

**Dendritische Glykopolymere und deren
Polyelektrolytkomplexe als effiziente Drug-Delivery-Systeme
für die verzögerte Wirkstofffreisetzung aus
Calciumphosphatzement**

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

**der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden**

von

Dipl.-Chem. Christin Striegler

geboren am 09.05.1984 in Dresden

Eingereicht am 06.07.2016

Die Dissertation wurde in der Zeit von Januar 2010 bis
Juni 2016 am Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e. V. angefertigt.

Gutachter: **Prof. Dr. rer. nat. habil. Brigitte Voit**
 Prof. Dr. rer. nat. Michael Gelinsky

Tag der Verteidigung: 17.11.2016

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei meiner Doktormutter Prof. Dr. habil. Brigitte Voit und bei Dr. Dietmar Appelhans für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die sehr gute wissenschaftliche Betreuung bedanken. Die konstruktiven Diskussionen und Anregungen zur Bearbeitung unterschiedlichster Problematiken waren für die erfolgreiche Bearbeitung dieser Dissertation stets sehr hilfreich.

Ein weiterer Dank richtet sich an die zahlreichen Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Analytik für die umfangreichen analytischen Messungen und die Unterstützung bei der Auswertung und Interpretation der selten trivialen Messwerte. Ein besonderer Dank gilt dabei Dr. Hartmut Komber und Andreas Korwitz für die NMR-analytischen Untersuchungen und Dr. Susanne Boye für die Bestimmungen der diskussionsreichen Molmassen mittels SEC und AF4. Weiterhin danke ich Dr. Mikhail Malanin und der leider bereits verstorbenen Gudrun Adam für die Aufnahme der IR-Spektren.

Besonders danken möchte ich auch Andreas Janke für die zeitaufwändigen AFM-Untersuchungen und Leonhard Schellkopf für die nicht so einfachen TEM und cryo-TEM-Untersuchungen. Ebenso danke ich Dr. Martin Müller und Birgit Urban für die Bereitstellung der Polyelektrolytkomplexe und für die Untersuchung der Sekundärstruktur der Polyaminosäureketten. Anja Caspari danke ich für die DLS- und Zetapotentialmessungen, Marina Oelmann für die pH-abhängigen Titrationsen und Ulrich Oertel für die hilfreiche Unterstützung bei der Auswertung der UV/Vis-Spektren.

Christiane Effenberg möchte ich insbesondere für die umfangreiche Unterstützung bei den Komplexierungs- und Freisetzungsexperimenten danken. Ohne ihre Hilfe hätten die zahlreich benötigten Messreihen nicht bewältigt werden können.

An dieser Stelle gilt mein Dank den Kooperationspartnern des SFB/Transregio 79. Dabei sollen insbesondere Prof. Dr. Michael Gelinsky und Dr. Matthias Schumacher vom Zentrum für translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebe, sowie Prof. Dr. Katrin Susanne Lips und Dr. Stefan Lautenschläger von der Justus-Liebig-Universität Gießen für die sehr gute Zusammenarbeit und den lehrreichen interdisziplinären Austausch genannt werden.

Ein großer Dank geht vor allem auch an die ehemaligen und noch IPF-Kolleginnen und Kollegen Jan Stadermann, Robert Pöttsch, Jens Gaitzsch, Mohamed Yassin, Samaa Salem, Franka Ennen, Nicole Hauptmann, Sandra Tripp, Maria Riedel, Jörg Kluge, Hannes Gumz,

Johannes Fingernagel, David Simon und Bettina Mamitzsch, um nur einige zu nennen, mit denen ich in der Zeit am IPF in diversen Kaffee- und Mittagspausen und bei gelegentlichen Ausflügen und Treffen so viel Spaß hatte.

Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meinem Mann Sascha und meinem Sohn Ben, meiner Familie und meinen Freunden Matthias und Antje für ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht bedanken! Sie haben diese Arbeit erst wirklich möglich gemacht!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis.....	IV
1. Einleitung und Motivation.....	1
2. Grundlagen	4
2.1 Multiples Myelom	4
2.2 Potentielle Wirkstoffe zur Behandlung bei Multiplm Myelom	5
2.2.1 Statine.....	5
2.2.2 Bisphosphonate	6
2.2.3 Proteasominhibitoren	7
2.3 Knochenersatzmaterialien (KEM).....	9
2.3.1 Biologische Knochenersatzmaterialien	9
2.3.2 Synthetische Knochenersatzmaterialien.....	11
2.3.3 Komposite	19
2.4 KEM als Drug-Delivery-Systeme (DDS).....	20
2.5 Dendritische Polymere.....	28
2.6 Dendritische Glykopolymere.....	31
2.7 Kern-Schale-Architekturen mit Aminosäure-/Peptidschalen	34
3. Zielstellung	39
4. Ergebnisse und Diskussion	42
4.1 Synthese und Charakterisierung der wasserlöslichen Kern-Schale-Architekturen ...	42
4.1.1 Hochverzweigtes Polyethylenimin.....	42
4.1.2 Synthese der <i>N</i> -Carboxyanhydride.....	43
4.1.3 NCA-Polymerisation	45
4.1.4 Hydrolyse der Benzylester	54
4.1.5 Reduktive Aminierung	61
4.2 Untersuchungen zum Verhalten in wässriger Lösung.....	67
4.2.1 pH-Wert-abhängiger Ladungszustand.....	67
4.2.2 Dynamische Lichtstreuexperimente	69
4.2.3 Rasterkraftmikroskopie	73
4.2.4 Transmissionselektronenmikroskopie	75
4.2.5 Strukturbeschreibung der Kern-Schale-Architekturen.....	77

4.3	Komplexierungs- und Freisetungsverhalten von Bortezomib in wässriger Lösung	81
4.3.1	Ultrafiltration.....	82
4.3.2	Voruntersuchungen	83
4.3.3	Wirkstoffkomplexierung in die Kern-Schale-Architekturen.....	85
4.3.4	Wirkstoffkomplexierung in Polyelektrolytkomplexe.....	92
4.3.5	Wirkstofffreisetzung.....	100
4.4	Komplexierungs- und Freisetungsverhalten von Bortezomib im Calciumphosphatzement.....	101
4.4.1	Freisetzung BZM, Copolymer und PEK aus CPC	103
4.4.2	Freisetzung BZM aus BZM/Copolymer/CPC und BZM/PEK/CPC.....	107
4.5	Kooperationsarbeiten.....	113
5.	Zusammenfassung und Ausblick	118
6.	Experimenteller Teil	126
6.1	Geräte und Verfahren	126
6.2	Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	130
6.2.1	Übersicht	130
6.2.2	Hochverzweigtes Polyethylenimin.....	131
6.3	Synthesen.....	132
6.3.1	Synthese der <i>N</i> -Carboxyanhydride.....	132
6.3.2	NCA-Polymerisation	133
6.3.3	Hydrolyse	135
6.3.4	Reduktive Aminierung	137
6.3.5	Markierung mit Rhodamin B-Isothiocyant	141
6.4	Strömungspotentialtitration und Zetapotentialmessung	142
6.5	Herstellung Polyelektrolytkomplexe	142
6.6	Ultrafiltrationsexperimente.....	143
6.6.1	Voruntersuchungen	143
6.6.2	Wirkstoffkomplexierung	144
6.6.3	Wirkstofffreisetzung.....	145
6.7	Calciumphosphatzementexperimente	147
6.7.1	Herstellung der Calciumphosphatzementplättchen.....	147
6.7.2	Beladung der Zementplättchen.....	147
6.7.3	Wirkstoff- und Copolymerfreisetzung	149

6.8	Dynamische Lichtstreuexperimente	150
6.8.1	Kern-Schale-Architekturen	150
6.8.2	Copolymer/BZM-Komplexe	150
6.8.3	Polyelektrolytkomplexe, PEK/BZM-Komplexe	151
7.	Anhang	153
8.	Literaturverzeichnis.....	171
	Abbildungsverzeichnis	184
	Tabellenverzeichnis	191
	Publikationsliste	193
	Versicherung	195

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

β -BLA-NCA	L-Asparaginsäure- β -benzylester- <i>N</i> -carboxyanhydrid
γ -BLG-NCA	L-Glutaminsäure- γ -benzylester- <i>N</i> -carboxyanhydrid
AF4	asymmetrische Flussfeldflussfraktionierung
AFM	Atomic Force Microscopy, Rasterkraftmikroskopie
APS	Aminopropyldimethylmonoethoxysilan
ATP	Adenosintriphosphat
ATR-FT-IR	Attenuated Total Reflectance Fourier Transformed Infrared, abgeschwächte Totalreflexion-Fouriertransformation-Infrarot
ATRP	atom transfer radical polymerisation; radikalische Atomtransfer polymerisation
BLG	L-Glutaminsäure- γ -benzylester
BMP	bone morphogenic protein; Knochen-Morphogenese-Protein
BZM	Bortezomib
CaP	Calciumphosphat
CD	Circular Dichroism, Zirkulardichroismus
CDHA	Calciumdefizitärer Hydroxylapatit
CPC	Calciumphosphatzement
CS	Zellulosesulfat
DB	degree of branching, Verzweigungsgrad
DCA	Dichloressigsäure
DCPA	Calciumhydrogenphosphat-Anhydrid
DDS	Drug-Delivery-System, Wirkstoffträgersystem
DKM	Demineralisierte Knochenmatrix
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMF	Dimethylformamid
DMSO- d_6	Deutertes Dimethylsulfoxid
DP	degree of polymerisation, Polymerisationsgrad
DS	degree of substitution, Substitutionsgrad
EDA-Cell	Ethylendiamin-Zellulose
EI	Ethylenimin
HA	Hydroxylapatit
KEM	Knochenersatzmaterial

LM	Lösungsmittel
LS	Lichtstreuung
MSC	mesenchymal stem cells, mesenchymale Stammzellen
MWCO	molecular weight cut-off, Molmassenausschlussgrenze
NCA	<i>N</i> -Carboxyanhydrid
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Kernspinresonanz
NMRP	nitroxide-mediated radical polymerisation, Nitroxid-vermittelte radikalische Polymerisation
PBLG	Poly- γ -benzyl-L-glutaminsäureester
PBS	Phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykolsäure
PEI	Polyethylenimin
PEI-Mal	Polyethylenimin-Maltose
PEI-PAsp	Polyethylenimin-poly-L-asparaginsäure
PEI-PAsp-Lac	Polyethylenimin-poly-L-asparaginsäure-Laktose
PEI-PAsp-Mal	Polyethylenimin-poly-L-asparaginsäure-Maltose
PEI-PBLA	Polyethylenimin-poly- β -benzyl-L-asparaginsäureester
PEI-PBLG	Polyethylenimin-poly- γ -benzyl-L-glutaminsäureester
PEI-PGlu	Polyethylenimin-poly-L-glutaminsäure
PEI-PGlu-Lac	Polyethylenimin-poly-L-glutaminsäure-Laktose
PEI-PGlu-Mal	Polyethylenimin-poly-L-glutaminsäure-Maltose
PEK	Polyelektrolytkomplex
PES	Polyethersulfon
PLGA	Poly(milchsäure-co-glykolsäure)
PMMA	Polymethylmethacrylat
RAFT	reversible addition-fragmentation chain transfer, Reversible Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragung
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand
rdMSC	reaming debris mesenchymal stem cells, aus dem Knochen-Bohrmehl gewonnene mesenchymale Stammzellen
Rh B-SCN	Rhodamin B-Isothiocyanat
RI	refractive index, Brechungsindex
ROMP	ring-opening metathesis polymerisation, Ringöffnungsmetathese

	Polymerisation
RT	Raumtemperatur
SEC	size exclusion chromatography, Größenausschlusschromatographie
SEM	scanning electron microscopy, Rasterelektronenmikroskopie
TCP	Tricalciumphosphat
(Cryo-)TEM	(Kryogene) Transmissionselektronenmikroskopie
TNF	Tumornekrosefaktor
UV/Vis	ultraviolet-visible, ultraviolet-sichtbar
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WS	Wirkstoff
WW	Wechselwirkung
Abs	Absorption
c	Konzentration
c _{Stamm}	Konzentration Stammlösung
d	Schichtdicke
D	dendritisch
D _h	hydrodynamischer Durchmesser
Đ	Dispersität M_w/M_n
I ₀	Intensität eingestrahktes Licht
I	Intensität austretendes Licht
L	linear
m	Masse
m	Multipllett
M	Molmasse
M ₀	Molmasse Monomer
M _n	zahlenmittlere Molmasse
M _{th}	theoretische Molmasse
M _w	gewichtsmittlere Molmasse
n	Stoffmenge
pK _a	Säurekonstante
R _h	hydrodynamischer Radius
rpm	rotations per minute, Rotationen pro Minute
s	Singulett
t	Triplet

T	terminal
ϵ	molarer Absorptionskoeffizient
λ	Wellenlänge

1. Einleitung und Motivation

Aufgrund der wachsenden Bevölkerung und der zunehmenden Lebenserwartung nimmt die Zahl an Krebserkrankungen weltweit stetig zu, wobei Lungenkrebs, Brustkrebs und Darmkrebs die häufigsten bösartigen (malignen) Tumorerkrankungen darstellen.¹ Im fortgeschrittenen Stadium der Krebserkrankung kann es zur Ausbreitung der Tumoren im gesamten Körper kommen. Dabei werden die malignen Zellen über die Blut- und Lymphbahnen in andere Gewebe transportiert, wo sie sich ansiedeln und vermehren. Dieses Phänomen bezeichnet man als Metastasierung. Findet eine Metastasierung in den Knochen statt, so spricht man von sekundären malignen Knochentumoren. Knochenkrebs² kann jedoch auch direkt im Knochen bzw. Knochenmark entstehen. Im Vergleich zu anderen Krebsarten sind solche primär malignen Knochentumoren (Sarkome) sehr selten. Während die am häufigsten auftretenden Sarkome, dazu gehören das Osteosarkom, das Ewing-Sarkom und das Chondrosarkom, bereits erfolgreich geheilt werden können, ist das multiple Myelom bisher in den meisten Fällen eine tödlich verlaufende maligne Knochenerkrankung. Jährlich erkranken etwa 6 von 100.000 Personen in der europäischen Union neu am multiplen Myelom, wobei mehr Männer als Frauen betroffen sind. Etwa die Hälfte der betroffenen Personen ist zum Zeitpunkt der Diagnose bereits älter als 65 Jahre und nur etwa 1 % jünger als 40 Jahre.³ Beim multiplen Myelom vermehren sich im Knochenmark in hohem Maße unkontrolliert entartete Plasmazellen. Diese Myelomzellen unterdrücken einerseits die Bildung von normalen Plasmazellen und beeinflussen andererseits empfindlich das Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und -abbau. Somit ergeben sich aus der Erkrankung nicht nur die Bekämpfung der Knochentumoren selbst, sondern auch die Behandlung der dabei auftretenden Knochenresorption und damit verbundene mögliche Frakturen. Je nach Alter, Gesundheitszustand und Stadium der Myelomerkrankung ist eine individuelle Therapie für jeden einzelnen Patienten erforderlich. Neben der üblichen Chemo- und Strahlentherapie rücken innovative Medikamente, wie Proteasominhibitoren und Bisphosphonate in den Fokus der Behandlung. Diese reduzieren das Myelomzellwachstum bzw. wirken hemmend auf den Knochenabbau. Dadurch können einerseits die Symptome während des Krankheitsverlaufes gemindert werden. Andererseits wird durch das Einbeziehen der neuen Medikamente in die Therapie eine Verlängerung der Lebenszeit erzielt. Die Verabreichung der Medikamente erfolgt hauptsächlich oral oder intravenös. Dadurch werden die Wirkstoffe über die Blutbahn im gesamten Körper transportiert und können somit auch auf gesundes Gewebe wirken. Je nach Dosis und Dauer der Einnahme zeigen Bisphosphonate und Proteasominhibitoren nicht

zu vernachlässigende Nebenwirkungen, welche entweder eine Reduktion der niedrigsten wirksamen Dosis oder die Wahl einer effektiveren Verabreichungsmethode nötig machen. Die beim multiplen Myelom durch Knochenresorption auftretenden Knochendefekte können operativ durch Knochenersatzmaterialien aufgefüllt und stabilisiert werden. Insbesondere die Anwendung von Knochenzementen, wie Calciumphosphatzemente in Form von mischbaren Pulvern und injizierbaren Pasten, ermöglichen ein Einmischen der Wirkstoffe direkt in das Knochenersatzmaterial. Durch das Auffüllen des defekten Knochens mit dem wirkstoffbeladenen Knochenzement ist eine gezielte Freisetzung des Wirkstoffes direkt am Wirkort möglich. Diese Art der Verabreichungsmethode ermöglicht zudem eine wesentliche Reduktion der Wirkstoffdosis und somit eine schonendere Therapie der Myelompatienten mit bereits ausgeprägter Knochenresorption. Weiterhin können durch Modifizierung der Zusammensetzung des CPCs einerseits die benötigten physikalischen, biologischen und chemischen Eigenschaften für den zu behandelnden Knochen variiert werden. Andererseits kann dadurch auch die Freisetzungskinetik des Wirkstoffes aus dem Zement angepasst werden. Trotz dessen wird oftmals nicht das optimale Wirkstofffreisetzungsprofil für die erforderliche Therapie erreicht. Insbesondere für Langzeittherapien ist es wichtig, dass der Wirkstoff zunächst innerhalb kurzer Zeit in einer entsprechend hohen Wirkdosis und anschließend über einen längeren Zeitraum in geringeren Dosen freigesetzt wird. Diese Tatsache macht es erforderlich ein weiteres System in den CPC zu integrieren, ohne die Eigenschaften des Zementes signifikant zu verändern und gleichzeitig die Freisetzung des Wirkstoffes zu verbessern.

In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl an Drug-Delivery-Systemen auf Basis von Polymeren entwickelt, um Wirkstoffe effizient an den vorgesehenen Wirkort zu transportieren und dadurch deren Wirksamkeit und Verträglichkeit im physiologischen System zu verbessern. Polymere können in den unterschiedlichsten Strukturen hergestellt und passgenau für den jeweiligen Wirkstoff modifiziert werden. Dendritische Polymere, wie perfekt verzweigte Dendrimere und hochverzweigte Polymere, erweisen sich aufgrund ihrer globularen Struktur und der Vielzahl an funktionellen Gruppen in der Peripherie als besonders geeignete Wirkstoffträgersysteme. In den letzten Jahren wurden insbesondere Polypropylenimin-, Polyamidoamin-Dendrimere und hochverzweigtes Polyethylenimin hinsichtlich ihrer Synthese und ihrer charakteristischen Eigenschaften intensiv untersucht. Ein entscheidendes Kriterium für den Einsatz dieser dendritischen Polymere als Wirkstoffträger im physiologischen System ist deren Biokompatibilität. Aufgrund der hohen Anzahl an Aminogruppen besitzen diese Polyamine über einen großen pH-Bereich eine positive

Oberflächenladung und sind somit in der Lage mit negativ geladenen biologischen Membranen in Wechselwirkung zu treten. Solche ionischen Interaktionen führen i. d. R. zur Zerstörung gesunder Zellen.⁴ Durch Modifizierung der peripheren Gruppen mit biokompatiblen Einheiten, wie Sacchariden oder Aminosäuren, wird die Biokompatibilität der dendritischen Strukturen signifikant erhöht. Dabei ermöglicht die Anbindung von Saccharideinheiten eine spezifische Bindung dieser dendritischen Glykopolymere an Rezeptoren auf Membranoberflächen und somit ihre Aufnahme in die Zellen.⁵ Weiterhin wird nichtkollagenen Proteinen eine entscheidende Rolle bei der Biomineralisation von Knochen zugesprochen. Dazu gehört das Glykoprotein Bone-Sialoprotein (BSP), welches einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren (Glutaminsäure und Asparaginsäure) in der Polypeptidkette aufweist. Diese Aminosäuren können die Keimbildung und das Wachstum der Hydroxylapatitkristalle beeinflussen.^{6, 7} Aus der Literatur sind bisher Drug-Delivery-Systeme auf der Basis von dendritischen Polyaminen modifiziert mit Saccharideinheiten oder Peptidketten bekannt. Von erhöhtem Interesse im Hinblick auf die Knochenregeneration sind jedoch innovative Wirkstoffträgersysteme, die alle drei Komponenten und somit die Eigenschaften dendritischer Polymere mit denen von Sacchariden und Polypeptiden vereinen.

2. Grundlagen

2.1 Multiples Myelom

Das Multiple Myelom ist eine bösartige Knochenkrebskrankung, bei der es zu einer unkontrollierten Vermehrung entarteter, antikörperbildender Plasmazellen im Knochenmark kommt. Beim gesunden Menschen entwickeln sich aus Knochenmarkstammzellen B-Lymphozyten (B-Zellen), eine Vorstufe der Plasmazellen.⁸ Nach Reifung und Kontakt mit Antigenen werden die aktivierten B-Zellen zur Proliferation (Vermehrung) und Differenzierung angeregt. Dabei entstehen letztendlich ausdifferenzierte Plasmazellen, welche antigenspezifische Antikörper, sogenannte Immunglobuline, produzieren. Man unterscheidet fünf Hauptklassen der Immunglobuline, wobei eine spezifische Plasmazelle nur eine der Immunglobulinklassen produzieren kann. Beim Multiplen Myelom kommt es hingegen zu einer starken Veränderung des genetischen Materials des B-Lymphozyten.⁹ Aus dieser B-Zelle entstehen entartete Plasmazellen, welche sich unkontrolliert vermehren und in hohem Maße Bruchstücke bzw. komplette Antikörper einer Immunglobulinklasse produzieren. Dieses monoklonale Immunglobulin, auch M- oder Paraprotein genannt, ist jedoch nicht richtig funktionstüchtig und kann somit seine Aufgabe der Infektionsabwehr nicht mehr erfüllen. Zudem wird die Produktion normal funktionierender Immunglobuline durch das M-Protein eingeschränkt, wodurch zusätzlich das Immunsystem des Myelompatienten geschwächt wird. Neben der erhöhten Neigung zu Infekten sind Anämie, eine Einschränkung der Nierenfunktion, ein erhöhter Kalziumgehalt im Blut (Hyperkalzämie), Knochenschmerzen und osteolytische Läsionen typische klinische Manifestationen.³ Entscheidend für das Multiple Myelom ist nicht nur die Entartung der Plasmazellen, sondern auch die Mikroumgebung im Knochenmark, in dem sich die Myelomzellen entwickeln und vermehren.¹⁰ Aufgrund von spezifischen Adhäsionsmolekülen sind Myelomzellen in der Lage im Knochenmark an Stromazellen zu binden.² Dadurch werden sowohl von den Myelomzellen als auch von den Stromazellen vermehrt Zytokine (u. a. Interleukine (speziell Interleukin 6), Tumornekrosefaktoren (TNF), Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand (RANKL) und Wachstumsfaktoren, wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und andere myelomzellen- bzw. osteoklastenstimulierende Faktoren gebildet. Diese führen zum einen zu einer erhöhten Tumorzellenvermehrung und andererseits zu einer erhöhten Knochenresorption, wobei gleichzeitig die Osteoblastenaktivität, also der Knochenaufbau, gehemmt ist.^{2, 3, 10-12} Je nach Typ und Schwere der Erkrankung und dem Alter des Patienten

gibt es verschiedene Therapieansätze zur Behandlung des Multiplen Myeloms.¹³⁻¹⁶ Dabei sollen zum einen die Myelomzellen selbst bekämpft und andererseits die durch das Multiple Myelom verursachten Knochenleiden verhindert bzw. behandelt werden. Bei Patienten jünger als 70 Jahre und einem allgemein guten Gesundheitszustand gilt die Hochdosis-Chemotherapie mit Zytostatika und anschließender autologer Stammzelltransplantation als Standardtherapie zur Reduktion der Tumorzellmasse. Weiterhin kommen verschiedene Wirkstoffe einzeln oder in Kombination mit anderen Substanzen in unterschiedlichen Therapiephasen zum Einsatz. Insbesondere die Verabreichung neuerer Substanzen, wie Proteasominhibitoren (Bortezomib und Carfilzomib) und immunmodulatorische Wirkstoffe (Thalidomid, Lenalidomid und Pomalidomid) erhöht die Ansprechrate auf die Chemotherapie und dessen Wirksamkeit. Außerdem verlängern sie die Remission, d. h. das temporäre oder dauerhafte Nachlassen der durch das Myelom verursachten Symptome, und die Überlebenszeit der Patienten. Bisphosphonate werden speziell zur Vermeidung bzw. Behandlung der Knochenresorption durch das multiple Myelom eingesetzt, wodurch das Risiko von Frakturen während der Erkrankung wesentlich gesenkt werden kann.

2.2 Potentielle Wirkstoffe zur Behandlung bei Multiplem Myelom

2.2.1 Statine

Cholesterin wird nicht nur über die Nahrung aufgenommen, sondern zu einem großen Teil vom Körper selbst gebildet. Ein erhöhter Cholesterinspiegel kann u. a. das Risiko von Herz-Kreislauf-Erkrankungen steigern. Um den Cholesterinspiegel zu senken werden häufig Statine angewendet. Sie gehören zur Substanzklasse der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA)-Reduktase-Inhibitoren und reduzieren durch die Hemmung des Enzyms HMG-CoA-Reduktase die Cholesterinbiosynthese. Statine wirken aber nicht nur cholesterinsenkend sondern beeinflussen auch die Knochenneubildung bei krankheitsbedingten Knochendefekten. Lipophile Statine (**Abbildung 2.1**), wie Mevastatin, Fluvastatin, Simvastatin und Lovastin, erhöhen die Expression des Knochen-Morphogenese-Proteins BMP-2. Daraus resultieren eine verstärkte Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu knochenbildenden Osteoblasten und eine erhöhte Proliferation der Osteoblasten. Dieser Effekt konnte jedoch für hydrophile Statine, wie Pravastatin, nicht bestätigt werden. Weiterhin wurde für die Statine Simvastatin, Mevastatin und Pitavastatin eine Hemmung der Osteoblastenapoptose (programmierter Zelltod der Osteoblasten) festgestellt. Außerdem reduzieren Statine die Osteoklastogenese und somit die Anzahl an knochenabbauenden Osteoklasten. Eine erhöhte Dosis von Statinen

im Vergleich zur klinisch üblichen Dosis durch orale oder intravenöse Verabreichung hat eine positive Wirkung auf die Knochenregeneration, kann aber auch verstärkt zu Nebenwirkungen führen. Deshalb werden lokale Behandlungen von Knochendefekten mit statinbeladenen Knochenersatzmaterialien in Form von festen Trägergerüsten, Mikrokugeln oder injizierbaren Hydrogelen mit niedrigerer Wirkstoffdosis untersucht.¹⁷

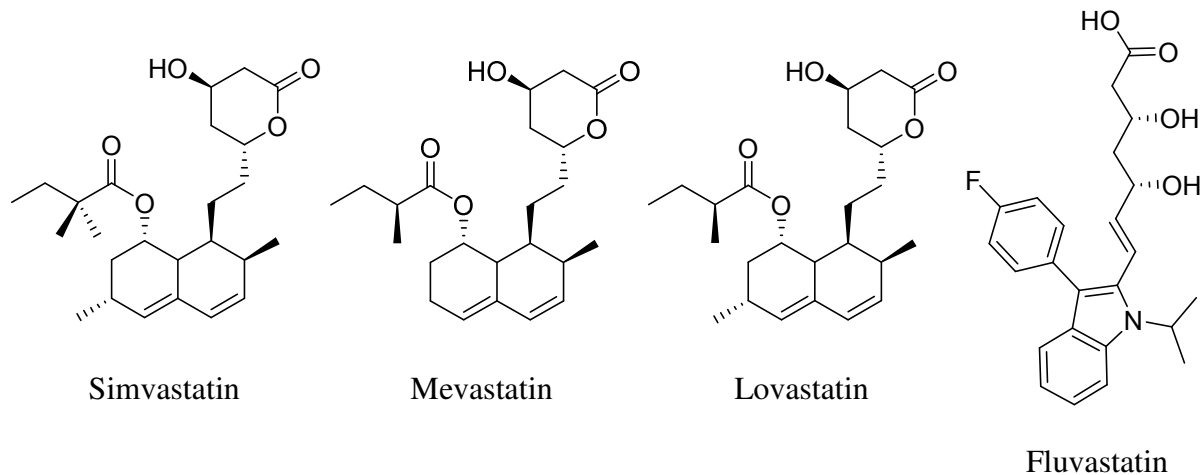


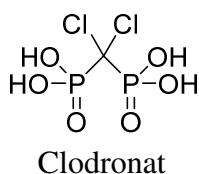
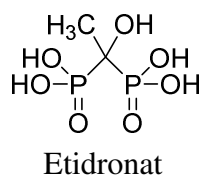
Abbildung 2.1: Lipophile Statine.

2.2.2 Bisphosphonate

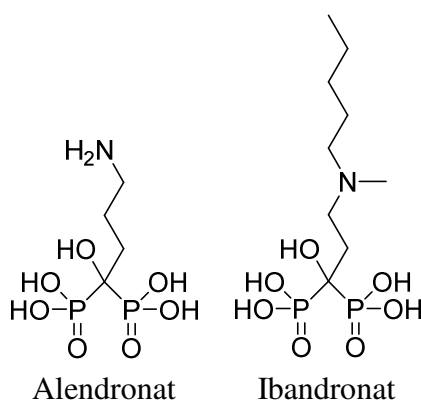
Die Wirkstoffgruppe der Bisphosphonate wird in der Medizin zur Reduzierung eines krankhaft gesteigerten Knochenabbaus bei Erkrankungen wie Osteoporose, osteolytische Knochenmetastasen und tumorassoziierter Hyperkalzämie eingesetzt. Bisphosphonate sind Analoga der Pyrophosphate, wobei die Brücke zwischen den Phosphonatgruppen nicht ein Sauerstoffatom sondern ein Kohlenstoffatom bildet. Dadurch sind die Bisphosphonate metabolisch stabil und werden nicht wie die Pyrophosphate enzymatisch abgebaut. Besteht eine Seitengruppe des Kohlenstoffatoms aus einer Hydroxylgruppe wird die Bindungsaffinität des Wirkstoffes zum Knochen erhöht. Je nachdem, ob in der anderen Seitenkette ein Stickstoffatom vorhanden ist, wirken die Bisphosphonate über verschiedene Mechanismen hemmend auf die Bildung der Osteoklasten bzw. auf die Knochenresorption. Dadurch überwiegt der Knochenaufbau durch die Osteoblasten. Allgemein unterscheidet man die Bisphosphonate nach drei Generationen (**Abbildung 2.2**). Zur ersten Generation gehören Bisphosphonate mit aliphatischen Seitenketten oder Halogenen, wie Etidronat oder Clodronat. Diese Wirkstoffe besitzen die geringste Wirkpotenz, d. h. es muss eine hohe Dosis des Wirkstoffes für eine effektive Therapie verabreicht werden. Bisphosphonate der zweiten Generation (u. a. Pamidronat, Alendronat und Ibandronat) besitzen in der Seitenkette eine Aminogruppe. Bei der dritten Generation besteht die Seitenkette aus einem stickstoffhaltigen

Heterozyklus, wodurch diese Bisphosphonate die höchste Wirkpotenz besitzen. Dazu gehören z. B. Risedronat und Zoledronat. Insbesondere bei fortgeschrittenem Knochenbefall mit malignen Tumoren (multiples Myelom, Mammakarzinom) kommt es zu einer erhöhten Osteoklastenaktivität und somit zu einer starken Resorption der Knochensubstanz. Der verstärkte Knochenabbau führt zu einem erhöhten Kalziumspiegel im Blut, der sogenannten Hyperkalzämie. Durch die Langzeiteinnahme von Bisphosphonaten in regelmäßigen Abständen kann dieser tumorbedingten Hyperkalzämie entgegengewirkt und signifikant das Risiko von Knochenfrakturen gesenkt werden. Beim multiplen Myelom wird insbesondere Zoledronat eingesetzt. Es schützt nicht nur den Knochen vor Resorption und Frakturen, sondern zeigt zudem eine effektive Wirkung gegen die Knochentumorzellen. Trotz der knochenschützenden Wirkung können bei der Behandlung mit Bisphosphonaten schwerwiegende Nebenwirkungen, wie bisphosphonatassoziierte Kieferosteonekrosen oder einer Beeinträchtigung der Nierenfunktion auftreten. Daher ist eine genaue Überwachung der Therapie und bei Bedarf eine Reduzierung der Dosis bzw. ein Abbruch der Therapie mit Bisphosphonaten nötig.^{3, 18, 19}

1. Generation



2. Generation



3. Generation

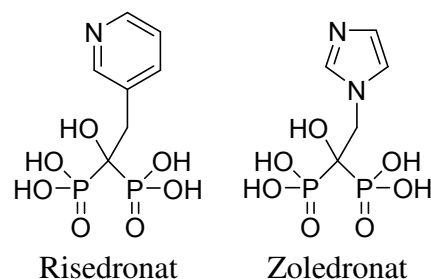


Abbildung 2.2: Bisphosphonate der ersten, zweiten und dritten Generation.

2.2.3 Proteasominhibitoren

Proteasomen sind katalytische Komplexe im Zellkern und Zytoplasma eukaryotischer Zellen, welche strukturell geschädigte bzw. nicht mehr benötigte Proteine abbauen. Dieser streng regulierte Proteinabbau ist ein wichtiger Mechanismus für essentielle Zellfunktionen, wie die Zellzyklusprogression, die Gentranskription und die Apoptose. Wird jedoch die Funktion der Proteasomen gehemmt, sammeln sich abzubauen Proteine in der Zelle an. Dadurch kann der Stoffwechsel in der Zelle nicht mehr reguliert werden und es kommt letztlich zum Zelltod.

Bortezomib (**Abbildung 2.3**) ist der erste Proteasominhibitor, welcher sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine hohe Wirksamkeit gegen Myelomzellen zeigte. Verschiedene Studien belegten dabei eine signifikante Reduktion von Zytokinen, welche für das Myelomzellwachstum, die Osteoklastenfunktion und die Knochenresorption verantwortlich sind. Zudem wurde durch Bortezomib eine gesteigerte Osteoblastenaktivität festgestellt, wodurch der Knochenaufbau begünstigt wird. Maligne Zellen reagieren auf die Hemmung der Proteasomen wesentlich empfindlicher als gesunde Zellen. Während also die malignen Zellen absterben sind die gesunden Zellen in der Lage sich wieder zu regenerieren. Die Zellregeneration der nichtmalignen Zellen kann jedoch nur erfolgen, wenn durch das Bortezomib maximal 80 % der Proteasomen reversibel gehemmt werden.^{3, 20-22}

Das von Millennium Pharmaceuticals als Velcade® vertriebene Bortezomib ist ein dipeptidisches Boronsäurederivat. Es besteht strukturell aus einer Pyrazinoyl-, einer Phenylanyl- und einer L-Boronoleucin-Einheit, welche über Peptidbindungen miteinander verbunden sind. Die Synthese des Wirkstoffes erfolgt zunächst über das stabile trimere Boronsäureanhydrid, welches mit dem Hilfsstoff Mannitol zu einem Diester umgesetzt wird. Die für die Behandlung des multiplen Myeloms aktive Form des Bortezomibs wird durch Lösen des Diesters in Kochsalzlösung erhalten.²³

Neben der potenten Wirkung bei multiplm Myelom weist Bortezomib jedoch auch schwerwiegende Nebenwirkungen auf. So kommt es häufig zu einer peripheren Neuropathie, d. h. einer Nervenschädigung insbesondere in Händen und Füßen. Proteasominhibitoren der zweiten Generation, wie Carfilzomib (**Abbildung 2.3**), zeigen im Vergleich zu Bortezomib weniger stark ausgeprägte Nebenwirkungen und zudem eine höhere Wirksamkeit.^{3, 16}

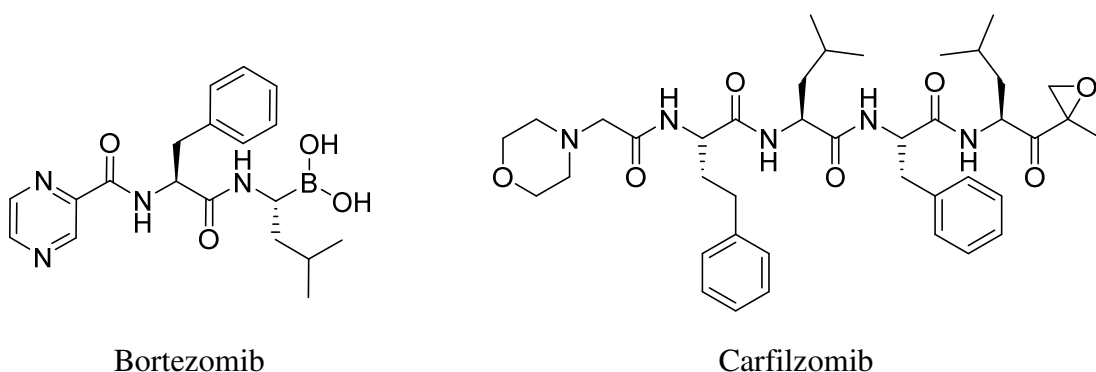


Abbildung 2.3: Proteasominhibitoren der ersten Generation (Bortezomib) und der zweiten Generation (Carfilzomib).

2.3 Knochenersatzmaterialien (KEM)

Der Knochen ist ein bemerkenswertes lebendes Gewebe, das verschiedene Schlüsselfunktionen im Körper übernimmt. Neben der Stützfunktion und dem Schutz der Organe ist es am Stoffwechsel verschiedener Mineralstoffe, wie zum Beispiel Calcium, beteiligt. Weiterhin findet im Knochenmark primär die Bildung von Blutzellen statt. Aufgrund der verschiedenen Funktionen wird eine ständige Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen benötigt.²⁴ Im Gegensatz zu anderen Körpergeweben ist der Knochen in der Lage kleinere Defekte und Frakturen durch Selbstheilung zu regenerieren. Kommt es hingegen zu größeren Knochendefekten oder pathologischen Frakturen kann die Funktion des Knochens nur durch chirurgische Rekonstruktion wieder hergestellt werden.²⁵ Bereits vor über 100 Jahren wurden sowohl körpereigene (autogen) als auch körperfremde (allogen – menschlich, xenogen – tierisch) Knochen transplantiert.^{26, 27} 1881 berichtete Sir William Macewen von einer erfolgreichen allogenen Knochentransplantation zur Wiederherstellung eines menschlichen Oberarmknochens.²⁸ Neben menschlichem bzw. tierischem Spenderknochen können weitere biologische und auch synthetische Materialien als Knochenersatzmaterialien (KEM) für die Auffüllung des Knochendefektes bzw. die Knochenregeneration eingesetzt werden. Ein ideales KEM sollte sowohl osteogen (Knochenneubildung durch Osteoblasten), osteokonduktiv (Knochenwachstum am Leitgerüst), osteoinduktiv (Anregung Knochenneubildung durch Differenzierung knochenbildender Zellen) als auch osteointegrativ (strukturelle und funktionale Verbindung zwischen KEM und Knochen) sein.^{29, 30} Zusätzlich sind eine hohe Biokompatibilität und –resorbierbarkeit sowie eine strukturelle Ähnlichkeit zum Knochen erforderlich. Das Knochenersatzmaterial sollte einfach handhabbar und kosteneffektiv sein.³¹ Im Folgenden werden die KEM nach ihrer Herkunft in drei Gruppen unterteilt:

2.3.1 Biologische Knochenersatzmaterialien

Autogenes Transplantat

Bei der autogenen Transplantation wird körpereigenes Gewebe für die Rekonstruktion des defekten Knochens verwendet. In der modernen Medizin gelten autogene Transplantate als „Goldstandard“. Sie verfügen über eine hohe osteogene Kapazität und ein osteokonduktives Gerüst mit lebenden Zellen und Proteinen für eine optimale Defektheilung ohne eine Abstoßungsreaktion auszulösen. Nachteilig allerdings sind unter anderem die begrenzte Verfügbarkeit an transplantierbarem Knochen und die weitere benötigte Operation für die

Entnahme des Transplantats und die damit verbundenen möglichen Komplikationen (erhöhtes Infektions- und Frakturrisiko, Nervenschädigungen, Hämatome).^{24, 32}

Allogenes Transplantat

Allogene Knochentransplantate werden von einem Individuum der gleichen Spezies gewonnen. Dabei handelt es sich entweder um Lebendspenden oder posthum entnommenes Knochenmaterial. Die Transplantate von Lebendspendern stammen meist aus klinikeigenen Knochenbanken. Die posthum entnommenen Knochenmaterialien werden hingegen von Unternehmen aufbereitet und kommerziell vertrieben. Die allogenen Knochentransplantate werden in unterschiedlichen Formen aus kortikalem Knochen (kompaktes Knochengewebe), der Spongiosa (schwammartiges Innenknochengewebe) oder kortikospongiossem Knochen bereitgestellt. Es werden sowohl vollständige Knochensegmente als auch Spongiosachips, Spongiosablöcke und Granulate transplantiert. Die Transplantation allogener Knochen birgt jedoch einige Risiken. Es können Autoimmunerkrankungen auftreten, Krankheits-erregerübertragungen oder virale Infektionen mit dem humanen Immundefizienz-Virus oder Hepatitis B/C erfolgen. Um diese Risiken zu vermeiden, werden nur sehr selten Frischtransplantate verwendet. Durch Einfrieren bzw. Gefriertrocknen der allogenen Knochen werden Immunreaktionen gegen das Transplantat reduziert und biologische und biochemische Eigenschaften nur teilweise beeinflusst. Zusätzlich können weitere Sterilisationstechniken wie zum Beispiel gamma-Bestrahlung angewendet werden. Jedoch nehmen mit einer aggressiveren Konservierungs- und Sterilisationsbehandlung der Transplantate ihre osteoinduktiven Eigenschaften stark ab, da wichtige Knochenzellen zerstört und Proteine denaturiert werden. Zusätzlich verschlechtern sich auch die Osteokonduktivität und die mechanischen Eigenschaften im Vergleich zu frischen Transplantaten. Trotz der Aufbereitung des Knochengewebes besteht immer ein Restrisiko Krankheiten an den Empfänger zu übertragen.^{25, 29}

Neben den mineralisierten allogenen Transplantaten können auch demineralisierte Materialien zur Anwendung kommen. Demineralisierte Knochenmatrix (DKM) wird durch Dekalzifizierung des kortikalen Knochens hergestellt, wobei die trabekuläre Struktur erhalten bleibt. Aufgrund der Präparationsmethode verbleibt eine hohe Anzahl an Wachstumsfaktoren in der Matrix. Dadurch besitzt die DKM im Gegensatz zum mineralisierten Knochentransplantat sowohl osteokonduktive als auch osteoinduktive Eigenschaften. Allerdings resultiert aus der Demineralisierung eine schwache strukturelle Stabilität wodurch die DKM nur im strukturell stabilen Umfeld transplantiert werden kann.³¹ Aufgrund der

gravierenden Nachteile sind allogene Knochentransplantate nur bedingt gute Ersatzmaterialien im Vergleich zum autogenen Knochen.

Xenogene Transplantate

Bei Xenotransplantationen gehören Spender und Empfänger nicht der gleichen Spezies an. Der Spender ist ein Tier und der Empfänger ein Mensch. Xenogene Transplantate werden hauptsächlich von Rindern, Schweinen und Korallen gewonnen. Wie bei den allogenen Transplantaten besteht das Risiko immunologischer Abstoßungsreaktionen und der Krankheitsübertragung durch Bakterien, Viren oder Prionen. Bei bovinen Materialien kann es insbesondere zur Übertragung der bovinen spongiformen Enzephalopathie kommen. Deshalb wird während des Herstellungsverfahrens sämtliches organisches Material entfernt, was zu einem Verlust der osteogenen und osteoinduktiven Eigenschaften führt. Das zurückbleibende poröse Hydroxylapatit entspricht der mineralischen Struktur des menschlichen spongösen Knochens und dient lediglich als Leitstruktur für das Knochenwachstum.³³

Eines der wissenschaftlich am besten dokumentierten xenogenen Transplantate ist Bio-Oss® (Geistlich Pharma AG, Schweiz). Das bovine Hydroxylapatit zeichnet sich durch seine sehr guten mechanischen Eigenschaften (Langzeitstabilität) aus und besitzt eine vergleichbare Porengröße zum menschlichen Knochen.^{29, 31} Deproteiniertes Knochenmineral kann zusätzlich auch mit synthetisch hergestellten zellbindenden Peptiden beschichtet werden. Diese Peptide binden für den Knochenaufbau wichtige Zellen, welche analog dem natürlichen Mechanismus proliferieren und differenzieren.^{31, 34}

2.3.2 Synthetische Knochenersatzmaterialien

Metalle und Metalllegierungen

Metallische Implantate basierend auf rostfreiem Stahl, Titan bzw. Titanlegierungen und verschiedene Cobalt-Chrom-Legierungen werden seit Jahrzehnten bevorzugt in der Orthopädie (z. B. künstliche Hüft- und Kniegelenke, Bandscheibenprothese), Unfallchirurgie (z. B. Platten, Schrauben, Nägel), Zahnmedizin und Herz- und Gefäßchirurgie angewendet.³⁵ Aufgrund der hohen Zug- und Ermüdungsfestigkeit sind Metallimplantate stark mechanisch belastbar. Im Allgemeinen sind die heutzutage eingesetzten Metalle und Metalllegierungen korrosionsbeständig und finden Anwendung als Langzeitimplantate. Allerdings kann der Einsatz durch mögliche Metallionenfreisetzung im Körper limitiert werden. Es können toxische bzw. allergische Reaktionen durch Nickel, Cobalt und Chrom auftreten und diese

können sogar eine Karzinogenese bewirken.³⁶ Beim Einsatz von Metallimplantaten zur kurzzeitigen Fixierung von Frakturen ist eine zweite Operation zur Entfernung der stabilisierenden Platten, Schrauben und Nägel nötig. Um diese zusätzlichen Operationen und die damit verbundenen Unannehmlichkeiten für den Patienten und die zusätzlichen Kosten zu vermeiden, wird mittlerweile an biologisch abbaubaren Metallimplantaten geforscht, welche während der Frakturheilung durch Korrosion im physiologischen Milieu vollständig abgebaut werden. Dabei stehen speziell Magnesium und Magnesiumbasierende Legierungen im Fokus der Biomaterialwissenschaftler, da selbst hohe Mengen dieses Metalls vom Körper toleriert werden.^{35, 37, 38} Weiterhin spielen verschiedene molekulare und biologische Prozesse an der Implantat/Gewebe-Grenzfläche eine wichtige Rolle für eine erfolgreiche Integration des metallischen Implantats in das umgebende Gewebe. Für eine verbesserte Osseointegration, insbesondere von Langzeitimplantaten, werden die Oberflächen bioinertter Metallimplantate mittels mechanischer, chemischer oder physikalischer Methoden modifiziert und somit bioaktiviert.^{35, 39, 40} Neben den kompakten und wenig flexiblen Metallimplantaten werden seit kurzer Zeit intensiv Metallschäume (**Abbildung 2.4**) als potentieller Knochenersatz entwickelt.⁴¹ Neben den sehr guten mechanischen Eigenschaften und der hohen Flexibilität ermöglicht die poröse Struktur ein Einwachsen von Knochenzellen, Blutgefäßen und Nerven.



Abbildung 2.4: Metallschäume als Knochenersatzimplantate (Quelle: Modell eines metallischen Implantates, Fraunhofer IFAM Dresden).

Zur Herstellung metallischer Schäume eignen sich insbesondere Titan^{42, 43} und Tantal^{44, 45} aufgrund ihrer hohen Biokompatibilität und Korrosionsbeständigkeit. Auch Eisen und Magnesium werden in Form von Metallschäumen als bioabbaubarer Knochenersatz geprüft.^{46, 47} Darüber hinaus ist es möglich, Wirkstoffe über das metallische Implantat in das zu regenerierende Gewebe mit einzubringen. Dies kann z. B. über polymere oder keramische

Beschichtungen des Implantates, aber auch direkt über das Metall als Schaum bzw. als biologisch abbaubares Material erfolgen.³⁸

Polymere

Polymere für den Knochenersatz werden in natürliche und synthetische Polymere unterteilt. Zu den natürlichen Polymeren gehören u. a. Kollagen und Alginat, wobei Kollagen das am häufigsten verwendete Polymer ist. Von den 19 bekannten Kollagentypen sind jedoch nur Typ I, II und III für die Anwendung als Gerüstmaterial geeignet. Die Stabilität und die mechanischen Eigenschaften können dabei durch Vernetzung erhöht werden.⁴⁸ Synthetische Polymere für die Knochenregeneration sind hauptsächlich Polyetherketone, lineare, aliphatische Polyester (Polymilchsäure, Poly- ϵ -caprolacton), Polyurethane, Polyphosphazene oder auch Polyether (Polyethylenglykol, Polyethylenoxid). Bei diesen Polymeren unterscheidet man zusätzlich hinsichtlich der Biodegradierbarkeit. Zum Beispiel wird das biostabile Polymer Polymethylmethacrylat (PMMA) in Form des Knochenzements sowohl in der orthopädischen Chirurgie zur Fixierung von Gelenkprothesen als auch in der Zahnmedizin für Teil- bzw. Vollprothesen und Provisorien verwendet. Die toxischen Inhaltsstoffe (Monomer, Inhibitoren, Initiatoren etc.) können jedoch zu allergischen Reaktionen beim Patienten führen. Außerdem kommt es durch die exotherme Polymerisation zu einer Erhitzung auf über 40 °C an der Grenzschicht zwischen Knochen und Implantat. Diese kann zur Nekrose des umliegenden Gewebes und damit verbundenen Entzündungsreaktionen führen.^{48, 49} Polyester, wie Polyglykolid, Polymilchsäure und Copolymere aus diesen Materialien, sind resorbierbar und werden insbesondere als Schrauben und Stifte zur Fixierung von Knochenfrakturen eingesetzt. Die Abbaudauer kann dabei durch Variation des Molekulargewichtes, der Kristallinität und der Zusammensetzung der Copolymere eingestellt werden. Darüber hinaus können diese bioabbaubaren Polymere u. a. auch zur Herstellung von Nahtmaterial, Platten und Netzen verwendet werden.^{31, 48, 50}

Calciumphosphate und Calciumphosphatzemente

Calciumphosphate (CaP) sind Mineralien aus Calcium- und Phosphationen und gegebenenfalls Wasserstoff- bzw. Hydroxidionen. Man unterscheidet strukturell zwischen Ortho- (PO_4^{3-}), Pyro- ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) und Polyphosphaten ($(\text{PO}_3)_n^{n-}$), wobei Orthophosphate die Hauptmineral Komponente der Hartgewebe biologischer Systeme darstellen. Dabei handelt es sich speziell um kristallinen Apatit, dessen Ionen nicht stöchiometrisch in der Gitterstruktur angeordnet sind. Dieses „biologische Apatit“ besteht neben Calcium und Phosphat auch aus Natrium, Magnesium und Carbonat. In **Tabelle 2.1** sind die wichtigsten Orthophosphate mit

stöchiometrischer Zusammensetzung zusammengefasst. Sie sind alle in Säure, jedoch nicht in Wasser löslich. Dabei gilt: Je größer das Ca:P-Verhältnis, desto wasserunlöslicher sind die Orthophosphate.⁵¹

Tabelle 2.1: Übersicht biologisch relevanter Calciumorthophosphate⁵²

Verbindung	Abkürzung	Chemische Formel	Ca:P
Monocalciumphosphat-Monohydrat	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
Monocalciumphosphat-Anhydrit	MCPA	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,5
Dicalciumphosphat-Dihydrat	DCPD, Brushit	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,0
Dicalciumphosphat-Anhydrit	DCPA, Monetit	CaHPO_4	1,0
Octacalciumphosphat	OCP	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	1,33
α -Tricalciumphosphat	α -TCP	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
β -Tricalciumphosphat	β -TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Amorphes Calciumphosphat	ACP	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n \text{H}_2\text{O}$	1,2 – 2,2
Calciumdefizitärer Hydroxylapatit	CDHA	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$)	1,5 – 1,67
Hydroxylapatit	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Tetracalciumphosphat	TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2,0

Aufgrund der Ähnlichkeit mit dem natürlichen Knochenmaterial besitzen Calciumphosphate eine hohe Biokompatibilität. Sie sind außerdem bioaktiv, bioabbaubar und osteokonduktiv. Kommerziell erhältliche CaP (**Abbildung 2.5**) unterscheiden sich nach ihrer Herkunft (natürlich bzw. synthetisch), der Zusammensetzung, der physikalischen Form und den physikochemischen Eigenschaften.⁵³ Insbesondere finden CaP in Form von Keramiken als vorgefertigte Blöcke bzw. Granulate mit unterschiedlicher Porosität Anwendung als Knochenimplantate (ausführliche Betrachtung der Keramiken im anschließenden Kapitel). Keramikblöcke weisen eine hohe mechanische Stabilität auf. Aufgrund ihrer Festigkeit können sie jedoch nicht perfekt an den Knochendefekt angepasst werden, wodurch die Knochenheilung erschwert werden kann. Granulate hingegen passen sich besser als Blöcke an

den jeweiligen Defekt an. Problematisch sind allerdings die mögliche Migration in das umliegende Gewebe und die geringe mechanische Stabilität.⁵⁴



Abbildung 2.5: Verschiedene Formen der Knochenersatzmaterialien auf Calciumphosphat-Basis.⁵⁵

Eine weitere Form der CaP sind Knochenzemente. Sie werden seit den 1980er Jahren intensiv untersucht. Dabei handelt es sich um Zwei- oder Mehrkomponentensysteme, welche aus einer oder mehreren pulverförmigen Calciumorthophosphaten und einer wässrigen Lösung bestehen. Durch Mischen der festen und flüssigen Komponenten entsteht eine formbare Paste, welche direkt in den Knochendefekt eingearbeitet werden kann. Das Abbinden und die Aushärtung des Calciumphosphatzements (CPC) findet *in vivo* im Knochen unter physiologischen Bedingungen statt. Das ermöglicht, im Gegensatz zu den CaP-Keramiken, eine sehr gute geometrische Anpassung des Zements und einen effektiven Knochen-Zement-Kontakt speziell bei komplexen Defekten. Während des Abbindens und Aushärtens entstehen durch Lösungs- und Fällungsprozesse hauptsächlich gering kristalliner HA bzw. CDHA oder Brushit (DCPD). Welche Art von Calciumphosphatverbindung gebildet wird, hängt im Wesentlichen von der Partikelgröße der Ausgangssubstanzen, dem pH-Wert des Reaktionsgemisches und der Temperatur während dem Verarbeitungs- und Aushärtungsprozesses ab.⁵⁰ Das Abbinden des Zementes erfolgt über Säure-Base-Reaktionen bzw. Hydrolyse.⁵⁶ HA bzw. CDHA entstehen durch beide Reaktionstypen. Brushit-Zemente hingegen entstehen ausschließlich durch Reaktion einer relativ sauren und einer relativ basischen CaP-Komponente. Der kontinuierliche Prozess des Abbindens erfolgt zunächst durch Freisetzung von Calcium- und Phosphationen aus den CaP-Pulvern. Dabei entsteht eine übersättigte Lösung, in der die Keim- und Kristallitbildung der sich neu bildenden CaP-Phase an den CaP-Pulverpartikeln stattfindet. Die dabei entstehenden nadel- bzw. plättchenförmigen

Kristalle (**Abbildung 2.6**) wachsen so lange wie die Ausgangssubstanzen sich in wässriger Lösung auflösen.⁵⁶⁻⁵⁸

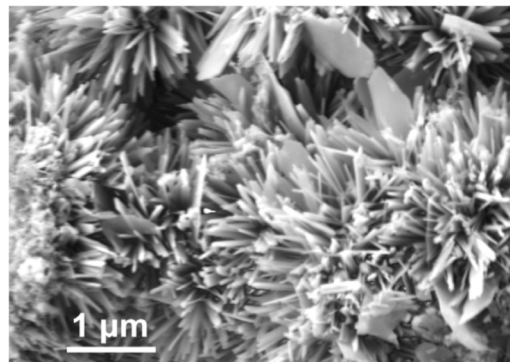


Abbildung 2.6: SEM: Mikrostrukturierter Calciumphosphatzement – nadel- und plättchenförmige Kristalle.⁵⁸

Die Abbindezeit kann durch verschiedene Faktoren wie Pulverpartikelgröße, Pulver/Flüssigkeit-Verhältnis, Zugabe von Calcium- bzw. Phosphationen, Kristallisationskeimen oder Kristallwachstumsinhibitoren angepasst werden.⁵⁹ Letztendlich entstehen die poröse Struktur und die mechanische Stabilität der Zemente durch das Verzahnen der wachsenden Kristalle. Gut präparierte CPC-Probenkörper können zwar annähernd die des natürlichen Knochens entsprechenden Druck- und Zugfestigkeiten erreichen, allerdings ist nicht klar, inwieweit diese mit *in vivo* ausgehärteten Zementen vergleichbar sind. Außerdem besitzen natürliche Knochen eine signifikant geringere Sprödigkeit als Zemente auf CaP-Basis. Dadurch können CPC nur in nicht bzw. wenig lasttragenden Knochendefekten oder in Kombination mit metallischen Implantaten angewendet werden.⁶⁰ Neben Größe, Anzahl, Morphologie und Verteilung der Kristalle in der sich neubildenden CaP-Phase übt die Porosität entscheidend Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften sowie die Resorbierbarkeit des CPC aus. Durch Einmischen von Porenbildnern können Makroporosität und Interkonnektivität in den mikrostrukturierten Zementen realisiert werden, ohne die Abbindeigenschaften zu verändern (**Abbildung 2.7**). Dadurch nimmt einerseits die Festigkeit der CPC stark ab. Andererseits ermöglichen die miteinander verbundenen Mikro- und Makroporen ein Eindiffundieren biologischer Flüssigkeiten, wie Blut, und das Einwachsen von Knochengewebe, was wiederum den aktiven Abbau des Implantats durch Knochenzellen (Osteoklasten) begünstigt. Für eine ausreichende Interkonnektivität ohne größeren Festigkeitsverlust können deshalb zum Beispiel resorbierbare Fasern eingesetzt werden. Diese verstärken einerseits kurzzeitig die Belastbarkeit des Zementes. Andererseits wird ein Einwachsen des Knochens durch die entstehenden, miteinander verbundenen Makroporen beim Abbau der Fasern ermöglicht.^{56, 58} Verschiedene Strategien und Methoden

zur Einbringung von Makroporen in die Calciumphosphatzemente, wie Auslaugung, Schaumbildung oder Emulsion, sind ausführlich von Ginebra et al.⁶¹ beschrieben worden.

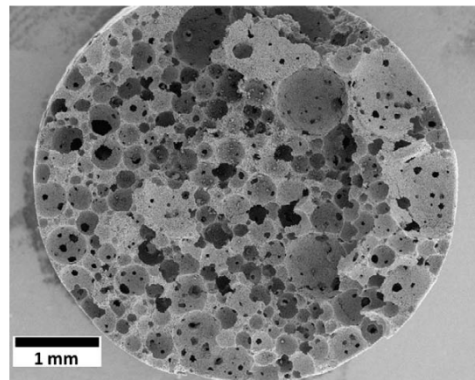


Abbildung 2.7: Makroporöser, interkonnektierender CDHA durch Zusatz eines Schaumbildners in die flüssige Phase des CPC.⁶¹

Trotz ihrer geringen mechanischen Belastbarkeit finden CPC vielseitig Anwendung in der Dentalmedizin, Gesichts- und Schädelchirurgie und bei diversen Frakturen (Wirbel, Handgelenk, Hüftgelenk, etc.). Dabei können sowohl hochviskose Pasten manuell in den Knochendefekt eingearbeitet oder als Pasten mit geringerer Viskosität minimal invasiv injiziert werden.

Keramiken

Keramiken sind anorganische, nichtmetallische Knochenersatzmaterialien, welche über einen Hochtemperaturesinterungsprozess aus pulverförmigen biologischen bzw. synthetischen Ausgangssubstanzen hergestellt werden.^{50, 62} Die dabei entstehenden glasartig-amorphen oder kristallinen Werkstoffe können nach ihrer Biokompatibilität in bioinerte, bioaktive und bioresorbierbare Keramiken unterschieden werden.⁶³

Aluminiumoxid (Al_2O_3)- und Zirkoniumoxid (ZrO_2)-Keramiken sind bioinerte Werkstoffe mit exzellenten mechanischen Eigenschaften und hoher Korrosionsbeständigkeit. Sie werden vorwiegend im Dentalbereich⁶⁴ in Form von Zahnkronen und -brücken und in der orthopädischen Chirurgie^{65, 66} als Hüftgelenksendprothesen angewendet.

Bioaktive Hydroxylapatit- ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA) und Tricalciumphosphatkeramiken ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, α - und β -TCP) sind osteokonduktiv und besitzen eine ähnliche chemische Zusammensetzung wie das im Knochen natürlich vorkommende Apatit. Durch spezifische chemische und biologische Prozesse an der bioaktiven Hydroxylapatitoberfläche entsteht ein Verbund mit dem neugebildeten Knochen ohne die Ausbildung einer Bindegewebsschicht.⁶⁷ Diesen Vorgang nennt man Verbundsosteogenese. Synthetisches Hydroxylapatit ist spröde

und kann zellulär nur in sehr geringem Maße abgebaut werden. Aus biologischen Ausgangsstoffen (z. B. Boviner Spongiosa) hergestellte HA-Keramiken besitzen ein interkonnektierendes Porensystem, wodurch eine gute Osteointegration möglich wird. Bei HA- und TCP-Keramiken aus synthetischen Ausgangsmaterialien muss das Porensystem durch spezielle Herstellungsverfahren erzeugt werden. Im Gegensatz zu Hydroxylapatit wird Tricalciumphosphat nicht nur zellulär, sondern auch durch chemische Lösungsvorgänge schnell abgebaut. Durch Kombination von sprödem Hydroxylapatit mit resorbierbarem TCP können biphasige Keramiken hergestellt werden. Sie vereinen die gewünschten Eigenschaften der jeweils einzelnen Keramiken. Durch Variation der Zusammensetzung kann bei einem höheren Anteil an HA eine verbesserte mechanische Festigkeit und somit ein stabileres Implantat erzeugt werden. Bei einem höheren Anteil an TCP wird durch die schnelle Resorbierbarkeit hingegen ein besseres An- und Einwachsen des neugebildeten Knochens ermöglicht. Bioaktive Keramiken werden in unterschiedlichen physikalischen Formen (Pulver, Granulate, Blöcke etc.) sowohl in der Orthopädie als auch in der Dentalmedizin als Knochenersatzmaterial angewandt. Zusätzlich können sie als Trägersystem für Antibiotika und Krebsmedikamente dienen.^{31, 48, 50, 52}

Bioaktive Gläser

Glasartige Knochenersatzmaterialien bestehen aus Netzworkebildnern (SiO_2 , P_2O_5 und B_2O_3) und Netzworkewandlern (Alkali- und Erdalkalimetalloxide). Die Herstellung der bioaktiven Gläser erfolgt klassisch über das Schmelzen der Ausgangsstoffe bei 1200 °C bis 1500 °C . Durch schnelles Abkühlen der Schmelze wird Kristallisation verhindert und es entsteht die typische glasartige Struktur. Das erste bioaktive Glas wurde 1969 von Larry L. Hench entwickelt und ist unter dem Namen Bioglass 45S5 bekannt. Es besteht aus 45 % SiO_2 , 24,5 % Na_2O , 24,5 % CaO und 6 % P_2O_5 und besteht somit nur aus im Körper natürlich vorkommenden Mineralien. Ein weiteres Herstellungsverfahren ist der Sol-Gel-Prozess. Dabei bildet sich ein Netzwerk aus Solpartikeln (Gelbildung) durch Hydrolyse und Polykondensation von Alkoxiden. Im Gegensatz zu den über den Schmelzprozess hergestellten Biogläser besitzen die Sol-Gel-Gläser eine bessere Zusammensetzung und höhere Bioaktivität. Allerdings können über beide Herstellungsverfahren nur Mikroporen mit ungleichmäßiger und unzureichender Verteilung realisiert werden. Werden beim Sol-Gel-Verfahren strukturlenkende Substanzen zugegeben, können mesoporöse Glasstrukturen generiert werden, die eine geordnete Porenstruktur mit Porengrößen im Bereich von 2 bis 50 nm besitzen. Bioaktive Gläser zeichnen sich insbesondere durch ihre hohe

Biokompatibilität, Bioresorbierbarkeit und Osteokonduktivität aus. Beim Kontakt mit physiologischen Lösungen, wie Blut, können die Wassermoleküle leicht in die offene Silicatstruktur eindringen. Dabei werden Ionen freigesetzt und das bioaktive Glas abgebaut. Zum einen bildet sich aus den freigesetzten Calcium- und Phosphationen eine Oberflächenschicht aus carbonatsubstituiertem Apatit, welche einen starken Verbund zwischen Implantat und Knochen ermöglicht. Dadurch können bioaktive Gläser sowohl an Weich- als auch an Hartgewebe stabil anbinden. Andererseits regen die ionischen Abbauprodukte die Angiogenese (Wachstum bereits vorhandener Blutgefäße) an, beeinflussen die Genexpression und begünstigen die Osteoblastendifferenzierung. Diese Eigenschaften hängen im Wesentlichen von der Zusammensetzung des Bioglasses und der damit verbundenen Ionenfreisetzung ab.^{68, 69}

Bioaktive Gläser werden u. a. als Knochenfüllmaterial in der Zahnheilkunde und als Knochenplatten in der Gesichtschirurgie angewandt. Aufgrund ihrer mechanischen Eigenschaften, insbesondere der geringen Bruchzähigkeit, sind sie jedoch nicht als lasttragende Implantate geeignet. Allerdings können durch Sinterung poröse glasartige Gerüststrukturen erhalten werden, deren Druckfestigkeit der des kortikalen Knochens entspricht. Eine weitere Anwendung wäre die Beschichtung tragfähiger Metallimplantate mit Biogläsern zur Erhöhung der Biokompatibilität, wodurch eine Fixierung der Prothese am Knochen möglich ist.^{30, 68} Der Einsatz bioaktiver Gläser als Trägersystem für Wirkstoffe und bioaktive Moleküle wird in **Kapitel 2.4** ausführlicher diskutiert.

2.3.3 Komposite

Einphasige Materialien, wie Metalle, Polymere oder Keramiken, bieten nur teilweise die notwendigen Anforderungen für eine optimale Knochenneubildung. Sie unterscheiden sich entweder strukturell oder in der Zusammensetzung von natürlichem Knochen. Der Knochen selbst ist ein komplexes System aus etwa einem Drittel organischen und zwei Drittel anorganischen Bestandteilen. Dabei besteht die anorganische Mineralphase hauptsächlich aus Apatit. Die organische Matrix setzt sich größtenteils aus Kollagen Typ I und einem geringen Anteil an nichtkollagenen Proteinen zusammen.⁷⁰ Das flexible Kollagen bildet ein strukturelles Gerüst in dem die HA-Kristalle verankert sind, welche die mechanische Festigkeit des Knochens erzeugen. Dieses Zusammenspiel von Struktur und Zusammensetzung macht den Knochen zu einem idealen mehrphasigen Verbundmaterial, einem Komposit. Die mineralische Phase ist dabei nicht direkt, sondern über die nichtkollagenen Proteine mit dem Kollagen verbunden.⁷¹ Aufgrund der starken Ähnlichkeit

mit dem natürlichen Knochen sind mehrphasige Materialien auf der Basis von Hydroxylapatit und Kollagen die naheliegendsten Komposite. Weiterhin werden vor allem Metalle, Keramiken und natürliche bzw. synthetische Polymere als Kompositmaterialien eingesetzt. Durch die Kombination dieser und anderer Materialien zu einem Verbundmaterial können sowohl osteokonduktive, osteoinduktive und osteogene Eigenschaften in einem Implantat realisiert werden.³¹ Je nach Zusammensetzung sind die Komposite nicht, teilweise oder vollständig resorbierbar und für unterschiedlichste Knochendefekte entsprechend anpass- und einsetzbar.

2.4 KEM als Drug-Delivery-Systeme (DDS)

Die Verabreichung von Medikamenten stellt in der modernen Medizin eine große Herausforderung dar. Um dem Patienten eine hohe Wirksamkeit ohne bzw. mit nur geringen Nebenwirkungen ermöglichen zu können, muss der Wirkstoff im erkrankten Gewebe selektiv angereichert oder kontrolliert über einen bestimmten Zeitraum freigesetzt werden. Der Einsatz vieler Wirkstoffe ist aufgrund ihrer hohen Toxizität gegenüber gesundem Zellgewebe, der geringen Löslichkeit bzw. der Instabilität im physiologischen Milieu oder einer mangelnden Passierbarkeit biologischer Barrieren in die Organe limitiert.⁷² Zur Überwindung dieser Schwierigkeiten werden seit Jahrzehnten sogenannte Drug-Delivery-Systeme (DDS) entwickelt. Sie werden als Trägersysteme definiert, welche einen entsprechenden Wirkstoff aufnehmen, diesen im physiologischen System zum gewünschten Wirkort transportieren und dort den Wirkstoff kontrolliert freisetzen, ohne ihn in seiner biologischen Wirksamkeit zu verändern. Die Freisetzung hängt dabei im Wesentlichen von der Mikrostruktur des DDS, der Löslichkeit des WS und der Art der Bindung zwischen WS und der Matrix des DDS ab. Ist das Trägersystem resorbierbar, beeinflusst zusätzlich der Mechanismus des Abbaus die WS-Freisetzung.⁵⁷ DDS können aus den unterschiedlichsten Materialien bestehen. Je nach Zusammensetzung, Größe und Form ist die Aufnahme verschiedenster Wirkstoffe und somit eine breite therapeutische Anwendung möglich.⁷³

Calciumphosphatzemente

Ginebra et al.^{57, 74} beschreiben ausführlich das hohe Potential der Calciumphosphatzemente als Drug-Delivery-Systeme. Aufgrund der Ausfällung und Aushärtung des CPC bei Raumtemperatur bzw. bei 37 °C und der dabei entstehenden intrinsischen Porosität können sowohl Wirkstoffe, biologisch aktive Moleküle als auch Zellen in den CPC ohne eine thermische Denaturierung oder einen Aktivitätsverlust eingearbeitet werden. Die Beladung

des CPC kann durch Behandeln der bereits ausgefällten CPC-Blöcke oder -Granulate mit der Wirkstofflösung erfolgen. Dabei wird entweder die Wirkstofflösung tropfenweise auf die CPC-Oberfläche aufgetragen oder der CPC in die Wirkstofflösung eingetaucht. Effektiver ist jedoch das Einmischen des Wirkstoffes in eine der beiden Zementphasen vor der Ausfällung und Aushärtung des Zementes, da diese Art der WS-Beladung sowohl für manuell formbare als auch injizierbare Zementpasten angewendet werden kann. Die Verteilung des WS im gesamten Material erfolgt über das Lösen in der flüssigen Phase wesentlich homogener als über das Einmischen in die Pulverzementphase. Der Einbau der WS-Moleküle findet dabei weniger in das Kristallgitter der ausfallenden Apatit- bzw. Brushitkristalle statt. Vielmehr erfolgt ein Einschluss zwischen den verschränkten Kristallen. Dabei liegen die WS-Moleküle entweder gelöst in der flüssigen Phase in den Mikroporen, adsorbiert oder chemisch gebunden auf der Oberfläche der neugeformten Kristalle oder in fester Form als Wirkstoffkristalle oder –aggregate vor. Die Komplexierung von Wirkstoffen oder anderen biologischen Molekülen in den CPC kann jedoch den Mechanismus der Ausfällung und Aushärtung, die rheologischen Eigenschaften und die Mikrostruktur beeinflussen. Wie stark die Änderungen der Materialeigenschaften durch WS-Moleküle sind, hängt hauptsächlich von der Chemie der WS und somit von den resultierenden Wechselwirkungen mit dem CPC, von der WS-Konzentration und über welche Phase (flüssig oder Pulver) der Wirkstoff eingemischt wird ab.

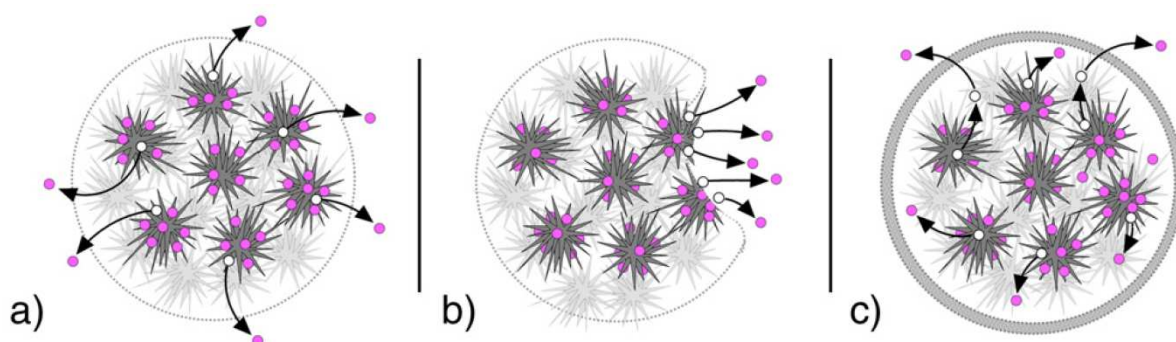


Abbildung 2.8: Mechanismen der WS-Freisetzung aus CPC nach Ginebra et al.⁵⁷:
 a) diffusionskontrolliert, b) Beschleunigung durch Resorption,
 c) Verlangsamung durch *in vivo* gebildete HA-Schicht.

Die Wirkstofffreisetzung aus dem CPC ist generell ein diffusionskontrollierter Prozess, wenn die Trägermatrix im Freisetzungsmittel nicht quillt oder sich auflöst (**Abbildung 2.8a**). Calciumphosphatzemente können jedoch aktiv durch Osteoklasten und Makrophagen oder passiv durch chemische Lösungsvorgänge und Hydrolyse resorbiert werden. Der aktive Abbau der schwerlöslichen Apatitzemente ist wesentlich langsamer als die Freisetzung der

WS-Moleküle. In diesem Fall bleibt die Freisetzung diffusionskontrolliert. Bei Brushit hingegen ist die Löslichkeit im physiologischen Medium um ein bis zwei Größenordnungen höher als bei HA. Somit wird dieser Zement aktiv und passiv abgebaut und die Freisetzung entsprechend beschleunigt. Die Freisetzung des Wirkstoffes ist somit nicht mehr diffusions- sondern resorptionskontrolliert (**Abbildung 2.8b**). Im Gegensatz dazu kann die Ausbildung einer HA-Schicht *in vivo* an der Oberfläche bioaktiver CPC genau das Gegenteil bewirken. Dadurch wird die Diffusion der WS-Moleküle aus dem CPC verlangsamt (**Abbildung 2.8c**).

Antibiotika wurden hinsichtlich des Einbaus und der Freisetzung aus CPC bisher am intensivsten untersucht. Unter anderem wurden Aminoglykoside, wie Gentamicin⁷⁵⁻⁷⁷, und Glykopeptide, wie Vancomycin⁷⁸⁻⁸⁰, zur Prophylaxe gegen eventuell entstehende Infektionen durch die Transplantation oder bei bereits bestehenden Knocheninfektionen mit Bakterien untersucht. Die verschiedenen Studien zeigen in Abhängigkeit vom verwendeten Antibiotikum und CPC unterschiedlich hohe Freisetzungsraten über Zeiträume von wenigen Tagen bis hin zu mehreren Wochen. Allerdings werden Antibiotika insbesondere aus resorbierbaren Zementen häufig zu schnell freigesetzt. Um die Freisetzung zu verzögern wurden Polymere, wie Polyacrylsäure, Polyacrylamid, Chitosan oder Alginat den Zementen beigemischt. Schnieders et al.⁸¹ konnten z. B. die Freisetzung von Gentamicin aus Apatitzement durch das Einmischen von antibiotikabeladenen Poly(milchsäure-co-glykolsäure)-Mikrokugeln in den Zement signifikant verzögern. Bohner et al.⁸² berichten von einer Verzögerung der Gentamicinfreisetzung aus Brushit/Polyacrylsäure-Kompositen. Dabei wurden in die Mikroporen Polyacrylsäure/Gentamicin-Gele eingebracht.

Rheumatische Arthritis, Osteoarthritis oder post-operativen Schmerzen bei Knochenimplantationen erfordern eine schmerzstillende und entzündungshemmende Therapie. Indomethacin⁸³⁻⁸⁷, Ibuprofen⁸⁸ und Acetylsalicylsäure^{89, 90} sind nichtsteroidale entzündungshemmende Wirkstoffe, die auf die wirksame Freisetzung aus CPC untersucht wurden. Aufgrund der möglichen Komplexbildung von Calcium durch Salicylsäure werden jedoch die rheologischen und mechanischen Eigenschaften der CPC stark beeinflusst.⁸⁹ Ibuprofen hingegen zeigte keinerlei Interaktionen mit HA-Zement. Die Freisetzung des WS erfolgte zu 100 % innerhalb von 48 Stunden. Um dem entgegenzuwirken wurde Ibuprofen in geringfügig methoxyamidierte Pektin-Mikrokugeln verkapselt, wodurch eine kontrollierte WS-Freisetzung aus dem Kompositmaterial erzielt werden konnte.⁸⁸

Der Einsatz von Krebsmedikamenten bei bösartigen Knochentumoren führt bei der bisherigen Verabreichung zu starken Nebenwirkungen, obwohl diese durch eine lokale Behandlung

direkt am Knochen reduziert werden könnten. Nur wenige Studien beschreiben bisher die Entwicklung geeigneter wirkstoffbeladener CPC.⁹¹⁻⁹⁷ Diese sollen einerseits Knochendefekte nach der Tumorentfernung stabilisieren und Knochenneubildung anregen und andererseits relevante Krebsmedikamente (z. B. Mercaptopurine, Paclitaxel oder Cisplatin) gezielt freisetzen. Cisplatin, ein Chemotherapeutikum, zeigte eine hohe Freisetzung aus Apatitzement zwischen 20 % und 60 % über 4 Wochen.⁹³ Diese hohe Freisetzungsrates führt jedoch zu einer hohen Cisplatinkonzentration in Niere und Leber und beeinträchtigt zudem die Knochenneubildung. Weiterhin können hohe, lokale Konzentrationen des Krebsmedikamentes das umliegende gesunde Gewebe schädigen.⁵⁷

Bei Osteoporose ist das Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und -abbau gestört. Um dem übermäßigen Knochenabbau entgegenzuwirken wird seit Jahrzehnten die Hormonersatztherapie (HET) angewandt. Allerdings birgt insbesondere die Langzeitverabreichung von Östrogenen u. a. ein hohes Brustkrebsrisiko. Deshalb wird immer häufiger die HET durch antiresorptive, nichthormonelle Therapien mit z. B. Bisphosphonaten ersetzt. Insbesondere Alendronat und Pamidronat wurden für die lokale Behandlung direkt am porösen Knochen in CPC untersucht.⁹⁸⁻¹⁰¹ Trotz der geringeren Druckfestigkeit der CPC durch den Einbau von Bisphosphonaten zeigten die Studien vielversprechende Freisetzungsrates.

Darüber hinaus können auch Moleküle mit hoher molarer Masse wie Wachstumsfaktoren und andere Proteine in CPC eingearbeitet werden. Insbesondere die Superfamilie der transformierenden Wachstumsfaktoren-beta (TGF- β), wozu auch die Knochen-Morphogenese-Proteine (engl. bone morphogenic proteins, BMP) gehören, können, neben anderen Funktionen, die Knochenbildung stimulieren. Durch Injektion verabreichte Wachstumsfaktoren diffundieren sehr schnell vom Implantat weg und wirken damit nur gering auf die Knochenregeneration ein. Durch das Einbringen von Wachstumsfaktoren in CPC kann die Proteinfreisetzung kontrolliert werden, wobei gleichzeitig knochenaufbauende Zellen in den Zement migrieren können. Studien¹⁰²⁻¹⁰⁵ belegen jedoch, dass die freigesetzte Menge an Wachstumsfaktoren zunächst hoch ist und nach wenigen Tagen nur noch gleichbleibend geringe Mengen aus dem CPC abgegeben werden. Dabei werden zunächst ungebundene Proteinmoleküle von der Oberfläche des CPC in das umliegende Medium freigesetzt werden. Die Wachstumsfaktoren innerhalb des CPC binden sehr stark mit dem Zement. Dadurch wird die Freisetzung stark herabgesetzt. Durch die Verwendung von aktiv resorbierbaren CPC kann die TGF- β -Freisetzungsrates erhöht werden. Einen guten Überblick über die verschiedenen CPC beladen mit Wachstumsfaktoren geben Ginebra et al.^{57, 74}.

Neben Wirkstoffen und Proteinen wird zunehmend auch die Aufnahme und Freisetzung von Ionen in CPC untersucht. Dabei liegt der Schwerpunkt einerseits auf am Knochenbau beteiligte Ionen, wie z. B. Calcium-, Phosphat- oder Strontiumionen.^{57, 106-110} Andererseits sind Ionen mit antimikrobieller Wirkung wie Silberionen von großem Interesse. Aufgrund der aktiven Resorbierbarkeit zeigen Brushzemente eine höhere Silberionenfreisetzung als Apatitzemente und sind damit eine gute Alternative zu mit Antibiotika beladenen CPC.¹¹¹⁻¹¹³

Keramiken

Im Gegensatz zu CPC werden bioaktive Keramiken bei sehr hohen Temperaturen hergestellt. Da die meisten pharmazeutischen Wirkstoffe eine niedrige Zersetzungstemperatur besitzen, können diese nicht vor bzw. während des Sinterungsprozesses in die Ausgangskomponenten eingearbeitet werden. Die Beladung mit Wirkstoffen findet erst im Anschluss des Herstellungsprozesses durch Imprägnierung der Keramiken mit gesättigten WS-Lösungen statt. Für die Aufnahme und Freisetzung von WS ist die Porosität der Keramiken entscheidend. Strukturparameter, wie Größe, Anzahl, Verteilung, Form und Konnektivität der Poren sowie die mögliche Funktionalisierung der Keramikoberfläche, können durch die Anpassung der Sinterungstemperatur, -zeit und der Materialzusammensetzung beeinflusst werden. Dadurch ist es möglich sowohl kleinere als auch größere Wirkstoffe und biologische Moleküle in die Keramik zu integrieren. Wie bei den CPC ist durch den direkten Kontakt des bioaktiven Materials mit dem angrenzenden Knochen und Gewebe eine WS-Freisetzung aus der Keramik besonders effektiv. Keramiken als DDS werden hauptsächlich für die Knochenregeneration bei kritischen Defekten, zur Infektionsbehandlung, bei osteoporotischen Frakturen und zur Knochenkrebstherapie angewendet.¹¹⁴ Dabei kommen Keramiken in Form von Blöcken, Granulaten oder Pulvern zum Einsatz. Zum Beispiel konnte durch das Einbringen von Wachstumsfaktoren in biphasige Keramiken aus HA und TCP im Vergleich zu nicht WS-beladenen Keramiken ein verstärktes Knochenwachstum belegt werden.¹¹⁵⁻¹¹⁷ Weiterhin werden Keramiken aber insbesondere als Beschichtungen auf Metallimplantaten aufgebracht. Diese werden näher in diesem Kapitel im Abschnitt ***Metalle*** erläutert.

Biogläser

Die bereits benannten Vorteile der bioaktiven Gläser (**Kapitel 2.3.2**) in Kombination mit der Wirksamkeit aufgenommener und am Wirkort freigesetzter Wirkstoffe bzw. bioaktiver Moleküle machen Biogläser zu hocheffektiven DDS. Sowohl osteoinduktive Wirkstoffe, wie Peptide, Hormone und Wachstumsfaktoren, als auch Medikamente, wie Antibiotika, können in diese knochenregenerierenden Materialien integriert werden. Wie bei den Keramiken ist

das Einmischen der potentiellen Wirkstoffe vor bzw. während dem Schmelzprozess im klassischen Herstellungsverfahren aufgrund der hohen Temperaturen nicht sinnvoll. Erst nach dem Abkühlen der Gläser können diese in WS-Lösungen getaucht werden. Die WS interagieren in den Poren über Wasserstoffbrücken bzw. über physikalische Adsorption auf der bioaktiven Glasoberfläche (**Abbildung 2.9**). Im Sol-Gel-Prozess hingegen können die biologischen Moleküle direkt in das Bioglas während dem Herstellungsprozess integriert werden. Diese Methode wird bei Raumtemperatur durchgeführt, wodurch die bioaktive Funktion der WS erhalten bleibt.^{69, 118} In verschiedenen Studien wurden u. a. antimikrobielle Substanzen zur Prävention bzw. Heilung bakterieller Infektionen bei Knochenimplantationen in mikroporösen Biogläsern mit verschiedenen Zusammensetzungen getestet.¹¹⁹⁻¹²³

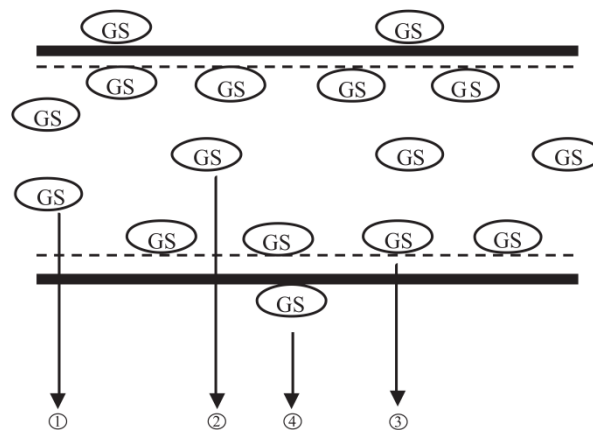


Abbildung 2.9: schematische Darstellung der Wechselwirkungen von Gentamicinsulfat (GS) mit mesoporösem Bioglas nach Xia und Wang¹²⁴; 1 – GS an der Porenöffnung, 2 – GS eingeschlossen in der Pore, keine H-Brücken mit Si-OH oder P-OH, 3 – GS eingeschlossen in der Pore, mit H-Brücken mit Si-OH oder P-OH, 4 – GS an der Bioglasoberfläche adsorbiert.

Aufgrund der ungleichmäßigen Porengröße und -verteilung konventionell hergestellter Biogläser ist die WS-Freisetzung aus diesen Implantatstrukturen nicht optimal. Bei mesoporösen Biogläsern ist die Porenstruktur hingegen sehr gleichmäßig. Je nach Zusammensetzung, Morphologie, Herstellungsverfahren und Beladungsmethode kann die Porengröße angepasst und somit die diffusionskontrollierte WS-Freisetzung beeinflusst werden.¹²⁵ Xia und Chang¹²⁴ beschreiben die Beladung und Freisetzung des Antibiotika Gentamicinsulfat in mesoporöse Biogläser im Vergleich zu konventionellen Biogläsern. Aufgrund der erhöhten spezifischen Oberfläche und dem großen Porenvolumen stehen wesentlich mehr funktionelle Gruppen (Si-OH, P-OH) für die Wechselwirkung mit WS-Molekülen (**Abbildung 2.9**) zur Verfügung. Dadurch können die mesoporösen Materialien einerseits dreimal so viel Wirkstoff aufnehmen wie mikroporöse Gläser. Andererseits wird

der Wirkstoff durch die Vielzahl an Wasserstoffbrücken stärker zurückgehalten als in konventionellen Biogläsern. Je nach Wirkstoff und Anwendung können mesoporöse Bioglas-DDS in Form von Pulvern, Fasern, dreidimensionalen Gerüsten oder Kompositen hergestellt werden.¹²⁵

Metalle

Im Vergleich zu polymer- und CaP-basierenden Drug-Delivery-Systemen gibt es im Zusammenhang mit Knochenregeneration nur wenig Literatur³⁸ zur Wirkstofffreisetzung aus metallischen Implantaten. Um Metallimplantate als Trägersysteme zu nutzen, können verschiedene Strategien angewendet werden. Häufig werden potentielle metallische Implantate mit wirkstoffbeladenen Polymeren oder Keramiken beschichtet. Dabei wurden bioabbaubare Polymere wie Polymilchsäure, Polyglykolsäure, Milchsäure-Glykolsäure-Copolymere oder Polyethylenglykol als Beschichtungsmaterial für die Freisetzung antibakterieller Wirkstoffe geprüft.¹²⁶⁻¹³¹ Die metallischen Implantate werden entweder in Polymer/WS-Lösungen eingetaucht und luftgetrocknet bzw. mit der Polymer/WS-Lösung besprüht oder mit einer zuvor hergestellten Polymer/WS-Manschette umhüllt. Je nachdem wie oft das Eintauchen bzw. Besprühen wiederholt wird, kann die Polymerschichtdicke und somit auch die WS-Menge variiert werden. Die Freisetzung der Antibiotika aus den Polymerbeschichtungen erfolgt dabei über Diffusion oder Erosion. Die Beladung von Keramikbeschichtungen wird hauptsächlich durch das Eintauchen der metallischen Implantate in einer gesättigten Calciumphosphatlösung realisiert. Auf der metallischen Oberfläche bildet sich durch Keimbildung und Wachstum von HA-Kristallen eine gleichmäßige Apatitkristallschicht aus. Anschließend wird der Beschichtungslösung der Wirkstoff beigemischt. Durch erneutes Eintauchen des Implantats in die Calciumphosphat/WS-Lösung entsteht eine zweite Apatitschicht mit eingelagertem WS. Stigter et al.¹³² untersuchten den Einschluss und die Freisetzung verschiedener Antibiotika in bzw. aus solchen keramikbeschichteten Titanimplantaten. Die Freisetzungsraten waren denen der polymerbeschichteten Metallimplantate annähernd gleich. Darüber hinaus können Wirkstoffe auch direkt auf der Metalloberfläche kovalent gebunden¹³³⁻¹³⁵ bzw. über selbstanordnende Monoschichten¹³⁶ oder als Nanopartikel^{137, 138} angelagert werden. Weiterhin stellen auch Metallschäume geeignete DDS dar, in deren Poren die WS eingearbeitet werden können.¹³⁹⁻¹⁴¹ Zur Anwendung von resorbierbaren Metallimplantaten als DDS bei der Knochenregeneration gibt es jedoch bisher noch keine Untersuchungen. Insbesondere Magnesium ist ein geeignetes abbaubares Metall, da hohe Konzentrationen des Metalls im Körper toleriert werden und die

Abbaubarkeit durch die Zusammensetzung der Magnesiumlegierung angepasst werden kann.^{38, 142}

Polymere

Natürliche und synthetische Polymere stellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung und Struktur potenzielle DDS für unterschiedliche therapeutische Anwendungen dar. Je nach Ausgangsmaterial und Herstellungsprozess¹⁴³ können polymere Materialien mit unterschiedlicher Größe, Funktionalität und Form speziell für die Knochenregeneration hergestellt werden. Dadurch ist es möglich, ein präzises Knochenersatzmaterial entweder aus dem Polymer allein oder in Kombination mit anderen Materialien, wie z. B. CaP-basierenden Materialien¹⁴⁴, zu generieren und mit entsprechenden Wirkstoffen oder biologischen Molekülen zu beladen. In Abhängigkeit von den Eigenschaften des Polymers (z. B. Bioabbaubarkeit oder Wasserlöslichkeit) kann die Freisetzung der biologisch aktiven Substanzen direkt am Wirkort Knochen gesteuert werden. In den vergangenen Jahren wurden sowohl natürliche als auch synthetische Polymere als DDS vorwiegend mit antibakteriellen und entzündungshemmenden Wirkstoffen, Bisphosphonaten und Wachstumsfaktoren für die Knochenregeneration untersucht.^{143, 145} Aufgrund der Vielzahl an veröffentlichten Studien und Untersuchungen sollen an dieser Stelle nur ausgewählte, aktuelle Beispiele natürlicher und synthetischer Polymere als potenzielle DDS für die Knochenregeneration kurz dargestellt werden.

Die natürlichen Polymere Chitosan und Kollagen stellen aufgrund ihrer sehr guten Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit und geringen Toxizität geeignete Polymere für die gezielte und kontrollierte Freisetzung von verschiedenen therapeutischen Wirkstoffen dar. Die Herstellung von Wirkstoffträgern mit Chitosan erfolgt u. a. über Miniemulsion, chemische oder ionische Gelbildung, Koazervation/Ausfällung, Sprühtrocknungstechniken oder Selbstassemblierung. Je nach Herstellungsverfahren können Membranen, Schwämme, Fasern, Mikrokugeln oder Hydrogele generiert werden.^{145, 146} Doty et al.¹⁴⁷ beschreiben ein bioabbaubares Komposit aus in Calciumsulfat integrierten Chitosanmikrokugeln. Der Calciumsulfatzement enthält ausschließlich das Antibiotikum Vancomycin, während die Chitosanmikrokugeln in unterschiedlichen Verhältnissen mit Vancomycin und dem Wachstumsfaktor rhBMP-2 beladen sind. Die *in vitro* Untersuchungen zeigten, dass durch die Kombination dieser beiden Therapeutika in einem KEM über einen klinisch relevanten Zeitraum gleichzeitig sowohl mögliche bakterielle Infektionen verhindert als auch die Knochenregeneration angeregt werden können. Hamilton et al.¹⁴⁸ untersuchten in ihrer Studie

BMP-2 beladene Kollagenmatrizes. Durch bifunktionelle Peptide, die als Linker zwischen den Wachstumsfaktoren und der Kollagenmatrix fungieren, war eine kontrollierte Freisetzung der BMP-2 und somit eine verbesserte Knochenregeneration *in vivo* möglich.

Neben den natürlichen Polymeren werden insbesondere die synthetischen, bioresorbierbaren Polymere Polymilchsäure, Polyglykolsäure und Copolymere aus diesen beiden Polymeren als DDS für die Knochenregeneration untersucht. Zum Beispiel verwendeten Karfeld-Sulzer et al.¹⁴⁹ für die effektive Freisetzung von rhBMP-2 ein *in situ* formendes Implantat auf Basis von Poly(milchsäure-co-glykolsäure) (PLGA). Der Wachstumsfaktor kann jedoch in hohen Dosen Nebenwirkungen, wie ektopische Knochenbildung oder männliche Sterilität, hervorrufen. Um die Menge an rhBMP-2 zu reduzieren und gleichzeitig seine Aktivität zu erhöhen, wurde N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) mit in das Copolymersystem eingebracht. Je nach Molekulargewicht des Copolymers und dem Verhältnis an Polymilchsäure zu Polyglykolsäure konnte die Freisetzung von NMP und des Wachstumsfaktors und somit die Knochenregeneration *in vivo* gesteuert werden. Shi et al.¹⁵⁰ berichten von einem thermosensitiven Poly(milchsäure-co-glykolsäure)-polyethylenglykol-poly(milchsäure-co-glykolsäure) (PLGA-PEG-PLGA)-Triblockcopolymer. Das mit dem Wirkstoff Simvastatin beladene, injizierbare Hydrogel führte *in vivo* vier Wochen nach der Injektion zu einem signifikanten Knochenwachstum, wobei die Freisetzung des Wirkstoffes relativ zum Copolymerabbau erfolgte.

Im Gegensatz zu Metallen oder CaP-basierenden Materialien sind Polymere wesentlich variabler in ihrer Form, Größe und Zusammensetzung. Dadurch ist es möglich gezielt Polymere mit spezifischen Eigenschaften herzustellen und entsprechend den Anforderungen des Knochendefektes und dem zu transportierenden Wirkstoff passgenau zu modifizieren. Diese Vielfältigkeit birgt ein hohes Potential für zukünftige polymere DDS nicht nur im Bereich der Knochenregeneration.

2.5 Dendritische Polymere

Polymere sind vielseitige und einzigartige Materialien, die aus dem heutigen Alltag nicht mehr wegzudenken sind. Generell unterscheidet man vier Hauptklassen der Polymere: lineare, vernetzte, verzweigte und dendritische Strukturen. Seit den Pionierarbeiten von Flory¹⁵¹, Vögtle et al.¹⁵², Tomalia et al.¹⁵³ und Newkome et al.¹⁵⁴ besteht insbesondere ein hohes wissenschaftliches Interesse an den dendritischen Polymeren. Zu dieser Polymerklasse gehören u. a. die Dendrimere¹⁵⁵⁻¹⁵⁸ und die hochverzweigten (hvz) Polymere¹⁵⁸⁻¹⁶⁰

(Abbildung 2.10). Dendrimere besitzen eine dreidimensionale, perfekt verzweigte Polymerarchitektur, welche aus drei Hauptbestandteilen besteht. An den multifunktionalen, zentralen Kern sind die Verzweigungseinheiten, sogenannte Generationen, in Form von Dendren mit peripheren Endgruppen gebunden.

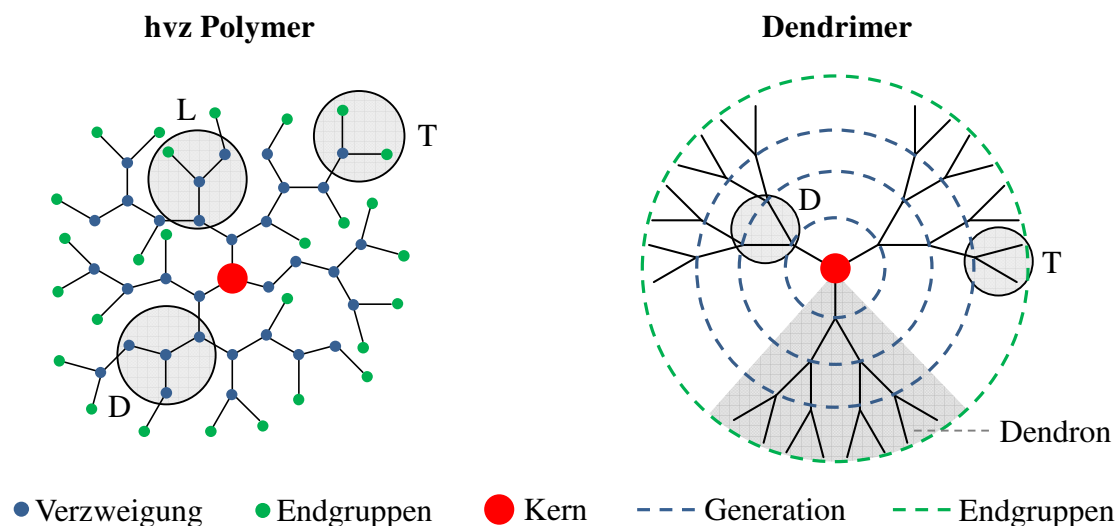


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung eines hochverzweigten (hvz) Polymers im Vergleich zum Dendrimer.

Generell erfolgt die Herstellung der Dendrimere entweder über die divergente oder über die konvergente Synthesestrategie.¹⁶¹ Bei der divergenten Methode werden die Dendren vom Kernmolekül aus Generation für Generation von innen nach außen aufgebaut. Bei der konvergenten Methode hingegen werden zunächst die einzelnen Dendren synthetisiert und dann an das multifunktionale Kernmolekül gebunden. Somit erfolgt hier die Synthese von außen von der Peripherie nach innen zum Kern. Über beide Methoden sind perfekte Dendrimerarchitekturen meist nur mit wenigen Generationen möglich. Bei der divergenten Methode wird aufgrund der exponentiell steigenden Anzahl funktionaler Endgruppen mit jeder zusätzlichen Generation der vollständige Umsatz des Monomers an den Endgruppen erschwert. Dies führt zu Fehlstellen in der Dendrimerstruktur. Bei der konvergenten Methode hingegen werden zwar durch die Synthese der einzelnen Dendren Fehlstellen vermieden, allerdings ist die Generationenzahl durch die sterische Hinderung der Dendren bei der Anknüpfung an das Kernmolekül begrenzt. Aufgrund der Limitierungen bei der Synthese war es bisher nur möglich Polyamidoamin (PAMAM)-Dendrimere bis zur zehnten Generation herzustellen.¹⁶² Andere Dendrimere, wie Polypropylenimin (PPI)¹⁶³, weisen bereits bei geringeren Generationen Fehlstellen auf. Die aufwendige Synthese ermöglicht einerseits eine kontrollierte, monodisperse Struktur der Dendrimere mit definierter Molmasse, bedeutet andererseits aber auch einen hohen Zeit- und Kostenfaktor. Eine günstigere Alternative sind

hochverzweigte Polymere, welche direkt in einer einstufigen Synthese hergestellt werden können. Dadurch ist allerdings keine Kontrolle der einheitlichen Verzweigung möglich. Dementsprechend ergibt sich eine höhere Molmassenverteilung und ein kleinerer Verzweigungsgrad als bei den Dendrimeren. Außerdem besitzen die hochverzweigten Polymere neben dendritischen und terminalen zusätzlich lineare Einheiten im Makromolekül. Trotz der erheblichen Unterschiede weisen hochverzweigte Polymere, wie die Dendrimere, eine globulare Struktur mit hohem Verzweigungsgrad und einer hohen Dichte an funktionellen Endgruppen auf (**Abbildung 2.10**).

Aufgrund der speziellen Eigenschaften der dendritischen Polymere im Vergleich zu linearen oder vernetzten Polymeren besteht ein hohes wissenschaftliches Interesse in der pharmazeutischen und biomedizinischen Anwendung als Drug-Delivery-Systeme. Für die Verkapselung, den Transport und die gezielte Freisetzung am Wirkort können dendritische Polymere auf unterschiedliche Weise mit potentiellen Wirkstoffen wechselwirken (**Abbildung 2.11**).^{159, 164} Einerseits können Wirkstoffe entweder kovalent an der Peripherie an den endständigen Funktionalitäten angebunden werden oder nicht-kovalent über physikalische Wechselwirkungen (WW) (elektrostatische WW, Wasserstoffbrücken, van der Waals Kräfte) mit den endständigen Funktionalitäten interagieren. Andererseits kann eine Verkapselung der Wirkstoffe im Inneren der polymeren Trägersysteme ebenfalls über physikalische oder hydrophobe WW erfolgen. Auf diese Weise werden z. B. wasserunlösliche Wirkstoffe eingeschlossen und können so im Trägersystem in wässriger Umgebung (z. B. im Blutkreislauf) transportiert werden.

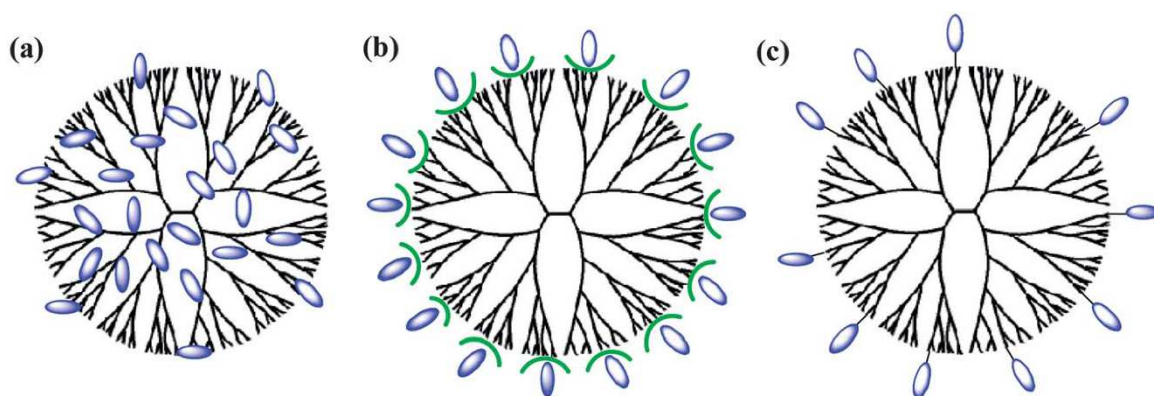


Abbildung 2.11: WS-Beladung am Beispiel Dendrimer: (a) physikalische WW im Inneren des Dendrimers, (b) physikalische WW an der Peripherie, (c) kovalente Bindung an der Peripherie.¹⁶⁴

Wirkstoffträgersysteme sind am effizientesten, wenn sie eine hohe WS-Beladungskapazität, eine zielgerichtete WS-Freisetzungskinetik direkt am Wirkort, eine geringe Toxizität und eine

hohe Biokompatibilität aufweisen.¹⁶⁴ Die Toxizität und somit die Biokompatibilität in biologischen Systemen hängen im Wesentlichen von den Endgruppen und der Größe bzw. Molmasse der dendritischen Polymere ab. Dendritische Polymere mit Aminogruppen in der Peripherie, wie PAMAM-, PPI-Dendrimere und hvz Polyethylenimin (PEI) (**Abbildung 2.12**), sind unter physiologischen Bedingungen kationisch geladen und wechselwirken mit negativ geladenen biologischen Membranen. Dadurch wirken dendritische Polymere mit positiv geladener Peripherie nicht nur zytotoxisch, sondern auch hemolytisch und hämatologisch toxisch.⁴ Die Toxizität nimmt dabei mit zunehmender Generation der Dendrimere bzw. zunehmender Molmasse der hochverzweigten Polymere und somit mit steigender Konzentration kationischer Endgruppen zu. Dendritische Polymere hingegen mit neutraler bzw. negativer Oberflächenladung weisen *in vivo* keine bzw. nur eine geringe Toxizität auf. Um die Biokompatibilität kationischer, dendritischer WS-Trägersysteme zu erhöhen, können die kationischen Endgruppen mit neutralen oder anionischen Komponenten modifiziert werden. Insbesondere die Anbindung von Polyethylenglycol (PEG), Aminosäuren bzw. Peptiden und Kohlenhydraten reduziert signifikant die Toxizität dendritischer Polymere *in vivo*.⁴ Durch die Generierung solcher Kern-Schale-Strukturen können nicht nur die Biokompatibilität der dendritischen Polymere verändert werden. Weiterhin ist eine Anpassung der Löslichkeit, und der Wechselwirkungen mit speziellen Wirkstoffen und Oberflächen möglich.¹⁵⁸

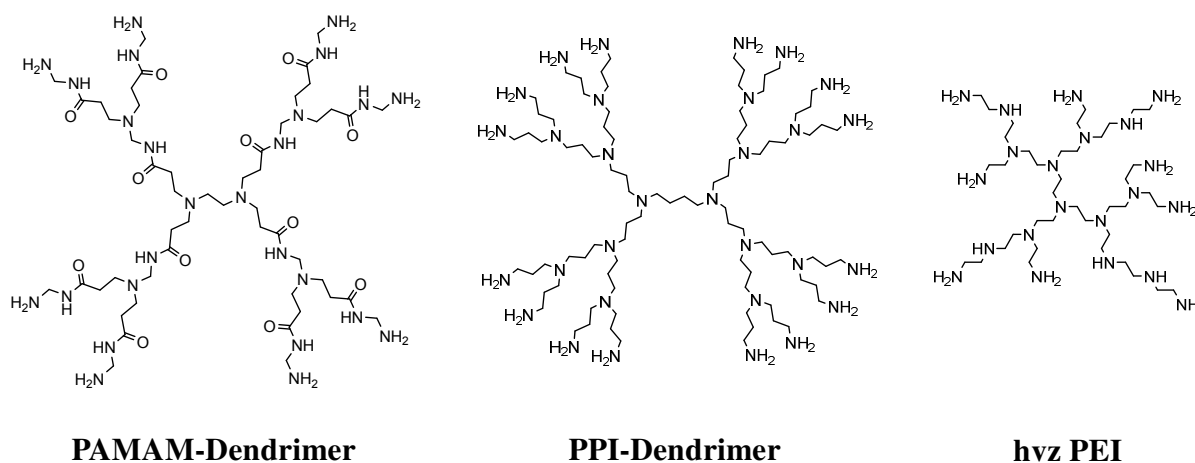


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der Polyamidoamin- und Polypropylenimin-Dendrimere sowie des hochverzweigten Polyethylenimins.

2.6 Dendritische Glykopolymere

Aufgrund der Tatsache, dass Kohlenhydrate in der Lage sind, an bestimmte Rezeptoren von Biomembranen zu binden, sind sie in eine Vielzahl von essentiellen biologischen Prozessen

involviert. Dabei dienen sie nicht nur als Energiespeicher und zur Stabilisierung von Zellwänden, sondern spielen eine entscheidende Rolle bei Vorgängen wie Zell-Zell-Interaktionen, Signalübertragungen oder Entzündungsreaktionen.¹⁶⁵ Die Wechselwirkung eines einzelnen spezifischen Zuckerliganden mit einem Rezeptor ist sehr schwach. Daher existieren auf Biomembranen viele spezifische Rezeptoren bzw. Rezeptoren mit mehreren Bindungsstellen an denen gleichzeitig eine Vielzahl an spezifischen Zuckerliganden binden kann. Durch diesen sogenannten multivalenten Effekt, auch glykosidischer Clustereffekt genannt, wird die Ligand-Rezeptor-Bindung um ein Vielfaches erhöht.⁵ Werden Kohlenhydrate an polymere Strukturen gebunden, so können diese Glykopolymersysteme über die rezeptorvermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen werden. Diese Tatsache bildet die Grundlage für eine Vielzahl von biomedizinischen Anwendungen der Glykopolymere als z. B. Biosensoren, Kontrastmittel oder Trägersysteme für Wirkstoffe (DDS).¹⁶⁶

Eine Vielzahl an geschützten und ungeschützten Glykomonomeren bieten die Möglichkeit unterschiedlichste Glykoarchitekturen über verschiedene Synthesemethoden darzustellen.¹⁶⁷¹⁶⁸ Insbesondere mit kontrolliert radikalischen Polymersynthesemethoden können lineare und verzweigte Homo-, Stern-, Blockco- oder Pfropfcopolymere mit Kohlenhydrateinheiten hergestellt werden. Dazu gehören u. a. die Nitroxid-vermittelte radikalische Polymerisation (NMRP), die radikalische Atomtransferpolymerisation (ATRP) und die Reversible Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragungspolymerisation (RAFT). Aber auch die Ringöffnungs-metathese-Polymerisation (ROMP) mit *N*-Carboxyanhydrid- bzw. ungeschützten Norbornen-Monomeren oder die anionische und kationische Polymerisation von geschützten Glykomonomeren führen zu definierten Glykopolymeren mit kontrollierbarer Molmasse. Weiterhin können Glykopolymere durch Anbindung von Kohlenhydrateinheiten an ein bereits vorhandenes polymeres Gerüst erhalten werden. Dafür werden häufig über polymeranalogue bzw. organische Reaktionen, wie Cycloaddition, reduktive Aminierung, Veresterung, nukleophile Substitution und andere, aktivierte Saccharideinheiten final mit den funktionellen Gruppen des Polymers umgesetzt.^{165, 168} Besonders attraktiv sind dabei dendritische Polymere, da sie aufgrund ihrer hohen Anzahl an funktionellen peripheren Gruppen die notwendige Multivalenz für eine starke Bindung an Rezeptoren bereitstellen. PAMAM und PPI sind zwei der wenigen bisher kommerziell erhältlichen Dendrimere, deren terminalen Aminogruppen im wässrigen Milieu mit einer Vielzahl an Mono-, Di- und Oligosacchariden umgesetzt wurden. Die Arbeitsgruppe um Dr. Dietmar Appelhans beschäftigt sich intensiv mit der Synthese von PPI-Glykodendrimeren und deren medizinischen Anwendung u. a. bei Prionen-

erkrankungen¹⁶⁹⁻¹⁷², Alzheimer^{169, 173, 174}, Krebserkrankungen¹⁷⁵⁻¹⁷⁸, HIV-Infektionen¹⁷⁹⁻¹⁸² oder zur Erhöhung des Effektes antibakterieller Wirkstoffe¹⁸³⁻¹⁸⁵. Dabei wurden insbesondere PPI-Dendrimere der zweiten bis fünften Generation mit Maltose- und Maltotriose-Einheiten untersucht.

Ein entscheidender Faktor für spezifische Wechselwirkungen von dendritischen Glykopolymeren mit Wirkstoffen und biologischen Molekülen ist der Grad der Saccharidfunktionalisierung am polymeren Kernmolekül. Bei vollständiger Disubstitution der peripheren primären Aminogruppen von PPI-Dendrimern entstehen sogenannte sugar balls, welche aufgrund der Abschirmung der kationischen Ladung des PPI-Kerns eine neutrale Oberflächenladung besitzen. Wird hingegen eine offene Schalenstruktur am PPI-Dendrimer generiert, nimmt die kationische Oberflächenladung mit abnehmendem Oligosaccharidsubstitutionsgrad zu.^{166, 186} Appelhans et al. untersuchten insbesondere an hvz PEI den Einfluss der Schalendichte (**Abbildung 2.13**) auf die charakteristischen Eigenschaften der dendritischen Glykopolymere.^{166, 186, 187} Wird das Oligosaccharid im Überschuss eingesetzt, entsteht eine dichte Schalenstruktur (Struktur A) bei der im Idealfall alle terminalen und linearen Aminogruppen des PEI-Kernmoleküls mit Saccharideinheiten abgesättigt sind. Durch die zweifache Substitution an den primären Aminogruppen und die Monosubstitution an den sekundären Aminogruppen besitzt das resultierende PEI-Glykopolymer ausschließlich tertiäre Aminogruppen. Beim Einsatz des Oligosaccharides im Unterschuss können je nach molarem Verhältnis verschiedene offene Schalenstrukturen generiert werden, z. B. Struktur B und C in **Abbildung 2.13**. Dabei reagieren hauptsächlich nur die terminalen Aminogruppen mit einem Saccharidmolekül, so dass vorzugsweise lineare Funktionalitäten in der Peripherie entstehen. Im Gegensatz zur Struktur B werden bei der Struktur C nicht alle primären Aminogruppen mit Oligosacchariden umgesetzt. Dementsprechend liegen in der dendritischen Glykopolymerstruktur sowohl primäre, sekundäre, als auch tertiäre Aminoeinheiten vor. In Abhängigkeit von der Schalendichte und dem pH-Wert besitzen die PEI-Glykopolymere eine unterschiedliche kationische Oberflächenladung und Ladungsdichte. Aufgrund der dichten Schalenstruktur besitzt die Struktur A die geringste kationische Ladung. Struktur C mit der geringsten Anzahl an Oligosaccharideinheiten besitzt hingegen die höchste kationische Ladung. Alle PEI-Glykopolymere liegen in wässrigem Medium als isolierte Kern-Schale-Architekturen vor, wobei der pH-Wert keinen Einfluss auf die Größe dieser dendritischen Glykopolymere hat.

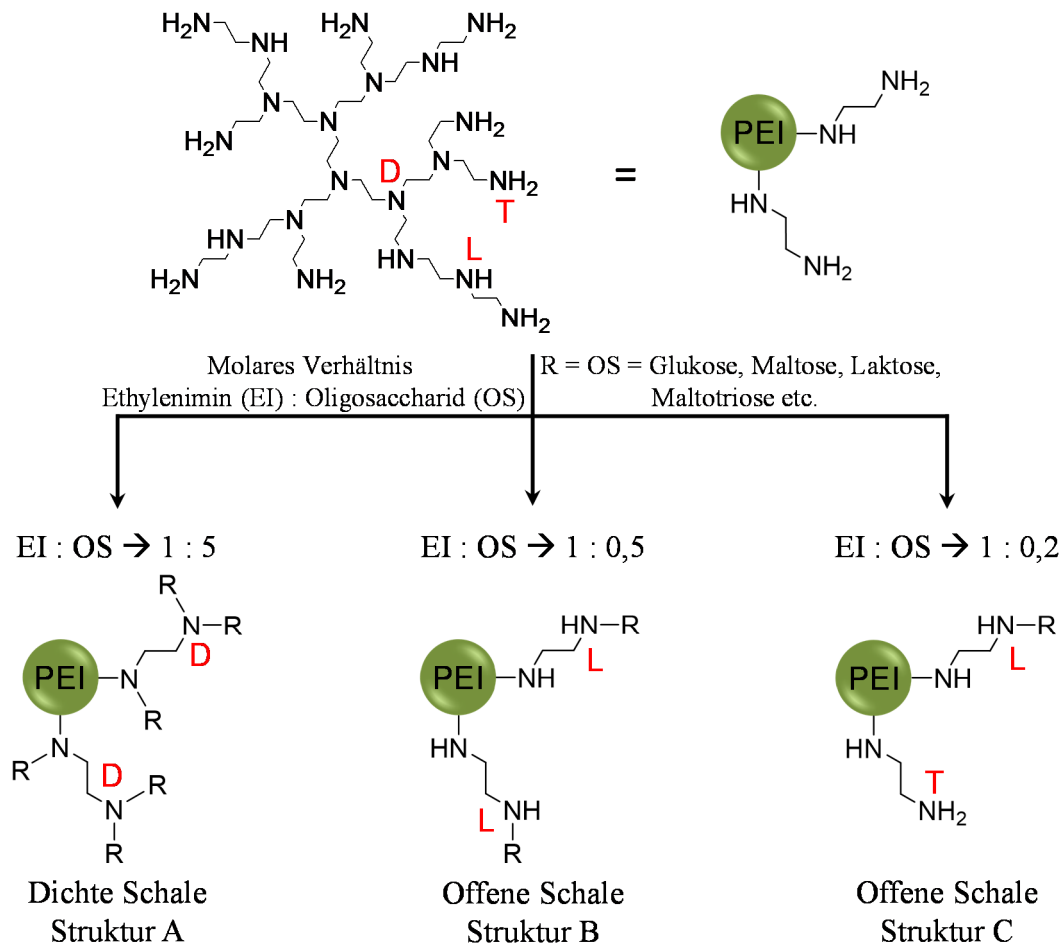


Abbildung 2.13: Offene und dichte Schalenstrukturen von Glykopolymeren am Beispiel von hvz PEI als Kernmolekül nach Appelhans et al.¹⁸⁶.

Die hydrophile Saccharidschale und der kationische, hydrophobe PEI-Kern ermöglichen spezifische Interaktionen über elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und andere nicht-kovalente Wechselwirkungen mit einer Vielzahl an Wirkstoffen und Biomolekülen, weshalb sie vorwiegend Anwendung als Drug-Delivery-Systeme finden.^{166, 186, 188-193}

2.7 Kern-Schale-Architekturen mit Aminosäure-/Peptidschalen

Neben der Darstellung von dendritischen Glykopolymeren bietet die Anbindung von Aminosäuren bzw. Peptiden eine weitere Möglichkeit die Biokompatibilität kationischer, dendritischer Polymere zu erhöhen. Aus der Literatur sind insbesondere Kern-Schale-Architekturen auf der Basis von PPI-^{194, 195} und PAMAM-Dendrimern¹⁹⁶⁻¹⁹⁹ sowie hvz PEI²⁰⁰⁻²⁰⁶ bekannt, wobei die Peptidschale aus Polylysin, Polyglutaminsäure oder benzylgeschützter Polyglutaminsäure besteht. Die Synthese der Peptidketten verläuft üblicherweise über die ringöffnende Polymerisation von reaktiven α -Aminosäure-*N*-

Carboxyanhydriden (**Abbildung 2.14**), auch als NCA-Polymerisation bekannt, wobei die dendritischen Polyamine als Makroinitiatoren fungieren. Aufgrund der Ringstruktur des *N*-Carboxyanhydrids (NCA) ist die Carbonylgruppe am C-5 stark aktiviert. Diese kann leicht acetyliert werden, wobei gleichzeitig die Aminogruppe geschützt ist.²⁰⁷

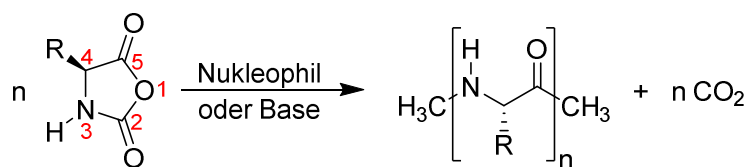


Abbildung 2.14: Ringöffnende Polymerisation von α -Aminosäure-*N*-Carboxyanhydriden.

In Abhängigkeit vom eingesetzten Initiator verläuft die NCA-Polymerisation entweder über den Amin- bzw. Carbamat-Mechanismus oder den Mechanismus der aktivierten Monomere.²⁰⁸

Bei der Initiierung der NCA-Polymerisation durch starke Nucleophile (primäre Amine) wird das *N*-Carboxyanhydrid nukleophil am C-5 unter Ringöffnung angegriffen. Es entsteht eine Carbaminsäure, welche über zwei verschiedene Wege weiter reagieren kann (**Abbildung 2.15**). Zum einen kann eine direkte Decarboxylierung erfolgen. Das resultierende Aminosäurederivat besitzt wiederum eine primäre Aminogruppe an dem ein weiteres NCA-Monomer angreifen kann. Dieser Amin-Mechanismus wurde zuerst von Wessely et al.^{209, 210} und Watson et al.²¹¹ beschrieben. Andererseits ist eine Deprotonierung der Carbaminsäure möglich. Das resultierende Carbamation ist ebenfalls in der Lage ein weiteres NCA-Monomer anzugreifen. Durch Decarboxylierung des entstehenden gemischten Carbamin-carboxylanhydrids entsteht das Produkt des Amin-Mechanismus. Das Kettenwachstum über das Carbamation wurde von Idelson und Blout als Carbamat-Mechanismus beschrieben.²¹² Sowohl der Amin- als auch der Carbamat-Mechanismus sind reversibel. Der Mechanismus des Kettenwachstums ist in der Regel von den Reaktionsbedingungen und dem Initiator selbst abhängig.

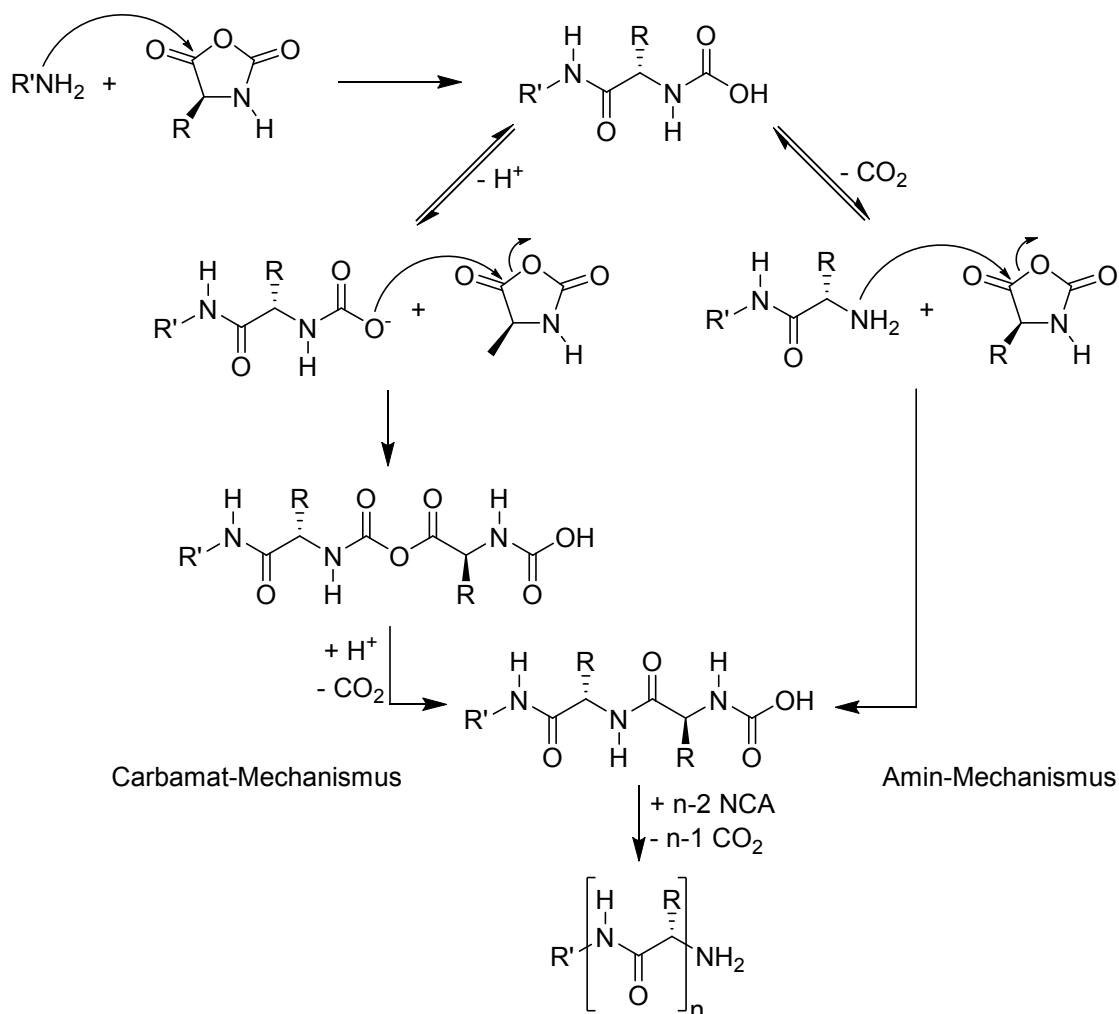


Abbildung 2.15: Initiierung und Kettenwachstum der NCA-Polymerisation mit Nucleophilen.

Bei dem von Bamford et al.²¹³ entwickelten Mechanismus der aktivierten Monomere (**Abbildung 2.16**) erfolgt die Initiierung der NCA-Polymerisation durch starke Basen (tertiäre Amine). Die Initiatorbase deprotoniert im ersten Schritt die unsubstituierte NH-Gruppe des *N*-Carboxyanhydrids. Das entstehende NCA-Anion greift am C-5 eines weiteren NCA-Monomers an. Es entsteht ein Carbamat, welches durch Decarboxylierung und einem Protonentransfer zu einem *N*-Aminoacyl-NCA reagiert. An diesem Dimer kann nun erneut ein NCA-Anion angreifen. Im Gegensatz zum Amin- bzw. Carbamat-Mechanismus wird beim Mechanismus der aktivierten Monomere der Initiator nicht in die Peptidkette eingebaut und dient deshalb vielmehr als Katalysator in einem Protonierungs/Deprotonierungs-Gleichgewicht.

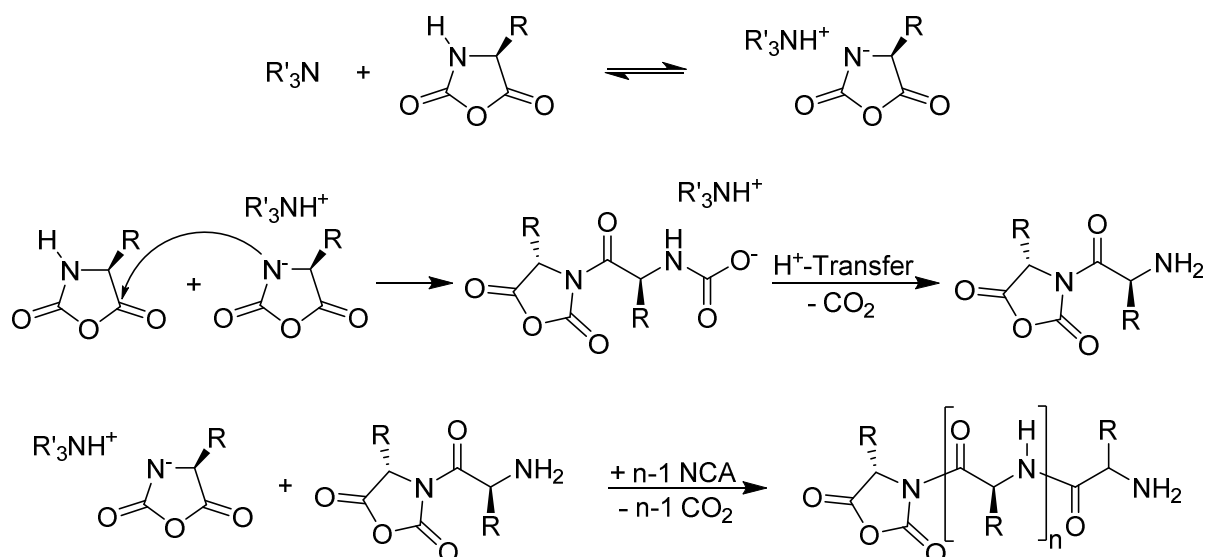


Abbildung 2.16: NCA-Polymerisation über Aktiviertes Monomer-Mechanismus.

Der NCA-Polymerisation kann bei Ausschluss von Neben- und Abbruchreaktionen ein „lebender Charakter“ zugesprochen werden. Allerdings können Nebenreaktionen u. a. durch Monomerverunreinigungen oder Spuren von Wasser bei der traditionellen NCA-Polymerisation kaum vermieden werden. Weiterhin stehen der Amin- bzw. Carbamat-Mechanismus und der Mechanismus der aktivierten Monomere zueinander in Konkurrenz, wobei während der Polymerisation ein Wechsel zwischen den Mechanismen erfolgen kann. Somit stellt der eine Mechanismus eine Nebenreaktion des anderen Mechanismus dar, wodurch die Kontrolle über das Kettenwachstum nicht mehr gegeben ist.^{207, 214}

Dendritische Polyamine besitzen im Gegensatz zu den üblichen Initiatoren, wie n-Hexylamin, eine Vielzahl an reaktiven Aminogruppen. Bei den Dendrimeren PAMAM und PPI erfolgt die Initiierung der NCA-Polymerisation durch die primären Aminogruppen in der Peripherie, wodurch eine Generierung einer dichten Schalenstruktur mit definierter Peptidkettenlänge möglich ist. In der Literatur wird vorwiegend postuliert, dass eine vollständige Polymerisation an allen primären Endfunktionalitäten stattfindet. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch die im Strukturinneren der Dendrimere vorliegenden tertiären Aminogruppen eine NCA-Polymerisation initiieren. In diesem Fall werden Peptidketten über den Mechanismus der aktivierten Monomere generiert, welche nicht an den Makroinitiator angebunden und durch Aufreinigung im Produkt nicht mehr nachweisbar sind. Hadjichristidis et al. bestätigten diese Annahme durch den Nachweis von geringen Mengen an linearem Poly- γ -benzyl-L-glutaminsäureester bei der NCA-Polymerisation mit den Makroinitiatoren PAMAM und PPI.²¹⁵ Hvz PEI besitzt neben primären und tertiären zusätzlich sekundäre Aminogruppen. Dadurch können sowohl an den terminalen, als auch an den linearen

Funktionalitäten des Makroinitiators Peptidketten aufgebaut werden. Aufgrund der unterschiedlichen Nukleophilie bzw. Basizität der verschiedenen Aminofunktionalitäten und der uneinheitlichen Struktur des Makroinitiators ist eine kontrollierte Polymerisation von Aminosäuren mit definierter Kettenlänge über die traditionelle NCA-Polymerisation kaum möglich. Insbesondere bei der Umsetzung von Poly- γ -benzyl-L-glutaminsäureester mit hvz PEI zeigen die Ergebnisse verschiedener Charakterisierungsmethoden die Komplexität der NCA-Polymerisation und der entstehenden, offenen Kern-Schale-Architektur.^{203, 205}

Trotz der geringen Kontrolle über die Anbindung der Peptidketten an dendritische Polymere weisen diese Kern-Schale-Architekturen ein hohes Potential als Drug-Delivery-Systeme auf. In Abhängigkeit von der Ladung und Sekundärstruktur der Peptidketten und dem Vorliegen als isolierte Makromoleküle oder als selbstassemblierte Strukturen können verschiedene Wirkstoffe und biologische Moleküle über einfache physikalische Wechselwirkungen integriert werden.

3. Zielstellung

Wie in **Kapitel 2.4** beschrieben, wurden bereits Komposite aus CPC und natürlichen Polymeren als geeignete DDS insbesondere für die gezielte, verzögerte Freisetzung von Antibiotika untersucht. In Bezug auf Knochenkrebstherapeutika gibt es nur sehr wenige Untersuchungen zur Wirkstofffreisetzung allein aus dem CPC. Eine Kombination von CPC mit Polymeren als Wirkstoffträger für die kontrollierte, lokale Behandlung von Knochentumoren und zur Regeneration des geschädigten Knochens sind hingegen noch nicht bekannt.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Synthese eines neuartigen polymeren Wirkstoffträgersystems für die Verbesserung der verzögerten Wirkstofffreisetzung potenzieller Arzneistoffe aus Knochenersatzmaterialien zur Behandlung von Myelomzellen infiltrierten und geschädigten Knochen. Um im physiologischen System eingesetzt werden zu können, muss der Wirkstoffträger verschiedene Anforderungen erfüllen. Zum einen ist eine hohe Wasserlöslichkeit und Biokompatibilität erforderlich, wobei das Trägersystem und resultierende Zersetzungsprodukte keine toxische Wirkung auf das umliegende gesunde Zellgewebe aufweisen dürfen. Der entsprechende Wirkstoff muss in ausreichendem Maße in die Polymerstruktur komplexierbar sein und über einen längeren Zeitraum durch physikalische Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen oder ionische attraktive Kräfte, im Wirkstoffträger verweilen. Zum anderen darf das Trägersystem das Knochenersatzmaterial nicht negativ in seinen mechanischen Eigenschaften (z. B. Porosität und Festigkeit) beeinflussen, damit der Knochenersatz leicht in den geschädigten Knochen eingearbeitet und die strukturelle Stabilität gewährleistet werden kann.

Die potenziellen Wirkstoffträgersysteme sollen als sogenannte Kern-Schale-Architekturen dargestellt werden (**Abbildung 3.1**). Dabei bildet hochverzweigtes Polyethylenimin das Kernmakromolekül, an dessen endständige Aminogruppen die Anbindung benzylgeschützter Polyglutaminsäure- oder Polyasparaginsäureketten über die NCA-Polymerisation realisiert werden kann. Über die eingesetzte Aminosäuremenge soll die Kettenlänge und somit die Dicke der Schale variiert werden. Um die Anforderung der Wasserlöslichkeit zu erfüllen, muss die Abspaltung der Schutzgruppen in den Aminosäureseitenketten durch Hydrolyse der Benzylesterbindungen erfolgen. Weiterhin soll die Biokompatibilität durch zusätzliche Oligosaccharideinheiten (Maltose, Laktose) an den endständigen Aminogruppen der Polyaminosäureketten erhöht werden, wodurch eine zweite Schalenstruktur generiert wird.

Mit Hilfe verschiedener analytischer Methoden (u. a. Kernresonanz-, Infrarotspektroskopie und dynamischer Lichtstreuung) sollen die Kern-Schale-Architekturen hinsichtlich ihrer Struktur, der Konformation der Polyaminosäureketten und dem Aggregationsverhalten in Abhängigkeit vom Ladungszustand charakterisiert und untersucht werden.

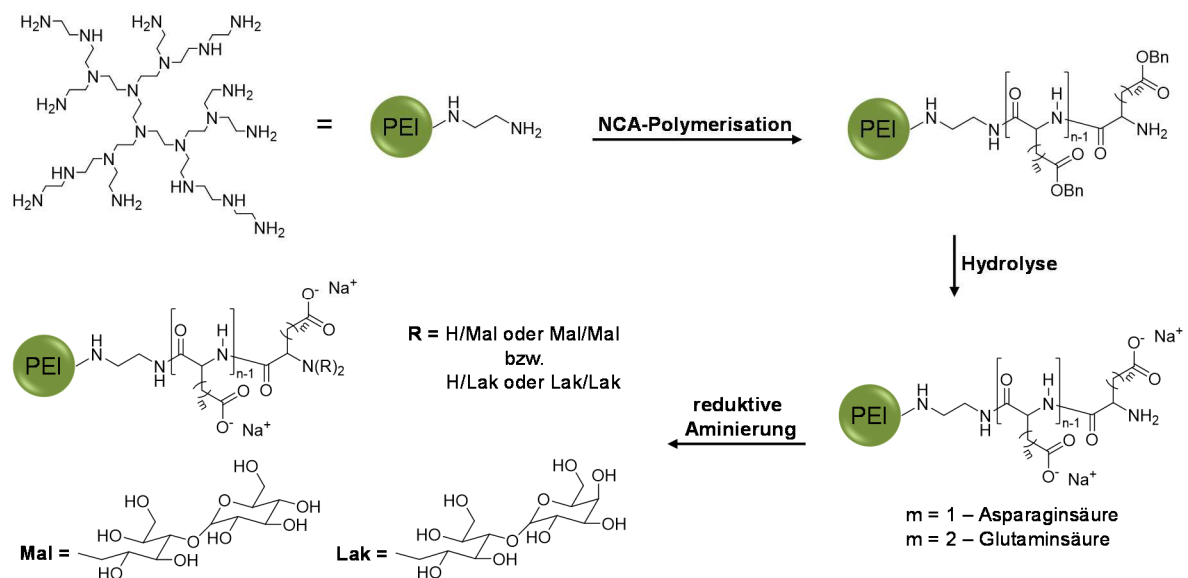


Abbildung 3.1: Syntheschema der wasserlöslichen Kern-(Doppel-)Schale-Architekturen.

Kern-Schale-Architekturen auf Basis von dendritischen Polymeren für die effektive Komplexierung und gezielte Freisetzung verschiedenster Wirkstoffe sind aus der Literatur in hohem Maße bekannt. Insbesondere Haag et al.^{159, 216} haben unter anderem an hvz Polyethylenimin^{217, 218}, hvz Polyglycerol²¹⁹⁻²²² und hvz Polyestern^{223, 224} unterschiedlichste Schalenstrukturen generiert. Die Ermittlung der Komplexierungskapazität und Freisetzungsrates der dendritischen Kern-Schale-Architekturen mit verschiedenen Wirkstoffen und Biomolekülen beschränkte sich dabei bisher nur auf Lösungen. Zur Integration dieser speziellen heterogenen Systeme in feste Materialien und zur Wirkstofffreisetzung aus den resultierenden Kompositen sind noch keine Untersuchungen bekannt. Dementsprechend beinhaltet ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit den Einbau wirkstoffbeladener polymerer Trägersysteme in die Calciumphosphatphase und die Untersuchung der Wirkstofffreisetzung aus dem generierten Hybridmaterial. Dafür wird der von InnoTERE GmbH (Radebeul) bereitgestellte Calciumphosphatzement Biocement 1.0 verwendet, in den sowohl die synthetisierten Kern-(Doppel-)Schale-Architekturen als auch das von der Arbeitsgruppe um Dr. Appelhans etablierte maltosemodifizierte Polyethylenimin (PEI(25)-Mal B) integriert werden soll. Weiterhin sollen Polyelektrolytkomplexe, welche aus den genannten Polymerstrukturen mit entsprechenden linearen Polykationen bzw. Polyanionen hergestellt werden, als potenzielle Trägersysteme getestet und in die Calciumphosphatphase überführt

werden. Für die Evaluierung der reduzierten Wirkstofffreisetzung aus der Calciumphosphatphase sind verschiedene Vorversuche mit dynamischer Lichtstreuung und Ultrafiltration nötig. Dabei soll u. a. das Wechselwirkungsverhalten der Polymerstrukturen mit dem Wirkstoff und der Komplexierungs- und Freisetzungsgrad des Wirkstoffs im geeigneten Medium ermittelt werden.

Zusätzlich soll sowohl die Biokompatibilität der generierten Kern-Schale-Architekturen als auch dessen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften des Calciumphosphatzementes in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Michael Gelinsky (Zentrum für Translationale Knochen, Gelenk- und Weichgewebeforschung, TU Dresden) und von Prof. Dr. Katrin Susanne Lips (Justus-Liebig-Universität Gießen) untersucht werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

Entsprechend der Zielstellung gliedern sich die Ergebnisse und die damit verbundene Diskussion in folgende Themenbereiche: Zunächst wird die Synthese und die dazugehörige analytische Charakterisierung der Monomere und Kern-Schale-Architekturen vorgestellt. Des Weiteren wird detailliert auf das Verhalten der wasserlöslichen Polymerstrukturen im wässrigen Medium eingegangen. Anschließend erfolgt die Diskussion über die Beladung der Wirkstoffträgersysteme mit Arzneistoffen und deren Freisetzung sowohl in bzw. aus der wässrigen Lösung als auch aus der Calciumphosphatphase. Abschließend werden die Ergebnisse der Kooperationsarbeiten zur Untersuchung der Biokompatibilität der Kern-Schale-Architekturen und deren Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften des Calciumphosphatzementes näher erläutert.

4.1 Synthese und Charakterisierung der wasserlöslichen Kern-Schale-Architekturen

4.1.1 Hochverzweigtes Polyethylenimin

Für die Darstellung der wasserlöslichen Polymerstrukturen wurde ein nieder- und ein hochmolekulares hochverzweigtes Polyethylenimin (PEI, **Abbildung 4.1**) als Kernmolekül verwendet. Beide Polyethylenimine wurden von der BASF SE (Ludwigshafen, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

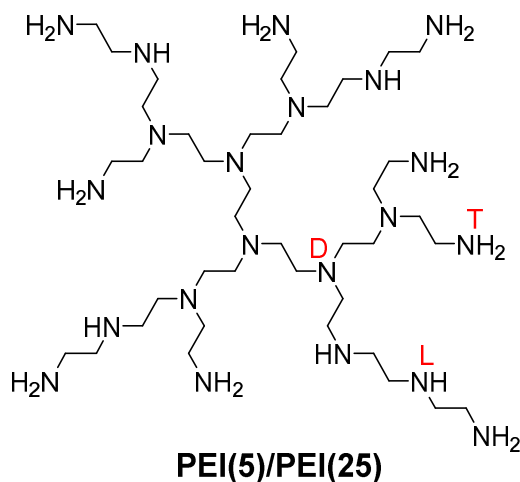


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung von hochverzweigtem Polyethylenimin.

Das hochverzweigte, niedermolekulare PEI mit dem Markennamen Lupasol G100 besitzt nach Herstellerangaben eine gewichtsmittlere Molmasse von 5.000 g/mol und wird im Folgenden mit **PEI(5)** abgekürzt. Das hochverzweigte Derivat Lupasol WF wird mit einer gewichtsmittleren Molmasse von 25.000 g/mol angegeben. Dieses Polyethylenimin wird als **PEI(25)** bezeichnet. Mit ^{13}C -NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden die Strukturparameter hochverzweigter Polyethylenimine bereits ausführlich von Appelhans et al.¹⁸⁶ ermittelt. Die entsprechenden Parameter für **PEI(5)** und **PEI(25)** sind in **Tabelle 4.1** aufgelistet. Das Verhältnis zwischen tertiären (T), linearen (L) und dendritischen (D) Gruppen beträgt für **PEI(5)** 1:1,15:0,94 und für **PEI(25)** 1:1,38:1,03.

Tabelle 4.1: Strukturparameter von **PEI(5)** und **PEI(25)**.

	M_0 [g/mol]	M_n^a [g/mol]	M_w^a [g/mol]	DP_n	DP_w	T [%]	L [%]	D [%]	DB [%]
PEI(5)	43	3.600	5.000	84	116	32,4 (27,2) ^b	37,3 (31,4) ^b	30,3 (25,4) ^b	62,8
PEI(25)	43	9.600	25.000	223	581	29,3 (65,3) ^b	40,4 (89,9) ^b	30,3 (67,6) ^b	59,5

^a mit SEC und Lichtstreuung von der BASF SE charakterisiert^{225, 226}

^b Anzahl der jeweiligen Aminogruppeneinheit = prozentualer Anteil / 100- DP_n

4.1.2 Synthese der *N*-Carboxyanhydride

Die Aktivierung der Säurefunktion von L-Glutaminsäure- γ -benzylester (γ -BLG) und L-Asparaginsäure- β -benzylester (β -BLA) erfolgte nach der Fuchs-Farthing-Methode.^{227, 228} Dabei werden freie Aminosäuren und deren Derivate direkt mit gasförmigem Phosgen, flüssigem Diphosgen oder kristallinem Triphosgen zu *N*-Carboxyanhydriden (NCA) umgesetzt.

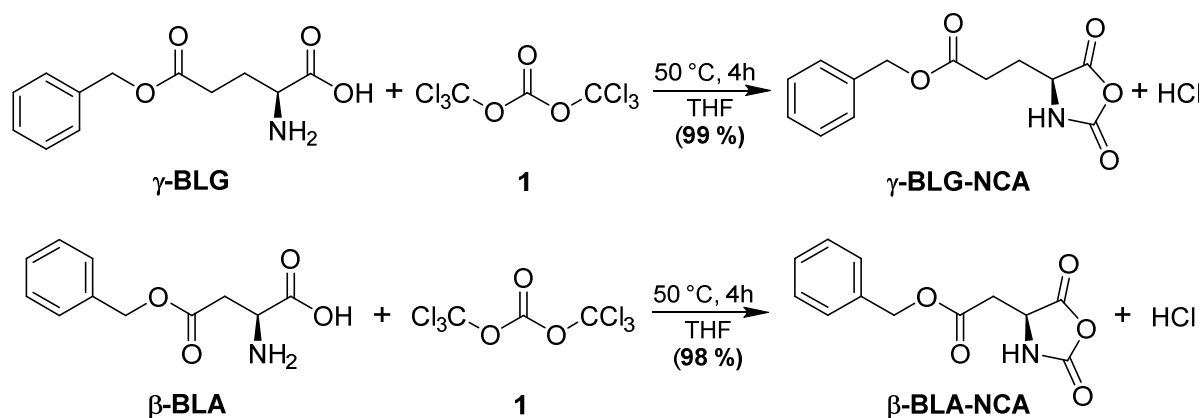


Abbildung 4.2: Syntheschema zur Herstellung der *N*-Carboxyanhydrid-Monomere.

In dieser Arbeit wurde das am einfachsten handhabbare Triphosgen **1** (**Abbildung 4.2**) verwendet. Während der Reaktion greift die α -Aminosäure das Phosgenierungsreagenz nucleophil an, wodurch in Summe drei Moleküle Phosgen entstehen.²²⁹ Um eine aufwendige Aufarbeitung des Reaktionsproduktes zu vermeiden, wird Triphosgen im molaren Verhältnis 1:3 zum α -Aminosäurebenzylester eingesetzt. Die Synthese der NCA-Monomere wurde nach einer abgewandelten Vorschrift von Daly und Poché²³⁰ durchgeführt. Als Nebenprodukt entsteht Chlorwasserstoff, welches den entstandenen NCA-Ring zu Aminosäurechlorid-Hydrochlorid spalten kann. Durch Phosgenierung des Hydrochlorids entstehen α -Isocyanato-Säurechloride.²³¹ Dieser Nebenreaktion wurde entgegengewirkt, in dem bereits während der Reaktion Argon über das Reaktionsgemisch geleitet und somit der entstandene Chlorwasserstoff sofort ausgespült wurde. Weiterhin wurde nach Beendigung der Reaktion das Reaktionsgemisch mehrmals mit Tetrahydrofuran gespült bis die Lösung einen pH-Wert von etwa 7 besaß. Die in *n*-Hexan auskristallisierten NCA-Monomere L-Glutaminsäure- γ -benzylester-*N*-carboxyanhydrid (**γ -BLG-NCA**) und L-Asparaginsäure- β -benzylester-*N*-carboxyanhydrid (**β -BLA-NCA**) wurden in hohen Ausbeuten erhalten und mit ¹H-NMR-Spektroskopie (**Abbildung 4.3** und **4.4**) charakterisiert. Die Signale der Arylprotonen (H-1) sind deutlich zu erkennen. Die chemische Verschiebung des Stickstoffprotons von **γ -BLG-NCA** beträgt 9.1 ppm und die von **β -BLA-NCA** 9.0 ppm. Das charakteristische Protonensignal der Methingruppe liegt bei 4.5 ppm (5-H, **γ -BLG-NCA**) bzw. 4.7 ppm (4-H, **β -BLA-NCA**). Nur das Signal der Methylengruppe (3-H) von **γ -BLG-NCA** überlagert mit dem Lösungsmittelsignal. In beiden ¹H-NMR-Spektren sind keine Verunreinigungen, welche die nachfolgende NCA-Polymerisation stören könnten, zu erkennen.

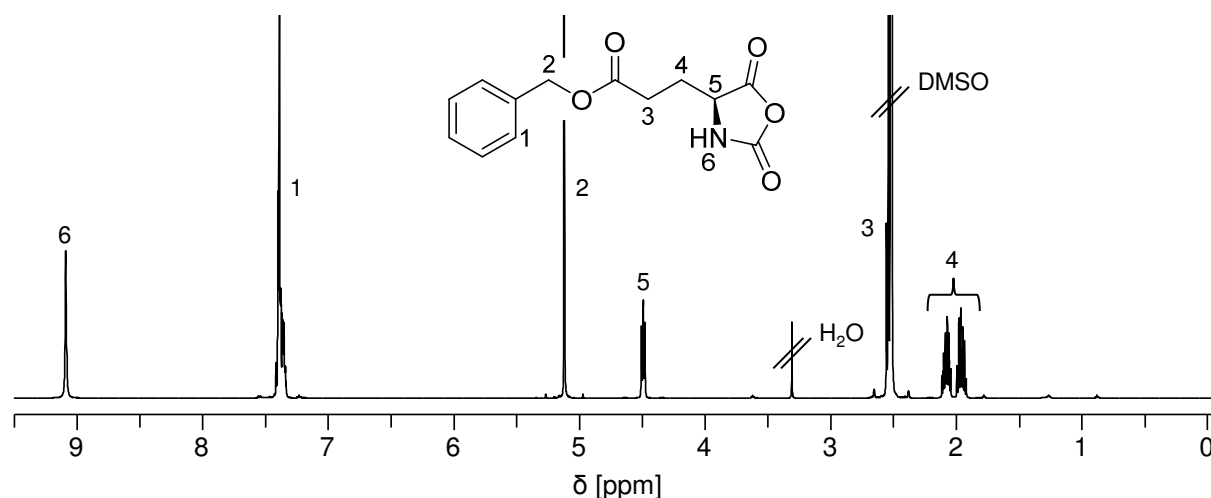


Abbildung 4.3: ¹H-NMR-Spektrum von L-Glutaminsäure- γ -benzylester-*N*-carboxyanhydrid (**γ -BLG-NCA**), aufgenommen in deuteriertem DMSO.

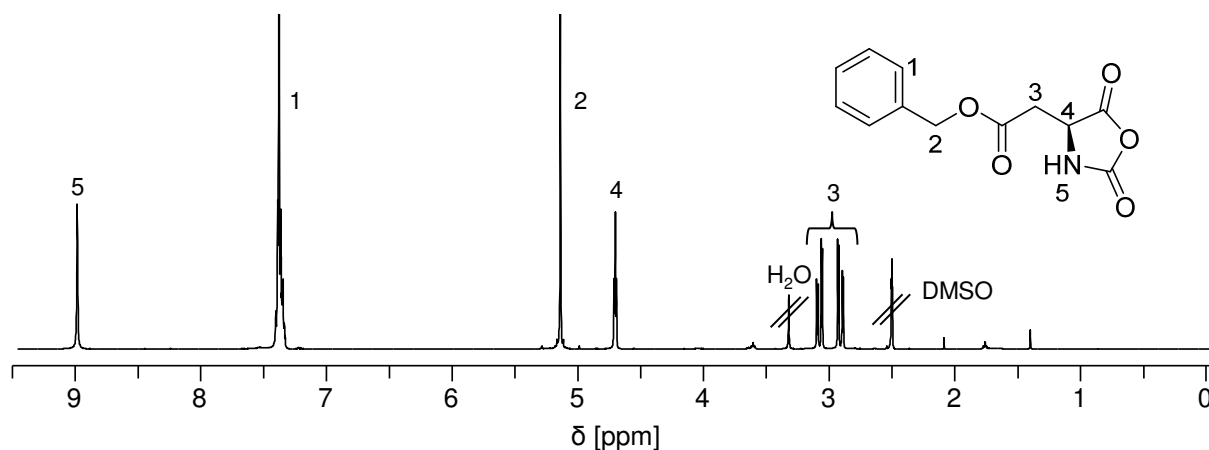


Abbildung 4.4: ^1H -NMR-Spektrum von L-Asparaginsäure- β -benzylester- N -carboxyanhydrid (**β -BLA-NCA**), aufgenommen in deuteriertem DMSO.

4.1.3 NCA-Polymerisation

Die ringöffnende Polymerisation von α -Aminosäure- N -carboxyanhydriden ist die heute am häufigsten verwendete Methode zur Herstellung synthetischer Polypeptide. Die Synthese von Polyethylenimin-poly- γ -benzyl-L-glutaminsäureester (**PEI(5)-PBLG**) und Polyethylenimin-poly- β -benzyl-L-asparaginsäureester (**PEI(5)-PBLA**) erfolgte nach einer Vorschrift von Tian et al.²⁰⁵ (**Abbildung 4.5**).

PEI(5) dient dabei als multifunktionaler Makroinitiator, wobei die primären, sekundären und tertiären Aminogruppen die NCA-Polymerisation gleichermaßen initiieren können. Verunreinigungen der Edukte beeinflussen die Polymerisation der α -Aminosäure- N -carboxyanhydride in hohem Maße. Wasser kann die NCA-Monomere nukleophil angreifen und somit ebenfalls eine NCA-Polymerisation initiieren. Um diese Nebenreaktion zu vermeiden, wurde das stark hygroskopische **PEI(5)** unter Vakuum über zwei Tage getrocknet. Die NCA-Monomere wurden über eine Fritte abgesaugt, mehrmals mit n -Hexan gespült und anschließend ebenfalls unter Vakuum getrocknet. Das bei der NCA-Polymerisation unter Schutzgasatmosphäre entstehende Kohlenstoffdioxid wurde mit Argon ausgespült. Die Aufreinigung von **PEI(5)-PBLG** und **PEI(5)-PBLA** erfolgte über eine zweitägige Dialyse gegen Methanol.

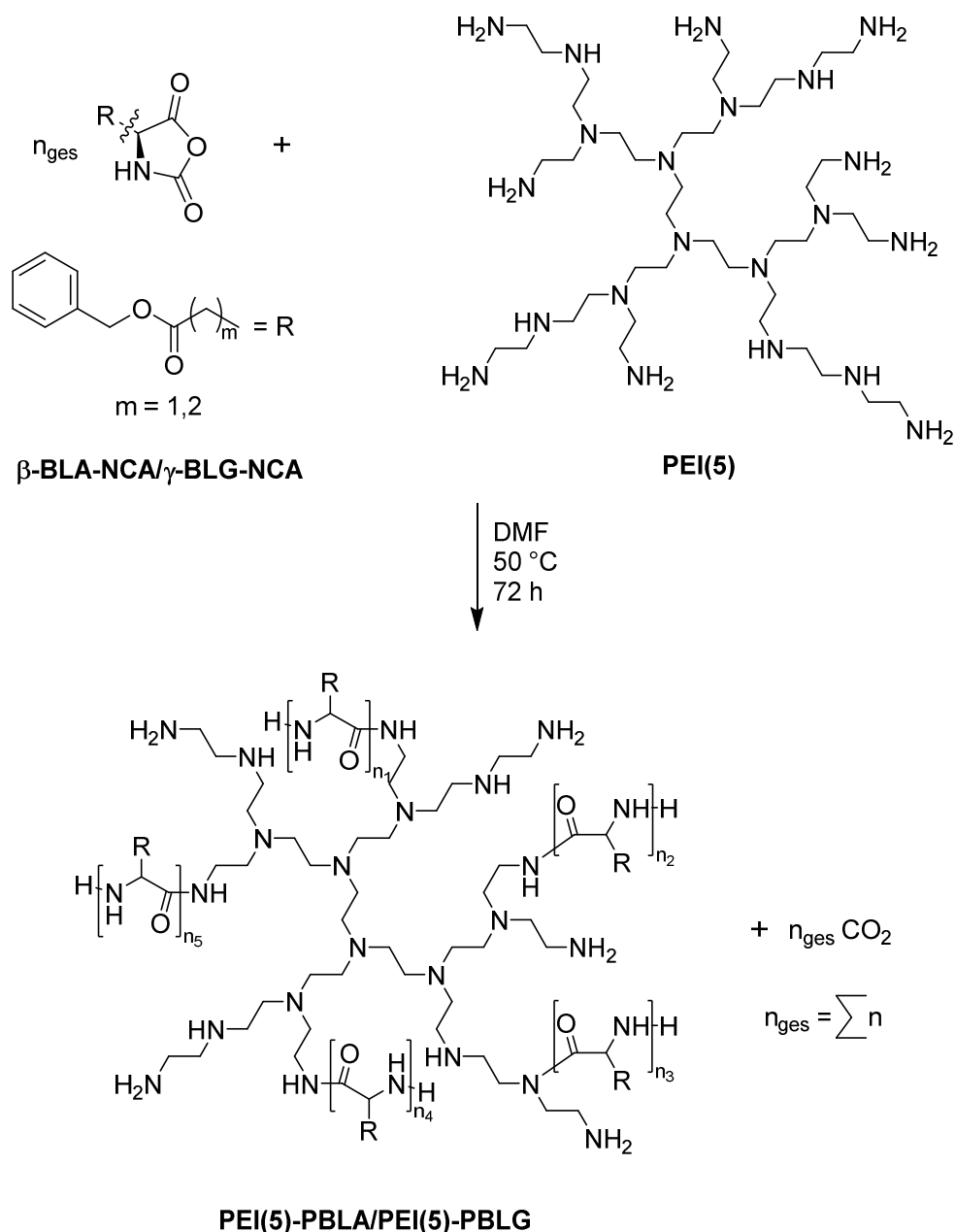


Abbildung 4.5: Syntheschema der dendritischen Copolymere **PEI(5)-PBLA** ($m = 1$; $n_{\text{ges}} = 346$) und **PEI(5)-PBLG** ($m = 2$; $n_{\text{ges}} = 43, 173, 259, 346$).

Es wurden dendritische Copolymere mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen zwischen den Ethylenimineinheiten (EI-Einheiten) des PEI und dem NCA-Monomer hergestellt (siehe **Tabelle 4.2** und **6.3**). Die Werte 43, 173, 259 und 346 in den Strukturbezeichnungen entsprechen der in der NCA-Polymerisation eingesetzten Anzahl an BLG- bzw. BLA-Einheiten.

Tabelle 4.2: Verhältnisse der Monomere und theoretische zahlenmittlere Molmasse der dendritischen Copolymere.

	Monomereinheiten (Anzahl)			Monomereinheiten- verhältnis		$M_{n,th}^a$ [g/mol]
	EI	BLG	BLA	EI:BLG	EI:BLA	
PEI(5)-PBLG-43	84	43	-	1 : 0,5	-	13.000 ^a
PEI(5)-PBLG-173	84	173	-	1 : 2,0	-	41.500 ^a
PEI(5)-PBLG-259	84	259	-	1 : 3,1	-	60.400 ^a
PEI(5)-PBLG-346	84	346	-	1 : 4,1	-	79.500 ^a
PEI(5)-PBLA-346	84	-	346	-	1 : 4,1	74.600 ^b

^a für PEI(5)-PBLG: $M_{n,th} = M_n(\text{PEI}(5)) + n_{ges} \cdot M(\text{BLG})$ mit $M_n(\text{PEI}(5)) = 3.600$ g/mol, $M(\text{BLG}) = 219,25$ g/mol und n_{ges} = Anzahl der BLG-Einheiten;

^b für PEI(5)-PBLA: $M_{n,th} = M_n(\text{PEI}(5)) + n_{ges} \cdot M(\text{BLA})$ mit $M_n(\text{PEI}(5)) = 3.600$ g/mol, $M(\text{BLA}) = 205,23$ g/mol und n_{ges} = Anzahl der BLA-Einheiten

Im Gegensatz zu der in der Literatur²⁰³⁻²⁰⁶ beschriebenen Löslichkeit der dendritischen Strukturen mit PBLG-Ketten waren **PEI(5)-PBLG-43**, **PEI(5)-PBLG-173** und **PEI(5)-PBLG-259** nicht bzw. nur wenig in Chloroform löslich. Dimethylsulfoxid (DMSO) erwies sich als etwas besseres Lösungsmittel. Allerdings waren die dendritischen Copolymere zum Teil auch gequollen. Die hochmolekularen **PEI(5)-PBLG-346** und **PEI(5)-PBLA-346** lösten sich hingegen teilweise in Chloroform und nach kurzem Erwärmen gut in DMSO. Mögliche Ursachen der unterschiedlichen Löslichkeit werden in **Kapitel 4.2.5** ausführlicher diskutiert.

NMR-Spektroskopie

Die ¹H-NMR-Spektren von **PEI(5)-PBLG-346** (**Abbildung 4.6**) und **PEI(5)-PBLA-346** (**Abbildung 4.7**) belegen die erfolgte ringöffnende Polymerisation der NCA-Monomere in oligomere bzw. polymere Aminosäureketten am hochverzweigten Polyethylenimin. Diese können jedoch nur zur Charakterisierung der PBLG- bzw. PBLA-Ketten herangezogen werden. Die Protonensignale des **PEI(5)** im Bereich von 2.5 ppm bis 3.5 ppm sind zum einen durch das Wasser- und DMSO-Signal und zum anderen durch die Signale der Methylengruppen (H-2 und H-3 von **PEI(5)-PBLG-346**, H-2 von **PEI(5)-PBLA-346**) überlagert. Dadurch ist es nicht möglich, das molare Verhältnis zwischen den EI-Einheiten des PEI und den BLG- bzw. BLA-Einheiten zu ermitteln. Weiterhin kann auch nicht festgestellt werden, an wie vielen terminalen und linearen Aminogruppen Polyaminosäureketten aufgebaut wurden. Die NMR-Spektren geben zudem keine Information über die Kettenlängen oder nicht am PEI gebundene Ketten, welche durch dendritische

Aminogruppen oder etwaige Verunreinigungen, wie Spuren von Wasser, initiiert wurden. ^{13}C -NMR-Spektren standen aufgrund der mäßigen Löslichkeit in DMSO für die weitere Strukturaufklärung nicht zur Verfügung.

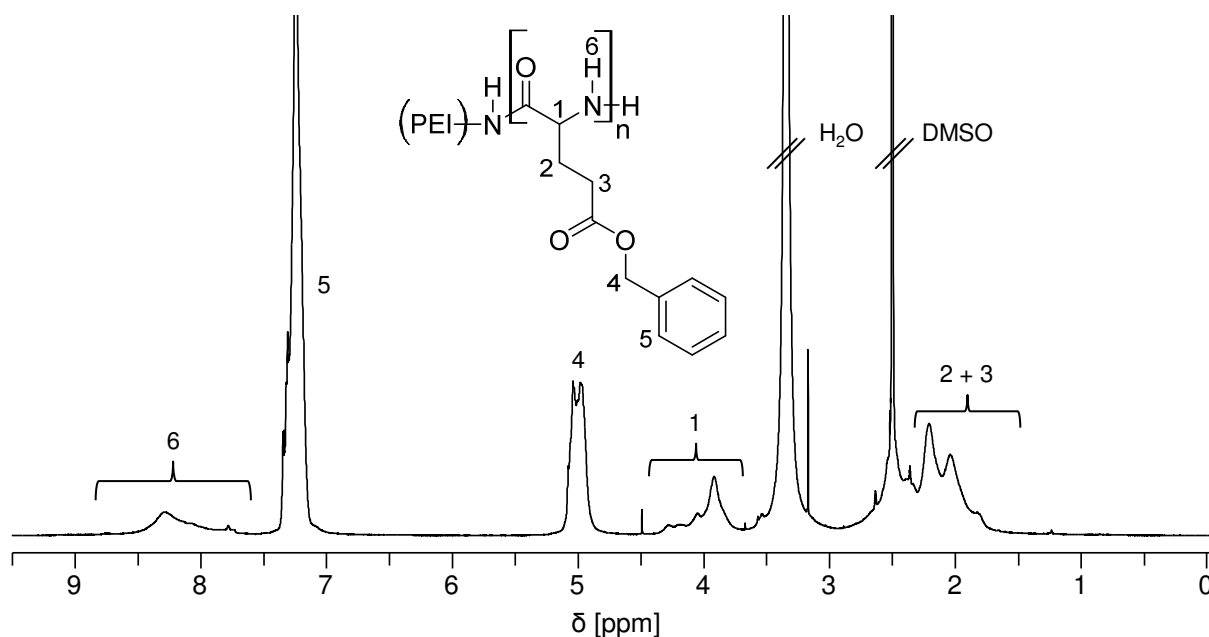


Abbildung 4.6: ^1H -NMR-Spektrum von Polyethylenimin-poly- γ -benzyl-L-glutaminsäure-ester (**PEI(5)-PBLG-346**), aufgenommen in deuteriertem DMSO.

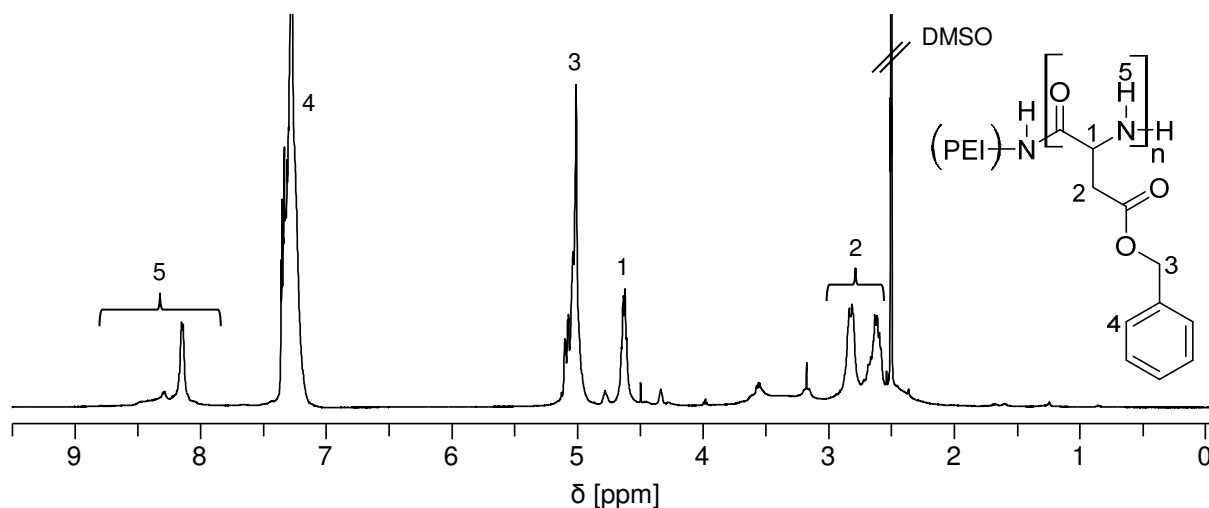


Abbildung 4.7: ^1H -NMR-Spektrum von Polyethylenimin-poly- β -benzyl-L-asparaginsäure-ester (**PEI(5)-PBLA-346**), aufgenommen in deuteriertem DMSO.

ATR-FT-IR-Spektroskopie

Die ATR-FT-IR-Spektroskopie ist eine hilfreiche analytische Methode zur Aufklärung der Sekundärstruktur von Polypeptiden. In Abhängigkeit von einer geordneten (α -Helix, β -Faltblatt) oder einer ungeordneten (random coil) Struktur erscheinen die Amid I- ($\text{C}=\text{O}$ -

Valenzschwingung) und Amid II-Banden (C–N-Valenz- und N–H-Biegeschwingung) bei eindeutigen Wellenzahlen im Infrarotspektrum (**Tabelle 4.3**).

Tabelle 4.3: Allgemeine Infrarot-Frequenzen [cm^{-1}] der Amid I- und Amid II-Banden von Polypeptiden nach Miyazawa und Blout.²³²

Konformation	Amid I	Amid II
α -Helix	1650	1546
β -Faltblatt	1630	1530
Random coil	1656	1535

Poly- γ -benzyl-L-glutaminsäureester (PBLG) gehört zu den α -Helix-bildenden Homopolypeptiden und ist hinsichtlich seiner Konformation das am häufigsten untersuchte synthetische Polypeptid. Es handelt sich dabei um eine rechtsdrehende Helix, die als 18/5-Helix bezeichnet wird. Diese helikale Struktur besteht aus 3,6 Monomereinheiten pro Windung bzw. 18 Monomereinheiten pro 5 Windungen. Neben der stabilen α -Helix existiert PBLG auch in der Konformation des β -Faltblattes.²³³⁻²³⁷ Untersuchungen von Papadopoulos et al.²³⁷ mit FT-IR-Spektroskopie, ^{13}C -Festkörper-NMR und Weitwinkel-Röntgenstreuung ergaben, dass bei einem Polymerisationsgrad kleiner 18 Poly- γ -benzyl-L-glutaminsäureester sowohl in der Konformation einer α -Helix- als auch einer β -Faltblatt-Struktur vorliegt. Bei mehr als 18 Monomereinheiten stabilisieren die intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen ausschließlich die helikale Struktur.

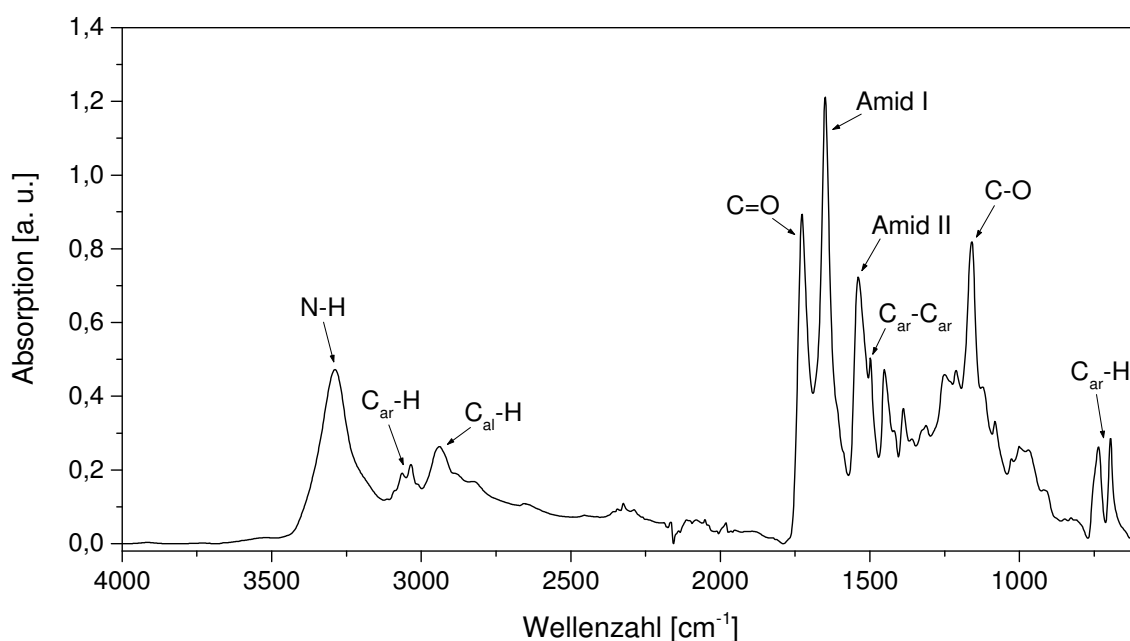


Abbildung 4.8: FT-IR-Spektrum von PEI(5)-PBLG-346, KBr-Pressling.

In **Abbildung 4.8** ist das FT-IR-Spektrum von **PEI(5)-PBLG-346** zu sehen. Wichtige strukturaufklärende Banden sind die N–H-Valenzschwingungen bei einer Wellenlänge von $\approx 3300\text{ cm}^{-1}$ und die Doppelbande der aromatischen C–H-Valenzschwingungen bei 3064 cm^{-1} und 3035 cm^{-1} . Die Banden der aliphatischen C–H-Valenzschwingungen befinden sich unterhalb von 3000 cm^{-1} . Die Esterbindung wird durch die C=O-Streckschwingung bei 1727 cm^{-1} und die C–O-Streckschwingung bei 1160 cm^{-1} charakterisiert. Die Banden bei 1498 cm^{-1} (C–C-Phenyl-Streckschwingung) und bei 736 cm^{-1} und 695 cm^{-1} (C–H-Deformationsschwingungen monosubstituierter Benzolring) stammen von den Benzylschutzgruppen. Die Amid-Banden befinden sich bei 1650 cm^{-1} (Amid I) und 1539 cm^{-1} (Amid II). Daraus lässt sich nicht auf eine konkrete Konformation schließen. Die Lage der Amid I-Bande weist auf eine α -Helix-Struktur hin. Jedoch sollte bei einer helikalen Konformation die Amid II-Bande bei einer Wellenzahl von ca. 1550 cm^{-1} zu sehen sein. **PEI(5)-PBLG-346** fiel während der Aufarbeitung in Methanol aus, wurde in reinem Wasser dispergiert und gefriergetrocknet. Für die Aufnahme des ATR-FT-IR-Spektrums wurde mit der Probe ein KBr-Pressling hergestellt und gemessen. Für eine bessere Vergleichbarkeit mit den in der Literatur^{237, 238} bereits ausführlich beschriebenen Konformationsanalysen zum PBLG wurde sowohl reiner Poly- γ -benzyl-L-glutaminsäureester (**PBLG**, $M_w = 150 - 300\text{ kDa}$) als auch **PEI(5)-PBLG-346** in Dimethylformamid (DMF) gelöst und aus der konzentrierten Lösung ein Film präpariert.

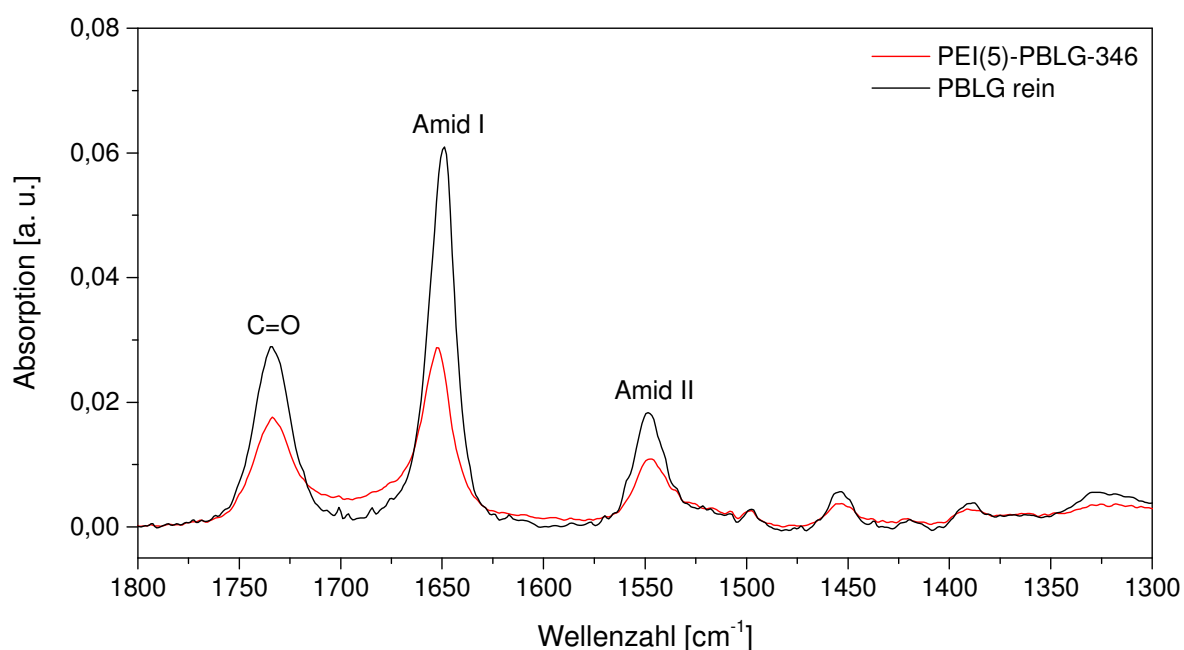


Abbildung 4.9: Ausschnitt aus dem FT-IR-Spektrum von reinem **PBLG** (schwarz) und **PEI(5)-PBLG-346** (rot), Film aus DMF.

Die FT-IR-Spektren von reinem **PBLG** und von **PEI(5)-PBLG-346** (**Abbildung 4.9**) zeigen jeweils die Amid I-Bande bei $\approx 1650 \text{ cm}^{-1}$ und die Amid II-Bande bei $\approx 1550 \text{ cm}^{-1}$, welche diagnostisch für die α -Helix sind.²³⁹ Der Nachweis der Ausbildung einer α -helikalen Konformation belegt somit die Annahme langkettiger PBLG-Ketten am PEI-Kern mit mindestens 18 Monomereinheiten. Weiterhin wird bestätigt, dass der positiv geladene PEI-Kern keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur der ungeladenen PBLG-Ketten ausübt.

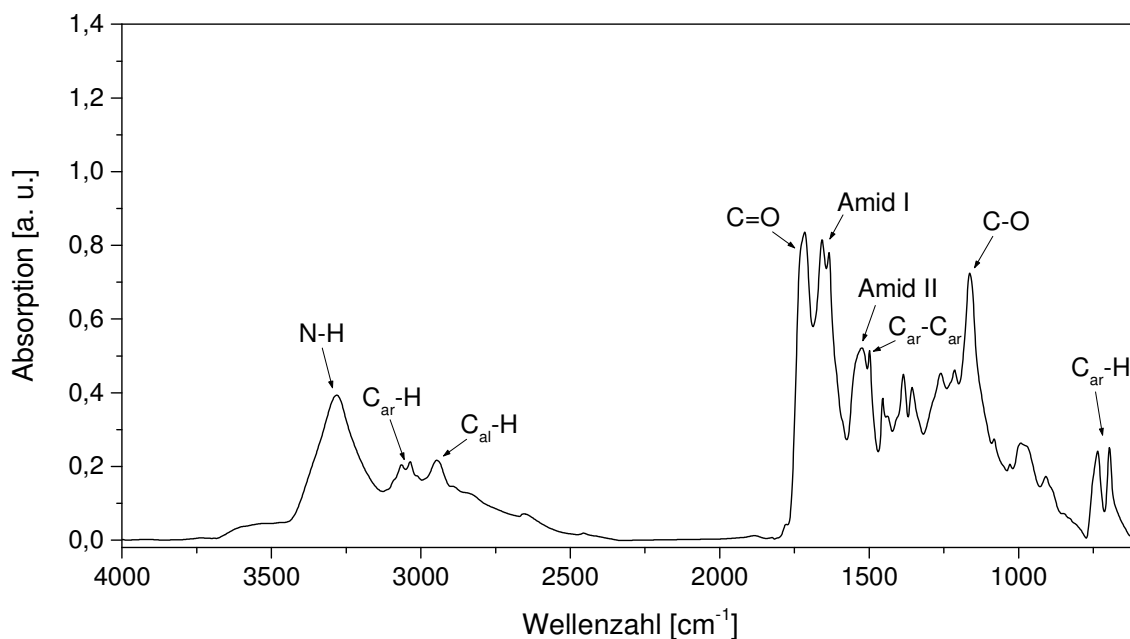


Abbildung 4.10: FT-IR-Spektrum von **PEI(5)-PBLA-346**, KBr-Pressling.

Das FT-IR-Spektrum von **PEI(5)-PBLA-346** (**Abbildung 4.10**) zeigt ähnliche Banden wie **PEI(5)-PBLG-346**. Jedoch gibt es Unterschiede in der Position und Form der Amid-Banden. Aus der Literatur²⁴⁰⁻²⁴² ist bekannt, dass Poly- β -benzyl-L-asparaginsäureester in Abhängigkeit vom Polymerisationsgrad, der Temperatur und dem Lösungsmittel in mehreren Konformationen vorliegen kann. Dazu gehören die rechtsdrehende und linksdrehende α -Helix, die ω -Helix, das β -Faltblatt und die random coil Struktur. In **Tabelle 4.4** sind die Konformationen mit den zugehörigen Infrarot-Frequenzen aufgelistet. Die Amid I-Bande von **PEI(5)-PBLA-346** erscheint als Doppelbande bei $\approx 1658 \text{ cm}^{-1}$ und $\approx 1634 \text{ cm}^{-1}$. Bei einer Wellenzahl von $\approx 1525 \text{ cm}^{-1}$ ist eine verbreiterte Amid II-Bande zu sehen. Es ist anzunehmen, dass die benzylgeschützten Poly-L-Asparaginsäureketten zum Teil eine geordnete Struktur als auch eine ungeordnete Struktur bilden. Da in dieser Arbeit der Fokus auf den glutaminsäuremodifizierten Kern-Schale-Architekturen lag, wurde hier auf eine zeitaufwendige und intensive infrarotspektroskopische Analyse von **PEI(5)-PBLA-346** verzichtet.

Tabelle 4.4: Infrarot-Frequenzen [cm^{-1}] von Poly- β -benzyl-L-asparaginsäureester.²⁴²

Konformation	Amid I	Amid II
rechtsdrehende α -Helix	1658	1553
linksdrehende α -Helix	1665	1558
ω -Helix	1672	1536
β -Faltblatt	1636	1535
random coil	1655	1535

Größenausschlusschromatographie

Für eine bessere quantitative Charakterisierung der benzylgeschützten Aminosäureeinheiten am hochverzweigten Polyethylenimin wurde versucht, die Molmassen der dendritischen Polymere mit der Größenausschlusschromatographie (engl. size exclusion chromatography, SEC) in Kombination mit Brechungsindex- (RI-) und Lichtstreu- (LS-)detektion zu bestimmen. Aufgrund der Löslichkeit in Dimethylacetamid (DMAc) erfolgte die Aufnahme der Chromatogramme nur für **PEI(5)**, **PEI(5)-PBLG-173**, **PEI(5)-PBLG-259** und **PEI-PBLG-346**. Zur Unterdrückung eventueller Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial wurde Lithiumchlorid (3 g/l) dem Eluenten und den Polymerlösungen zugegeben.

Tabelle 4.5: Übersicht der mit SEC-RI-LS bestimmten Molmassen von **PEI(5)** und der verschiedenen **PEI(5)-PBLG**, .

	LS + RI				Kalibrierung		
	M_{th} [g/mol]	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	\bar{D}	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	\bar{D}
PEI(5)	3.600 ^a	2.000	2.600	1,3	-	-	-
PEI(5)-PBLG-173	41.500	21.800	29.600	1,36	16.300	27.000	1,66
PEI(5)-PBLG-259	60.400	16.400	22.500	1,37	11.900	20.700	1,74
PEI(5)-PBLG-346	79.500	20.000	27.300	1,37	12.700	26.500	2,09

^a mit SEC und Lichtstreuung von der BASF SE charakterisiert^{225, 226}

Die ersten Messungen zeigten einen hohen Anteil an Aggregaten. Deshalb wurden die Polymerlösungen über Nacht auf 60 °C erwärmt, um Wasserstoffbrückenbindungen

aufzubrechen. Die Auswertung der Verteilungskurven der Lichtstreu- und Brechungsindex-Signale ergeben sehr kleine Molmassen im Vergleich zu den theoretisch berechneten Molmassen (**Tabelle 4.5**). Weiterhin zeigte die probenspezifische Kalibrierung der Molmasse in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen noch vorhandene Aggregate und Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial. Hochmolekulare Makromoleküle eluieren zum Zeitpunkt niedermolekularer Makromoleküle. In **Abbildung 4.11** ist das Chromatogramm für **PEI(5)-PBLG-346** dargestellt.

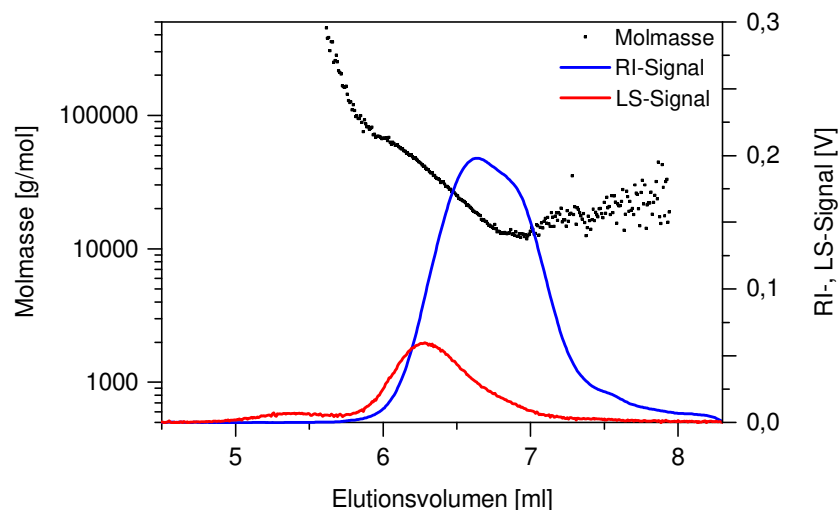


Abbildung 4.11: Molmassen, RI- und LS-Signal von **PEI(5)-PBLG-346** in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen mittels SEC-RI-LS in DMAc/LiCl (3 g/l) bestimmt, vorherige Erwärmung der Polymerlösung auf 60°C.

Aus den niedrigen Molmassen kann auf eine unkontrollierte NCA-Polymerisation am Polyethylenimin geschlossen werden. Aufgrund der mit FT-IR nachgewiesenen α -Helix-Struktur ist anzunehmen, dass sich wenige lange PBLG-Ketten bilden. Die signifikant kleine Molmasse deutet dabei auf eine Initiierung der NCA-Polymerisation an nur wenigen reaktiven Aminogruppen des Polyethylenimins. Die primären, sekundären und tertiären Aminogruppen des Makroinitiators konkurrieren miteinander, so dass sowohl der Amin-Mechanismus als auch der „activated monomer“-Mechanismus ablaufen kann (siehe **Kapitel 2.7**). Weiterhin besitzen hochverzweigte Polymere im Gegensatz zu Dendrimeren keine perfekte globulare Struktur. Dadurch sind die reaktiven Aminogruppen in Abhängigkeit von der Verzweigung nicht alle gleich gut zugänglich. Erfolgt jedoch eine Initiierung der NCA-Polymerisation trotz der schlechteren Zugänglichkeit durch tertiäre Aminogruppen entstehen Polyaminosäureketten, die nicht am PEI-Kern gebunden sind. Zusätzlich können Spuren von Wasser und geringe Verunreinigungen der Monomere zu einer Limitierung der NCA-Polymerisation führen. Trotz der intensiven Reinigung der Polymerisationsprodukte durch Dialyse ist es dennoch möglich, dass oligomere und polymere PBLG-Ketten, gebildet durch

den „activated monomer“-Mechanismus bzw. durch Nebenreaktionen, im Produkt verbleiben. Diese führen ebenfalls zu einer kleineren Molmasse.

4.1.4 Hydrolyse der Benzylester

Aufgrund der schlechten Löslichkeit der Kern-Schale-Architekturen mit weniger als 346 Aminosäureeinheiten und der damit verbundenen unzureichenden Charakterisierung wurden für die Darstellung der wasserlöslichen Copolymere nur **PEI(5)-PBLG-346** und **PEI(5)-PBLA-346** verwendet.

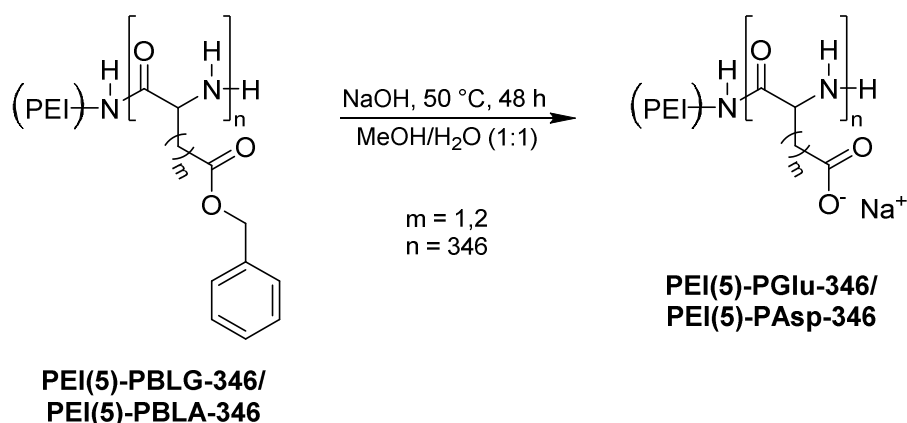


Abbildung 4.12: Syntheschema zur Abspaltung der Benzylschutzgruppen durch Hydrolyse.

Die Abspaltung der Benzylschutzgruppen erfolgte über eine Hydrolyse mit Natriumhydroxid in einem 1:1 Gemisch aus reinem Wasser und Methanol (**Abbildung 4.12**). Für eine vollständige Entschützung waren mindestens drei Äquivalente pro Benzylgruppe nötig. Die Charakterisierung der Hydrolyseprodukte Polyethylenimin-poly-L-glutaminsäure (**PEI(5)-PGlu-346**) und Polyethylenimin-poly-L-asparaginsäure (**PEI(5)-PAsp-346**) erfolgte über NMR- und ATR-FT-IR-Spektroskopie und asymmetrische Flussfeldflussfraktionierung (AF4).

NMR-Spektroskopie

Die ^1H -NMR-Spektren der Hydrolyseprodukte in **Abbildung 4.13** zeigen keine Signale bei einer chemischen Verschiebung von ca. 7.5 ppm und somit eine vollständige Abspaltung der Benzylschutzgruppen. Es treten lediglich die Protonensignale der Methingruppe (H-2) und der Methylengruppen (H-3, H-4) auf, welche teilweise die Protonensignale des PEI-Kerns überlagern. Die vollständige Hydrolyse wird auch durch die ^{13}C -NMR-Spektren von **PEI(5)-PGlu-346** (**Abbildung 4.14**) und **PEI(5)-PAsp-346** (**Abbildung 7.1**) bestätigt. Aufgrund der stark elektronenziehenden Umgebung sind die Kohlenstoffatome der Peptidgruppe und der

Carboxylatgruppe stark entschirmt. Diese ^{13}C -Signale sind daher zu höheren Frequenzen verschoben und erscheinen bei einer chemischen Verschiebung von > 170 ppm.

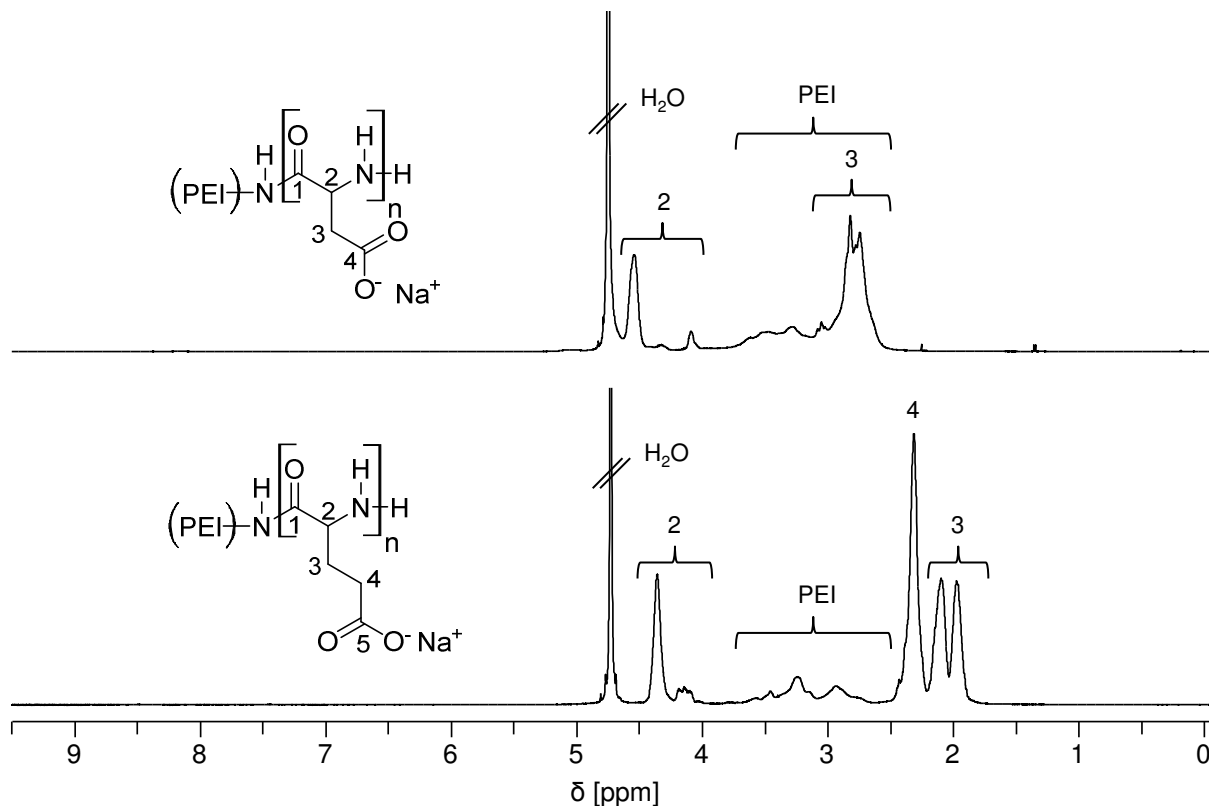


Abbildung 4.13: ^1H -NMR-Spektren von **PEI(5)-PAsp-346** (oben) und **PEI(5)-PGlu-346** (unten), aufgenommen in D_2O .

Beim Vergleich des ^{13}C -NMR-Spektrums von **PEI(5)-PGlu-346** mit dem des reinen Polyethylenimins **PEI(5)** im Bereich von 35 bis 55 ppm sind weitere wichtige strukturaufklärende Kohlenstoffsignale erkennbar. Neben dem Signal der dendritischen (D) Aminogruppen treten auch die Kohlenstoffsignale linearer (L) und terminaler (T) Einheiten auf. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass nicht an allen primären und sekundären Aminogruppen des PEI-Kerns die NCA-Polymerisation initiiert wurde.

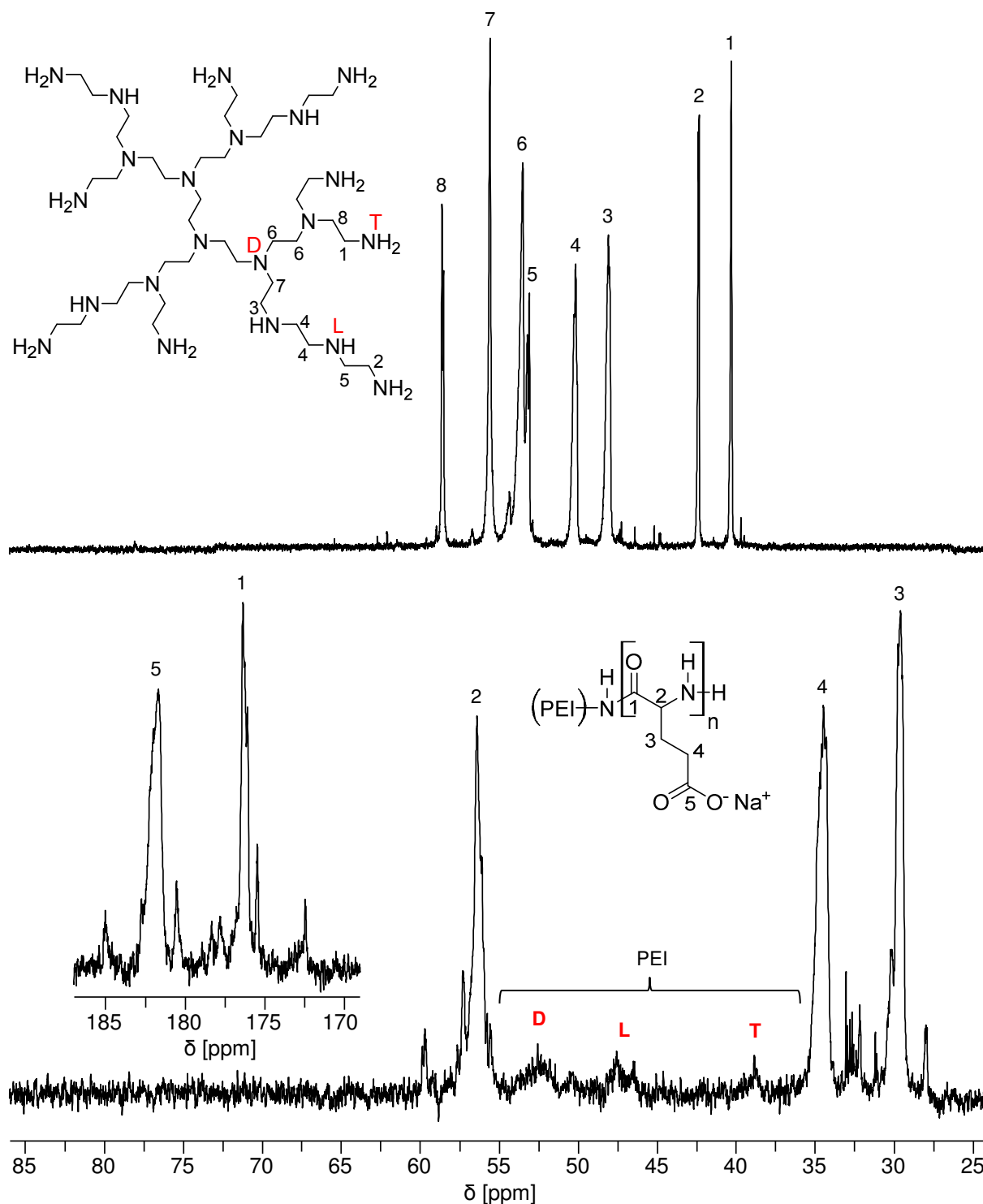


Abbildung 4.14: ^{13}C -NMR-Spektren aufgenommen in D_2O : oben PEI(5), unten PEI(5)-PGlu-346.

ATR-FT-IR-Spektroskopie

Die FT-IR-Spektren von PEI(5)-PGlu-346 (Abbildung 4.15) und PEI(5)-PAsp-346 (Abbildung 4.16), gemessen im KBr-Pressling, zeigen breite, sich überlagernde Banden. Im Bereich von 3000 cm^{-1} befinden sich die N-H-, CO-NH- (N-monosubstituiert) und C-H-Valenzschwingungsbanden. Die vollständige Entschützung der Carboxylgruppen wird durch

das Fehlen der Esterschwingungsbanden um 1700 cm^{-1} bestätigt. Die Bande der symmetrischen Valenzschwingung der Carboxylatgruppen ist deutlich bei $\approx 1400\text{ cm}^{-1}$ zu sehen. Im Spektrum von **PEI(5)-PGlu-346** überlagert die entsprechende antisymmetrische COO^- -Valenzschwingungsbande mit der Amid II-Bande, weshalb diese intensiver als die Amid I-Bande ist.

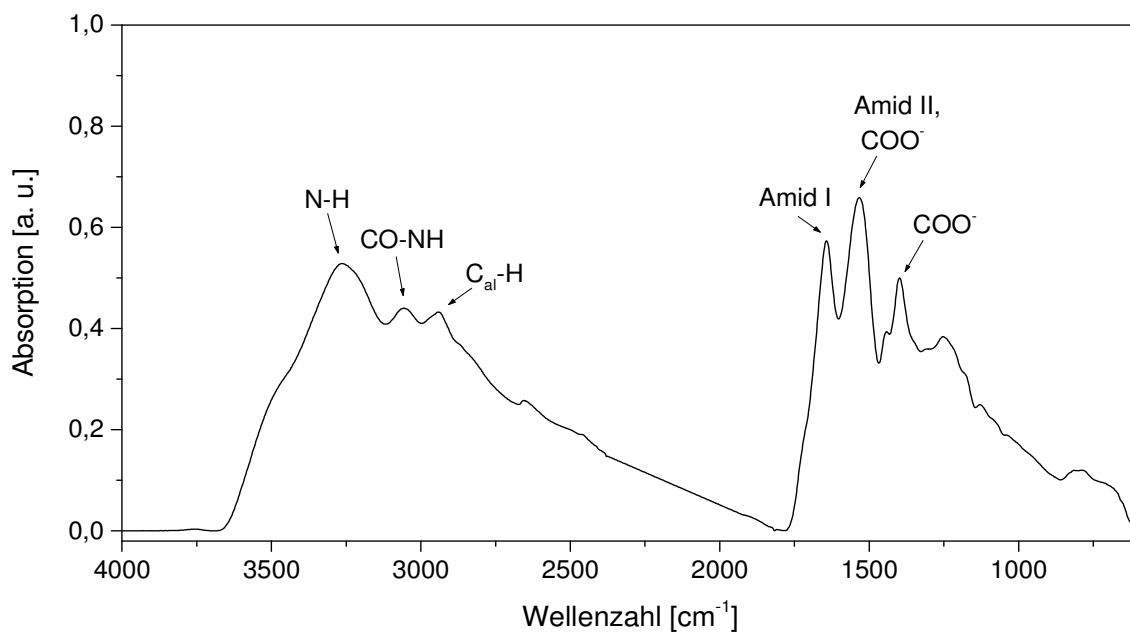


Abbildung 4.15: FT-IR-Spektrum von **PEI(5)-PGlu-346**, KBr-Pressling.

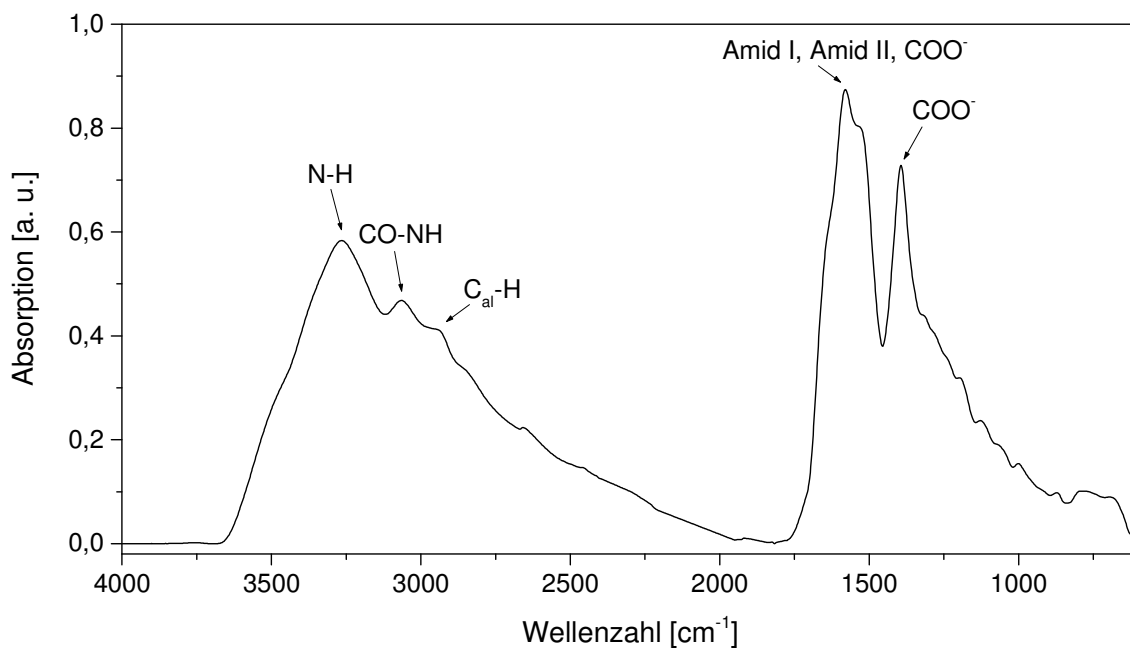


Abbildung 4.16: FT-IR-Spektrum von **PEI(5)-PAsp-346**, KBr-Pressling.

Im FT-IR-Spektrum von **PEI(5)-PAsp-346** überlagern die antisymmetrische COO^- -Valenzschwingungsbande und beide Amid-Banden. Aufgrund der Bandenüberlagerungen

können aus diesen FT-IR-Spektren keine Aussagen zur jeweils vorliegenden Konformation gemacht werden. Aus der Literatur²⁴³⁻²⁴⁵ ist bekannt, dass bei Polyglutaminsäure in wässriger Lösung ein Helix-Coil-Übergang stattfindet. Bei pH 8 sind die Seitenketten negativ geladen. Dadurch sind die elektrostatischen Abstoßungskräfte innerhalb der Polyglutaminsäureketten am größten und es entsteht eine aufgeweitete random coil Struktur. Mit abnehmendem pH Wert werden die Carboxylatgruppen zunehmend protoniert. Durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen kann sich somit eine rechtsdrehende α -Helix Struktur ausbilden. Daraufhin wurden in weiteren Experimenten Filme aus einer wässrigen Polyglutaminsäurelösung (**PGlu**, $M_w = 61$ kDa, 1 mM) und einer wässrigen **PEI(5)-PGlu-346**-Lösung (1 mg/ml) auf einem ATR-Kristall präpariert. Die aufgenommenen FT-IR-Spektren bei pH 3 und pH 7 bzw. 8 sind in **Abbildung 4.17** dargestellt.

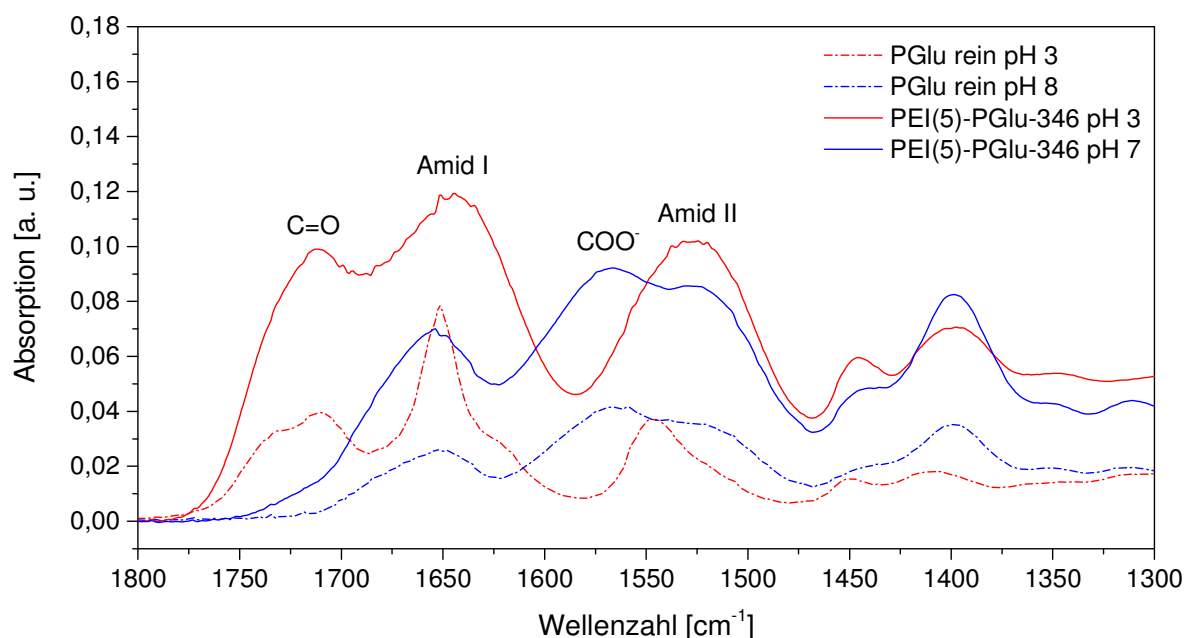


Abbildung 4.17: FT-IR-Spektren (Ausschnitt) im Vergleich: reine Polyglutaminsäure (**PGlu**) bei pH 3 und pH 8 (gestrichelt), **PEI(5)-PGlu-346** bei pH 3 und pH 7; Filme aus wässriger Lösung.

Die reine **PGlu** bei pH 3 weist eindeutig eine α -helikale Konformation auf. Die Amid-Banden sind schmal, wobei sich die Amid I-Bande bei einer Wellenzahl von 1652 cm^{-1} und die Amid II-Bande bei 1548 cm^{-1} befindet. Die Lage der Amid-Banden verändert sich signifikant bei einer pH Wert-Änderung von pH 3 nach pH 8. Es zeigt sich eine breite Amid I-Bande bei 1647 cm^{-1} und eine breite Doppelbande im Bereich von Amid II. Dabei tritt die antisymmetrische Valenzschwingung der Carboxylatgruppe bei 1567 cm^{-1} auf und überlagert die Amid II-Bande bei 1532 cm^{-1} . Die Lage der Amid-Banden belegt eine random coil Konformation. Das IR-Spektrum von **PEI(5)-PGlu-346** zeigt bei pH 7 ebenfalls eine

ungeordnete Sekundärstruktur. Bei den Wellenzahlen 1567 cm^{-1} und 1530 cm^{-1} tritt die Doppelbande von COO^- und Amid II auf. Die Amid I-Bande befindet sich bei 1653 cm^{-1} . Im Gegensatz zu reinem **PGlu** können die an den PEI-Kern gebundenen Polyglutaminsäureketten bei pH 3 jedoch keine helikale Konformation ausbilden. Die Amid-Banden sind breit, wobei die Amid I-Bande bei $\approx 1650\text{ cm}^{-1}$ und die Amid II-Bande bei 1532 cm^{-1} zu sehen ist. Diese Banden sind charakteristisch für die random coil Konformation.

Aus den infrarotspektroskopischen Untersuchungen im Film lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen. Zum einen ist es möglich, dass die PGlu-Ketten am Polyethylenimin nicht ausreichend lang genug sind, um eine helikale Konformation auszubilden. Dem widersprechen jedoch die FT-IR-spektroskopischen Untersuchungen von **PEI(5)-PBLG-346** (Abbildung 4.8), bei denen eindeutig das Vorliegen einer α -Helix nachgewiesen werden konnte. Wahrscheinlicher sind zum einen geringe elektrostatische Attraktionen zwischen den kationischen Aminogruppen des PEI-Kerns und noch wenigen Carboxylatgruppen an den Polyglutaminsäureketten. Zum anderen können ungehindert Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carboxyl-, C=O- bzw. N-H-Gruppen der PGlu-Ketten mit den Aminogruppen des Polyethylenimins entstehen. Diese starken Wechselwirkungen mit dem PEI-Kern können die Ausbildung einer geordneten Sekundärstruktur verhindern. Da **PEI(5)-PGlu-346** neben den positiv geladenen Aminogruppen am PEI-Kern auch kationische, endständige Aminogruppen an den Polyglutaminsäureketten besitzt, können diese Wechselwirkungen sowohl intra- als auch intermolekular auftreten.

PEI(5)-PAsp-346 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter IR-spektroskopisch untersucht. Aus der Literatur²⁴⁶ ist bekannt, dass reine Polyasparaginsäure, genau wie Polyglutaminsäure, bei niedrigem pH Wert (geringer Ionisationsgrad) die helikale Konformation ausbildet. Allerdings sind bei PAsp aufgrund der kürzeren Seitenketten die repulsiven Wechselwirkungskräfte stärker als bei PGlu. Dadurch fällt PAsp unmittelbar nach Ausbildung der α -Helix in wässriger Lösung aus. Die präparierten Filme werden bei geringem Ionisationsgrad trüb und mindern die Auflösung der FT-IR-Spektren. Eine genaue Konformationsanalyse in Abhängigkeit vom Ionisationsgrad ist nur in Kombination mit Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie möglich. Versuche zur CD-spektroskopischen Untersuchung von **PEI(5)-PGlu-346** waren allerdings erfolglos, da der PEI-Kern die Absorption stark beeinflusst. Dieser Effekt kann auch bei **PEI(5)-PAsp-346** angenommen werden. Aufgrund der erschwerten und dementsprechend zeitintensiven spektroskopischen Untersuchungen wurde auf eine genaue Analyse der pH-abhängigen Sekundärstruktur im Fall

der wasserlöslichen asparaginsäuremodifizierten Kern-Schale-Architekturen verzichtet. Weiterhin liegt der Schwerpunkt der Arbeit bei den dendritischen Copolymerstrukturen mit Polyglutaminsäureketten.

Größenausschlusschromatographie

Zur Bestimmung der Molmasse der wasserlöslichen dendritischen Polymere wurde zunächst die SEC-RI-LS gewählt. Obwohl eine für polare Substanzen sehr gut geeignete UltrahydrogelTM-Säule eingesetzt wurde, traten starke adsorptive Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial auf. Die SEC-Messungen von **PEI(5)-PGlu-346** waren nicht reproduzierbar.

Asymmetrische Flussfeldflussfraktionierung

Wesentliche Nachteile der SEC stellen die unerwünschte Interaktion der Probensubstanz mit dem Säulenmaterial und der durch hohe Scherkräfte mögliche Polymerabbau dar. Deshalb wurde die asymmetrische Flussfeldflussfraktionierung in Kombination mit LS-Detektion als eine weitere Separationsmethode zur Bestimmung der Molmasse der wasserlöslichen dendritischen Copolymere herangezogen. Dabei erfolgt die Separation der unterschiedlich großen Makromoleküle in einem flachen Trennkanal ohne stationäre Phase durch ein senkrechtes Strömungskraftfeld, welches mit der laminaren Längsströmung des Eluenten überlagert. Die unterschiedlichen Spezies werden dann in Abhängigkeit ihres Diffusionskoeffizienten aufgetrennt.

Tabelle 4.6: Ergebnisse der AF4-LS-Messungen von **PEI(5)-PGlu-346**.

M_{th} [g/mol]	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	\bar{D}	dn/dc [ml/g]	R_h [nm]
48.400 ^a	6.700	13.300	1,99	0,15	$1,7 \pm 0,13$

^a Annahme einer vollständigen Entschützung der 346 Glutaminsäureeinheiten

Die mit AF4 ermittelten Molmassen (**Tabelle 4.6**) von **PEI(5)-PGlu-346** sind im Vergleich zur theoretisch erwarteten Molmasse, wie bereits bei **PEI(5)-PBLG-346**, wesentlich kleiner. Trotz der unterschiedlichen Methodik stehen diese jedoch in einem guten Verhältnis zu den mit SEC bestimmten Molmassen von **PEI(5)-PBLG-346** ($M_n(LS+RI) = 20.000$ g/mol und $M_n(\text{Kalibrierung}) = 12.700$ g/mol). Durch die Entschützung der Carboxylgruppen nimmt die Molmasse der einzelnen Glutaminsäureeinheiten um je 91 g/mol ab. Dementsprechend verringert sich auch in Abhängigkeit von der Anzahl an gebundenen Glutaminsäureeinheiten die Molmasse der **PEI(5)-PGlu-346**-Makromoleküle signifikant. Weiterhin ist die Dispersität mit einem Wert von 2 sehr hoch. Das bedeutet, dass eine breite statistische Verteilung der

Molmassen der einzelnen Makromoleküle vorliegt. Dies wird in der Auftragung der differentiellen Massenfraktionen über der Molmasse deutlich (**Abbildung 4.18**). Es liegen dendritische Makromoleküle sowohl mit einem geringeren Anteil ($M < 10.000$ g/mol) als auch mit einem höheren Anteil ($M = 20.000 - 50.000$ g/mol) an Glutaminsäureeinheiten vor.

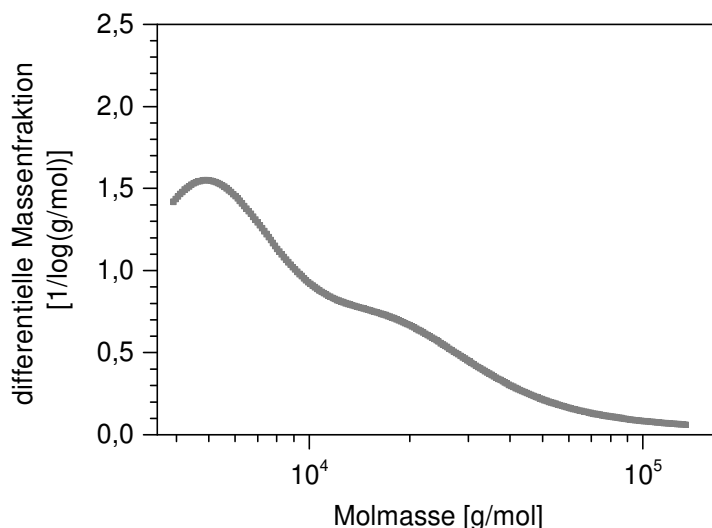


Abbildung 4.18: Verteilung der Massenfraktionen von **PEI(5)-PGlu-346** in Abhängigkeit von der Molmasse bestimmt mittels AF4-LS.

4.1.5 Reduktive Aminierung

Die Modifizierung der wasserlöslichen Kern-Schale-Architekturen mit Oligosacchariden erfolgte über eine reduktive Aminierung in basischer Umgebung (**Abbildung 4.19**). In wässriger Lösung liegen Oligosaccharide im Gleichgewicht als zyklisches Halbacetal und offenkettiges Aldehyd vor. Das Gleichgewicht liegt dabei weit auf der Seite des Halbacetals. Durch den nukleophilen Angriff primärer bzw. sekundärer Aminoeinheiten an der offenkettigen Oligosaccharidstruktur mit freier Aldehydfunktion wird ein Imin bzw. ein Enamin gebildet. Anschließend findet eine Reduktion mit Boran-Pyridin-Komplex zum sekundären bzw. tertiären Amin statt. Für eine möglichst hohe Oligosaccharidanbindung wurden Maltose bzw. Laktose im 10-fachen Überschuss, bezogen auf die Anzahl der terminalen Aminogruppen, eingesetzt. Die Strukturaufklärung der Reaktionsprodukte Polyethylenimin-Poly-L-glutaminsäure-maltose (**PEI(5)-PGlu-346-Mal**), Polyethylenimin-Poly-L-glutaminsäurelaktose (**PEI(5)-PGlu-346-Lak**), Polyethylenimin-Poly-L-asparaginsäuremaltose (**PEI(5)-PAsp-346-Mal**) und Polyethylenimin-Poly-L-asparaginsäurelaktose (**PEI(5)-PAsp-346-Lak**) erfolgte mit NMR- und ATR-FT-IR-Spektroskopie und asymmetrischer Flussfeldflussfraktionierung.

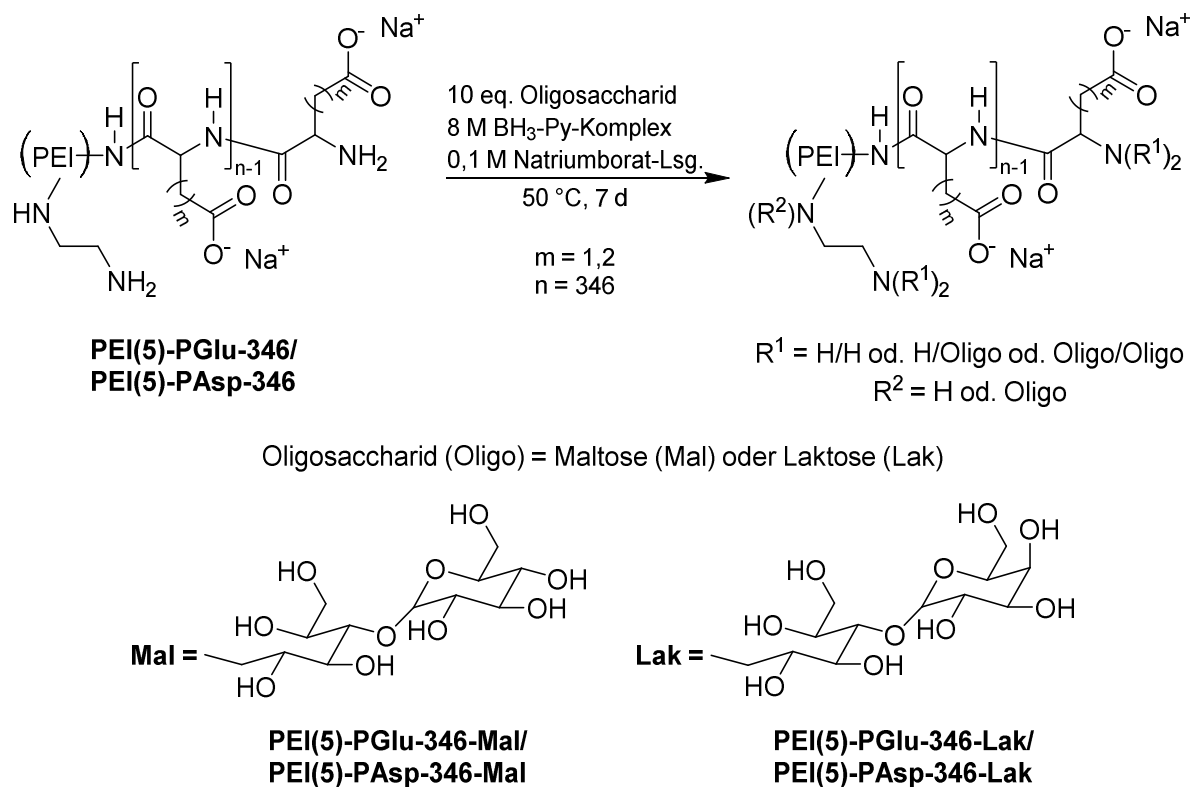


Abbildung 4.19: Syntheschema der Anbindung von Oligosaccharideinheiten an die wasserlöslichen Kern-Schale-Architekturen **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PAsp-346** durch reduktive Aminierung.

NMR-Spektroskopie

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **PEI(5)-PGlu-346-Mal** (Abbildung 4.20) bestätigt die Anbindung der Maltoseeinheiten an **PEI(5)-PGlu-346**. Es zeigt neben den charakteristischen Protonensignalen der Methingruppe (H-2) und der Methylengruppen (H-3, H-4) der Glutaminsäureeinheiten das anomere Protonensignal H-1'' der α -1,4 glykosidischen Bindung. Das H-1'-Signal der Methylengruppe (Bindung an terminale Aminogruppe der Glutaminsäurekette) wird durch die Protonensignale des PEI-Kerns im Bereich von 2.5 ppm bis 3.5 ppm überlagert. Weitere charakteristische Protonensignale der Maltoseeinheiten erscheinen im Bereich von 3.4 ppm bis 4.1 ppm als Multipllett. Aufgrund der Überlagerung der Protonensignale können keine quantitativen Aussagen zur genauen Anzahl der gebundenen Maltosemoleküle gemacht werden. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **PEI(5)-PGlu-346-Lak**, **PEI(5)-PAsp-346-Mal** und **PEI(5)-PAsp-346-Lak** befinden sich im Anhang (Abbildung 7.2 – 7.4).

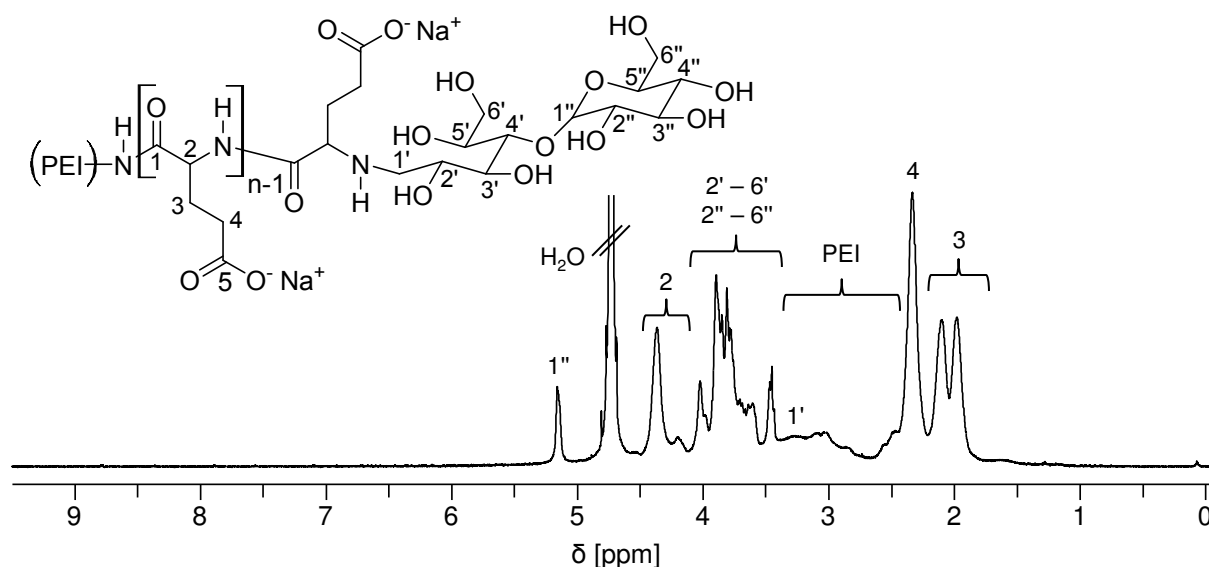


Abbildung 4.20: ^1H -NMR-Spektrum von **PEI(5)-PGlu-346-Mal**, aufgenommen in D_2O .

Die Modifizierung von **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PAsp-346** mit Maltose bzw. Laktose kann theoretisch an allen noch freien terminalen und linearen Aminogruppen am PEI-Kern und an den endständigen Aminogruppen der Polyaminosäureketten erfolgen. Aufgrund der stärkeren Nukleophilie ist die Substitutionsreaktion an primären Aminogruppen wahrscheinlicher als an sekundären. Weiterhin werden die Aminogruppen am hochverzweigten PEI-Kern durch die Polyaminosäureketten sterisch abgeschirmt. Somit ist anzunehmen, dass die Anbindung der Oligosaccharideinheiten hauptsächlich an den endständigen Aminogruppen der Polyaminosäureketten stattfindet. Dabei kann sowohl eine Mono- als auch Disubstitution stattfinden. Bei näherer Betrachtung des ^{13}C -NMR-Spektrums von **PEI(5)-PGlu-346-Mal** (**Abbildung 4.21**) fällt auf, dass im Bereich von 35 bis 55 ppm die Kohlenstoffsignale der dendritischen und linearen Aminogruppen des PEI erscheinen. Allerdings ist im Vergleich zum ^{13}C -NMR-Spektrum von **PEI(5)-PGlu-346** (**Abbildung 4.14**) kein erkennbares Signal der terminalen Aminogruppen zu sehen. Dies deutet darauf hin, dass neben der Modifizierung der endständigen Aminogruppen der Polyglutaminsäureketten mit Maltose möglicherweise auch eine Substitution an einigen terminalen Aminogruppen des PEI-Kerns stattgefunden hat. Im ^{13}C -NMR-Spektrum von **PEI(5)-PGlu-346-Lak** (**Abbildung 7.5**) sind die Signale des **PEI(5)** nicht deutlich zu identifizieren. Dadurch lassen sich keine Rückschlüsse auf eine mögliche Substitution des PEI-Kerns mit Laktose ziehen.

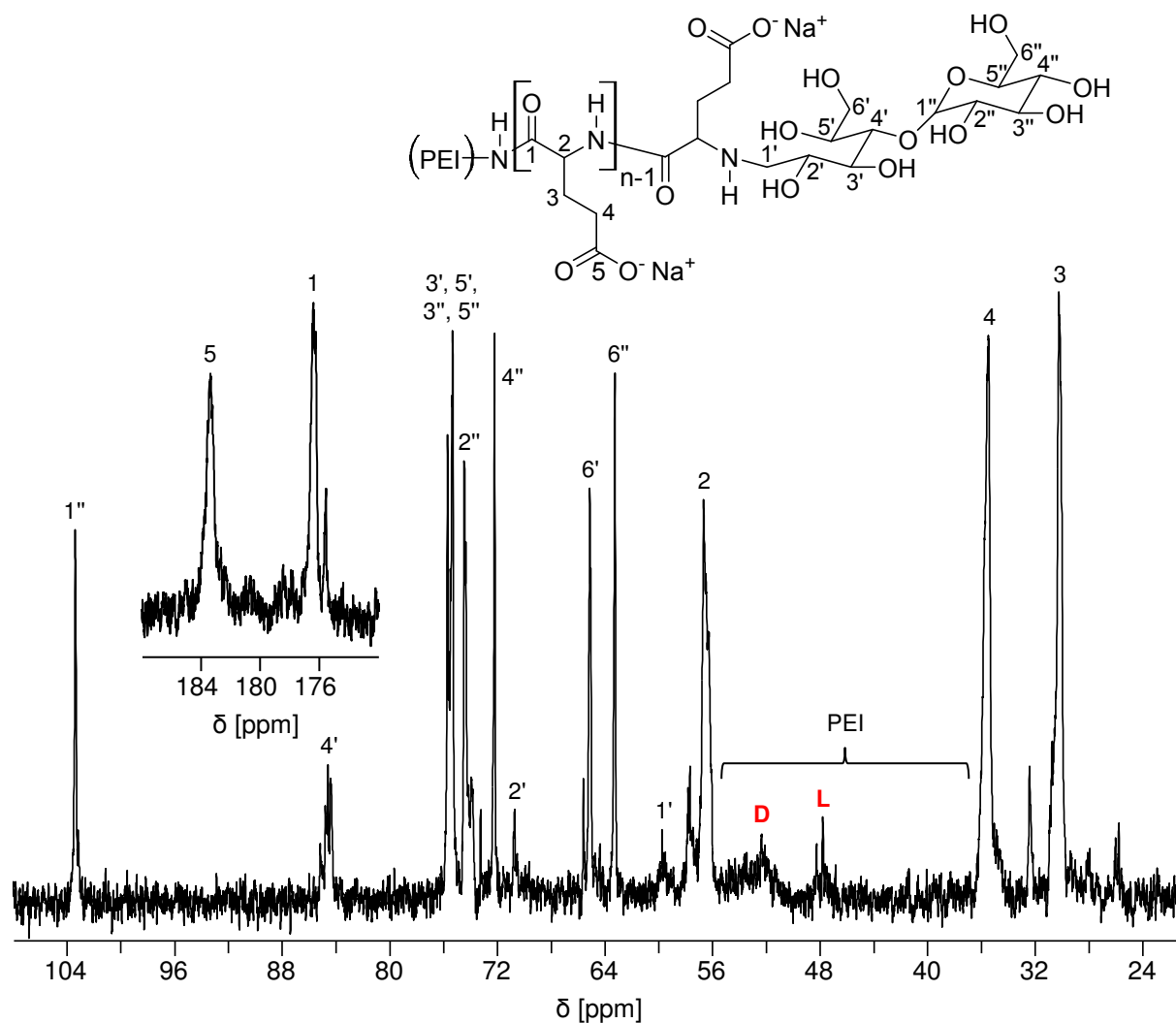


Abbildung 4.21: ^{13}C -NMR-Spektrum von PEI(5)-PGlu-346-Mal, aufgenommen in D_2O .

ATR-FT-IR-Spektroskopie

Die FT-IR-Spektren der oligosaccharidmodifizierten dendritischen Strukturen (Abbildung 4.22, 7.6 – 7.8), gemessen als KBr-Pressling, unterscheiden sich nur wenig von denen von PEI(5)-PGlu-346 bzw. PEI(5)-PAsp-346 (Abbildung 4.15, 4.16). Im Fall von PEI(5)-PGlu-346-Mal und PEI(5)-PGlu-346-Lak überlagert wie bei PEI(5)-PGlu-346 die antisymmetrische Valenzschwingungsbande der Carboxylatgruppe mit der Amid II-Bande bei einer Wellenzahl von $\approx 1548\text{ cm}^{-1}$. Dadurch ist die Bande wesentlich größer als die Amid I-Bande bei $\approx 1644\text{ cm}^{-1}$. Im Bereich von $1000\text{ bis }1200\text{ cm}^{-1}$ sind in beiden Spektren breite Banden der CO-Valenzschwingungen der Maltose- bzw. Laktoseeinheiten zu sehen.

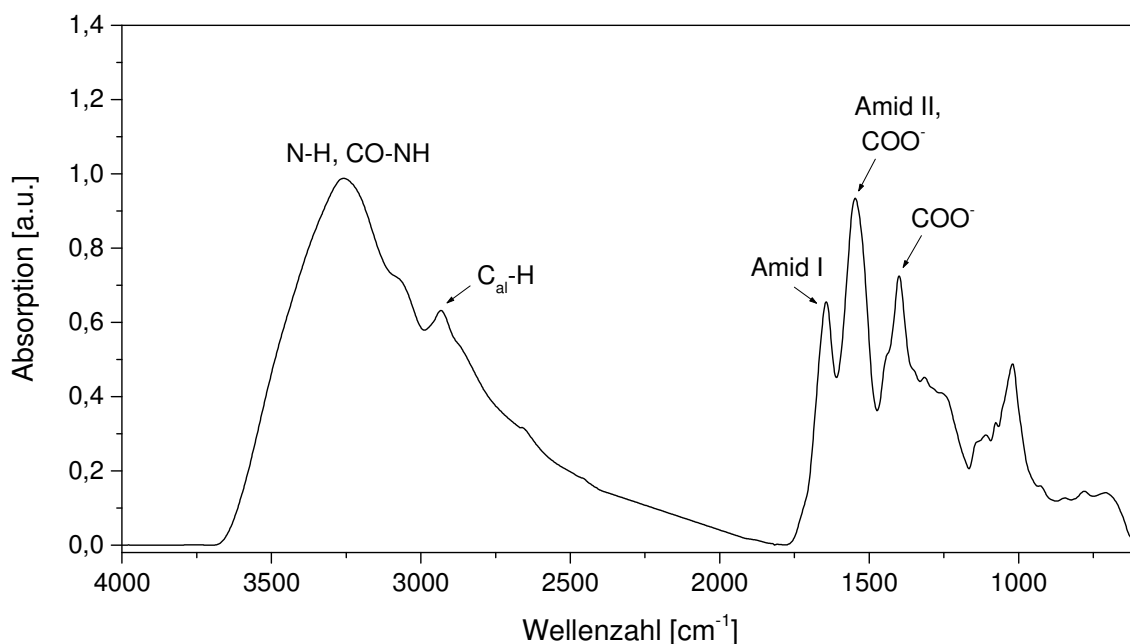


Abbildung 4.22: FT-IR-Spektrum von **PEI(5)-PGlu-346-Mal**, KBr-Pressling.

Zur Aufklärung der Sekundärstruktur wurde je ein Film aus wässriger **PEI(5)-PGlu-346-Mal**-Lösung (1 mg/ml) mit pH 3 und pH 6 auf einem ATR-Kristall hergestellt. Die aufgenommenen Spektren in **Abbildung 4.23** zeigen bei beiden pH-Werten in Form und Verlauf die gleichen Banden wie **PEI(5)-PGlu-346** (**Abbildung 4.17**).

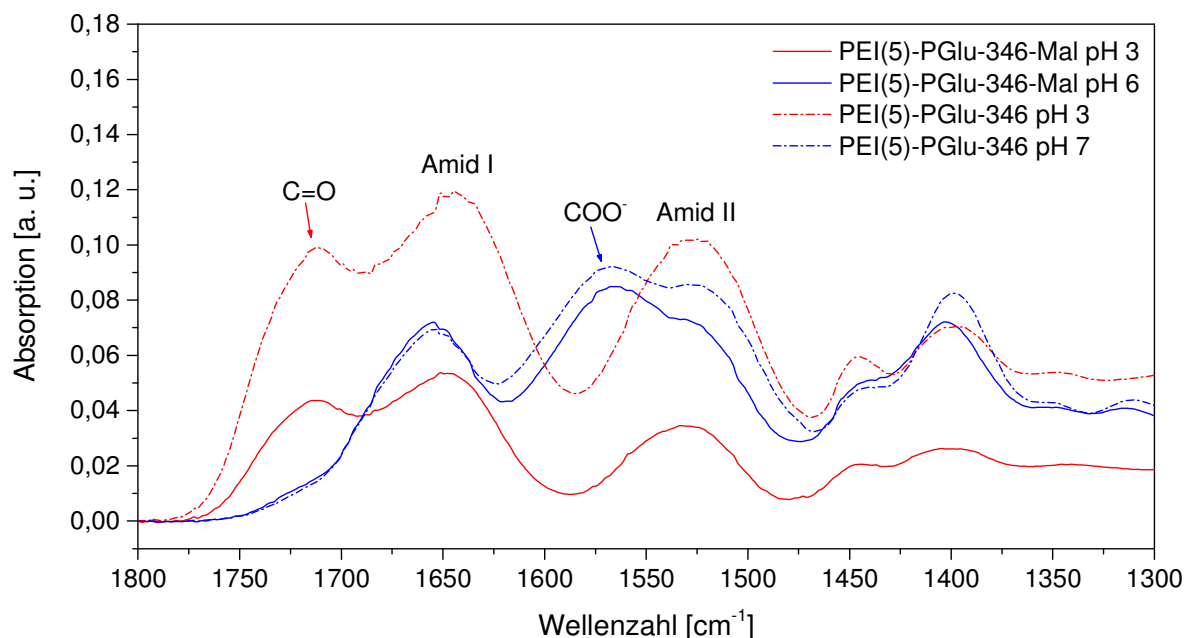


Abbildung 4.23: FT-IR-Spektren (Ausschnitte) im Vergleich: **PEI(5)-PGlu-346** bei pH 3 und pH 7 (gestrichelt), **PEI(5)-PGlu-346-Mal** bei pH 3 und pH 6; Filme aus wässriger Lösung.

Bei pH-Wert 6 erscheint die Amid I-Bande bei 1655 cm^{-1} und die charakteristische Doppelbande von Amid II bei $\approx 1530\text{ cm}^{-1}$ und COO^- bei 1565 cm^{-1} . Das IR-Spektrum von

PEI(5)-PGlu-346-Mal bei pH 3 zeigt die Amid I-Bande bei einer Wellenzahl von 1650 cm^{-1} und die Amid II-Bande bei 1533 cm^{-1} . Die PGlu-Ketten in der **PEI(5)-PGlu-346-Mal**-Struktur bilden unabhängig vom pH-Wert und dem Grad der Oligosaccharidmodifizierung eine random coil Konformation aus. Somit werden die in **Kapitel 4.1.4** beschriebenen Wechselwirkungen in **PEI(5)-PGlu-346** zwischen den Polyglutaminsäureketten und dem PEI-Kern durch zusätzliche Oligosaccharideinheiten nicht beeinflusst. Diese werden wohl eher durch zusätzliche H-Brücken mit den OH-Gruppen der Maltose verstärkt.

Größenausschlusschromatographie

Wie bei **PEI(5)-PGlu-346** wurde zur Bestimmung der Molmasse von **PEI(5)-PGlu-346-Mal** mit SEC eine Ultrahydrogelsäule eingesetzt und dem Eluenten (Wasser) 0,02 % Natriumazid zugegeben. Trotz dessen traten Aggregate und Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial auf, wodurch die Messungen nicht reproduzierbar waren.

Asymmetrische Flussfeldflussfraktionierung

Die Analyse von **PEI(5)-PGlu-346-Mal** mit AF4 zeigt ähnliche Ergebnisse wie **PEI(5)-PGlu-346**. Die ermittelten Molmassen (**Tabelle 4.7**) sind im Vergleich zum theoretischen Wert sehr klein und statistisch breit verteilt.

Tabelle 4.7: Analytische Daten der AF4-Messungen von **PEI(5)-PGlu-346-Mal**.

M_{th} [g/mol]	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	\bar{D}	dn/dc [ml/g]	R_h [nm]
57.300 ^a	20.600	41.200	2,00	0,145	$2,5 \pm 0,13$

^a $M_{th} = M_{th}(\text{PEI(5)-PGlu-346}) + 27 \cdot M(\text{Maltoseeinheit}) = 48.400\text{ g/mol} + 27 \cdot 327,3\text{ g/mol}$ mit der Annahme, dass alle 27 terminalen NH-Gruppen monosubstituiert werden.

In **Abbildung 4.24** sind die gewichtsabhängigen Molmassenverteilungen von **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** vergleichend aufgetragen. Ergänzend zu den Ergebnissen der NMR-Spektroskopie wird deutlich, dass die Anbindung von Maltose stattgefunden hat. Die Molmassen der einzelnen Fraktionen sind signifikant größer als die von **PEI-PGlu-346**. Es liegen Makromoleküle sowohl mit einem geringen Anteil als auch einem hohen Anteil an Glutaminsäure- und Maltoseeinheiten vor. Genauere Aussagen zur Anzahl an angebonden Aminosäureeinheiten und Oligosaccharidmolekülen können jedoch nicht gemacht werden.

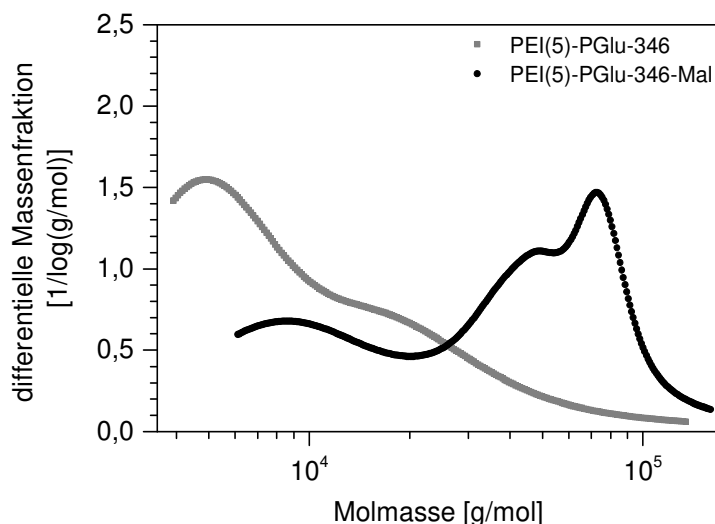


Abbildung 4.24: Verteilung der Massenfraktionen von **PEI(5)-PGlu-346-Mal** (schwarz) in Abhängigkeit von der Molmasse im Vergleich zu **PEI(5)-PGlu-346** (grau) bestimmt mit AF4-LS.

4.2 Untersuchungen zum Verhalten in wässriger Lösung

4.2.1 pH-Wert-abhängiger Ladungszustand

Polyethylenimin ist ein kationischer Polyelektrolyt, dessen Aminogruppen in wässriger Lösung in Abhängigkeit vom pH-Wert protoniert bzw. deprotoniert vorliegen. Polyglutaminsäure und Polyasparaginsäure hingegen sind negativ geladene Polyelektrolyte. Bei einem pH-Wert ca. kleiner gleich 4 liegen die Carboxylgruppen der Polyglutaminsäure ($pK_a = 4,1$) und die der Polyasparaginsäure ($pK_a = 3,9$) in den Seitenketten vollständig protoniert vor.²⁴⁷ Die Anbindung von Polyamino säureketten an den PEI-Kern macht es somit zunächst notwendig, den Ladungszustand der jeweiligen Kern-Schale-Architekturen in Abhängigkeit vom pH-Wert zu untersuchen.

Die Charakterisierung der Oberflächenladung erfolgte mit pH-abhängigen Strömungspotentialtitrationen und Zetapotentialmessungen. **Abbildung 4.25A** zeigt die Messwerte der Strömungspotentialmessungen von **PEI(5)**, **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal**. Hochverzweigtes Polyethylenimin ist ein schwacher Polyelektrolyt, der eine positive Oberflächenladung im pH-Bereich von 3 bis 9 besitzt. Im pH-Wert-Bereich kleiner 8 sind die primären, sekundären und tertiären Aminogruppen vollständig protoniert. Im Gegensatz dazu kommt es aufgrund der negativ geladenen Carboxylgruppen der Polyglutaminsäureketten zu einem stark veränderten Kurvenverlauf bei **PEI(5)-PGlu-346**. Die hochverzweigte Copolymerstruktur besitzt nur noch im stark sauren Bereich eine positive Oberflächenladung. Am isoelektronischen Punkt ($pH = 3,9$) besitzt **PEI(5)-PGlu-346** die gleiche Anzahl an

protonierten Aminogruppen und deprotonierten Carboxylgruppen. Bereits bei einem pH-Wert von größer 3,9 dominieren die Carboxylatgruppen, wobei der Wert der anionischen Oberflächenladung ab einem pH-Wert von ca. 6 am größten ist. Der gleiche Kurvenverlauf der Strömungspotentialmessung wurde für **PEI(5)-PGlu-346-Mal** ermittelt. Demnach wird die Protonierung bzw. Deprotonierung der Amino- und Carboxylgruppen durch die Modifikation mit Oligosacchariden nicht beeinflusst.

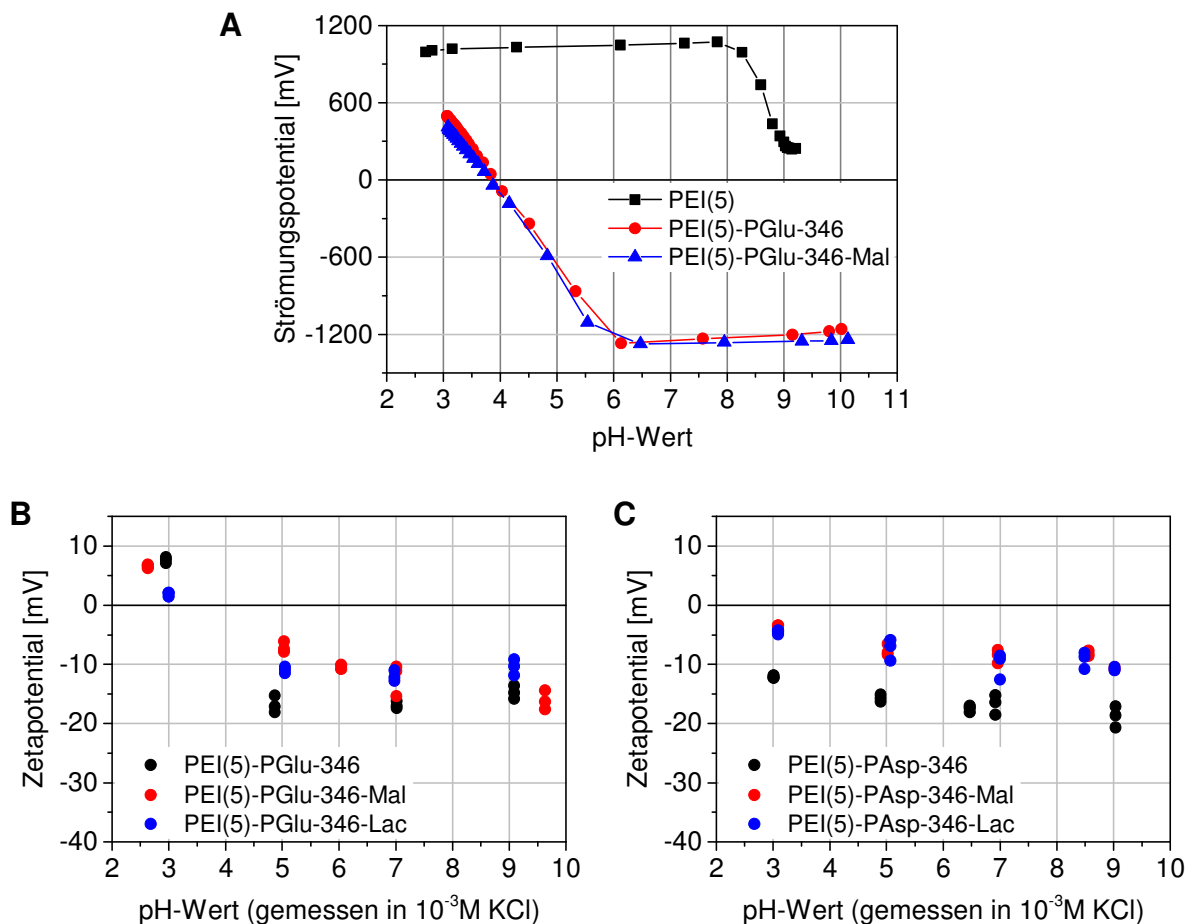


Abbildung 4.25: A – PH-abhängige Strömungspotentialtitration von **PEI(5)**, **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal**. B – pH-abhängige Zetapotentialmessung von **PEI(5)-PGlu-346**, **PEI(5)-PGlu-346-Mal** und **PEI(5)-PGlu-346-Lak**. C – pH-abhängige Zetapotentialmessung von **PEI(5)-PAsp-346**, **PEI(5)-PAsp-346-Mal** und **PEI(5)-PAsp-346-Lak**.

Auch die Ergebnisse der Zetapotentialmessungen von **PEI(5)-PGlu-346**, **PEI(5)-PGlu-346-Mal** und **PEI(5)-PGlu-346-Lak** (Abbildung 4.25B) belegen eine negative Oberflächenladung über einen großen pH-Wert-Bereich. Erst bei einem pH-Wert kleiner gleich 3 konnte ein positives Zetapotential für die glutaminsäuremodifizierte Kern-Schale-Architekturen gemessen werden. **PEI(5)-PAsp-346** und deren oligosaccharidmodifizierte Derivate weisen hingegen über den gesamten gemessenen pH-Wert-Bereich eine negative

Oberflächenladung auf (**Abbildung 4.25C**). Dabei scheinen die Oligosaccharideinheiten die negative Ladungen der Polyasparaginsäureketten etwas abzuschirmen. Dieser Effekt ist bei den glutaminsäuremodifizierten Copolymeren nur bei $\text{pH} \approx 5$ deutlich zu erkennen.

4.2.2 Dynamische Lichtstreuexperimente

Die Größenbestimmung der wasserlöslichen Kern-Schale-Architekturen und die Untersuchung möglicher auftretender Aggregationseffekte erfolgten mit der dynamischen Lichtstreuung. Zunächst wurden die hydrodynamischen Durchmesser der dendritischen Polymere **PEI(25)-Mal B**, **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** gelöst in reinem Wasser und PBS-Lösung ($\text{pH} 7,4$) bestimmt. Entsprechend der Ultrafiltrationsexperimente (**Kapitel 4.3.3**) wurde die Polymerkonzentration von $0,119 \text{ g/l}$ gewählt und DLS-Messungen direkt nach der Probenpräparation (0 h), nach 3 h und nach 20 h durchgeführt. Die angegebenen hydrodynamischen Durchmesser (**Tabelle 4.8**) sind Mittelwerte der jeweiligen Fünffachbestimmungen. Mit der gewählten Konzentration konnten jedoch nur für **PEI(25)-Mal B** reproduzierbare Größen bestimmt werden. Die DLS-Messungen für **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** wurden mit der zehnfachen Konzentration von $1,19 \text{ g/l}$ wiederholt.

Tabelle 4.8: Hydrodynamische Durchmesser von **PEI(25)-Mal B**, **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** in reinem Wasser und PBS-Lösung nach 0, 3 und 20 h.

	Reines Wasser			pH 7,4		
	0 h	3 h	20 h	0 h	3 h	20 h
PEI(25)-Mal B^a	17 nm	16 nm	17 nm	14 nm	14 nm	15 nm
PEI(5)-PGlu-346^b	9 nm	9 nm	8 nm	7 nm	7 nm	6 nm
PEI(5)-PGlu-346-Mal^b	9 nm	9 nm	9 nm	8 nm	8 nm	8 nm

^a $c = 0,119 \text{ g/l}$

^b $c = 1,190 \text{ g/l}$

In **Abbildung 4.26** und **7.9-13** sind die Größenverteilungen der untersuchten dendritischen Polymere gezeigt. Innerhalb des Zeitraumes kommt es zu keiner signifikanten Änderung der Verteilungskurven. Somit existieren alle drei Polymerstrukturen sowohl in reinem Wasser als auch in PBS-Puffer über mindestens 20 h als stabile Makromoleküle. **PEI(25)-Mal B** weist in reinem Wasser einen hydrodynamischen Durchmesser von $\approx 17 \text{ nm}$ und in PBS-Puffer von $\approx 15 \text{ nm}$ auf. **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** sind mit einem $D_h < 10 \text{ nm}$ nur

halb so groß. Interessanterweise ist **PEI(5)-PGlu-346-Mal** nicht signifikant größer als **PEI(5)-PGlu-346**. Aus den IR-Untersuchungen ist bekannt, dass beide Polymere bei $\text{pH} > 6$ eine random coil Struktur ausbilden. Dabei können die anionischen Polyglutaminsäureketten mit dem kationischen PEI-Kern in Wechselwirkung treten, was zu einer kompakten Struktur führt. Weiterhin besteht aus den ^{13}C -NMR-spektroskopischen Untersuchungen von **PEI(5)-PGlu-346-Mal** die Annahme, dass Maltoseeinheiten nicht nur an den Endfunktionalitäten der PGlu-Ketten, sondern auch am PEI-Kern angebunden werden. Somit führt die Anbindung der Maltose mehr zu einer Verdichtung als einer Vergrößerung der Polymerstruktur.

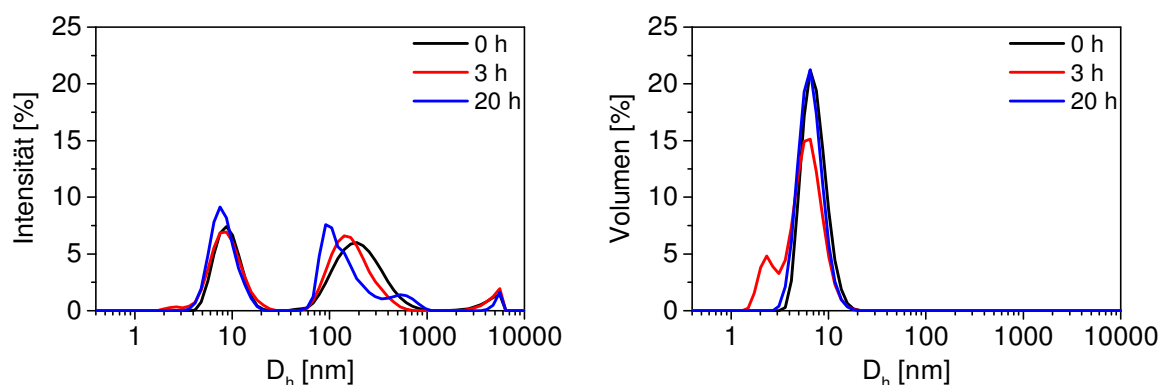


Abbildung 4.26: DLS-Verteilungskurven von **PEI(5)-PGlu-346** ($c = 1,19 \text{ g/l}$) in reinem Wasser nach 0, 3, 20 h.

Aus den Intensitätskurven der DLS-Messungen von **PEI(5)-PGlu-346** in reinem Wasser sind neben den eindeutigen Peaks der einzelnen Makromoleküle im Bereich von 10 nm auch Anteile von vermeintlichen Aggregaten bei einem $D_h > 100 \text{ nm}$ zu sehen. In den entsprechenden Volumenkurven fehlen jedoch diese Peaks. Das lässt sich damit begründen, dass größere Moleküle eine wesentlich höhere Streuintensität besitzen und somit auch bei geringen Konzentrationen eine gewisse Intensität aufweisen. Daraus ist zu schließen, dass die Anzahl der großen Partikel gegenüber den einzelnen Makromolekülen sehr gering ist. Aufgrund der negativen Oberflächenladung kann eine Aggregation der einzelnen Makromoleküle ausgeschlossen werden. Wahrscheinlicher sind kleine Schmutzpartikel, die bei der Reinigung der Lösungen mit einem $450 \mu\text{m}$ -Filter nicht entfernt wurden. Weiterhin ist in den Verteilungskurven nach 3 h ein kleiner Peak bei $D_h < 3 \text{ nm}$ zu sehen. Das Auftreten solcher Peaks im sehr kleinen Größenbereich kann auf die räumliche Struktur der Polymere zurückgeführt werden. Aufgrund der Verzweigung des Polyethylenimins und dessen unregelmäßige Modifizierung sind die hier beschriebenen Polymere nicht perfekt kugelförmig. Etwas in den Raum ragende Polyaminosäureketten bzw. Oligosaccharideinheiten streuen das eingestrahelte Licht in dem Maße, dass in der Auswertung des

Streulichtes Peaks vermeintlich kleinerer Partikel ermittelt werden. Dieser Effekt wurde mehr oder weniger bei allen untersuchten Polymeren beobachtet.

Die wasserlöslichen Kern-Schale-Architekturen **PEI(5)-PGlu-346** bzw. **PEI(5)-PAsp-346** und deren oligosaccharidmodifizierten Derivate zeigen in Abhängigkeit vom pH-Wert eine unterschiedliche Oberflächenladung. Daraufhin wurden diese Strukturen auf ein pH-abhängiges Aggregationsverhalten in Phosphatpufferlösungen untersucht.

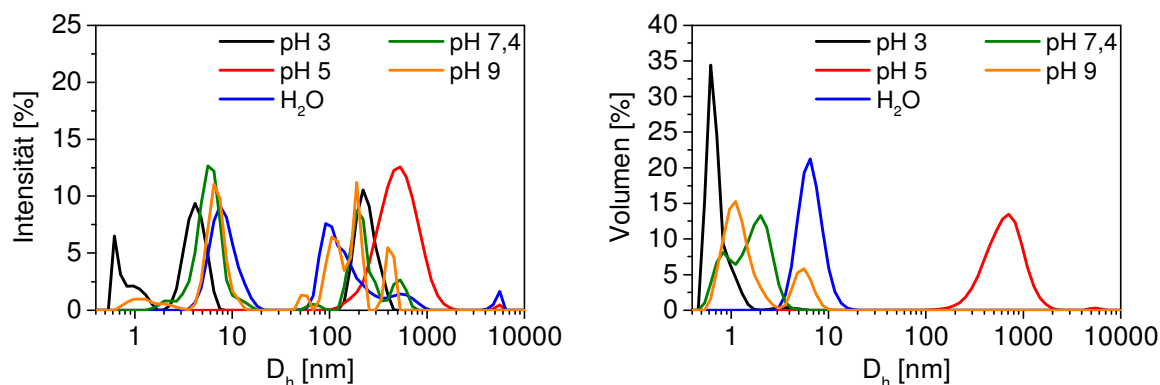


Abbildung 4.27: DLS-Verteilungskurven von **PEI(5)-PGlu-346** ($c = 1,19$ g/l) in reinem Wasser und PBS-Lösungen pH 3, 5, 7,4 und 9.

In **Abbildung 4.27** sind die Verteilungskurven der DLS-Messungen von **PEI(5)-PGlu-346** bei pH 3, 5 und 9 im Vergleich mit denen bei pH 7,4 und in reinem Wasser abgebildet. Im stark aziden pH-Bereich (kationische Oberflächenladung) und neutralen bzw. alkalischen pH-Bereich (hohe anionische Oberflächenladung) sind die repulsiven Wechselwirkungskräfte so stark, dass die **PEI(5)-PGlu-346**-Makromoleküle isoliert in Lösung existieren. Bei pH = 3 sollten keine bzw. nur wenige anionische Ladungen existieren. Dadurch können die neutralen Polyglutaminsäureketten in hohem Maße mit dem PEI-Kern über Wasserstoffbrückenbindungen wechselwirken und bilden eine dichte Polyglutaminsäureschale. Dieser Effekt führt zu dem geringen hydrodynamischen Durchmesser von nur 4 nm. Im Gegensatz dazu sind die Carboxylgruppen bei $pH > 6$ vollständig deprotoniert. Die starken Abstoßungskräfte innerhalb und zwischen den PGlu-Ketten führen zu einer aufgeweiteten Schalenstruktur. Es ergibt sich im Vergleich zu pH 3 eine fast doppelt so große Kern-Schale-Architektur mit $D_h \approx 7$ nm. Bei pH 5 hingegen bilden sich große Aggregate mit einem hydrodynamischen Durchmesser von etwa 500 nm. In diesem pH-Wert-Bereich liegen die Carboxylgruppen nur teilweise deprotoniert vor (siehe Strömungspotentialmessung **Abbildung 4.25A**). Dadurch scheint eine Annäherung der einzelnen Makromoleküle durch ionische Wechselwirkungen zwischen den Carboxylatgruppen und den endständigen kationischen Aminogruppen der Polyglutaminsäureketten möglich zu sein. Die entstandenen Aggregate können zusätzlich

durch intermolekulare Wasserstoffbrücken stabilisiert werden. Im Gegensatz dazu bildet **PEI(5)-PAsp-346** sowohl bei pH 3 als auch bei pH 9 kleinere und größere Aggregate, obwohl die Oberflächenladung über den gesamten pH-Bereich von 3 bis 9 negativ ist (**Abbildung 7.16**). Ursachen könnten in der vorliegenden Sekundärstruktur liegen, die in dieser Arbeit jedoch nicht näher analysiert wurde. Die oligosaccharidmodifizierten **PEI(5)-PGlu-346**-Strukturen hingegen zeigen bei allen untersuchten pH-Werten keine Aggregation (**Abbildung 7.14, 7.15**). Aus den Zetapotentialmessungen (**Abbildung 4.25B und C**) insbesondere bei pH 5 wird deutlich, dass die Oligosaccharideinheiten die Ladungen der Kern-Schale-Strukturen abschirmen. Dadurch werden ionische Wechselwirkungen zwischen den Makromolekülen verhindert. Allerdings können sich Wasserstoffbrücken intermolekular zwischen den Oligosaccharideinheiten ausbilden. Diese sind jedoch wesentlich schwächer als ionische Wechselwirkungen, weshalb keine stabilen Aggregate in wässriger Lösung beobachtet werden können. Die oligosaccharidmodifizierten Derivate von **PEI(5)-PAsp-346** existieren nur bei $\text{pH} \leq 7,4$ als isolierte Makromoleküle (**Abbildung 7.17, 7.18**). In wässriger Lösung mit pH 9 fallen **PEI(5)-PAsp-346-Mal** und **PEI(5)-PAsp-346-Lak** aus. Nach dem Filtern mit einem $0,45 \mu\text{m}$ Spritzenfilter ist die Konzentration der Kern-Schale-Architekturen wahrscheinlich so gering, dass nur wenige Makromoleküle mit einem hydrodynamischen Durchmesser von ca. 10 nm gemessen werden. Die mit DLS ermittelten hydrodynamischen Durchmesser der wasserlöslichen Polymere in Abhängigkeit vom pH-Wert sind in **Tabelle 4.9** zusammengefasst.

Tabelle 4.9: Mit DLS bestimmte hydrodynamische Durchmesser [nm] der wasserlöslichen Kern-Schale-Architekturen in reinem Wasser und Pufferlösungen bei verschiedenen pH-Werten nach 20 h.

	pH 3	pH 5	H ₂ O	pH 7,4	pH 9
PEI(25)-Mal B^a	-	-	16	14	-
PEI(5)-PGlu-346^b	4	500	8	6	7
PEI(5)-PGlu-346-Mal^b	7	8	9	8	8
PEI(5)-PGlu-346-Lak^b	8	12	12	9	13
PEI(5)-PAsp-346^b	200	9	14	11	500
PEI(5)-PAsp-346-Mal^b	9	9	8	11	9
PEI(5)-PAsp-346-Lak^b	9	9	4	10	10

^a c = 0,119 g/l

^b c = 1,190 g/l

4.2.3 Rasterkraftmikroskopie

Zur weiteren Aufklärung des Aggregationsverhaltens wurden **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** mit (in situ) AFM im trockenen Zustand und im wässrigen Tropfen (Wasser, PBS-Puffer pH 7,4) untersucht. In beiden Versuchsreihen wurde eine Polymerkonzentration von 0,1 g/l verwendet.

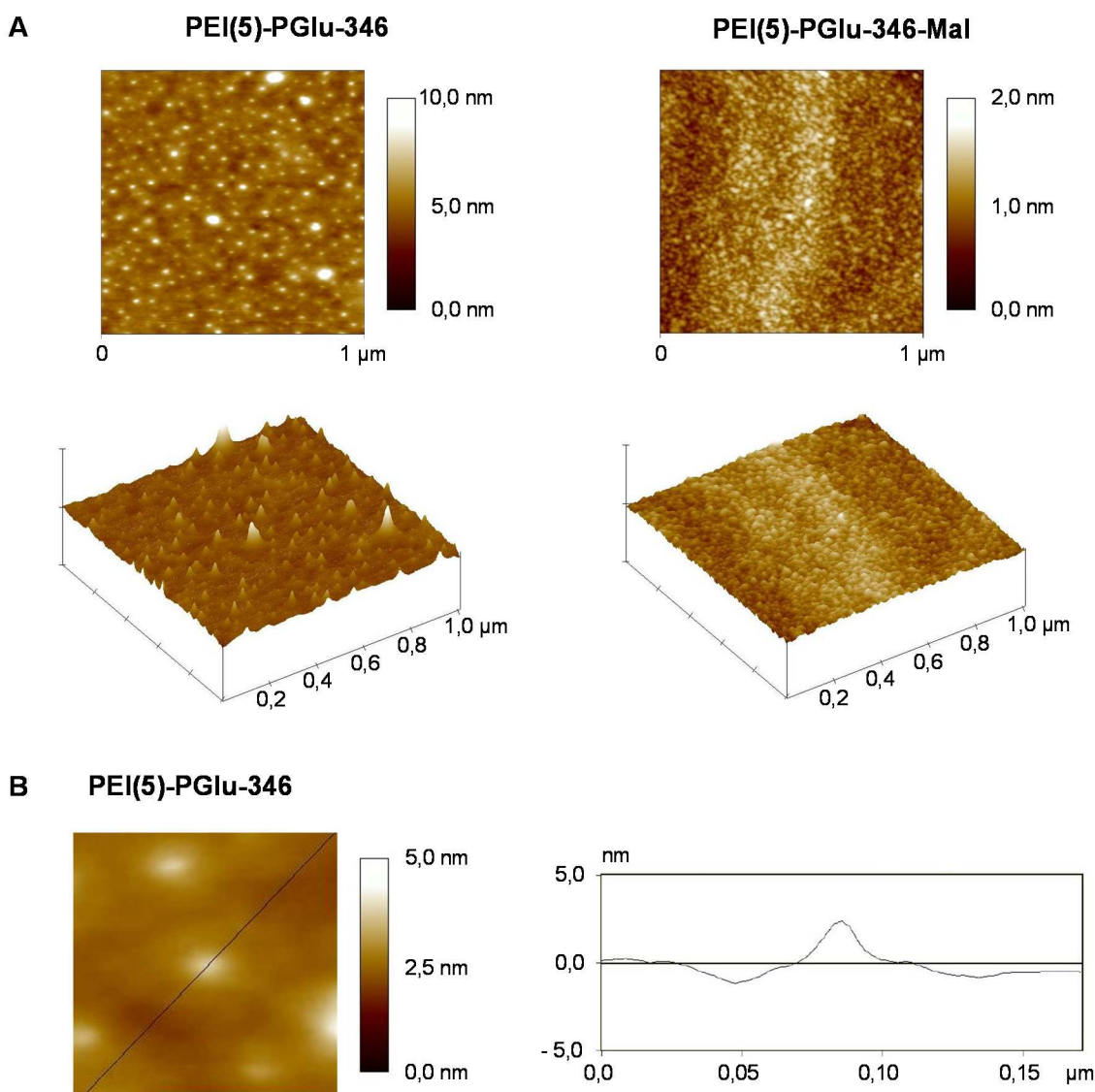


Abbildung 4.28: A - 2D- und 3D-Höhenbilder **PEI-PGlu-346** (links) und **PEI-PGlu-346-Mal** (rechts) im trockenen Zustand auf einem Siliziumwafer. B - Cross section der luftgetrockneten **PEI-PGlu-346**-Probe.

Abbildung 4.28A zeigt die 2D und 3D Höhenbilder von **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** der luftgetrockneten Proben auf einem Siliziumwafer. Es sind sphärische Teilchen zu sehen, welche als Aggregate interpretiert werden können. Die Aggregate von **PEI(5)-PGlu-346** sind im Durchmesser etwa 40 – 50 nm groß. Die Höhe der kleineren Teilchen beträgt 2,2 bis 4,5 nm, die der größeren 5,5 bis 10 nm. **PEI(5)-PGlu-346-Mal** weist

sehr flache Aggregate mit einer Ausdehnung von 10 bis 65 nm und einer Höhe von 0,8 bis 1,5 nm auf. Der pH-Wert der verwendeten wässrigen Polymerlösungen beträgt etwa 5 bis 6. In diesem pH-Wert-Bereich besitzen sowohl **PEI(5)-PGlu-346** als auch **PEI(5)-PGlu-346-Mal** eine negative Oberflächenladung, welche zu einer elektrostatischen Abstoßung zwischen den Makromolekülen führen sollte. Somit ist anzunehmen, dass es während des langsamen Eintrocknens der Polymerlösung zu einer Anreicherung der Makromoleküle im Zentrum des immer kleiner werdenden Tropfens kommt. Die in den Höhenbildern abgebildeten Aggregate sind lediglich Akkumulationen isolierter Polymere.

Für einen besseren Überblick über die Dimensionen der Kern-Schale-Architekturen wurde versucht, AFM-Bilder der gequollenen Polymere in Lösung aufzunehmen. Dafür wurde zunächst die Siliziumwaferoberfläche plasmagereinigt und mit Aminopropyltrimethoxysilan (APS) in der Gasphase beschichtet. Auf diesem dünnen, positiv geladenen Film wurden je ein Tropfen der entsprechenden wässrigen Polymerlösung platziert. Durch die Wechselwirkung der anionischen Polymere mit der modifizierten kationischen Siliziumwaferoberfläche konnten in situ AFM-Messungen in Lösung durchgeführt werden. Für die Auswertung der mittleren Durchmesser der potentiell angebundenen Makromoleküle bzw. Aggregate erfolgte die Aufnahme der Höhenbilder von aminosilanisierten Siliziumwafern mit reinem Wasser und PBS-Pufferlösung, mit wässriger **PEI(5)-PGlu-346**- und **PEI(5)-PGlu-346-Mal**-Lösung und mit **PEI(5)-PGlu-346**- und **PEI(5)-PGlu-346-Mal**-Puffer-Lösung pH 7,4.

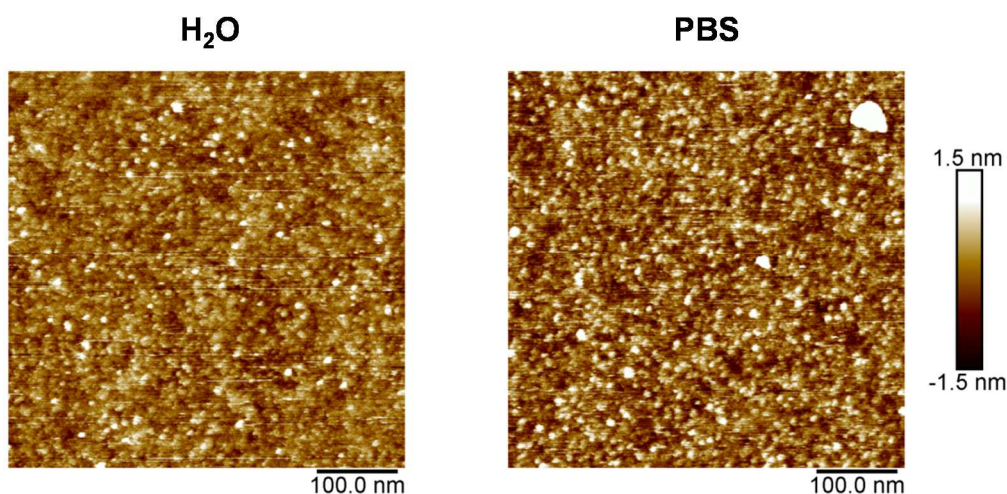


Abbildung 4.29: In situ AFM-Höhenbilder von **PEI(5)-PGlu-346** in reinem Wasser (links) und in PBS-Puffer-Lösung pH 7,4 (rechts) auf APS-beschichteten Siliziumwafern.

Abbildung 4.29 zeigt die Höhenbilder von **PEI(5)-PGlu-346** in Wasser und in PBS-Puffer-Lösung. In beiden Lösungsmitteln beträgt der Durchmesser der einzelnen Makromoleküle im

Mittel 6,3 nm mit einer Standardabweichung von 0,5 nm. Die Höhenbilder von **PEI(5)-PGlu-346-Mal** sowohl in Wasser als auch in PBS-Puffer-Lösung zeigen keine signifikanten Unterschiede in der Belegung der Waferoberfläche im Vergleich zu denen mit reinem Wasser bzw. PBS-Lösung (**Abbildung 7.19, Tabelle 7.1**) Wie bereits in **Kapitel 4.2.2** beschrieben, schirmen die Maltoseeinheiten die ionischen Ladungen der Kern-Schale-Architekturen ab. Dadurch wird die Wechselwirkung der anionischen Polyglutaminsäureketten mit dem kationischen Aminosilanfilm erschwert. Aufgrund der geringen Adsorption der Makromoleküle auf der modifizierten Waferoberfläche ist keine quantitative Auswertung möglich.

4.2.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Das hohe Auflösungsvermögen macht die Transmissionselektronenmikroskopie zu einer leistungsfähigen Methode zur Untersuchung der atomaren Struktur, Morphologie und Zusammensetzung von anorganischen und organischen Materialien. Zusätzlich zur Elektronenmikroskopie von getrockneten Proben erlaubt die Präparation im Cryo-TEM-Prozess die Abbildung von Strukturen in verglasten (schnell gefrorenen) Lösungen und Suspensionen. In dieser Arbeit wurde versucht, die nanometergroßen Kern-Schale-Architekturen **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** sowohl mit TEM als auch mit Cryo-TEM hochauflösend abzubilden. Dafür wurden entsprechend der AFM-Untersuchungen wässrige Polymerlösungen der Konzentration 0,1 g/l verwendet.

Die in **Abbildung 4.30A** abgebildete TEM-Aufnahme von **PEI(5)-PGlu-346** zeigt ein im Durchmesser etwa 400 nm großes Aggregat. Bei der Probenpräparation wurde auf einem TEM-Grid ein Tropfen der Polymerlösung platziert, welcher anschließend an der Luft trocknete. Es ist anzunehmen, dass es dabei genau wie bei den AFM-Untersuchungen zu einer Akkumulation der einzelnen Makromoleküle kommt. Eine Visualisierung der **PEI(5)-PGlu-346**-Strukturen mit der Cryo-TEM-Methode war jedoch nicht möglich. Aus den DLS- und in situ AFM-Untersuchungen wurde für dieses Polymer ein mittlerer Durchmesser von ≈ 7 nm bestimmt. Vermutlich ist die Auflösung bei den Cryo-TEM-Messungen im low-dose mode zu gering, um diese kleinen Makromoleküle abzubilden. Im Gegensatz dazu zeigen die Cryo-TEM-Aufnahmen (**Abbildung 4.30B und C**) der etwas größeren **PEI(5)-PGlu-346-Mal**-Polymere „Wolken“-Strukturen, in denen die Makromoleküle deutlich separiert vorliegen. Eine Erklärung für die Wolkenbildung findet sich in der Probenpräparation. Während des Blottings, dem Entfernen von überschüssigem Wasser mit Filterpapier, kommt es in dem entstehenden Probenfilm zu einer starken Konzentrationsänderung und somit zu einer

Akkumulation der **PEI(5)-PGlu-346-Mal**-Polymere. Bei der anschließenden Equilibrierung entfernen sich die anionischen Makromoleküle aufgrund repulsiver Wechselwirkung innerhalb weniger Sekunden wieder voneinander und bilden die unregelmäßig geformten „Wolken“ im Wasserfilm. Dieser Separationseffekt war bereits nach 5 s zu beobachten. Eine gleichmäßige Verteilung der einzelnen Makromoleküle nach längeren Equilibrierungszeiten konnte allerdings nicht beobachtet werden. Der gleiche Akkumulations- und Separationseffekt der **PEI(5)-PGlu-346-Mal**-Polymere wurde auch in PBS-Lösung beobachtet. Die Pufferlösung beeinflusst lediglich die Equilibrierungszeit, jedoch nicht die Anordnung der einzelnen Makromoleküle im wässrigen Film.

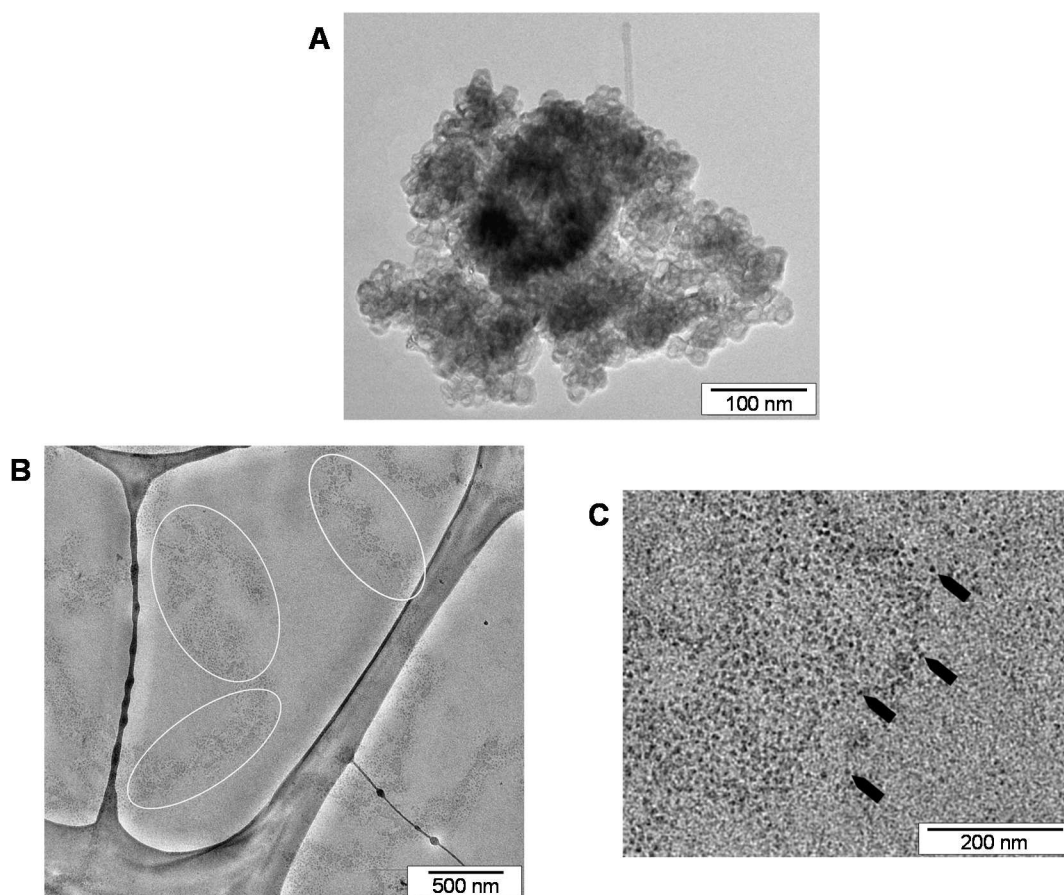


Abbildung 4.30: A – TEM-Aufnahme von **PEI(5)-PGlu-346**. B – Cryo-TEM-Aufnahme akkumulierter **PEI(5)-PGlu-346-Mal**-Makromoleküle („Wolkenbildung“). C – Cryo-TEM-Aufnahme einzelner Makromoleküle in der „Wolke“

Die Auswertung der Größenverteilung (**Abbildung 4.31**) der einzelnen **PEI(5)-PGlu-346-Mal**-Makromoleküle im Wasserfilm ergab einen mittleren Durchmesser von 11 nm und entspricht der mit DLS bestimmten Größe von ≈ 9 nm.

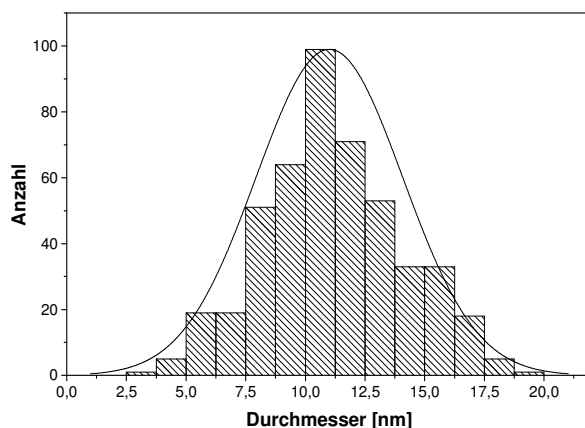


Abbildung 4.31: Aus den cryo-TEM-Aufnahmen ermittelte Größenverteilung der einzelnen Makromoleküle von **PEI(5)-PGlu-346-Mal** in reinem Wasser, Klassengröße 1,25 nm.

4.2.5 Strukturbeschreibung der Kern-Schale-Architekturen

Aus der Vielzahl der analytischen Untersuchungen ergeben sich für **PEI(5)-PBLG-346**, **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und dem pH-Wert unterschiedlich strukturierte Architekturen.

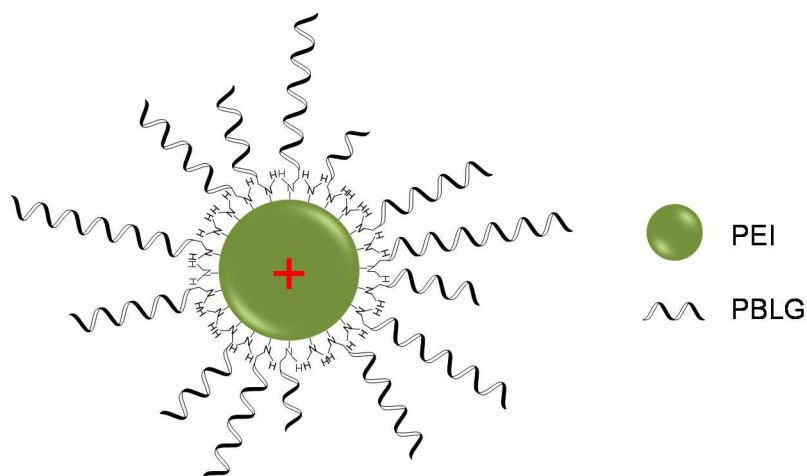


Abbildung 4.32: Schematische Darstellung von **PEI(5)-PBLG-346**, Ausbildung von PBLG-Helices in aprotischen polaren Lösungsmitteln.

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-spektroskopischen Analysen von **PEI(5)-PBLG-346**, **PEI(5)-PGlu-346** belegten eine erfolgreiche Polymerisation der Glutaminsäureeinheiten am PEI-Kern. Dabei fand die Initiierung jedoch nicht an allen zur Verfügung stehenden primären und sekundären Aminogruppen statt. Weiterhin können auch die tertiären Aminogruppen eine NCA-Polymerisation initiieren, wobei die entstehenden Polyglutaminsäureketten aber nicht am PEI-Kern angepfropft werden. Aus den analytischen Untersuchungen ist nicht bekannt, wie viele NCA-Monomere tatsächlich am PEI-Kern umgesetzt worden. Allerdings sind die

angebundenen PBLG-Ketten lang genug, so dass mit FT-IR-Spektroskopie eine helikale Sekundärstruktur nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 4.32**).

In Abhängigkeit von der Anzahl an eingesetzten NCA-Monomeren wurde eine unterschiedliche Löslichkeit von **PEI(5)-PBLG-43**, **PEI(5)-PBLG-173**, **PEI(5)-PBLG-259** und **PEI(5)-PBLG-346** in organischen Lösungsmitteln bei Raumtemperatur festgestellt. Die Löslichkeit der Copolymere in Chloroform nahm mit höherem Anteil an BLG-Einheiten zu. Die mäßige Löslichkeit in DMSO hingegen war für alle PEI-PBLG-Strukturen gleich. Erst nach kurzem Erwärmen lösten sich die Copolymer vollständig in DMSO. PBLG löst sich aufgrund der Benzylschutzgruppe in unpolaren Lösungsmitteln, wie Toluol und Chloroform. Polyethylenimin hingegen ist sehr gut in polaren Lösungsmitteln, wie Wasser und Methanol, löslich. In Dimethylsulfoxid (DMSO) ist PEI noch teilweise löslich, in Chloroform hingegen nicht. Durch die offene Schalenstruktur üben somit sowohl der PEI-Kern als auch die PBLG-Schale Einfluss auf das Löslichkeitsverhalten der Copolymere. Bei einem geringen Anteil an BLG-Einheiten wird die Löslichkeit hauptsächlich durch den PEI-Kern bestimmt. Dementsprechend sind **PEI(5)-PBLG-43** und **PEI(5)-PBLG-173** nicht in Chloroform löslich. Erst bei höheren Anteilen an BLG-Einheiten in der Schale lösen sich die Copolymere teilweise in CHCl_3 . Aufgrund der offenen Schalenstruktur ergibt sich auch die hinreichende Löslichkeit der Copolymere in DMSO. Dabei wird das Lösungsverhalten, unabhängig von der Kettenlänge der PBLG-Ketten, durch den PEI-Kern bestimmt. Die in der Literatur²⁰³⁻²⁰⁶ beschriebenen PEI-PBLG-Copolymere mit kleineren und größeren PEI-Kernen ($M_w = 1.800, 10.000$ und 25.000 Da) besitzen im Gegensatz dazu eine hohe Löslichkeit in Chloroform. Wahrscheinlich konnte bei diesen PEI-PBLG-Strukturen ein höherer Pflopfungsgrad der PBLG-Ketten und somit eine dichtere Schale erreicht werden. Dadurch beeinflusst der PEI-Kern die Löslichkeit weniger als bei den in dieser Arbeit beschriebenen Copolymerstrukturen. Aus den vorangegangenen Ausführungen lässt sich schlussfolgern, dass sowohl der PEI-Kern als auch die Dichte der PBLG-Schale und die Länge der PBLG-Ketten in Abhängigkeit vom organischen Lösungsmittel einen entscheidenden Einfluss auf das Lösungsverhalten der Copolymere ausüben.

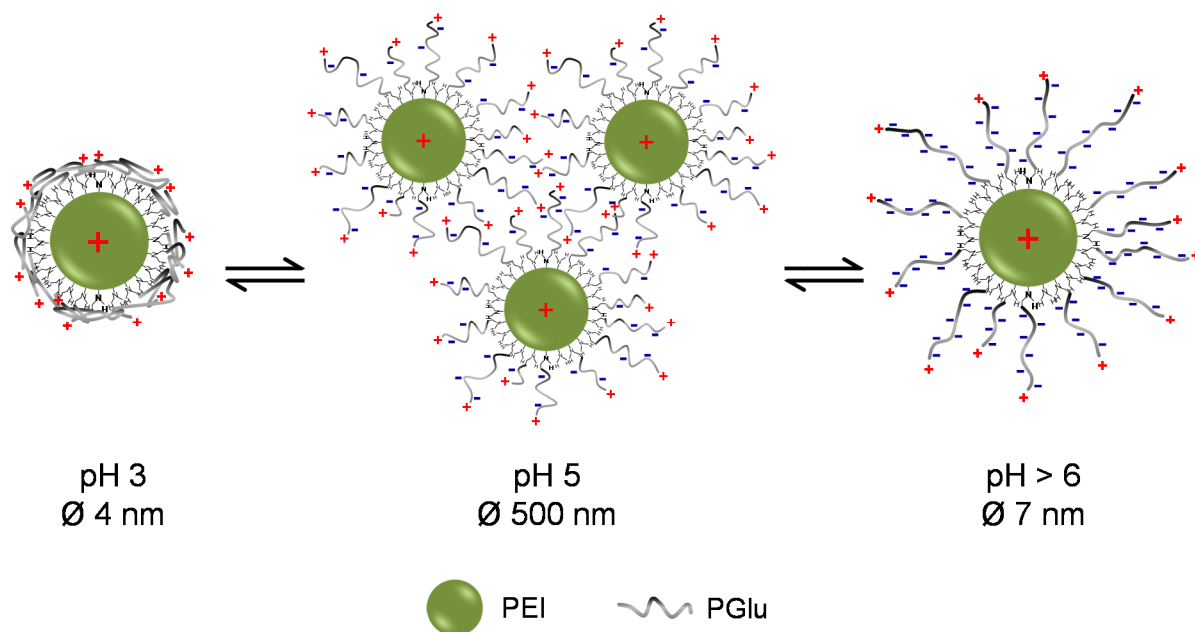


Abbildung 4.33: Schematische Darstellung der möglichen Strukturen von **PEI(5)-PGlu-346** in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Durch die Entschüttung der Carboxylgruppen besitzt **PEI(5)-PGlu-346** in Abhängigkeit vom pH-Wert unterschiedliche Oberflächenladungen und auch innerhalb der Makromoleküle unterschiedliche Ladungsdichten. Die dadurch unterschiedlich möglichen Polymerstrukturen sind schematisch in **Abbildung 4.33** dargestellt. Im Vergleich zu reiner Polyglutaminsäure und Polyglutaminsäureketten aufgefropft auf Polyamidoamin (PAMAM)-Dendrimere der 3. Generation¹⁹⁶ konnte bei **PEI(5)-PGlu-346** nicht der typische Helix-Coil-Übergang in wässriger Lösung bei Variation des pH-Wertes beobachtet werden. Bei den PAMAM-Dendrimern initiierten alle terminalen Aminogruppen die NCA-Polymerisation, wobei die resultierenden PGLu-Ketten mit 34 Monomereinheiten gleich lang sind. Die dichte Schale erlaubt aufgrund sterischer Hinderungen keine Wechselwirkungen mit dem positiv geladenen PAMAM-Kern. Dadurch bildet sich bei $\text{pH} < 5$ zu 100 % die helikale Konformation aus. Die unterschiedlich langen PGLu-Ketten in der **PEI(5)-PGlu-346**-Struktur an dem nur teilweise modifizierten PEI-Kern stellen eine offene Schalenstruktur dar. Bei pH 3 können die ungeladenen Glutaminsäureeinheiten ungehindert über Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminogruppen des PEI in Wechselwirkung treten (**Abbildung 4.33**). Dadurch wird die Ausbildung einer geordneten Sekundärstruktur gestört. Durch Erhöhung des pH-Wertes werden die Carboxylgruppen zunehmend deprotoniert. Die dicht am PEI-Kern angeordneten Polyglutaminsäureketten strecken sich aufgrund der innerhalb und zwischen den Ketten wirkenden repulsiven Kräfte in den umgebenden Raum. Bei pH 5 können die endständigen Aminogruppen mit den teilweise deprotonierten Carboxylgruppen ionisch wechselwirken,

wobei es zu einer Durchdringung der Schalen der einzelnen Makromoleküle kommen kann. Dadurch bilden sich größere Aggregate, die durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden. Wird der pH-Wert weiter erhöht, liegen die **PEI(5)-PGlu-346**-Polymere wieder als isolierte Makromoleküle vor. Die hohe Anzahl an negativen Ladungen führt nicht nur zu starken repulsiven Wechselwirkungen zwischen den Kern-Schale-Architekturen, sondern auch innerhalb der PGlu-Ketten. Dadurch bildet sich eine sternförmige Polymerstruktur aus. Durch die verstärkte Kettenstreckung in den Raum vergrößert sich die polymere Struktur von 4 nm (pH 3) auf 7 nm (pH > 6) im Durchmesser.

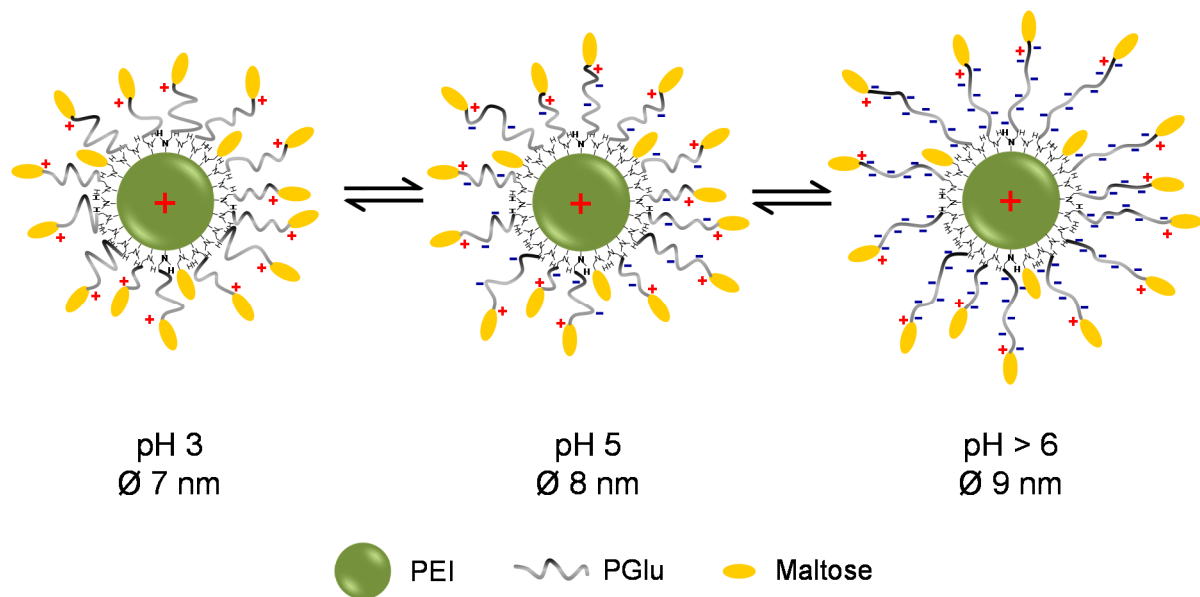


Abbildung 4.34: Schematische Darstellung der möglichen Strukturen von **PEI(5)-PGlu-346-Mal** in Abhängigkeit vom pH-Wert.

In der Literatur¹⁸⁷ wird für **PEI(5)** ein Durchmesser von ca. 3 nm angegeben. Durch eine teilweise bzw. vollständige Modifizierung der terminalen und linearen Aminogruppen mit Maltose nimmt die Größe der Glykodendrimere nur um 2 bis 3 nm zu. Durch die Anbindung von Maltoseeinheiten an **PEI(5)-PGlu-346** im basischen Milieu nimmt der Durchmesser von **PEI(5)-PGlu-346-Mal** bei pH > 6 ebenfalls nur um 2 nm zu (**Abbildung 4.34**). Die stark gestreckten Polyglutaminsäureketten bilden eine weit geöffnete Schalenstruktur, welche eine zusätzliche Umsetzung noch freier Aminogruppen am PEI-Kern mit Maltose erlaubt. Dadurch bildet sich nicht nur eine Doppelschalen-Struktur, sondern zusätzlich auch eine binäre Struktur am PEI-Kern aus. Mit sinkendem pH-Wert wird die Anzahl der negativen Ladungen durch die Protonierung der Carboxylatgruppen kleiner. Die repulsiven Kräfte innerhalb der Kern-Schale-Struktur werden schwächer, wodurch sich verstärkt Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Polyglutaminsäureketten und den Maltoseeinheiten ausbilden können. Die **PEI(5)-PGlu-346-Mal**-Struktur wird dichter und der

Durchmesser verkleinert sich von 9 nm (pH > 6) auf 7 nm (pH 3). Im Gegensatz zu **PEI(5)-PGlu-346** findet bei den oligosaccharidmodifizierten Copolymeren keine Aggregation bei pH 5 statt. Die endständigen Maltoseeinheiten schirmen die ionischen Ladungen der Makromoleküle in dem Maße ab, dass es zu keinen attraktiven, intermolekularen Wechselwirkungen kommen kann. Wasserstoffbrücken und andere nichtkovalente Wechselwirkungskräfte sind zu schwach, um eine stabile Aggregation zu bewirken. Es ist anzunehmen, dass bei pH 3 eine Wechselwirkung der ungeladenen PGlu-Ketten mit dem PEI-Kern durch die voluminösen Maltoseeinheiten nicht in dem Maße wie bei **PEI(5)-PGlu-346** stattfinden kann. Jedoch wird auch hier die Ausbildung einer helikalen Sekundärstruktur durch die H-Brücken mit Maltose verhindert.

4.3 Komplexierungs- und Freisetungsverhalten von Bortezomib in wässriger Lösung

Die Untersuchung der Komplexierung von relevanten Wirkstoffen zur Knochenregeneration bzw. zur Behandlung des multiplen Myeloms und deren Freisetzung erfolgte an den wasserlöslichen Kern-Schale-Architekturen **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** so wie an dem von der Arbeitsgruppe um Dr. Appelhaus (IPF, Abteilung Bioaktive und responsive Polymere) etablierten **PEI(25)-Mal B**. Weiterhin wurden Polyelektrolytkomplexe (PEK) aus den genannten Polymerstrukturen in der Arbeitsgruppe von Dr. Martin Müller (IPF, Abteilung Polyelektrolyte und Dispersionen) hergestellt (**Abbildung 4.35**). Das **PEK 0.9** aus **PEI(25)-Mal B** und vollsubstituiertem (DS = 3), linearem Zellosulfat (CS) weist dabei einen geringen kationischen Überschuss auf. Die Polyelektrolytkomplexe **PEK 1.1-A** und **PEK 1.1-B** hingegen besitzen im geringen Überschuss aus den anionischen **PEI(5)-PGlu-346-** bzw. **PEI(5)-PGlu-346-Mal-**Strukturen und kationischem, linearem Ethylendiamin-Zellulose. Als potentielle Wirkstoffe (WS) wurden das Statin Cerivastatin, das Bisphosphonat Risedronat und der Proteasominhibitor Bortezomib (**BZM**) eingesetzt. Zur Bestimmung der Menge an komplexierten bzw. freigesetzten Wirkstoff wurden die Polymer/WS-Lösungen mit der Ultrafiltrationsmethode aufgetrennt und UV/Vis-spektroskopisch untersucht.

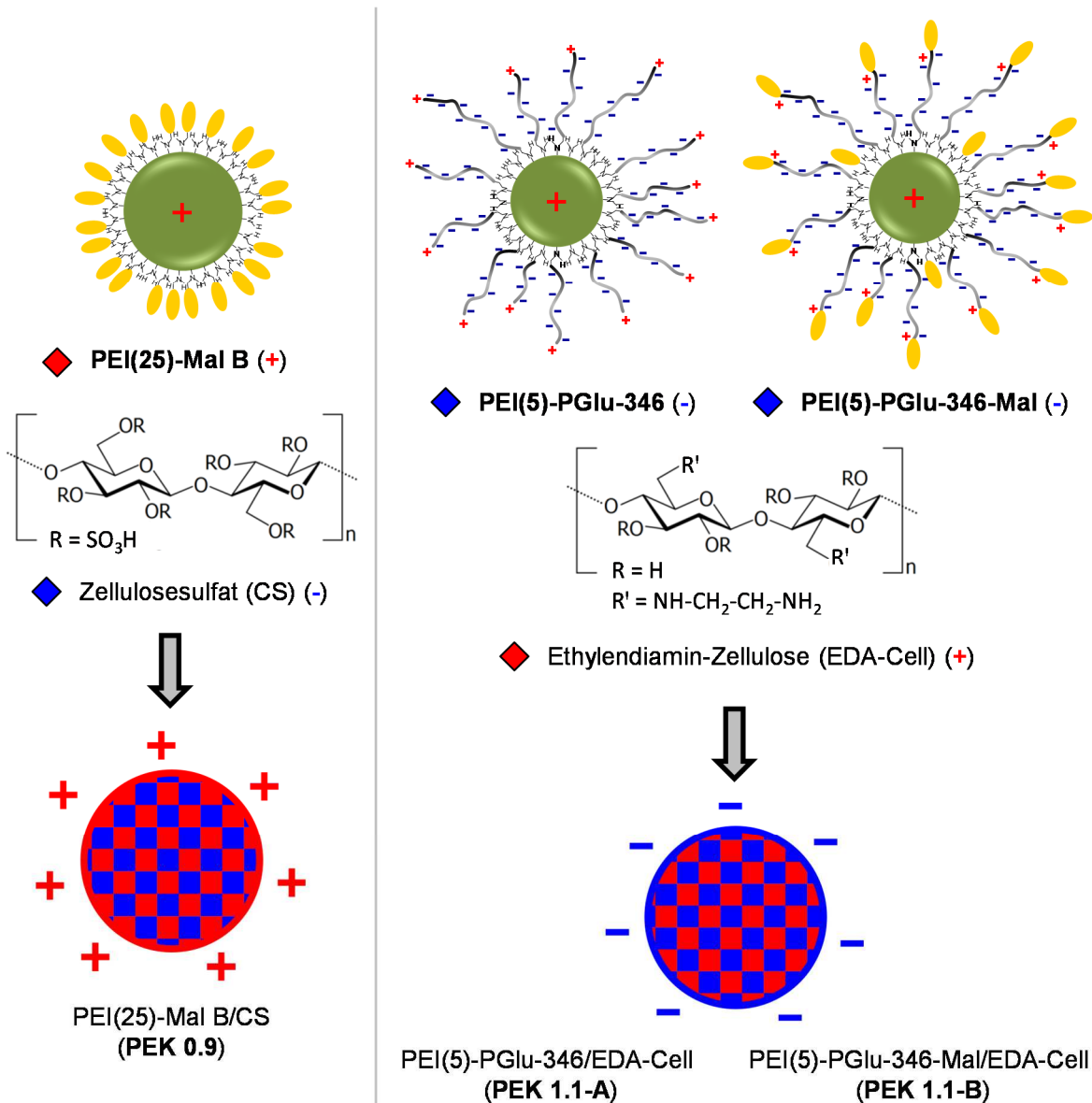


Abbildung 4.35: Schematische Darstellung der verwendeten wasserlöslichen Kern-Schale-Architekturen und der entsprechenden Polyelektrolytkomplexe.

4.3.1 Ultrafiltration

Die Komplexierung der Wirkstoffe in die wasserlöslichen Kern-Schale-Architekturen sowie in die entsprechenden Polyelektrolytkomplexe und dessen Freisetzung in wässrige Lösung erfolgten mit der Ultrafiltration nach dem Dead-End-Prinzip. Dabei werden die freien Wirkstoffmoleküle durch Filtration der Feed-Lösung (Polymer/WS-Lösung) über eine semipermeable Membran unter senkrecht wirkendem Druck (1 – 10 bar) von den wirkstoffbeladenen Polymerpartikeln abgetrennt. Die Ausschlussgrenze bei der Ultrafiltration beträgt 1 – 100 nm und wird durch die Porengröße der Filtermembran bestimmt. Üblicherweise wird sie als Molecular Weight Cut-Off (MWCO) angegeben und definiert die geringste Molmasse sphärischer Moleküle, die zu 90 % von der Membran zurückgehalten

werden. Während des Filtrationsprozesses bildet sich auf der Membran ein Filterkuchen durch Anreicherung der beladenen Polymerpartikel. Um ein Verstopfen der Poren zu vermeiden wird die Feed-Lösung langsam gerührt. In **Abbildung 4.36** ist der Prozess der Ultrafiltration schematisch dargestellt.

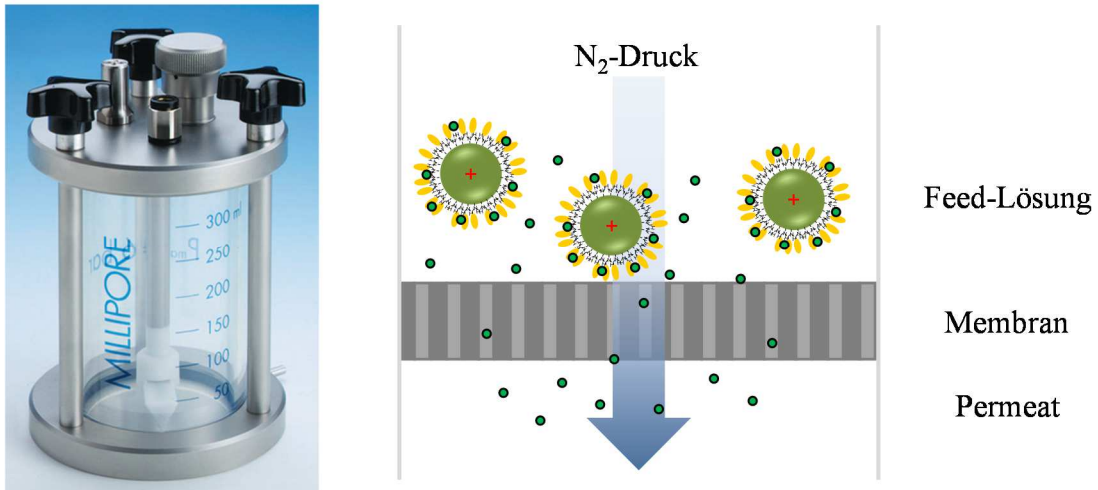


Abbildung 4.36: Schematische Darstellung der Ultrafiltration nach der Dead-End-Methode.

4.3.2 Voruntersuchungen

Die UV/Vis-Spektroskopie ist eine analytische Methode, bei der Materie durch Absorption eingestrahler elektromagnetischer Strahlung des ultravioletten und sichtbaren Bereiches in einen elektronisch angeregten Zustand überführt wird. Die auftretende Abschwächung der Intensität des eingestrahlt Lichtes durch die absorbierende Substanz wird durch das Lambert-Beersche Gesetz (**Gleichung 1**) beschrieben. Dabei ist die Absorption der Anzahl absorbierender Moleküle proportional.

$$\text{Abs}(\lambda) = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad \text{Gleichung 1}$$

$\text{Abs}(\lambda)$ – Absorption bei Wellenlänge λ

I_0 – Intensität eingestrahlt Licht

I – Intensität austretendes Licht

$\varepsilon(\lambda)$ – molarer Absorptionskoeffizient bei
Wellenlänge λ (L/(mol·cm))

c – Konzentration (mol/L)

d – Schichtdicke der Küvette (cm)

Das Lambert-Beersche Gesetz gilt nur für monochromatisches Licht und verdünnte Lösungen ($c > 0,01 \text{ mol/l}$). Die Überprüfung der Gültigkeit erfolgt über einen Kalibrierprozess. Für die Wirkstoffe Cerivastatin, Risedronat und Bortezomib wurden Kalibrierungen in reinem Wasser und in PBS-Lösung durchgeführt. Dabei wurden die Stammlösungen über 20 Stufen verdünnt und zu jeder Konzentration die Absorption bei der entsprechenden Wellenlänge gemessen.

Tabelle 4.10: Kalibriergeraden der Wirkstoffe Cerivastatin, Risedronat und Bortezomib in reinem Wasser und PBS-Lösung.

WS	LM	λ [nm]	c_{Stamm}	Kalibriergerade	Bestimmtheitsmaß
Cerivastatin	H ₂ O	270	0,135 ($2,9 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$)	Abs = $8,894 \cdot c$	$R^2 = 0,9978$
	PBS	270	0,145 ($3,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$)	Abs = $13,01 \cdot c$	$R^2 = 0,9986$
Risedronat	H ₂ O	263	0,079 ($2,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$)	Abs = $15,918 \cdot c$	$R^2 = 0,9999$
	PBS	263	0,062 ($2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$)	Abs = $10,934 \cdot c$	$R^2 = 0,9988$
Bortezomib	H ₂ O	271	0,062 g/l ($1,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$)	Abs = $29,792 \cdot c$	$R^2 = 0,9999$
	PBS	271	0,076 ($2,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$)	Abs = $33,738 \cdot c$	$R^2 = 0,9998$

Die Kalibrierkurven (**Tabelle 4.10**) von Cerivastatin und Risedronat zeigten bei einer Absorption kleiner eins eine lineare Abhängigkeit. Bei Bortezomib war die Linearität sogar bis zu einer Absorption von zwei gegeben. In **Abbildung 7.20** sind die Kalibrierkurven für Bortezomib dargestellt. Da das Lambert-Beersche Gesetz nur im linearen Bereich gültig ist, wurden für die weiteren UV/Vis-spektroskopischen Untersuchungen Wirkstoffkonzentrationen mit einer Absorption < 1 gewählt.

Weiterhin wurden die potentiellen Wirkstoffe Cerivastatin, Risedronat und Bortezomib auf mögliche Wechselwirkungen mit dem Membranmaterial getestet. Dafür wurden wässrige Stammlösungen der Wirkstoffe durch eine Zellulose- und eine Polyethersulfonmembran mit einem MWCO von 1000 Da ultrafiltriert. Die Konzentration der Wirkstoffe im Permeat muss dabei konstant sein und der Ausgangskonzentration entsprechen. Nur dann kann bei der Untersuchung des komplexierten Wirkstoffes sichergestellt werden, dass die Abnahme der Wirkstoffkonzentration im Permeat im Vergleich zur Feed-Lösung durch Wechselwirkungen

mit dem Polymer zustande kommen. Im Fall von Cerivastatin und Risedronat ergaben sich aus den UV/Vis-Spektren starke Wechselwirkungen der Wirkstoffmoleküle mit den Membranen. Am Beispiel von Risedronat und Bortezomib sind die Absorptionsspektren der Membranstabilitätstests in reinem Wasser in **Abbildung 4.37** dargestellt. Im Gegensatz zu Risedronat zeigt sich bei Bortezomib über den gesamten Ultrafiltrationsprozess eine konstante Wirkstoffkonzentration im Permeat. Die Absorptionskurven der verschiedenen Permeate sind dabei annähernd der der Ausgangslösung gleich. Die Wechselwirkung von **BZM** mit der Membran ist somit vernachlässigbar klein. Eine annähernd gleiche Membranstabilität ergibt sich auch für **BZM** in PBS-Lösung (**Abbildung 7.21**). Aufgrund der Wechselwirkungen des Statins und des Bisphosphonates mit der Zellulose- und Polyethersulfonmembran wurde in den folgenden Komplexierungs- und Freisetzungsexperimenten nur das Bortezomib verwendet.

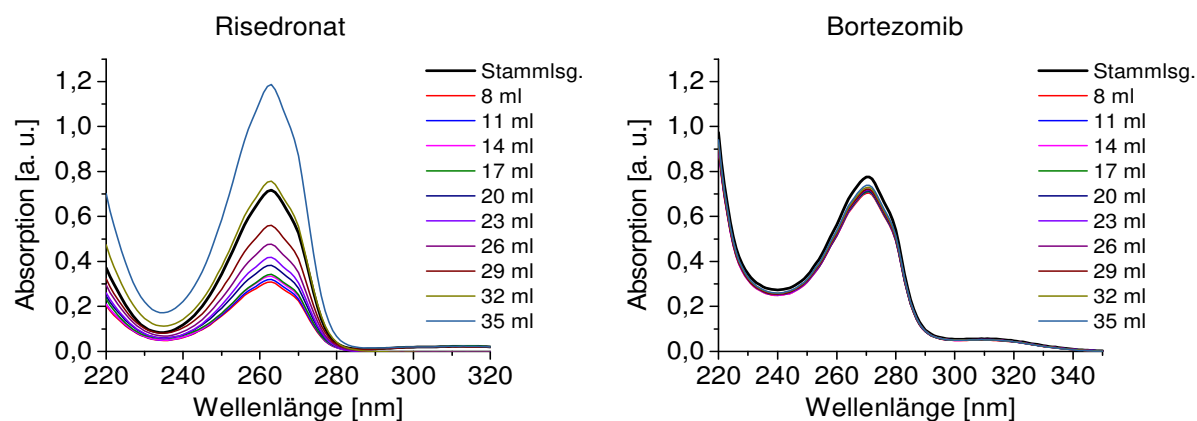


Abbildung 4.37: Membranstabilitätstests von Risedronat (40 mg/l) und Bortezomib (30 mg/l) auf PES-Membranen (MWCO 1000 Da) in reinem Wasser.

4.3.3 Wirkstoffkomplexierung in die Kern-Schale-Architekturen

Wechselwirkungen Bortezomib

Bevor die Ergebnisse der Wirkstoffkomplexierung und –freisetzung näher diskutiert werden, sollen an dieser Stelle zunächst mögliche Wechselwirkungen des **BZM** mit den Copolymeren erörtert werden. **BZM** liegt im festen Zustand als trimeres Boroxin vor. In wässriger Lösung entsteht aus dem Trimer die freie Boronsäure (**Abbildung 4.38**). Die in der Masterarbeit von Markus Franke²⁴⁸ beschriebenen ¹H-NMR-spektroskopischen Untersuchungen belegen einen Umsetzungsgrad von 15 % des trimeren Bortezomibs zur freien Boronsäure innerhalb von 20 Stunden in reinem Wasser.

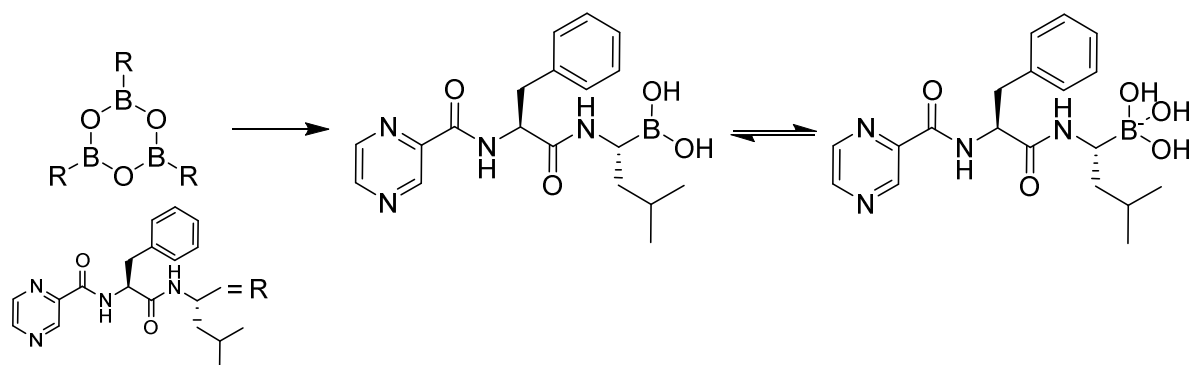


Abbildung 4.38: Umsetzung des trimeren Bortezomib zur freien Boronsäure in wässriger Lösung.

Die Herstellung der **BZM**-Lösungen für die Ultrafiltrationen erfolgte durch Lösen des Wirkstoffes unter Rühren über Nacht. Somit ist davon auszugehen, dass eine Komplexierung des **BZM** in Form des Trimers und der freien Boronsäure stattgefunden hat. Dabei können folgende Wechselwirkungen auftreten:

- Wasserstoffbrückenbindungen
- Esterbildung
- Amin-Boran-Komplexbildung
- Ionische Wechselwirkungen

Das trimere Boroxin besitzt Pyrazin- und Amidgruppen, welche Wasserstoffbrückenbindungen mit den Amino-, Carboxyl- und Hydroxylgruppen der Copolymere ausbilden können. Die freie Boronsäure kann zusätzlich über die Hydroxylgruppen am Boratom wechselwirken. Aus der Literatur²⁴⁹⁻²⁵² ist bekannt, dass Bor- und Boronsäuren mit Diolen in basisch wässriger Lösung reversibel kovalente Ester bilden. Van den Berg et al.²⁵³ untersuchten speziell die Bildung von Boratestern aus Borsäure mit Mono- und Disacchariden, wobei die Borsäure folgende Reaktivitätsabstufung zeigt:



Die an die Aminogruppen des PEI-Kerns (**PEI(25)-Mal B**) und der Polyglutaminsäureketten (**PEI(5)-PGlu-346-Mal**) gebundenen Maltoseeinheiten besitzen an C-2' und C-3', C-2'' und C-3'' bzw. C-3'' und C-4'' je eine äquatoriale Hydroxylgruppe und somit eine *trans*-1,2-Diol-Struktur. Mit dieser kann die freie Boronsäure des **BZM** nicht komplexieren. Weiterhin wäre eine Esterbildung mit C-5' und C-6' möglich. Diese ist jedoch aufgrund der schlechten Zugänglichkeit für die Boronsäure unwahrscheinlich. Möglich ist hingegen eine Esterbildung an C-4'' und C-6''. Dabei kann sich ein reversibler 1,3-Diol-Boratester bilden (**Abbildung 4.39**).

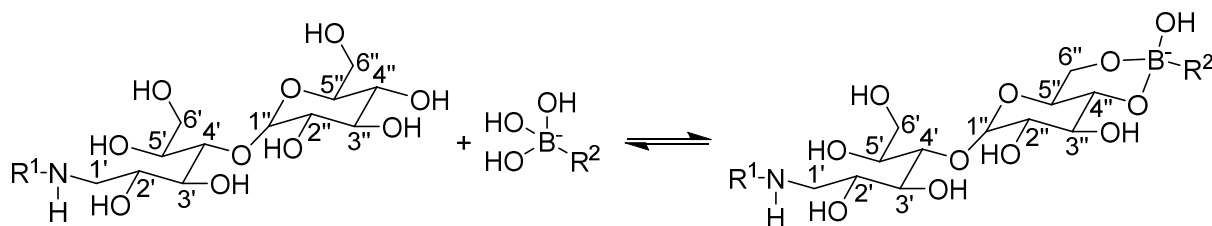


Abbildung 4.39: Mögliche reversible Esterbildung der freien Boronsäure mit den Maltose-einheiten von **PEI(25)-Mal B** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal**.

Dabei ist jedoch zu beachten, dass in wässriger Lösung Bor- bzw. Boronsäuren im Gleichgewicht in der neutralen, trigonal planaren Form und der anionischen, tetraedrischen Form vorliegen (**Abbildung 4.38**). Es wird allgemein angenommen, dass aufgrund der scheinbar höheren Affinität der Boronsäuren gegenüber Diolen im basischen Medium das Boronation die aktive Spezies ist. Kinetische Studien widerlegen jedoch diese Annahme.²⁵⁴ Weiterhin ist die stabile Bildung von Estern aus Bor- bzw. Boronsäuren und Diolen von zahlreichen anderen Faktoren, wie u. a. dem pH-Wert, der Acidität des Diols und der Art des Substituenten am Boratom, abhängig.^{255, 256} Eine weitere Möglichkeit der Interaktionen zwischen Bortezomib und den Kern-Schale-Strukturen sind Donor-Akzeptor-Wechselwirkungen zwischen dem Stickstoffatom (Donor) der Aminogruppen und dem Boratom (Akzeptor) des trimeren Boroxins bzw. der Boronsäure. Allerdings liegen die Aminogruppen der Kern-Schale-Architekturen in reinem Wasser bzw. bei pH 7,4 größtenteils protoniert vor. Somit kann eine Komplexbildung des **BZM** an den protonierten Aminogruppen ausgeschlossen werden. Allerdings sind ionische Wechselwirkungen der kationischen Aminogruppen des PEI und der endständigen Aminogruppen der Polyglutaminsäureketten mit den teilweise deprotonierten Boronsäuregruppen möglich. Die Boronsäure ist jedoch eine sehr schwache Säure, so dass nur ein sehr geringer Anteil an Boronationen in Lösung vorliegt (**Abbildung 4.38**).

Da **BZM** in wässriger Lösung hauptsächlich in Form des trimeren Boroxins vorliegt kann angenommen werden, dass Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Copolymeren und **BZM** für die Aufnahme des Wirkstoffes in die polymeren Trägersysteme vorwiegend verantwortlich sind. Aus sterischen Gründen werden diese Interaktionen bevorzugt an der Schalenstruktur der Copolymeren stattfinden.

Wirkstoffkomplexierung

Zur Ermittlung der Komplexierungskapazität von **BZM** wurden Copolymer/**BZM**-Lösungen mit den molaren Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50 sowohl in reinem Wasser als auch in PBS-

Lösung hergestellt und nach 0 h, 3 h und 20 h ultrafiltriert. Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von **BZM** wurde bei gleichbleibender Wirkstoffkonzentration die Konzentration der Copolymere entsprechend der molaren Verhältnisse eingestellt. Die Berechnung der Menge an komplexiertem Wirkstoff erfolgte mit den UV/Vis-Spektren der jeweiligen Copolymer/**BZM**-Lösung und des Permeats.

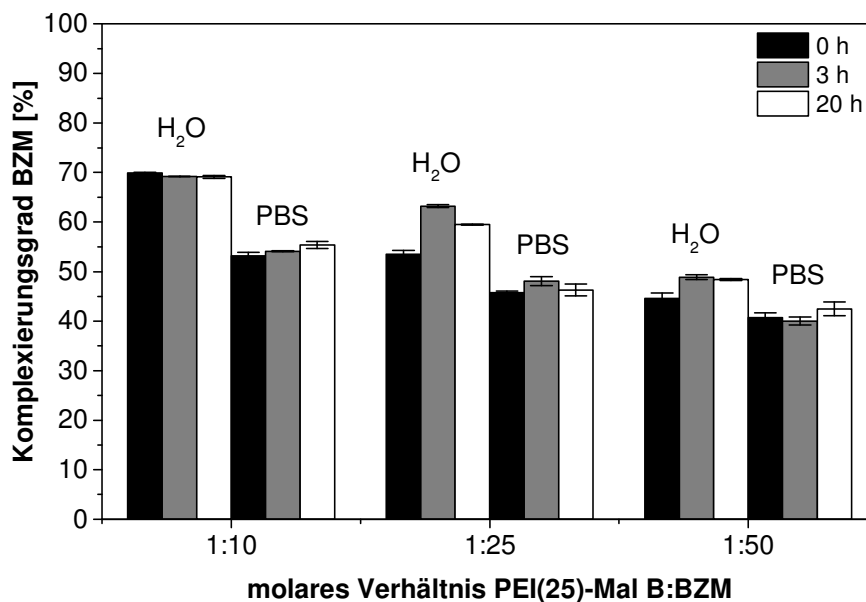


Abbildung 4.40: Komplezierte Menge **BZM** in **PEI(25)-Mal B** in reinem H₂O und PBS-Lösung nach 0 h, 3 h und 20 h bei den molaren **PEI(25)-Mal B:BZM**-Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50.

Die Aufnahme von **BZM** in alle drei Kern-Schale-Strukturen ist zeitunabhängig (**Abbildung 4.40, 4.41** und **7.22**). Die Komplexierung erfolgt innerhalb weniger Minuten und bleibt über 20 Stunden weitestgehend stabil. Von den drei wasserlöslichen Kern-Schale-Architekturen komplexiert **PEI(25)-Mal B** die größte Menge an **BZM**, sowohl in reinem Wasser als auch in PBS-Lösung (**Abbildung 4.40, Tabelle 7.2**). Dabei fällt auf, dass **PEI(25)-Mal B** in reinem Wasser mehr Wirkstoff aufnehmen kann als in PBS-Lösung. Durch die hohe Anzahl an Ionen in der PBS-Lösung kommt es wahrscheinlich zu einem Salzeffekt, der die Komplexierung mit **BZM** beeinträchtigt. Dieser Unterschied wird jedoch mit größer werdendem Copolymer/**BZM**-Verhältnis geringer, da man sich der maximal möglichen **BZM**-Beladung immer mehr annähert. In reinem Wasser beträgt der Komplexierungsgrad bei einem **PEI(25)-Mal B/BZM**-Verhältnis von 1:10 annähernd 70 %. Demnach kann ein **PEI(25)-Mal B**-Makromolekül sieben Wirkstoffmoleküle aufnehmen. Mit größer werdendem **PEI(25)-Mal B/BZM**-Verhältnis nimmt jedoch der Komplexierungsgrad ab. Somit werden nur noch $\approx 60\%$ (1:25) bzw. $\approx 50\%$ (1:50) des in Lösung befindlichen **BZM** in die Kern-Schale-Struktur aufgenommen. Dadurch erhöht sich die Anzahl komplexierter **BZM**-

Moleküle lediglich auf 14 (1:25) bzw. 23 (1:50). Dieses nichtlineare Komplexierungsverhalten von **PEI(25)-Mal B** ist bereits aus der Literatur¹⁸⁸ bekannt. Hier wurde die Aufnahme des Nukleotids Adenosintriphosphat (ATP) mit verschiedenen dendritischen Glykopolymeren untersucht. Dabei stellte man fest, dass mit höherem **PEI(25)-Mal B:ATP**-Verhältnis der Komplexierungsgrad an ATP kleiner wird. Durch die Erhöhung des Wirkstoffgehaltes bzw. der Erniedrigung des Copolymergehaltes in der Lösung müssen sich die vorherrschenden Gleichgewichte entsprechend einstellen. Dabei konkurrieren die Auflösung des trimeren Boroxins zur freien Borsäure und das Gleichgewicht zwischen Borsäure und Boronation mit dem dynamischen Gleichgewicht zwischen komplexiertem und freien **BZM** in Form des Boroxins, der Boronsäure und dem Boronation. Zusätzlich kommt es zunehmend zu sterischen Hinderungen zwischen den Wirkstoffmolekülen am **PEI(25)-Mal B** mit steigendem Copolymer/**BZM**-Verhältnis, welche ebenfalls den linearen Anstieg des Komplexierungsgrades beeinflussen.

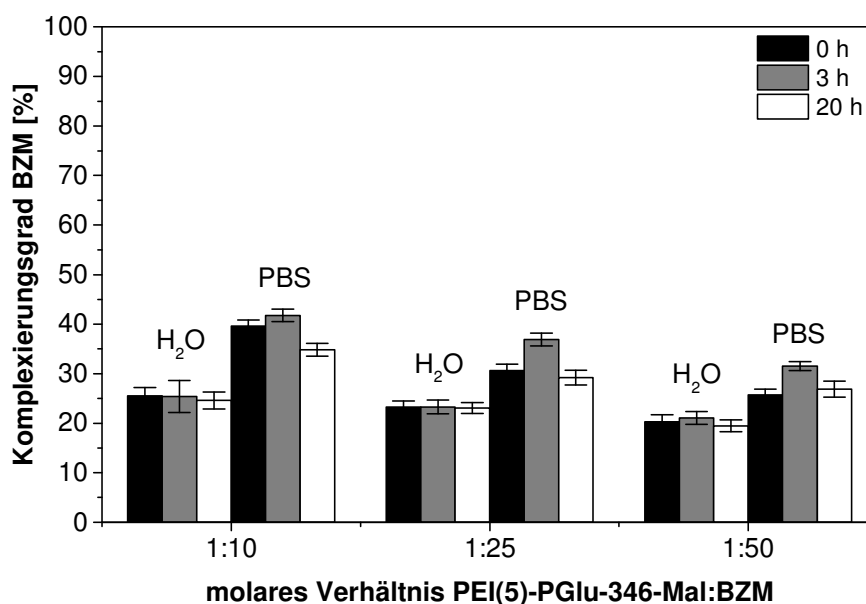


Abbildung 4.41: Komplezierte Menge **BZM** in **PEI(5)-PGlu-346-Mal** in reinem H₂O und PBS-Lösung nach 0 h, 3 h und 20 h bei den molaren **PEI(5)-PGlu-346-Mal:BZM**-Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50.

Im Gegensatz zu **PEI(25)-Mal B** werden unabhängig vom Medium von den glutaminsäuremodifizierten Copolymeren weniger **BZM**-Moleküle aufgenommen (**Abbildung 7.22, 4.41** und **Tabelle 7.3, 7.4**). In reinem Wasser werden von **PEI(5)-PGlu-346** maximal 21 % und von **PEI(5)-PGlu-346-Mal** maximal 25 % der Wirkstoffmoleküle aufgenommen. Der Komplexierungsgrad nimmt dabei nur geringfügig mit größer werdendem Copolymer/**BZM**-Verhältnis ab. In PBS-Lösung hingegen ist die Wirkstoffaufnahme für beide glutaminsäuremodifizierten Polymerstrukturen größer als in reinem Wasser. Allerdings

tritt wiederum das nichtlineare Komplexierungsverhalten wie bei **PEI(25)-Mal B** auf. **PEI(5)-PGlu-346** zeigt bei einem Copolymer/**BZM**-Verhältnis von 1:10 einen Komplexierungsgrad von $\approx 35\%$. Diese sinkt um $\approx 15\%$ bei Erhöhung des **PEI(5)-PGlu-346/BZM**-Verhältnisses auf 1:50. **PEI(5)-PGlu-346-Mal** nimmt etwa 5 % mehr Bortezomib auf als **PEI(5)-PGlu-346** ohne Maltose, wobei der höchste Komplexierungsgrad nach 3 h für alle Copolymer/**BZM**-Verhältnisse erreicht wird.

Der höhere Komplexierungsgrad des **PEI(25)-Mal B** im Vergleich zu den glutaminsäuremodifizierten Copolymeren lässt sich zum einen in der Größe des PEI-Kerns und zum anderen durch die Polyglutaminsäureketten begründen. **PEI(25)** besitzt im Mittel 223 Aminogruppen. Davon sind 65 terminal und 90 linear (siehe **Tabelle 4.1**). Die offene Maltosestruktur wird über die reduktive Aminierung der terminalen und teilweise der linearen Einheiten regeneriert. An **PEI(25)-Mal B** sind nach Auswertung der Ergebnisse der Elementaranalyse²⁴⁸ 87 Maltosemoleküle am **PEI(25)** gebunden. Die Disaccharideeinheiten besitzen eine Vielzahl an OH-Gruppen, welche u. a. über Wasserstoffbrücken mit dem **BZM** wechselwirken können. Das für **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** verwendete **PEI(5)** hingegen besitzt nur 27 terminale und 31 lineare Aminogruppen. Dabei sind die terminalen Aminogruppen nur teilweise mit PGlu-Ketten modifiziert. Aufgrund von sterischen Hinderungen wird der Wirkstoff nur mit den Glutaminsäureeinheiten in der äußeren Schale der **PEI(5)-PGlu-346**-Struktur über Wasserstoffbrücken bzw. ionisch wechselwirken. Dadurch ist die Aufnahme von **BZM** in **PEI(5)-PGlu-346** wesentlich kleiner als in die **PEI(25)-Mal B**-Struktur. Durch das Anbinden von Maltoseeinheiten an **PEI(5)-PGlu-346** erhöht sich der Komplexierungsgrad nur wenig. Trotz des eingesetzten Überschusses an Maltose werden die Disaccharideeinheiten hauptsächlich nur an den endständigen Aminogruppen der Polyglutaminsäureketten und teilweise an den noch freien terminalen Aminogruppen des **PEI(5)** gebunden. Dementsprechend stehen neben den Glutaminsäureeinheiten auch die Hydroxylgruppen der Maltoseeinheiten für Wasserstoffbrückenbindungen zur Verfügung. Aufgrund der schlechteren Zugänglichkeit der Maltoseeinheiten am **PEI(5)**-Kern werden jedoch auch bei **PEI(5)-PGlu-346-Mal** die **BZM**-Moleküle hauptsächlich in der äußeren Schale komplexiert.

Da sich die Wechselwirkungen der Wirkstoffmoleküle mit den Kern-Schale-Architekturen nicht nur intra- sondern auch intermolekular ausbilden können wurde mit der dynamischen Lichtstreuung eine mögliche Aggregation der beladenen Makromoleküle untersucht.

Dynamische Lichtstreuexperimente

Entsprechend der Wirkstoffkomplexierung wurden Copolymer/**BZM**-Lösungen mit den Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50 in reinem Wasser und PBS-Lösung (pH 7,4) hergestellt und der hydrodynamische Durchmesser der Komplexe mit dynamischer Lichtstreuung ermittelt (**Tabelle 7.5-7.7**). In **Abbildung 4.42** sind beispielhaft die Intensitätsverteilungskurven des **PEI(25)-Mal B/BZM**-Komplexes (1:50) dargestellt. Aufgrund der bimodalen Verteilung scheinen sowohl kleinere isolierte Komplexe als auch größere Aggregate in reinem Wasser vorzuliegen. Aus der Volumenverteilung wird jedoch ersichtlich, dass keine stabile Aggregation der **PEI(25)-Mal B/BZM**-Komplexe stattfindet. Alle Copolymer/**BZM**-Komplexe zeigen unabhängig von der Zeit, dem Lösungsmittel und dem Copolymer/**BZM**-Verhältnis sowohl kleinere als auch größere Partikel in der Intensitätsverteilung. Die Auftragung des Volumens über dem hydrodynamischen Durchmesser bestätigt allerdings, dass alle Copolymer/**BZM**-Komplexe als isolierte wirkstoffbeladene Makromoleküle vorliegen. Die hydrodynamischen Durchmesser entsprechen dabei denen der reinen Copolymeren ohne **BZM** in reinem Wasser bzw. PBS-Lösung (**Tabelle 4.8**).

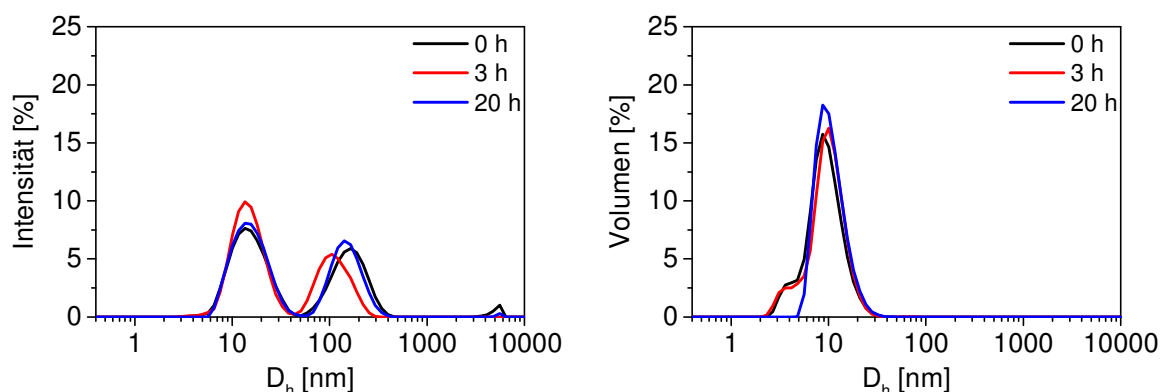


Abbildung 4.42: DLS-Verteilungskurven von **PEI(25)-Mal B/BZM** 1:50 in reinem Wasser nach 0 h, 3 h und 20 h.

Lediglich der **PEI(5)-PGlu-346-Mal/BZM**-Komplex zeigt kurzweilige Aggregation in reinem Wasser bei dem größten Copolymer/**BZM**-Verhältnis von 1:50 (**Abbildung 4.43**). Direkt nach dem Mischen der Copolymer- mit der **BZM**-Lösung bilden sich kleinere Aggregate mit einem hydrodynamischen Durchmesser von ≈ 70 nm und größere Aggregate mit $D_h \approx 400$ nm. Nach drei Stunden lösen sich die losen Zusammenlagerungen jedoch bereits auf und ein Teil der **PEI(5)-PGlu-346-Mal/BZM**-Komplexe liegt als isolierte **BZM**-beladene Makromoleküle vor. Nach 20 Stunden sind nur noch wenige Aggregate vorhanden.

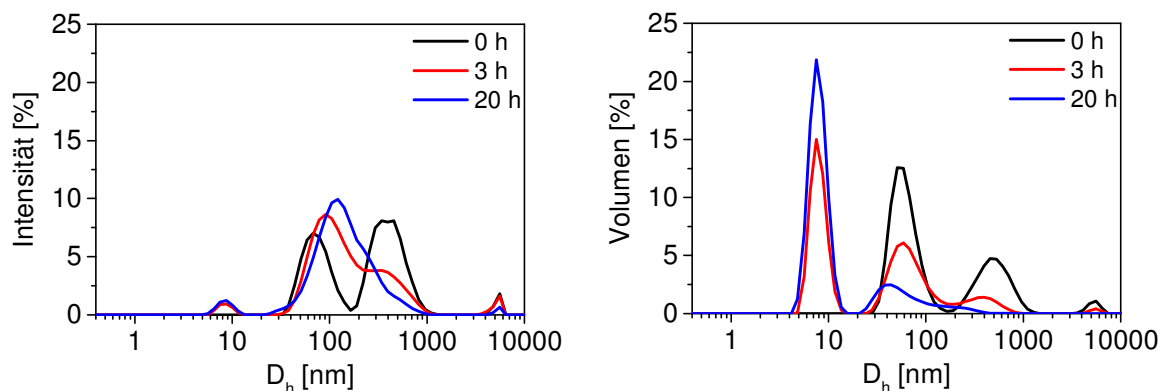


Abbildung 4.43: DLS-Verteilungskurven von **PEI(5)-PGlu-346-Mal/BZM 1:50** in reinem Wasser nach 0 h, 3 h und 20 h.

4.3.4 Wirkstoffkomplexierung in Polyelektrolytkomplexe

Die verwendeten Polyelektrolytkomplexe **PEK 0.9** (PEI(25)-Mal B/CS), **PEK 1.1-A** (PEI(5)-PGlu-346/EDA-Cell) und **PEK 1.1-B** (PEI(5)-PGlu-346-Mal/EDA-Cell) wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Martin Müller bereitgestellt. Die Herstellung der PEKs erfolgte in reinem Wasser, wobei sich für den kationischen **PEK 0.9** eine klare Lösung und für die anionischen **PEK 1.1-A** und **PEK 1.1-B** trübe Lösungen ergaben. Die Konzentration des Copolymers im jeweiligen PEK betrug 1 g/l.

Zur Ermittlung der Komplexierungskapazität von **BZM** in die **PEK 0.9**, **PEK 1.1-A** und **PEK 1.1-B** wurden PEK/**BZM**-Lösungen mit den molaren Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50 entsprechend den Wirkstoffkomplexierungen mit den Copolymeren hergestellt. Auch hier wurde die Wirkstoffkonzentration konstant gehalten und die PEK-Konzentration entsprechend den molaren Verhältnissen angeglichen. Da zusätzliche Ionen die gebildeten Komplexe beeinflussen und sogar zur Ausfällung führen können, wurden die Komplexierungsversuche nur in reinem Wasser durchgeführt. Die Ultrafiltrationen erfolgten nach 0 h, 3 h und 20 h. Die Menge an komplexiertem Wirkstoff wurde wiederum mit den UV/Vis-Spektren der jeweiligen PEK/**BZM**-Lösung und des Permeats berechnet.

Wie bei den reinen Copolymeren erfolgt die **BZM**-Komplexierung mit den PEKs innerhalb weniger Minuten und ist über 20 Stunden relativ stabil (**Abbildung 4.44**, **4.45** und **7.23**). Auch hier ist die Wirkstoffaufnahme in den kationischen PEK mit dem Copolymer **PEI(25)-Mal B** im Vergleich zu den anionischen PEKs signifikant größer. Im linken Graphen der **Abbildung 4.44** ist die prozentual aufgenommene Menge an **BZM** in **PEK 0.9** in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis und der Zeit dargestellt. Wie bereits bei der **BZM**-Komplexierung in das reine Copolymer ist eine Abnahme des Komplexierungsgrades mit zunehmendem molarem Verhältnis von 56 % (1:10, 20 h) auf 39 % (1:50, 20 h) ersichtlich.

Somit erfolgt beim **PEK 0.9** wie beim reinen **PEI(25)-Mal B** eine nichtlineare Komplexierung und es werden bei der größten **BZM**-Konzentration maximal 20 Wirkstoffmoleküle an **PEK 0.9** komplexiert (**Tabelle 7.8**). Im Vergleich zum reinen Copolymer (rechter Graph **Abbildung 4.44**) wird durch den Polyelektrolytkomplex jedoch etwas weniger Wirkstoff aufgenommen. Aufgrund der dichten Struktur der Polyelektrolytkomplexe ist anzunehmen, dass die **BZM**-Moleküle nur an der Oberfläche der aggregierten Komplexe über die bereits benannten Wechselwirkungen (**Kapitel 4.3.3**) mit den **PEI(25)-Mal B**-Strukturen interagieren. Nur wenige **BZM**-Moleküle werden auch in die PEKs diffundieren und mit innenliegenden Copolymeren wechselwirken. Dementsprechend nehmen im Vergleich zu den reinen Copolymeren in Summe weniger **PEI(25)-Mal B**-Copolymere im Polyelektrolytkomplex den Wirkstoff auf. Jedoch können auch Zellosulfatmoleküle im äußeren Bereich der PEKs über Wasserstoffbrücken mit dem **BZM** in Wechselwirkung treten. Dadurch ist die Wirkstoffaufnahme des **PEK 0.9** im Vergleich zum reinen **PEI(25)-Mal B** nur geringfügig kleiner.

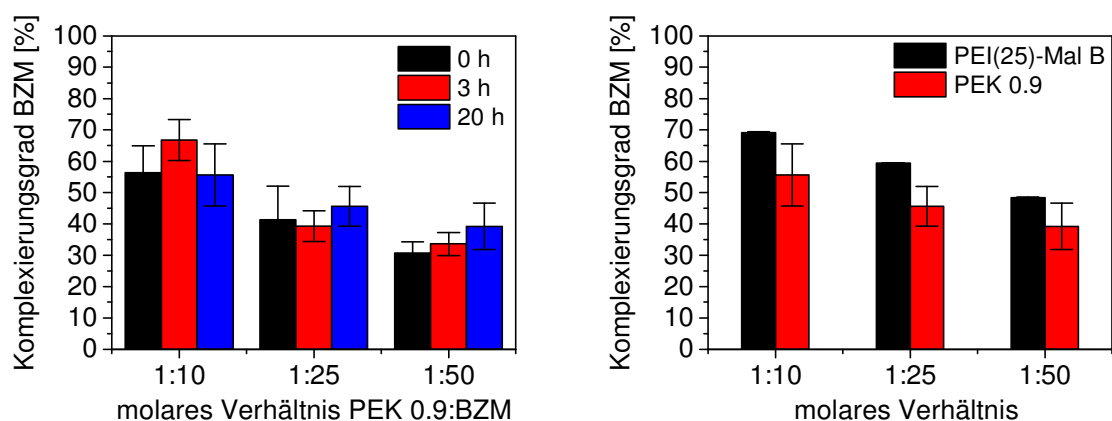


Abbildung 4.44: links: Komplexierte Menge **BZM** in **PEK 0.9** in reinem H₂O nach 0 h, 3 h und 20 h bei den molaren Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50; rechts: Vergleich der **BZM**-Komplexierung zwischen **PEI(25)-Mal B** und **PEK 0.9** nach 20 h.

Wie bereits bei den reinen Copolymeren komplexieren **PEK 1.1-A** (**Abbildung 7.29**, **Tabelle 7.9**) und **PEK 1.1-B** (**Abbildung 4.45**, **Tabelle 7.10**) mit den glutaminsäure-modifizierten Copolymeren im Vergleich zum **PEK 0.9** wesentlich weniger Bortezomib. Beide anionische Polyelektrolytkomplexe nehmen unabhängig von der **BZM**-Konzentration maximal 20 % der **BZM**-Moleküle auf. Das entspricht etwa 10 Wirkstoffmolekülen bei einem molaren Verhältnis von 1:50. Der große Unterschied in der Komplexierungskapazität im Vergleich zum **PEK 0.9** ist, wie bei den reinen Copolymeren auch, in der Struktur der Copolymere selbst begründet. Durch den kleineren PEI-Kern und die damit geringere Anzahl

an funktionalen Aminogruppen können entsprechend weniger **BZM**-Moleküle mit diesen Copolymerstrukturen in Wechselwirkung treten. Beim Vergleich von **PEK1.1-A** bzw. **PEK 1.1-B** mit dem entsprechenden reinen Copolymer (**Abbildung 4.45**) zeigt sich auch hier ein etwas geringerer Komplexierungsgrad. Dabei treten die Wirkstoffmoleküle vorwiegend mit den Copolymeren und der Ethylendiamin-Zellulose im äußeren Bereich der PEKs hauptsächlich über Wasserstoffbrücken in Wechselwirkung. Wie bei **PEK 0.9** werden die **BZM**-Moleküle nur zu einem geringen Anteil auch mit den innenliegenden Polymerstrukturen interagieren können.

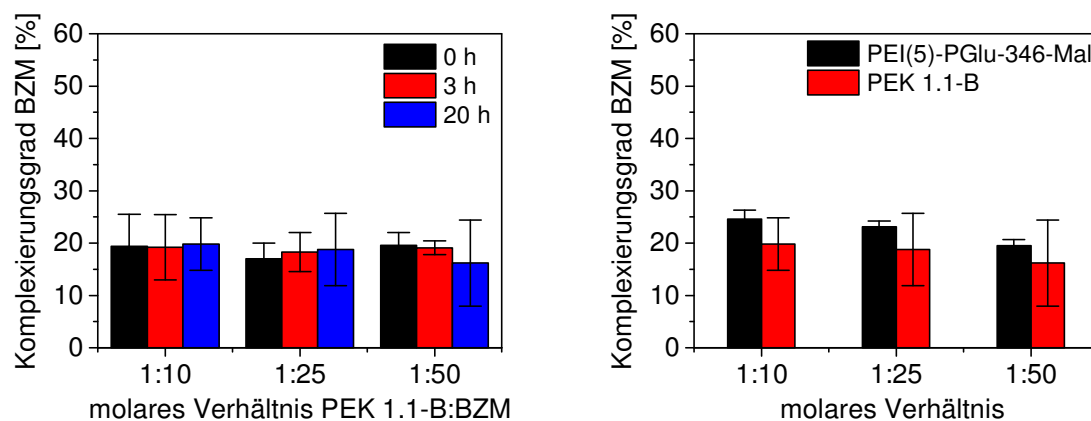


Abbildung 4.45: links: Komplexierte Menge **BZM** in **PEK 1.1-B** in reinem H_2O nach 0 h, 3 h und 20 h bei den molaren Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50; rechts: Vergleich der **BZM**-Komplexierung zwischen **PEI(5)-PGlu-346-Mal** und **PEK 1.1-B** nach 20 h.

Beim Vergleich der Polyelektrolytenkomplexe mit den entsprechenden reinen Copolymeren sind die hohen Standardabweichungen der jeweiligen Komplexierungsgrade besonders auffällig. Um die Menge an aufgenommenen **BZM** in die Copolymere und PEKs zu bestimmen, wurden während der Ultrafiltrationen nach 18 ml, 23 ml und 28 ml (entspricht den Probenbezeichnungen 20 ml, 25 ml und 30 ml) je 2 ml des Permeats in Küvetten aufgefangen und UV/Vis-spektroskopisch untersucht. Die Absorptionskurven geben die Menge an nicht komplexiertem **BZM** wieder. Das heißt, je größer das Absorptionsmaximum bei der Wellenlänge von 271 nm ist, desto mehr freies **BZM** befindet sich im Permeat und desto weniger **BZM** wurde von den Copolymeren bzw. PEKs aufgenommen. Am Beispiel der Absorptionskurven der Permeate von **PEI(5)-PGlu-346-Mal/BZM** im Verhältnis 1:50 (**Abbildung 4.46 links**) ist kein signifikanter Unterschied im Absorptionsmaximum des Permeats nach 18 ml, 23 ml und 28 ml zu erkennen. Im Vergleich dazu zeigen die Absorptionskurven der Permeate der **PEK 1.1-B/BZM**-Lösung eine Erhöhung der Absorption im Maximum mit zunehmendem Permeatvolumen (**Abbildung 4.46 rechts**). Während der

Ultrafiltration der PEK-Lösungen bildete sich sichtbar ein Filterkuchen auf der Membran. Es ist anzunehmen, dass während der Filterkuchenbildung nicht komplexiertes **BZM** im Filterkuchen mit eingeschlossen wird und somit im Permeat zunächst eine scheinbar geringere Menge an freiem Bortezomib nachgewiesen wird. Mit andauernder Ultrafiltration wird die PEK/**BZM**-Lösung in der Rührzelle aufkonzentriert und der Filterkuchen größer. Durch die wirkenden Scherkräfte des Rührers direkt über der Membran wird der Filterkuchen wahrscheinlich immer wieder aufgebrochen, wodurch das im Filterkuchen eingeschlossene freie Bortezomib nun verstärkt ausgespült wird. Dadurch ist kurz vor Beendigung der Ultrafiltration die **BZM**-Konzentration im Permeat am höchsten. Dieser Effekt wurde bei allen Ultrafiltrationen der PEK/**BZM**-Lösungen mehr oder weniger ausgeprägt beobachtet, welcher zu den unterschiedlich hohen Standardabweichungen führt.

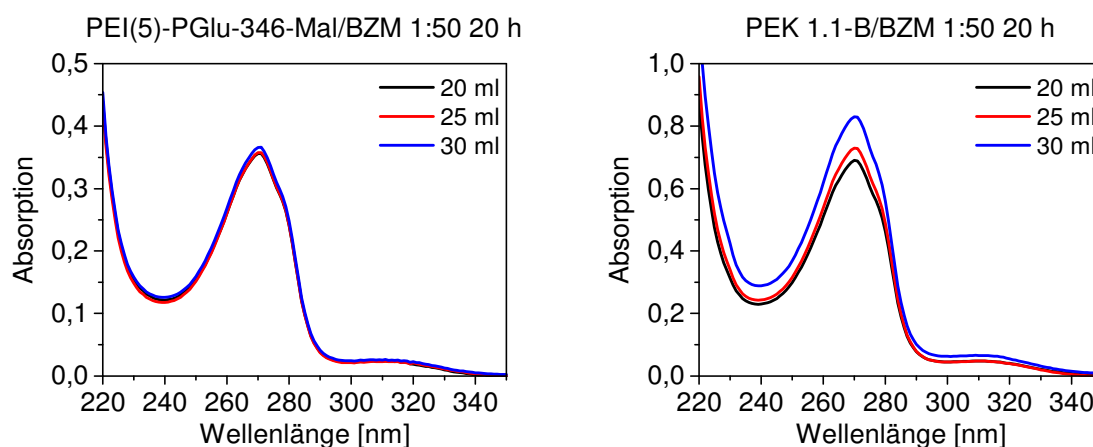


Abbildung 4.46: UV/Vis-Absorptionskurven der Permeate der **PEI(5)-PGlu-346-Mal/BZM-** und **PEK 1.1-B/BZM**-Lösung im Verhältnis 1:50 nach 20 h.

Dynamische Lichtstreuversuche

Polyelektrolytkomplexe sind in reinem Wasser sehr stabil. Durch die Zugabe von weiteren Substanzen, insbesondere Salze, kann die Stabilität der PEKs jedoch stark beeinflusst werden.²⁵⁷ Um einen möglichen Einfluss des Wirkstoffes auf die Polyelektrolytkomplexe nachweisen zu können, wurden zunächst die PEK-Stammlösungen mit 1 g/l Copolymer im PEK ohne Zugabe von BZM mit DLS untersucht. In **Abbildung 4.47** sind die DLS-Verteilungskurven der kationischen **PEK 0.9-** und der anionischen **PEK 1.1-A-** und **PEK 1.1-B-**Stammlösungen dargestellt. Sowohl die Intensitäts- als auch die Volumenverteilungskurven von **PEK 1.1-A** und **PEK 1.1-B** zeigen Komplexe mit einem hydrodynamischen Durchmesser > 100 nm. Für **PEK 1.1-A** ergibt sich ein D_h von etwa 190 nm und für **PEK 1.1-B** von ca. 250 nm. Im Gegensatz zu den monomodalen Verteilungskurven der anionischen PEKs weist **PEK 0.9** eine bimodale Verteilung auf. Dabei liegen in der Lösung

hauptsächlich kleinere Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von etwa 30 nm vor. Weiterhin befinden sich in einem geringen Anteil auch größere Partikel mit einem D_h um 150 nm in der **PEK 0.9**-Lösung. Dementsprechend liegt in reinem Wasser kein stabiler **PEK 0.9**-Komplex bei einer **PEI(25)-Mal B**-Konzentration von 1 g/l vor. Eine mögliche Ursache dafür ist in der Ladung der **PEI(25)-Mal B**-Struktur zu finden. Die wässrigen Ausgangslösungen von **PEI(25)-Mal B** und Zelloxysulfat besitzen einen pH-Wert um 8. Werden diese Lösungen für die Bildung des Komplexes vereint, steigt der pH-Wert auf etwa 9,5 an. Aus der Literatur¹⁸⁶ ist bekannt, dass generell die Anbindung von Oligosacchariden an hochverzweigtes PEI zu einer deutlichen Abnahme der kationischen Oberflächenladung führt. Dabei gilt: Je mehr Oligosaccharideinheiten am PEI gebunden werden, desto geringer ist die Oberflächenladung. Außerdem wird der isoelektrische Punkt der glykodendritischen Strukturen mit steigender Anzahl an Oligosaccharideinheiten herabgesetzt. Dementsprechend scheint der schwache Polyelektrolyt **PEI(25)-Mal B** bei einem pH-Wert von 9,5 eine zu geringe positive Oberflächenladung für eine stabile Komplexbildung mit Zelloxysulfat zu besitzen.

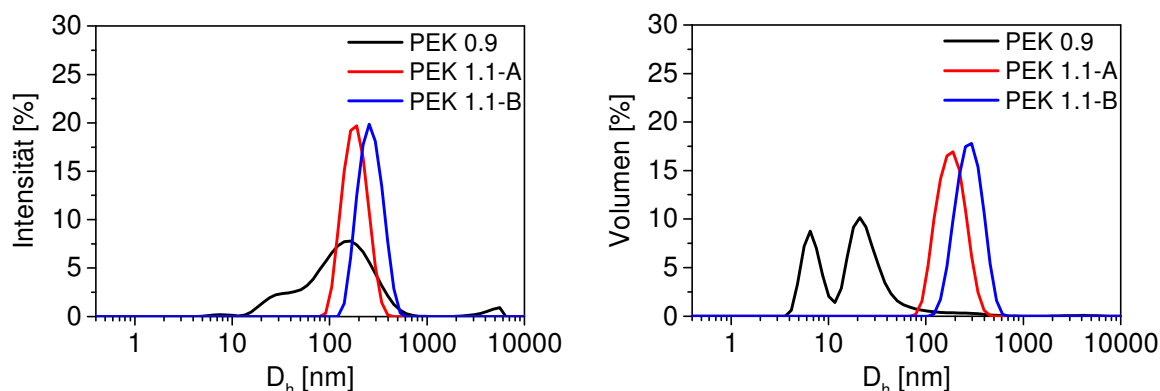


Abbildung 4.47: DLS-Verteilungskurven der Polyelektrolytkomplexe (1 g/l Copolymer im PEK) in reinem Wasser.

Für die Wirkstoffkomplexierung mit **BZM** werden jedoch geringere Konzentrationen der Polyelektrolytkomplexe verwendet. Deshalb wurden die hochkonzentrierten PEK-Stammlösungen (1 g/l Copolymer im PEK) entsprechend den in **Kapitel 6.8.3** beschriebenen Probenpräparationen mit reinem Wasser verdünnt. Die verdünnten PEK-Lösungen besitzen entsprechend den Komplexierungsversuchen eine Copolymerkonzentration von 0,297 g/l (1:10), 0,119 g/l (1:25) und 0,0595 g/l (1:50). Die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers der verdünnten PEKs mit DLS erfolgte kurz nach der Verdünnung (0 h) nach 3 h und 20 h. In **Abbildung 4.48** sind die Verteilungskurven der verdünnten **PEK 0.9**-Lösung mit der Konzentration 0,297 g/l nach 0, 3 und 20 h zu sehen. Die Intensitätskurven zeigen im

Vergleich zur unverdünnten **PEK 0.9**-Stammlösung keinen deutlichen Unterschied im Anteil kleiner Partikel. Die Bimodalität ist zwar nicht so ausgeprägt, dennoch zeigen die Intensitätskurven eine breite Verteilung der Partikelgröße im Bereich von etwa 10 nm bis 500 nm. Aufschlussreicher sind hingegen die Volumenverteilungskurven. Es scheint eine Aggregation der kleineren Partikel zu größeren Komplexen innerhalb der 20 Stunden stattzufinden, wobei der Volumenanteil kleiner Partikel um 10 nm stark abnimmt.

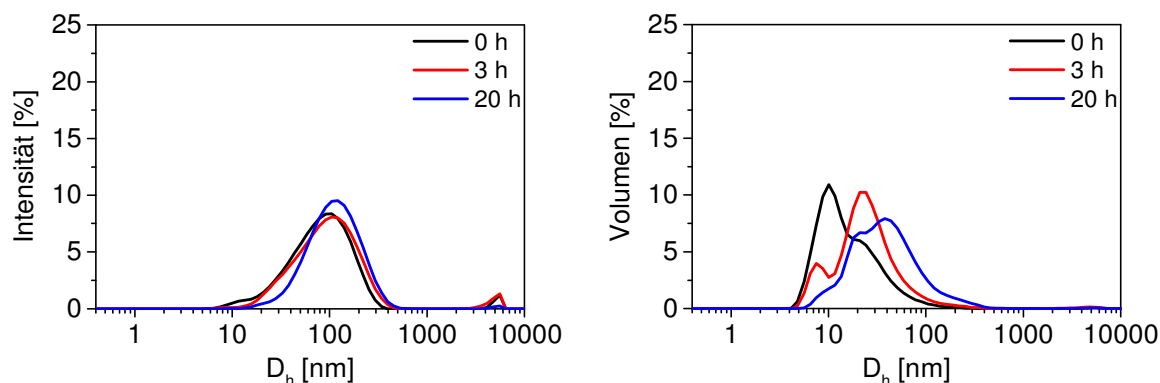


Abbildung 4.48: DLS-Verteilungskurven von **PEK 0.9** (0,297 g/l) nach 0 h, 3 h und 20 h.

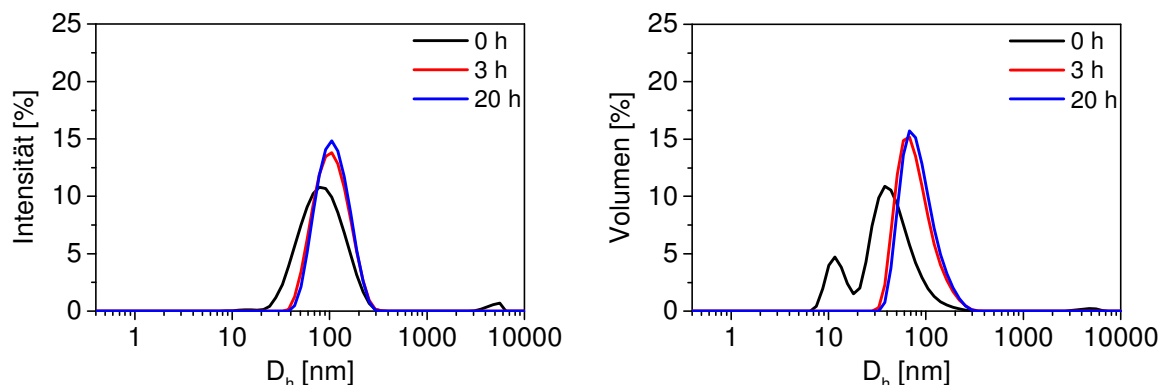


Abbildung 4.49: DLS-Verteilungskurven von **PEK 0.9** (0,0595 g/l) nach 0 h, 3 h und 20 h.

Diese zeitabhängige Komplexbildung wird bei den verdünnteren **PEK 0.9**-Lösungen mit den **PEI(25)-Mal B**-Konzentrationen 0,119 g/l und 0,0595 g/l noch deutlicher (**Abbildung 7.30** und **4.49**). Die Intensitätskurven werden schmaler und aus der bimodalen Partikelgrößenverteilung wird eine monomodale Verteilung. In der **PEK 0.9**-Lösung mit der **PEI(25)-Mal B**-Konzentrationen 0,119 g/l (**Abbildung 7.30**) liegen nach 20 Stunden nur noch Polyelektrolytkomplexe mit einem hydrodynamischen Durchmesser von etwa 100 nm vor. In der etwa 20fach verdünnten **PEK 0.9**-Lösung ist die Aggregation der kleineren Partikel zu Polyelektrolytkomplexen bereits nach drei Stunden vollständig (**Abbildung 4.49**). Aus den zeitabhängigen DLS-Untersuchungen mit **PEK 0.9** lässt sich schlussfolgern, dass zum einen mit stärkerer Verdünnung ein höherer Anteil an PEKs bereits direkt nach der

Verdünnung gebildet wird. Zum anderen ist die PEK-Bildung nicht nur konzentrations-, sondern auch zeitabhängig. Je geringer die **PEK 0.9**-Konzentration ist, desto schneller bilden sich die Polyelektrolytkomplexe in der wässrigen Lösung. Die Ursache dieses Verdünnungseffektes liegt wiederum in der Oberflächenladung der **PEI(25)-Mal B**-Copolymere begründet. Der pH-Wert sinkt allein durch die Zugabe von reinem Wasser zur **PEK 0.9**-Stammlösung von 9,5 auf 8,8 bei einer **PEI(25)-Mal B**-Konzentrationen von 0,297 g/l im **PEK 0.9**. Die **PEK 0.9**-Lösungen mit den Copolymerkonzentrationen 0,119 g/l bzw. 0,0595 g/l weisen sogar nur einen pH-Wert von 8,4 bzw. 8,2 auf. Somit scheint mit niedrigerem pH-Wert die kationische Oberflächenladung der **PEI(25)-Mal B**-Copolymere zuzunehmen, wodurch sich stabilere Polyelektrolytkomplexe mit dem anionischen Zellosulfat bilden können.

Die DLS-Untersuchungen der verdünnten **PEK 1.1-A**- und **PEK 1.1-B**-Lösungen wiesen, wie bereits bei den unverdünnten PEK-Stammlösungen (**Abbildung 4.47**), eine stabile Bildung der gewünschten Polyelektrolytkomplexe unabhängig von der Zeit und der PEK-Konzentration nach (**Abbildung 7.25** und **7.26**).

Entsprechend den DLS-Untersuchungen der mit **BZM** beladenen Copolymere wurden auch die beladenen PEKs auf einen möglichen Einfluss der Wirkstoffmoleküle auf die PEK-Strukturen hin untersucht. Dafür wurden, wie in **Kapitel 6.8.3** beschrieben, PEK/**BZM**-Lösungen mit den Verhältnissen 1:10 (mit 0,297 g/l Copolymer im PEK), 1:25 (mit 0,119 g/l Copolymer im PEK) und 1:50 (mit 0,0595 g/l Copolymer im PEK) in reinem Wasser hergestellt. Die Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers erfolgte wiederum direkt nach der Herstellung (0 h) der PEK/**BZM**-Lösungen, nach 3 h und 20 h.

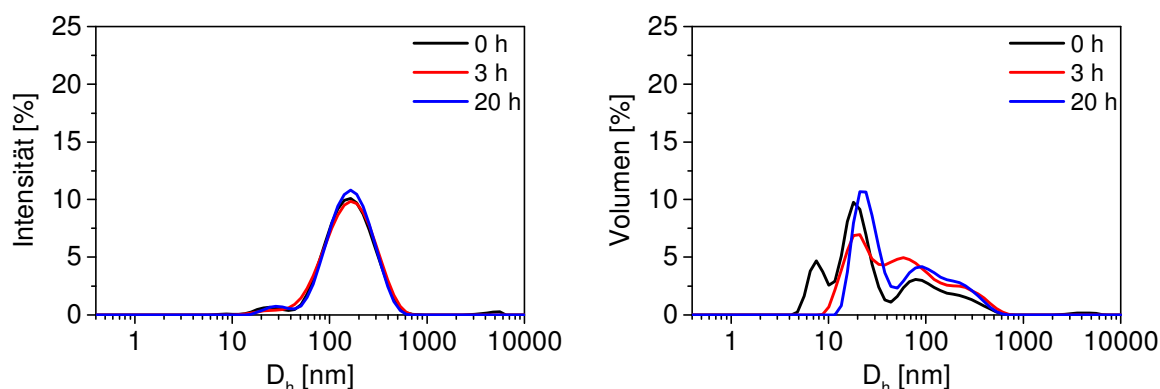


Abbildung 4.50: DLS-Verteilungskurven von **PEK 0.9/BZM** 1:10 in reinem Wasser nach 0 h, 3 h und 20 h.

In **Abbildung 4.50** sind die Verteilungskurven von **PEK 0.9/BZM** im Verhältnis 1:10 dargestellt. Im Vergleich zu **PEK 0.9** (0,297 g/l) ohne **BZM** (**Abbildung 4.48**) sind die

Intensitätskurven gleichmäßiger und schmäler. Der Anteil an kleinen Partikeln ist nach wie vor vorhanden, wobei die Volumenverteilungskurven nun auch einen größeren Anteil an Komplexen zeigen. In den DLS-Verteilungskurven der **PEK 0.9/BZM**-Lösung mit dem Verhältnis 1:25 ist nur direkt nach der Herstellung der **PEK/BZM**-Lösung ein geringer Anteil an kleinen Partikeln vorhanden. Nach 3 h liegen bereits ausschließlich größere Komplexe mit einem hydrodynamischen Durchmesser von etwa 50 nm in der Lösung vor. Nach 20 h besitzen diese Komplexe eine Partikelgröße von etwa 70 nm im Durchmesser. In der **PEK 0.9/BZM**-Lösung mit der geringsten Konzentration an **PEK 0.9** (**Abbildung 4.51**) liegen zu jeder Messzeit ausschließlich große Komplexe vor. Dabei nimmt der hydrodynamische Durchmesser innerhalb der 20 h von etwa 80 nm auf 100 nm zu.

Die Zugabe von **BZM** scheint die Komplexbildung im Vergleich zu den **PEK 0.9**-Lösungen ohne **BZM** zu stabilisieren. Ob sich dabei ausschließlich Polyelektrolytkomplexe bilden, die den Wirkstoff über die beschriebenen Wechselwirkungen (**Kapitel 4.3.2**) aufnehmen, oder ob das **BZM** direkt an der Bildung größerer Komplexe über intermolekulare Wasserstoffbrücken beteiligt ist, kann aus den DLS-Untersuchungen nicht geschlussfolgert werden.

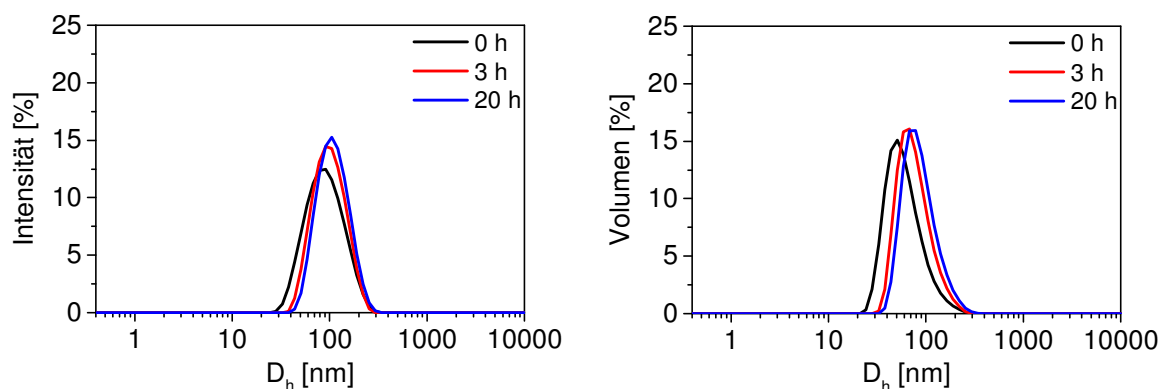


Abbildung 4.51: DLS-Verteilungskurven von **PEK 0.9/BZM** 1:50 in reinem Wasser nach 0 h, 3 h und 20 h.

Die DLS-Verteilungskurven der **PEK 1.1-A/BZM**- und **PEK 1.1-B/BZM**-Lösungen (**Abbildung 7.28** und **7.29**) zeigen im Vergleich zu den **PEK**-Lösungen ohne **BZM** (**Abbildung 7.25** und **7.26**) keinen signifikanten Unterschied. Im Gegensatz zum **PEK 0.9** hat der Wirkstoff somit keinen Einfluss auf die bereits stabil vorliegenden Polyelektrolytkomplexe.

4.3.5 Wirkstofffreisetzung

Bevor die beladenen Copolymer/**BZM**- und PEK/**BZM**-Komplexe in den Calciumphosphatzement eingearbeitet wurden, erfolgte zunächst der Nachweis der Freisetzung des Wirkstoffes aus den polymeren Trägersystemen in PBS-Lösung. Dafür wurden die Copolymere bzw. Polyelektrolytkomplexe zunächst mit **BZM** in reinem Wasser im molaren Verhältnis 1:10 und 1:50 komplexiert und ultrafiltriert. Der verbleibende Filterkuchen mit den Copolymer/**BZM**- bzw. PEK/**BZM**-Komplexen auf der Ultrafiltrationsmembran wurde anschließend gefriergetrocknet, in 300 ml PBS-Lösung gelöst und zunächst 30 Minuten gerührt. Aus dieser Copolymer/**BZM**- bzw. PEK/**BZM**-Stammlösung wurden 30 ml Lösung entnommen und sofort das gleiche Volumen an PBS-Lösung wieder zugegeben. Anschließend erfolgte die Ultrafiltration der entnommenen Copolymer/**BZM**- bzw. PEK/**BZM**-Lösung. Mit der UV/Vis-Spektroskopie wurde die **BZM**-Konzentration im Permeat ermittelt. Die Freisetzung des Wirkstoffes aus den polymeren Trägersystemen wurde auf diese Weise über 14 Tage verfolgt.

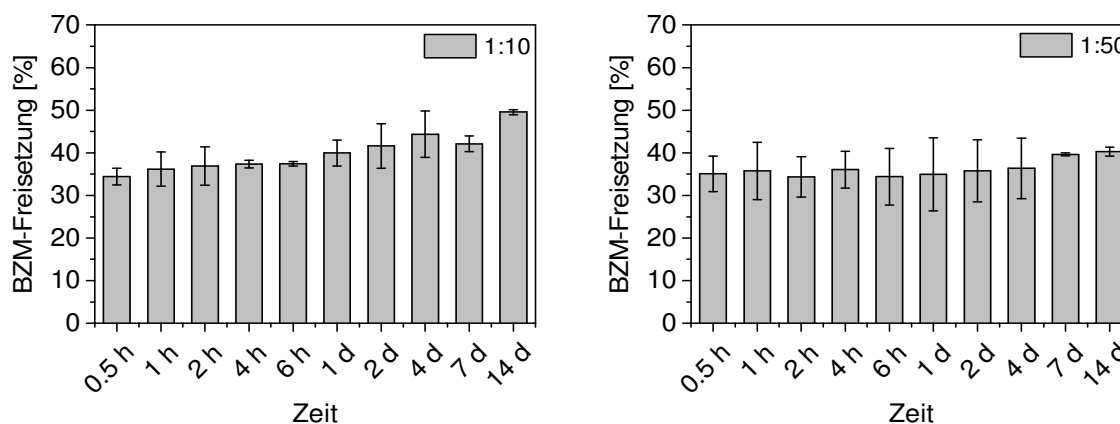


Abbildung 4.52: Additive **BZM**-Freisetzung aus dem **PEI(25)-Mal B/BZM**-Komplex nach Beladung von **PEI(25)-Mal B** mit **BZM** im Verhältnis 1:10 und 1:50.

In **Abbildung 4.52** ist die Freisetzung des **BZM** aus **PEI(25)-Mal B** dargestellt. Unabhängig vom verwendeten **BZM**-Überschuss bei der Komplexbildung wird das **BZM** aus beiden **PEI(25)-Mal B/BZM**-Komplexen schnell freigesetzt. Nach 30 Minuten befinden sich bereits ca. 35 % des komplexierten Wirkstoffes in der PBS-Lösung. Bei dem **PEI(25)-Mal B/BZM** (1:10)-Komplex steigt die Freisetzungsrates innerhalb der 14 Tage auf 51 % an. Durch die Verdünnung der **PEI(25)-Mal B/BZM**-Stammlösung mit PBS-Lösung nach jeder Entnahme der Komplexlösung stellt sich ein neues Gleichgewicht in der PBS-Lösung ein. Dabei wird das Gleichgewicht mit jeder Verdünnung mehr auf die Seite der freigesetzten **BZM**-Moleküle verschoben. Bei insgesamt sieben komplexierten **BZM**-Molekülen pro **PEI(25)-Mal B/BZM**-

Komplex werden demnach bereits nach 30 Minuten drei **BZM**-Moleküle aus diesem Komplex freigesetzt. Nach 14 Tagen erhöht sich die Freisetzungsrage lediglich auf vier **BZM**-Moleküle. Dieser schwache Verdünnungseffekt ist bei dem **PEI(25)-Mal B/BZM**-Komplex (1:50) aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht zu erkennen. Trotz des hohen Komplexierungsgrades werden hier nur acht bis neun der 23 komplexierten **BZM**-Moleküle innerhalb der 14 Tage freigesetzt.

Im Gegensatz zu den **PEI(25)-Mal B/BZM**-Komplexen konnte aus den **PEI(5)-PGlu-346/BZM**- und **PEI(5)-PGlu-346-Mal/BZM**-Komplexen keine Freisetzung des Wirkstoffes beobachtet werden. Die glutaminsäuremodifizierten Copolymere komplexieren im Vergleich zu **PEI(25)-Mal B** wesentlich weniger **BZM** in reinem Wasser. Bei dem molaren Verhältnis von 1:10 werden nur zwei bis drei **BZM**-Moleküle und bei dem molaren Verhältnis von 1:50 nur 10 **BZM**-Moleküle in den glutaminsäuremodifizierten Copolymeren komplexiert. Trotz der Verdünnung der Copolymer/**BZM**-Stammlösungen mit PBS-Lösung nach jeder Entnahme der Komplexlösung ist die freigesetzte Menge an **BZM** in PBS-Lösung wahrscheinlich so gering, dass diese mit der UV/Vis-Spektroskopie nicht nachweisbar ist.

Der Nachweis der Wirkstofffreisetzung aus den Polyelektrolytkomplexen war mit dieser Methode nicht durchführbar. Die Auswertung der Absorptionsspektren der Permeate ergab eine signifikante Abnahme der freigesetzten **BZM**-Moleküle über 14 Tage. Es ist anzunehmen, dass die Polyelektrolytkomplexe durch das Gefriertrocknen zerstört worden. Dadurch liegen die vermeintlichen **PEK/BZM**-Komplexe beim anschließenden Lösen in PBS-Lösung nicht mehr in der gleichen nanopartikulären Form vor, wie vor dem Gefriertrocknen in reinem Wasser.

4.4 Komplexierungs- und Freisetungsverhalten von Bortezomib im Calciumphosphatzement

Die Komplexierungen von Bortezomib mit den Copolymeren und Polyelektrolytkomplexen in wässriger Lösung ergaben eine hinreichend hohe Wirkstoffaufnahme in die Kern-Schale-Architekturen. Dadurch konnten die beladenen Trägersysteme schließlich für die eigentlich vorgesehene Anwendung in den von der Firma InnoTERE GmbH (Radebeul, Deutschland) bereitgestellten Calciumphosphatzement Biocement 1.0 eingemischt werden.

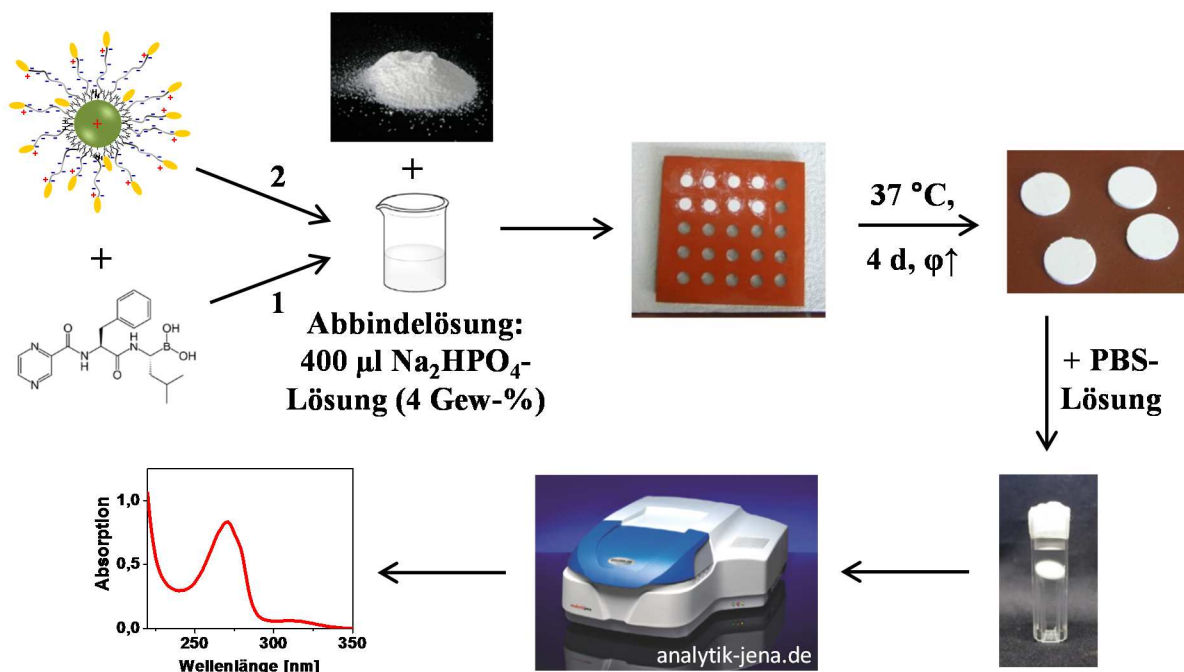


Abbildung 4.53: Schematische Darstellung der Herstellung der mit **BZM** und Trägersystem beladenen Calciumphosphatzemente, Bestimmung der Menge an freigesetztem **BZM** mit UV/Vis-Spektroskopie.

Für die Herstellung der CPC-Plättchen (**Abbildung 4.53**) wurden die entsprechenden Mengen an Copolymer bzw. PEK und **BZM** in einer Dinatriumhydrogenphosphatlösung (4 Gew.-% Na_2HPO_4 , im Weiteren als Abbindelösung bezeichnet) gelöst und mit dem CPC vermischt. Im Gegensatz zu den Freisetzungsvorsuchen in wässriger Lösung (**Kapitel 4.3.5**) werden die beladenen Copolymer/**BZM**- bzw. PEK/**BZM**-Komplexe nach der Wirkstoffkomplexierung nicht von den freien **BZM**-Molekülen abgetrennt. Somit befindet sich in dem CPC auch nicht komplexierter Wirkstoff. Anschließend erfolgte das Ausstreichen der homogenen Paste in die Löcher einer vorgefertigten Silikonmatrize. Die getrockneten Zementplättchen wurden in UV-Küvetten mit PBS-Lösung gegeben und UV/Vis-spektroskopisch untersucht. Die Ermittlung der **BZM**-Freisetzungsrates erfolgte dann im abgeschlossenen System über 14 Tage.

Freisetzungsmechanismen

Wie in **Kapitel 2.4** beschrieben ist die Freisetzung des Wirkstoffes ohne zusätzliches Trägersystem ein hauptsächlich diffusionskontrollierter Prozess. Durch die zusätzliche Beladung der CPC mit Copolymer/**BZM**- bzw. PEK/**BZM**-Komplexen kann die Diffusion des Wirkstoffes aus dem CPC über folgende Wege stattfinden (**Abbildung 4.54**):

Die freien, vom polymeren Trägersystem nicht komplexierten Wirkstoffmoleküle diffundieren durch die mit PBS-Lösung durchdrungenen Poren aus dem CPC-Zement (**1**). Da die Diffusion nur durch die CPC-Poren behindert wird, ist dies der schnellste

Freisetzungsweg. Diese Freisetzung hat zur Folge, dass sich im CPC ein neues Gleichgewicht zwischen den freien und den in den polymeren Trägern komplexierten Wirkstoffmolekülen einstellt und somit Wirkstoff aus den Trägersystemen freigesetzt wird (2). Diese nun freien Wirkstoffmoleküle diffundieren ebenfalls durch die Poren aus dem CPC. Neben den freien **BZM**-Molekülen können zudem auch die noch teilweise beladenen polymeren Trägersysteme aus dem Zement freigesetzt werden (3). Einerseits kann bei ausreichender Porengröße eine Diffusion durch die Poren wie bei den **BZM**-Molekülen erfolgen. Andererseits kann eine Freisetzung der Copolymer/**BZM**- bzw. PEK/**BZM**-Komplexe durch passiven Abbau der CPC-Matrix stattfinden. Bei dem verwendeten Biocement 1.0 handelt es sich jedoch um einen schwerlöslichen Apatizement. Somit ist die Freisetzung durch Auflösen des Zementes in PBS-Lösung in den hier beschriebenen Freisetzungsversuchen nicht relevant.

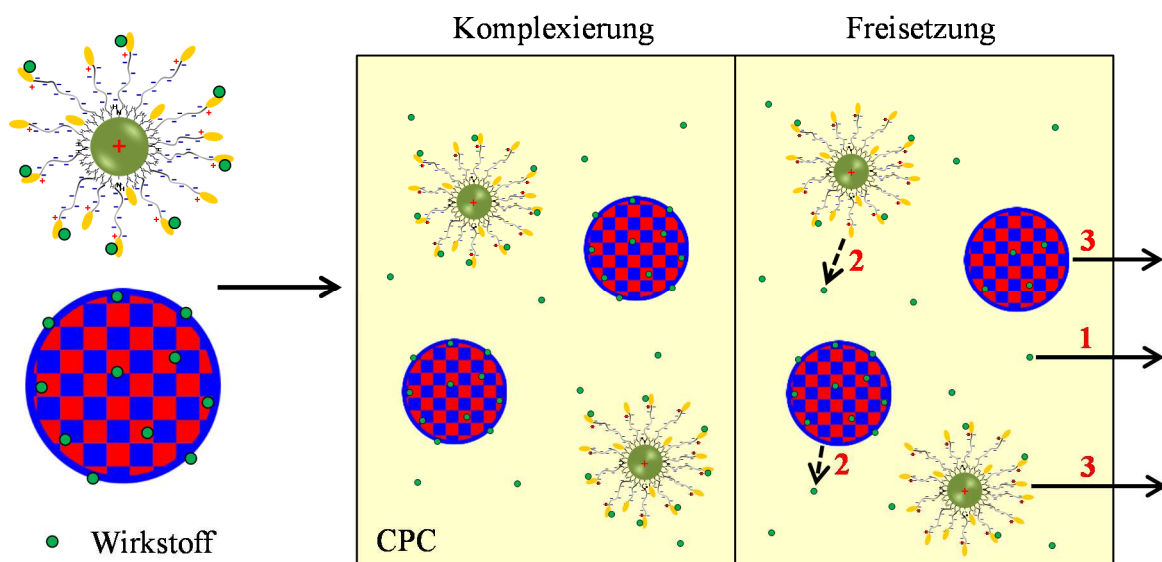


Abbildung 4.54: Schematische Darstellung der Komplexierung/Freisetzung des Wirkstoffes und der Copolymer/Wirkstoff- bzw. PEK/Wirkstoff-Komplexe in/aus CPC am Beispiel von PEI(5)-PGlu-346-Mal und PEK 1.1-B.

4.4.1 Freisetzung BZM, Copolymer und PEK aus CPC

Freisetzung BZM

Die diffusionskontrollierte Freisetzung des reinen Wirkstoffes aus der CaP-Phase wurde mit den **BZM**-Konzentrationen 50 $\mu\text{g/g}$ CPC und 100 $\mu\text{g/g}$ CPC überprüft. **Abbildung 4.55** zeigt ein verzögertes Freisetzungsprofil für beide **BZM**-Konzentrationen. Dabei diffundieren nach 1 h weniger als 20 % des Wirkstoffes aus dem Zement in die PBS-Lösung. Allerdings steigt die Freisetzungsrates innerhalb eines Tages stark an, so dass nach 24 Stunden bereits mehr als 60 % **BZM** aus dem CPC freigesetzt wurden. Danach ändert sich die Freisetzungsrates bis

nach 14 Tagen nur noch wenig. Für die geringe Konzentration (50 µg **BZM**/g CPC) scheint die Wirkstofffreisetzung im Vergleich zur höheren Konzentration mit 100 µg **BZM**/g CPC etwas höher zu sein. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass das Einmischen des CPC in die AbbindeLösung mit dem gelösten Wirkstoff manuell erfolgt. Somit kann keine optimale homogene Vermischung des Wirkstoffes im Zement garantiert werden. Besonders bei der Konzentration von 50 µg **BZM**/g CPC spiegelt sich dieser Effekt in der Standardabweichung über alle 8 Zementplättchen wieder. Deshalb kann man bei beiden verwendeten Konzentrationen von einer gleichen Freisetzungsrates des **BZM** über 14 Tage ausgehen.

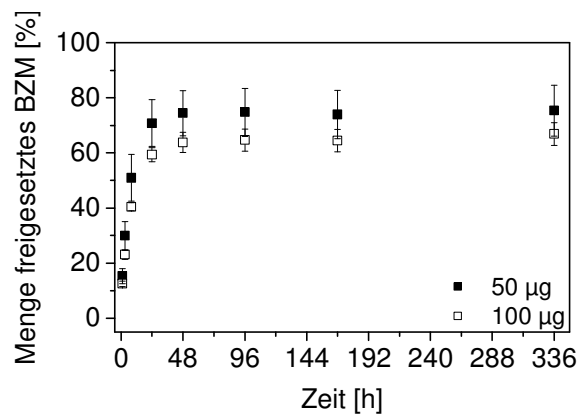


Abbildung 4.55: Freisetzung von Bortezomib (50 µg/g CPC und 100 µg/g CPC) aus dem CPC.

Freisetzung Copolymere und PEKs

Aufgrund der schnellen Freisetzung großer Mengen **BZM** aus dem CPC ist der **BZM**/CPC-Komposit kein geeignetes Hybridmaterial für eine dosierte Langzeittherapie bei Multiplem Myelom. Bestreben dieser Arbeit ist die Erzeugung einer effektiven verzögerten Freisetzung des Wirkstoffes aus dem Calciumphosphatzement durch die Integration eines zusätzlichen polymeren Trägersystems im Vergleich zum reinen CPC-Trägersystem. Damit dieses Ziel erfüllt werden kann, ist eine stark verzögerte Freisetzung der Copolymere bzw. der Polyelektrolytkomplexe selbst aus dem CPC notwendig, um den Wirkstoff dosierter und über einen längeren Zeitraum freisetzen zu können. Um diese Anforderung zu überprüfen wurden zunächst die Rhodamin B-markierten Copolymere und PEKs in den CPC eingearbeitet und auf ihre Freisetzung hin untersucht. Dabei wurden die Rh-Copolymere und **Rh-PEK 0.9** in den Konzentrationen 100 µg/g CPC, 200 µg/g CPC und 400 µg/g CPC verwendet. Die **Rh-PEK 1.1-A** und **Rh-PEK 1.1-B** wurden in den Konzentrationen 100 µg/g CPC und 200 µg/g CPC in den Zement eingearbeitet. Bei den Konzentrationen der PEKs ist wiederum die Konzentration des Rh-Copolymer im PEK gemeint.

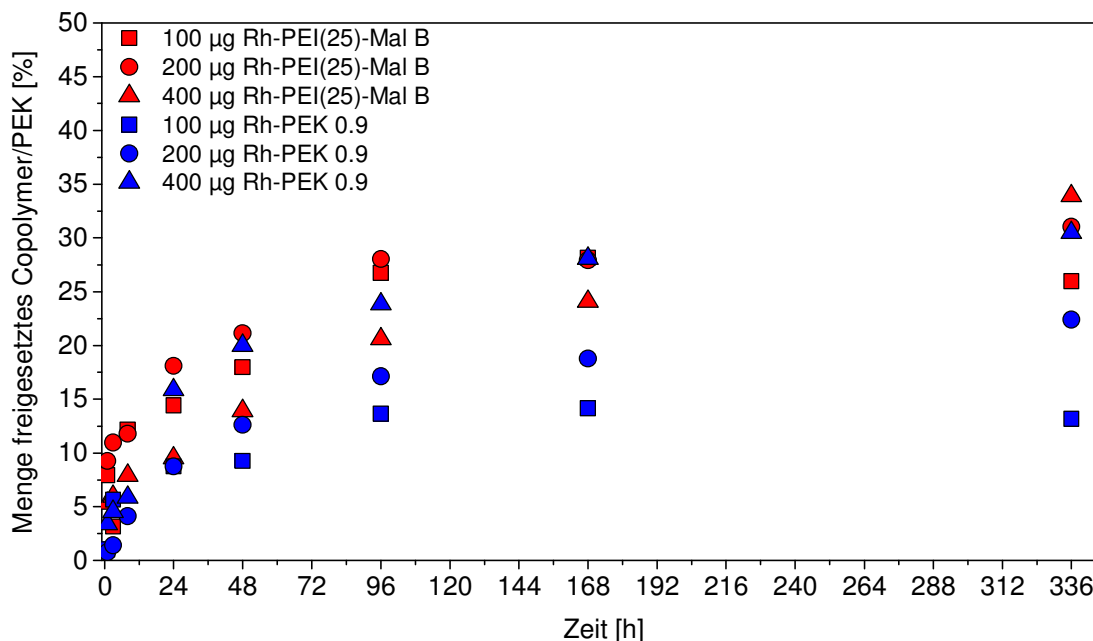


Abbildung 4.56: Verzögerte Freisetzung von Rhodamin B-markiertem **PEI(25)-Mal B** aus **PEI(25)-Mal B/CPC**- und **PEK 0.9/CPC**-Kompositen.

In **Abbildung 4.56** ist die Freisetzung von **Rh-PEI(25)-Mal B** und **PEK 0.9** graphisch dargestellt. Aufgrund der Übersichtlichkeit werden die Standardabweichungen im Graphen nicht gezeigt, sondern nur in **Tabelle 7.11** aufgelistet. Allgemein geht aus dem Graphen hervor, dass das **PEI(25)-Mal B** sowohl aus dem **PEI(25)-Mal B/CPC**- als auch aus dem **PEK 0.9/CPC**-Komposit stark verzögert freigesetzt wird. Dabei zeigt sich jedoch bei **PEI(25)-Mal B/CPC** ein anderes Freisetzungsprofil für das Copolymer als bei **PEK 0.9/CPC**. Innerhalb der ersten 7 Tage wird aus dem Hybridmaterial mit nur 100 µg bzw. 200 µg Copolymer/g CPC mehr **PEI(25)-Mal B** freigesetzt als aus dem **PEI(25)-Mal B/CPC**-Komposit mit 400 µg Copolymer/g CPC. Danach scheint für die **PEI(25)-Mal B/CPC**-Komposite mit 100 µg bzw. 200 µg Copolymer/g CPC das Gleichgewicht zwischen freigesetztem und im CPC eingeschlossenen Copolymer erreicht zu sein. Nach 14 Tagen ergibt sich für das Hybridmaterial eine Freisetzungsrate von 26 % bei 100 µg **PEI(25)-Mal B/g CPC** bzw. 31 % bei 200 µg **PEI(25)-Mal B/g CPC**. Das Freisetzungsprofil des **PEI(25)-Mal B/CPC**-Komposits mit 400 µg Copolymer/g CPC hingegen zeigt innerhalb von 14 Tagen eine stetige Zunahme der freigesetzten Copolymermenge im abgeschlossenen System. Innerhalb der ersten 24 Stunden werden lediglich 10 % des Copolymers aus der CaP-Phase freigesetzt, nach 14 Tagen sind es jedoch insgesamt 34 %. Im Gegensatz zu den Copolymer/CPC-Kompositen zeigen die **PEK 0.9/CPC**-Komposite einheitliche Freisetzungsprofile. Dabei wird im Vergleich zum reinen Copolymer aus dem Hybridmaterial mit 100 µg **PEK 0.9/g CPC** bzw. 200 µg **PEK 0.9/g CPC** nur etwa halb so viel **PEI(25)-Mal B**

freigesetzt. Die Freisetzungsrates von **PEI(25)-Mal B** aus dem **PEK 0.9/CPC**-Komposit mit 400 µg Copolymer im **PEK 0.9** gleicht etwa der der reinen Copolymeren. Trotz dessen, dass **PEI(25)-Mal B** mit Zulfosulfat keine stabilen und einheitlichen Polyelektrolytkomplexe in reinem Wasser bildet, sind die kleineren und größeren Aggregate im CPC besser integriert, als die einzelnen Copolymer-Makromoleküle. Eine Diffusion durch die Poren aus dem CPC ist durch die Größe der Aggregate eingeschränkt, wodurch eine geringere Freisetzung von **PEK 0.9** im Vergleich zu **PEI(25)-Mal B** beobachtet wird.

Bei den Copolymeren **Rh-PEI(5)-PGlu-346** und **Rh-PEI(5)-PGlu-346-Mal** und den zugehörigen **Rh-PEK 1.1-A** und **Rh-PEK 1.1-B** konnte keine Freisetzung der Rhodamin-B-markierten Copolymeren aus dem CPC nachgewiesen werden. An den negativ geladenen Carboxylgruppen der Glutaminsäureeinheiten können Calciumionen komplexieren und bilden somit den Kristallisationskeim für die Ausfällung von Hydroxylapatit.^{258, 259} Dadurch werden die glutaminsäuremodifizierten Copolymeren im Gegensatz zu den **PEI(25)-Mal B**-Strukturen in die HA-Struktur integriert und können durch Diffusion allein nicht freigesetzt werden.

Salzeinfluss auf die Polyelektrolytkomplexe

Die Zugabe von Salzen zu Polyelektrolytkomplexlösungen kann in Abhängigkeit von der Stärke der Polyelektrolyte einerseits zu einer erhöhten Aggregation und letztendlich zur Ausfällung der PEKs führen. Andererseits quellen PEKs, welche aus Polyanionen mit Carboxylgruppen bestehen, durch die zusätzlichen Ionen und lösen sich bei der Überschreitung einer kritischen Salzkonzentration auf.²⁵⁷ Da das Abbinden des Zements mit einer 4 Gew.-%igen Na₂HPO₄-Lösung erfolgte, wurde der Einfluss des Salzes auf die in reinem Wasser stabilen **PEK 1.1-A** und **PEK 1.1-B** mit DLS untersucht. Dafür wurden sowohl die PEK-Stammlösungen (1 g/l Copolymer im PEK) mit festem Na₂HPO₄ versetzt, als auch salzhaltige PEK-Lösungen mit den Copolymerkonzentrationen 0,297 g/l, 0,119 g/l und 0,0595 g/l entsprechend der Komplexierungsversuche hergestellt. Durch die Zugabe von festem Na₂HPO₄ wurden die trüben **PEK 1.1-A**- und **PEK 1.1-B**-Lösungen klar. Bei den unverdünnten **PEK 1.1-A**- und **PEK 1.1-B**-Stammlösungen wurde sogar eine Ausfällung der PEKs beobachtet. Diese Aggregation bis hin zur Ausfällung bestätigen auch die DLS-Messungen. Innerhalb von 3 h bilden sich in den salzhaltigen PEK-Stammlösungen Komplexe mit einem hydrodynamischen Durchmesser größer 1000 nm (**Abbildung 7.30** und **4.57**).

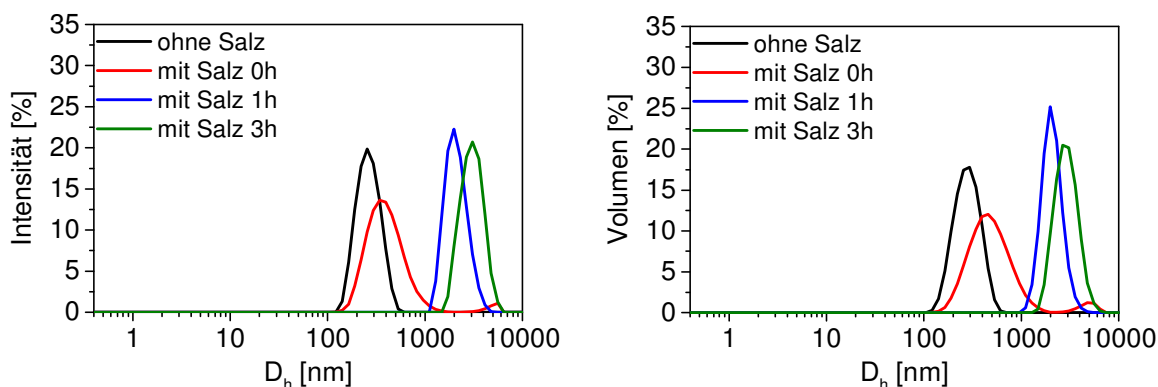


Abbildung 4.57: DLS-Verteilungskurven von **PEK 1.1-B** (1 g/l) mit Na_2HPO_4 (4 Gew.-%) nach 0 h, 3 h und 20 h.

Im Vergleich zu den **PEK 1.1-A**-Lösungen ohne Salz (**Abbildung 7.25**) bilden sich in den verdünnten **PEK 1.1-A**-Lösungen durch die Salzzugabe doppelt so große Komplexe mit einem hydrodynamischen Durchmesser von etwa 400 nm (**Abbildung 7.31 bis 7.33**). Die Intensitätskurven sind breiter und mit zunehmender Verdünnung wird der Anteil an großen Komplexen mit einem $D_h > 1000$ nm größer. Die breiten Intensitätsverteilungskurven der verdünnten **PEK 1.1-B**-Lösungen zeigen hingegen sowohl eine Aggregation der PEKs zu größeren Komplexen, als auch eine Auflösung der PEKs zu kleineren Komplexen mit einem $D_h < 100$ nm (**Abbildung 4.58, 7.34 und 7.35**).

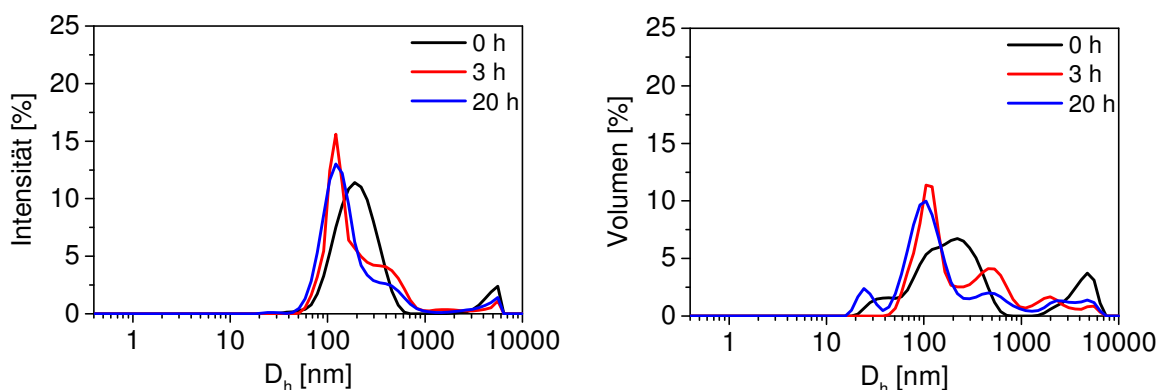


Abbildung 4.58: DLS-Verteilungskurven von **PEK 1.1-B** (0,119 g/l) mit Na_2HPO_4 (4 Gew.-%) nach 0 h, 3 h und 20 h.

4.4.2 Freisetzung BZM aus BZM/Copolymer/CPC und BZM/PEK/CPC

Die dynamischen Lichtstreuversuche haben gezeigt, dass sich zum einen mit **PEI(25)-Mal B** und Zellosulfat kein stabiler **PEK 0.9** in reinem Wasser bildet und zum anderen die stabilen **PEK 1.1-A** und **PEK 1.1-B** direkt nach der Zugabe von Na_2HPO_4 (4 Gew.-%) hauptsächlich zu größeren Komplexen aggregieren. Trotz dessen wurden neben den reinen

Copolymeren auch die PEKs mit **BZM** beladen, in den CPC eingearbeitet und die freigesetzte Menge **BZM** aus den **BZM/PEK/CPC**-Kompositen bestimmt.

Für die Untersuchung der **BZM**-Freisetzung aus den **BZM/Copolymer/CPC**- und **BZM/PEK/CPC**-Trägersystemen wurden zunächst unterschiedlich konzentrierte **BZM**- und Copolymer- bzw. PEK-Stammlösungen hergestellt und miteinander vermischt. Nach einer Komplexierungszeit von einer Stunde wurde mit den **BZM/Copolymer**- bzw. **BZM/PEK**-Lösungen der Zement angemischt, in die Silikonmatrix ausgestrichen und ausgehärtet. Die mit UV/Vis-Spektroskopie bestimmten Freisetzungsraten von **BZM** aus den **BZM/Copolymer/CPC**- und **BZM/PEK/CPC**-Kompositen wurden mit dem Kontrollsystem **BZM/CPC** verglichen.

PEI(25)-Mal B und PEK 0.9

Für die Freisetzungsbefragungen von **BZM** aus den **BZM/PEI(25)-Mal B/CPC**- und **BZM/PEK 0.9/CPC**-Kompositen wurden folgende Kombinationen an **BZM**- zu **PEI(25)-Mal B**- bzw. **PEK 0.9**-Konzentrationen getestet: 50 µg/100 µg, 50 µg/200 µg, 100 µg/100 µg und 100 µg/200 µg. Für das **PEK 0.9** gilt wiederum, dass die angegebene Konzentration der **PEI(25)-Mal B**-Konzentration im **PEK 0.9** entspricht.

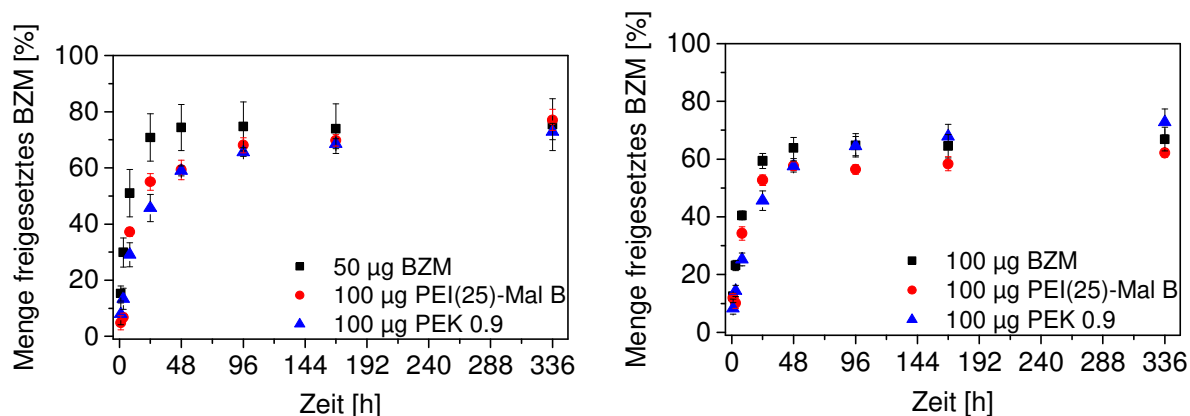


Abbildung 4.59: Freisetzungsraten von **BZM** aus **BZM/PEI(25)-Mal B/CPC** und **BZM/PEK 0.9/CPC** innerhalb von 14 Tagen, links – Konzentrationspaar 50 µg/100 µg, rechts – Konzentrationspaar 100 µg/100 µg.

Bei allen **BZM/PEI(25)-Mal B/CPC**- und **BZM/PEK 0.9/CPC**-Kompositen wurde bei allen Konzentrationspaaren ein verzögertes Freisetzungsprofil ermittelt (**Abbildung 4.59** und **7.36**). Dabei ist die Menge an freigesetztem **BZM** aus den **BZM/PEI(25)-Mal B/CPC** bei allen Konzentrationspaaren etwas geringer im Vergleich zum reinen **BZM** in CPC. Trotzdem werden innerhalb der ersten 24 h mehr als 50 % des Wirkstoffes aus den **BZM/PEI(25)-Mal B/CPC**-Kompositen freigesetzt. Zunächst können die nicht vom Copolymer

komplexierten freien **BZM**-Moleküle aus dem CPC diffundieren. Dadurch stellt sich im CPC ein neues Gleichgewicht zwischen den im Copolymer komplexierten **BZM** und freiem Wirkstoff ein, wodurch das aus dem Copolymer freigesetzte **BZM** wiederum aus dem CPC diffundieren kann. Weiterhin diffundiert das wirkstoffbeladene Copolymer ebenfalls durch die Poren aus dem CPC. Dabei gilt, dass freies **BZM** und **BZM**-beladenes Copolymer nahe am Rand der CPC-Tablette zuerst freigesetzt werden. Freies **BZM** und wirkstoffbeladenes Copolymer im Inneren der CPC-Tablette werden aufgrund des längeren Diffusionsweges erst zu einem späteren Zeitpunkt freigesetzt. Aufgrund dieser Freisetzungsmechanismen wird im Vergleich zum reinen **BZM/CPC**-Komposit nur geringfügig weniger Wirkstoff aus den **BZM/PEI(25)-Mal B/CPC**-Kompositen freigesetzt. Beim Vergleich der **BZM/PEI(25)-Mal B/CPC**-Komposite der Konzentrationspaare 50 µg/100 µg und 50 µg/200 µg (**Abbildung 4.60**) fällt auf, dass innerhalb der ersten 48 h aus dem Komposit mit 200 µg **PEI(25)-Mal B** mehr **BZM** aus dem CPC freigesetzt wird, als aus dem Komposit mit 100 µg Copolymer. Einerseits sollte die doppelte Menge an **PEI(25)-Mal B** bei gleicher Menge **BZM** (50 µg) insgesamt mehr Wirkstoff komplexieren. Somit liegt weniger freies **BZM** im CPC vor, das schnell aus der CaP-Phase diffundieren kann. Andererseits befindet sich nahe am Rand der CPC-Tablette, im Gegensatz zu dem Komposit mit nur 100 µg Copolymer, auch die doppelte Menge an wirkstoffbeladenem **PEI(25)-Mal B**, die zusammen mit dem freien **BZM** schnell aus dem CPC freigesetzt wird. Dadurch ergibt sich für **BZM/PEI(25)-Mal B/CPC**-Komposit mit dem Konzentrationspaar 50 µg/200 µg eine etwas höhere Freisetzungsrates, als bei dem Komposit mit dem Konzentrationspaar 50 µg **BZM**/100 µg **PEI(25)-Mal B**.

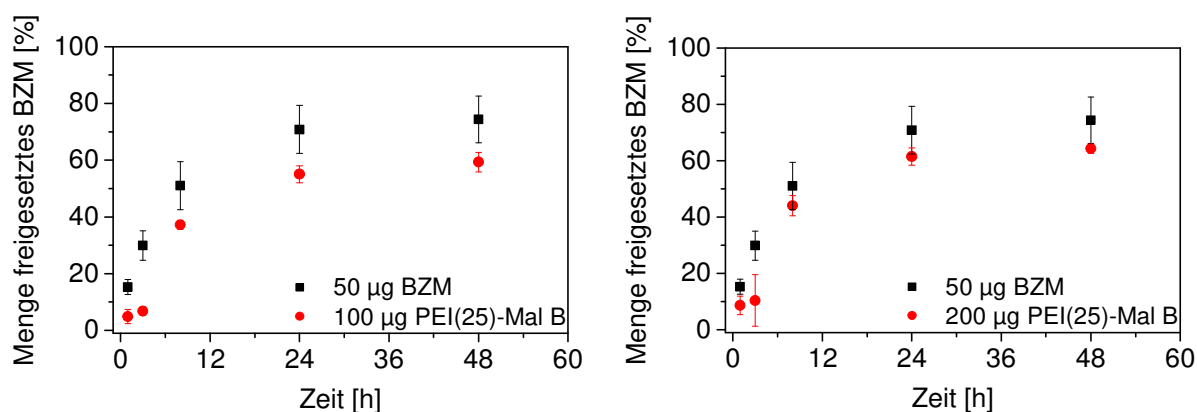


Abbildung 4.60: Freisetzungsrates von **BZM** aus **BZM/PEI(25)-Mal B/CPC** innerhalb von 48 h, links – Konzentrationspaar 50 µg/100 µg, rechts – Konzentrationspaar 50 µg/200 µg.

Dieser Unterschied konnte bei den **BZM/PEI(25)-Mal B/CPC**-Kompositen der Konzentrationspaare 100 µg/100 µg und 100 µg/200 µg nicht festgestellt werden. Hier ist die

Konzentration an freiem **BZM** gegenüber dem im Copolymer komplexierten **BZM** so hoch, dass die Freisetzungsrates innerhalb der ersten 48 h hauptsächlich durch die Diffusion des freien **BZM** aus dem CPC bestimmt wird.

Bei den **BZM/PEK 0.9/CPC**-Kompositen mit den Konzentrationspaaren 50 µg/100 µg und 100 µg/100 µg (**Abbildung 4.59**) wird innerhalb der ersten 24 h etwas weniger **BZM** (46 %) im Vergleich zu den **BZM/PEI(25)-Mal B/CPC**-Kompositen freigesetzt. Diese geringere Freisetzung liegt darin begründet, dass die mit wirkstoffbeladenen kleineren und größeren Aggregate des **PEK 0.9** nicht so leicht durch die Poren diffundieren können, wie die einzelnen Copolymer-Makromoleküle. Bei den **BZM/PEK 0.9/CPC**-Kompositen mit den Konzentrationspaaren 50 µg/200 µg und 100 µg/200 µg (**Abbildung 4.61**) wird hingegen innerhalb der ersten 8 h mehr Wirkstoff freigesetzt, als aus dem **BZM/CPC**-Kontrollsystem. Bei diesen Kompositen wurde die doppelte Menge **PEK 0.9** im CPC eingemischt. Dadurch befinden sich am CPC-Tablettenrand mehr beladene PEKs, als in den **BZM/PEK 0.9/CPC**-Kompositen mit nur 100 µg Copolymer im PEK. Diese wirkstoffbeladenen **PEK 0.9** diffundieren zunächst zusammen mit dem freien **BZM** schnell aus der CaP-Phase. Erst nach 8 h verringert sich die Freisetzung von **BZM** aus dem **BZM/PEK 0.9/CPC**-Komposit mit 50 µg BZM und 200 µg Copolymer im **PEK 0.9**. Bei dem **BZM/PEK 0.9/CPC**-Komposit mit dem Konzentrationspaar 100 µg/200 µg gleicht sich die Freisetzungsrates aufgrund der doppelten Menge Wirkstoff nach 8 h der des **BZM/CPC**-Komposites an.

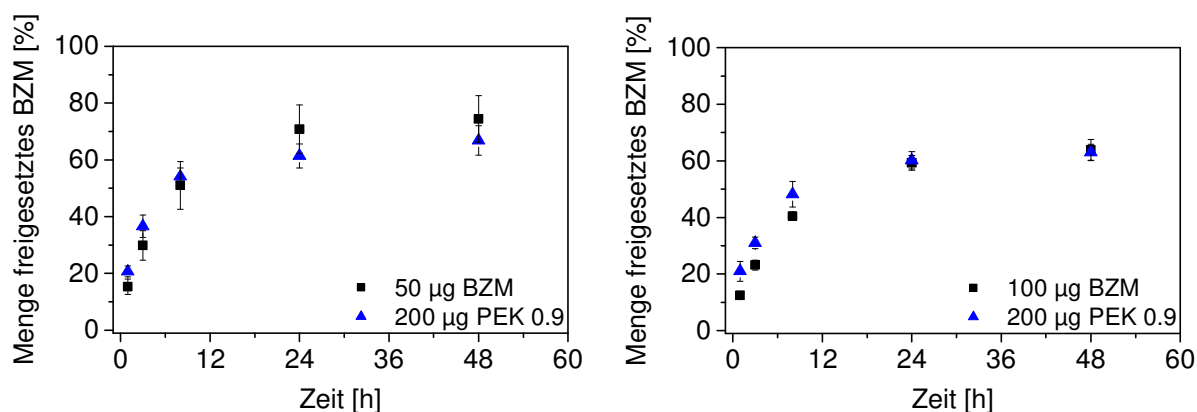


Abbildung 4.61: Freisetzungsrates von **BZM** aus **BZM/PEK 0.9/CPC** innerhalb von 48 h, links – Konzentrationspaar 50 µg/200 µg, rechts – Konzentrationspaar 100 µg/200 µg.

PEI(5)-PGlu-346(-Mal) und PEK 1.1-A(B)

Die Bestimmung der Freisetzungsrates von **BZM** aus den **BZM/PEI(5)-PGlu-346/CPC**- bzw. **BZM/PEI(5)-PGlu-346-Mal/CPC**- und **BZM/PEK 1.1-A/CPC**- bzw. **BZM/PEK 1.1-B/CPC**-Kompositen erfolgte mit den Kombinationen an **BZM**- zu Copolymer- bzw. PEK-

Konzentrationen 50 µg/100 µg, 50 µg/200 µg und 100 µg/100 µg, wobei die PEK-Konzentration der Konzentration des Copolymers im PEK entspricht.

Bei den **BZM/PEI(5)-PGlu-346/CPC**-Kompositen mit den Konzentrationspaaren 50 µg/100 µg und 50 µg/200 µg (**Abbildung 4.62**) sind deutlich verzögerte Freisetzungprofile im Vergleich zum **BZM/CPC**-Kontrollsystem erkennbar. Jedoch werden innerhalb der ersten 24 h, wie bei den **BZM/PEI(25)-Mal-B/CPC**-Hybridmaterialien, bereits etwa 55 % des Wirkstoffes freigesetzt. Zwar wird das wirkstoffbeladene **PEI(5)-PGlu-346** selbst nicht aus dem Zement freigesetzt, allerdings komplexiert es im Vergleich zu **PEI(25)-Mal B** weniger **BZM** in der Copolymerstruktur. Dadurch befindet sich im Zement mehr freier Wirkstoff, der schnell aus der CaP-Phase diffundieren kann. Im Gegensatz zu den **BZM/PEI(25)-Mal-B/CPC**-Kompositen wird innerhalb des Messzeitraumes jedoch nicht das Freisetzungsniveau des **BZM/CPC**-Komposites (75 %) erreicht. Nach 14 Tagen beträgt die **BZM**-Freisetzung aus den Hybridmaterialien mit den Konzentrationspaaren 50 µg/100 µg und 50 µg/200 µg maximal 66 %. Der **BZM/PEK 1.1-A/CPC** zeigt gegenüber dem **BZM/PEI(5)-PGlu-346/CPC** keine bessere verzögerte Wirkstofffreisetzung beim Konzentrationspaar 50 µg/100 µg. Bei Verwendung der doppelten Menge **PEK 1.1-A** hingegen wird innerhalb der ersten 24 h weniger Wirkstoff aus dem Hybridmaterial freigesetzt, als bei dem Komposit mit dem reinen Copolymer. Die größere Menge aggregierter PEKs scheint zunächst die Diffusion der freien **BZM**-Moleküle durch die Porenstruktur zu behindern. Danach steigt die Freisetzungsrates jedoch weiter an und erreicht das Freisetzungsniveau des **BZM/CPC**-Komposites. Wahrscheinlich beeinflusst die in die Poren eindiffundierende PBS-Lösung weiter die PEK-Struktur (siehe **Kapitel 4.4.1 Salzeinfluss auf die Polyelektrolytkomplexe**), so dass der Wirkstoff nach einer gewissen Zeit leichter aus dem Komposit herausdiffundieren kann.

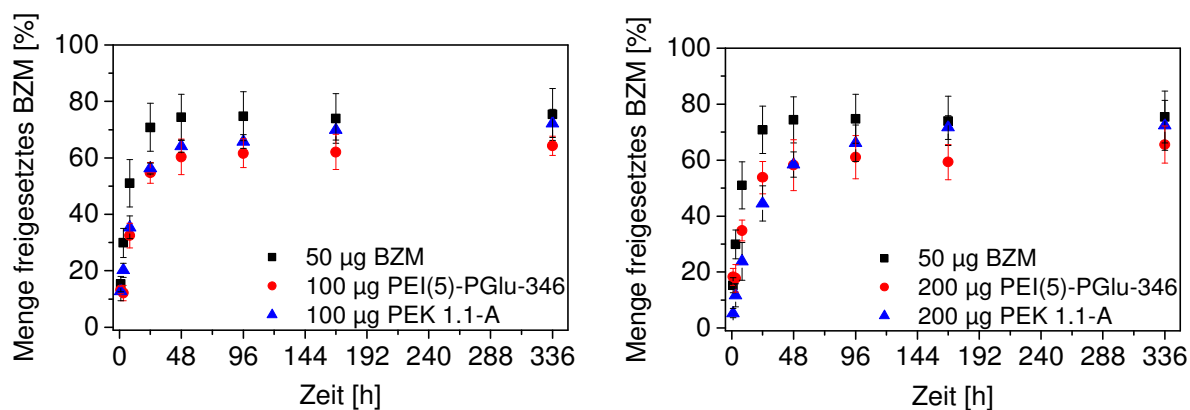


Abbildung 4.62: Freisetzungsrates von **BZM** aus **BZM/PEI(5)-PGlu-346/CPC** und **BZM/PEK 1.1-A/CPC** innerhalb von 14 Tagen, links – Konzentrationspaar 50 µg/100 µg, rechts – Konzentrationspaar 50 µg/200 µg.

Bei den Kompositen mit 100 μg **BZM** und 100 μg **PEI(5)-PGlu-346** bzw. **PEK 1.1-A** wurden keine signifikanten verzögerten Freisetzungprofile für **BZM** ermittelt (**Abbildung 7.37**). Aufgrund der geringen **BZM**-Komplexierung in das Copolymer bzw. in den PEK diffundiert die große Menge an freiem Wirkstoff schnell aus dem CPC. Die PEK-Aggregate behindern die Diffusion des **BZM** dabei nur wenig.

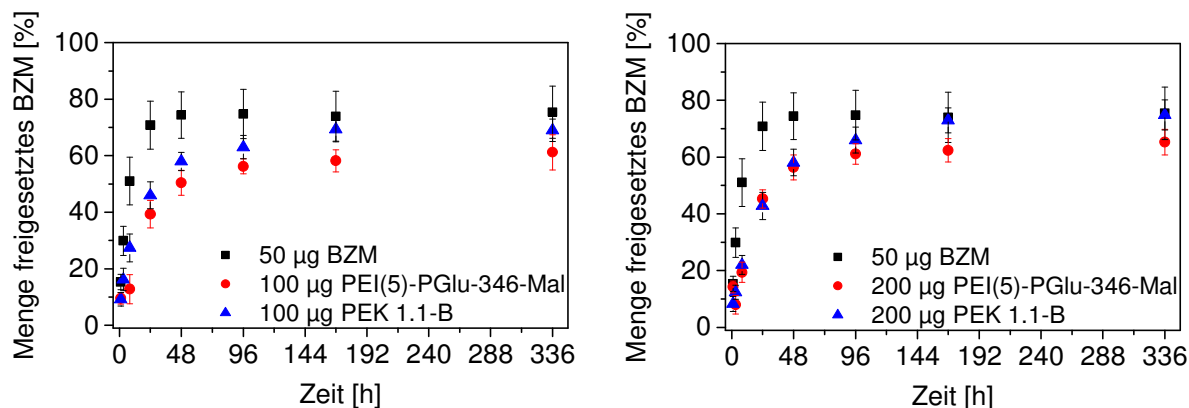


Abbildung 4.63: Freisetzungsrate von **BZM** aus **BZM/PEI(5)-PGlu-346-Mal/CPC** und **BZM/PEK 1.1-B/CPC** innerhalb von 14 Tagen, links – Konzentrationspaar 50 μg /100 μg , rechts – Konzentrationspaar 50 μg /200 μg .

Die **BZM**-Freisetzungprofile der **BZM/PEI(5)-PGlu-346-Mal/CPC**- und **BZM/PEK 1.1-B/CPC**-Komposite mit den Konzentrationspaaren 50 μg /200 μg (**Abbildung 4.63 rechts**) und 100 μg /100 μg (**Abbildung 7.36**) zeigen gegenüber denen der **BZM/PEI(5)-PGlu-346/CPC**- und **BZM/PEK 1.1-A/CPC**-Hybridmaterialien keine deutlich verbesserte, verzögerte Wirkstofffreisetzung. Zwar wird aus dem Komposit mit 50 μg **BZM** und 200 μg **PEI(5)-PGlu-346-Mal** innerhalb der ersten 24 h weniger **BZM** (45 %) als in dem vergleichbaren Komposit mit **PEI(5)-PGlu-346** (54 %) freigesetzt. Nach 48 h ist die Freisetzungsrate jedoch mit 56 % annähernd der des **BZM/PEI(5)-PGlu-346/CPC**-Hybridmaterials (58 %) gleich. Ein deutlicher Unterschied ist jedoch bei dem Konzentrationspaar 50 μg /100 μg erkennbar (**Abbildung 4.63 links**). Innerhalb des ersten Tages werden aus dem Komposit mit **PEI(5)-PGlu-346-Mal** nur 39 % des **BZM** freigesetzt. Erst nach einer Woche beträgt die **BZM**-Freisetzungsrate 58 %, während bei allen anderen Kompositen unabhängig von der Konzentration an **BZM** und Copolymer bereits nach 48 h etwa 60 % des Wirkstoffes aus dem CPC freigesetzt werden. Nach 14 Tagen beträgt die **BZM**-Gesamtfreisetzung aus dem **BZM/PEI(5)-PGlu-346-Mal/CPC**-Komposit (50 μg /100 μg) 61 %. Im Vergleich zum **BZM/CPC**-Kontrollsystem werden somit innerhalb des Messzeitraumes von zwei Wochen insgesamt 14 % mehr **BZM** im Hybridmaterial zurückgehalten. **PEI(5)-PGlu-346-Mal** wird, wie **PEI(5)-PGlu-346**, nicht nachweisbar aus dem Zement freigesetzt. Durch die Maltose

kann das Copolymer etwas mehr Wirkstoff in seine Struktur aufnehmen, als das glutaminsäuremodifizierte **PEI(5)** ohne Maltose. Bei 50 µg **BZM** und 100 µg **PEI(5)-PGlu-346-Mal** wird genügend Wirkstoff vom Copolymer komplexiert, so dass im Vergleich zum Konzentrationspaar 100 µg/100 µg weniger freies **BZM** zunächst aus dem CPC rausdiffundiert. Dabei wird die **BZM**-Diffusion durch ständige Komplexierungs- und Freisetzungsvorgänge mit den in der Kristallstruktur verankerten Copolymeren behindert. Im Vergleich zu **PEI(5)-PGlu-346** scheinen diese Wechselwirkungen durch die angebundene Maltose stärker zu sein. Da nur halb so viel Copolymer wie bei dem Komposit mit 50 µg **BZM** und 200 µg **PEI(5)-PGlu-346-Mal** im Zement eingemischt wurde, befindet sich auch wesentlich weniger Copolymer am Tablettenrand. Dadurch wird durch die Gleichgewichtseinstellung zwischen komplexiertem und freiem **BZM** ebenfalls weniger Wirkstoff freigesetzt. Die **BZM/PEK 1.1-B/CPC**-Hybridmaterialien zeigen gegenüber den Kompositen mit dem Copolymer kein verbessertes Freisetzungsprofil. Wie bei den **BZM/PEK 1.1-A/CPC**-Kompositen scheint die hohe Salzkonzentration im Zement Einfluss auf die PEK-Struktur zu nehmen, wodurch die **BZM**-Freisetzung erleichtert wird.

4.5 Kooperationsarbeiten

Im Rahmen des DFG-Projektes des Sonderforschungsbereiches Transregio 79 wurden die hier dargestellten Copolymere in verschiedenen Arbeitsgruppen u. a. hinsichtlich ihrer Anwendung im Calciumphosphatzement und ihrer Toxizität gegenüber verschiedenen mesenchymalen Stammzelllinien untersucht. In diesem Kapitel sollen einige relevante Ergebnisse der Kooperationsarbeiten kurz dargestellt werden.

Einfluss auf mechanische Eigenschaften des CPC

Die Verarbeitbarkeit und die resultierende Stabilität nach dem Aushärten im Knochendefekt sind essentiell für die klinische Anwendung eines potentiellen Calciumphosphatzementes. Der Zusatz von weiteren Substanzen in den Zement kann den Abbindeprozess und die daraus resultierenden mechanischen Eigenschaften des resultierenden CPC stark beeinflussen. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Michael Gelinsky wurden am Zentrum für Translationale Knochen, Gelenk- und Weichgewebeforschung (TU Dresden) der Einfluss der Copolymere **PEI(25)-Mal B**, **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** auf verschiedene mechanische Eigenschaften des Biocement 1.0 hin untersucht.

Das Einmischen von **PEI(25)-Mal B** in den Zement führte zu einer geringen Abnahme der Abbindezeit und der Offenporigkeit des Zementes mit zunehmender Copolymerkonzentration

(0,65 mg und 3,25 mg pro 1 g Zement). SEM-Untersuchungen zeigten jedoch, dass sowohl der reine Zement als auch der Zement mit einer **PEI(25)-Mal B**-Konzentration von 0,65 mg/g CPC eine in hohem Maße strukturierte mikroporöse Oberfläche aufweisen. Erst das Einmischen von sehr hohen Copolymerkonzentrationen (3,25 mg/g CPC) führt zu einer weniger ausgeprägten Apatitkristallstruktur. Der Einfluss der glutaminsäuremodifizierten Copolymere auf die Porosität des CPC wurde bisher noch nicht getestet. Da für die Wirkstofffreisetzungen jedoch nur geringe Mengen ($> 400 \mu\text{g/g}$ CPC) eingesetzt wurden, kann man davon ausgehen, dass auch durch diese Copolymere keine signifikante Änderung der porösen Struktur stattfindet. Weiterhin wurde der Einfluss der Copolymere auf die Widerstandsfähigkeit des Zementes bei einwirkenden Druckkräften hin untersucht (**Abbildung 4.64**). Dabei wurde jedoch nur eine geringe Reduktion der Druckfestigkeit ermittelt. Die Untersuchungen ergaben somit keine signifikanten Änderungen der mechanischen Eigenschaften des Biocement 1.0 durch das Einmischen der Copolymere.

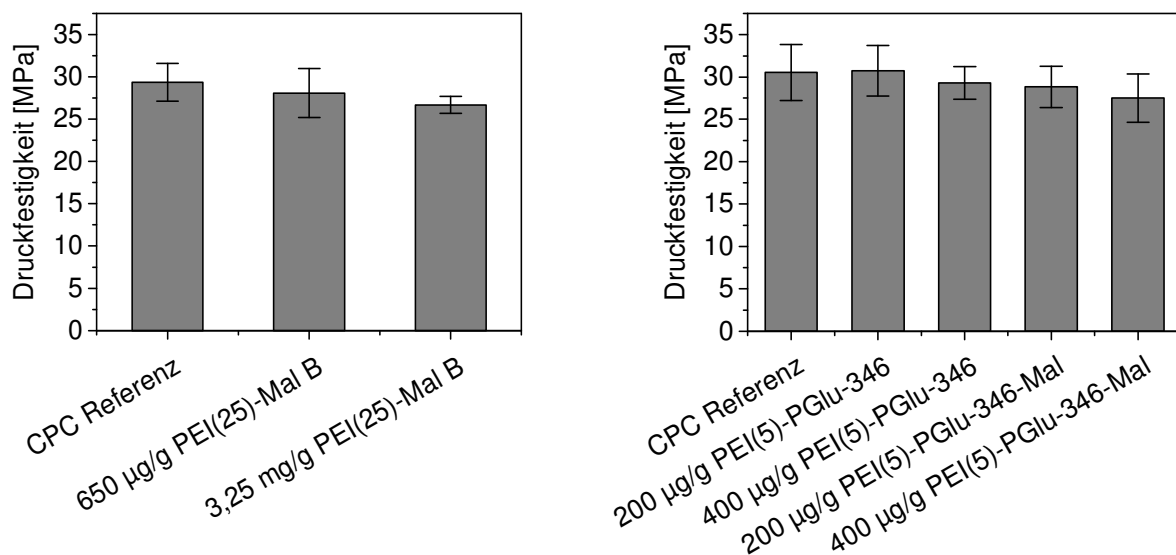


Abbildung 4.64: Copolymerkonzentrationsabhängige Druckfestigkeit des Biocement 1.0 im Vergleich zum reinen Zement.

Einfluss auf Zellen

Ein wesentlicher Faktor für den Einsatz der Copolymere im Knochenzement ist die Toxizität gegenüber knochenspezifischen Zellen. Polyethylenimine wirken aufgrund der kationischen Ladung toxisch auf Zellen, wobei die Toxizität allgemein mit kleiner werdender Molmasse abnimmt. Neben den hämatopoetischen Stammzellen enthält das menschliche Knochenmark mesenchymale Stammzellen (MSC). Diese MSC sind multipotent, d. h. sie können sich zu spezialisierten Zellen, wie zum Beispiel zu Knorpel-, Knochen- oder Fettzellen, entwickeln. Die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Katrin Susanne Lips hat an der Justus-Liebig-

Universität Gießen den Einfluss der maltosemodifizierten Polyethylenimine **PEI(5)-Mal B** und **PEI(25)-Mal B** auf MSC untersucht. Dabei wurden mesenchymale Stammzellen aus dem Knochen-Bohrmehl (reaming debris, rdMSC) vier verschiedener Spender verwendet. Während **PEI(5)-Mal B** in den Konzentrationen 0,05 mg/ml und 1 mg/ml nach einer Inkubationszeit von 24 h und 72 h keinen signifikanten toxischen Effekt auf die rdMSC zeigte, stieg bei **PEI(25)-Mal B** die Toxizität insbesondere nach 72 h bei der höheren Konzentration von 1 mg/ml stark an. Diese Toxizität wurde durch Lichtmikroskopiebilder bestätigt, die bereits nach 72 h deutliche Anzeichen von Zellschäden durch **PEI(25)-Mal B** und eine verringerte Zellzahl gegenüber der Referenz zeigen. TEM-Aufnahmen zeigen zudem das Anhaften der **PEI(25)-Mal B**-Partikel an der Zellwand nach einer Stunde und die signifikante Schädigung der Mitochondrien nach nur einem Tag (**Abbildung 4.65**).

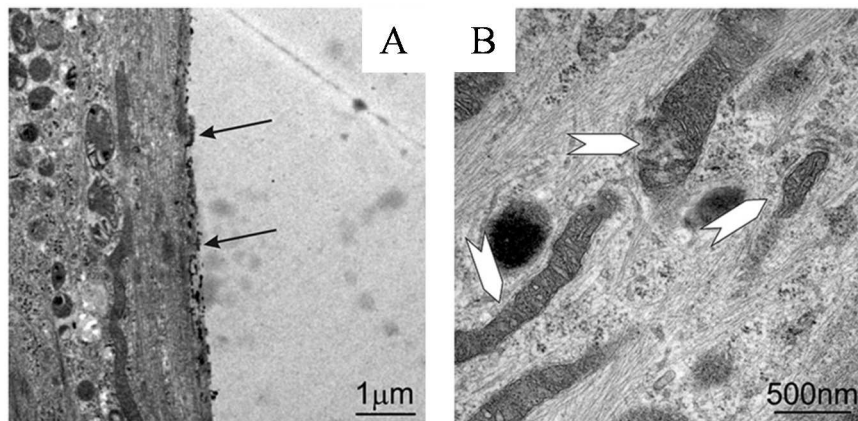


Abbildung 4.65: TEM-Aufnahmen von rdMSC mit **PEI(25)-Mal B**. A – Akkumulation von **PEI(25)-Mal B**-Nanopartikeln an der Zellwand nach 60 min. B – Schädigung der Mitochondrien nach 1 d.

Da die potentiellen Wirkstoffträger jedoch für eine Langzeittherapie angewendet werden sollen, wurde der Einfluss auf die Proliferation der rdMSC über 28 Tage untersucht. Dabei wurde für beide Copolymere speziell bei der Konzentration von 1 mg/ml nach einer Inkubationszeit von 21 und 28 Tagen eine signifikante Hemmung der Zellvermehrung festgestellt. Lichtmikroskopiebilder nach 21 Tagen Inkubationszeit belegen insbesondere durch **PEI(25)-Mal B** verursachte Zellschäden und freie Zellfragmente, während die rdMSC durch **PEI(5)-Mal B** nur geringfügig geschädigt wurden. Eine Hemmung der Proliferation wurde auch bei der osteogenen Differenzierung der rdMSC zu Osteoblasten ermittelt. Aufgrund der toxischen Wirkung des **PEI(25)-Mal B** speziell bei 1 mg/ml wurden für die Differenzierungsversuche die Copolymere in den Konzentrationen 1 µg/ml, 20 µg/ml und 50 µg/ml verwendet. Zwar konnte für alle Copolymerkonzentrationen eine osteogene

Differenzierung der rdMSC festgestellt werden, allerdings ist auch hier die Proliferation der differenzierten Zellen im Vergleich zur Referenz ohne Copolymer gehemmt. Die genaue Durchführung der *in vitro* Zellexperimente und die ausführliche Diskussion der resultierenden Ergebnisse wurden im Journal of Nanobiotechnology veröffentlicht.²⁶⁰ Parallel zu den *in vitro* Untersuchungen an der Justus-Liebig-Universität Gießen wurde der Einfluss von **PEI(25)-Mal B** auf humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Gelinsky überprüft. Die Auswertung der Zellzahl osteogen stimulierter hMSC (**Abbildung 4.66**) zeigt nach einer Woche Inkubationszeit keinen Unterschied in der Proliferation gegenüber der Kontrolle ohne Copolymer. Nach 14 Tagen ist jedoch eine deutliche Hemmung der Osteoblasten-Proliferation bei einer **PEI(25)-Mal B**-Konzentration > 66 µg/ml ersichtlich. Lediglich bei der geringsten Copolymerkonzentration wurde die Zellvermehrung durch **PEI(25)-Mal B** nicht negativ beeinflusst.

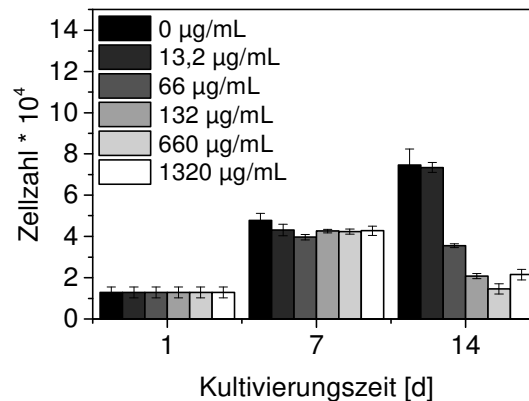


Abbildung 4.66: Proliferation von osteogen stimulierten hMSC nach 7 d und 14 d bei unterschiedlichen **PEI(25)-Mal B**-Konzentrationen.

Aus den Zellversuchen mit den beiden maltosemodifizierten Copolymeren geht eindeutig hervor, dass das **PEI(25)-Mal B** mit dem größeren PEI-Kern einen erheblichen toxischen und proliferationshemmenden Einfluss auf MSC besitzt. Bei **PEI(5)-Mal B** sind diese Einflüsse aufgrund des kleineren PEI-Kerns wesentlich reduzierter. Die Ergebnisse bestärken somit die Auswahl des kleinen PEI-Kerns für die Generierung der glutaminsäuremodifizierten Copolymere **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal**.

Weiterhin wurde am Zentrum für Translationale Knochen, Gelenk- und Weichgewebeforschung der Einfluss der glutaminsäuremodifizierten Copolymere auf osteogen stimulierte hMSC untersucht. Als Marker wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP), eines für Osteoblasten spezifisches Enzym, herangezogen. Sowohl mit **PEI(5)-PGlu-346** als auch mit **PEI(5)-PGlu-346-Mal** proliferieren die Zellen in gleichem Maße wie die Kontrolle ohne Copolymer (**Abbildung 4.67**). Lediglich bei **PEI(5)-PGlu-346-**

Mal wurde ein leichter Rückgang der Zellzahl bei hohen Konzentrationen ($> 120 \mu\text{g/ml}$) festgestellt.

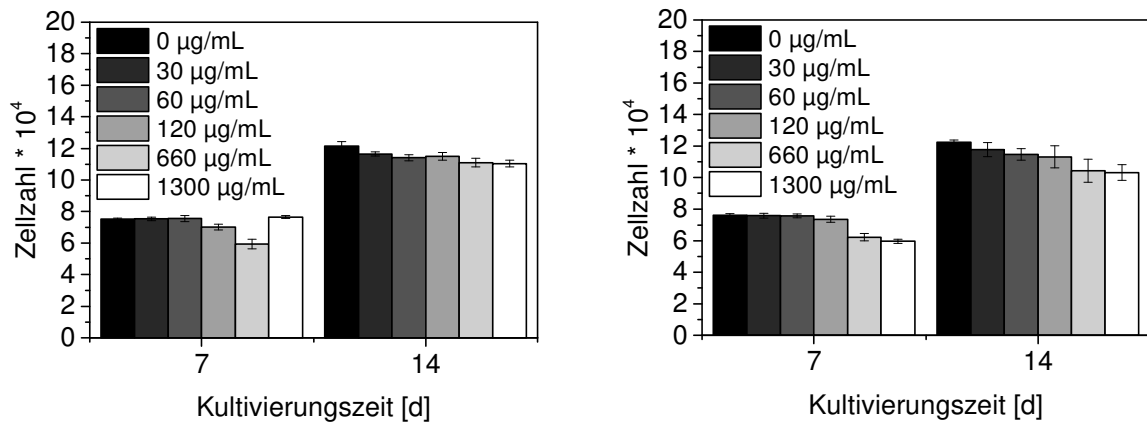


Abbildung 4.67: Proliferation von osteogen stimulierten hMSC nach 7 d und 14 d bei unterschiedlichen Copolymer-Konzentrationen, links - **PEI(5)-PGlu-346**, rechts - **PEI(5)-PGlu-346-Mal**.

Zudem war bei beiden Copolymeren eine osteogene Differenzierung der hMSC zu Osteoblasten nachweisbar (**Abbildung 4.68**). Hohe Konzentrationen von **PEI(5)-PGlu-346** wirken jedoch insbesondere bei längerer Inkubationszeit (14 Tage) hemmend auf die Bildung der Osteoblasten. Ein interessantes Ergebnis zeigte hingegen die osteogene Differenzierung der hMSC in Anwesenheit von **PEI(5)-PGlu-346-Mal**. Unabhängig von der **PEI(5)-PGlu-346-Mal**-Konzentration differenzierten die Stammzellen in gleichem Maße wie die Kontrolle ohne Copolymer. Copolymerkonzentrationen von 60 $\mu\text{g/ml}$ und 120 $\mu\text{g/ml}$ scheinen die Entwicklung der Stammzellen zu knochenbildenden Osteoblasten sogar zu fördern. Für die Verifizierung dieser vielversprechenden Ergebnisse sind weitere Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Gelinsky geplant.

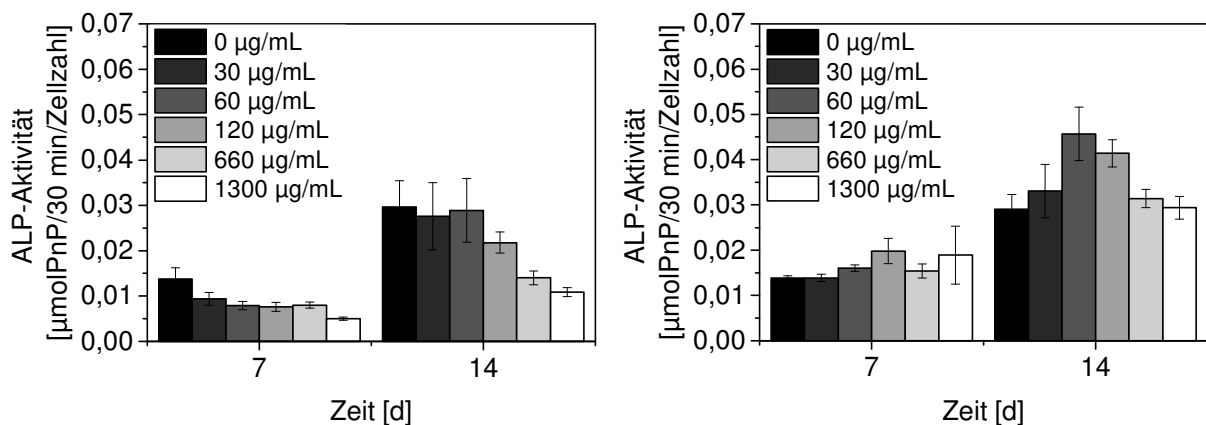


Abbildung 4.68: Osteogene Differenzierung der hMSC zu Osteoblasten in Anwesenheit von **PEI(5)-PGlu-346** (links) und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** (rechts) nach 7 d und 14 d.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Für die Behandlung poröser Knochen gibt es eine Vielzahl an zugelassener Knochenersatzmaterialien, wobei stets an der Verbesserung bereits vorhandener KEM und der Erforschung und Entwicklung neuer Materialien gearbeitet wird. Ein erfolgversprechendes Konzept ist die Optimierung von KEM durch Kombination verschiedener Materialien, um die Eigenschaften der einzelnen Materialien miteinander zu vereinen. Diese Arbeit beschreibt eine Möglichkeit der Kombination von Calciumphosphatzementen mit neuartigen polymeren Drug-Delivery-Systemen für eine kontrollierte, verzögerte Wirkstofffreisetzung aus dem Komposit in den erkrankten Knochen. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Synthese eines biokompatiblen Drug-Delivery-Systems als Träger für relevante Wirkstoffe zur Knochenregeneration bei multiplem Myelom. Als Basispolymer diente dafür das kommerziell erhältliche hochverzweigte Polyethylenimin. Aufgrund der zunehmenden Toxizität mit steigender Anzahl an positiv geladenen Aminogruppen in der Peripherie des globularen Makromoleküls wurde ein hochverzweigtes Polyethylenimin mit geringer Molmasse ($M_w = 5000 \text{ g/mol}$, **PEI(5)**) gewählt. An den linearen und terminalen Aminogruppen des **PEI(5)** erfolgte eine Modifizierung mit biokompatiblen Aminosäure- und Oligosaccharideinheiten.

Synthese der Drug-Delivery-Systeme

Auf der Grundlage der Arbeiten von Tian et al.²⁰⁴⁻²⁰⁶ wurden im ersten Schritt die *N*-Carboxyanhydride aus benzylgeschützter Glutaminsäure (**γ -BLG-NCA**) bzw. Asparaginsäure (**β -BLA-NCA**) und Triphosgen nach der Fuchs-Farthing-Methode^{227, 228} synthetisiert. Die Umsetzung der NCA-Monomere mit dem **PEI(5)**-Makroinitiator erfolgte im zweiten Schritt mit den molaren Monomereinheitenverhältnissen EI:BLG von 1:0,5, 1:2, 1:3 und 1:4 und EI:BLA von 1:4. Für die Generierung wasserlöslicher Drug-Delivery-Systeme wurden anschließend die Benzylschutzgruppen an **PEI(5)-PBLG-346** und **PEI(5)-PBLA-346** hydrolytisch abgespalten. Die NMR-spektroskopische Analyse von **PEI(5)-PBLG-346**, **PEI(5)-PBLA-346**, **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PAsp-346** bestätigte die Annahme, dass die NCA-Polymerisation nicht an allen primären und sekundären Aminogruppen des **PEI(5)** initiiert wurde. Weiterhin wurden für die Copolymere signifikant kleinere Molmassen im Vergleich zu den theoretisch erwarteten Molmassen ermittelt. Daraus folgt die Annahme, dass die NCA-Polymerisation nicht nur durch primäre und sekundäre, sondern auch durch tertiäre Aminogruppen initiiert wurde. Die dabei generierten Peptidketten sind jedoch nicht am **PEI(5)** gebunden. Über die reduktive Aminierung erfolgte danach die Anbindung der

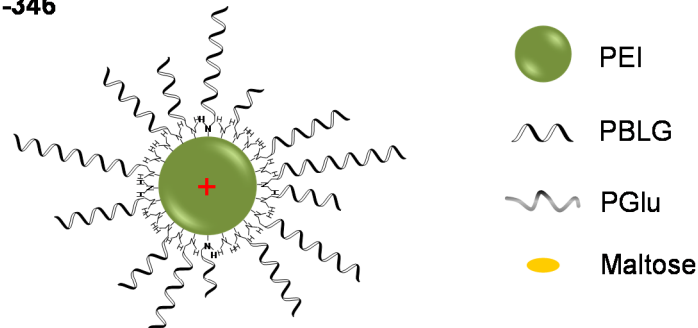
Oligosaccharideinheiten. Sowohl Maltose als auch Laktose wurden im zehnfachen Überschuss eingesetzt, um eine möglichst dichte zweite Schale am Copolymer zu erzeugen. Die ^{13}C -NMR-spektroskopischen Untersuchungen an **PEI(5)-PGlu-346-Mal** belegten sowohl eine Modifizierung der endständigen primären Aminogruppen der Peptidketten als auch der noch freien primären Aminogruppen des PEI-Kerns mit Maltose. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Kern-Schale-Architekturen eine binäre Doppelschalenstruktur besitzen.

Strukturelle Eigenschaften der glutaminsäuremodifizierten Drug-Delivery-Systeme

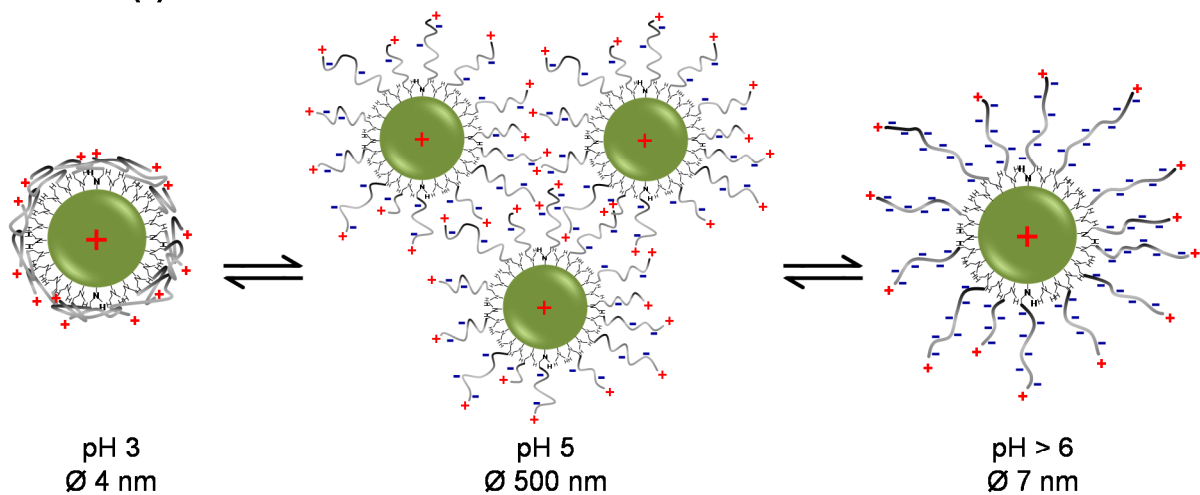
Mit FT-IR-spektroskopischen Untersuchungen wurde die Ausbildung einer helikalen Sekundärstruktur der benzylgeschützten Peptidketten an den **PEI(5)-PBLG-346**-Copolymeren nachgewiesen (**Abbildung 5.1 A**). Entsprechend der Literatur²³⁷ bestehen die PBLG-Ketten somit mindestens aus 18 Glutaminsäureeinheiten. In Abhängigkeit vom pH-Wert und dem daraus resultierenden Ladungszustand nach der Hydrolyse wurde die typische Konformationsumwandlung (Helix-Coil-Übergang) der Polyglutaminsäureketten erwartet. Für die Polyglutaminsäureketten von **PEI(5)-PGlu-346** wurde jedoch eine ungeordnete Sekundärstruktur sowohl bei niedrigem als auch bei hohem pH-Wert festgestellt (**Abbildung 5.1 B**). Weiterhin liegen die Makromoleküle unterhalb des isoelektrischen Punktes von 3,9 bei pH = 3 in wässriger Lösung mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 4 nm isoliert vor. Im Gegensatz dazu bildet **PEI(5)-PGlu-346** oberhalb des isoelektrischen Punktes bei pH = 5 größere Aggregate mit einem D_h um 500 nm. Bei weiterer Erhöhung des pH-Wertes auf > 6 sind wiederum nur isolierte Makromoleküle nachweisbar. Diese sind mit einem hydrodynamischen Durchmesser um 7 nm allerdings doppelt so groß wie bei pH = 3. Die Ausbildung der ungeordneten Sekundärstruktur der Peptidketten sowohl im protonierten (pH = 3) als auch im teilweise (pH = 5) und vollständig (pH > 6) deprotonierten Zustand sowie das Vorliegen als isolierte Makromoleküle bzw. Aggregate hängt im Wesentlichen von den Wechselwirkungen der Peptidschale und des PEI-Kerns ab. Aufgrund der offenen Schalenstruktur können die vorwiegend protonierten Carboxylgruppen bei pH = 3 über H-Brücken mit den Aminogruppen des PEI interagieren. Es entsteht eine dichte Schalenstruktur am Kern, wodurch die Ausbildung der α -helikalen Konformation der PGlu-Ketten unterdrückt wird. Mit zunehmendem pH-Wert nimmt auch die Zahl der deprotonierten Carboxylgruppen in den Peptidketten zu. Aufgrund der repulsiven Kräfte zwischen den negativ geladenen Glutaminsäureeinheiten strecken sich die Peptidketten in die Peripherie. Diese ungeordnete Kettenstreckung ist bei vollständiger Deprotonierung am größten. Bei einem pH-Wert um 5 können die teilweise deprotonierten Carboxylgruppen

eines **PEI(5)-PGlu-346**-Makromoleküls mit den protonierten, endständigen Aminogruppen der Peptidketten eines weiteren Copolymeren ionisch wechselwirken. Die resultierenden Aggregate werden dabei zusätzlich durch intermolekulare H-Brücken stabilisiert.

A - PEI(5)-PBLG-346



B - PEI(5)-PGlu-346



C - PEI(5)-PGlu-346-Mal

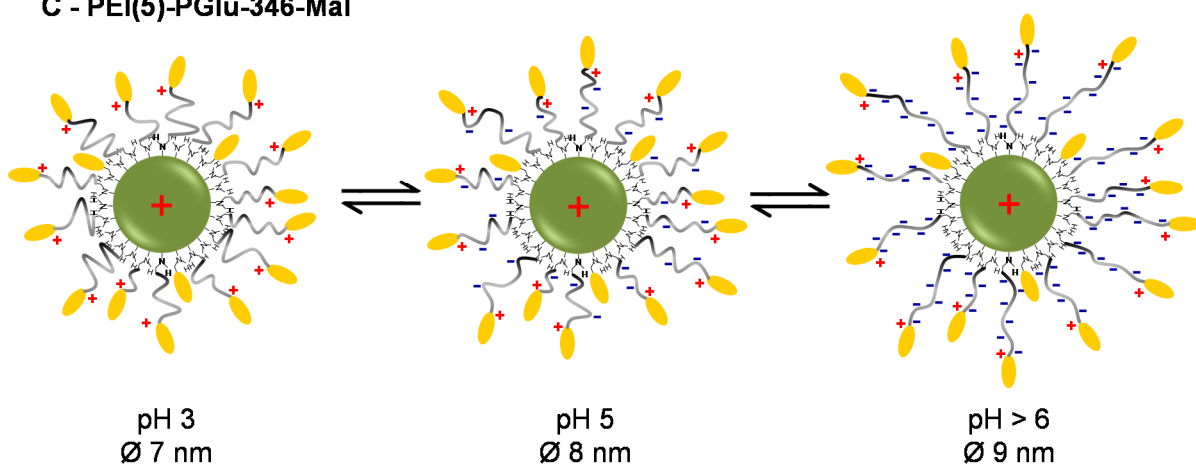


Abbildung 5.1: schematische Darstellung der DDS in Abhängigkeit vom Ladungszustand. A – offene Schalenstruktur des **PEI(5)-PBLG-346** mit α -helikalen PBLG-Ketten, B – pH-abhängiges Verhalten von **PEI(5)-PGlu-346** in wässriger Lösung, C - pH-abhängiges Verhalten von **PEI(5)-PGlu-346-Mal** in wässriger Lösung mit binärer Doppelschale.

Im Vergleich zu der **PEI(5)-PGlu-346**-Struktur übt der positiv geladene PEI-Kern selbst keinen signifikanten Einfluss auf die Sekundärstruktur der Polyglutaminsäureketten im **PEI(5)-PGlu-346-Mal**-Copolymer aus (**Abbildung 5.1 C**). Die Ausbildung der α -Helices bei $\text{pH} = 3$ wird hauptsächlich durch intramolekulare H-Brücken zwischen den PGlu-Ketten und den am PEI-Kern gebundenen Maltoseeinheiten verhindert. Aufgrund der zunehmenden Deprotonierung der Carboxylgruppen mit zunehmendem pH-Wert wirken repulsive ionische Kräfte innerhalb der Ketten. Folglich strecken sich die Ketten in die Peripherie, wodurch sich der hydrodynamische Radius der **PEI(5)-PGlu-346-Mal**-Struktur von 7 nm ($\text{pH} = 3$) auf 9 nm ($\text{pH} > 6$) vergrößert. Weiterhin schirmen die Maltoseeinheiten die Ladungen der Makromoleküle in dem Maße ab, dass eine Aggregation um $\text{pH} = 5$, wie bei **PEI(5)-PGlu-346**, nicht festgestellt werden konnte. Somit liegt **PEI(5)-PGlu-346-Mal** unabhängig vom pH-Wert als isoliertes Makromolekül vor, wobei die PGlu-Ketten eine ungeordnete Sekundärstruktur aufweisen.

Im Gegensatz zu den bisher bekannten glutaminsäuremodifizierten Kern-Schale-Architekturen^{194-196, 198, 203-206, 244, 261} wurde ein derartiges pH-abhängiges Verhalten der Kern-Schale-Architekturen in Lösung in der Literatur noch nicht beschrieben. Dabei wird die Copolymerstruktur durch ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken sowohl inter- als auch intramolekular entscheidend beeinflusst.

Wirkstoffkomplexierung in die Drug-Delivery-Systeme und die entsprechenden Polyelektrolytkomplexe

Zur Einschätzung der Kern-Schale-Architekturen als geeignete Drug-Delivery-Systeme wurde die Aufnahme des Proteasominhibitors Bortezomib in die reinen Copolymere **PEI(25)-Mal B**, **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** sowie die entsprechenden Polyelektrolytkomplexe untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Komplexierung des Wirkstoffes in die Copolymere sowohl in reinem Wasser als auch in PBS-Lösung zeitunabhängig erfolgte. Jedoch nimmt die Anzahl komplexierter **BZM**-Moleküle mit größerem Copolymer/**BZM**-Verhältnis von 1:10 über 1:25 hin zu 1:50 nicht linear zu. Ursache dafür sind hauptsächlich die zunehmenden sterischen Hinderungen zwischen den Wirkstoffmolekülen am Copolymer mit abnehmendem Copolymergehalt. Aufgrund der strukturellen Größenunterschiede und der Anzahl an Maltoseeinheiten ist **PEI(25)-Mal B** im Vergleich zu den glutaminsäuremodifizierten Copolymeren in der Lage wesentlich mehr Wirkstoff aufzunehmen. Bei einem molaren Verhältnis von 1:50 werden in PBS-Lösung in die **PEI(25)-Mal B**-Struktur etwa 20 **BZM**-Moleküle aufgenommen. Die glutaminsäuremodifizierten

Copolymere können hingegen im Mittel nur zehn (**PEI(5)-PGlu-346**) bzw. 15 **BZM**-Moleküle (**PEI(5)-PGlu-346-Mal**) komplexieren. Die Komplexierungskapazität der Polyelektrolytkomplexe **PEK 0.9** (**PEI(25)-Mal B**/Zellulosesulfat), **PEK 1.1-A** (**PEI(5)-PGlu-346**/Ethylendiamin-Zellulose) und **PEK 1.1-B** (**PEI(5)-PGlu-346-Mal**/Ethylendiamin-Zellulose) in reinem Wasser ist gleich der der Copolymere. Dabei nimmt **PEK 0.9** bei einem molaren Copolymer/**BZM**-Verhältnis von 1:50 maximal 20 Wirkstoffmoleküle auf. **PEK 1.1-A** und **PEK 1.1-B** komplexieren maximal die Hälfte an **BZM**. Trotz der großen Unterschiede in der Wirkstoffaufnahme waren alle Copolymere und Polyelektrolytkomplexe geeignet, um diese Trägersysteme auf das Freisetungsverhalten hin zu untersuchen.

Wirkstofffreisetzung aus dem Calciumphosphatzement

Um die Freisetzung des Wirkstoffes aus der Calciumphosphatphase beurteilen zu können, wurden zunächst die Freisetzungsprofile des reinen Wirkstoffes, der reinen Copolymere und der entsprechenden Polyelektrolytkomplexe überprüft. Aufgrund der geringen Größe (< 1 nm) können die **BZM**-Moleküle schnell durch die Poren aus dem CPC diffundieren. Dementsprechend werden bei einer Wirkstoffkonzentration von 50 µg/g bereits nach 24 Stunden mehr als 60 % des **BZM** diffusionskontrolliert freigesetzt. Die Freisetzungsraten von **PEI(25)-Mal B** und **PEK 0.9** sind im Vergleich zum **BZM** wesentlich geringer. Innerhalb des ersten Tages werden in Abhängigkeit von der **PEI(25)-Mal B**-Konzentration weniger als 20 % des Copolymers aus dem CPC freigesetzt. Ursache dafür ist die nanoskalige Dimension der Makromoleküle und Polyelektrolytkomplexe, welche die Diffusion durch die offenporige CaP-Phase erschwert. Für **PEI(5)-PGlu-346**, **PEI(5)-PGlu-346-Mal** und die zugehörigen **PEK 1.1-A** und **PEK 1.1-B** wurde keine Freisetzung aus dem CPC ermittelt. Wie aus der Literatur^{6, 7} bekannt, komplexieren die Glutaminsäureeinheiten Calciumionen und beeinflussen dadurch die Keimbildung und das Wachstum der CaP-Phase. Die Copolymerstrukturen werden somit in den CPC integriert und können nur durch Abbau des schwerlöslichen Zementes freigesetzt werden.

Ein wichtiger Aspekt bei der Betrachtung der Polyelektrolytkomplexe ist deren Stabilität in wässriger Lösung. Die dynamischen Lichtstreuversuche zeigten, dass **PEI(25)-Mal B** mit Zellulosesulfat bereits in reinem Wasser keinen stabilen Komplex bildet. Erst innerhalb von 20 Stunden aggregieren kleinere Partikel in Abhängigkeit von der Verdünnung der **PEK 0.9**-Lösung zu größeren Komplexen. Weiterhin wurde bei der Zugabe von Na₂HPO₄ (4 Gew.-%), entsprechend der Abbinde- und Ablösung des CPC, eine konzentrationsabhängige Aggregation der in reinem Wasser stabilen **PEK 1.1-A** und **PEK 1.1-B** bis hin zur Ausfällung beobachtet. Trotz

der Instabilität wiesen Polyelektrolytkomplexe in wässriger Lösung im Vergleich zu den isolierten Copolymeren größere Aggregate auf. Aus diesem Grund wurden sowohl **BZM/Copolymer/CPC**- als auch **BZM/PEK/CPC**-Komposite hergestellt und die Wirkstofffreisetzung untersucht.

Die Freisetzung des Wirkstoffes aus den Hybridmaterialien wurde über 14 Tage verfolgt. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen an **BZM** und Copolymer im Verhältnis 1:1, 1:2 und 1:4 eingesetzt. Im Vergleich zum reinen **BZM** wird der Wirkstoff aus dem Komposit mit 50 µg **BZM** und 100 µg **PEI(25)-Mal B** in geringerer Menge freigesetzt (**Abbildung 5.2**). Nach 24 Stunden beträgt die Freisetzungsrate für das **BZM/PEI(25)-Mal B/CPC**-Komposit etwa 55 % und für das **BZM/PEK 0.9/CPC**-Komposit etwa 45 %. Bei den Hybridmaterialien mit den Konzentrationspaaren 50 µg/200 µg, 100 µg/100 µg und 100 µg/200 µg waren jedoch kaum Unterschiede zum Freisetzungsprofil des reinen **BZM** ersichtlich. Über den betrachteten Zeitraum von 14 Tagen ist die Freisetzung für eine effektive Anwendung im Knochen zur Behandlung des Multiplen Myeloms aus den Hybridmaterialien mit **PEI(25)-Mal B** bzw. **PEK 0.9** somit zu hoch und zu schnell. Auch die **BZM/PEI(5)-PGlu-346/CPC**- und **BZM/PEK 1.1-A/CPC**-Komposite zeigten im Vergleich zu denen mit **PEI(25)-Mal B** und **PEK 0.9** keine deutliche Verbesserung der verzögerten **BZM**-Freisetzung (**Abbildung 5.2**). Lediglich die Freisetzungsprofile der Hybridmaterialien mit **BZM/PEI(5)-PGlu-346** im Verhältnis 1:2 und 1:4 verlaufen flacher und gleichen sich nicht bereits innerhalb von 14 Tagen dem des Bortezomibs an.

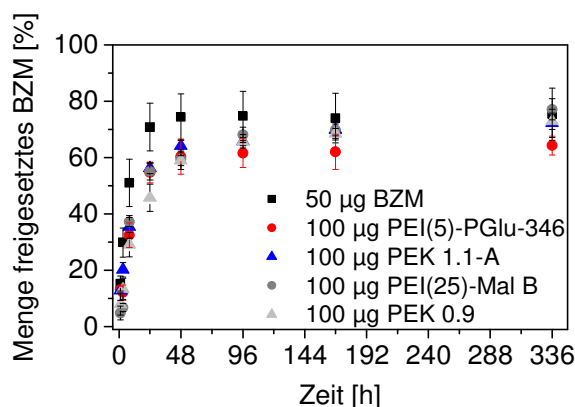


Abbildung 5.2: Vergleich der **BZM**-Freisetzungsraten aus **BZM/PEI(5)-PGlu-346/CPC** und **BZM/PEK 1.1-A/CPC** mit **BZM/PEI(25)-Mal B/CPC** und **BZM/PEK 0.9/CPC**, Konzentrationspaare 50 µg/100 µg.

Erst die Verwendung des **PEI(5)-PGlu-346-Mal** bewirkt eine signifikante Verbesserung der Wirkstofffreisetzung aus den Hybridmaterialien mit **BZM/PEI(5)-PGlu-346-Mal** im Verhältnis 1:2 und 1:4 (**Abbildung 5.3**). Insbesondere bei dem Konzentrationspaar 50 µg

BZM/100 µg PEI(5)-PGlu-346-Mal im Verhältnis 1:2 werden nach 24 Stunden weniger als 40 % **BZM** aus dem Komposit freigesetzt. Im Vergleich zu dem reinen **BZM** in CPC verringert sich somit die Freisetzungsrates um etwa die Hälfte innerhalb des ersten Tages. Weiterhin steigt die Freisetzungsrates innerhalb der 14 Tage nur auf etwa 60 %. Somit liegt die Gesamtfreisetzungsrates des **BZM** aus dem **BZM/PEI(5)-PGlu-346-Mal/CPC**-Komposit ca. 15 % unterhalb der des **BZM/CPC**-Komposits. Die Hybridmaterialien mit **PEK 1.1-B** hingegen zeigen nicht dieses deutlich verbesserte Freisetzungsprofil.

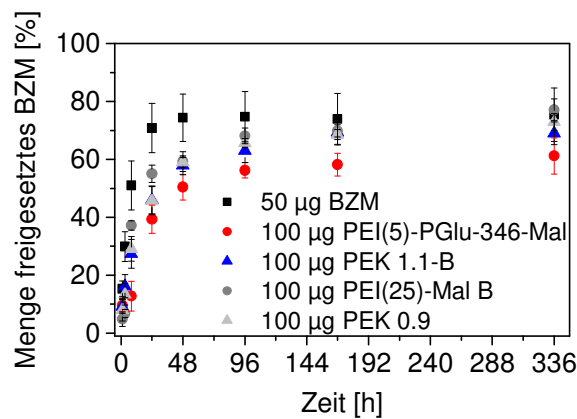


Abbildung 5.3: Vergleich der **BZM**-Freisetzungsrates aus **BZM/PEI(5)-PGlu-346-Mal/CPC** und **BZM/PEK 1.1-B/CPC** mit **BZM/PEI(25)-Mal B/CPC** und **BZM/PEK 0.9/CPC**, Konzentrationspaare 50 µg/100 µg.

Fazit und Ausblick

Durch die Kombination von hochverzweigtem Polyethylenimin mit Polyglutaminsäure und Maltose wurde in dieser Arbeit ein innovatives Drug-Delivery-System für die kontrollierte und verzögerte Freisetzung von Bortezomib aus Calciumphosphatzementen erzeugt. Diese binäre Kern-Doppelschale-Struktur übt trotz der Integration in HA-Kristallstruktur keinen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften des Knochenersatzmaterials aus. Weiterhin weist sie eine hohe Biokompatibilität auf und ist sogar in der Lage die osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen zu knochenbildenden Osteoblasten positiv zu beeinflussen.

In zukünftigen Arbeiten sollte u. a. geprüft werden, inwieweit eine einheitlichere Kern-Schale-Architektur auf Basis von hvz PEI und Polyaminosäureketten zu realisieren ist. Eine Möglichkeit bietet die Anbindung von alkinmodifizierten Carbonsäuren über die Carboxylgruppe an die primären und sekundären Aminogruppen des PEI-Kerns. An die angebundenen Alkylketten mit endständiger Alkingruppe können anschließend definiert lange Polyaminosäureketten mit einer Azidgruppe über eine 1,3-dipolare Cycloaddition („Click-

Reaktion“) angebunden werden. Durch die Kontrolle der Bindungsstelle am hvz PEI und der Länge der Peptidketten so wie die zusätzlichen hydrophoben Alkylketten kann die Aufnahme in und auch die Freisetzung aus dem DDS insbesondere für hydrophobe Wirkstoffe besser optimiert werden. Dabei sollten auch andere Aminosäuren, als Glutamin- und Asparaginsäure, oder sogar die Kombination von verschiedenen Aminosäuren in Betracht gezogen werden. Weiterhin ist ein erfolgsversprechender Einsatz von Polyelektrolytkomplexen integriert in Calciumphosphatzementen aufgrund der Instabilität in salzhaltigen Lösungen kritisch zu beurteilen. Diese und weitere Fragestellungen werden im Teilprojekt M7 „Biokompatible Polyelektrolytkomplexe für die kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen zur Hartgeweberegeneration“ des Sonderforschungsbereich/Transregio 79 „Werkstoffe für die Geweberegeneration im systemisch erkrankten Knochen“ weiter verfolgt.

6. Experimenteller Teil

6.1 Geräte und Verfahren

Asymmetrische Flussfeldflussfraktionierung (AF4)

Zur Bestimmung der Molmassen der wasserlöslichen Copolymere **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** wurde das AF4-System Eclipse DUALTEC von Wyatt Technology Europe mit dem Agilent Pumpensystem der 1260er Serie eingesetzt. Die Membran bestand aus Polyethersulfon mit einem MWCO von 3000 Da. Die Detektion erfolgte mit dem Lichtstreuungsdetektor DAWN HELEOS II (Wyatt Technologies Corp., USA) und dem Brechungsindexdetektor Optilab T-rEX (Wyatt Technologies Corp., USA). Als Eluent und Lösungsmittel wurde ein 50 mM Nitratpuffer mit 0,02 % (w/V) Natriumazid bei einer Kanalflussrate von 0,8 ml/min verwendet. Zur Auftrennung von **PEI(5)-PGlu-346** wurde ein isokratischer Querfluss von 4 ml/min für 20 min angelegt. Bei **PEI(5)-PGlu-346-Mal** wurde die Trennung durch einen linearen Querflussgradienten von 3 zu 0 ml/min erreicht.

Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die hydrodynamischen Durchmesser der wasserlöslichen Copolymere, der Copolymer/Wirkstoff-Komplexe und der Polyelektrolytkomplexe wurden mit der dynamischen Lichtstreuung ermittelt. Die DLS-Messungen erfolgten bei Raumtemperatur (25 °C) mit einem Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) mit einem Helium-Neon-Laser (633 nm) bei einem Streuwinkel von 173°.

Gefriertrocknung

Mit Hilfe der Gefriertrocknungsanlage von Christ (Alpha 1-2 LD plus, Osterode, Deutschland) wurde Wasser nach dem Einfrieren mit flüssigem Stickstoff bei einem Druck von 0,03 mbar und einer Temperatur von – 52 °C aus den Proben entfernt.

Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die Bestimmung der absoluten Molmassen von **PEI(5)**, **PEI(5)-PBLG-173**, **PEI(5)-PBLG-259** und **PEI(5)-PBLG-346** erfolgte in DMAc/LiCl (3 g/l) mit folgendem SEC-System:

Säule: PolarGel-M (Polymer Labs, UK)
Pumpe: Gradient HPLC Series 1200 (AgilentTechnologies Inc., USA)
Brechungsindex-Detektor: DRI-Detektor K2301 (Knauer GmbH, Deutschland)
Lichtstreuendetektor: miniDAWN TriStar (Wyatt Technologies Corp., USA)
Strömungsgeschwindigkeit: 1 ml/min

Die absolute Molmassenbestimmung der wasserlöslichen dendritischen Copolymer **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** erfolgte in Wasser mit 0,02 % NaN₃ mit folgendem SEC-System:

Säule: drei UltrahydrogelTM von Waters (250, 1000, 2000)
Pumpe: Gradient HPLC Series 1200 (AgilentTechnologies Inc., USA)
Brechungsindex-Detektor: DRI-Viscosity-detector ETA 2020 (WGE BURES GmbH & Co. KG, Deutschland)
Lichtstreuendetektor: miniDAWN TriStar (Wyatt Technologies Corp., USA)
Strömungsgeschwindigkeit: 1 ml/min

Infrarotspektroskopie (ATR-FT-IR)

Die Aufnahme der FT-IR-Spektren im KBr-Pressling erfolgte mit einem Vertex 80v Spektrometer der Firma Bruker mit einer Golden Gate Diamant Einheit (SPECAC) in einem Wellenzahlenbereich von 4000 bis 600 cm⁻¹. Die Anzahl der Scans betrug 100 pro Messung bei einer Auflösung von 4 cm⁻¹.

Für die Aufnahme der FT-IR-Spektren an Filmen wurde ein Bruker IFS28 Spektrometer ausgestattet mit einem Globar als Strahlungsquelle und einem MTC-Detektor verwendet. Die Messungen erfolgten jeweils in einem Wellenzahlenbereich von 4000 bis 400 cm⁻¹ mit 100 Scans bei einer Auflösung von 2 cm⁻¹. Die Polymerfilme auf dem trapezoiden, internen Reflexionselement aus Germanium (KOMLAS GmbH, Berlin) wurden aus Lösungen der Konzentrationen 0,1 – 1 mg/ml präpariert.

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden mit einem Bruker DRX 500 NMR-Spektrometer aufgenommen. Die Messungen der ¹H-NMR-Spektren erfolgten bei 500,13 MHz und die der ¹³C-NMR-

Spektren bei 125,75 MHz. Die ^1H -NMR-Spektren von γ -BLG-NCA, β -BLA-NCA, PEI(5)-PBLG-346 und PEI(5)-PBLA-346 wurden in DMSO- d_6 gemessen. Zur internen Kalibrierung wurde das Lösungsmittelsignal ($\delta(^1\text{H}) = 7.26$ ppm) herangezogen. Die Messung der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren der wasserlöslichen Copolymere erfolgte in D_2O . Hierfür wurde ein Kapillarröhrchen gefüllt mit einer 2,2,3,3- d_4 -3-(Trimethylsilyl)propionsäure Natriumsalz Lösung ($\delta(^1\text{H}) = 0$ ppm, $\delta(^{13}\text{C}) = 0$ ppm) in D_2O für die externe Kalibrierung verwendet.

Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die AFM-Messungen im Trockenem wurden mit einem Dimension 3100 NanoScope IIIa (Veeco, USA) im Tapping Mode durchgeführt. Es wurden Silicon-SPM-Sensoren der Firma BudgetSensors (Bulgarien) mit einer Federkonstante von 40 N/m und einer Resonanzfrequenz von 300 kHz verwendet. Der Radius der Cantilever-Messspitze war kleiner 10 nm. Für die Messungen wurde ein Tropfen der wässrigen Copolymerlösung auf dem Siliziumwafer platziert, der über Nacht eintrocknete.

Für die in situ AFM-Messungen in Lösung wurden plasmaaktivierte Silizium-Wafer mit Aminopropyldimethylmonoethoxysilan (APS) in der Gasphase beschichtet, anschließend mit Isopropanol gespült und 1 h bei 120 °C getrocknet. Die Bestimmung der Morphologie der adsorbierten Polymerpartikel erfolgte im Peak Force Tapping Mode mit einem Dimension ICON (Bruker-Nano, USA). Es wurden Silicon-Nitrid-Sensoren SCANASYST-FLUID+ (Bruker, USA) mit einer Federkonstante von 0,7 N/m und einem Radius der Cantilever-Messspitze von 5 nm verwendet. Die Partikelgrößenverteilung wurde mit Hilfe der Software NanoScope Analysis (Bruker-Nano, USA) bestimmt.

Die Konzentration der Copolymerlösungen betrug für beide Messmethoden 0,1 g/l.

Titration

Die pH-abhängigen Titrationsen wurden mit einem Particle Charge Detector (PCD-03) der Firma Müttek im pH-Bereich 3-10 durchgeführt.

(Cryo-)Transmissionselektronenmikroskopie ((Cryo-)TEM)

Die TEM-Untersuchungen wurden an einem Libra 200 (Zeiss, Deutschland) Transmissionselektronenmikroskop mit einer Beschleunigungsspannung von 200 kV durchgeführt. Alle Aufnahmen erfolgten mit Hilfe einer 2048x2048 CCD Kamera (Troendle Deutschland) und wurden mittels iTEM Software (Olympus Corp., Japan) bearbeitet. Für die Morphologie-Untersuchungen wurde ein Tropfen der jeweiligen Copolymerlösung auf ein mit

Kohlenstoff beschichtetes TEM-Grid (200 mesh; Plano GmbH, Deutschland) aufgetragen und luftgetrocknet. Die Cryo-TEM-Aufnahmen wurden mit einem Libra 120 TEM (Zeiss, Deutschland), betrieben im low-dose mode, mit einer Beschleunigungsspannung von 120 kV aufgenommen. Das Gerät war mit einer 2k CCD Kamera (Troendle, Deutschland) und einem Elektronenenergieverlustfilter ausgestattet, der im zero-loss mode betrieben wurde. Die Reduktion des Bildrauschens und die Kontrastoptimierung erfolgte mittels iTEM Software (Olympus Corp., Japan).

Für die Cryo-TEM-Untersuchungen wurden die Copolymerlösungen mit Hilfe eines EM-GP1 (Leica, Deutschland), ausgestattet mit einer Klimakammer (100 % Luftfeuchte, 21 °C), verglast. Ein Tropfen (3,5 µl) der entsprechenden Probe wurde auf einem Lacey TEM-Grid (Plano GmbH, Deutschland) platziert. Nach dem Entfernen von überschüssigem Wasser mit Filterpapier (0,6 s), dem sogenannten Blotting, erfolgte eine Equilibrierung von 10 s bevor das Grid zur Verglasung in flüssiges Ethan (92 K, -181 °C) getaucht wurde.

Ultrafiltration

Die Ultrafiltrationen wurden mit lösungsmittelbeständigen Rührzellen der Firma Merck Millipore bei einem Druck von 5 bar und 200 rpm durchgeführt. Die verwendeten Omega™ Membranscheibenfilter (Pall Life Science, USA) mit einer Ausschlussgrenze von 1000 Da bestanden aus Polyethersulfon.

UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektren wurden mit Hilfe des Specord 210plus UV/Vis-Spektralphotometer von Analytik Jena aufgenommen. Für die UV/Vis-Messungen wurden 3 ml Plastibrand Plastikmakroküvetten (Einmalküvetten), 220 – 900 nm, von Carl Roth verwendet.

Zeta-Potential

Die entsprechenden Oberflächenladungen wurden als Zetapotential mit einem Zetasizer Nano ZS der Firma Malvern Instruments bei 25 °C aufgenommen.

Wasseraufbereitung

Das verwendete reine Wasser wurde durch Aufreinigung von entionisiertem Wasser mit dem Milli-Q Gradient A10 (TOC = 3 ppm, Leitfähigkeit = 18,2 MΩcm, 0,2 µm Membranfilter) der Firma Millipore Corp. (USA) erhalten.

6.2 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

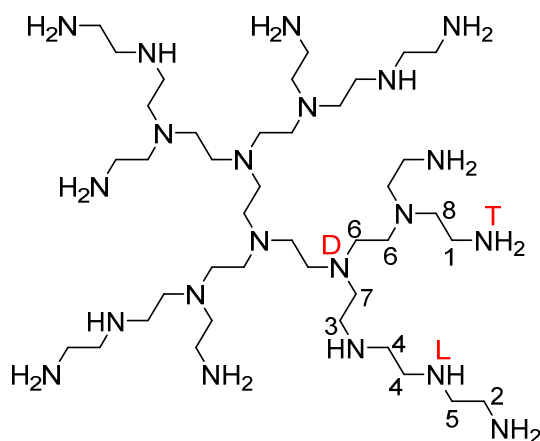
6.2.1 Übersicht

Verbindung	Reinheit	Lieferant
L-Asparaginsäure- β -benzylester		Sigma-Aldrich
Bis-(trichlormethyl)-carbonat	> 99 %	Fluka
Boran-Pyridin-Komplex 8M BH ₃		Sigma-Aldrich
Bortezomib	> 99 %	Absource Diagnostics
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	$\geq 99,5$ %	Fluka
Dinatriumhydrogenphosphat	$\geq 98,5$ %	Sigma-Aldrich
Dinatriumtetraborat Decahydrat	$\geq 99,5$ %	Sigma-Aldrich
L-Glutaminsäure- γ -benzylester	≥ 99 %	Sigma-Aldrich
<i>n</i> -Hexan	≥ 99 %	Merck
Kaliumhydroxid	> 85 %	Riedel-de-Haën
D(+)-Laktose-Monohydrat	> 98 %	Sigma-Aldrich
Lupasol G100		BASF
Lupasol WF		BASF
D(+)-Maltose-Monohydrat	> 99 %	Sigma-Aldrich
Methanol	99,99 %	Acros Organics
Natriumhydroxid	≥ 98 %	Sigma Aldrich
PBS Puffer-Tabletten		Sigma-Aldrich
PEI-Mal B		^a
Poly- γ -benzyl-L-glutaminsäureester		Polyscience Inc.
Poly-L-glutaminsäure (PGlu 61K)		Sigma-Aldrich
Salzsäure, rauchend	37 – 38 %	Merck
Tetrahydrofuran	> 99,5 %	Fluka

^a wurde von Arbeitsgruppe Dr. Appelhans bereitgestellt

6.2.2 Hochverzweigtes Polyethylenimin

Das hochverzweigte Polyethylenimin wurde von der BASF SE (Ludwigshafen, Deutschland) bereitgestellt. Es wurden das Lupasol G100 ($M_w = 5.000 \text{ g/mol}$) und das Lupasol WF ($M_w = 25.000 \text{ g/mol}$) verwendet. Diese beiden Polyethylenimine wurden NMR-spektroskopisch charakterisiert.



Lupasol G100 (PEI(5))

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 500.13 MHz):

$\delta = 2.42 - 2.95 \text{ ppm}$ (m; alle H-Signale überlagert)

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 125.75 MHz):

$\delta = 40.3 \text{ (C-1)}, 42.4 \text{ (C-2)}, 48.1 \text{ (C-3)}, 50.2 \text{ (C-4)}, 52.6 - 54.9 \text{ (C-5, C-6)}, 55.6 \text{ (C-7)}, 58.6 \text{ ppm (C-8)}$

Lupasol WF (PEI(25))

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 500.13 MHz):

$\delta = 2.42 - 2.95 \text{ ppm}$ (m; alle H-Signale überlagert)

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 125.75 MHz):

$\delta = 40.3 \text{ (C-1)}, 42.4 \text{ (C-2)}, 48.1 \text{ (C-3)}, 50.2 \text{ (C-4)}, 52.6 - 55.0 \text{ (C-5, C-6)}, 55.6 \text{ (C-7)}, 58.7 \text{ ppm (C-8)}$

6.3 Synthesen

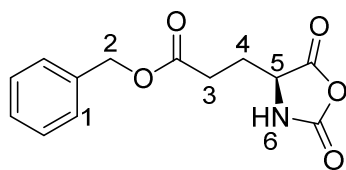
6.3.1 Synthese der *N*-Carboxyanhydride

Das *N*-Carboxyanhydrid-Monomer des L-Glutaminsäure- γ -benzylesters wurde entsprechend einer modifizierten Methode von Daly und Poché²³⁰ hergestellt. In einem ausgeheizten Dreihalskolben mit Rückflusskühler und Blasenähler wurden 70 ml über Molsieb getrocknetes Tetrahydrofuran und 5,93 g (25 mmol) L-Glutaminsäure- γ -benzylester unter Argonatmosphäre vorgelegt. Die weiße Dispersion wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt bevor die Zugabe von 2,96 g (10 mmol) Bis-(trichlormethyl)carbonat erfolgte. Das Reaktionsgemisch wurde auf 50 °C erhitzt und unter Rückfluss gerührt, bis sich nach etwa 1 h eine klare Lösung bildete. Anschließend ließ man für weitere 4 h rühren. In dieser Zeit wurde jede Stunde Argon über die Lösung in 20 %ige KOH-Lösung aller 30 Minuten geleitet. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer auf 20 ml eingengt. Es erfolgte eine Zugabe von 50 ml trockenem Tetrahydrofuran und eine erneute Einengung auf 20 ml. Dieser Vorgang wurde acht Mal wiederholt bis der pH-Wert der Lösung von 3 auf etwa 7 gestiegen war. Die Auskristallisierung des L-Glutaminsäure- γ -benzylester-*N*-carboxyanhydrids (γ -BLG-NCA) erfolgte in *n*-Hexan über Nacht im Gefrierschrank. Die Kristalle wurden für die NCA-Polymerisation über eine G4-Fritte abgesaugt, mehrmals mit *n*-Hexan gespült und bei 30 °C unter Vakuum getrocknet.

Die Synthese des L-Asparaginsäure- β -benzylester-*N*-carboxyanhydrids (β -BLA-NCA) erfolgte analog der oben beschriebenen Vorschrift. Die dafür verwendeten Einwaagen der Edukte sind in **Tabelle 6.1** aufgeführt. Die Produkte γ -BLG-NCA und β -BLA-NCA wurden in Form weißer Kristalle erhalten. Die Lagerung erfolgte in *n*-Hexan bei -20 °C.

Tabelle 6.1: Eingesetzte Eduktmengen für die Synthese von β -BLA-NCA.

L-Asparaginsäure- β -benzylester	5,35 g (23,9 mmol)
Bis-(trichlormethyl)carbonat	2,84 g (9,6 mmol)
Tetrahydrofuran	50 ml

L-Glutaminsäure- γ -benzylester-N-carboxyanhydrid

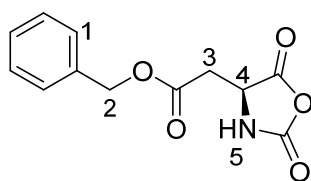
Benzyl-3-(2,5-dioxooxazolidin-4-yl)propanoat

Ausbeute: 6,50 g (24,7 mmol, **99 %**)Summenformel: C₁₃H₁₃NO₅

Molare Masse: 263,25 g/mol

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500.13 MHz):

δ = 1.9 – 2.2 (m; H-3, H-4), 4.5 (m; H-5), 5.1 (s; H-2), 7.3 – 7.5 (m; H-1), 9.1 ppm (s; H-6)

L-Asparaginsäure-β-benzylester-N-carboxyanhydrid

Benzyl 2-(2,5-dioxooxazolidin-4-yl)acetat

Ausbeute: 5,85 g (23,5 mmol, **98 %**)Summenformel: C₁₂H₁₁NO₅

Molare Masse: 249,22 g/mol

¹H-NMR (DMSO-d₆, 500.13 MHz):

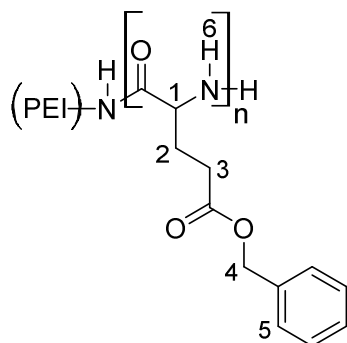
δ = 2.85 – 3.15 (m; H-3), 4.7 (m; H-4), 5.15 (s; H-2), 7.25 – 7.5 (m; H-1), 9.0 ppm (s; H-5)

6.3.2 NCA-Polymerisation

Das hochverzweigte Polyethylenimin ist stark hygroskopisch und enthält 50 % Wasser. In einem ausgeheizten Stickstoffrundkolben wurde die doppelte Ansatzmenge **PEI(5)** vorgelegt und über 48 h unter Vakuum getrocknet. Entsprechend der zurückgebliebenen Menge wasserfreien Makroinitiators wurden trockenes *N,N*-Dimethylformamid (8 ml) und das entsprechende *N*-Carboxyanhydrid unter Argonatmosphäre zugegeben (**Tabelle 6.2**). Das Reaktionsgemisch rührte mindestens 72 h bei Raumtemperatur und wurde dann über 48 h gegen Methanol dialysiert (Dialysemembran: regenerierte Zellulose, MWCO 3500 Da). Anschließend wurde das Dialysat eingeeengt, in wenig reinem Wasser suspendiert und bei 30 °C 2 h getrocknet. Man erhielt die Produkte Polyethylenimin-poly- γ -benzyl-L-glutaminsäureester (**PEI(5)-PBLG**) und Polyethylenimin-poly- β -benzyl-L-asparaginsäureester (**PEI(5)-PBLA**) als weißen Feststoff.

Tabelle 6.2: Syntheseparameter der NCA-Polymerisationen.

	Monomer [mol %]		Monomer- verhältnis EI : BLG/ BLA	m(PEI) [g] (n(PEI) [mol])	m(BLG) [g] (n(BLG) [mol])	Aus- beute [g]	Umsatz [%]
	EI	BLG/ BLA					
PEI(5)- PBLG-43	65,9 (84) ^a	34,1 (43) ^b	1 : 0,5	0,086 (2,39 · 10 ⁻⁵)	0,272 (1,03 · 10 ⁻³)	0,312	74
PEI(5)- PBLG-173	32,6 (84) ^a	67,4 (173) ^b	1 : 2,0	0,100 (2,78 · 10 ⁻⁵)	1,264 (4,80 · 10 ⁻³)	1,152	82
PEI(5)- PBLG-259	24,4 (84) ^a	75,6 (259) ^b	1 : 3,1	0,050 (1,39 · 10 ⁻⁵)	0,948 (3,60 · 10 ⁻³)	0,839	95
PEI(5)- PBLG-346	19,5 (84) ^a	80,5 (346) ^b	1 : 4,1	0,087 (2,42 · 10 ⁻⁵)	2,200 (8,36 · 10 ⁻³)	1,920	92
PEI(5)- PBLA-346	19,5 (84) ^a	80,5 (346) ^b	1 : 4,1	0,122 (3,39 · 10 ⁻⁵)	2,922 (1,17 · 10 ⁻²)	2,25	89

^a Anzahl der Ethylenimineinheiten^b Anzahl der BLG- bzw. BLA-Einheiten**Polyethylenimin-poly- γ -benzyl-L-glutaminsäureester**¹H NMR (DMSO-d₆, 500,13 MHz):

$\delta = 1.6 - 2.8$ (m; H-2, H-3), $3.6 - 4.4$ (m; H-1), $4.8 - 5.2$ (m; H-4), $7.1 - 7.4$ (m; H-5), $7.7 - 8.50$ ppm (m; H-6)

Die Signale des hochverzweigten PEI, welche normalerweise im Bereich von 2,5 bis 3,5 ppm erscheinen, können nicht bestimmt werden. Sie sind sehr breit und werden durch das Lösungsmittel- und Wassersignal stark überlagert.

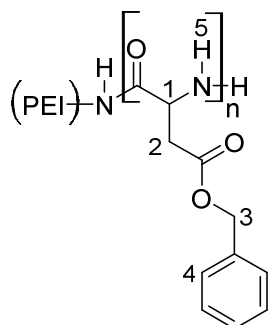
ATR-FT-IR, KBr-Pressling:

$\nu = 3288.5$ (N–H), 3063.7 , 3034.5 (C_{ar} –H), 2939.0 (C_{al} –H), 1726.9 (C=O), 1649.6 (Amid I), 1538.7 (Amid II), 1498.0 (C_{ar} – C_{ar}), 1159.5 (C–O), 735.6 , 695.3 cm^{-1} (C_{ar} –H monosubstituiert)

SEC:

Ermittelte Molmassen mittels SEC siehe **Kapitel 4.1.3, Tabelle 4.5**.

Polyethylenimin-poly- β -benzyl-L-asparaginsäureester



1H NMR (DMSO- d_6 , 500,13 MHz):

$\delta = 2.55 - 3.0$ (m; H-2), $4.3 - 4.8$ (m; H-1), $4.9 - 5.3$ (m; H-3), $7.0 - 7.6$ (m; H-4), $7.95 - 8.6$ ppm (m; H-5)

Die Signale des hochverzweigten PEI, welche normalerweise im Bereich von 2,5 bis 3,5 ppm erscheinen, können nicht bestimmt werden. Sie sind sehr breit und werden durch das Lösungsmittel- und Wassersignal stark überlagert.

ATR-FT-IR, KBr-Pressling:

$\nu = 3281.5$ (N–H), 3064.8 , 3035.6 (C_{ar} –H), 2946.3 (C_{al} –H), 1715.4 (C=O), 1657.8 und 1634.4 (Amid I), 1524.5 (Amid II), 1498.7 (C_{ar} – C_{ar}), 1163.6 (C–O), 735.7 , 695.6 cm^{-1} (C_{ar} –H monosubstituiert)

6.3.3 Hydrolyse

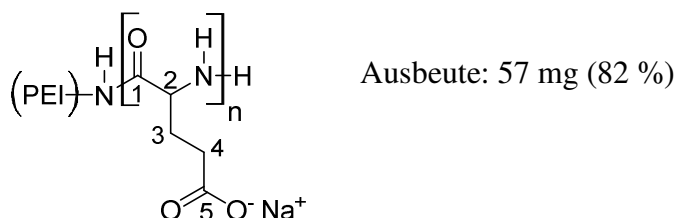
Für die Synthese der Polyethylenimin-poly-L-glutaminsäure (**PEI(5)-PGlu-346**) wurden in einem Rundkolben 106 mg ($8,2 \cdot 10^{-6}$ mol) **PEI(5)-PBLG-346**, 112 mg ($2,8 \cdot 10^{-3}$ mol, 7 eq pro Benzylestergruppe) Natriumhydroxid und 20 ml eines 1:1 Lösungsmittelgemisches aus entionisiertem Wasser und Methanol vorgelegt. Man ließ das Reaktionsgemisch bei 50 °C über 48 h rühren. Das Lösungsmittelgemisch wurde eingengt und den Feststoff löste man in entionisiertem Wasser. Die stark basische Lösung wurde mit 0,1 M HCl-Lösung auf pH 5 angesäuert und anschließend gegen reines Wasser über vier Tage dialysiert (Dialysemembran: regenerierte Cellulose, MWCO 2000 Da).

Die Abspaltung der Benzylschutzgruppen von **PEI(5)-PBLA-346** wurde analog der oben beschriebenen Vorschrift durchgeführt. Die dafür eingesetzten Mengen an Edukten sind in **Tabelle 6.3** aufgeführt. **PEI(5)-PGlu-346** und Polyethylenimin-poly-L-asparaginsäure (**PEI(5)-PAsp-346**) wurden als weiße Feststoffe erhalten.

Tabelle 6.3: Eingesetzte Eduktmengen für die Synthese von **PEI(5)-PAsp-346**.

PEI(5)-PBLA-346	500 mg ($6,7 \cdot 10^{-6}$ mol)
NaOH	355 mg (8,88 mmol)
H ₂ O/MeOH (1:1)	30 ml

Polyethylenimin-poly-L-glutaminsäure



¹H NMR (D₂O, 500,13 MHz):

$\delta = 1.7 - 2.2$ (m; H-3), $2.2 - 2.5$ (m; H-4), $3.9 - 4.5$ ppm (m; H-2)

Die Signale des hochverzweigten PEI liegen im Bereich von $2,5 - 3,8$ ppm und sind durch andere Signale überlagert.

¹³C NMR (D₂O, 125.75 MHz):

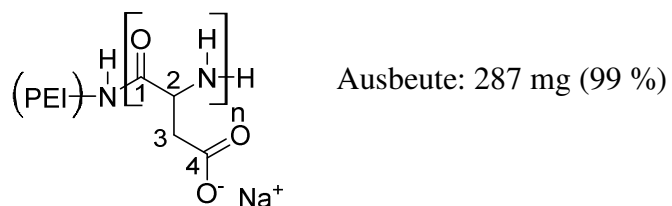
$\delta = 27 - 31.5$ (C-3), $33.5 - 37$ (C-4), $38 - 40$ (PEI-T), $46 - 49$ (PEI-L), $51 - 54$ (PEI-D), $55 - 59$ (C-2), $174 - 179$ (C-1), $181 - 184$ ppm (C-5)

ATR-FT-IR, KBr-Pressling:

$\nu = 3264.5$ (N-H), 3056.4 (CO-NH) 2940.9 (C_{al}-H), 1642.9 (Amid I), 1533.2 (Amid II, COO⁻), 1398.4 cm⁻¹ (COO⁻)

AF4:

Ermittelte Molmassen mittels AF4 siehe **Kapitel 4.1.4, Tabelle 4.6**.

Polyethylenimin-poly-L-asparaginsäure

^1H NMR (D_2O , 500,13 MHz):

$\delta = 2.5 - 3.1$ (m; H-3), $4.0 - 4.65$ ppm (m; H-2)

Die Signale des hochverzweigten PEI liegen im Bereich von 2,5 – 3,8 ppm und sind durch andere Signale überlagert.

^{13}C NMR (D_2O , 125.75 MHz):

$\delta = 39 - 43$ (C-3), $43 - 53$ (PEI-T, L, D), $53 - 57$ (C-2), $174 - 177$ (C-1), 180 ppm (C-4)

ATR-FT-IR, KBr-Pressling:

$\nu = 3265.3$ (N–H), 3065.3 , 2930.0 ($\text{C}_{\text{al}}\text{--H}$), 1579.8 (Amid I, Amid II, COO^-), 1393.8 cm^{-1} (COO^-)

6.3.4 Reduktive Aminierung*a) PEI(5)-Mal B, PEI(25)-Mal B*

Die dendritischen Glykopolymere **PEI(5)-Mal B** und **PEI(25)-Mal B** wurden von der Arbeitsgruppe um Dr. Appelhans bereitgestellt. Die Synthese und Charakterisierung dieser Polymerstrukturen ist ausführlich in der Literatur^{186, 187} und der Masterarbeit von Markus Franke²⁴⁸ beschrieben. Für diese Arbeit verwendete relevante Daten der Elementaranalysen von Markus Franke sind in **Tabelle 6.4** aufgelistet.

Tabelle 6.4: Berechnete Anzahl der Maltoseeinheiten und Molmassen der Glykodendrimere mit Elementaranalyse, Masterarbeit Markus Franke.

Struktur	Anzahl Maltoseeinheiten	M [g/mol]
PEI(5)-Mal B	46	18600
PEI(25)-Mal B	87	38100

b) PEI(5)-PGlu-346-Mal, PEI(5)-PGlu-346-Lak

Für die reduktive Aminierung der glutaminsäure-modifizierten Kern-Schale-Struktur mit Disacchariden wurden 42 mg (0.98 mmol NH-Gruppen) **PEI(5)-PGlu-346** und 3,6 g (10 mmol) D(+)-Maltose-Monohydrat in 30 ml 0,1 M Natriumborat-Lösung gelöst. Nachdem

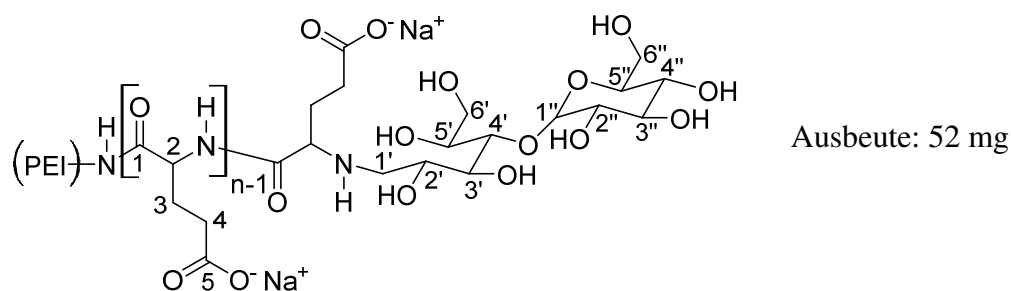
sich die Feststoffe vollständig gelöst hatten wurde 1,25 ml (10 mmol) eines 8 M Boran-Pyridin-Komplexes zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde auf 50 °C erwärmt und für sieben Tage gerührt. Die Reinigung des Produktes erfolgte über eine Dialyse (Dialysemembran: regenerierte Cellulose, MWCO 2000 Da) gegen reines Wasser über vier Tage. Man erhielt nach der Gefriertrocknung einen weißen Feststoff.

Die Modifizierung mit Laktose-Einheiten erfolgte analog der oben beschriebenen Vorschrift mit folgenden Einwaagen der Edukte:

Tabelle 6.5: Eingesetzte Eduktmengen für die Synthese von **PEI(5)-PGlu-346-Lak**.

PEI(5)-PGlu-346	130 mg (3,0 mmol NH-Gruppen)
D(+)-Laktose-Monohydrat	10,8 g (30 mmol)
Boran-Pyridin-Komplexes (8 M)	3,8 ml (30 mmol)
Natriumborat-Lösung (0,1 M)	30 ml

Polyethylenimin-poly-L-glutaminsäure-maltose



^1H NMR (D_2O , 500,13 MHz):

$\delta = 1.7 - 2.2$ (m; H-3), $2.2 - 2.4$ (m; H-4), 3.3 (m; H-1'), $3.4 - 4.1$ (m; H-2', H-3', H-4', H-5', H-6', H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''), $4.1 - 4.5$ (m; H-2), $5.05 - 5.2$ ppm (m; H-1'')

Die Signale des hochverzweigten PEI liegen im Bereich von 2,5 – 3,5 ppm und sind durch andere Signale überlagert.

^{13}C NMR (D_2O , 125,75 MHz):

$\delta = 30$ (C-3), 35.5 (C-4), $37 - 43$ (PEI-T), $43 - 50$ (PEI-L), $50 - 55$ (PEI-D), $55 - 59$ (C-2), $59 - 61$ (C-1'), 63 (C-6''), 65 (C-6'), $69 - 71$ (C-2'), 72 (C-4''), $73.5 - 74.5$ (C-2''), $74.5 - 77$ (C-3', C-5', C-3'', C-5''), $83 - 86$ (C-4'), 103.5 (C-1''), $174 - 178$ (C-1), $182 - 186$ ppm (C-5)

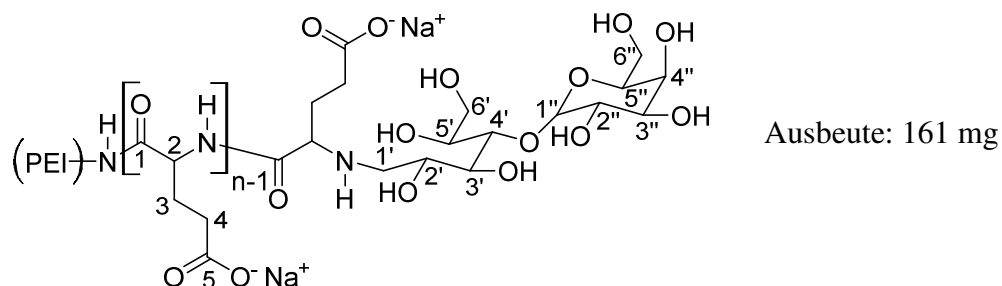
ATR-FT-IR, KBr-Pressling:

$\nu = 3258.1$ (NH), 2932.6 ($\text{C}_{\text{al}}\text{-H}$), 1643.8 (Amid I), 1547.1 (Amid II, COO^-), 1399.9 (COO^-), 1020.2 cm^{-1} (C-OH)

AF4:

Ermittelte Molmassen mittels AF4 siehe **Kapitel 4.1.5, Tabelle 4.7.**

Polyethylenimin-poly-L-glutaminsäure-laktose



$^1\text{H NMR}$ (D_2O , 500,13 MHz):

$\delta = 1.8 - 2.2$ (m; H-3), $2.2 - 2.45$ (m; H-4), $3.5 - 4.1$ (m; H-1', H-2', H-3', H-4', H-5', H-6', H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''), $4.1 - 4.5$ (m; H-2), $4.55 - 4.65$ ppm (m; H-1'')

Die Signale des hochverzweigten PEI liegen im Bereich von 2,5 – 3,5 ppm und sind durch andere Signale überlagert.

$^{13}\text{C NMR}$ (D_2O , 125,75 MHz):

$\delta = 29 - 32$ (C-3), $35.5 - 38$ (C-4), $55 - 57$ (C-2), $57 - 85$ (C-1', C-2', C-3', C-4', C-5', C-6', C-2'', C-3'', C-4'', C-5'', C-6''), $103 - 108$ (Laktose, C-1''), $176 - 177.5$ (C-1), $183 - 187$ ppm (C-5)

Die Signale des hochverzweigten PEI liegen im Bereich von 38 – 55 ppm. Sie sind im Gegensatz zu den anderen Signalen der Laktose und der Glutaminsäure sehr schwach.

ATR-FT-IR, KBr-Pressling:

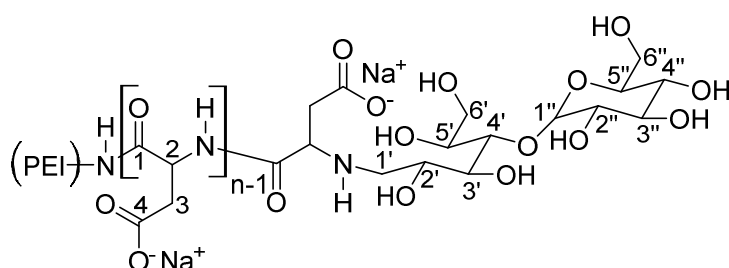
$\nu = 3260.4$ (NH), 2937.1 ($\text{C}_{\text{al}}\text{-H}$), 1644.4 (Amid I), 1548.5 (Amid II, COO^-), 1404.3 (COO^-), 1070.9 cm^{-1} (C–OH)

c) *PEI(5)-PAsp-346-Mal*, *PEI(5)-PAsp-346-Lak*

Die reduktive Aminierung der asparaginsäure-modifizierten Kern-Schale-Strukturen mit Maltose- bzw. Laktose-Einheiten erfolgte analog der oben beschriebenen Vorschrift b) *PEI(5)-PGlu-346-Mal*, *PEI(5)-PGlu-346-Lak*. Die Produkte wurden ebenfalls als weiße Feststoffe erhalten. Die entsprechenden Angaben zu den eingesetzten Eduktmengen sind in der nachfolgenden **Tabelle 6.6** aufgelistet.

Tabelle 6.6: Eingesetzte Eduktmengen für die Synthese von **PEI(5)-PAsp-346-Mal** und **PEI(5)-PAsp-346-Lak**.

PEI(5)-PAsp-346	90 mg (2,1 mmol NH-Gruppen)
D(+)-Maltose-Monohydrat	7,54 g (21 mmol)
D(+)-Laktose-Monohydrat	7,54 g (21 mmol)
Boran-Pyridin-Komplexes (8 M)	2,63 ml (21 mmol)
Natriumborat-Lösung (0,1 M)	30 ml

Polyethylenimin-poly-L-asparaginsäure-maltose

Ausbeute: 132 mg

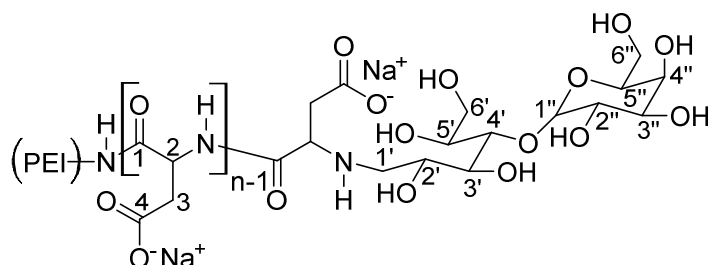
¹H NMR (D₂O, 500,13 MHz):

$\delta = 2.3 - 3.0$ (m; H-3), $3.35 - 4.05$ (m; H-1', H-2', H-3', H-4', H-5', H-6', H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''), $4.05 - 4.6$ (m; H-2), $5.0 - 5.3$ ppm (m; H-1'')

Die Signale des hochverzweigten PEI liegen im Bereich von 2,5 – 3,5 ppm und sind durch andere Signale überlagert.

ATR-FT-IR, KBr-Pressling:

$\nu = 3272.3$ (NH), 2930.0 (C_{al}-H), 1583.4 (Amid I, Amid II, COO⁻), 1399.8 (COO⁻), 1022.5 cm⁻¹ (C–OH)

Polyethylenimin-poly-L-asparaginsäure-laktose

Ausbeute: 132 mg

¹H NMR (D₂O, 500,13 MHz):

$\delta = 2.4 - 3.0$ (m; H-3), $3.45 - 4.1$ (m; H-1', H-2', H-3', H-4', H-5', H-6', H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''), $4.1 - 4.9$ ppm (m; H-2, H-1'')

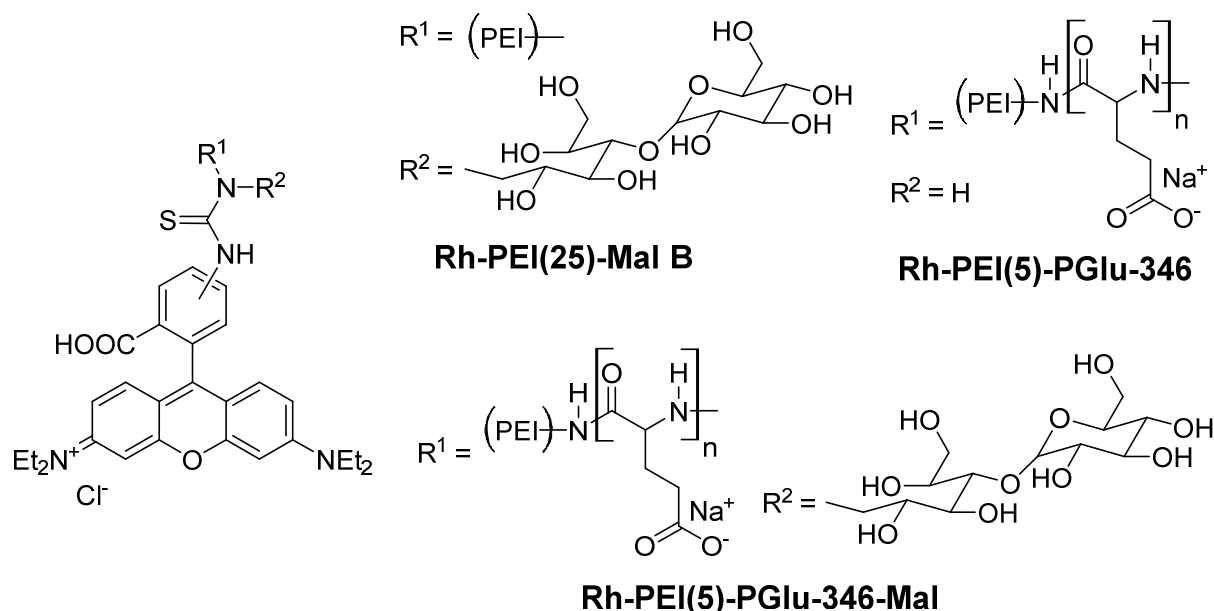
Die Signale des hochverzweigten PEI liegen im Bereich von 2,5 – 3,5 ppm und sind durch andere Signale überlagert.

ATR-FT-IR, KBr-Pressling:

$\nu = 3268.9$ (NH), 2930.0 (C_{al-H}), 1580.7 (Amid I, Amid II, COO^-), 1397.7 (COO^-), 1046.2 cm^{-1} (C–OH)

6.3.5 Markierung mit Rhodamin B-Isothiocyanat

Je 50 mg **PEI(25)-Mal B** (38.100 g/mol^a, $1,3 \cdot 10^{-6}$ mol), **PEI(5)-PGlu-346** (48.400 g/mol^b, $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol) und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** (58.100 g/mol^c, $0,7 \cdot 10^{-6}$ mol) wurden in 5 ml reinem Wasser gelöst. In einem weiteren Schnappdeckelglas wurden je 1,5 mg ($2,8 \cdot 10^{-6}$ mol) Rhodamin B-Isothiocyanat (**Rh B-SCN**) in DMSO gelöst. Die Farbstofflösungen wurden anschließend unter Lichtausschluss in die Copolymerlösungen getropft. Die Farbstoff/Copolymer-Gemische rührten über Nacht unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur. Die Aufreinigung erfolgte über eine Chromatographiesäule mit Sephadex und reinem Wasser als Eluent. Nach anschließender Gefriertrocknung erhielt man **Rh-PEI(25)-Mal B**, **Rh-PEI(5)-PGlu-346** und **Rh-PEI(5)-PGlu-346-Mal** als rosafarbene Feststoffe. Die Bestimmung der angebondenen Menge Rhodamin B erfolgte mit der UV/Vis-Spektroskopie.



UV/Vis (PBS, pH 7,4): $\lambda_{max} = 552$ nm

^a mittels Elementaranalyse berechnete Molmasse

^b theoretisch berechnete Molmasse bei vollständiger Polymerisation aller 346 Glutaminsäureeinheiten am PEI-Kern

^c theoretisch berechnete Molmasse bei Monosubstitution aller 27 terminalen Aminogruppen

6.4 Strömungspotentialtitration und Zetapotentialmessung

Für die Strömungspotentialtitration von Polyethylenimin wurden zunächst 0,1 ml einer 0,01 M wässrigen PEI-Lösung mit 14,9 ml reinem Wasser vereint. Der pH-Wert dieser PEI-Ausgangslösung betrug 6,8. Mit einer 0,1 M NaOH-Lösung wurde ein pH-Wert größer 9 eingestellt und mit einer 0,1 M HCl-Lösung in 0,001 ml Schritten auf pH 3 titriert. Für die Messungen der Strömungspotentiale der glutaminsäuremodifizierten Strukturen wurden wässrige Lösungen der Konzentration 0,5 mg/ml hergestellt. Je 1 ml dieser Lösungen wurden mit 14 ml reinem Wasser vereint. Es folgte die Einstellung des pH-Wertes der Ausgangslösungen mit 0,1 M HCl-Lösung auf pH 3. Die Titration wurde in 0,001 ml Schritten mit 0,1 M NaOH-Lösung auf pH 10 durchgeführt.

Für die pH-abhängige Zetapotentialmessungen wurden je 10 ml Ausgangslösung der Konzentration 1 mg/ml der jeweiligen Kern-Schale-Strukturen in 10^{-3} M KCl-Lösung hergestellt. Zunächst wurde das Zetapotential beim Ausgangs-pH-Wert gemessen. Anschließend wurden die Probenlösungen geteilt und mit 0,1 M HCl- bzw. KOH-Lösung entsprechende pH-Werte eingestellt (**Tabelle 6.7**).

Tabelle 6.7: pH-Werte der Zetapotentialmessungen.

Struktur	Ausgangs-pH-Wert	Eingestellte pH-Werte
PEI(5)-PGlu-346	9,09	2,9; 4,9; 7,0
PEI(5)-PGlu-346-Mal	6,04	2,6; 5,0; 7,0; 9,6
PEI(5)-PGlu-346-Lak	6,98	3,0; 5,0; 9,6
PEI(5)-PAsp-346	6,47	3,0; 4,9; 6,9; 9,0
PEI(5)-PAsp-346-Mal	8,56	3,1; 5,0; 7,0; 9,0
PEI(5)-PAsp-346-Lak	8,49	3,1; 5,1; 7,0; 9,6

6.5 Herstellung Polyelektrolytkomplexe

Die hier in der Arbeit verwendeten Polyelektrolytkomplexe wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Martin Müller (IPF, Abteilung Polyelektrolyte und Dispersionen) bereitgestellt. Zur Herstellung der Polyelektrolytkomplexe mit dem positiv geladenen **PEI(25)-Mal B** wurde lineares, vollsubstituiertes (DS = 3) Cellulosesulfat (CS) als entgegengesetzt geladener Polyelektrolyt verwendet. Definierte Volumen der wässrigen 0,002 M Cellulosesulfat-Lösung wurden langsam mit der wässrigen **PEI(25)-Mal B**-Lösung (1 g/l in reinem Wasser) bzw.

Rh-PEI(25)-Mal B-Lösung (1 g/l in reinem Wasser) gemischt. Das stöchiometrische Verhältnis n^-/n^+ zwischen Polyanion und Polykation beträgt 0,9. Somit besitzt der Polyelektrolytkomplex eine kationische Nettoladung.

Die Polyelektrolytkomplexe der negativ geladenen glutaminsäuremodifizierten Copolymere wurden mit der linearen, positiv geladenen Ethylendiamin-Cellulose (EDA-Cell) hergestellt. Definierte Volumina der wässrigen 0,002 M EDA-Cell-Lösung wurden langsam mit der wässrigen **PEI(5)-PGlu-346-**, **PEI(5)-PGlu-346-Mal-**, **Rh-PEI(5)-PGlu-346-** bzw. **Rh-PEI(5)-PGlu-346-Mal-Lösung** der Konzentration 1 g/l gemischt. Die resultierenden Polyelektrolytkomplexe besitzen eine anionische Nettoladung mit einem stöchiometrischen Verhältnis $n^-/n^+ = 1.1$.

6.6 Ultrafiltrationsexperimente

6.6.1 Voruntersuchungen

Kalibrierung

Für die Untersuchung der Wirkstoffaufnahme in die Kern-Schale-Strukturen wurden zunächst Kalibrierungen durch Probenverdünnung durchgeführt. Man stellte je eine Wirkstoffstammlösung in reinem Wasser und PBS-Lösung her. Anschließend wurden 2 ml der jeweiligen Stammlösung in eine Küvette überführt und die Absorption bei der entsprechenden Wellenlänge gemessen. Für die erste Verdünnung entnahm man 200 μ l Stammlösung und fügte 200 μ l reines Wasser bzw. PBS-Lösung hinzu. Die Verdünnung wurde insgesamt zwanzig Mal wiederholt. Aus den jeweiligen Absorptionen konnten die entsprechenden Kalibriergeraden ermittelt werden.

Membranstabilitätstests

Die Überprüfung möglicher Wechselwirkungen der Wirkstoffe mit den Ultrafiltrationsmembranen erfolgte mit Stammlösungen, deren Konzentrationen der vorangegangenen Kalibrierungen mit einer Absorption < 1 entsprachen. Die Konzentration der Cerivastatin- und Risedronatlösungen betrug 40 mg/l und die der Bortezomiblösung 30 mg/l. Für die Membranstabilitätstests wurden je 40 ml Stammlösung mit reinem Wasser und PBS-Lösung hergestellt. Je 2 ml der Stammlösungen wurden jeweils in UV-Küvetten überführt. Die restlichen 38 ml der Stammlösungen wurden durch Polyethersulfon- bzw. Zellulosemembranen mit MWCO 1000 Da bei 5 bar Stickstoffdruck und einer

Rührgeschwindigkeit von 200 rpm ultrafiltriert. Dabei ließ man zunächst 5 ml Lösung durchlaufen und nahm dann je 3 ml Proben. Die Auswertung der Membranstabilität erfolgte mit Hilfe der UV/Vis-Spektren.

6.6.2 Wirkstoffkomplexierung

Copolymere/BZM

Für die Bestimmung der Menge an komplexiertem Bortezomib wurden das entsprechende Copolymer und Bortezomib in je 200 ml reinem Wasser bzw. PBS-Lösung gelöst. Das Copolymer und Bortezomib wurden in den molaren Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50 eingesetzt. **PEI(25)-Mal B** besitzt eine Molmasse von 38.100 g/mol.²⁴⁸ Entsprechend der molaren Verhältnisse ergeben sich die **PEI(25)-Mal B**-Konzentrationen mit 0,297 g/l ($7,8 \cdot 10^{-6}$ mol, 1:10), 0,119 g/l ($3,1 \cdot 10^{-6}$ mol, 1:25) und 0,0595 g/l ($1,6 \cdot 10^{-6}$ mol, 1:50) bei einer **BZM**-Konzentration von 30 mg/l ($7,8 \cdot 10^{-5}$ mol). Da für die Copolymere **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** keine auswertbaren Molmassen bestimmt werden konnten wurden die gleichen Mengen an Copolymer wie bei **PEI(25)-Mal B** eingesetzt. Sofort nach Vermischen der entsprechenden Copolymer- und Wirkstoffstammlösung wurden dreimal 40 ml der Copolymer/**BZM**-Lösung (insgesamt 400 ml) entnommen. Davon wurden je 2 ml als Referenz in Küvetten und die restlichen je 38 ml in drei Rührzellen gefüllt. Die Ultrafiltration wurde unmittelbar nach der Befüllung (0 h) bei 5 bar und 200 rpm gestartet. Die Probennahme von je 2 ml erfolgte nach 18, 23 und 28 ml (entspricht den Probenbezeichnungen 20, 25 und 30 ml). Die Ultrafiltrationen wurden nach 3 und 20 h wiederholt. Die Berechnung der komplexierten Menge Bortezomib erfolgte mit Hilfe der UV/Vis-Spektren.

PEKs/BZM

Für die Komplexierung des Bortezomibs mit den Polyelektrolytkomplexen wurden je 120 ml PEK/**BZM**-Lösungen entsprechend der molaren Verhältnisse 1:10, 1:25 und 1:50 hergestellt. Das molare Verhältnis bezieht sich auf die Konzentration des jeweiligen Copolymers im PEK. Daraus ergeben sich die gleichen Konzentrationen wie bei den Komplexierungen des **BZM** mit den reinen Copolymeren (siehe oben *Copolymere/BZM*). Die von der Arbeitsgruppe um Dr. Martin Müller bereitgestellten PEK-Stammlösungen (1 g/l Copolymer im PEK) wurden entsprechend der molaren Verhältnisse mit reinem Wasser verdünnt. Die dafür benötigten Volumina der PEK-Stammlösung sind in **Tabelle 6.8** aufgelistet. In den für die Verdünnung nötigen Volumina an reinem Wasser wurde das **BZM** mit der Konzentration 30 mg/l

(3,6 mg/120 ml, $7,8 \cdot 10^{-5}$ mol) gelöst und mit den jeweiligen Volumina der PEK-Stammlösungen gemischt. Somit wurden z. B. für das molare Verhältnis 1:10 in 84 ml reinem Wasser 3,6 mg **BZM** gelöst und mit 36 ml PEK-Stammlösung vereint. Sofort nach Vermischen der entsprechenden Volumina an PEK-Stammlösung und Wirkstofflösung wurden 40 ml der PEK/**BZM**-Lösung entnommen. Davon wurden 2 ml als Referenz in eine Küvette und die restlichen 38 ml in eine Rührzelle überführt. Die Ultrafiltration wurde unmittelbar nach der Befüllung (0 h) bei 5 bar und 200 rpm gestartet. Die Probennahme von je 2 ml erfolgte nach 18, 23 und 28 ml (entspricht den Probenbezeichnungen 20, 25 und 30 ml). Die Ultrafiltration wurde mit den verbleibenden 80 ml PEK/**BZM**-Lösung nach 3 und 20 h wiederholt. Die Berechnung der komplexierten Menge Bortezomib erfolgte mit Hilfe der UV/Vis-Spektren.

Tabelle 6.8: PEK- und **BZM**-Konzentrationen für die molaren Verhältnisse 1:10, 1:25 und 1:50 und entsprechende Volumina der PEK-Stammlösung (1 g/l Copolymer im PEK) und von reinem Wasser für die Herstellung der 120 ml PEK/**BZM**-Lösungen.

	c _{PEK} [g/l]	c _{PEK} [g/120 ml]	V _{PEK-Stamm} [ml]	c _{BZM} [mg/120 ml]	V _{H₂O} [ml]
1:10	0,297	0,036	36	3,6	84
1:25	0,119	0,014	14	3,6	106
1:50	0,0595	0,0072	7,2	3,6	112,8

6.6.3 Wirkstofffreisetzung

Für die Untersuchung der Wirkstofffreisetzung mit den Copolymer/Wirkstoff-Verhältnissen 1:10 und 1:50 wurden zunächst je 100 ml einer doppelt konzentrierten **BZM**-Lösung (60 mg/l) und einer doppelt konzentrierten Copolymerlösung (0,594 g/l bei 1:10, 0,119 g/l bei 1:50) in reinem Wasser hergestellt. Nach Vereinigung der **BZM**-Lösung und der jeweiligen Copolymer-Lösung ließ man entsprechend der höchsten Aufnahme aus den Untersuchungen der Wirkstoffaufnahme 3 h bzw. 20 h rühren. Anschließend wurde die gesamte Lösung bei 5 bar und 200 rpm ultrafiltriert. Man ließ am Ende der Ultrafiltration lediglich 8 ml Überstand in der Ultrafiltrationszelle. Es erfolgte eine Probennahme von 2 ml nach 50 ml, 100 ml und 150 ml sowie des gesamten Permeates. Mit Hilfe der UV/Vis-Absorptionen dieser Proben (**Abbildung 6.1**) wurde die Menge an komplexiertem Wirkstoff berechnet. Anschließend wurden dem Überstand 10 ml reines Wasser hinzugefügt und man ließ wieder 10 ml durchlaufen. Dieser Spülvorgang wurde ein zweites Mal wiederholt. Der Überstand nach dem

Spülen und das auf der Membran adsorbierte wirkstoffbeladene Copolymer wurden in einen Kolben überführt und gefriergetrocknet. Der Komplex wurde dann in 300 ml PBS-Puffer gelöst und 30 Minuten gerührt. Danach erfolgten die Entnahme von 30 ml Lösung aus dieser Stammlösung und die sofortige Zugabe von 30 ml PBS-Lösung zu der Stammlösung. Von der entnommenen Lösung wurden 2 ml als Referenz in eine UV-Küvette überführt. Die restlichen 28 ml ultrafiltrierte man unter den bekannten Bedingungen (5 bar, 200 rpm). Man ließ 14 ml durchlaufen und nahm dann fünfmal je 2 ml Proben (16, 18, 20, 22 und 24 ml). Die Ultrafiltration wurde nach 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 1 d, 2 d, 4 d, 7 d und 14 d wiederholt. Die Berechnung an freigesetztem Wirkstoff erfolgte mit Hilfe der Absorptionsspektren der Permeate, des Komplexierungsgrades und der Menge an wirkstoffbeladenem Copolymer nach der Gefriertrocknung.

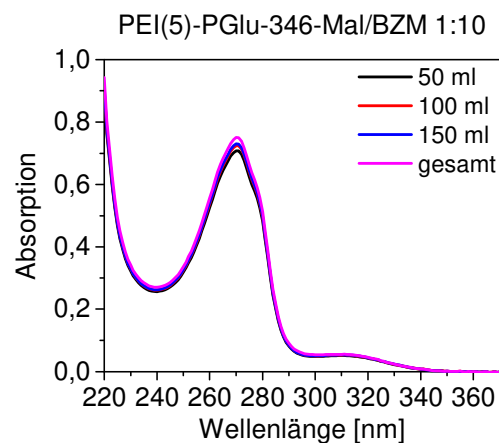


Abbildung 6.1: UV/Vis-Spektren als Grundlage zur Berechnung der Menge an komplexierten **BZM** am Beispiel **PEI(5)-PGlu-346-Mal/BZM 1:10**.

Die Komplexierung für die Wirkstofffreisetzung aus den PEK/**BZM**-Komplexen erfolgte ebenfalls mit den molaren PEK/**BZM**-Verhältnissen 1:10 und 1:50. Für die doppelt konzentrierten PEK-Lösungen wurden entsprechende Volumina der **PEK**-Stammlösung (1 g/l Copolymer im PEK) entnommen und mit reinem Wasser auf 100 ml aufgefüllt (**Tabelle 6.9**). Die anschließende Ultrafiltration und die **BZM**-Freisetzung wurden analog der Wirkstofffreisetzung aus den Copolymer/**BZM**-Komplexen durchgeführt.

Tabelle 6.9: PEK-Konzentrationen für die molaren Verhältnisse 1:10 und 1:50 und entsprechende Volumina der PEK-Stammlösung (1 g/l Copolymer im PEK) und von reinem Wasser für die Herstellung der 100 ml PEK/BZM-Lösungen.

	c_{PEK} [g/l]	2·c_{PEK} [g/100 ml]	V_{PEK-Stamm} [ml]	V_{H₂O} [ml]
1:10	0,297	0,0595	59,5	40,5
1:50	0,0595	0,0119	11,9	88,1

6.7 Calciumphosphatzementexperimente

In dieser Arbeit wurde für die Untersuchungen zur Freisetzung aus der Calciumphosphatphase der Calciumphosphatzement Biocement 1.0 der Firma InnoTERE GmbH (Radebeul, Deutschland) verwendet. Dieses Mehrkomponentensystem auf der Basis von α -Tricalciumphosphat (α -TCP) besitzt folgende Zusammensetzung: 58 % α -Tricalciumphosphat, 24 % Calciumhydrogenphosphat-Anhydrid (DCPA), 8,5 % Calciumcarbonat (CaCO_3) und 8,5 % Hydroxylapatit (HA). Zum Abbinden des Calciumphosphatzementes wurde eine Na_2HPO_4 -Lösung (4 Gew.-%) verwendet.

6.7.1 Herstellung der Calciumphosphatzementplättchen

Für die Herstellung der Zementplättchen wurde zunächst eine Silikonfolie mit ausgestanzten Löchern (Höhe 1 mm, \varnothing 10 mm) auf einer befeuchteten Glasplatte platziert. Pro Charge wurden 1 g des Zements mit 400 μl Abbindelösung homogen vermischt. Die entstandene Paste wurde gleichmäßig in die Löcher der Silikonmatrize gestrichen, so dass insgesamt acht Zementplättchen erhalten worden. Anschließend wurde die Silikonform mit einer zweiten Glasplatte abgedeckt. Die Aushärtung der Zementplättchen erfolgte in einer abgeschlossenen, mit etwas Wasser gefüllten Kammer über vier Tage bei 37 °C im Trockenschrank.

6.7.2 Beladung der Zementplättchen

Für die Freisetzungsuntersuchungen aus dem Calciumphosphatzement wurden der reine Wirkstoff, die Copolymere bzw. PEKs und die mit Wirkstoff beladenen polymeren Trägersysteme in die Abbindelösung eingemischt. Um die Freisetzung der reinen Copolymere und PEKs mit UV/Vis-Spektroskopie bestimmen zu können wurden diese polymeren Trägersysteme zunächst mit Rhodamin B-Isothiocyanat markiert. Die Konzentration der verwendeten Wirkstoff- und Copolymerstammlösungen in der 4 Gew.-%igen Na_2HPO_4 -

Lösung und der PEK-Stammlösung in reinem Wasser betrug 1 g/l. Das Ausstreichen und Abbinden der Zementplättchen erfolgte nach dem in **Kapitel 6.7.1** beschriebenen Verfahren. Bei den wirkstoffhaltigen CPC-Plättchen wurde die Aushärtung unter Lichtausschluss durchgeführt.

BZM/CPC, Rh-Copolymer/CPC, Rh-PEK/CPC

Für die Untersuchung der Freisetzung des reinen Wirkstoffes wurden die Konzentrationen 50 µg **BZM**/g CPC und 100 µg **BZM**/g CPC gewählt. Es wurde das entsprechende Volumen der Wirkstoffstammlösung (1 g/l in 4 Gew.-%-iger Na₂HPO₄-Lösung) in ein Eppendorfgefäß überführt, auf 400 µl mit der reinen Abbindelösung aufgefüllt und mit dem Zementpulver vermischt. Analog erfolgte die Zuführung der Rhodamin B-markierten Copolymere (100 µg/g CPC, 200 µg/g CPC und 400 µg/g CPC) in die Zementplättchen. In **Tabelle 6.10** sind die verwendeten Volumina der Wirkstoff- bzw. Copolymerstammlösungen und der reinen Abbindelösung entsprechend der verwendeten Konzentration in 1 g CPC angegeben.

Tabelle 6.10: Eingesetzte Volumina der jeweiligen Stammlösungen und der reinen Abbindelösung in 1 g CPC.

C Stammlösung [µg/g CPC]	V Stammlösung [ml]	V Na ₂ HPO ₄ [ml]
50	0,05	0,35
100	0,1	0,3
200	0,2	0,2
400	0,4	-

Im Fall der Polyelektrolytkomplexe wurden Rh-PEK-Stammlösungen (1 g/l Rh-Copolymer im Rh-PEK) mit den Rhodamin B-markierten Copolymeren in reinem Wasser hergestellt. Erst unmittelbar vor dem Anmischen der CPC-Paste erfolgte die Zugabe von Na₂HPO₄ als Feststoff (5 ml Rh-PEK-Stammlösung + 0,2083 g Na₂HPO₄ $\hat{=}$ 4 Gew.-%-iger Lösung) zur Rh-PEK-Stammlösung. Anschließend wurde das entsprechende Volumen an salzhaltiger Rh-PEK-Stammlösung entnommen und mit reiner Abbindelösung auf 400 µl aufgefüllt. Die Rh-Copolymerkonzentrationen im **Rh-PEK 0.9** betragen 100 µg/g CPC, 200 µg/g CPC und 400 µg/g CPC, die in den **Rh-PEK 1.1-A** und **Rh-PEK 1.1-B** 100 µg/g CPC und 200 µg/g CPC. Analog der **Tabelle 6.10** wurden die gleichen Volumina der Rh-PEK-Stammlösung mit Na₂HPO₄-Salz und der reinen Abbindelösung vereint und mit 1 g CPC gemischt.

BZM/Copolymer/CPC, BZM/PEK/CPC

Bei der Herstellung der AbbindeLösung für die Zementplättchen mit Wirkstoff und Copolymer wurden die entsprechenden Volumina der Wirkstoff- und Copolymerstammlösungen (je 1 g/l in 4 Gew.-%-iger Na₂HPO₄-Lösung) in einem Eppendorfgesäß vereint und mit reiner 4 Gew.-%-igen Na₂HPO₄-Lösung auf 400 µl aufgefüllt (**Tabelle 6.11**). Nach einer Komplexierungszeit von einer Stunde wurde der Zement mit der **BZM/Copolymer**-Lösung homogen gemischt. Die Untersuchung der **BZM**-Freisetzung erfolgte mit den Konzentrationspaaren 50 µg **BZM**/100 µg Copolymer, 100 µg **BZM**/100 µg Copolymer, 50 µg **BZM**/200 µg Copolymer und 100 µg **BZM**/200 µg Copolymer in 1 g CPC.

Tabelle 6.11: Eingesetzte Volumina der jeweiligen Stammlösungen und der reinen AbbindeLösung in 1 g CPC zur Herstellung der beladenen **BZM/Copolymer**-Zemente.

Verhältnis BZM/Copolymer [µg/µg]	V _{BZM-Stamm} [ml]	V _{Stamm (Copolymer bzw. PEK)} [ml]	V _{Na₂HPO₄} [ml]
50/100	0,05	0,1	0,25
100/100	0,1	0,1	0,2
50/200	0,05	0,2	0,15
100/200	0,1	0,2	0,1

Im Falle der CPC-Plättchen mit Wirkstoff und Polyelektrolytkomplex wurde zunächst der PEK-Stammlösung (hergestellt in reinem Wasser) Na₂HPO₄ als Feststoff (5 ml PEK-Stammlösung + 0,2083 g Na₂HPO₄ ≅ 4 Gew.-%-iger Lösung) zugegeben. Für die Konzentrationspaare 50 µg **BZM**/100 µg PEK, 100 µg **BZM**/100 µg PEK und 50 µg **BZM**/200 µg PEK wurden analog der **Tabelle 6.11** die entsprechenden Volumina der PEK-Stammlösung (mit Na₂HPO₄) und **BZM**-Stammlösung in einem Eppendorfgesäß vereint und mit reiner 4 Gew.-%iger Na₂HPO₄-Lösung auf 400 µl aufgefüllt. Nach einer Komplexierungszeit von einer Stunde wurde der Zement mit der **BZM/PEK**-Lösung homogen gemischt.

6.7.3 Wirkstoff- und Copolymerfreisetzung

In UV-durchlässigen Halbmikro-Küvetten wurden die hergestellten Zementplättchen oberhalb des Strahlengangs platziert und mit 2 ml PBS-Puffer befüllt. Die Küvetten wurden mit einem

Deckel verschlossen und mit Parafilm abgedichtet. Die Freisetzung des Wirkstoffes bzw. der Copolymere erfolgte bei 37 °C und unter Lichtschutz im Trockenschrank. Die freigesetzte Wirkstoff- bzw. Copolymermenge in die PBS-Lösung wurde mit UV-Spektroskopie ermittelt. Dafür wurden die Absorptionen 1 h, 3 h, 8 h, 1 d, 2 d, 4 d, 7 d und 14 d nach der Auslagerung gemessen.

6.8 Dynamische Lichtstreuexperimente

6.8.1 Kern-Schale-Architekturen

Entsprechend der Komplexierungsversuche (siehe **Kapitel 6.6.2**) wurde die Copolymerkonzentration 0,119 g/l (1:25) zur Größenbestimmung der Makromoleküle gewählt. Für die Untersuchungen in reinem Wasser und PBS-Puffer wurden zunächst 0,95 mg **PEI(25)-Mal B**, **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** eingewogen, mit 2 ml reinem Wasser bzw. PBS-Lösung aufgefüllt und filtriert (0,45 µl Nylon-Filter). Je 0,5 ml der vierfach konzentrierten Copolymerlösungen wurden anschließend in UV-Küvetten gegeben und mit 1,5 ml reinem Wasser bzw. PBS-Lösung aufgefüllt. Die DLS-Messungen erfolgten sofort nach der Probenpräparation (0 h), nach 3 h und 20 h. Weiterhin wurden DLS-Messungen von **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PAsp-346** und den jeweiligen Oligosaccharidderivaten mit der Konzentration 1,19 g/l in reinem Wasser, PBS-Puffer und in Pufferlösungen der pH-Werte 3, 5 und 9 durchgeführt. Dafür wurden 2,38 mg des jeweiligen Copolymers in 2 ml reinem Wasser bzw. Pufferlösung gelöst und gefiltert. 1 ml der jeweiligen zweifach konzentrierten Copolymerlösung wurde in einer UV-Küvette vorgelegt und mit reinem Wasser bzw. der entsprechenden Pufferlösung aufgefüllt. Die DLS-Messungen erfolgten 20 h nach der Probenpräparation.

6.8.2 Copolymer/BZM-Komplexe

Entsprechend der Komplexierungsversuche (siehe **Kapitel 6.6.2**) wurden Copolymerkonzentrationen mit 0,297 g/l (1:10), 0,119 g/l (1:25) und 0,0595 g/l (1:50) und die Bortezomibkonzentration 30 mg/l verwendet. Zunächst wurden die in **Tabelle 6.12** aufgeführten Mengen an **PEI(25)-Mal B**, **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** in 2 ml reinem Wasser bzw. PBS-Puffer gelöst und filtriert (0,45 µl Nylon-Filter). Weiterhin wurde die vierfache Menge Bortezomib (0,6 mg) in 5 ml reinem Wasser bzw. PBS-Puffer gelöst. In UV-Küvetten wurden je 0,5 ml Copolymerlösung mit 0,5 ml Bortezomiblösung

vereinigt und entsprechend mit 1 ml reinem Wasser bzw. PBS-Lösung aufgefüllt. Die DLS-Messungen der Copolymer/**BZM**-Lösungen erfolgte sofort nach der Präparation (0 h), nach 3 h und 20 h.

Tabelle 6.12: Eingesetzte Mengen an **PEI(25)-Mal B**, **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** zur Herstellung vierfach konzentrierter wässriger Lösungen.

	c [g/l]	4•c [g/l]	m [mg/2 ml]
1:10	0,297	1,188	2,38
1:25	0,119	0,476	0,95
1:50	0,0595	0,238	0,48

6.8.3 Polyelektrolytkomplexe, PEK/**BZM**-Komplexe

Je 2 ml der in **Kapitel 6.5** beschriebenen PEK-Stammlösungen (1 g/l Copolymer im PEK) wurden in UV-Küvetten gegeben und mit DLS gemessen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 83 mg Na_2HPO_4 entsprechend der Präparation der Calciumphosphatzemente (**Kapitel 6.7**) zur Herstellung der 4 w%-igen Na_2HPO_4 -Lösung. Die Partikelgrößen wurden sofort nach Zugabe des Salzes, nach 1 h, 3 h, 24 h, 48 h, 7 d und 14 d bestimmt.

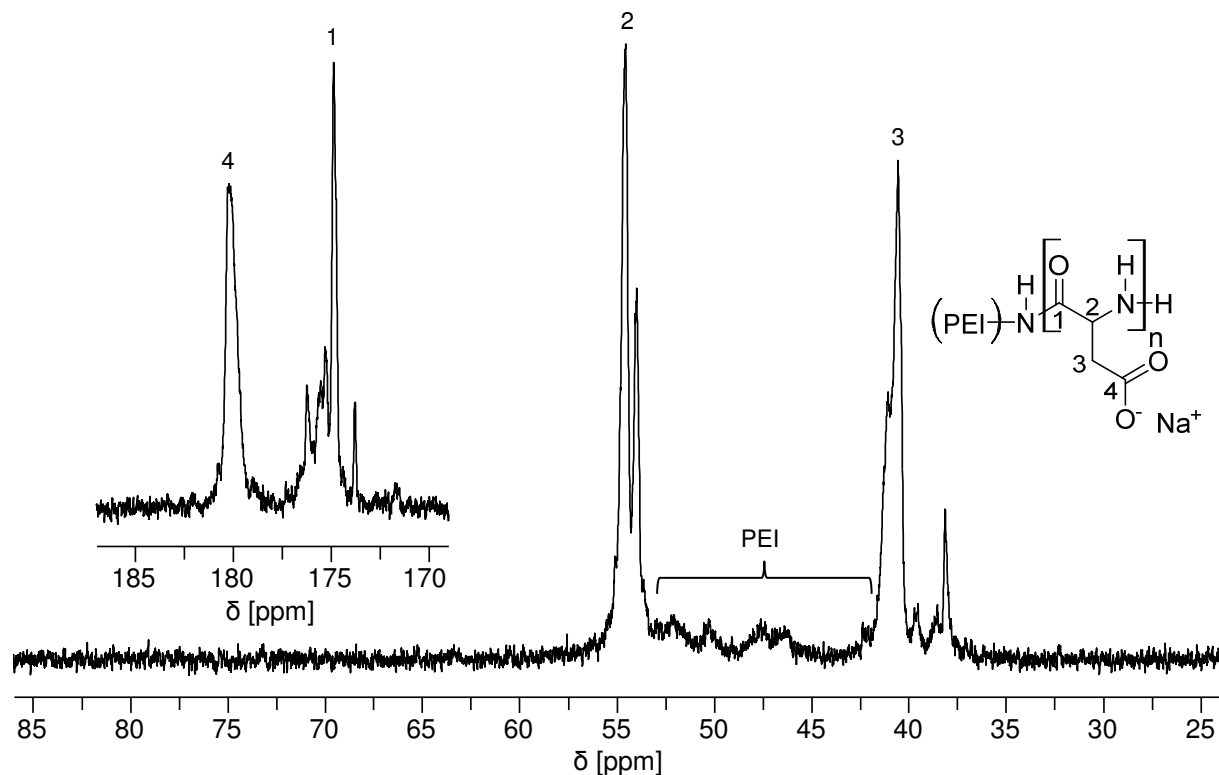
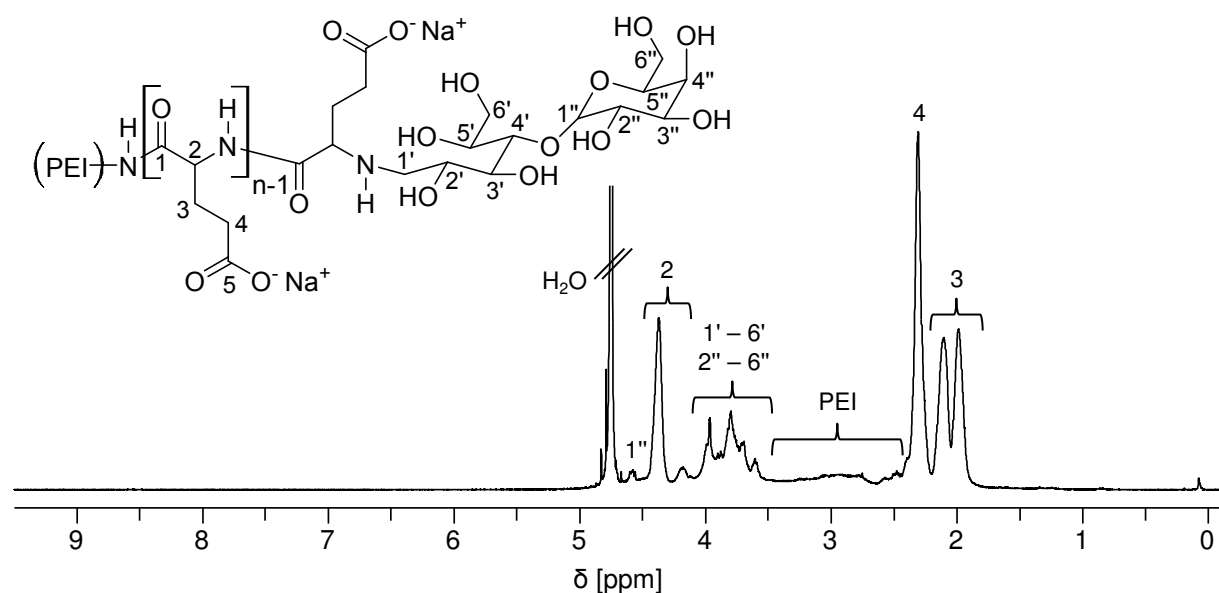
Für die DLS-Untersuchungen der verdünnten PEKs ohne **BZM** wurden zunächst entsprechend den molaren Verhältnissen 2 ml dreifach konzentrierte PEK-Lösungen aus den PEK-Stammlösungen hergestellt. Die dafür benötigten Volumina an PEK-Stammlösung und reinem Wasser sind in **Tabelle 6.13** aufgeführt. In der UV/Vis-Küvette wurden anschließend 0,5 ml der dreifach konzentrierten PEK-Lösung mit 1 ml reinem Wasser verdünnt. Die Ermittlung der hydrodynamischen Durchmesser erfolgt direkt nach der Verdünnung (0 h) nach 3 h und 20 h. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 83 mg Na_2HPO_4 zu den PEK-Lösungen in der UV/Vis-Küvette entsprechend der Präparation der Calciumphosphatzemente (**Kapitel 6.7**) zur Herstellung der 4 Gew.-%-igen Na_2HPO_4 -Lösung. Die Partikelgrößen wurden sofort nach Zugabe des Salzes (0 h), nach 1 h und 3 h bestimmt. Für die Partikelgrößenbestimmung der PEK/**BZM**-Komplexe erfolgte zunächst die Herstellung einer dreifach konzentrierten **BZM**-Lösung (90 mg/l). Dafür wurden 0,45 mg **BZM** in 5 ml reinem Wasser gelöst. Für die DLS-Untersuchungen wurden in der UV/Vis-Küvette 0,5 ml der jeweiligen dreifach konzentrierten PEK-Lösung mit 0,5 ml reinem Wasser und 0,5 ml **BZM**-Lösung gemischt und der hydrodynamische Durchmesser nach 0 h, 3 h und 20 h bestimmt. Anschließend erfolgten wiederum die Zugabe von 83 mg Na_2HPO_4 und die Bestimmung der Partikelgrößen direkt nach Zugabe des Salzes (0 h), nach 1 h und 3 h.

Tabelle 6.13: Volumina an PEK-Stammlösung und reinem Wasser zur Herstellung von je 2 ml verdünnter PEK-Lösung entsprechend den molaren Verhältnissen.

	c [g/l]	3·c [g/l]	V_{PEK-Stamm} [ml]	V_{H₂O} [ml]
1:10	0,297	0,891	1,79	0,21
1:25	0,119	0,357	0,71	1,29
1:50	0,0595	0,179	0,36	1,64

7. Anhang

NMR-Spektroskopie

Abbildung 7.1: ^{13}C -NMR-Spektrum von PEI(5)-PAsp-346, aufgenommen in D_2O Abbildung 7.2: ^1H -NMR-Spektrum von PEI(5)-PGlu-346-Lak, aufgenommen in D_2O .

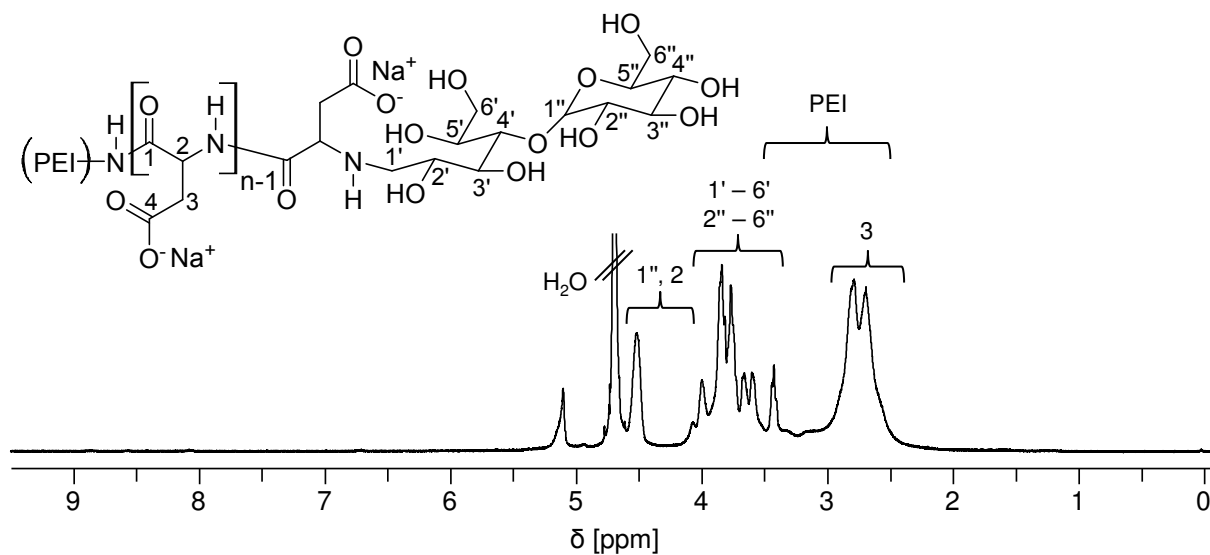


Abbildung 7.3: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von PEI(5)-PAsp-346-Mal, aufgenommen in D_2O .

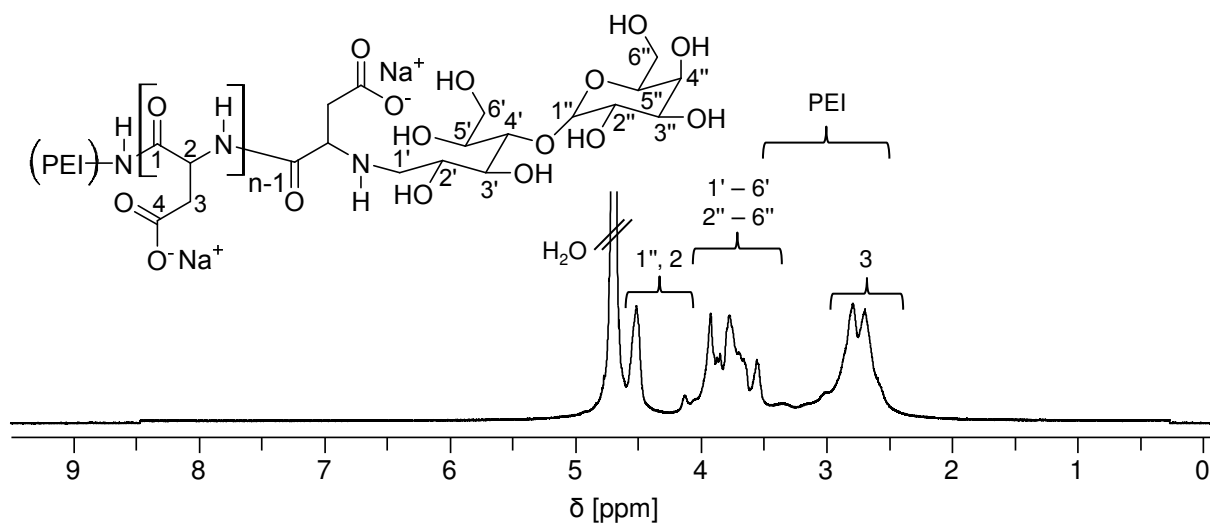


Abbildung 7.4: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von PEI(5)-PAsp-346-Lak, aufgenommen in D_2O .

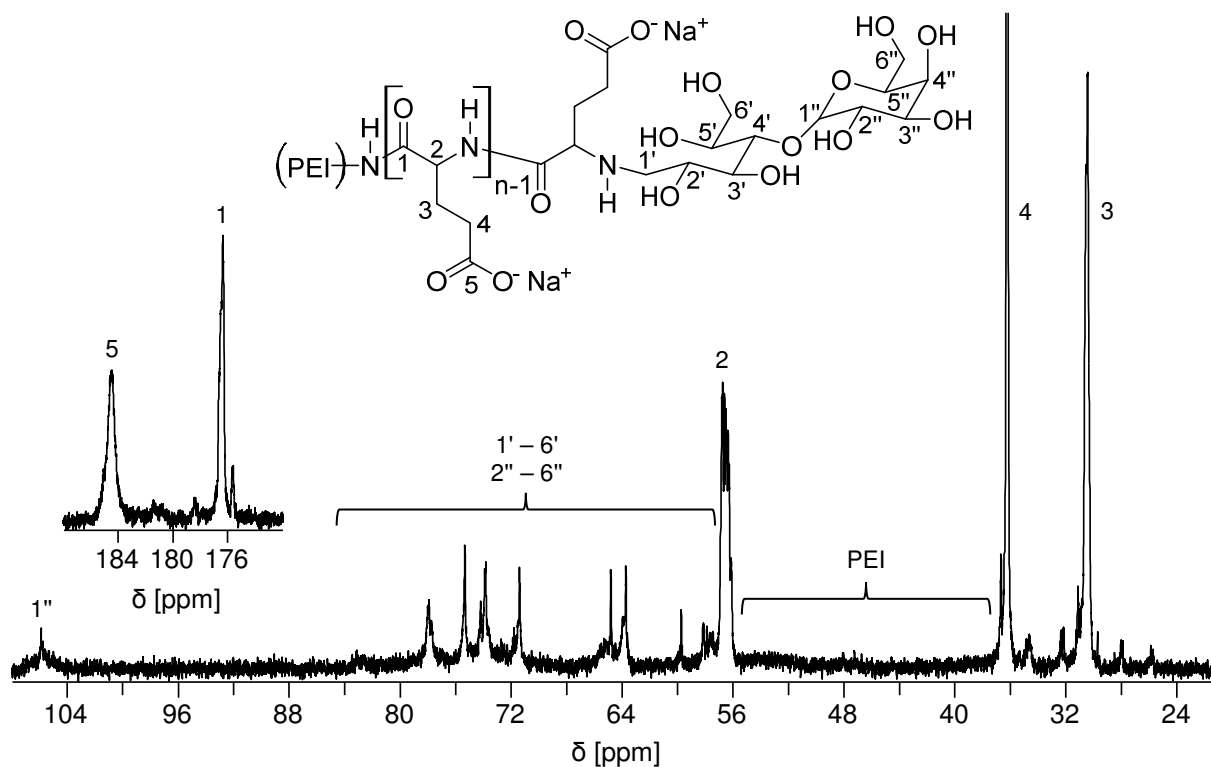


Abbildung 7.5: ^{13}C -NMR-Spektrum von PEI(5)-PGlu-346-Lak, aufgenommen in D_2O .

FTIR-Spektroskopie

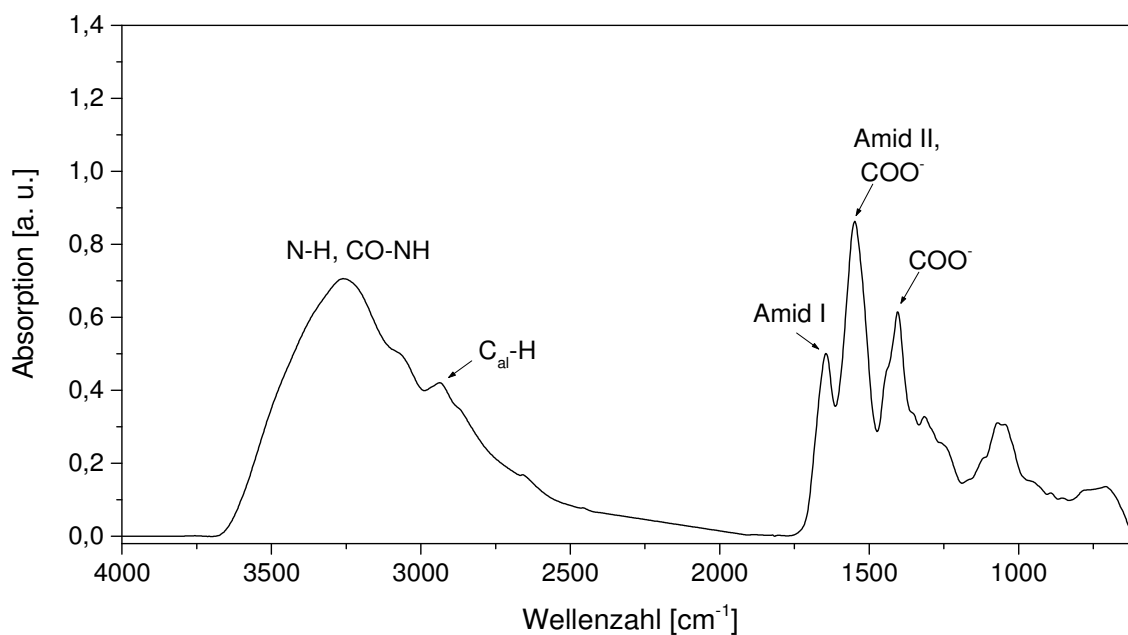


Abbildung 7.6: FT-IR-Spektrum von PEI(5)-PGlu-346-Lak, KBr-Pressling.

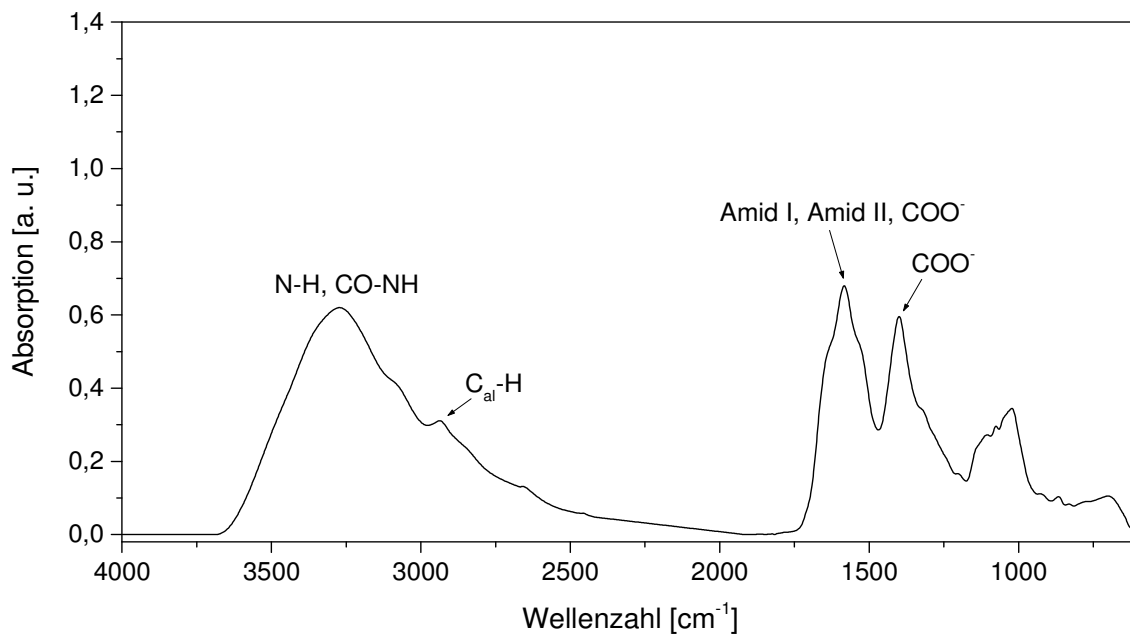


Abbildung 7.7: FT-IR-Spektrum von PEI(5)-PAsp-346-Mal, KBr-Pressling.

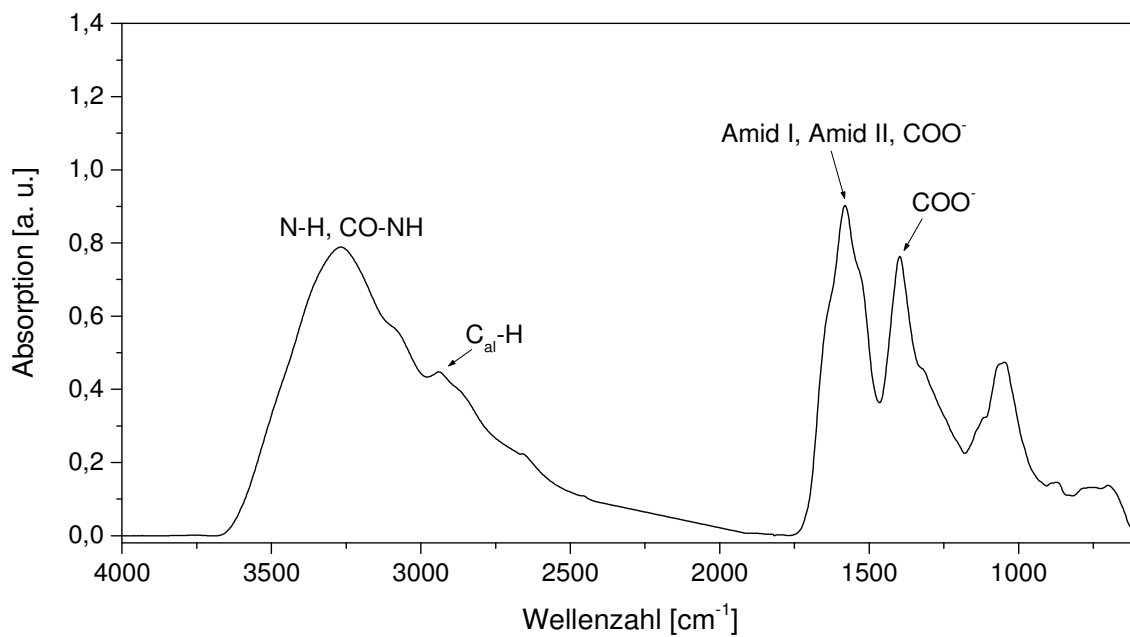
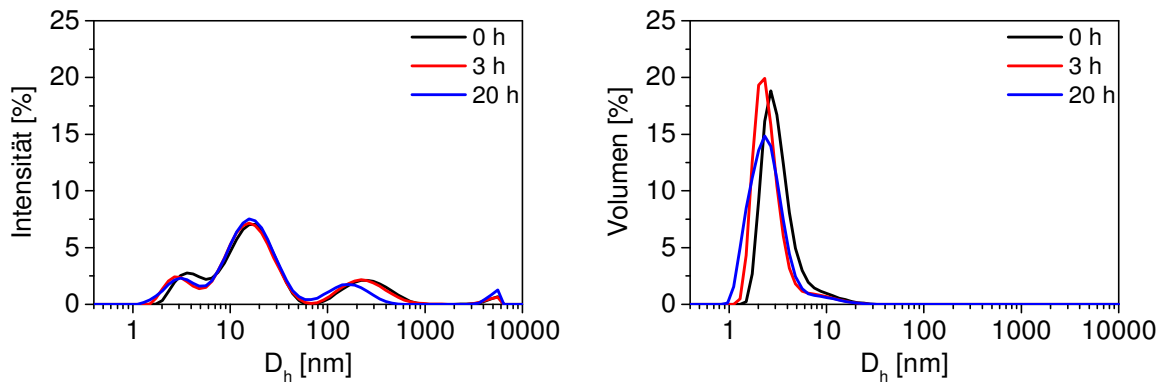
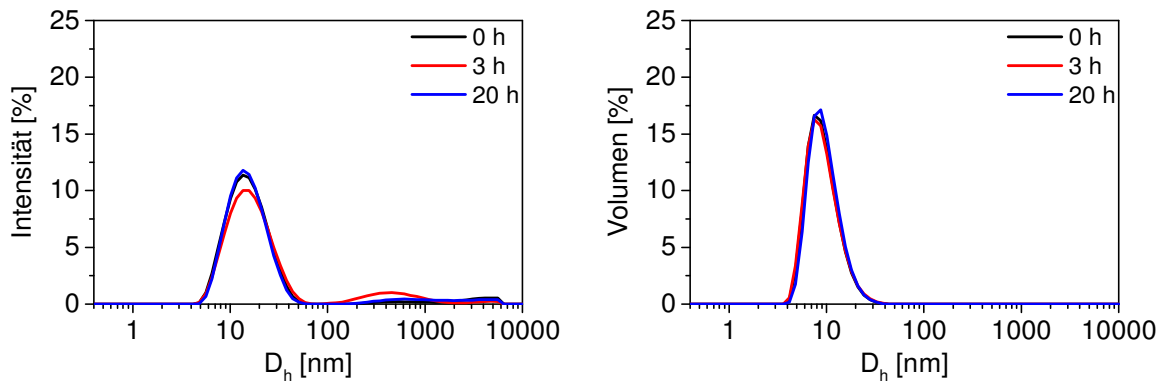
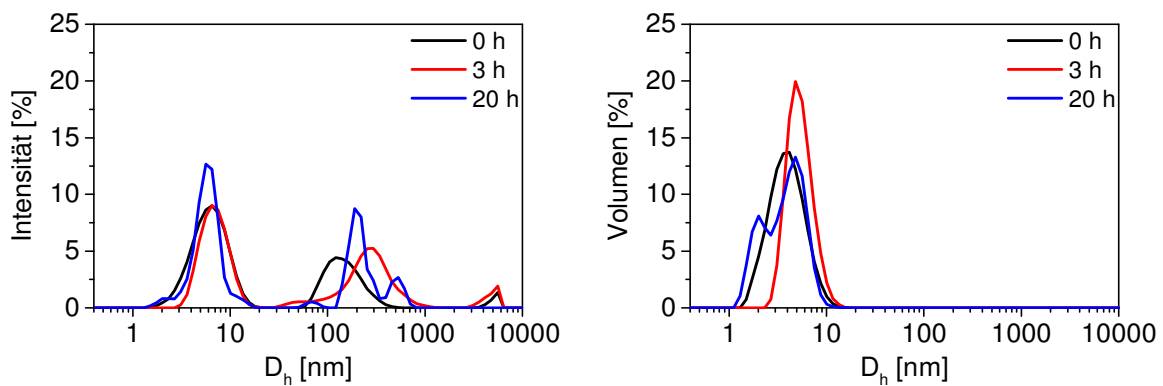


Abbildung 7.8: FT-IR-Spektrum von PEI(5)-PAsp-346-Lak, KBr-Pressling.

Dynamische Lichtstreuung**Abbildung 7.9:** DLS-Verteilungskurven von **PEI(25)-Mal B** ($c = 0,119$ g/l) in reinem Wasser nach 0, 3, 20 h.**Abbildung 7.10:** DLS-Verteilungskurven von **PEI(25)-Mal B** ($c = 0,119$ g/l) in PBS-Lösung nach 0, 3, 20 h.**Abbildung 7.11:** DLS-Verteilungskurven von **PEI(5)-PGlu-346** ($c = 1,19$ g/l) in PBS-Lösung nach 0, 3, 20 h.

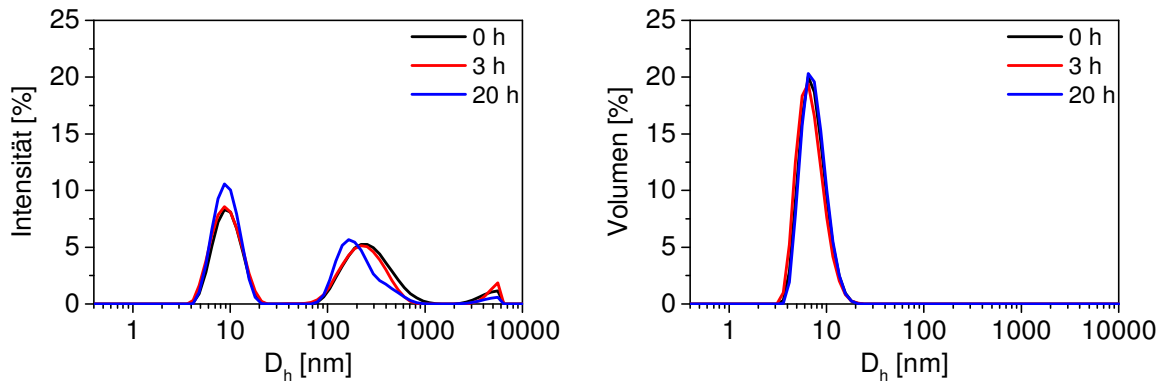


Abbildung 7.12: DLS-Verteilungskurven von **PEI(5)-PGlu-346-Mal** ($c = 1,19$ g/l) in reinem Wasser nach 0, 3, 20 h.

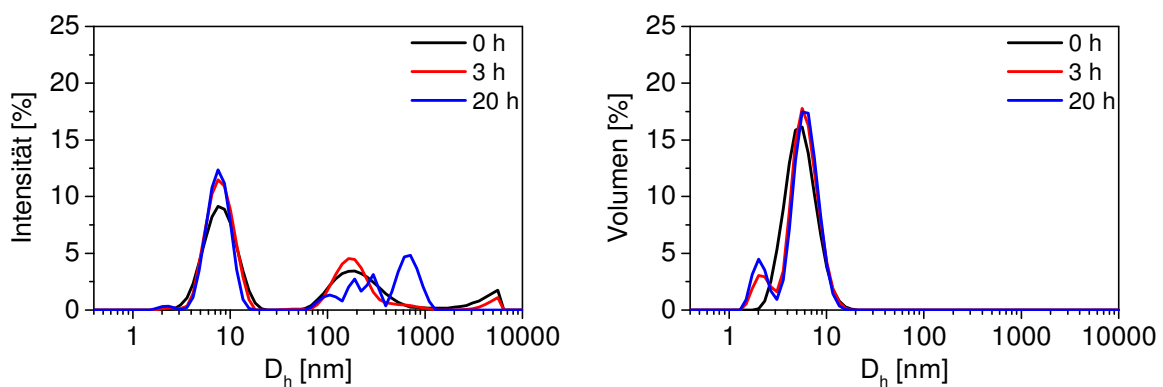


Abbildung 7.13: DLS-Verteilungskurven von **PEI(5)-PGlu-346-Mal** ($c = 1,19$ g/l) in PBS-Lösung nach 0, 3, 20 h.

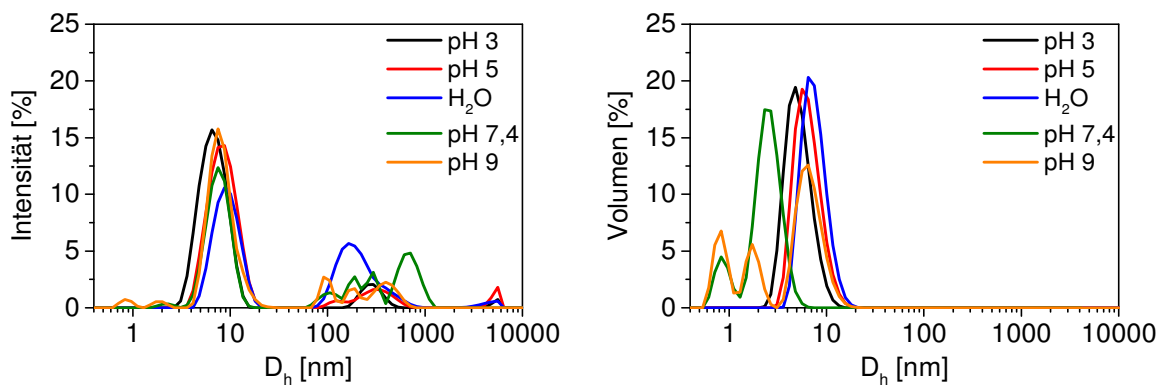


Abbildung 7.14: DLS-Verteilungskurven von **PEI(5)-PGlu-346-Mal** ($c = 1,19$ g/l) in reinem Wasser und PBS-Lösungen pH 3, 5, 7,4 und 9.

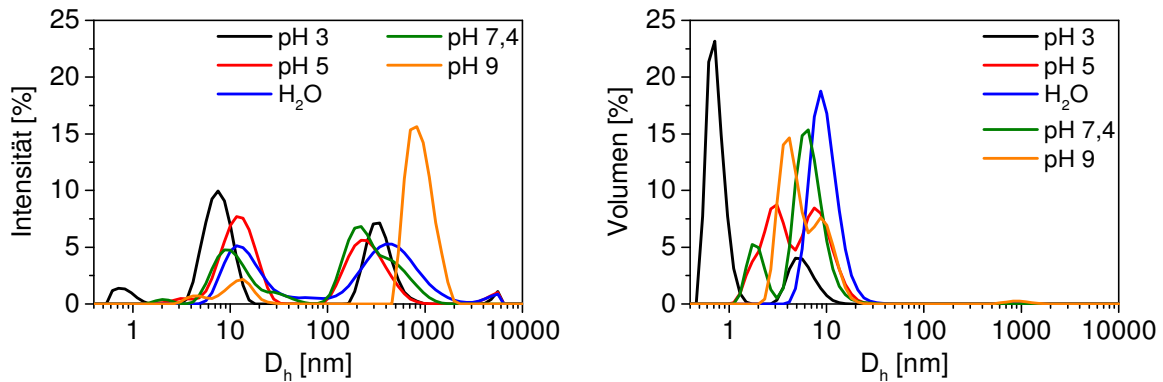


Abbildung 7.15: DLS-Verteilungskurven von **PEI(5)-PGlu-346-Lak** ($c = 1,19$ g/l) in reinem Wasser und PBS-Lösungen pH 3, 5, 7,4 und 9.

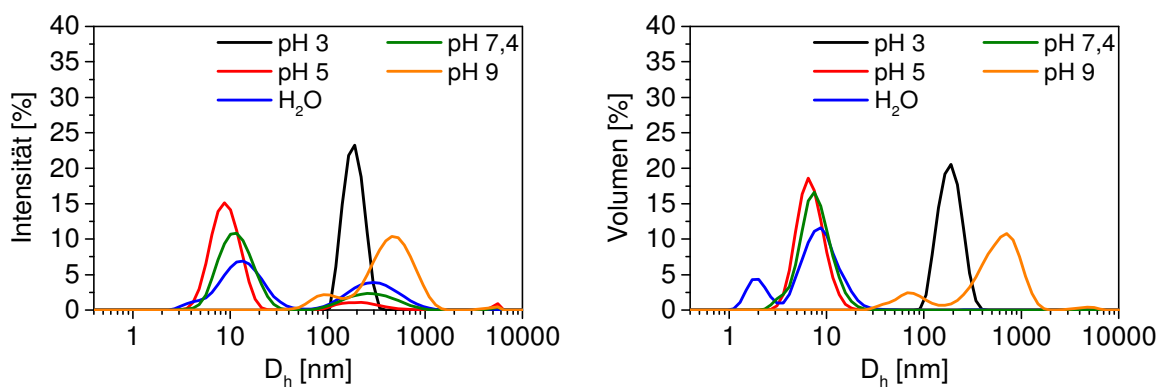


Abbildung 7.16: DLS-Verteilungskurven von **PEI(5)-PAsp-346** ($c = 1,19$ g/l) in reinem Wasser und PBS-Lösungen pH 3, 5, 7,4 und 9.

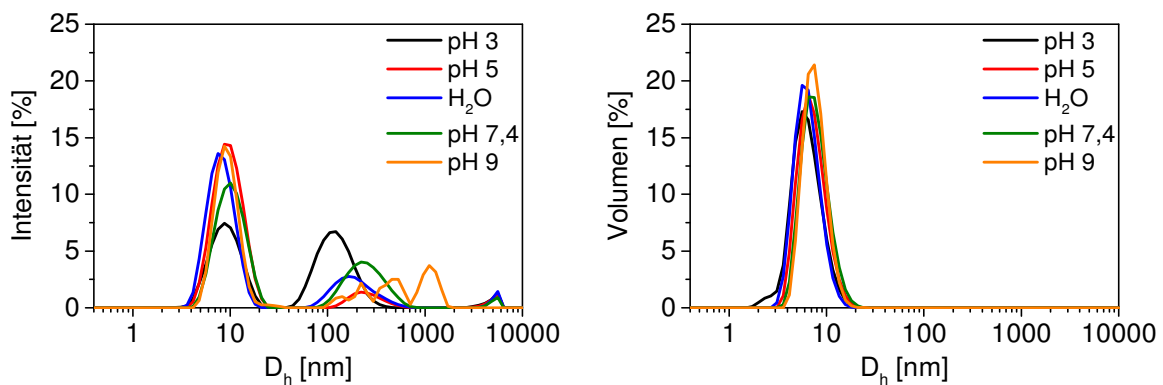


Abbildung 7.17: DLS-Verteilungskurven von **PEI(5)-PAsp-346-Mal** ($c = 1,19$ g/l) in reinem Wasser und PBS-Lösungen pH 3, 5, 7,4 und 9.

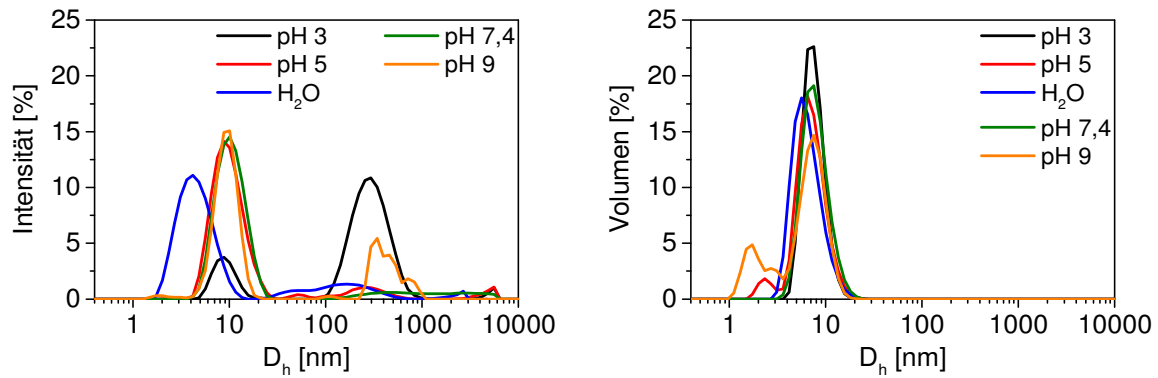


Abbildung 7.18: DLS-Verteilungskurven von **PEI(5)-PAsp-346-Lak** ($c = 1,19$ g/l) in reinem Wasser und PBS-Lösungen pH 3, 5, 7,4 und 9.

Rasterkraftmikroskopie

Tabelle 7.1: Rauigkeit und relative Oberflächendifferenz von **PEI(5)-PGlu-346** und **PEI(5)-PGlu-346-Mal** auf aminosilanisierten Wafern in reinem Wasser und PBS-Puffer pH 7,4 im Vergleich zu reinen aminosilanisierten Siliziumwafern.

	Rauigkeit S_a [nm]		Relative Oberflächendifferenz [%]	
	H_2O	PBS	H_2O	PBS
APS	0,247	0,262	1,35	1,88
PEI(5)-PGlu-346	0,286	0,406	2,20	3,86
PEI(5)-PGlu-346-Mal	0,254	0,307	1,68	2,97

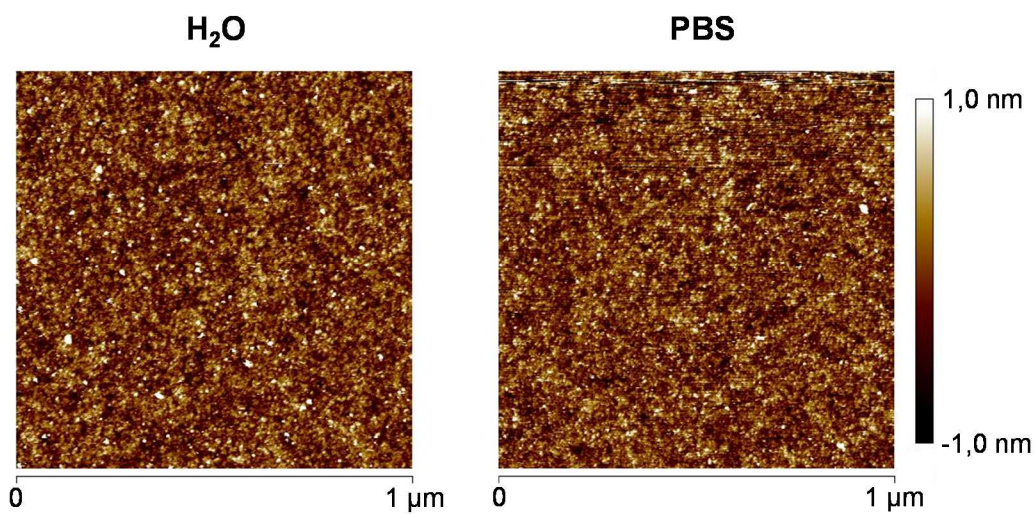


Abbildung 7.19: aminosilanisierte Siliziumwafer in reinem Wasser und PBS-Puffer pH 7,4.

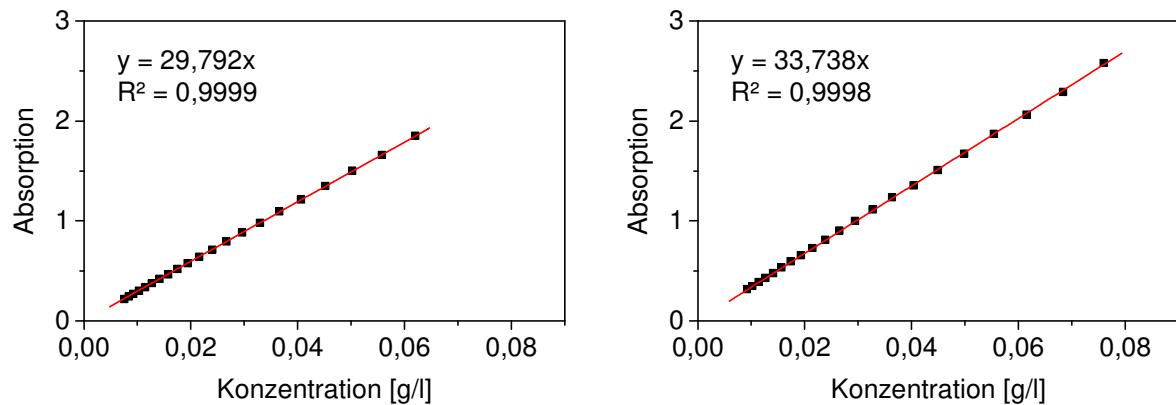
Wirkstoffkomplexierung

Abbildung 7.20: Kalibriergeraden für den Wirkstoff **BZM** in reinem Wasser (links) und PBS-Lösung (rechts).

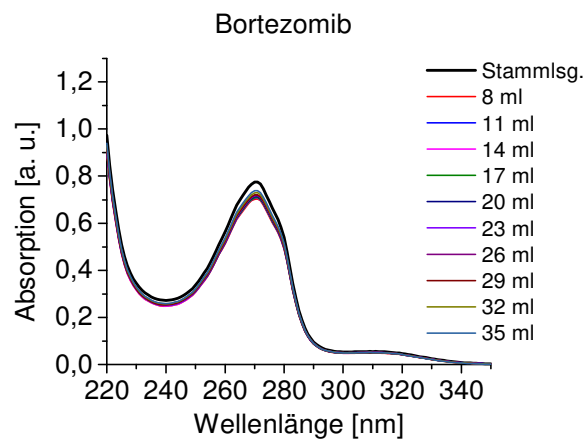


Abbildung 7.21: Membranstabilitätstest von **BZM** (30 mg/l) auf einer PES-Membran (MWCO 1000 Da) in PBS-Lösung pH 7,4.

Tabelle 7.2: prozentualer Anteil bzw. Anzahl (in Klammern) an komplexiertem **BZM** in **PEI(25)-Mal B**.

	H₂O			PBS		
	0h	3h	20h	0h	3h	20h
1:10	68,4 ± 0,1 (7)	67,7 ± 0,03 (7)	67,5 ± 0,3 (7)	51,9 ± 0,7 (5)	52,8 ± 0,1 (5)	54,1 ± 0,7 (5)
1:25	51,9 ± 0,8 (13)	61,6 ± 0,3 (15)	57,9 ± 0,1 (14)	44,5 ± 0,3 (11)	46,8 ± 0,9 (12)	45,0 ± 1,2 (12)
1:50	43,0 ± 1,1 (22)	47,2 ± 0,5 (24)	46,8 ± 0,2 (23)	39,5 ± 1,0 (20)	38,7 ± 0,8 (20)	41,2 ± 1,4 (21)

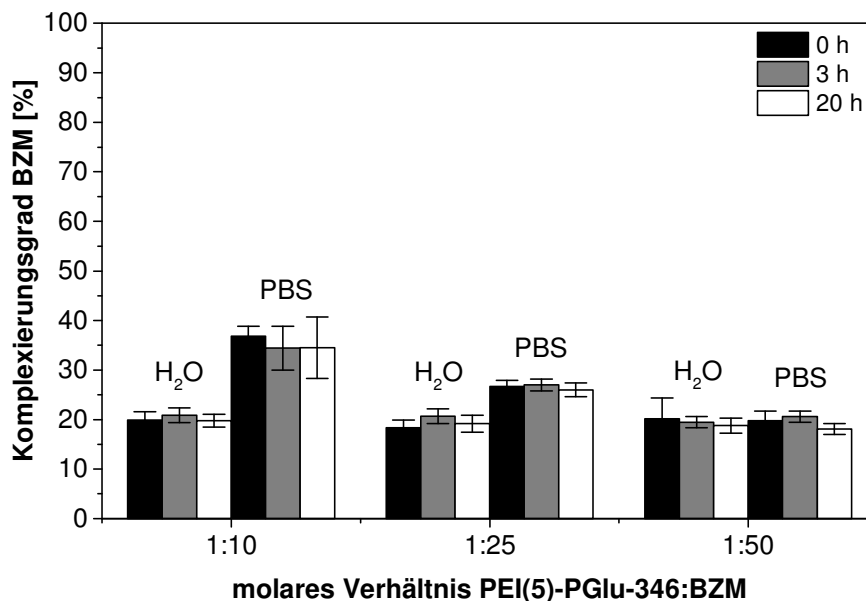


Abbildung 7.22: Komplezierte Menge **BZM** in **PEI(5)-PGlu-346** in reinem H_2O und PBS-Lösung nach 0 h, 3 h und 20 h bei den molaren **PEI(5)-PGlu-346:BZM**-Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50.

Tabelle 7.3: prozentualer Anteil bzw. Anzahl (in Klammern) an komplexiertem **BZM** in **PEI(5)-PGlu-346**.

	H ₂ O			PBS		
	0h	3h	20h	0h	3h	20h
1:10	19,9 ± 1,7 (2)	20,9 ± 1,5 (2)	19,8 ± 1,3 (2)	36,8 ± 2,0 (4)	34,4 ± 4,4 (3)	34,5 ± 6,2 (3)
1:25	18,4 ± 1,5 (5)	20,7 ± 1,5 (5)	19,2 ± 1,7 (5)	26,7 ± 1,2 (7)	27,0 ± 1,2 (7)	26,0 ± 1,4 (7)
1:50	20,2 ± 4,2 (10)	19,5 ± 1,1 (10)	18,8 ± 1,5 (9)	19,8 ± 1,9 (10)	20,6 ± 1,1 (11)	18,1 ± 1,1 (9)

Tabelle 7.4: prozentualer Anteil bzw. Anzahl (in Klammern) an komplexiertem **BZM** in **PEI(5)-PGlu-346-Mal**.

	H₂O			PBS		
	0h	3h	20h	0h	3h	20h
1:10	25,5 ± 1,7 (3)	25,4 ± 3,2 (3)	24,6 ± 1,7 (2)	39,6 ± 1,2 (4)	41,8 ± 1,3 (4)	34,8 ± 1,3 (3)
1:25	23,3 ± 1,2 (6)	23,3 ± 1,4 (6)	23,1 ± 1,1 (6)	30,6 ± 1,3 (8)	36,9 ± 1,3 (9)	29,2 ± 1,5 (7)
1:50	20,3 ± 1,4 (10)	21,1 ± 1,3 (10)	19,5 ± 1,2 (10)	25,7 ± 1,2 (14)	31,5 ± 0,9 (16)	26,9 ± 1,6 (13)

Tabelle 7.5: Hydrodynamische Durchmesser von **PEI(25)-Mal B/BZM**-Komplexen mit den molaren Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50 in reinem Wasser und PBS-Lösung nach 0 h, 3 h und 20 h.

	Reines Wasser			pH 7,4		
	0h	3h	20h	0h	3h	20h
1:10	14 nm	16 nm	16 nm	14 nm	14 nm	14 nm
1:25	13 nm	16 nm	15 nm	12 nm	12 nm	14 nm
1:50	14 nm	14 nm	14 nm	12 nm	12 nm	10 nm

Tabelle 7.6: Hydrodynamische Durchmesser von **PEI(5)-PGlu-346/BZM**-Komplexen mit den molaren Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50 in reinem Wasser und PBS-Lösung nach 0 h, 3 h und 20 h.

	Reines Wasser			pH 7,4		
	0h	3h	20h	0h	3h	20h
1:10	9 nm	8 nm	7 nm	8 nm	6 nm	6 nm
1:25	10 nm	8 nm	9 nm	6 nm	7 nm	7 nm
1:50	10 nm	9 nm	14 nm	7 nm	7 nm	10 nm

Tabelle 7.7: Hydrodynamische Durchmesser von **PEI(5)-PGlu-346-Mal/BZM-Komplexen** mit den molaren Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50 in reinem Wasser und PBS-Lösung nach 0 h, 3 h und 20 h.

	Reines Wasser			pH 7,4		
	0h	3h	20h	0h	3h	20h
1:10	9 nm	9 nm	9 nm	8 nm	8 nm	8 nm
1:25	8 nm	9 nm	9 nm	8 nm	9 nm	8 nm
1:50	70 nm, 400 nm	9 nm, 90 nm, 350 nm	9 nm, 120 nm	9 nm	9 nm	12 nm

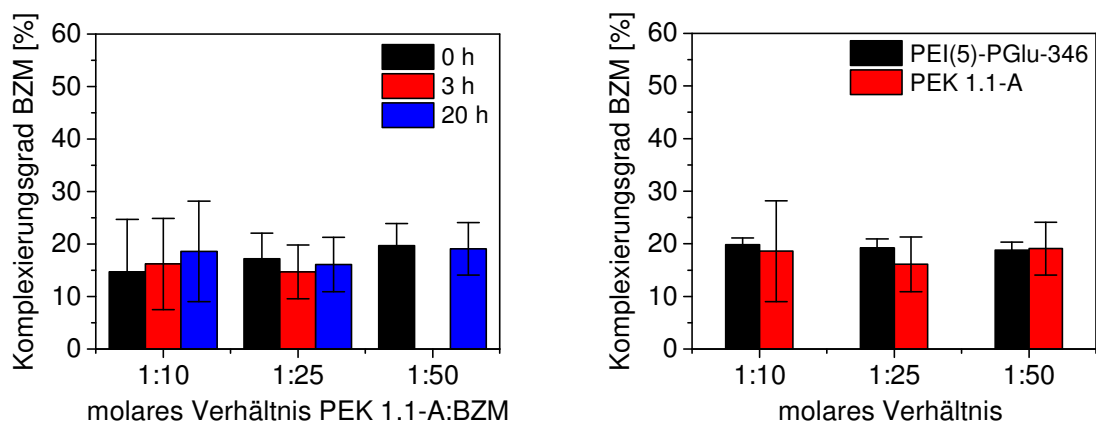


Abbildung 7.23: links: Komplezierte Menge **BZM** in **PEK 1.1-A** in reinem H_2O nach 0 h, 3 h und 20 h bei den molaren Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50; rechts: Vergleich der **BZM-Komplexierung** zwischen **PEI(5)-PGlu-346** und **PEK 1.1-A** nach 20 h.

Tabelle 7.8: prozentualer Anteil bzw. Anzahl (in Klammern) an komplexiertem **BZM** in **PEK 0.9**.

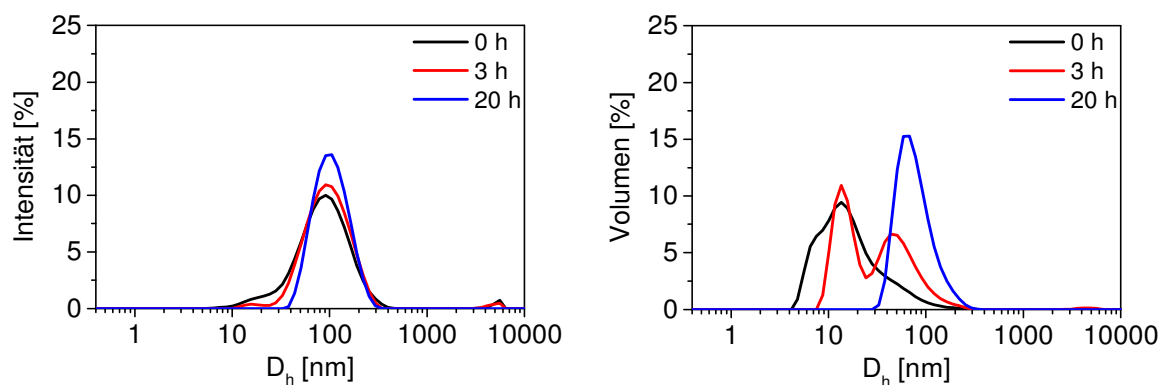
	H_2O		
	0h	3h	20h
1:10	56,4 ± 8,5 (6)	66,8 ± 6,5 (7)	55,6 ± 9,9 (6)
1:25	41,4 ± 10,6 (10)	39,3 ± 4,9 (10)	45,6 ± 6,3 (11)
1:50	30,7 ± 3,5 (15)	33,6 ± 3,7 (17)	39,2 ± 7,4 (20)

Tabelle 7.9: prozentualer Anteil bzw. Anzahl (in Klammern) an komplexiertem **BZM** in **PEK 1.1-A.**

	H₂O		
	0h	3h	20h
1:10	14,7 ± 10 (1)	16,2 ± 8,7 (2)	18,6 ± 9,6 (2)
1:25	17,2 ± 4,9 (4)	14,7 ± 5,1 (4)	16,1 ± 5,2 (4)
1:50	19,7 ± 4,2 (10)	-	19,1 ± 5,0 (10)

Tabelle 7.10: prozentualer Anteil bzw. Anzahl (in Klammern) an komplexiertem **BZM** in **PEK 1.1-B.**

	H₂O		
	0h	3h	20h
1:10	19,4 ± 6,1 (2)	19,2 ± 6,2 (2)	19,8 ± 5,0 (2)
1:25	17,0 ± 3,0 (4)	18,3 ± 3,7 (5)	18,8 ± 6,9 (5)
1:50	19,6 ± 2,4 (10)	19,1 ± 1,3 (10)	16,2 ± 8,2 (8)

**Abbildung 7.24:** DLS-Verteilungskurven von **PEK 0.9** (0,119 g/l) nach 0 h, 3 h und 20 h.

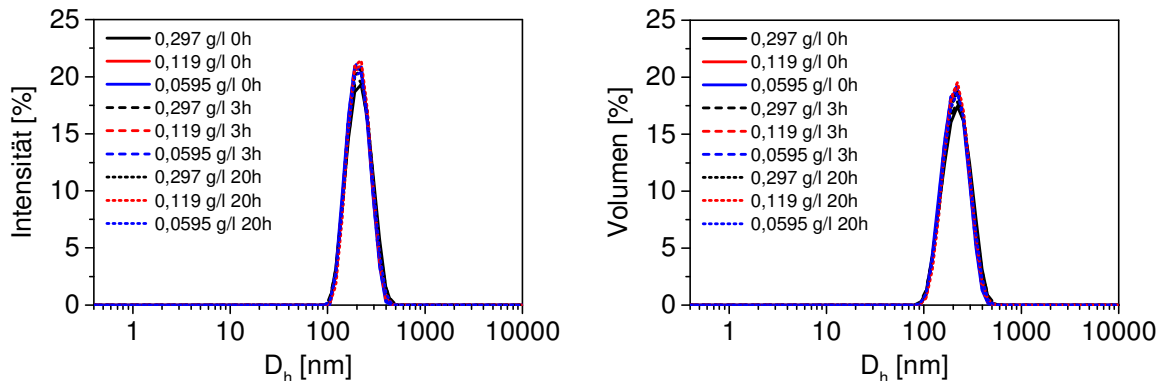


Abbildung 7.25: DLS-Verteilungskurven von **PEK 1.1-A** 0 h, 3 h und 20 h nach dem Verdünnen der **PEK 1.1-A**-Stammlösung (1 g/l **PEI(5)-PGlu-346** im PEK) entsprechend der Wirkstoffkomplexierung in reinem Wasser.

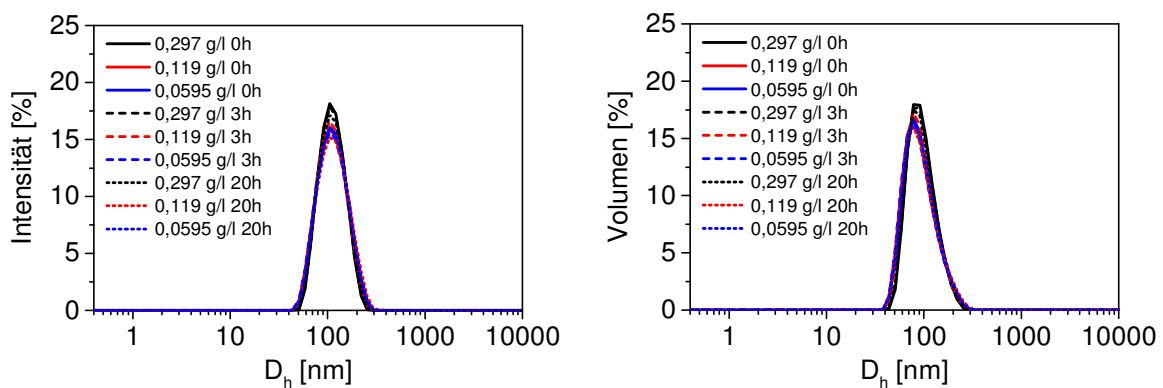


Abbildung 7.26: DLS-Verteilungskurven von **PEK 1.1-B** 0 h, 3 h und 20 h nach dem Verdünnen der **PEK 1.1-B**-Stammlösung (1 g/l **PEI(5)-PGlu-346-Mal** im PEK) entsprechend der Wirkstoffkomplexierung in reinem Wasser.

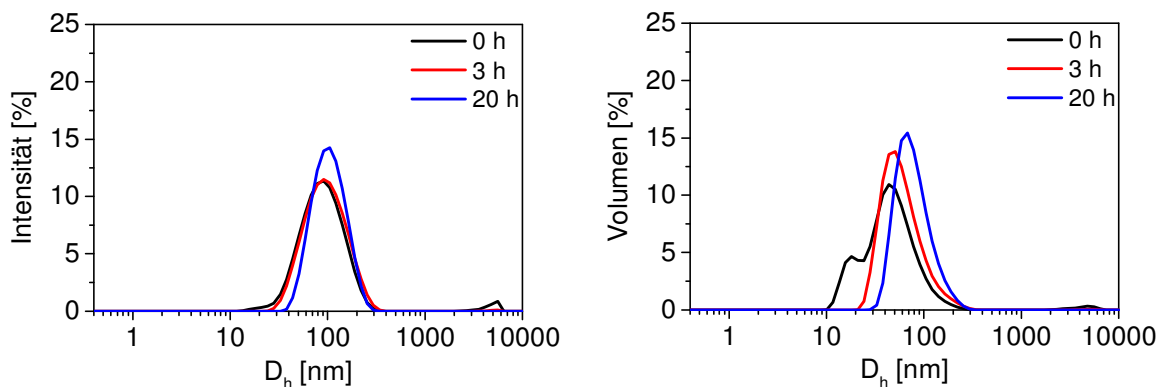


Abbildung 7.27: DLS-Verteilungskurven von **PEK 0.9/BZM 1:25** in reinem Wasser nach 0 h, 3 h und 20 h.

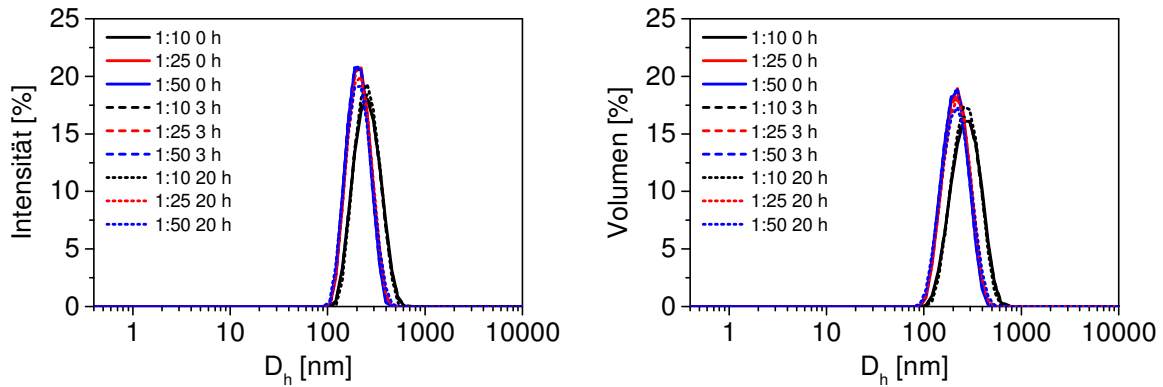


Abbildung 7.28: DLS-Verteilungskurven von **PEK 1.1-A/BZM** 1:10, 1:25 und 1:50 in reinem Wasser nach 0 h, 3 h und 20 h.

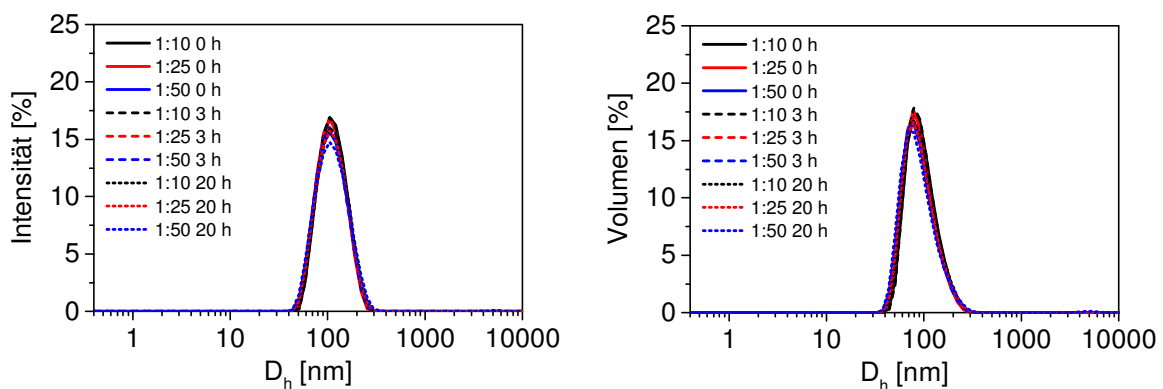


Abbildung 7.29: DLS-Verteilungskurven von **PEK 1.1-B/BZM** 1:10, 1:25 und 1:50 in reinem Wasser nach 0 h, 3 h und 20 h.

Tabelle 7.11: Freigesetzte Menge **Rh-PEI(25)-Mal B** aus **Rh-PEI(25)-Mal B/CPC** bzw. **Rh-PEK 0.9/CPC** innerhalb von 14 Tagen.

Zeit	PEI(25)-Mal B			PEK 0.9		
	100 µg/ g CPC	200 µg/ g CPC	400 µg/ g CPC	100 µg/ g CPC	200 µg/ g CPC	400 µg/ g CPC
1 h	7,9 ± 3,0	9,3 ± 3,8	5,3 ± 1,0	1,0 ± 2,9	0,8 ± 6,6	2,4 ± 2,2
3 h	8,9 ± 4,0	9,1 ± 3,4	5,0 ± 1,0	5,7 ± 3,4	1,4 ± 5,7	3,2 ± 1,9
8 h	14,1 ± 7,9	12,8 ± 4,1	7,9 ± 2,0	-	4,1 ± 3,9	3,9 ± 3,0
1 d	16,3 ± 6,9	17,2 ± 3,1	10,0 ± 1,8	8,8 ± 16,3	8,8 ± 4,8	14,4 ± 3,9
2 d	18,0 ± 4,6	19,2 ± 2,8	13,9 ± 1,4	9,3 ± 10,0	12,6 ± 5,6	20,0 ± 2,9
4 d	24,8 ± 7,6	25,2 ± 4,5	20,6 ± 4,2	13,6 ± 12,9	17,1 ± 5,4	23,9 ± 3,9
7 d	28,2 ± 5,2	27,9 ± 4,5	23,6 ± 2,6	14,2 ± 10,7	18,8 ± 4,8	30,1 ± 4,3
14 d	26,0 ± 11,9	30,6 ± 4,3	33,9 ± 2,4	13,2 ± 9,3	22,4 ± 5,0	32,2 ± 2,8

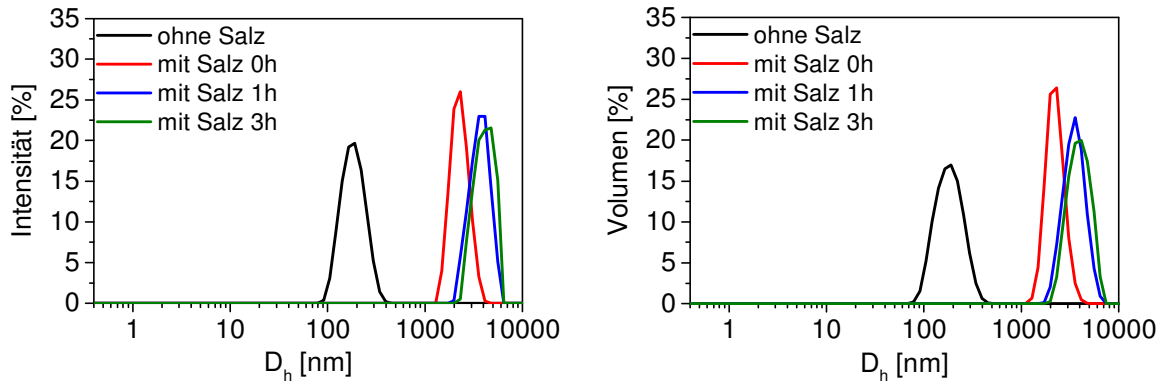


Abbildung 7.30: DLS-Verteilungskurven von **PEK 1.1-A** (1 g/l) mit Na₂HPO₄ (4 Gew.-%) nach 0 h, 3 h und 20 h.

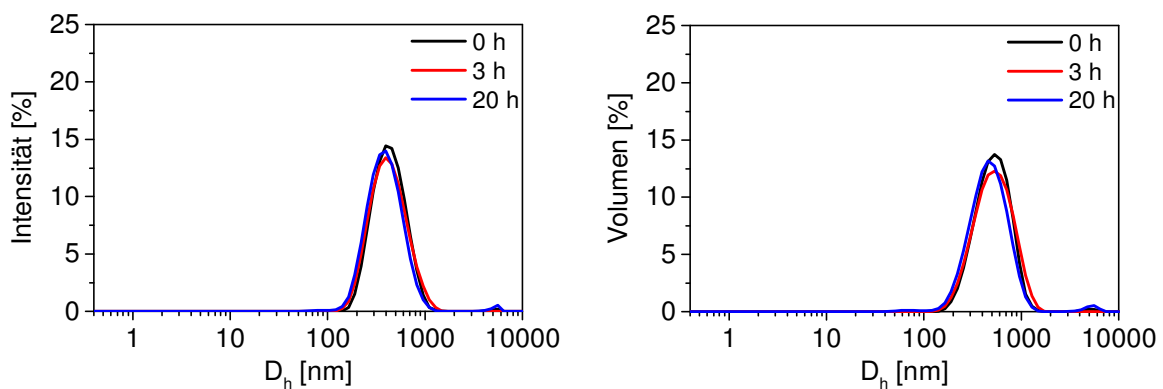


Abbildung 7.31: DLS-Verteilungskurven von **PEK 1.1-A** (0,297 g/l) mit Na₂HPO₄ (4 Gew.-%) nach 0 h, 3 h und 20 h.

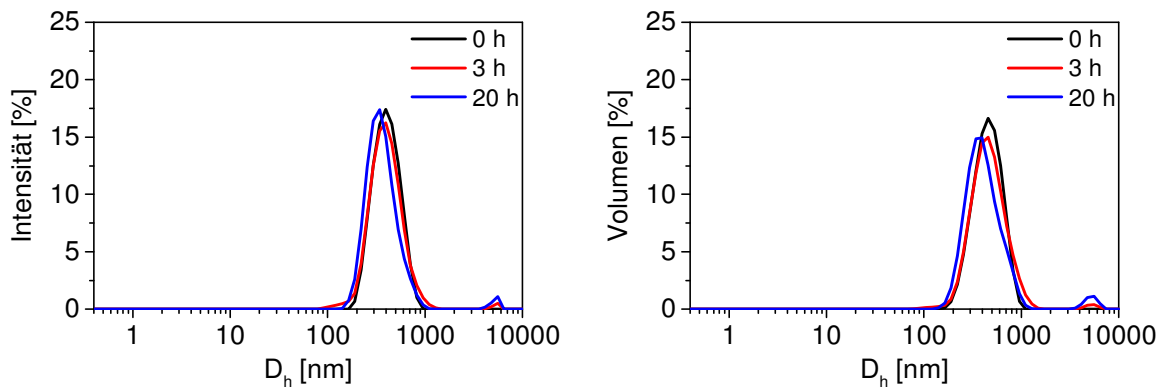


Abbildung 7.32: DLS-Verteilungskurven von **PEK 1.1-A** (0,119 g/l) mit Na₂HPO₄ (4 Gew.-%) nach 0 h, 3 h und 20 h.

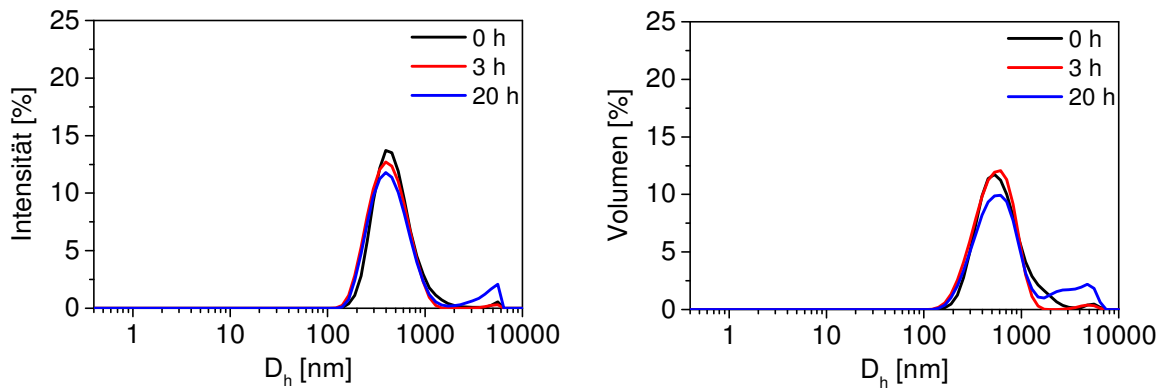


Abbildung 7.33: DLS-Verteilungskurven von **PEK 1.1-A** (0,0595 g/l) mit Na_2HPO_4 (4 Gew.-%) nach 0 h, 3 h und 20 h.

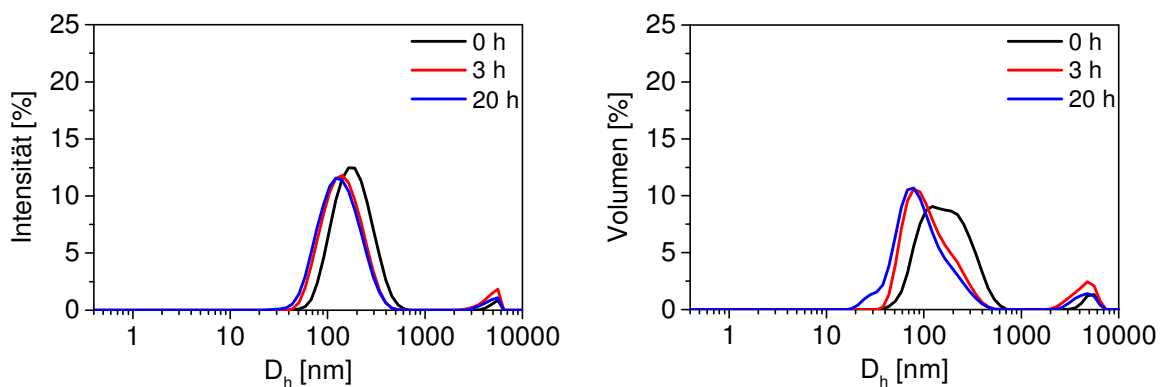


Abbildung 7.34: DLS-Verteilungskurven von **PEK 1.1-B** (0,297 g/l) mit Na_2HPO_4 (4 Gew.-%) nach 0 h, 3 h und 20 h.

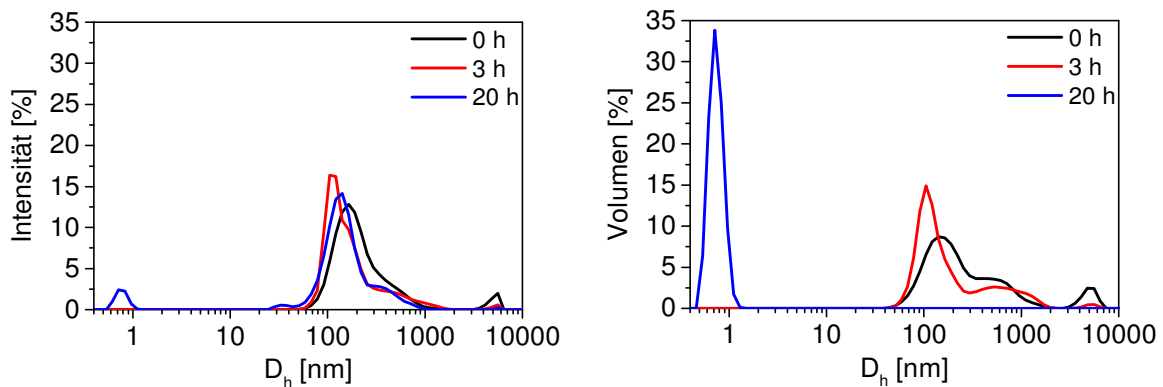


Abbildung 7.35: DLS-Verteilungskurven von **PEK 1.1-B** (0,0595 g/l) mit Na_2HPO_4 (4 Gew.-%) nach 0 h, 3 h und 20 h.

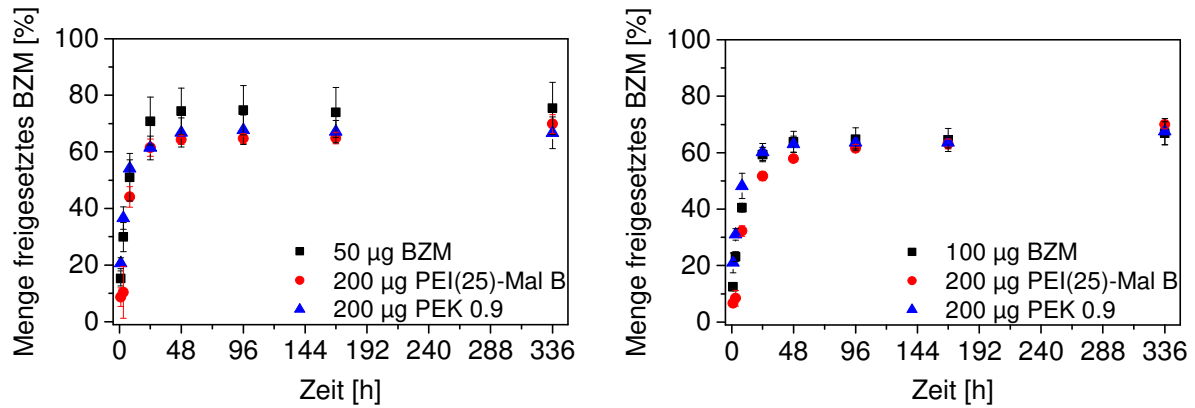


Abbildung 7.36: Freisetzungsrate von **BZM** aus **BZM/PEI(25)-Mal B/CPC** und **BZM/PEK 0.9/CPC** innerhalb von 14 Tagen, links – Konzentrationspaar 50 µg/200 µg, rechts – Konzentrationspaar 100 µg/200 µg.

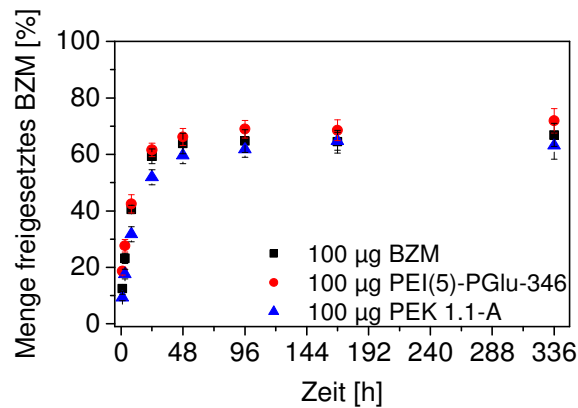


Abbildung 7.37: Freisetzungsrate von **BZM** aus **BZM/PEI(5)-PGlu-346/CPC** und **BZM/PEK 1.1-A/CPC** innerhalb von 14 Tagen, Konzentrationspaar 100 µg/100 µg.

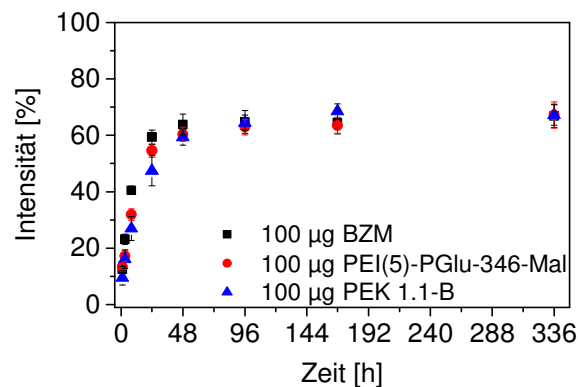


Abbildung 7.38: Freisetzungsrate von **BZM** aus **BZM/PEI(5)-PGlu-346-Mal/CPC** und **BZM/PEK 1.1-B/CPC** innerhalb von 14 Tagen, Konzentrationspaar 100 µg/100 µg.

8. Literaturverzeichnis

- [1] Cancer, International A. f. R. a., *World Cancer Report 2014*. **2014**.
- [2] van Driel, M.; van Leeuwen, J. P. T. M., *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2014**, *561* (0), 159-166.
- [3] Papamerkouriou, Y. M.; Kenanidis, E.; Gamie, Z.; Papavasiliou, K.; Kostakos, T.; Potoupnis, M.; Sarris, I.; Tsiridis, E.; Kyrkos, J., *Expert Opinion on Biological Therapy* **2015**, *15* (2), 213-230.
- [4] Jain, K.; Kesharwani, P.; Gupta, U.; Jain, N. K., *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, *394* (1-2), 122-142.
- [5] Turnbull, W. B.; Stoddart, J. F., *Reviews in Molecular Biotechnology* **2002**, *90* (3-4), 231-255.
- [6] Thula, T. T.; Svedlund, F.; Rodriguez, D. E.; Podschun, J.; Pendi, L.; Gower, L. B., *Polymers* **2011**, *3* (1), 10.
- [7] Wazen, R. M.; Tye, C. E.; Goldberg, H. A.; Hunter, G. K.; Smith, C. E.; Nanci, A., *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **2007**, *55* (1), 35-42.
- [8] Rink, L.; Kruse, A.; Haase, H., *Immunologie für Einsteiger*. Germany, **2015**; Vol. 2.
- [9] Das Multiple Myelom - Eine Einführung. http://www.myelom-nrw.de/fileadmin/user_upload/Downloads/PMM-Wissen/pmm-wissen-1.pdf (08.01.2016).
- [10] Anderson, K. C.; Carrasco, R. D., *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **2011**, *6* (1), 249-274.
- [11] Oranger, A.; Carbone, C.; Izzo, M.; Grano, M., *Clinical and Developmental Immunology* **2013**, *2013*, 1-11.
- [12] Reagan, M. R.; Liaw, L.; Rosen, C. J.; Ghobrial, I. M., *Bone* **75**, 161-169.
- [13] Bianchi, G.; Anderson, K. C., *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2014**, *64* (6), 422-444.
- [14] Röllig, C.; Knop, S.; Bornhäuser, M., *The Lancet* **2014**, (0).
- [15] Smith, D.; Yong, K., *BMJ* **2013**, *346*.
- [16] Goldschmidt, H. Therapie und Nachsorge des Multiplen Myeloms. <http://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/multiples-myelom-plasmozytom-morbus-kahler/therapie.html> (09.01.2016).
- [17] Oryan, A.; Kamali, A.; Moshiri, A., *J Control Release* **2015**, *215*, 12-24.
- [18] Singh, T.; Kaur, V.; Kumar, M.; Kaur, P.; Murthy, R. S. R.; Rawal, R. K., *Journal of Drug Targeting* **2015**, *23* (1), 1-15.
- [19] U., M., *pharma-kritik* **2006**, *28* (5), 17-20.
- [20] Kaufman, J. L.; Lonial, S., *Oncology Research and Treatment* **2006**, *29* (4), 162-168.
- [21] Adams, J., *Nat Rev Cancer* **2004**, *4* (5), 349-360.
- [22] Bertsche, T.; Schulz, M., *Pharmazeutische Zeitung* **2004**, *40*.

-
- [23] Ivanov, A. S.; Zhalnina, A. A.; Shishkov, S. V., *Tetrahedron* **2009**, *65* (34), 7105-7108.
- [24] Hing, K. A., *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **2004**, *362* (1825), 2821-2850.
- [25] Oryan, A.; Alidadi, S.; Moshiri, A.; Maffulli, N., *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* **2014**, *9* (1), 18.
- [26] Elsalanty, M.; Genecov, D., *Craniomaxillofac Trauma Reconstr* **2009**, *2*, 125 - 134.
- [27] Sanan, A.; Haines, S. J., *Neurosurgery* **1997**, *40* (3), 588-603.
- [28] Macewen, W., *Proceedings of the Royal Society of London* **1881**, *32* (212-215), 232-247.
- [29] Kao, S. T.; Scott, D. D., *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America* **2007**, *19* (4), 513-521.
- [30] Moore, W. R.; Graves, S. E.; Bain, G. I., *ANZ Journal of Surgery* **2001**, *71* (6), 354-361.
- [31] Kolk, A.; Handschel, J.; Drescher, W.; Rothamel, D.; Kloss, F.; Blessmann, M.; Heiland, M.; Wolff, K.-D.; Smeets, R., *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* **2012**, *40* (8), 706-718.
- [32] Blokhuis, T. J.; Arts, J. J. C., *Injury* **2011**, *42*, Supplement 2 (0), S26-S29.
- [33] Laurencin, C. T.; El-Amin, S., F., *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* **2008**, *16* (1), 4-8.
- [34] Bhatnagar, R. S.; Qian, J. J.; Wedrychowska, A. W., *Tissue Eng* **1999**, *5*, 53-65.
- [35] Mahapatro, A., *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering* **2012**, *2* (4), 259-268.
- [36] Matusiewicz, H., *Acta Biomaterialia* **2014**, *10* (6), 2379-2403.
- [37] Gu, X.-N.; Li, S.-S.; Li, X.-M.; Fan, Y.-B., *Front. Mater. Sci.* **2014**, *8* (3), 200-218.
- [38] Lyndon, J. A.; Boyd, B. J.; Birbilis, N., *J Control Release* **2014**, *179* (0), 63-75.
- [39] Goriainov, V.; Cook, R.; M. Latham, J.; G. Dunlop, D.; Oreffo, R. O. C., *Acta Biomaterialia* **2014**, *10* (10), 4043-4057.
- [40] Variola, F.; Brunski, J. B.; Orsini, G.; Tambasco de Oliveira, P.; Wazen, R.; Nanci, A., *Nanoscale* **2011**, *3* (2), 335-353.
- [41] Lewis, G., *J Mater Sci: Mater Med* **2013**, *24* (10), 2293-2325.
- [42] Li, Y. H.; Sun, Z. Q.; Li, X. L.; Ding, P. P.; Gong, L. K., *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* **2014**, *16* (5-6), 513-518.
- [43] Singh, R.; Lee, P. D.; Dashwood, R. J.; Lindley, T. C., *Materials Technology* **2010**, *25* (3-4), 127-136.
- [44] Mohandas, G.; Oskolkov, N.; McMahon, M. T.; Walczak, P.; Janowski, M., *Acta Neurobiologiae Experimentalis* **2014**, *74* (2), 188-196.
- [45] Yang, H.; Li, J.; Zhou, Z.; Ruan, J., *Materials Letters* **2013**, *100* (0), 152-155.
- [46] Oriňák, A.; Oriňáková, R.; Králová, Z.; Turoňová, A.; Kupková, M.; Hrubovčáková, M.; Radoňák, J.; Džunda, R., *J Porous Mater* **2014**, *21* (2), 131-140.
-

-
- [47] Orinakova, R.; Orinak, A.; Buckova, L. M.; Giretova, M.; Medvecký, L.; Labbanczova, E.; Kupkova, M.; Hrubovcaková, M.; Koval, K., *International Journal of Electrochemical Science* **2013**, 8 (12), 12451-12465.
- [48] Holzapfel, B. M.; Reichert, J. C.; Schantz, J.-T.; Gbureck, U.; Rackwitz, L.; Nöth, U.; Jakob, F.; Rudert, M.; Groll, J.; Hutmacher, D. W., *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, 65 (4), 581-603.
- [49] Mervi Puska, A. J. A. a. P. V., Polymer Composites for Bone Reconstruction. In *Polymer Composites for Bone Reconstruction, Advances in Composite Materials - Analysis of Natural and Man-Made Materials*, Těšínova, P., Ed. Finland, **2011**; 55-73.
- [50] Schnürer, S. M.; Gopp, U.; Kühn, K. D.; Breusch, S. J., *Orthopäde* 2003, 32 (1), 2-10.
- [51] Dorozhkin, S. V.; Epple, M., *Angewandte Chemie* 2002, 114 (17), 3260-3277.
- [52] Dorozhkin, S. V., *Biomaterials* 2010, 31 (7), 1465-1485.
- [53] LeGeros, R. Z., *Clinical Orthopaedics and Related Research* **2002**, 395, 81-98.
- [54] Ooms, E. M.; Wolke, J. G. C.; van der Waerden, J. P. C. M.; Jansen, J. A., *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, 61 (1), 9-18.
- [55] Dorozhkin, S., *Materials* **2009**, 2 (2), 399-498.
- [56] Dorozhkin, S. V., *International Journal of Materials and Chemistry* **2011**, 1 (1), 1-48.
- [57] Ginebra, M.-P.; Canal, C.; Espanol, M.; Pastorino, D.; Montufar, E. B., *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, 64 (12), 1090-1110.
- [58] Zhang, J.; Liu, W.; Schnitzler, V.; Tancret, F.; Bouler, J.-M., *Acta Biomaterialia* **2014**, 10 (3), 1035-1049.
- [59] Bohner, M.; Gbureck, U.; Barralet, J. E., *Biomaterials* **2005**, 26 (33), 6423-6429.
- [60] Bohner, M., *European Cells & Materials* **2010**, 20, 1-12.
- [61] Ginebra, M. P.; Espanol, M.; Montufar, E. B.; Perez, R. A.; Mestres, G., *Acta Biomaterialia* **2010**, 6 (8), 2863-2873.
- [62] Whitehouse, M.; Blom, A., *Materials* **2009**, 2 (4), 1895-1907.
- [63] Kamitakahara, M.; Ohtsuki, C.; Miyazaki, T., *Journal of Biomaterials Applications* **2008**, 23 (3), 197-212.
- [64] Tinschert, J.; Natt, G.; Mohrbotter, N.; Spiekermann, H.; Schulze, K. A., *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2007**, 80B (2), 317-321.
- [65] Huet, R.; Sakona, A.; Kurtz, S. M., *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **2011**, 4 (3), 476-483.
- [66] Afzal, A., *Materials Express* **2014**, 4 (1), 1-12.
- [67] Ducheyne, P.; Qiu, Q., *Biomaterials* **1999**, 20 (23-24), 2287-2303.
- [68] Brauer, D. S., *Angewandte Chemie* **2015**, 127 (14), 4232-4254.
- [69] Hum, J.; Boccaccini, A., *J Mater Sci: Mater Med* **2012**, 23 (10), 2317-2333.
- [70] James, R.; Deng, M.; Laurencin, C.; Kumbar, S., *Front. Mater. Sci.* **2011**, 5 (4), 342-357.
- [71] Murugan, R.; Ramakrishna, S., *Composites Science and Technology* **2005**, 65 (15-16), 2385-2406.
-

-
- [72] Rawat, M.; Singh, D.; Saraf, S.; Saraf, S., *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2006**, 29 (9), 1790-1798.
- [73] Malafaya, P. B.; Silva, G. A.; Baran, E. T.; Reis, R. L., *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **2002**, 6 (4), 283-295.
- [74] Ginebra, M. P.; Traykova, T.; Planell, J. A., *J Control Release* **2006**, 113 (2), 102-110.
- [75] Stallmann, H. P.; Faber, C.; Bronckers, A.; Amerongen, A. V. N.; Wuisman, P., *Bmc Musculoskeletal Disorders* **2006**, 7.
- [76] Bohner, M.; Lemaitre, J.; VanLanduyt, P.; Zambelli, P. Y.; Merkle, H. P.; Gander, B., *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1997**, 86 (5), 565-572.
- [77] Joosten, U.; Joist, A.; Frebel, T.; Brandt, B.; Diederichs, S.; von Eiff, C., *Biomaterials* **2004**, 25 (18), 4287-4295.
- [78] Gbureck, U.; Vorndran, E.; Barralet, J. E., *Acta Biomaterialia* **2008**, 4 (5), 1480-1486.
- [79] Hamanishi, C.; Kitamoto, K.; Tanaka, S.; Otsuka, M.; Doi, Y.; Kitahashi, T., *Journal of Biomedical Materials Research* **1996**, 33 (3), 139-143.
- [80] Urabe, K.; Naruse, K.; Hattori, H.; Hirano, M.; Uchida, K.; Onuma, K.; Park, H. J.; Itoman, M., *Journal of Orthopaedic Science* **2009**, 14 (6), 784-793.
- [81] Schnieders, J.; Gbureck, U.; Thull, R.; Kissel, T., *Biomaterials* **2006**, 27 (23), 4239-4249.
- [82] Bohner, M.; Lemaître, J.; Merkle, H. P.; Gander, B., *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2000**, 89 (10), 1262-1270.
- [83] Hamada, H.; Ohshima, H.; Ito, A.; Higuchi, W. I.; Otsuka, M., *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **2010**, 33 (7), 1228-1232.
- [84] Otsuka, M.; Nakahigashi, Y.; Matsuda, Y.; Fox, J. L.; Higuchi, W. I.; Sugiyama, Y., *J Control Release* **1998**, 52 (3), 281-289.
- [85] Otsuka, M.; Nakahigashi, Y.; Matsuda, Y.; Fox, J. L.; Higuchi, W. I., *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1994**, 83 (11), 1569-1573.
- [86] Otsuka, M.; Matsuda, Y.; Wang, Z.; Fox, J. L.; Higuchi, W. I., *Pharmaceutical Research* **1997**, 14 (4), 444-449.
- [87] Otsuka, M.; Nakahigashi, Y.; Matsuda, Y.; Fox, J. L.; Higuchi, W. I.; Sugiyama, Y., *J Control Release* **1997**, 43 (2-3), 115-122.
- [88] Fullana, S. G.; Ternet, H.; Freche, M.; Lacout, J. L.; Rodriguez, F., *Acta Biomaterialia* **2010**, 6 (6), 2294-2300.
- [89] Ginebra, M. P.; Rilliard, A.; Fernández, E.; Elvira, C.; San Román, J.; Planell, J. A., *Journal of Biomedical Materials Research* **2001**, 57 (1), 113-118.
- [90] Otsuka, M.; Matsuda, Y.; Suwa, Y.; Fox, J. L.; Higuchi, W. I., *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1994**, 83 (2), 259-263.
- [91] Otsuka, M.; Matsuda, Y.; Suwa, Y.; Fox, J. L.; Higuchi, W. I., *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1994**, 83 (11), 1565-1568.
- [92] Otsuka, M.; Matsuda, Y.; Fox, J. L.; Higuchi, W. I., *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1995**, 84 (6), 733-736.
- [93] Tahara, Y.; Ishii, Y., *Journal of Orthopaedic Science* **2001**, 6 (6), 556-565.
-

-
- [94] Tani, T.; Okada, K.; Takahashi, S.; Suzuki, N.; Shimada, Y.; Itoi, E., *In Vivo* **2006**, *20* (1), 55-60.
- [95] Tanzawa, Y.; Tsuchiya, H.; Shirai, T.; Nishida, H.; Hayashi, K.; Takeuchi, A.; Kawahara, M.; Tomita, K., *Journal of Orthopaedic Science* **2011**, *16* (1), 77-84.
- [96] Lopez-Heredia, M. A.; Kamphuis, G. J. B.; Thune, P. C.; Oner, E. C.; Jansen, J. A.; Walboomers, X. F., *Biomaterials* **2011**, *32* (23), 5411-5416.
- [97] Li, D.; Yang, Z.; Li, X.; Li, Z.; Li, J.; Yang, J., *Biomedical Materials* **2010**, *5* (2).
- [98] Zhao, J.; Tang, H.; Gu, J.; Wang, B.; Bao, L.; Wang Bing, Q., *Orthopedics* **2010**, *33* (8), 546-561.
- [99] Schnitzler, V.; Fayon, F.; Despas, C.; Khairoun, I.; Mellier, C.; Rouillon, T.; Massiot, D.; Walcarius, A.; Janvier, P.; Gauthier, O.; Montavon, G.; Bouler, J.-M.; Bujoli, B., *Acta Biomaterialia* **2011**, *7* (2), 759-770.
- [100] Panzavolta, S.; Torricelli, P.; Bracci, B.; Fini, M.; Bigi, A., *Journal of Inorganic Biochemistry* **2009**, *103* (1), 101-106.
- [101] Panzavolta, S.; Torricelli, P.; Bracci, B.; Fini, M.; Bigi, A., *Journal of Inorganic Biochemistry* **2010**, *104* (10), 1099-1106.
- [102] Blom, E. J.; Burger, E. H.; Wolke, J. G. C.; van Waas, M. A. J.; Driessens, F. C. M.; Klein-Nulend, J., *Materialwissenschaft Und Werkstofftechnik* **2001**, *32* (12), 962-969.
- [103] Blom, E. J.; Klein-Nulend, J.; Wolke, J. G. C.; van Waas, M. A. J.; Driessens, F. C. M.; Burger, E. H., *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, *59* (2), 265-272.
- [104] Huse, R. O.; Ruhe, P. Q.; Wolke, J. G. C.; Jansen, J. A., *Clinical Oral Implants Research* **2004**, *15* (6), 741-749.
- [105] Li, M.; Liu, X.; Liu, X.; Ge, B., *Clinical Orthopaedics and Related Research* **2010**, *468* (7), 1978-1985.
- [106] Gustavsson, J.; Ginebra, M. P.; Engel, E.; Planell, J., *Acta Biomaterialia* **2011**, *7* (12), 4242-4252.
- [107] Alkhraisat, M. H.; Moseke, C.; Blanco, L.; Barralet, J. E.; Lopez-Carbacos, E.; Gbureck, U., *Biomaterials* **2008**, *29* (35), 4691-4697.
- [108] Schumacher, M.; Gelinsky, M., *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, *3* (23), 4626-4640.
- [109] Schumacher, M.; Henss, A.; Rohnke, M.; Gelinsky, M., *Acta Biomaterialia* **2013**, *9* (7), 7536-7544.
- [110] Schumacher, M.; Lode, A.; Helth, A.; Gelinsky, M., *Acta Biomaterialia* **2013**, *9* (12), 9547-9557.
- [111] Gbureck, U.; Knappe, O.; Grover, L. M.; Barralet, J. E., *Biomaterials* **2005**, *26* (34), 6880-6886.
- [112] Clement, J. L.; Jarrett, P. S., *Metal-Based Drugs* **1994**, *1* (5-6), 467-482.
- [113] Ewald, A.; Hoesel, D.; Patel, S.; Grover, L. M.; Barralet, J. E.; Gbureck, U., *Acta Biomaterialia* **2011**, *7* (11), 4064-4070.
- [114] Arcos, D.; Vallet-Regí, M., *Acta Materialia* **2013**, *61* (3), 890-911.
- [115] Guicheux, J.; Gauthier, O.; Aguado, E.; Heymann, D.; Pilet, P.; Couillaud, S.; Faivre, A.; Daculsi, G., *Journal of Biomedical Materials Research* **1998**, *40* (4), 560-566.
-

-
- [116] Sumner, D. R.; Turner, T. M.; Urban, R. M.; Leven, R. M.; Hawkins, M.; Nichols, E. H.; McPherson, J. M.; Galante, J. O., *Journal of Orthopaedic Research* **2001**, *19* (1), 85-94.
- [117] Fu, Y.-C.; Chen, C.-H.; Wang, C.-Z.; Wang, Y.-H.; Chang, J.-K.; Wang, G.-J.; Ho, M.-L.; Wang, C.-K., *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **2013**, *27*, 64-76.
- [118] Manzano, M.; Vallet-Regí, M., *Progress in Solid State Chemistry* **2012**, *40* (3), 17-30.
- [119] Domingues, Z. R.; Cortes, M. E.; Gomes, T. A.; Diniz, H. F.; Freitas, C. S.; Gomes, J. B.; Faria, A. M. C.; Sinisterra, R. D., *Biomaterials* **2004**, *25* (2), 327-333.
- [120] Andrade, A. L.; Souza, D. M.; Vasconcellos, W. A.; Ferreira, R. V.; Domingues, R. Z., *Journal of Non-Crystalline Solids* **2009**, *355* (13), 811-816.
- [121] Xie, Z.; Liu, X.; Jia, W.; Zhang, C.; Huang, W.; Wang, J., *J Control Release* **2009**, *139* (2), 118-126.
- [122] Yao, A.; Wang, D.; Huang, W.; Fu, Q.; Rahaman, M. N.; Day, D. E., *Journal of the American Ceramic Society* **2007**, *90* (1), 303-306.
- [123] Soundrapandian, C.; Basu, D.; Sa, B.; Datta, S., *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2011**, *37* (5), 538-546.
- [124] Xia, W.; Chang, J., *J Control Release* **2006**, *110* (3), 522-530.
- [125] Wu, C.; Chang, J., *Mesoporous bioactive glasses: structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application*. **2012**; Vol. 2, 292-306.
- [126] Aviv, M.; Berdicevsky, I.; Zilberman, M., *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2007**, *83A* (1), 10-19.
- [127] Kim, W.-H.; Lee, S.-B.; Oh, K.-T.; Moon, S.-K.; Kim, K.-M.; Kim, K.-N., *Surface and Interface Analysis* **2008**, *40* (3-4), 202-204.
- [128] von Plocki, S. C.; Armbruster, D.; Klein, K.; Kaempf, K.; Zlinszky, K.; Hilbe, M.; Kronen, P.; Gruskin, E.; von Rechenberg, B., *Veterinary Surgery* **2012**, *41* (3), 410-421.
- [129] Lucke, M.; Wildemann, B.; Sadoni, S.; Surke, C.; Schiller, R.; Stemberger, A.; Raschke, M.; Haas, N. P.; Schmidmaier, G., *Bone* **2005**, *36* (5), 770-778.
- [130] Lucke, M.; Schmidmaier, G.; Sadoni, S.; Wildemann, B.; Schiller, R.; Haas, N. P.; Raschke, M., *Bone* **2003**, *32* (5), 521-531.
- [131] Gollwitzer, H.; Ibrahim, K.; Meyer, H.; Mittelmeier, W.; Busch, R.; Stemberger, A., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2003**, *51* (3), 585-591.
- [132] Stigter, M.; Bezemer, J.; de Groot, K.; Layrolle, P., *J Control Release* **2004**, *99* (1), 127-137.
- [133] Antoci, V., Jr.; King, S. B.; Jose, B.; Parvizi, J.; Zeiger, A. R.; Wickstrom, E.; Freeman, T. A.; Cornposto, R. J.; Ducheyne, P.; Shapiro, I. M.; Hickok, N. J.; Adams, C. S., *Journal of Orthopaedic Research* **2007**, *25* (7), 858-866.
- [134] Antoci, V., Jr.; Adams, C. S.; Parvizi, J.; Davidson, H. M.; Composto, R. J.; Freeman, T. A.; Wickstrom, E.; Ducheyne, P.; Jungkind, D.; Shapiro, I. M.; Hickok, N. J., *Biomaterials* **2008**, *29* (35), 4684-4690.
-

-
- [135] Jose, B.; Antoci, V.; Zeiger, A. R.; Wickstrom, E.; Hickok, N. J., *Chemistry & Biology* **2005**, *12* (9), 1041-1048.
- [136] Mani, G.; Johnson, D. M.; Marton, D.; Feldman, M. D.; Patel, D.; Ayon, A. A.; Agrawal, C. M., *Biomaterials* **2008**, *29* (34), 4561-4573.
- [137] Zheng, Y.; Li, J.; Liu, X.; Sun, J., *International Journal of Nanomedicine* **2012**, *7*, 875-884.
- [138] Cao, H.; Liu, X.; Meng, F.; Chu, P. K., *Biomaterials* **2011**, *32* (3), 693-705.
- [139] Aghion, E.; Yered, T.; Perez, Y.; Gueta, Y., *Advanced Engineering Materials* **2010**, *12* (8), B374-B379.
- [140] Manuel Perez, L.; Lalueza, P.; Monzon, M.; Antonio Puertolas, J.; Arruebo, M.; Santamaria, J., *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *409* (1-2), 1-8.
- [141] Gimeno, M.; Pinczowski, P.; Vazquez, F. J.; Perez, M.; Santamaria, J.; Arruebo, M.; Lujan, L., *International Journal of Pharmaceutics* **2013**, *452* (1-2), 166-172.
- [142] Kirkland, N. T.; Lespagnol, J.; Birbilis, N.; Staiger, M. P., *Corrosion Science* **2010**, *52* (2), 287-291.
- [143] Mourino, V.; Boccaccini, A. R., *Journal of the Royal Society Interface* **2010**, *7* (43), 209-227.
- [144] Philippart, A.; Boccaccini, A. R.; Fleck, C.; Schubert, D. W.; Roether, J. A., *Expert Review of Medical Devices* **2015**, *12* (1), 93-111.
- [145] Shi, S.; Jiang, W. B.; Zhao, T. X.; Aifantis, K. E.; Wang, H.; Lin, L.; Fan, Y. B.; Feng, Q. L.; Cui, F. Z.; Li, X. M., *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2015**, *103* (12), 3978-3992.
- [146] Ozdil, D.; Aydin, H. M., *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2014**, *89* (12), 1793-1810.
- [147] Doty, H.; Leedy, M.; Courtney, H.; Haggard, W.; Bumgardner, J., *J Mater Sci: Mater Med* **2014**, *25* (6), 1449-1459.
- [148] Hamilton, P. T.; Jansen, M. S.; Ganesan, S.; Benson, R. E.; Hyde-DeRuyscher, R.; Beyer, W. F.; Gile, J. C.; Nair, S. A.; Hodges, J. A.; Grøn, H., *PLoS ONE* **2013**, *8* (8), e70715.
- [149] Karfeld-Sulzer, L. S.; Ghayor, C.; Siegenthaler, B.; de Wild, M.; Leroux, J.-C.; Weber, F. E., *J Control Release* **2015**, *203*, 181-188.
- [150] Yan, Q.; Xiao, L.-Q.; Tan, L.; Sun, W.; Wu, T.; Chen, L.-W.; Mei, Y.; Shi, B., *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2015**, *103* (11), 3580-3589.
- [151] Flory, P. J., *Journal of the American Chemical Society* **1952**, *74* (11), 2718-2723.
- [152] Buhleier, E.; Wehner, W.; Vögtle, F., *Synthesis* **1978**, *1978* (02), 155-158.
- [153] Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P., *Polym J* **1985**, *17* (1), 117-132.
- [154] Newkome, G. R.; Yao, Z.; Baker, G. R.; Gupta, V. K., *The Journal of Organic Chemistry* **1985**, *50* (11), 2003-2004.
- [155] Abbasi, E.; Aval, S. F.; Akbarzadeh, A.; Milani, M.; Nasrabadi, H. T.; Joo, S. W.; Hanifehpour, Y.; Nejati-Koshki, K.; Pashaei-Asl, R., *Nanoscale Research Letters* **2014**, *9*.
-

- [156] Oliveira, J. M.; Salgado, A. J.; Sousa, N.; Mano, J. F.; Reis, R. L., *Progress in Polymer Science* **2010**, *35* (9), 1163-1194.
- [157] Wu, L.-p.; Ficker, M.; Christensen, J. B.; Trohopoulos, P. N.; Moghimi, S. M., *Bioconjugate Chemistry* **2015**, *26* (7), 1198-1211.
- [158] Soleyman, R.; Adeli, M., *Polymer Chemistry* **2015**, *6* (1), 10-24.
- [159] Kurniasih, I. N.; Keilitz, J.; Haag, R., *Chemical Society Reviews* **2015**, *44* (12), 4145-4164.
- [160] Zheng, Y.; Li, S.; Weng, Z.; Gao, C., *Chemical Society Reviews* **2015**, *44* (12), 4091-4130.
- [161] Vögtle, F.; Richardt, G.; Werner, N., *Dendritische Moleküle: Konzepte, Synthesen, Eigenschaften, Anwendungen*. Vieweg+Teubner Verlag: **2007**.
- [162] Tomalia, D. A., *Progress in Polymer Science* **2005**, *30* (3-4), 294-324.
- [163] Hummelen, J. C.; Van Dongen, J. L. J.; Meijer, E. W., *Chemistry – A European Journal* **1997**, *3* (9), 1489-1493.
- [164] Zhu, J.; Shi, X., *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, *1* (34), 4199-4211.
- [165] Spain, S. G.; Gibson, M. I.; Cameron, N. R., *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2007**, *45* (11), 2059-2072.
- [166] Appelhans, D.; Klajnert-Maculewicz, B.; Janaszewska, A.; Lazniewska, J.; Voit, B., *Chemical Society Reviews* **2015**, *44* (12), 3968-3996.
- [167] Ting, S. R. S.; Stenzel, M. H., Chapter 2: Direct Synthesis of Glycopolymers Using Glycomonomers. In *Glycopolymer Code : Synthesis of Glycopolymers and their Applications*, **2015**; 17-76.
- [168] Voit, B.; Appelhans, D., *Macromolecular Chemistry and Physics* **2010**, *211* (7), 727-735.
- [169] Appelhans, D.; Cladera, J.; Rogers, M.; Voit, B., CHAPTER 5: Dendritic Glyco Architectures - From H-Bond-Driven Molecular Interactions to Their Potential Use in Brain Disease Therapy. In *Glycopolymer Code: Synthesis of Glycopolymers and their Applications*, The Royal Society of Chemistry: **2015**; 149-177.
- [170] McCarthy, J. M.; Franke, M.; Resenberger, U. K.; Waldron, S.; Simpson, J. C.; Tatzelt, J.; Appelhans, D.; Rogers, M. S., *PLoS ONE* **2013**, *8* (1), e55282.
- [171] F. Ottaviani, M.; Cangiotti, M.; Fiorani, L.; Fattori, A.; Wasiak, T.; Appelhans, D.; Klajnert, B., *Current Medicinal Chemistry* **2012**, *19* (34), 5907-5921.
- [172] McCarthy, J. M.; Rasines, B.; Appelhans, D.; Rogers, M., *Advanced Healthcare Materials* **2012**, *1* (6), 768-772.
- [173] Klementieva, O.; Aso, E.; Filippini, D.; Benseny-Cases, N.; Carmona, M.; Juvés, S.; Appelhans, D.; Cladera, J.; Ferrer, I., *Biomacromolecules* **2013**, *14* (10), 3570-3580.
- [174] Klementieva, O.; Benseny-Cases, N.; Gella, A.; Appelhans, D.; Voit, B.; Cladera, J., *Biomacromolecules* **2011**, *12* (11), 3903-3909.
- [175] Mkandawire, M. M.; Lakatos, M.; Springer, A.; Clemens, A.; Appelhans, D.; Krause-Buchholz, U.; Pompe, W.; Rodel, G.; Mkandawire, M., *Nanoscale* **2015**, *7* (24), 10634-10640.

- [176] Ziemba, B.; Franiak-Pietryga, I.; Pion, M.; Appelhans, D.; Muñoz-Fernández, M. Á.; Voit, B.; Bryszewska, M.; Klajnert-Maculewicz, B., *International Journal of Pharmaceutics* **2014**, *461* (1–2), 391-402.
- [177] Franiak-Pietryga, I.; Ziółkowska, E.; Ziemba, B.; Appelhans, D.; Voit, B.; Szewczyk, M.; Góra-Tybor, J.; Robak, T.; Klajnert, B.; Bryszewska, M., *Molecular Pharmaceutics* **2013**, *10* (6), 2490-2501.
- [178] Filimon, A.; Sima, L. E.; Appelhans, D.; Voit, B.; Negroiu, G., *Current Medicinal Chemistry* **2012**, *19* (29), 4955-4968.
- [179] Ionov, M.; Ciepluch, K.; R. Moreno, B.; Appelhans, D.; Sanchez-Nieves, J.; Gomez, R.; J. de la Mata, F.; A. Munoz-Fernandez, M.; Bryszewska, M., *Current Medicinal Chemistry* **2013**, *20* (31), 3935-3943.
- [180] Córdoba, E. V.; Pion, M.; Rasines, B.; Filippini, D.; Komber, H.; Ionov, M.; Bryszewska, M.; Appelhans, D.; Muñoz-Fernández, M. A., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2013**, *9* (7), 972-984.
- [181] Maly, J.; Pedziwiatr-Werbicka, E.; Maly, M.; Semeradtova, A.; Appelhans, D.; Danani, A.; Zaborski, M.; Klajnert, B.; Bryszewska, M., *Current Medicinal Chemistry* **2012**, *19* (27), 4708-4719.
- [182] Szewczyk, M.; Drzewinska, J.; Dzmitruk, V.; Shcharbin, D.; Klajnert, B.; Appelhans, D.; Bryszewska, M., *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116* (50), 14525-14532.
- [183] Felczak, A.; Zawadzka, K.; Wronska, N.; Janaszewska, A.; Klajnert, B.; Bryszewska, M.; Appelhans, D.; Voit, B.; Lisowska, K., *New Journal of Chemistry* **2013**, *37* (12), 4156-4162.
- [184] Wronska, N.; Felczak, A.; Zawadzka, K.; Poszepczyńska, M.; Różalska, S.; Bryszewska, M.; Appelhans, D.; Lisowska, K., *Molecules* **2015**, *20* (10), 19330.
- [185] Felczak, A.; Wronska, N.; Janaszewska, A.; Klajnert, B.; Bryszewska, M.; Appelhans, D.; Voit, B.; Rozalska, S.; Lisowska, K., *New Journal of Chemistry* **2012**, *36* (11), 2215-2222.
- [186] Appelhans, D.; Komber, H.; Quadir, M. A.; Richter, S.; Schwarz, S.; van der Vlist, J.; Aigner, A.; Müller, M.; Loos, K.; Seidel, J.; Arndt, K.-F.; Haag, R.; Voit, B., *Biomacromolecules* **2009**, *10* (5), 1114-1124.
- [187] Thünemann, A. F.; Bienert, R.; Appelhans, D.; Voit, B., *Macromolecular Chemistry and Physics* **2012**, *213* (22), 2362-2369.
- [188] Polikarpov, N.; Appelhans, D.; Welzel, P.; Kaufmann, A.; Dhanapal, P.; Bellmann, C.; Voit, B., *New Journal of Chemistry* **2012**, *36* (2), 438-451.
- [189] Boye, S.; Polikarpov, N.; Appelhans, D.; Lederer, A., *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217* (29), 4841-4849.
- [190] Höbel, S.; Loos, A.; Appelhans, D.; Schwarz, S.; Seidel, J.; Voit, B.; Aigner, A., *J Control Release* **2011**, *149* (2), 146-158.
- [191] Richter, A.; Janke, A.; Zschoche, S.; Zimmermann, R.; Simon, F.; Eichhorn, K.-J.; Voit, B.; Appelhans, D., *New Journal of Chemistry* **2010**, *34* (10), 2105-2108.
- [192] Hauptmann, N.; Pion, M.; Wehner, R.; Muñoz-Fernández, M. Á.; Schmitz, M.; Voit, B.; Appelhans, D., *Biomacromolecules* **2014**, *15* (3), 957-967.

- [193] Warena, M.; Richter, A.; Schmidt, D.; Janke, A.; Müller, M.; Simon, F.; Zimmermann, R.; Eichhorn, K.-J.; Voit, B.; Appelhans, D., *Macromolecular Rapid Communications* **2012**, *33* (17), 1466-1473.
- [194] Appelhans, D.; Komber, H.; Kirchner, R.; Seidel, J.; Huang, C.-F.; Voigt, D.; Kuckling, D.; Chang, F.-C.; Voit, B., *Macromolecular Rapid Communications* **2005**, *26* (8), 586-591.
- [195] Byrne, M.; Thornton, P. D.; Cryan, S.-A.; Heise, A., *Polymer Chemistry* **2012**, *3* (10), 2825-2831.
- [196] Higashi, N.; Koga, T.; Niwa, M., *ChemBioChem* **2002**, *3* (5), 448-454.
- [197] Higashi, N.; Uchino, A.; Mizuguchi, Y.; Niwa, M., *International Journal of Biological Macromolecules* **2006**, *38* (2), 120-125.
- [198] Hui, H.; Chang-Ming, D.; Yen, W., *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2007**, *10* (5), 368-376.
- [199] Pan, S.; Wang, C.; Zeng, X.; Wen, Y.; Wu, H.; Feng, M., *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *420* (2), 206-215.
- [200] Wang, Q.; Yu, J.; Yan, Y.; Xu, S.; Wang, F.; Li, Q.; Wang, J.; Zhang, X.; Liu, D., *Polymer Chemistry* **2012**, *3* (5), 1284-1290.
- [201] Yan, Y.; Wei, D.; Li, J.; Zheng, J.; Shi, G.; Luo, W.; Pan, Y.; Wang, J.; Zhang, L.; He, X.; Liu, D., *Acta Biomaterialia* **2012**, *8* (6), 2113-2120.
- [202] Guo, Z.; Li, Y.; Tian, H.; Zhuang, X.; Chen, X.; Jing, X., *Langmuir* **2009**, *25* (17), 9690-9696.
- [203] Huang, H.; Li, J.; Liao, L.; Li, J.; Wu, L.; Dong, C.; Lai, P.; Liu, D., *European Polymer Journal* **2012**, *48* (4), 696-704.
- [204] Tian, H. Y.; Deng, C.; Lin, H.; Sun, J. R.; Deng, M. X.; Chen, X. S.; Jing, X. B., *Biomaterials* **2005**, *26* (20), 4209-4217.
- [205] Tian, H.; Chen, X.; Lin, H.; Deng, C.; Zhang, P.; Wei, Y.; Jing, X., *Chemistry – A European Journal* **2006**, *12* (16), 4305-4312.
- [206] Tian, H. Y.; Xiong, W.; Wei, J. Z.; Wang, Y.; Chen, X. S.; Jing, X. B.; Zhu, Q. Y., *Biomaterials* **2007**, *28* (18), 2899-2907.
- [207] Kricheldorf, H. R., *Angewandte Chemie* **2006**, *118* (35), 5884-5917.
- [208] Cheng, J.; Deming, T. J., Synthesis of Polypeptides by Ring-Opening Polymerization of α -Amino Acid N-Carboxyanhydrides. In *Peptide-Based Materials*, Deming, T., Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2012**; 1-26.
- [209] Wessely, F., *Z. Physiol. chem.* **1925**, *146*, 72.
- [210] Sigmund, F.; Wessely, F., *ibid.* **1926**, *157*, 91.
- [211] Waley, S. G.; Watson, J., *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **1949**, *199* (1059), 499-517.
- [212] Idelson, M.; Blout, E. R., *Journal of the American Chemical Society* **1958**, *80* (10), 2387-2393.
- [213] Ballard, D. G. H.; Bamford, C. H., *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1956**, (0), 381-387.

-
- [214] Deming, T. J., *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2000**, 38 (17), 3011-3018.
- [215] Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N.; Messman, J.; Mays, J., *Macromolecular Symposia* **2006**, 240 (1), 12-17.
- [216] Lukowiak, M. C.; Thota, B. N. S.; Haag, R., *Biotechnology Advances* **2015**, 33 (6, Part 3), 1327-1341.
- [217] Quadir, M. A.; Radowski, M. R.; Kratz, F.; Licha, K.; Hauff, P.; Haag, R., *J Control Release* **2008**, 132 (3), 289-294.
- [218] Radowski, M. R.; Shukla, A.; von Berlepsch, H.; Böttcher, C.; Pickaert, G.; Rehage, H.; Haag, R., *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, 46 (8), 1265-1269.
- [219] Kurniasih, I. N.; Liang, H.; Rabe, J. P.; Haag, R., *Macromolecular Rapid Communications* **2010**, 31 (17), 1516-1520.
- [220] Türk, H.; Shukla, A.; Alves Rodrigues, P. C.; Rehage, H.; Haag, R., *Chemistry – A European Journal* **2007**, 13 (15), 4187-4196.
- [221] Fleige, E.; Achazi, K.; Schaletzki, K.; Triemer, T.; Haag, R., *J Control Release* **2014**, 185, 99-108.
- [222] Kurniasih, I. N.; Liang, H.; Kumar, S.; Mohr, A.; Sharma, S. K.; Rabe, J. P.; Haag, R., *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, 1 (29), 3569-3577.
- [223] Walker, K.; Stumbé, J.-F.; Haag, R., *Polymers* **2016**, 8 (5), 192.
- [224] Stefani, S.; Kurniasih, I. N.; Sharma, S. K.; Böttcher, C.; Servin, P.; Haag, R., *Polymer Chemistry* **2016**, 7 (4), 887-898.
- [225] Krämer, M., Polymeric Nanocarriers with Dendritic Core-Shell Architectures. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br., Freiburg i. Br., **2004**.
- [226] Krämer, M.; Stumbé, J.-F.; Grimm, G.; Kaufmann, B.; Krüger, U.; Weber, M.; Haag, R., *ChemBioChem* **2004**, 5 (8), 1081-1087.
- [227] Farthing, A. C., *Journal of the Chemical Society* **1950**, 3213-3217.
- [228] Fuchs, F., *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1922**, 55 (9), 2943.
- [229] Eckert, H.; Forster, B., *Angewandte Chemie International Edition* **1987**, 26 (9), 894-895.
- [230] Daly, W. H.; Poché, D., *Tetrahedron Letters* **1988**, 29 (46), 5859-5862.
- [231] Poché, D. S.; Moore, M. J.; Bowles, J. L., *Synthetic Communications* **1999**, 29 (5), 843-854.
- [232] Miyazawa, T.; Blout, E. R., *Journal of the American Chemical Society* **1961**, 83 (3), 712-719.
- [233] Blout, E. R.; Asadourian, A., *Journal of the American Chemical Society* **1956**, 78 (5), 955-961.
- [234] Masuda, Y.; Miyazawa, T., *Die Makromolekulare Chemie* **1967**, 103 (1), 261-267.
- [235] Kricheldorf, H. R.; Mueller, D., *Macromolecules* **1983**, 16 (4), 615-623.
- [236] Shoji, A.; Ozaki, T.; Saito, H.; Tabeta, R.; Ando, I., *Macromolecules* **1984**, 17 (8), 1472-1479.
-

- [237] Papadopoulos, P.; Floudas, G.; Klok, H. A.; Schnell, I.; Pakula, T., *Biomacromolecules* **2004**, *5* (1), 81-91.
- [238] Doty, P.; Bradbury, J. H.; Holtzer, A. M., *Journal of the American Chemical Society* **1956**, *78* (5), 947-954.
- [239] Nevskaya, N. A.; Chirgadze, Y. N., *Biopolymers* **1976**, *15* (4), 637-648.
- [240] Kyotani, H.; Kanetsuna, H., *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition* **1972**, *10* (10), 1931-1939.
- [241] Kōmoto, T.; Kojima, Y.; Kawai, T., *Die Makromolekulare Chemie* **1978**, *179* (7), 1861-1865.
- [242] Sederel, W. L.; Bantjes, A.; Feijen, J.; Anderson, J. M., *Biopolymers* **1980**, *19* (9), 1603-1615.
- [243] Myer, Y. P., *Macromolecules* **1969**, *2* (6), 624-628.
- [244] Klok, H.-A.; Hernández, J. R.; Becker, S.; Müllen, K., *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2001**, *39* (10), 1572-1583.
- [245] Kimura, T.; Takahashi, S.; Akiyama, S.; Uzawa, T.; Ishimori, K.; Morishima, I., *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124* (39), 11596-11597.
- [246] Saudek, V.; Štokrová, Š.; Schmidt, P., *Biopolymers* **1982**, *21* (6), 1011-1020.
- [247] Tao, H., Stimuli-Responsive Copolymers and Their Applications. In *Synthesis and Applications of Copolymers*, Parthiban, A., Ed. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, **2014**; 286.
- [248] Franke, M., Untersuchung zum Freisetungsverhalten von Wirkstoffen aus dendritischen Glycopolymer-Calciumphosphat-Zement Hybridmaterialien. Masterarbeit, Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden, **2012**.
- [249] Böeseken, J., The use of Boric Acid for the Determination of the Configuration of Carbohydrates. In *Advances in Carbohydrate Chemistry*, Pigman, W. W.; Wolfro, M. L., Eds. Academic Press: **1949**; Vol. 4, 189-210.
- [250] Kuivila, H. G.; Keough, A. H.; Soboczinski, E. J., *The Journal of Organic Chemistry* **1954**, *19* (5), 780-783.
- [251] Lorand, J. P.; Edwards, J. O., *The Journal of Organic Chemistry* **1959**, *24* (6), 769-774.
- [252] James, T. D.; Phillips, M. D.; Shinkai, S., *Boronic Acids in Saccharide Recognition*. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, **2006**.
- [253] van den Berg, R.; Peters, J. A.; van Bekkum, H., *Carbohydrate Research* **1994**, *253*, 1-12.
- [254] Iwatsuki, S.; Nakajima, S.; Inamo, M.; Takagi, H. D.; Ishihara, K., *Inorganic Chemistry* **2007**, *46* (2), 354-356.
- [255] Springsteen, G.; Wang, B., *Tetrahedron* **2002**, *58* (26), 5291-5300.
- [256] Yan, J.; Springsteen, G.; Deeter, S.; Wang, B., *Tetrahedron* **2004**, *60* (49), 11205-11209.
- [257] Thünemann, A.; Müller, M.; Dautzenberg, H.; Joanny, J.-F.; Löwen, H., Polyelectrolyte Complexes. In *Polyelectrolytes with Defined Molecular Architecture II*, Schmidt, M., Ed. Springer Berlin Heidelberg: **2004**; Vol. 166, 113-171.

- [258] Hunter, G. K.; Goldberg, H. A., *Biochemical Journal* **1994**, 302 (Pt 1), 175-179.
- [259] Vavrusova, M.; Skibsted, L. H., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2013, 61 (22), 5380-5384.
- [260] Lautenschlaeger, S.; Striegler, C.; Dakischew, O.; Schuetz, I.; Szalay, G.; Schnettler, R.; Heiss, C.; Appelhans, D.; Lips, K. S., *Journal of Nanobiotechnology* 2015, 13 (65).
- [261] Inoue, K.; Horibe, S.; Fukae, M.; Muraki, T.; Ihara, E.; Kayama, H., *Macromolecular Bioscience* 2003, 3 (1), 26-33.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Lipophile Statine.....	6
Abbildung 2.2:	Bisphosphonate der ersten, zweiten und dritten Generation.....	7
Abbildung 2.3:	Proteasominhibitoren der ersten Generation (Bortezomib) und der zweiten Generation (Carfilzomib).	8
Abbildung 2.4:	Metallschäume als Knochenersatzimplantate (Quelle: Modell eines metallischen Implantates, Fraunhofer IFAM Dresden).....	12
Abbildung 2.5:	Verschiedene Formen der Knochenersatzmaterialien auf Calciumphosphat-Basis. ⁵⁵	15
Abbildung 2.6:	SEM: Mikrostrukturierter Calciumphosphatzement – nadel- und plättchen-förmige Kristalle. ⁵⁸	16
Abbildung 2.7:	Makroporöser, interkonnektierender CDHA durch Zusatz eines Schaumbildners in die flüssige Phase des CPC. ⁶¹	17
Abbildung 2.8:	Mechanismen der WS-Freisetzung aus CPC nach Ginebra et al. ⁵⁷ : a) diffusionskontrolliert, b) Beschleunigung durch Resorption, c) Verlangsamung durch <i>in vivo</i> gebildete HA-Schicht.	21
Abbildung 2.9:	schematische Darstellung der Wechselwirkungen von Gentamicinsulfat (GS) mit mesoporösem Bioglas nach Xia und Wang ¹²⁴ ; 1 – GS an der Porenöffnung, 2 – GS eingeschlossen in der Pore, keine H-Brücken mit Si-OH oder P-OH, 3 – GS eingeschlossen in der Pore, mit H-Brücken mit Si-OH oder P-OH, 4 – GS an der Bioglasoberfläche adsorbiert.	25
Abbildung 2.10:	Schematische Darstellung eines hochverzweigten (hvz) Polymers im Vergleich zum Dendrimer.....	29
Abbildung 2.11:	WS-Beladung am Beispiel Dendrimer: (a) physikalische WW im Inneren des Dendrimers, (b) physikalische WW an der Peripherie, (c) kovalente Bindung an der Peripherie. ¹⁶⁴	30
Abbildung 2.12:	Schematische Darstellung der Polyamidoamin- und Polypropylenimin-Dendrimere sowie des hochverzweigten Polyethylenimins.	31
Abbildung 2.13:	Offene und dichte Schalenstrukturen von Glykopolymeren am Beispiel von hvz PEI als Kernmolekül nach Appelhans et al. ¹⁸⁶	34
Abbildung 2.14:	Ringöffnende Polymerisation von α -Aminosäure- <i>N</i> -Carboxyanhydriden. ...	35
Abbildung 2.15:	Initiierung und Kettenwachstum der NCA-Polymerisation mit Nukleophilen.....	36
Abbildung 2.16:	NCA-Polymerisation über Aktiviertes Monomer-Mechanismus.	37
Abbildung 3.1:	Syntheschema der wasserlöslichen Kern-(Doppel-)Schale-Architekturen.	40
Abbildung 4.1:	Schematische Darstellung von hochverzweigtem Polyethylenimin.	42
Abbildung 4.2:	Syntheschema zur Herstellung der <i>N</i> -Carboxyanhydrid-Monomere.	43
Abbildung 4.3:	¹ H-NMR-Spektrum von L-Glutaminsäure- γ -benzylester- <i>N</i> -carboxyanhydrid (γ -BLG-NCA), aufgenommen in deuteriertem DMSO. ...	44

Abbildung 4.4:	¹ H-NMR-Spektrum von L-Asparaginsäure-β-benzylester- <i>N</i> -carboxyanhydrid (β-BLA-NCA), aufgenommen in deuteriertem DMSO.	45
Abbildung 4.5:	Syntheschema der dendritischen Copolymere PEI(5)-PBLA (m = 1; n _{ges} = 346) und PEI(5)-PBLG (m = 2; n _{ges} = 43, 173, 259, 346).	46
Abbildung 4.6:	¹ H-NMR-Spektrum von Polyethylenimin-poly-γ-benzyl-L-glutaminsäure-ester (PEI(5)-PBLG-346), aufgenommen in deuteriertem DMSO.	48
Abbildung 4.7:	¹ H-NMR-Spektrum von Polyethylenimin-poly-β-benzyl-L-asparaginsäure-ester (PEI(5)-PBLA-346), aufgenommen in deuteriertem DMSO.	48
Abbildung 4.8:	FT-IR-Spektrum von PEI(5)-PBLG-346, KBr-Pressling.	49
Abbildung 4.9:	Ausschnitt aus dem FT-IR-Spektrum von reinem PBLG (schwarz) und PEI(5)-PBLG-346 (rot), Film aus DMF.	50
Abbildung 4.10:	FT-IR-Spektrum von PEI(5)-PBLA-346, KBr-Pressling.	51
Abbildung 4.11:	Molmassen, RI- und LS-Signal von PEI(5)-PBLG-346 in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen mittels SEC-RI-LS in DMAc/LiCl (3 g/l) bestimmt, vorherige Erwärmung der Polymerlösung auf 60°C.	53
Abbildung 4.12:	Syntheschema zur Abspaltung der Benzylschutzgruppen durch Hydrolyse.	54
Abbildung 4.13:	¹ H-NMR-Spektren von PEI(5)-PAsp-346 (oben) und PEI(5)-PGlu-346 (unten), aufgenommen in D ₂ O.	55
Abbildung 4.14:	¹³ C-NMR-Spektren aufgenommen in D ₂ O: oben PEI(5), unten PEI(5)-PGlu-346.	56
Abbildung 4.15:	FT-IR-Spektrum von PEI(5)-PGlu-346, KBr-Pressling.	57
Abbildung 4.16:	FT-IR-Spektrum von PEI(5)-PAsp-346, KBr-Pressling.	57
Abbildung 4.17:	FT-IR-Spektren (Ausschnitt) im Vergleich: reine Polyglutaminsäure (PGlu) bei pH 3 und pH 8 (gestrichelt), PEI(5)-PGlu-346 bei pH 3 und pH 7; Filme aus wässriger Lösung.	58
Abbildung 4.18:	Verteilung der Massenfraktionen von PEI(5)-PGlu-346 in Abhängigkeit von der Molmasse bestimmt mittels AF4-LS.	61
Abbildung 4.19:	Syntheschema der Anbindung von Oligosaccharideinheiten an die wasserlöslichen Kern-Schale-Architekturen PEI(5)-PGlu-346 und PEI(5)-PAsp-346 durch reduktive Aminierung.	62
Abbildung 4.20:	¹ H-NMR-Spektrum von PEI(5)-PGlu-346-Mal, aufgenommen in D ₂ O.	63
Abbildung 4.21:	¹³ C-NMR-Spektrum von PEI(5)-PGlu-346-Mal, aufgenommen in D ₂ O. ...	64
Abbildung 4.22:	FT-IR-Spektrum von PEI(5)-PGlu-346-Mal, KBr-Pressling.	65
Abbildung 4.23:	FT-IR-Spektren (Ausschnitte) im Vergleich: PEI(5)-PGlu-346 bei pH 3 und pH 7 (gestrichelt), PEI(5)-PGlu-346-Mal bei pH 3 und pH 6; Filme aus wässriger Lösung.	65
Abbildung 4.24:	Verteilung der Massenfraktionen von PEI(5)-PGlu-346-Mal (schwarz) in Abhängigkeit von der Molmasse im Vergleich zu PEI(5)-PGlu-346 (grau) bestimmt mit AF4-LS.	67

Abbildung 4.25: A – PH-abhängige Strömungspotentialtitration von PEI(5), PEI(5)-PGlu-346 und PEI(5)-PGlu-346-Mal. B – pH-abhängige Zetapotentialmessung von PEI(5)-PGlu-346, PEI(5)-PGlu-346-Mal und PEI(5)-PGlu-346-Lak. C – pH-abhängige Zetapotentialmessung von PEI(5)-PAsp-346, PEI(5)-PAsp-346-Mal und PEI(5)-PAsp-346-Lak.	68
Abbildung 4.26: DLS-Verteilungskurven von PEI(5)-PGlu-346 (c = 1,19 g/l) in reinem Wasser nach 0, 3, 20 h.	70
Abbildung 4.27: DLS-Verteilungskurven von PEI(5)-PGlu-346 (c = 1,19 g/l) in reinem Wasser und PBS-Lösungen pH 3, 5, 7,4 und 9.	71
Abbildung 4.28: A - 2D- und 3D-Höhenbilder PEI-PGlu-346 (links) und PEI-PGlu-346-Mal (rechts) im trockenen Zustand auf einem Siliziumwafer. B - Cross section der luftgetrockneten PEI-PGlu-346-Probe.	73
Abbildung 4.29: In situ AFM-Höhenbilder von PEI(5)-PGlu-346 in reinem Wasser (links) und in PBS-Puffer-Lösung pH 7,4 (rechts) auf APS-beschichteten Siliziumwafern.	74
Abbildung 4.30: A – TEM-Aufnahme von PEI(5)-PGlu-346. B – Cryo-TEM-Aufnahme akkumulierter PEI(5)-PGlu-346-Mal-Makromoleküle („Wolkenbildung“). C – Cryo-TEM-Aufnahme einzelner Makromoleküle in der „Wolke“	76
Abbildung 4.31: Aus den cryo-TEM-Aufnahmen ermittelte Größenverteilung der einzelnen Makromoleküle von PEI(5)-PGlu-346-Mal in reinem Wasser, Klassengröße 1,25 nm.	77
Abbildung 4.32: Schematische Darstellung von PEI(5)-PBLG-346, Ausbildung von PBLG-Helices in aprotischen polaren Lösungsmitteln.	77
Abbildung 4.33: Schematische Darstellung der möglichen Strukturen von PEI(5)-PGlu-346 in Abhängigkeit vom pH-Wert.	79
Abbildung 4.34: Schematische Darstellung der möglichen Strukturen von PEI(5)-PGlu-346-Mal in Abhängigkeit vom pH-Wert.	80
Abbildung 4.35: Schematische Darstellung der verwendeten wasserlöslichen Kern-Schale-Architekturen und der entsprechenden Polyelektrolytkomplexe.	82
Abbildung 4.36: Schematische Darstellung der Ultrafiltration nach der Dead-End-Methode.	83
Abbildung 4.37: Membranstabilitätstests von Risedronat (40 mg/l) und Bortezomib (30 mg/l) auf PES-Membranen (MWCO 1000 Da) in reinem Wasser.	85
Abbildung 4.38: Umsetzung des trimeren Bortezomib zur freien Boronsäure in wässriger Lösung.	86
Abbildung 4.39: Mögliche reversible Esterbildung der freien Boronsäure mit den Maltoseeinheiten von PEI(25)-Mal B und PEI(5)-PGlu-346-Mal.	87
Abbildung 4.40: Komplexierte Menge BZM in PEI(25)-Mal B in reinem H ₂ O und PBS-Lösung nach 0 h, 3 h und 20 h bei den molaren PEI(25)-Mal B:BZM-Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50.	88
Abbildung 4.41: Komplexierte Menge BZM in PEI(5)-PGlu-346-Mal in reinem H ₂ O und PBS-Lösung nach 0 h, 3 h und 20 h bei den molaren PEI(5)-PGlu-346-Mal:BZM-Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50.	89

Abbildung 4.42: DLS-Verteilungskurven von PEI(25)-Mal B/BZM 1:50 in reinem Wasser nach 0 h, 3 h und 20 h.	91
Abbildung 4.43: DLS-Verteilungskurven von PEI(5)-PGlu-346-Mal/BZM 1:50 in reinem Wasser nach 0 h, 3 h und 20 h.	92
Abbildung 4.44: links: Komplexierte Menge BZM in PEK 0.9 in reinem H ₂ O nach 0 h, 3 h und 20 h bei den molaren Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50; rechts: Vergleich der BZM-Komplexierung zwischen PEI(25)-Mal B und PEK 0.9 nach 20 h.	93
Abbildung 4.45: links: Komplexierte Menge BZM in PEK 1.1-B in reinem H ₂ O nach 0 h, 3 h und 20 h bei den molaren Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50; rechts: Vergleich der BZM-Komplexierung zwischen PEI(5)-PGlu-346-Mal und PEK 1.1-B nach 20 h.	94
Abbildung 4.46: UV/Vis-Absorptionskurven der Permeate der PEI(5)-PGlu-346-Mal/BZM- und PEK 1.1-B/BZM-Lösung im Verhältnis 1:50 nach 20 h....	95
Abbildung 4.47: DLS-Verteilungskurven der Polyelektrolytkomplexe (1 g/l Copolymer im PEK) in reinem Wasser.	96
Abbildung 4.48: DLS-Verteilungskurven von PEK 0.9 (0,297 g/l) nach 0 h, 3 h und 20 h... 97	97
Abbildung 4.49: DLS-Verteilungskurven von PEK 0.9 (0,0595 g/l) nach 0 h, 3 h und 20 h.....	97
Abbildung 4.50: DLS-Verteilungskurven von PEK 0.9/BZM 1:10 in reinem Wasser nach 0 h, 3 h und 20 h.....	98
Abbildung 4.51: DLS-Verteilungskurven von PEK 0.9/BZM 1:50 in reinem Wasser nach 0 h, 3 h und 20 h.....	99
Abbildung 4.52: Additive BZM-Freisetzung aus dem PEI(25)-Mal B/BZM-Komplex nach Beladung von PEI(25)-Mal B mit BZM im Verhältnis 1:10 und 1:50.	100
Abbildung 4.53: Schematische Darstellung der Herstellung der mit BZM und Trägersystem beladenen Calciumphosphatzemente, Bestimmung der Menge an freigesetztem BZM mit UV/Vis-Spektroskopie.	102
Abbildung 4.54: Schematische Darstellung der Komplexierung/Freisetzung des Wirkstoffes und der Copolymer/Wirkstoff- bzw. PEK/Wirkstoff-Komplexe in/aus CPC am Beispiel von PEI(5)-PGlu-346-Mal und PEK 1.1-B.	103
Abbildung 4.55: Freisetzung von Bortezomib (50 µg/g CPC und 100 µg/g CPC) aus dem CPC.	104
Abbildung 4.56: Verzögerte Freisetzung von Rhodamin B-markiertem PEI(25)-Mal B aus PEI(25)-Mal B/CPC- und PEK 0.9/CPC-Kompositen.....	105
Abbildung 4.57: DLS-Verteilungskurven von PEK 1.1-B (1 g/l) mit Na ₂ HPO ₄ (4 Gew.-%) nach 0 h, 3 h und 20 h.	107
Abbildung 4.58: DLS-Verteilungskurven von PEK 1.1-B (0,119 g/l) mit Na ₂ HPO ₄ (4 Gew. -%) nach 0 h, 3 h und 20 h.	107
Abbildung 4.59: Freisetzungsrates von BZM aus BZM/PEI(25)-Mal B/CPC und BZM/PEK 0.9/CPC innerhalb von 14 Tagen, links – Konzentrationspaar 50 µg/100 µg, rechts – Konzentrationspaar 100 µg/100 µg.	108

Abbildung 4.60: Freisetzungsrates von BZM aus BZM/PEI(25)-Mal B/CPC innerhalb von 48 h, links – Konzentrationspaar 50 µg/100 µg, rechts – Konzentrationspaar 50 µg/200 µg.....	109
Abbildung 4.61: Freisetzungsrates von BZM aus BZM/PEK 0.9/CPC innerhalb von 48 h, links – Konzentrationspaar 50 µg/200 µg, rechts – Konzentrationspaar 100 µg/200 µg.....	110
Abbildung 4.62: Freisetzungsrates von BZM aus BZM/PEI(5)-PGlu-346/CPC und BZM/PEK 1.1-A/CPC innerhalb von 14 Tagen, links – Konzentrationspaar 50 µg/100 µg, rechts – Konzentrationspaar 50 µg/200 µg.....	111
Abbildung 4.63: Freisetzungsrates von BZM aus BZM/PEI(5)-PGlu-346-Mal/CPC und BZM/PEK 1.1-B/CPC innerhalb von 14 Tagen, links – Konzentrationspaar 50 µg/100 µg, rechts – Konzentrationspaar 50 µg/200 µg.....	112
Abbildung 4.64: Copolymerkonzentrationsabhängige Druckfestigkeit des Biocement 1.0 im Vergleich zum reinen Zement.	114
Abbildung 4.65: TEM-Aufnahmen von rdMSC mit PEI(25)-Mal B. A – Akkumulation von PEI(25)-Mal B-Nanopartikeln an der Zellwand nach 60 min. B – Schädigung der Mitochondrien nach 1 d.	115
Abbildung 4.66: Proliferation von osteogen stimulierten hMSC nach 7 d und 14 d bei unterschiedlichen PEI(25)-Mal B-Konzentrationen.	116
Abbildung 4.67: Proliferation von osteogen stimulierten hMSC nach 7 d und 14 d bei unterschiedlichen Copolymer-Konzentrationen, links - PEI(5)-PGlu-346, rechts - PEI(5)-PGlu-346-Mal.	117
Abbildung 4.68: Osteogene Differenzierung der hMSC zu Osteoblasten in Anwesenheit von PEI(5)-PGlu-346 (links) und PEI(5)-PGlu-346-Mal (rechts) nach 7 d und 14 d.....	117
Abbildung 5.1: schematische Darstellung der DDS in Abhängigkeit vom Ladungszustand. A – offene Schalenstruktur des PEI(5)-PBLG-346 mit α -helikalen PBLG-Ketten, B – pH-abhängiges Verhalten von PEI(5)-PGlu-346 in wässriger Lösung, C - pH-abhängiges Verhalten von PEI(5)-PGlu-346-Mal in wässriger Lösung mit binärer Doppelschale.	120
Abbildung 5.2: Vergleich der BZM-Freisetzungsrates aus BZM/PEI(5)-PGlu-346/CPC und BZM/PEK 1.1-A/CPC mit BZM/PEI(25)-Mal B/CPC und BZM/PEK 0.9/CPC, Konzentrationspaare 50 µg/100 µg.....	123
Abbildung 5.3: Vergleich der BZM-Freisetzungsrates aus BZM/PEI(5)-PGlu-346-Mal/CPC und BZM/PEK 1.1-B/CPC mit BZM/PEI(25)-Mal B/CPC und BZM/PEK 0.9/CPC, Konzentrationspaare 50 µg/100 µg.....	124
Abbildung 6.1: UV/Vis-Spektren als Grundlage zur Berechnung der Menge an komplexierten BZM am Beispiel PEI(5)-PGlu-346-Mal/BZM 1:10.....	146
Abbildung 7.1: ^{13}C -NMR-Spektrum von PEI(5)-PAsp-346, aufgenommen in D_2O	153
Abbildung 7.2: ^1H -NMR-Spektrum von PEI(5)-PGlu-346-Lak, aufgenommen in D_2O	153
Abbildung 7.3: ^1H -NMR-Spektrum von PEI(5)-PAsp-346-Mal, aufgenommen in D_2O ..	154
Abbildung 7.4: ^1H -NMR-Spektrum von PEI(5)-PAsp-346-Lak, aufgenommen in D_2O ..	154

Abbildung 7.5:	¹³ C-NMR-Spektrum von PEI(5)-PGlu-346-Lak, aufgenommen in D ₂ O...	155
Abbildung 7.6:	FT-IR-Spektrum von PEI(5)-PGlu-346-Lak, KBr-Pressling.....	155
Abbildung 7.7:	FT-IR-Spektrum von PEI(5)-PAsp-346-Mal, KBr-Pressling.....	156
Abbildung 7.8:	FT-IR-Spektrum von PEI(5)-PAsp-346-Lak, KBr-Pressling.....	156
Abbildung 7.9:	DLS-Verteilungskurven von PEI(25)-Mal B (c = 0,119 g/l) in reinem Wasser nach 0, 3, 20 h.....	157
Abbildung 7.10:	DLS-Verteilungskurven von PEI(25)-Mal B (c = 0,119 g/l) in PBS-Lösung nach 0, 3, 20 h.....	157
Abbildung 7.11:	DLS-Verteilungskurven von PEI(5)-PGlu-346 (c = 1,19 g/l) in PBS-Lösung nach 0, 3, 20 h.....	157
Abbildung 7.12:	DLS-Verteilungskurven von PEI(5)-PGlu-346-Mal (c = 1,19 g/l) in reinem Wasser nach 0, 3, 20 h.....	158
Abbildung 7.13:	DLS-Verteilungskurven von PEI(5)-PGlu-346-Mal (c = 1,19 g/l) in PBS-Lösung nach 0, 3, 20 h.....	158
Abbildung 7.14:	DLS-Verteilungskurven von PEI(5)-PGlu-346-Mal (c = 1,19 g/l) in reinem Wasser und PBS-Lösungen pH 3, 5, 7,4 und 9.....	158
Abbildung 7.15:	DLS-Verteilungskurven von PEI(5)-PGlu-346-Lak (c = 1,19 g/l) in reinem Wasser und PBS-Lösungen pH 3, 5, 7,4 und 9.....	159
Abbildung 7.16:	DLS-Verteilungskurven von PEI(5)-PAsp-346 (c = 1,19 g/l) in reinem Wasser und PBS-Lösungen pH 3, 5, 7,4 und 9.....	159
Abbildung 7.17:	DLS-Verteilungskurven von PEI(5)-PAsp-346-Mal (c = 1,19 g/l) in reinem Wasser und PBS-Lösungen pH 3, 5, 7,4 und 9.....	159
Abbildung 7.18:	DLS-Verteilungskurven von PEI(5)-PAsp-346-Lak (c = 1,19 g/l) in reinem Wasser und PBS-Lösungen pH 3, 5, 7,4 und 9.....	160
Abbildung 7.19:	aminosilanisierte Siliziumwafer in reinem Wasser und PBS-Puffer pH 7,4.....	160
Abbildung 7.20:	Kalibriergeraden für den Wirkstoff BZM in reinem Wasser (links) und PBS-Lösung (rechts).....	161
Abbildung 7.21:	Membranstabilitätstest von BZM (30 mg/l) auf einer PES-Membran (MWCO 1000 Da) in PBS-Lösung pH 7,4.....	161
Abbildung 7.22:	Komplexierte Menge BZM in PEI(5)-PGlu-346 in reinem H ₂ O und PBS-Lösung nach 0 h, 3 h und 20 h bei den molaren PEI(5)-PGlu-346:BZM-Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50.....	162
Abbildung 7.23:	links: Komplexierte Menge BZM in PEK 1.1-A in reinem H ₂ O nach 0 h, 3 h und 20 h bei den molaren Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50; rechts: Vergleich der BZM-Komplexierung zwischen PEI(5)-PGlu-346 und PEK 1.1-A nach 20 h.....	164
Abbildung 7.24:	DLS-Verteilungskurven von PEK 0.9 (0,119 g/l) nach 0 h, 3 h und 20 h.....	165
Abbildung 7.25:	DLS-Verteilungskurven von PEK 1.1-A 0 h, 3 h und 20 h nach dem Verdünnen der PEK 1.1-A-Stammlösung (1 g/l PEI(5)-PGlu-346 im PEK) entsprechend der Wirkstoffkomplexierung in reinem Wasser.....	166

Abbildung 7.26: DLS-Verteilungskurven von PEK 1.1-B 0 h, 3 h und 20 h nach dem Verdünnen der PEK 1.1-B-Stammlösung (1 g/l PEI(5)-PGlu-346-Mal im PEK) entsprechend der Wirkstoffkomplexierung in reinem Wasser. ..	166
Abbildung 7.27: DLS-Verteilungskurven von PEK 0.9/BZM 1:25 in reinem Wasser nach 0 h, 3 h und 20 h.....	166
Abbildung 7.28: DLS-Verteilungskurven von PEK 1.1-A/BZM 1:10, 1:25 und 1:50 in reinem Wasser nach 0 h, 3 h und 20 h.	167
Abbildung 7.29: DLS-Verteilungskurven von PEK 1.1-B/BZM 1:10, 1:25 und 1:50 in reinem Wasser nach 0 h, 3 h und 20 h.	167
Abbildung 7.30: DLS-Verteilungskurven von PEK 1.1-A (1 g/l) mit Na ₂ HPO ₄ (4 Gew.-%) nach 0 h, 3 h und 20 h.	168
Abbildung 7.31: DLS-Verteilungskurven von PEK 1.1-A (0,297 g/l) mit Na ₂ HPO ₄ (4 Gew.-%) nach 0 h, 3 h und 20 h.	168
Abbildung 7.32: DLS-Verteilungskurven von PEK 1.1-A (0,119 g/l) mit Na ₂ HPO ₄ (4 Gew.-%) nach 0 h, 3 h und 20 h.	168
Abbildung 7.33: DLS-Verteilungskurven von PEK 1.1-A (0,0595 g/l) mit Na ₂ HPO ₄ (4 Gew.-%) nach 0 h, 3 h und 20 h.	169
Abbildung 7.34: DLS-Verteilungskurven von PEK 1.1-B (0,297 g/l) mit Na ₂ HPO ₄ (4 Gew.-%) nach 0 h, 3 h und 20 h.	169
Abbildung 7.35: DLS-Verteilungskurven von PEK 1.1-B (0,0595 g/l) mit Na ₂ HPO ₄ (4 Gew.-%) nach 0 h, 3 h und 20 h.	169
Abbildung 7.36: Freisetzungsrates von BZM aus BZM/PEI(25)-Mal B/CPC und BZM/PEK 0.9/CPC innerhalb von 14 Tagen, links – Konzentrationspaar 50 µg/200 µg, rechts – Konzentrationspaar 100 µg/200 µg.	170
Abbildung 7.37: Freisetzungsrates von BZM aus BZM/PEI(5)-PGlu-346/CPC und BZM/PEK 1.1-A/CPC innerhalb von 14 Tagen, Konzentrationspaar 100 µg/100 µg.	170
Abbildung 7.38: Freisetzungsrates von BZM aus BZM/PEI(5)-PGlu-346-Mal/CPC und BZM/PEK 1.1-B/CPC innerhalb von 14 Tagen, Konzentrationspaar 100 µg/100 µg.	170

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Übersicht biologisch relevanter Calciumorthophosphate ⁵²	14
Tabelle 4.1:	Strukturparameter von PEI(5) und PEI(25).	43
Tabelle 4.2:	Verhältnisse der Monomere und theoretische zahlenmittlere Molmasse der dendritischen Copolymere.	47
Tabelle 4.3:	Allgemeine Infrarot-Frequenzen [cm ⁻¹] der Amid I- und Amid II-Banden von Polypeptiden nach Miyazawa und Blout. ²³²	49
Tabelle 4.4:	Infrarot-Frequenzen [cm ⁻¹] von Poly-β-benzyl-L-asparaginsäureester. ²⁴² ..	52
Tabelle 4.5:	Übersicht der mit SEC-RI-LS bestimmten Molmassen von PEI(5) und der verschiedenen PEI(5)-PBLG,	52
Tabelle 4.6:	Ergebnisse der AF4-LS-Messungen von PEI(5)-PGlu-346.....	60
Tabelle 4.7:	Analytische Daten der AF4-Messungen von PEI(5)-PGlu-346-Mal.....	66
Tabelle 4.8:	Hydrodynamische Durchmesser von PEI(25)-Mal B, PEI(5)-PGlu-346 und PEI(5)-PGlu-346-Mal in reinem Wasser und PBS-Lösung nach 0, 3 und 20 h.....	69
Tabelle 4.9:	Mit DLS bestimmte hydrodynamische Durchmesser [nm] der wasserlöslichen Kern-Schale-Architekturen in reinem Wasser und Pufferlösungen bei verschiedenen pH-Werten nach 20 h.....	72
Tabelle 4.10:	Kalibriergeraden der Wirkstoffe Cerivastatin, Risedronat und Bortezomib in reinem Wasser und PBS-Lösung.	84
Tabelle 6.1:	Eingesetzte Eduktmengen für die Synthese von β-BLA-NCA.....	132
Tabelle 6.2:	Syntheseparameter der NCA-Polymerisationen.	134
Tabelle 6.3:	Eingesetzte Eduktmengen für die Synthese von PEI(5)-PAsp-346.....	136
Tabelle 6.4:	Berechnete Anzahl der Maltoseeinheiten und Molmassen der Glykodendrimere mit Elementaranalyse, Masterarbeit Markus Franke. ...	137
Tabelle 6.5:	Eingesetzte Eduktmengen für die Synthese von PEI(5)-PGlu-346-Lak....	138
Tabelle 6.6:	Eingesetzte Eduktmengen für die Synthese von PEI(5)-PAsp-346-Mal und PEI(5)-PAsp-346-Lak.	140
Tabelle 6.7:	pH-Werte der Zetapotentialmessungen.....	142
Tabelle 6.8:	PEK- und BZM-Konzentrationen für die molaren Verhältnisse 1:10, 1:25 und 1:50 und entsprechende Volumina der PEK-Stammlösung (1 g/l Copolymer im PEK) und von reinem Wasser für die Herstellung der 120 ml PEK/BZM-Lösungen.....	145
Tabelle 6.9:	PEK-Konzentrationen für die molaren Verhältnisse 1:10 und 1:50 und entsprechende Volumina der PEK-Stammlösung (1 g/l Copolymer im PEK) und von reinem Wasser für die Herstellung der 100 ml PEK/BZM-Lösungen.	147
Tabelle 6.10:	Eingesetzte Volumina der jeweiligen Stammlösungen und der reinen AbbindeLösung in 1 g CPC.	148

Tabelle 6.11:	Eingesetzte Volumina der jeweiligen Stammlösungen und der reinen Abbinde­lösung in 1 g CPC zur Herstellung der beladenen BZM/Copolymer-Zemente.	149
Tabelle 6.12:	Eingesetzte Mengen an PEI(25)-Mal B, PEI(5)-PGlu-346 und PEI(5)-PGlu-346-Mal zur Herstellung vierfach konzentrierter wässriger Lösungen.	151
Tabelle 6.13:	Volumina an PEK-Stammlösung und reinem Wasser zur Herstellung von je 2 ml verdünnter PEK-Lösung entsprechend den molaren Verhältnissen.	152
Tabelle 7.1:	Rauigkeit und relative Oberflächendifferenz von PEI(5)-PGlu-346 und PEI(5)-PGlu-346-Mal auf aminosilanisierten Wafern in reinem Wasser und PBS-Puffer pH 7,4 im Vergleich zu reinen aminosilanisierten Siliziumwafern.	160
Tabelle 7.2:	prozentualer Anteil bzw. Anzahl (in Klammern) an komplexiertem BZM in PEI(25)-Mal B.	161
Tabelle 7.3:	prozentualer Anteil bzw. Anzahl (in Klammern) an komplexiertem BZM in PEI(5)-PGlu-346.	162
Tabelle 7.4:	prozentualer Anteil bzw. Anzahl (in Klammern) an komplexiertem BZM in PEI(5)-PGlu-346-Mal.	163
Tabelle 7.5:	Hydrodynamische Durchmesser von PEI(25)-Mal B/BZM-Komplexen mit den molaren Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50 in reinem Wasser und PBS-Lösung nach 0 h, 3 h und 20 h.	163
Tabelle 7.6:	Hydrodynamische Durchmesser von PEI(5)-PGlu-346/BZM-Komplexen mit den molaren Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50 in reinem Wasser und PBS-Lösung nach 0 h, 3 h und 20 h.	163
Tabelle 7.7:	Hydrodynamische Durchmesser von PEI(5)-PGlu-346-Mal/BZM-Komplexen mit den molaren Verhältnissen 1:10, 1:25 und 1:50 in reinem Wasser und PBS-Lösung nach 0 h, 3 h und 20 h.	164
Tabelle 7.8:	prozentualer Anteil bzw. Anzahl (in Klammern) an komplexiertem BZM in PEK 0.9.	164
Tabelle 7.9:	prozentualer Anteil bzw. Anzahl (in Klammern) an komplexiertem BZM in PEK 1.1-A.	165
Tabelle 7.10:	prozentualer Anteil bzw. Anzahl (in Klammern) an komplexiertem BZM in PEK 1.1-B.	165
Tabelle 7.11:	Freigesetzte Menge Rh-PEI(25)-Mal B aus Rh-PEI(25)-Mal B/CPC bzw. Rh-PEK 0.9/CPC innerhalb von 14 Tagen.	167

Publikationsliste

Beiträge in Zeitschriften:

„Amino acid modified hyperbranched poly(ethylene imine) with disaccharide decoration as anionic core-shell architecture: Influence of the pH and molecular architecture on solution behavior” Striegler, C.; Franke, M.; Müller, M.; Boye, S.; Oertel, U.; Janke, A.; Schellkopf, L.; Voit, B.; Appelhans, D. *Polymer* **2015**, *80*, 188-204.

„Dendritic glycopolymer as drug delivery system for proteasome inhibitor bortezomib in a calcium phosphate bone cement: First steps towards a local therapy of osteolytic bone lesions” Striegler, C.; Schumacher, M.; Effenberg, C.; Müller, M.; Seckinger, A.; Schnettler, R.; Voit, B.; Hose, D.; Gelinsky, M.; Appelhans, D. *Macromolecular Bioscience* **2015**, *15* (9), 1283-1295.

„Effects of dendritic core-shell glycoarchitectures on primary mesenchymal stem cells and osteoblasts obtained from different human donors” Lautenschläger, S.; Striegler, C.; Dakischew, O.; Schütz, I.; Szalay, G.; Schnettler, R.; Heiß, C.; Appelhans, D.; Lips, K. S. *Journal of Nanobiotechnology* **2015**, *13* (65), 1-16.

„Oligosaccharide shells as decisive factor for moderate and strong ionic interactions of dendritic poly(ethylene imine) scaffolds under shear forces” Tripp, S.; Appelhans, D.; Striegler, C.; Voit, B. *Chemistry - A European Journal* **2014**, *20* (27), 8314-8319.

„Delivery of bone therapeutic drugs by adhesive polyelectrolyte complexes” Torger, B.; Vehlow, D.; Woltmann, B.; Striegler, C.; Hempel, U.; Appelhans, D.; Müller, M. *de Gruyter* **2013**, *14*, 33.

„Biobasierte Polyelektrolytkomplexe für die kontrollierte Freisetzung von Arzneistoffen zur Behandlung von Knochenerkrankungen“ Müller, M.; Torger, B.; Appelhans, D.; Striegler, C.; Woltmann, B.; Hempel, U. *BIOMaterialien* **2011**, *12* (Heft 1-4), 67-78, SFB 12.

„Self-assembly of anionic core-shell architectures into pH-stable particles with defined dimensions as potential carrier systems” Voit, B.; Roßberg, C.; Appelhans, D.; Komber, H.; Krahl, F.; Arndt, K.-F.; Lederer, A. *Polymer Preprints* **2011**, *52* (1), 598.

Vorträge:

„Dendritic glycopolymers and their polyelectrolyte complexes as efficient drug delivery systems for retarded release of bortezomib from calcium phosphate cements“ C. Striegler, C. Effenberg, M. Franke, B. Torger, M. Müller, M. Schumacher, M. Gelinsky, A. Seckinger, B. Voit, D. Appelhans, 2014 IUPAC World Polymer Congress (MACRO 2014) – Chiang Mai, Thailand, 06.07.14 – 11.07.14.

Poster:

„Synthesis and characterisation of water-soluble polyglutamate-modified hyperbranched poly(ethylene imine)“ C. Striegler, D. Appelhans, F. Krahl, H. Komber, A. Lederer, A. Janke, B. Voit, 5th International Symposium on the Separation and Characterization of Natural and Synthetic Macromolecules – Amsterdam, Niederlande, 26.01.11 – 28.01.11.

„Synthesis and characterisation of water-soluble poly(amino acid)/oligosaccharide-modified hyperbranched poly(ethylene imine)“ C. Striegler, D. Appelhans, M. Franke, F. Krahl, H. Komber, A. Lederer, A. Janke, L. Schellkopf, B. Voit, 7th International Dendrimer Symposium (IDS7) – Gaithersburg, USA, 26.06.11 – 01.07.11.

Auszeichnung mit dem “Golden Poster Award“

„Biokompatible Polyelektrolytkomplexe für die kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen zur Hartgeweberegeneration“ B. Torger, M. Müller, C. Striegler, D. Appelhans, Projekttreffen SFB/TRR 79 – Heidelberg, Deutschland, 07.10.11.

„Evaluierung dendritischer Glycopolymere zur Komplexierung verschiedener Wirkstoffe für biomedizinische und analytische Fragestellungen“ C. Striegler, S. Tripp, D. Appelhans, N. Polikarpov, T. Erdmann, B. Voit, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM) – Gießen, Deutschland, 10.11.11 – 12.11.11.

Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Januar 2010 bis Juni 2016 am Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e. V. unter der wissenschaftlichen Betreuung von Frau Prof. Dr. habil. Brigitte Voit angefertigt.

Frühere Promotionsverfahren haben nicht stattgefunden.

Ich erkenne die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden vom 23.02.2011 mit den Änderungen der Beschlüsse des Fakultätsrates vom 15.06.2011 und 18.06.2014 in vollem Umfang an.

Dresden, 29.06.2016