

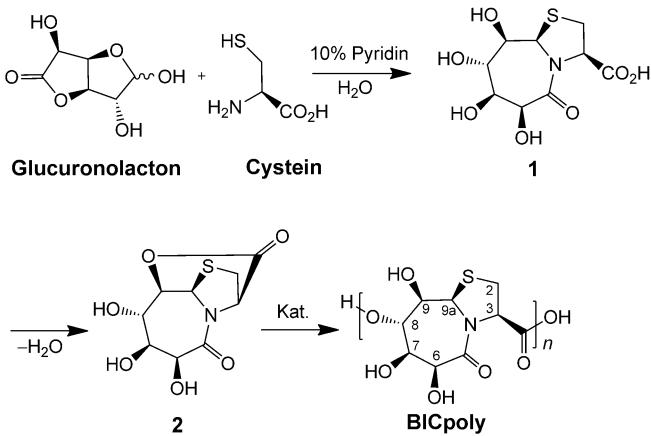
# Regioselektive Ringöffnungspolymerisation einer Polyhydroxycarbonsäure zu einem nanoskaligen Trägermaterial mit pH-abhängiger Stabilität und verzögter Wirkstofffreisetzung\*\*

Alexander Ewe, Anita Jansen de Salazar, Katharina Lemmnitzer, Michael Marsch,  
Achim Aigner\* und Armin Geyer\*

**Abstract:** *Synthetische Polyester sind aus Monohydroxycarbonsäuren aufgebaut, um das Problem der Regioselektivität der Veresterung bei der Ringöffnungspolymerisation zu vermeiden. Im Unterschied dazu trägt der lineare Polyester BICpoly gleich vier sekundäre OH-Gruppen pro Monomer und ist trotzdem nur über eine davon regioselektiv verestert. Sowohl bei der Synthese des tricyclischen Monomers als auch bei der Ringöffnungspolymerisation wird auf Schutzgruppen verzichtet, was BICpoly zu einem attraktiven neuen biokompatiblen Polymer macht. BICpoly-Nanopartikel können mit niedermolekularen Wirkstoffen beladen werden oder lassen sich auch als dünne Filme auf Oberflächen abscheiden. Die Freisetzung immobilisierter Substanzen macht BICpoly zu einem attraktiven Depot zur Wirkstofffreisetzung, wie wir anhand der Beladung von BICpoly mit Farbstoffen oder dem Zytostatikum Doxorubicin zeigen. Die charakteristische pH-Abhängigkeit des Abbaus unterscheidet BICpoly von anderen bekannten Polymeren.*

**B**iokompatible Polymere finden in der Medizin Verwendung z.B. für Beschichtungen oder als Depots für die Freisetzung von Wirkstoffen.<sup>[1]</sup> Häufig verwendet Bausteine sind Aminosäuren (Polyamide)<sup>[2]</sup> oder die Monohydroxycarbonsäuren Milchsäure (Polylactid PLA),<sup>[3]</sup> sowie Hydroxybuttersäure (Poly-R-3-hydroxybutyrat PHB).<sup>[4]</sup> Für Oligohydro-

xycarbonsäuren besteht die Herausforderung in der regioselektiven Ringöffnungspolymerisation (ROP), wofür es derzeit weder aktivierte Monomere, die ohne umständliche Schutzgruppenstrategie zugänglich sind, noch brauchbare Polymerisations-Katalysatoren gibt. Polymere biologischen Ursprungs, wie Polysaccharide (z.B. Cellulose) oder Polyhydroxycarbonsäuren (z.B. Alginate), sind gerade durch die selektive Ausbildung von nur einem aus einer Vielzahl möglicher Regiosomere gekennzeichnet. Dabei sind polymere Uronsäuren in der Regel als Acetale verknüpft. Hier beschreiben wir einen neuartigen Polyester, der wie andere synthetische Polyester durch ROP zugänglich ist, im Unterschied dazu aber die für Polysaccharide typische Anzahl von vier OH-Gruppen pro Baustein mit sich bringt (Schema 1).



**Schema 1.** Kondensation von D-Glucuronolacton mit L-Cystein liefert Thiazolidinolactam 1, welches mit EEDQ zu Monomer 2 lactonisiert wird. Nucleophile Katalyse der ROP führt zum Polyester BICpoly.

[\*] Dipl.-Chem. A. Ewe,<sup>[+]</sup> Prof. Dr. A. Aigner<sup>[++]</sup>  
Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
Klinische Pharmakologie, Universität Leipzig  
Härtelstraße 16–18, 04107 Leipzig (Deutschland)  
E-Mail: achim.aigner@medizin.uni-leipzig.de

Dr. A. Jansen de Salazar,<sup>[+]</sup> M. Marsch, Prof. Dr. A. Geyer<sup>[++]</sup>  
Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie  
Hans-Meerwein-Straße 4, 35032 Marburg (Deutschland)  
E-Mail: geyer@staff.uni-marburg.de

Dipl.-Phys. K. Lemmnitzer  
Institut für Medizinische Physik und Biophysik  
Universität Leipzig  
Härtelstraße 16–18, 04107 Leipzig (Deutschland)

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[+++] Gemeinsame Letztautorenschaft.

[\*\*] Wir danken Prof. Dr. M. Ulbricht und Dr. Jackely Aragón Gómez, Abteilung Polymeranalytik am Lehrstuhl für Technische Chemie II, Universität Duisburg-Essen, für die Durchführung der GPC-Messung sowie BSc. Wolf Mathis Rink für experimentelle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201412055> zu finden.

Die Kondensation von D-Glucuronolacton und L-Cystein ist im großen Maßstab in Wasser durchführbar.<sup>[5]</sup> Notwendig sind nur wenige Prozent Pyridin, damit die Reaktion nicht auf der Stufe des *S,N*-Acetals stehen bleibt. Dieses und ähnliche Thiazolidinolactame konnten als Dipeptidisostere in bioaktive Peptide,<sup>[6]</sup> synthetische Proteine<sup>[7]</sup> und synthetische Polyamide integriert werden<sup>[8]</sup> oder waren Ausgangspunkt für Naturstoffsynthesen.<sup>[9]</sup> Thiazolidinolactam 1 cyclisiert mit EEDQ (2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin) zu Lacton 2, welches als Pulver lagerbar ist. Pyridin wird bei der anschließenden Aufarbeitung komplett entfernt. Es kann alternativ auch durch Pyridoxal, einem Katalysator biologischen

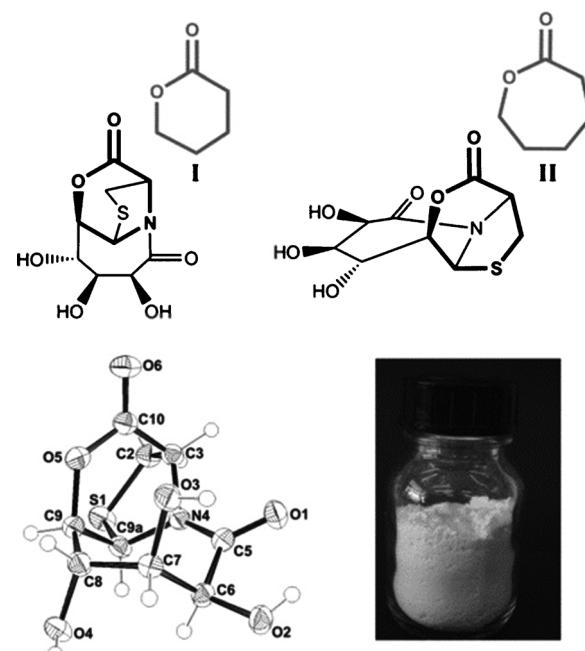
Ursprungs, ersetzt werden, ohne dass der Reaktionsverlauf dadurch beeinträchtigt wird. EEDQ vermittelt die regioselektive Kondensation der bekannten Tetrahydroxycarbonäure **1** zum Lacton **2**, welches ohne chromatographische Aufreinigung direkt aus dem Reaktionsmedium ausfällt. Von **2** konnte eine Kristallstruktur (CCDC 1017210) erhalten werden, die in Abbildung 1 gezeigt ist.

Die in der bicyclischen Ringgeometrie fixierte Ausrichtung der OH-Gruppen in **2** erzeugt einen ausreichend großen Reaktivitätsunterschied, um regioselektiv nur einen der möglichen Ester zu erhalten. Bei der basenkatalysierten ROP zum Polyester **BICpoly** werden im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum keine anderen Verknüpfungen, keine Umesterung oder gar verzweigte Ester beobachtet.

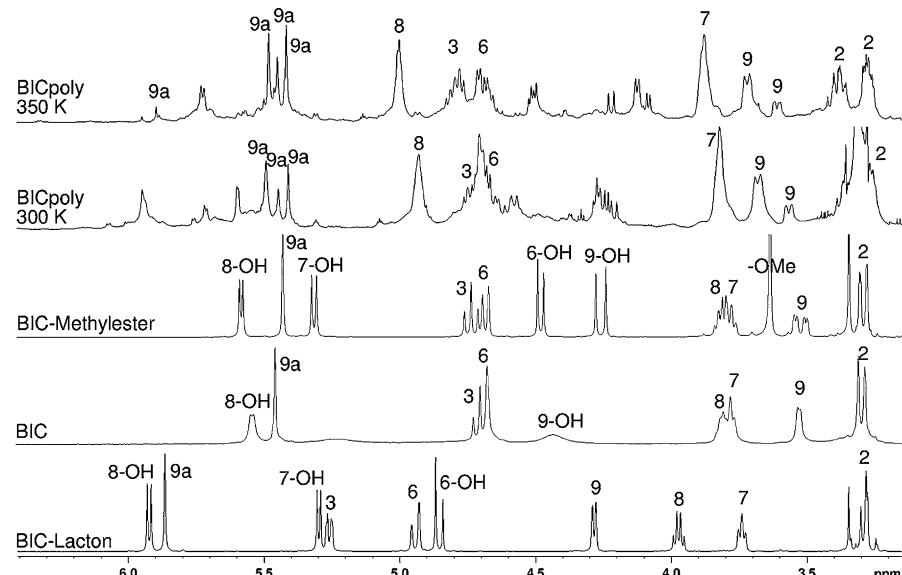
Als Reaktionsmedium bewährte sich Dimethylsulfoxid (DMSO), wovon **BICpoly** durch Fällung mit Wasser leicht abtrennbar ist. Für die ROP wurden unterschiedliche Basen als Katalysatoren untersucht (Details siehe Hintergrundinformationen). Eine Reaktionstemperatur von ca. 100 °C ist notwendig, um die Reaktion nach 30 min zu beenden. ROP liefert das Polymer mit einheitlicher Regio- und Stereochemie, wobei **BICpoly** ausschließlich aus dem in Schema 1 gezeigten Strukturelement aufgebaut ist. Die Verseifung des Polyesters durch Zugabe geringer Mengen von Basen (z. B. NaOH) hydrolysiert das Polymer wieder vollständig (> 99 % <sup>1</sup>H-NMR) in den Baustein **1**. Bei der Hydrolyse werden keine Fragmente beobachtet, welche eine separate toxikologische Untersuchung rechtfertigen würden (Hintergrundinformationen, Abbildung S1).

Die Massenspektrometrie identifiziert Polymerisationsgrade von weniger als 20 Bausteinen (siehe unten und Daten nicht gezeigt). ESI-MS wie MALDI-MS können nicht unterscheiden, ob der terminale Baustein als Lacton vorliegt oder ob es sich um makrocyclische Strukturen handelt. NMR-Spektroskopie identifiziert die Veresterung über O8 anhand der Entschirmung von C8 und H8 im Vergleich zu Monomer **1**. Über HPLC konnte das Tetramer abgetrennt werden, dessen NMR-spektroskopische Analyse in den Hintergrundinformationen, Abbildung S1 gezeigt ist. Zwar zeigen die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren die für ein Polymer statistischer Länge erwartete Mikroheterogenität. Allerdings kann nur mit dieser analytischen Methode die mit anderen Methoden nicht sichtbare Regioselektivität der Veresterung über O8 verifiziert werden (Abbildung 2).

Über MALDI-TOF werden Polymerisationsgrade bis  $n=9$  sicher nachgewiesen, sind darüber hinaus aber trotz schlechteren Signal/Rausch-Verhältnisses bis  $n=14$  zu



**Abbildung 1.** Die beiden oberen Darstellungen zeigen, dass **2** gleichzeitig einen δ-Valerolacton- und einen ε-Caprolactonring aufweist. Die Kristallstruktur verdeutlicht die kompakte Anordnung der oligocyclischen Ringe. Daneben ein Probengefäß mit **2** in Form eines weißen Pulvers.



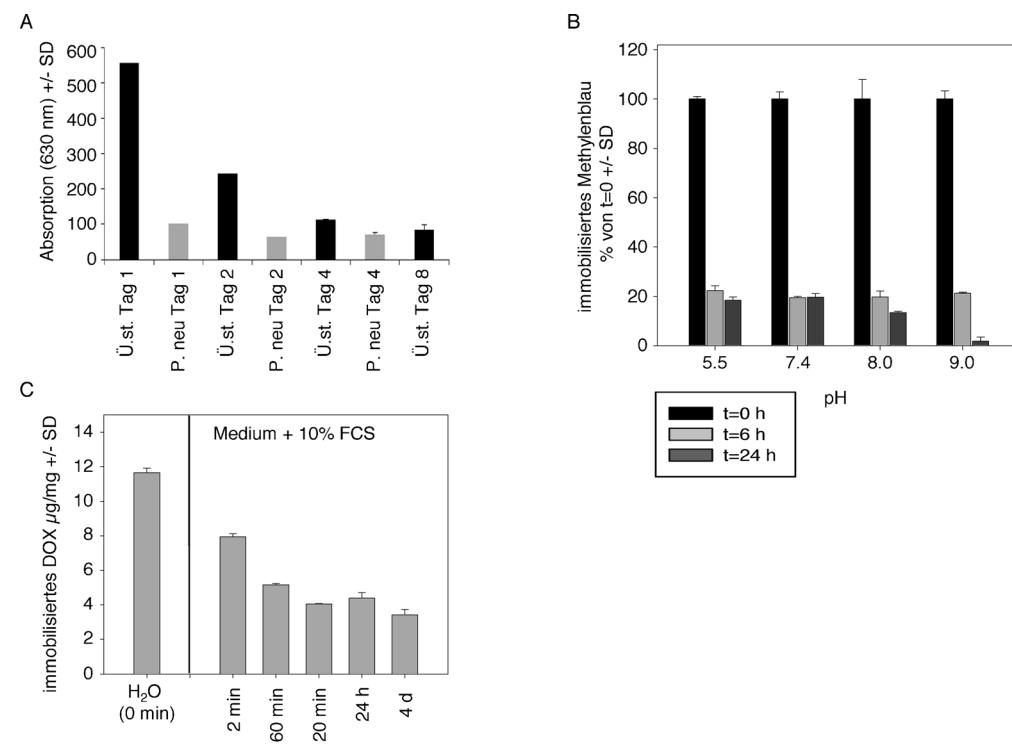
**Abbildung 2.** <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von **BICpoly** (500 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO, obere beiden Spektren 300 K und 350 K) sowie von drei monomeren BIC-Derivaten (300 MHz, 300 K, [D<sub>6</sub>]DMSO). Die Brückenkopfprotonen (H9a) liegen für die oberen vier Spektren charakteristisch um 5.5 ppm, während H9 im **2** (unteres Spektrum) bei 5.85 ppm resonant ist, wie die Endgruppe bei 350 K im **BICpoly** (oberstes Spektrum). Die selektive Veresterung über O8 führt zur Entschirmung von H8, welches in allen Monomeren unter 4 ppm resonant ist und als einziges der drei möglichen Verknüpfungsstellen (O6, O7 bzw. O8) in **BICpoly** auf ca. 5 ppm deutlich entzerrt wird. Unterschiedliche Polymerisationsgrade begründen die Heterogenität der Nebensignalsätze in den <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von **BICpoly**. Der chemische Austausch mit dem Proton der Carbonsäure führt zu unterschiedlicher Verbreiterung der OH-Gruppen. BIC-Methylester zeigt dabei die beste Vergleichbarkeit mit **BICpoly** bezüglich der 6-OH und 9-OH-Gruppen im Bereich von 4.0–4.6 ppm.

sehen (Hintergrundinformationen, Abbildung S2A). Eine sich daraus errechnende Molmasse des Polymers von ca.  $3500 \text{ g mol}^{-1}$  wird über Gelpermeationschromatographie bestätigt [ $M_n(D) = 3427 \text{ g mol}^{-1}$ ; Hintergrundinformationen, Abbildung S2B].

Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) und Phasenanalyse der Lichtstreuung (PALS) zeigen, dass bei der Fällung von in DMSO gelöstem **BICpoly** Nanopartikel gebildet werden. Die Größe der Nanopartikel erwies sich als abhängig von den Pufferbedingungen bei der Ausfällung und konnte in einem Bereich von 200 nm bis  $>1000$  nm eingestellt werden. So werden bei der Verwendung von reinem Wasser Nanopartikel mit einer Größe von ca. 200 nm (PCS, gemessen über Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments) und einer Oberflächenladung (Zetapotential, gemessen über ZetaPALS, Brookhaven) von  $-25$  bis  $-30$  mV erhalten (siehe Hintergrundinformationen, Abbildung S3A,B), während bei Salzlösungen (NaCl) mit steigender Ionenstärke größere Nanopartikel und schließlich auch Mikropartikel entstehen, die rasch sedimentieren (Hintergrundinformationen, Abbildung S3C). Der Vergleich von beladenen (siehe unten) mit nichtbeladenen Nanopartikeln in Wasser zeigt keinen Unterschied bezüglich Größe (Daten nicht gezeigt). Eine Behandlung der Nanopartikel mit Ultraschall (Ultraschall-Finger, Ultraschall-Bad) beeinflusst hingegen die Größe und führt zu etwas kleineren Nanopartikeln. So zeigt eine Größenmessung über Nanoparticle Tracking (NTA) – die immer etwas höhere Werte liefert als die PCS-Messung – eine Verkleinerung durch Ultraschall von 385 nm auf 294 nm (Hintergrundinformationen, Abbildung S3D).

Nanopartikel mit einer Größe von 300 nm und einer Ladung von  $-25$  mV wiesen nach mehrwöchiger Lagerung ohne Bewegung in dest. Wasser (pH 5.5–6.0) bei  $4^\circ\text{C}$  eine Größe von ca. 400 nm und eine Ladung bei ca.  $-30$  mV auf. Dies deutet auf eine Lagerbarkeit in Wasser ohne Aggregation und ohne nennenswerte sonstige Veränderungen hin,

was für andere polymere Nanopartikel oft nicht gilt und dann nur durch Modifikationen erreicht werden kann (siehe z.B. Lit. [10]). Bei Lagerung der Nanopartikel unter physiologischen Bedingungen (HEPES-gepufferte physiologische Kochsalzlösung) wurde die Bildung einer distinkten zweiten Population von Partikeln mit einer Größe um  $1.5 \mu\text{m}$  beobachtet, unter gleichzeitiger Detektion der oben genannten Nanopartikel. Letzteres könnte für antizipierte Anwendungen in biologischen Systemen unter Bedingungen, wo kein Abbau erfolgt, wichtig sein, obwohl unsere Untersuchungen zur biologischen Funktionalität immobilisierter Wirkstoffe eher darauf hindeuten, dass diese nicht kritisch von der Partikelgröße beeinflusst wird. Anschließend können die **BICpoly**-Nanopartikel auch als dünne Schicht auf die Oberfläche aufgebracht werden. Hierzu wurde die Suspension auf die Oberfläche gegeben und eingetrocknet. Der Phänotyp erwies sich dabei als abhängig von der Zahl der Waschschritte nach der Ausfällung, was auf unterschiedliche Partikelgrößen oder das Vorhandensein von residualem DMSO zurückgeführt



**Abbildung 3.** Verzögerte Freisetzung von Methylenblau aus präzipitierten **BICpoly**-Nanopartikeln. A)  $50 \mu\text{L}$  des nach Beladung blau gefärbten Nanopartikel-Sediments wurden, nach Abtrennung von nicht-geladenem Farbstoff, in  $0.1 \text{ M}$  Tris-Puffer (pH 7.4) aufgenommen und die Freisetzung des Methylenblau per Absorption der zentrifugierten Probenüberstände („Ü.st.“; schwarze Balken) bei  $630 \text{ nm}$  im zeitlichen Verlauf bestimmt. „P. (Puffer) neu“ repräsentieren Messungen direkt nach einem erfolgten Pufferwechsel (=der Hintergrund), und die Differenz zwischen dem grauen und dem schwarzen Balken des Folgezeitpunkts spiegelt somit die Methylenblau-Freisetzung wider. B) Zeitabhängigkeit der Menge an **BICpoly**-immobilisiertem Methylenblau in Abhängigkeit vom pH-Wert. Mit Methylenblau beladenes **BICpoly** wurde zum Zeitpunkt  $t=0$  bei den angegebenen pH-Werten ( $50 \text{ mM}$  Phosphatpuffer) bei  $37^\circ\text{C}$  unter Schütteln inkubiert. Nach 6 h bzw. 24 h wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Sediment zweimal mit Wasser gewaschen und die Menge an noch immobilisiertem Methylenblau bestimmt. Hierzu wurde das **BICpoly**-Sediment wie in den Hintergrundinformationen beschrieben lysiert; dargestellt ist die Absorption des Lysats, jeweils normiert auf  $t=0$ . C) Freisetzung von DOX unter physiologischen Bedingungen und Anwesenheit von Serum.  $1 \text{ mg}$  **BICpoly** wurden mit  $20 \mu\text{g}$  DOX beladen und in Zellkulturmedium inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Menge an noch immobilisiertem DOX bestimmt.

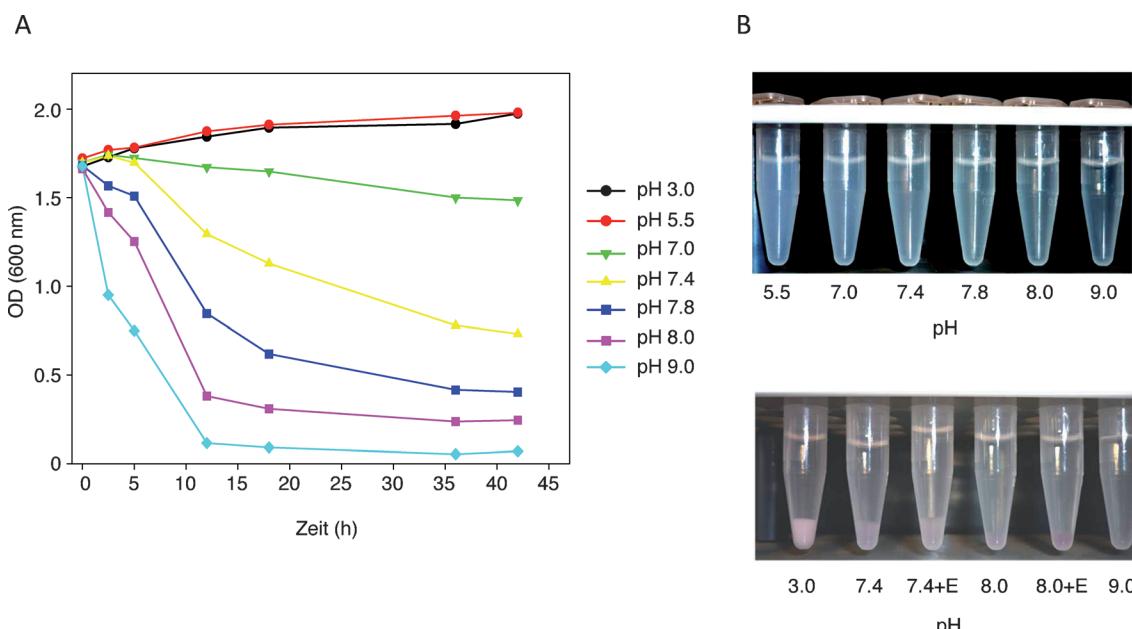
werden könnte. So ist ein Film aus einem nicht gewaschenen Präzipitat durchsichtig, nach mehreren Waschschritten un-durchsichtig weiß.

Die geringe Löslichkeit des Polymers und dessen rückstandslose Hydrolyse in BIC (Struktur 1) bzw. die beiden Monomere lassen es zur Verwendung als Depot zur Wirkstofffreisetzung geeignet erscheinen. Die Beladbarkeit von **BICpoly** mit niedermolekularen Stoffen sowie deren Freisetzung wurden exemplarisch für die Farbstoffe Methylenblau und Rhodamin sowie für das Zytostatikum Doxorubicin, das für mögliche medizinische Anwendungen bedeutsam ist und häufig als Modellsubstanz verwendet wird (siehe z.B. Lit. [11,12]), untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich im Zuge des Ausfällungsprozesses die entstehenden Nanopartikel, die wie oben dargestellt in Form eines Präzipitats oder bei Vorliegen einer Oberfläche als Film vorliegen, mit Wirkstoffen beladen lassen. Die Beladung gelang dabei unabhängig davon, ob der Wirkstoff in der DMSO-Phase (=Ausgangslösung des Polymers) oder in der wässrigen Phase (=Medium, dem das DMSO-gelöste Polymer zur Ausfällung zugeführt wird) vorgelegt wird. Die Beladungseffizienz erwies sich erwartungsgemäß als abhängig von der Ausgangskonzentration des Wirkstoffs in der Lösung; dieser sollte im Überschuss vorliegen. Im Falle von Methylenblau wurden maximale Beladungseffizienzen von  $10 \mu\text{g mg}^{-1}$  BICpoly ermittelt (Hintergrundinformationen, Abbildung S4A). Die Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Beladung zeigte hierbei, dass es sich um einen schnellen Prozess handelt, der bereits im untersten Minutenbereich abgeschlossen ist; eine Verlängerung der Inkubationszeit führte zu keiner zusätzlichen Beladung (Hintergrundinformationen, Abbildung S4B). Von den beladenen Nanopartikeln erfolgte

in reinem Wasser, auch bei Anwesenheit von Proteinen, die die Interaktion potenziell stören könnten, keine Desorption (Hintergrundinformationen, Abbildung S4C). Hingegen wurde in physiologischer NaCl-Lösung eine rasche Desorption bis auf ein Plateau bei ca.  $2 \mu\text{g mg}^{-1}$  BICpoly beobachtet, was dem Wert entspricht, der für Methylenblau auch bei Beladung unter diesen Salzbedingungen erzielt wurde (Daten nicht gezeigt) und auf elektrostatische und damit von der umgebenden Ionenstärke abhängige Wechselwirkungen hinweist. Im Falle des Zytostatikums Doxorubicin (DOX) wurde mit ca.  $12 \mu\text{g mg}^{-1}$  BICpoly eine etwas höhere Beladung erzielt. Diese war ebenfalls schnell und erwies sich als unabhängig davon, ob DOX während des Ausfällvorgangs zugesetzt („pre-loading“) oder anschließend zu den fertigen Nanopartikeln („post-loading“) zugegeben wurde (Hintergrundinformationen, Abbildung 4D). Während in reinem Wasser, auch in Gegenwart von Protein, wiederum keine Desorption erfolgte, nahm unter physiologischen Salzbedingungen die Beladungskapazität etwas ab, blieb mit ca.  $6 \mu\text{g mL}^{-1}$  BICpoly jedoch höher als bei Methylenblau (Daten nicht gezeigt).

Bei pH 7.4 wird der **BICpoly**-fixierte Wirkstoff langsam über mehrere Tage freigesetzt. Dies wurde zunächst an der langsamen Freisetzung von Methylenblau aus **BICpoly**-Nanopartikeln in den Überstand (Abbildung 3 A; siehe dort den Anstieg im Balken von grau nach schwarz) gezeigt.

Bei einem mehrfachen Pufferwechsel („P. (Puffer) neu“) war das **BICpoly**-Sediment nach 4 d vollständig entfärbt, ohne dass sich unter diesen Pufferbedingungen ein optisch sichtbarer Abbau des Polymers zeigte. Bei Inkubation von Methylenblau-beladenem BICpoly unter verschiedenen pH-Werten wurde nach einer raschen, durch die Ionenstärke des



**Abbildung 4.** Abbau der **BICpoly**-Nanopartikel, zu Färbezwecken beladen mit Doxorubicin, in Abhängigkeit vom pH-Wert eines zur Suspension verwendeten 0.5 M Tris-Puffers. A) Messung der optischen Dichte der Polymersuspensionen über einen Zeitraum von 6 d bei verschiedenen pH-Werten. B) Verbliebener Trübunggrad der Lösungen aus (A) nach 42 h (oben). Die Zentrifugation der Suspensionen nach Inkubation bei den angegebenen pH-Werten zeigt nach 42 h den teilweise Abbau bei pH 7.4 sowie den weitgehenden (pH 8.0) bzw. vollständigen (pH 9.0) Abbau bei pH 8.0 bzw. pH 9.0. Die Zugabe einer Esterase („+ E“) hat hierauf keinen Einfluss (B, unten).

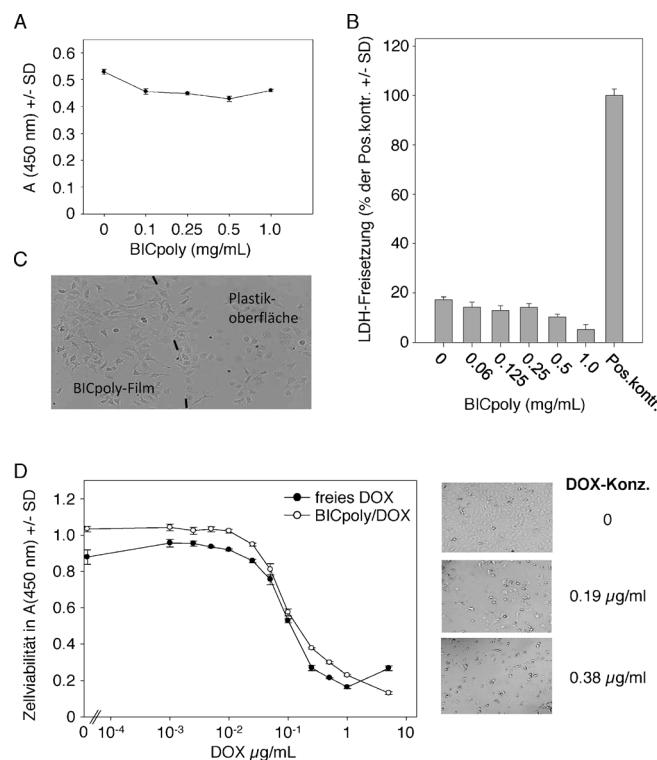
Puffers bedingten teilweisen Desorption nach 6 h bei niedrigen pH-Werten ein Plateau erreicht, wo unter diesen pH-Bedingungen keine weitere Desorption mehr erfolgte (Abbildung 3B). Hingegen wurde bei pH 8 bzw. pH 9 eine weitere teilweise (pH 8) bzw. fast vollständige (pH 9) Methylenblau-Freisetzung beobachtet, die auf die teilweise (pH 8) bzw. vollständige (pH 9) Hydrolyse des **BICpoly** zurückzuführen ist. Im Falle von DOX-beladenem **BICpoly** wurde die Abnahme der Menge an immobilisiertem Wirkstoff bei Inkubation in Zellkulturmedium untersucht. Hierbei wurde eine zunächst rasche, zu längeren Zeiträumen hin langsamer werdende Verringerung beobachtet (Abbildung 3C), wobei Werte erreicht werden, die unter der bei physiologischen Salzbedingungen erreichbaren Beladungskapazität liegen und wiederum auf einen langsamem Abbau des Trägermaterials hinweisen.

Tatsächlich kann parallel zur Freisetzung immobilisierter Substanzen ein Zerfall des Polymers unter Auflösung des sichtbaren, schwerlöslichen Präzipitats stattfinden. Dieser Prozess ist interessanterweise in einem engen pH-Bereich sehr stark pH-abhängig. So wurde ermittelt, dass bei 37°C dieser Zerfall bei pH 8–9 im unteren Stundenbereich (bis zu ca. 90% in den ersten 5 h) erfolgt, wohingegen im Bereich pH 3–7 völlige Stabilität über Tage (gemessen bis 6 d) besteht (Abbildung 4). Dies ist insofern besonders bedeutsam, als bei einem pH-abhängigen Abbau von Nanopartikeln im Allgemeinen der umgekehrte Fall, d.h. ein Zerfall bei niedrigen pH-Werten, beobachtet wird (siehe z.B. Lit. [12,13]). Der hier vorliegende bemerkenswerte Fall einer Stabilität bei saurem pH-Wert ist hingegen selten und eröffnet damit auch andere Applikationsmöglichkeiten. So ist eine orale Gabe (unbeschädigte Magenpassage mit anschließendem Abbau bei pH-Anstieg im Darm) möglich, wie beispielweise kürzlich für Poly(esteramide) zur oralen Insulin-Applikation gezeigt.<sup>[14]</sup>

Bei dem physiologisch besonders wichtigen pH 7.4 erfolgt innerhalb der ersten 2 d ca. 40% Abbau, der danach in eine noch langsamere Kinetik übergeht. Dieser bei pH 7.4 langsam erfolgende Abbau ist damit im Hinblick auf biologische Systeme besonders interessant.

In verschiedenen biologischen Tests konnte gezeigt werden, dass sich **BICpoly** sowie die Vorstufen **1** und **2** in vitro (Zellkultur) durch hohe Biokompatibilität auszeichnen. Im Zellviabilitätstest wird bei **BICpoly** über einen weiten Konzentrationsbereich keine Reduktion der Zahl lebender Zellen beobachtet (Abbildung 5A). Dies wird durch einen LDH-Freisetzungstest bestätigt, wo der Nicht-Anstieg von in das Medium freigesetzter Lactat-Dehydrogenase (LDH) das Ausbleiben von Zellzerstörung beweist (Abbildung 5B). Erst bei einer Konzentration von 20 mg mL<sup>-1</sup> wird eine leichte Beeinträchtigung des Zellwachstums beobachtet, was jedoch auf die Bildung und Ablagerung der Nanopartikel als Niederschlag auf den Zellen zurückgeführt werden kann (Hintergrundinformationen, Abbildung S5A). Im Falle der (nicht präzipitierenden) Zwischenprodukte **BIC** bzw. **2** wird selbst bei höheren Konzentrationen (100 mM; 28 mg mL<sup>-1</sup>) keine Zytotoxizität beobachtet (Hintergrundinformationen, Abbildung S5B).

Nach Aufbringen eines **BICpoly**-Überzugs auf eine Zellkultur-Unterlage konnte sogar beobachtet werden, dass sich



**Abbildung 5.** Die Zugabe steigender Mengen **BICpoly** zum Zellkulturmedium führt zu keiner Änderung in der Viabilität (A) und zu keiner Zerstörung (B) von SKOV-3 Ovarialkarzinomzellen, gemessen über WST-1-Assay bzw. LDH-Freisetzungstest. Der Umsatz an WST-1, bestimmt als A(450), ist proportional zur Zahl lebender Zellen, die Freisetzung von Lactat-Dehydrogenase (LDH) ein Maß für Zellzerstörung. C) Anheftung und Wachstum von adhärenten SKOV-3-Ovarialkarzinomzellen auf dem **BICpoly**; zum Vergleich sind Bereiche ohne Film mit Zellen gezeigt, die auf dem Plastikboden der Kulturschale wachsen. Die Zellen zeigen bei apparent gleicher Dichte und Viabilität eine geringfügig andere, eventuell durch kleinere Unterschiede in der extrazellulären Matrix bedingte Morphologie. D) Dosis-abhängige zytotoxische Wirkung von freiem und **BICpoly**-immobilisiertem Doxorubicin. 72 h nach Zugabe der auf der x-Achse bezeichneten Mengen DOX, frei oder mit **BICpoly** formuliert, wurde über WST-1-Assay die Zahl der lebenden Zellen bestimmt.

adhärente Zellen darauf anheften und kultivieren lassen (Abbildung 5C). Es finden somit Interaktionen zwischen Zellen und der **BICpoly**-Unterlage statt, ohne die Zellen zu beeinträchtigen. Entsprechend wurde auch beobachtet, dass sich im Zuge des Auflösungsprozesses des Präzipitats entstehende Partikel an Zellen anlagern.

Neben der Biokompatibilität des Trägers kommt dem Erhalt der Aktivität des immobilisierten Wirkstoffs besondere Bedeutung zu, und diese wurde hier anhand von DOX untersucht. Nach Behandlung kultivierter Tumorzellen mit freiem DOX wurde eine charakteristische Dosis-Wirkungs-Kurve erhalten (Abbildung 5D). Diese unterschied sich insbesondere im Hinblick auf die IC<sub>50</sub> (Konzentration halbmaximaler Inhibition) nicht von der Kurve aus gleichen Mengen an **BICpoly**-immobilisiertem DOX, was den vollständigen Erhalt der Aktivität des aus der **BICpoly**-Immobilisierung wieder freigesetzten DOX zeigt.

Zusammenfassend ist es uns gelungen, einen Polyester herzustellen, der alternierend aus D-Glucuronsäure und L-Cystein aufgebaut ist und bemerkenswerterweise ohne jegliche Schutzgruppen eine vollständig regiospezifische Polymerisation zeigt. Die Eigenschaften von **BICpoly** als Trägermatrix für niedermolekulare Wirkstoffe legen verschiedene Anwendungsmöglichkeiten im biomedizinischen bzw. pharmazeutischen Bereich nahe. Hierbei werden hinreichend hohe Beladungskapazitäten z.B. für das Zytostatikum Doxorubicin erreicht, und es ist vor allem auch der sehr stark pH-abhängige Abbau des Polymers zu den völlig natürlichen und damit biokompatiblen Ausgangsbausteinen zu berücksichtigen und von besonderem Interesse. Bei dem gerade für biologische Systeme wichtigen pH 7.4 wird eine Zerfallskinetik beobachtet, die die Immobilisierung von Wirkstoffen und deren protrahierte Freisetzung zulässt, während bereits durch leichte Modifikation des pH-Werts eine deutliche Stabilisierung des nanopartikulären Präzipitats bzw. ein stark beschleunigter Abbau erzielt werden kann und hierbei eine im Vergleich zu anderen Systemen inverse pH-Abhängigkeit der Stabilität beobachtet wird.

**Stichwörter:** Cystein · Nanopartikel · Polyester · Polyhydroxycarbonsäuren · Wirkstofftransport

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 6364–6369  
*Angew. Chem.* **2015**, *127*, 6462–6467

- [1] S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, K. W. Leong, *Compos. Sci. Technol.* **2001**, *61*, 1189–1224.
- [2] a) A. Cohen-Arazi, J. Domb, J. Katzhendler, *Polymer* **2010**, *2*, 418–439; b) W. Khan, S. Muthupandian, S. Farah, N. Kumar, A. J. Domb, *Macromol. Biosci.* **2011**, *11*, 1625–1636.

- [3] a) Y. Cheng, S. Deng, P. Chen, R. Ruan, *Front. Chem. China* **2009**, *4*, 259–264; b) L. Xiao, B. Wang, G. Yang, M. Gauthier in *Biomedical Science Engineering and Technology* (Hrsg.: D. N. Ghista), InTech, **2012**, S. 246–282; c) D. Garlotta, *J. Polym. Environ.* **2001**, *9*, 63–84.
- [4] a) D. Seebach, M. G. Fritz, *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *25*, 217–236; b) S. Mecking, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1078–1085; *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1096–1104.
- [5] A. Geyer, D. Bockelmann, K. Weissenbach, H. Fischer, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 477–478.
- [6] M. Haack, S. Enck, H. Seger, A. Geyer, A. G. Beck-Sickinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8326–8336.
- [7] B. Eckhardt, W. Grosse, L. O. Essen, A. Geyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 18336–18341.
- [8] M. Deshmukh, S. Singh, A. Geyer, *Biopolymers* **2013**, *99*, 273–281.
- [9] S. Enck, P. Tremmel, S. Eckhardt, M. Marsch, A. Geyer, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7166–7178.
- [10] A. Ewe, A. Schaper, S. Barnert, R. Schubert, A. Temme, U. Bakowsky, A. Aigner, *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 2663–2673.
- [11] S. W. Kim, K. T. Oh, Y. S. Youn, E. S. Lee, *Colloids Surf. B* **2014**, *116*, 359–364.
- [12] a) X. Duan, J. Xiao, Q. Yin, Z. Zhang, H. Yu, S. Mao, Y. Li, *ACS Nano* **2013**, *7*, 5858–5869; b) S. Wang, Y. Wu, R. Guo, Y. Huang, S. Wen, M. Shen, J. Wang, X. Shi, *Langmuir* **2013**, *29*, 5030–5036.
- [13] a) Y. Svenskaya, B. Parakhonskiy, A. Haase, V. Atkin, E. Lukyanets, D. Gorin, R. Antolini, *Biophys. Chem.* **2013**, *182*, 11–15; b) H. K. Kim, D. H. Thompson, H. S. Jang, Y. J. Chung, J. Van den Bossche, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 5648–5658.
- [14] P. He, Z. Tang, L. Lin, M. Deng, X. Pang, X. Zhuang, X. Chen, *Macromol. Biosci.* **2012**, *12*, 547–556.

Eingegangen am 16. Dezember 2014,  
veränderte Fassung am 23. Januar 2015  
Online veröffentlicht am 13. April 2015