

**Biomedizinische Anwendung von
Nanodiamant: Untersuchungen zu den
Wechselwirkungen mit der biologischen
Umgebung und zur gezielten
Wirkstofffreisetzung**



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Julius-
Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sarah Schweeberg

aus Würzburg

Würzburg 2018

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

Doktorurkunde ausgehändigt am

Das Geheimnis des Erfolges kennen nur jene, die einmal Misserfolg gehabt haben.

— *Antoine Saint-Exupéry* —

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2013 bis Oktober 2017 am Institut für Organische Chemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

X. Wu, M. Bruschi, T. Waag, S. Schweeberg, Y. Tian, T. Meinhardt, R. Stigler, K. Larsson, M. Funk, D. Steinmüller-Nethl, M. Rasse, A. Krueger, “Functionalization of Bone Implants with Nanodiamond Particles and Angiopoietin-1 to Improve Vascularization and Bone Regeneration”, *J. Mater. Chem. B* **2017**, 5, 6629 – 6636.

DANKSAGUNG

Ich danke Prof. Dr. Anke Krüger ganz besonders für die Betreuung meiner Arbeit und die Unterstützung bei den aufgetretenen wissenschaftlichen Fragestellungen.

Bei meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. Kamal Mustafa, Dr. Salwa Suliman und Dr. Mohamed Ibrahim von der Universität Bergen, Prof. Dr. Tanja Schirmeister, Annika Wagner und Sascha Jung von der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, sowie Prof. Dr. Doris-Steinmüller-Nethl möchte ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit bedanken.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern und ehemaligen Angestellten des Instituts für Organische Chemie der Universität Würzburg, die mich bei der Arbeit unterstützt haben. Dazu gehören Dr. Matthias Grüne und Elfriede Ruckdeschel aus der NMR-Abteilung, Dr. Michael Büchner und Fritz Dadrich aus der Massenspektrometrie und vor allem Frau Juliane Adelman, die immer einen sehr guten Vorschlag machte, wie man Moleküle noch sinnvoll vermessen kann. Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Vladimir Stepanenko für die Hilfe beim Spincoaten von Nanodiamanten, Liselotte Michels und Sabine Timmroth aus der Elementaranalyse sowie bei den engagierten und immer freundlichen Mitarbeitern aus der Chemikalienausgabe, Michael Ramold, Manfred Reinhart, Frank Förtsch und Bernd Brunner aus den verschiedenen Werkstätten, und insbesondere dem Glasbläser Jonathan Landeck, der immer bereit war, eine Spezialanfertigung sehr schnell und durchdacht anzufertigen, den Mitarbeitern aus der Institutsverwaltung der Organischen Chemie Dr. Christian Stadler, Dr. Alfons Ledermann, Anette Krug, Eleonore Klaus, Petra Leckert und ganz besonders Markus Braun, der mir immer weiterhelfen konnte, auch außerhalb der Öffnungszeiten.

Mein herzlichster Dank gilt außerdem den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Krüger, die mich während der Doktorarbeit durch Hochs und Tiefs begleitet haben. Dazu gehören Dr. Johannes Auerswald, Dr. Patrick Betz, Dr. Steffen Heyer, Benjamin Kiendl, Dr. Yvonne Kirchwehm, Stefan Kupka, Veronika Krämer, Dr. Daniel Lang, Dr. Peter Buschmann, Rachel Buschmann, Andreas Muzha, Stefan Wachtler, Viktor Warkentin, Johannes Ackermann, Lena Roos, Sinem Toksabay, Dr. Sara Ranjbar, Thomas Hertle, Christian Bauer, Julia Puck und natürlich Dr. Thilo Waag. Ich habe sowohl den wissenschaftlichen Austausch als auch die gemeinschaftlichen inner- und außeruniversitären Aktivitäten immer sehr genossen. Denjenigen, die ich im Zuge von Ausbildungen, Abschlussarbeiten oder Praktika betreuen durfte und die mich durch ihre Anstrengungen unterstützt haben, bin ich sehr

dankbar. Das sind Maria Son, Stefan Forster, Alexander Fritz, Katharina Emmert, Lena Roos, Frederik Wöber, und Julian Fink. Besonders Julian Fink möchte ich ebenfalls danken für die motivierenden Kaffeepausen und auch für die Hilfe beim Erstellen der Spektren.

Den größten Dank möchte ich meiner Familie und meinen Freunden aussprechen. Ohne die Hilfe und bedingungslose Unterstützung meiner beiden Geschwister, meiner Eltern, der Frau meines Vaters, meines Patenonkels sowie dessen Frau wäre ich nie so weit gekommen. Meinen Freunden möchte ich insbesondere danken für eure ewige Geduld und ellenlanges Zuhören, das Aushalten meines Auskotzens und eure liebevolle Unterstützung, sei es Sonntags- oder Mittagessen, etliche Kaffeepausen, von Nah und Fern (Schweiz mit inbegriffen); ihr tragt einen Großteil zum Gelingen dieses Zeitabschnitts bei!! Danke schön!!

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Nanodiamant.....	1
1.1.1 Herstellung von Nanodiamant-Partikeln.....	1
1.1.2 Struktur und Eigenschaften von Nanodiamant	1
1.1.3 Übersicht über die Funktionalisierung der Oberfläche von Nanodiamant.....	2
1.1.4 Homogenisierung und Funktionalisierung der Oberfläche von Nanodiamant.....	3
1.1.5 Das Anwendungspotential von Nanodiamant im medizinischen und biologischen Bereich	7
1.1.5.1 Nanopartikel als Wirkstoffträger.....	7
1.1.5.1.2 Anforderungen an Nanopartikel als Wirkstoffträger.....	7
1.1.5.2 Nanopartikel in biologischen Medien	13
1.2 Stimuli-Responsive Anbindung an Nanodiamant.....	18
1.3 Verwendete Wirkstoffe	20
1.3.1 Chloramphenicol.....	20
1.3.2 Folsäure.....	21
1.3.3 Doxorubicin.....	22
2 Zielsetzung	23
3 Hauptteil.....	25
3.1 Herstellung eines Linkersystems zur Anbindung an Nanodiamant.....	28
3.1.1 Synthese des Orthoesters 1 und dessen versuchte Anbindung an Nanodiamant...28	28

3.1.2	Synthese des Orthoesters 2.....	32
3.1.2.1	Reaktion des Diols 27 mit Triethylorthoacetat zum Orthoester 29.....	32
3.1.2.2	Reaktion des Chloramphenicols 6 mit Triethylorthoacetat und anschließender Reaktion mit 28 zum Orthoester 32	41
3.1.3	Reaktionen der Diole 27 und 12 mit Acrolein	43
3.1.3.1	Reaktion des Diols 27 mit Acrolein zum Orthoester 58	43
3.1.3.2	Reaktion des Diols 12 mit Acrolein zum Orthoester 20	44
3.1.4	Weitere Syntheseversuche zur Herstellung eines Orthoesters.....	45
3.2	Synthese eines Hydrazons zur Anbindung an Nanodiamant.....	47
3.2.1	Synthese eines Linkersystems zur pH-labilen Anbindung von DOX und kovalenten Anbindung von Folsäure.....	47
3.2.1.1	Funktionalisierung des Nanodiamanten 65 mit Alkin- und Carbonsäuregruppen.....	48
3.2.1.2	Synthese der funktionalisierten Folsäure 70	49
3.2.1.3	Funktionalisierung des Nanodiamanten 78 mit Alkin- und Carbonsäuregruppen	52
3.2.1.4	Synthese des Linkersystems zur Anbindung der Folsäure	53
3.2.1.5	Aufbau des Folsäurekonjugats 82	57
3.2.1.6	Anbindung des Linkers 87 an Folsäure 7.....	59
3.2.1.7	Anbindung an Doxorubicin 8 an die Nanodiamantsysteme 71 und 102	61
3.2.1.8	Anbindung von Doxorubicin 8 an Hydrazidderivat 104.....	65
3.2.1.9	Freisetzung von Doxorubicin 8 der unterschiedlichen Nandiamant-Konjugat-Systeme 103 und 106	67

3.2.2 Anwendung der Nanodiamantsysteme 71 und 102 auf weitere Ketonderivate.....	72
3.2.2.1 Anbindung von Ketonderivat 107 an Nanodiamantsysteme 71 und 102	72
3.3 Interaktionen von Nanodiamanten mit physiologischen Medien und Proteinen	77
3.3.1 Stabilität von Nanodiamant in physiologischen Medien	77
3.3.1.1 Stabilität von Nanodiamant in physiologischer 5%iger Glucoselösung (110).....	77
3.3.2 Nanodiamanten und Proteine	83
3.3.2.1 Nanodiamant und Angiopoietin-1 (111)	83
3.3.2.2 Nanodiamant (Cerasorb/Diasorb) in Humanserum (112)	84
4 Zusammenfassung und Ausblick	91
5 Summary and Outlook.....	95
6 Experimentalteil	99
6.1 Chemikalien	99
6.2 Analysenmethoden und Geräte.....	99
6.3 Synthesen	106
6.3.1 Synthese organischer Verbindungen.....	106
6.3.2 Herstellung und Funktionalisierung von Nanodiamant.....	160
7 Abkürzungsverzeichnis.....	176
7 Literaturverzeichnis.....	179

1 EINLEITUNG

1.1 Nanodiamant

1.1.1 Herstellung von Nanodiamant-Partikeln

Als Nanodiamant in den 1960er Jahren entdeckt wurde, war sein enormes Anwendungspotential noch nicht absehbar.^[1] Zur Zeit weckt er großes Interesse in der Erforschung für seine Anwendung im Bereich der Energieumwandlung und -speicherung, Katalyse, Elektronik, Optoelektronik und Biomedizin.^[2]

Bei der Herstellung von Nanodiamant wird grundlegend zwischen zwei verschiedenen Verfahren, der Schockwellenmethode und der Detonationssynthese, unterschieden.^[3-5] Hier-nach folgen noch einige Aufreinigungsschritte, bevor der Nanodiamant weiter funktionalisiert werden kann.

1.1.2 Struktur und Eigenschaften von Nanodiamant

Nanodiamant besitzt aufgrund seiner Größe und Struktur sehr interessante physikalische und chemische Eigenschaften, die zum größten Teil von der Beschaffenheit seiner Oberfläche abhängt. Da die Teilchen mit ca. 3–5 nm Größe 20–30 % ihrer Kohlenstoffatome auf der Oberfläche präsentieren, sind diese maßgeblich für die Reaktivität und Dispersionsfähigkeit entscheidend.^[6] Diamant besitzt eine außergewöhnliche Stabilität, einen hohen Härtegrad und eine sehr hohe Wärmeleitfähigkeit.^[7-8] Detonationsnanodiamant weist eine durch Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS) ermittelte Bandlücke von ca. 3.5 eV auf, je nach seinem Graphitisierungsgrad oder der Einbettung von Fremdatomen in der Gitterstruktur, was ihn zu einem interessanten Material in der Elektronik macht.^[9-11] Makroskopischer Diamant hingegen besitzt eine Bandlücke von etwa 5.5 eV und ist somit ein guter Isolator. Nanodiamant kann verschiedene Defekte besitzen, die ihn lumineszent machen. Als Beispiel sei hier der fluoreszente Nanodiamant zu nennen, der ein sogenanntes *nitrogen-vacancy center* (NV-Zentrum) aufweist.^[12-13] Hierbei ist ein Kohlenstoffatom durch ein Stickstoffatom ersetzt, dem eine Fehlstelle benachbart ist. Aufgrund dieses Zentrums besitzt dieser Diamant eine

eigene Fluoreszenz im roten und infraroten Bereich, die mit einem Laser, der Licht in einem Wellenlängenbereich von 400 nm – 600 nm ausstrahlt, angeregt werden kann.^[14] Diese Fluoreszenz bleibt über die Zeit stabil, blinkt nicht und bleicht nicht aus, was fluoreszenten Nanodiamant zu einem hervorragenden Kandidaten für biologische und medizinische Untersuchungen von Zellen, DNA oder Mikroorganismen macht.^[15-17]

1.1.3 Übersicht über die Funktionalisierung der Oberfläche von Nanodiamant

Die Oberflächenstruktur von Nanodiamant hängt sehr stark von der Herstellungsmethode ab.^[18-19] Allein wie der Diamant hergestellt wurde, ob durch das *high-pressure-high-temperature* (HPHT)-Verfahren, wobei zuerst größere Partikel entstehen, die anschließend auf die gewünschte Größe durch vielfältige weitere Verfahren verkleinert werden können, durch *chemical-vapour-decomposition* (CVD) oder durch das Detonationsverfahren Nanodiamantpartikel erzeugt werden, macht einen großen Unterschied in der Art der Oberflächengruppen und damit auch in der Reaktivität aus. Durch die relativ kleine Partikelgröße von 3 – 5 nm besitzt Detonationsnanodiamant eine sehr große Oberfläche, auf der hauptsächlich sauerstoffreiche Gruppen wie Hydroxygruppen, Ether oder Carbonsäuren (Abb. 1), aber auch eine große Anzahl an Doppelbindungen präsentiert werden.^[4, 20-22]

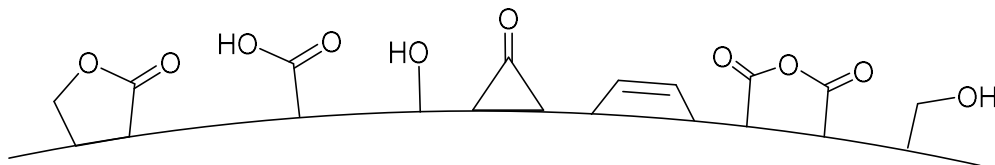


Abb. 1: Schematische Darstellung der Nanodiamantoberfläche, die vorwiegend sauerstoffhaltige Gruppen trägt.

Diese inhomogene Oberfläche fördert aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen, intermolekularer Wechselwirkungen oder kovalenter Bindungen die Agglomeratbildung.^[23] So können sich die erhaltenen Primärpartikel zu größeren Verbunden durch Adsorption oder Wasserstoffbrückenbindungen, wie auch durch kovalente Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Oberflächengruppen, zusammenschließen.

Für die Deagglomeration werden unterschiedliche Wege besprochen. Einer der effektivsten Wege, um Primärpartikel des Detonationsnanodiamanten zu erhalten, ist die Verwendung der

Rührwerkskugelmühle.^[24] Zum Aufbrechen der gebildeten Agglomerate wird auch oft das sogenannte BASD-Verfahren (*bead-assisted sonic disintegration*) verwendet, wobei unter starkem Ultraschall und dem Einsatz von Zirkoniumoxid als Mahlkörper Primärpartikel entstehen.^[25] Ebenfalls kann man durch chemische Behandlung und gleichzeitiger Beschallung im Ultraschallbad Primärpartikel erhalten.^[26]

Um den Abrieb der Mahlkörper zu vermeiden, werden auch nicht-toxische und nicht-kontaminierende kristalline Verbindungen wie Sucrose oder Natriumchlorid als zusätzliche Mahlkörper verwendet und eine trockene Vermahlung durchgeführt.^[27] Die Größe der Partikel beläuft sich dabei auf < 10 nm und beide Stoffe können durch einfaches Herauswaschen mit Wasser entfernt werden.

Die so erhaltenen Nanopartikel können nun mit unterschiedlichen Reagenzien und Methoden auf ihrer Oberfläche funktionalisiert werden.

1.1.4 Homogenisierung und Funktionalisierung der Oberfläche von Nanodiamant

Bevor die Oberfläche der Nanodiamantpartikel funktionalisiert werden kann, muss sie homogenisiert werden. Hierfür werden unterschiedliche Verfahren wie Oxidation, Reduktion, Graphitisierung, Halogenierung oder Hydrierung der Oberfläche durchgeführt. Folgende Abbildung gibt eine Übersicht über die unterschiedlichen Verfahren (Abb. 2).

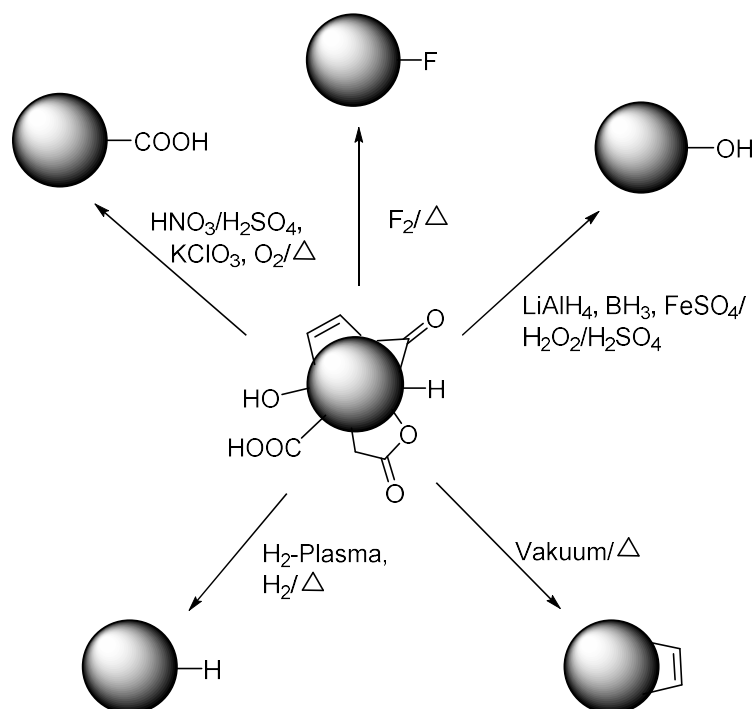


Abb. 2: Verschiedene Methoden zur Homogenisierung der Nanodiamantoberfläche.

Durch nasschemische Reaktionen können Oxidation bzw. Reduktion der Oberflächengruppen durchgeführt werden. Wird eine Mischung aus Salpetersäure und Schwefelsäure verwendet, werden Carboxylgruppen auf der Oberfläche generiert und die anschließende Kupplung von Aminogruppen kann sehr einfach gelingen.^[28] Soll eine möglichst homogene Hydroxylierung auf der Oberfläche realisiert werden, verwendet man Reduktionsmittel wie Borhydrid oder Lithiumaluminiumhydrid.^[29] Auch das Fenton-Reagenz (Eisen(II)sulfat und Wasserstoffperoxid in Schwefelsäure) erzeugt Hydroxylgruppen auf der Oberfläche.^[30] Durch die Anwendung eines Wasserstoffplasmas konnten Girard *et al.* zeigen, dass die Nanodiamantoberfläche fast vollständig hydriert werden kann.^[31]

An der homogenisierten Oberfläche können nun gezielt weitere Funktionalisierungen, ob kovalent oder nicht-kovalent, stattfinden. Oxidierter Nanodiamant mit Carboxylgruppen auf der Oberfläche kann nun durch Veresterungen mit Molekülen, die Hydroxylgruppen tragen, modifiziert werden.^[32] Auch können carboxylfunktionalisierte Primärpartikel zu hydroxylterminierten reduziert werden, die dann z.B. Paclitaxel, ein Krebstherapeutikum, physisorbieren können.^[33] Es ist aber auch möglich, Alkylketten an die Hydroxygruppen kovalent anzubinden und nach zwei weiteren Reaktionen ebenfalls Paclitaxel kovalent

anzubringen.^[34] Über Peptidkupplungsreagenzien können Aminogruppen an die Carbonsäuren der Nanodiamantoberflächen angebunden werden.^[35]

Alkine bieten eine breite Anwendung zur Anbindung verschiedenster Biomoleküle. 2001 wurde von Kolb *et al.* das ungeheure Anwendungspotential von „Click“- Chemie in der Naturstoffsynthese und Arzneimittelherstellung herausgestellt.^[36-38] Ihnen war wichtig, Mechanismen zu präsentieren, in denen man auf teure Enzymreaktionen verzichten kann, um Kohlenstoff-Heteroatom-Bindungen, die unverzichtbar beim Aufbau von neuen Pharmazeutika und Naturstoffen sind, zu knüpfen.

Um ausgedehnte sp^2 -hybridisierte Bereiche auf der Oberfläche vorzufinden, muss diese graphitisiert werden.^[39] Hierfür wird das Diamantmaterial im Vakuum für eine bestimmte Zeit bei 600 - 800 °C ausgeheizt, wodurch die sauerstoffhaltigen Gruppen verbrannt und unterschiedliche Arten an Doppelbindungssystemen entstehen.^[40] Werden die Temperaturgrenzen überschritten und die Zeitspanne ausgedehnt, so werden auch weiter innen gelegene Bereiche der Nanodiamanten in sp^2 -hybridisierte Schichten umgewandelt und es entstehen sogenannte Nanozwiebeln (*carbon onions*).^[41] Dieses Material wird z.B. analog der *Hummer*-Methode oxidiert, anschließend mit Harnstoff vermischt und einer Pyrolyse unterworfen, um Stickstoff-dotierte Nanozwiebeln zu erhalten, die Anwendung als elektrokatalytisches Material finden sollen.^[42]

Mit Nanodiamant, der eine hydrierte Oberfläche aufweist, sind ebenfalls Reaktionen durchführbar, die über einen Mechanismus des Elektronentransfers zur Funktionalisierung führen können.^[43] So zeigte Yeap *et al.*, dass die Immobilisierung von Diazoniumsalzen auf der Oberfläche, wobei Elektronen vom Nanodiamant an das Nitrophenyldiazoniumsalz übertragen werden, zu einer kovalenten Anbindung führt. Weitere Funktionalisierungen über Linkersysteme können nun dazu verwendet werden, um Wirkstoffe oder andere Moleküle anzubinden.

1.1.5 Das Anwendungspotential von Nanodiamant im medizinischen und biologischen Bereich

Gerade im medizinischen und biologischen Bereich haben Nanopartikel allgemein viele Kriterien und Anforderungen zu erfüllen.^[44-46] Die Herausforderungen, wie Stabilität in biologischen Medien, Abhängigkeit der Agglomeration von Größe oder Oberflächenfunktionalisierung, sowie die Ausbildung der Proteincorona und deren Steuerung sind nach wie vor Gegenstand der aktuellen Forschung.^[47-50]

1.1.5.1 Nanopartikel als Wirkstoffträger

Nanopartikel, wie Liposomen, magnetische Partikel, PLGA (Poly Lactic-co-Glycolic Acid)-Partikel, Gold- oder Platinpartikel, spielen schon seit einiger Zeit eine wichtige Rolle als Wirkstofftransportsysteme. Gerade in der Krebsforschung, in der bereits Medikamente wie Doxil® und Abraxane® Einzug in den Markt gefunden haben, sind die Vorteile der Nanopartikel gegenüber herkömmlichen Therapeutika besonders interessant.^[51-53] Einer davon ist der gezielte Transport eines Wirkstoffes zum Wirkort.^[54-55] Hierdurch können zukünftig geringere Wirkstoffmengen verabreicht werden, wodurch eine bessere Verträglichkeit für den Patienten erreicht werden kann und auftretende Nebenwirkungen eingeschränkt oder sogar beseitigt werden können.^[56] Weitere Vorteile von Nanopartikeln sind eine hohe Wirkstoffbeladung, eine gewünschte Langzeitstabilität der Konjugate, sowie geringe Produktionskosten.^[57]

1.1.5.1.2 Anforderungen an Nanopartikel als Wirkstoffträger

Nanodiamanten sind als Träger von Wirkstoffen aufgrund dieser genannten und noch einer weiteren, sehr bedeutenden Eigenschaft im Fokus der Forschung: ihrer geringen Toxizität.^[52, 58] Vor allem diese Eigenschaft macht sie für die medizinische Anwendung interessant.

Es stellt sich jedoch immer noch die Frage, wie funktionalisierte Nanodiamanten oder auch Nanodiamanten selbst auf die unterschiedlichen Zellarten wirken.^[55, 59-62] Als Wirkstoffträger sollten sie keine lebensbeeinträchtigenden Eigenschaften mit sich bringen. Schrand *et al.* untersuchte unterschiedliche Zelltypen unter dem Einfluss funktionalisierter und unfunktionalisierter Nanodiamanten und stellte fest, dass kaum bis keine toxischen Auswirkungen auf die Zellkulturen zu finden waren.^[63]

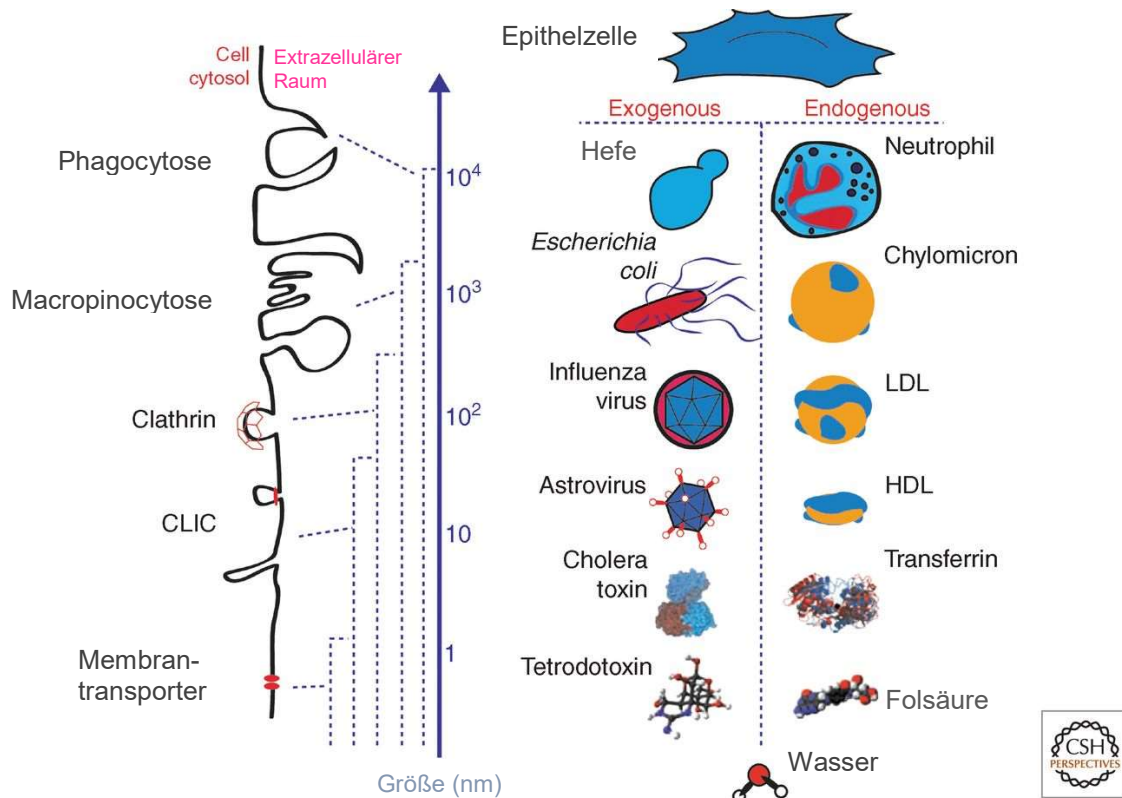


Abb. 3: Verschiedene Mechanismen der Endozytose und das Verhältnis der Größe oder endogenem/exogenem Transport (entnommen aus Lit. 64 mit freundlicher Genehmigung des CSH Perspectives Verlag).

Nanomaterialien, die über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden, wurden bereits auf die Oberflächenchemie, Partikelgröße, Form, Oberflächenbeschaffenheit und die Freisetzung aus den Endosomen in der Zelle untersucht (Abb. 3).^[64] Kationische Partikel werden besser aufgenommen als anionische oder neutrale. Grund hierfür ist die nicht-clathrin und nicht-caveolae-vermittelte Zellaufnahme der kationischen Spezies durch die negativ geladenen Proteoglykane auf der Zelloberfläche.^[65] Jedoch weisen diese Partikel auch eine höhere Cytotoxizität auf. Anionische Partikel hingegen sind weniger cytotoxisch, zeigen aber starke Interaktionen mit Plasmaproteinen, so dass sie erst gar nicht die Zelloberfläche erreichen und somit eine geringere Einschleusung in die Zelle geschieht.^[66] Ebenso spielt die Form eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme in die Zelle. So werden z.B. Goldpartikel, die kugelförmig sind, besser von HeLa-Zellen aufgenommen als zylindrische.^[67] Auch die Anordnung von anionischen und hydrophoben Gruppen auf der Oberfläche der Goldpartikel führt zu einem unterschiedlichen Aufnahmeweg in die Zelle.^[68] Als hydrophobe Gruppe dient 1-Octanthiol und als hydrophile Oberflächengruppe verwendet die Gruppe um Verma *et al.* 11-Mercapto-1-undecansulfonat. Sind die Gruppen abwechselnd und strukturiert angeordnet, so

werden die Partikel über Membranporen aufgenommen. Ist deren Verteilung zufällig und unstrukturiert auf der Oberfläche, werden sie über Endocytose eingeschleust.

Um die Partikeloberfläche nach außen hin abzuschirmen, aber immer noch kleine Partikelgrößen und eine gute Löslichkeit zu erhalten, werden Nanopartikel-Systeme entwickelt, die in organischen, wässrigen bzw. biologischen Medien diese Eigenschaften aufweisen. Tasaki *et al.* modifizierten die Oberfläche der Detonationsnanodiamanten mit Stearinsäure oder Tributylhexadecylphosphoniumbromid, um eine bessere Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln zu erreichen.^[69] Andere Gruppen wie die um Zhang *et al.* versuchen die Solubilisierung über Anbindung oder Physisorption von Lipiden an der Oberfläche von Nanodiamanten zu verbessern.^[70] Auf diese lipidbeladenen Nanodiamanten wurde das hydrophobe Krebstherapeutikum Sorafenib, ein Therapeutikum, was Anwendung bei fortgeschrittenen Tumoren findet, geladen und die Freisetzung untersucht. Die Konzentration des Wirkstoffs ist 15fach höher im primären Tumorgewebe verglichen mit dem freien Medikament und die Metastasenbildung bei Magenkrebs wird unterdrückt. Dieses System gilt als weisend für die Solubilisierung von hydrophoben Medikamenten und deren bessere Aufnahme.^[70]

Rotello *et al.* zeigt eine weitere Möglichkeit mit Zwitterionen für eine bessere Solubilisierung von Nanopartikeln auf.^[71-72] Die Gruppe untersuchte Zwitterionen unterschiedlicher Polyethylenglykol (PEG)-Kettenlängen, die sie an Goldpartikel angebunden haben sowie deren Affinität zu bestimmten Antibiotika, um multiresistente Bakterien zu bekämpfen.

Die Idee, Wirkstoffe über PEG-Ketten an Liposomen anzubinden, stammt aus dem Jahre 1994.^[73] Die Verwendung von PEG hat zwei Vorteile: Die Vermeidung der Phagozytose durch das Retikuloendotheliale System (RES), heute auch Retikuloendotheliales System (RES) genannt, und die Verwendung als Spacer bzw. Abstandhalter des endständigen Moleküls zur Partikeloberfläche. Hierdurch wird z.B. Folsäure, ein Rezeptoragonist, sehr gut auf der Liposomenoberfläche präsentiert und kann von Rezeptoren besser erkannt werden.^[73]

Ebenfalls wird versucht durch die Funktionalisierung von Nanodiamant mit PEG-Ketten auf der Oberfläche die Stabilisierung der Nanopartikel in biologischen Systemen voran zu treiben.^[74-76] In unterschiedlichen Medien zeigt sich, dass die Physisorption von Doxorubicin, einem Krebstherapeutikum, z.B. in Natriumcitratlösung fünfmal höher ist als in destilliertem Wasser. Über 150 Tage in PBS bei 4 °C betragen die Partikelgrößen von PEGylierten Nanodiamant 185 nm mit einem Zetapotential von -25 mV, wobei die Beladung zu einer Größe

von 211 nm mit einem Potential von -28 mV führt. Die Autoren weisen hier auf den sogenannten EPR (enhanced permeability and retention)-Effekt hin, der dazu führen würde, dass sich die größeren Konjugate im Tumorgewebe anreichern würden. Der EPR-Effekt begünstigt den passiven Wirkstofftransport.^[77-78] Hierbei kommt es durch die erhöhte Permeabilität der Membran zur Diffusion von größeren Molekülen wie Lipiden, Makromolekülen oder Nanopartikeln (100-400 nm) ins Zellinnere. Die erhöhte Permeabilität entsteht durch die Ausbildung neuer Blutgefäße, deren Epithelzellen Mängel in der vaskulären Struktur, sogenannte vergrößerte Fenestrierungen, die für den besseren Wirkstofftransport verantwortlich sind, aufweisen. Aufgrund des schlecht ausgebildeten Lymphsystems des Tumors kommt es kaum zum Abtransport aus der Zelle, so dass sich größere Partikel, größer als 40 kDa (ca. 6 nm), anreichern können. *In vitro* Tests zeigen eine erhöhte Mortalität der Krebszellen als mit freiem Wirkstoff allein, wie auch eine langsamere aber insgesamt erhöhte Freisetzung des Wirkstoffs aus dem Konjugat.^[75] Dies führt *in vivo* zu einer verlängerten Zirkulationszeit, da die Freisetzung über einen längeren Zeitraum geschieht und aufgrund der geringen freien Wirkstoffmenge, die zirkuliert, zu weniger Nebenwirkungen.

Ein weiterer Ansatz ist die Präsentation von PEG-Ketten unterschiedlicher Länge auf der Nanopartikeloberfläche. Es wurde untersucht, was für Auswirkungen auf die Blutzirkulationsdauer und die Aufnahme in Zellen bzw. Organen sie haben.^[79] Dabei zeigte sich, wie auch schon bei anderen Gruppen, dass die Blutzirkulationsdauer zunimmt, je mehr Polyethylenglykol-Einheiten sich auf der Oberfläche der Polymernanopartikel (Poly- ϵ -caprolacton, PCL) befinden. Durch unterschiedliche Oberflächenbelegungen erhielten sie auch unterschiedliche Eigenschaften und die Nanopartikel wurden in die Gruppen „brush“ (NPEG_{0.19}, NPEG_{0.25}, NPEG_{0.36}), d.h. eine PEG-Dichte von 0.19 – 0.36 PEG/nm², und „dense brush“ (NPEG_{0.55}, NPEG_{0.72}, NPEG_{0.86}), d.h. eine PEG-Dichte von über 0.55 PEG/nm², unterteilt. Die Nanopartikel mit einer Größe von circa 100 nm wurden für *in vivo* Tests an Mäusen verwendet, um einen Vergleich der „brush“- und „dense brush“-Gruppen realistisch durchführen zu können (Abb. 4).

Die Akkumulation in Leber und Milz nahm mit steigender PEG-Oberflächendichte ab, was in Einklang mit der Blutzirkulationsdauer steht. Ebenfalls zeigte die „dense brush“-Gruppe eine höhere Akkumulation in Tumorzellen, was auf die verlängerte Zirkulationsdauer zurückzuführen ist. Auch die Adsorption von Serumproteinen nahm ab, je höher die PEG-Dichte auf der Nanopartikeloberfläche war (Abb. 4).

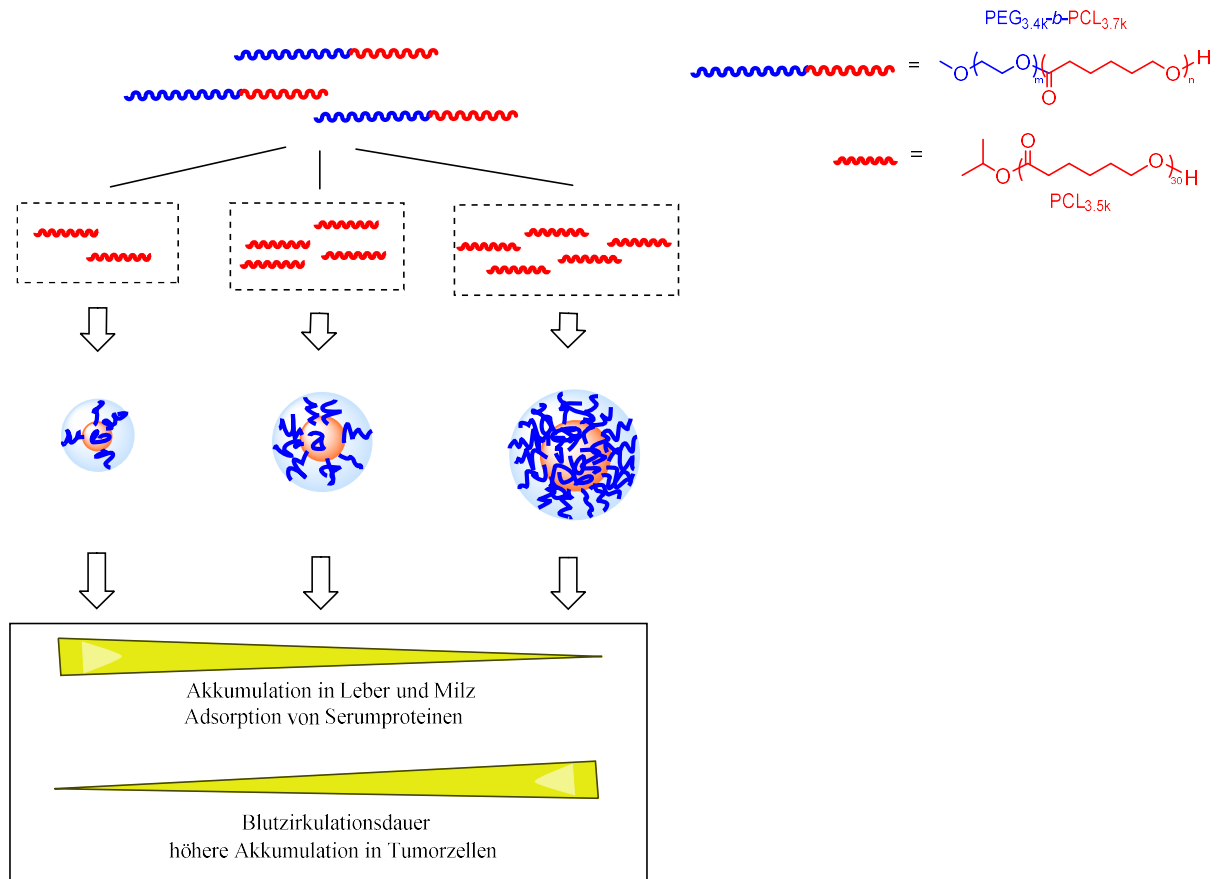
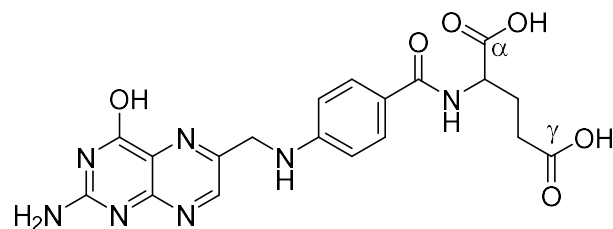


Abb. 4: Schematische Darstellung der Zunahme des Durchmessers der Polymer-Nanopartikel sowie die systemischen Auswirkungen, Anteil der Poly-ε-caprolacton (PCL, rot), Anteil der PEG-Einheiten (blau), ausgebildete Hydrathülle (hellblau) (in Anlehnung an Lit. 79).

Ein weiterer Aufnahmeweg für Nanopartikel findet über Rezeptoren, die für Signaltransduktion, Einschleusung oder Apoptose verantwortlich sind, statt. Einer dieser Rezeptoren ist der Transferrin-Rezeptor, ein transmembranes Transportprotein, das Transferrin über Endozytose in die Zelle, vor allem in Mitochondrien, einschleust.^[80] So wurden schon Gold-Nanopartikel, an die Transferrin über ein säurelabiles Diaminoketal angebunden ist, hinsichtlich der Überwindung der Blut-Hirnschranke beobachtet.^[81] Aber auch die rezeptorvermittelte Aufnahme in Krebszellen, sowie die Auswirkungen von Transferrin-modifiziertem Nanodiamanten hinsichtlich der Zellaufnahme in unterschiedliche Zelltypen wurden untersucht.^[82]

Ein ebenso interessanter Rezeptor, von denen es verschiedene Typen gibt, bindet Folsäure und schleust diese in die Zelle über unterschiedliche Wege ein. Der Erste ist ein Carrierprotein, der sogenannte Folatrezeptor 1 (engl.: reduced folate receptor (RFC)), der das Ein- und Ausschleusen reduzierter Folsäuren vereinfacht.^[83] Über ihn werden die meisten folsäureähnlichen

Wirkstoffe, wie Methotrexat, in die Zelle eingebracht. Bei dem zweiten Rezeptor handelt es sich um den protonengekoppelten Folatransporter, der ausschließlich Folsäure (PCFT) und Folsäurederivate transportiert.^[83] Wibowo *et al.* postulierten 2013 das Vorhandensein von drei verschiedenen Rezeptortypen, hFR α , hFR β und hFR γ , wohingegen Ledermann *et al.* 2015 schon vier unterschiedliche Transporter vorstellten.^[84] Der zuletzt entdeckte wird FR δ bzw. Juno genannt, jedoch ist dieser nicht in der Lage reduzierte Folsäure oder Folsäure selbst zu binden, sondern stellt den Ei-Izumo-Rezeptor dar, der für die Erkennung der Eizelle durch das Spermium verantwortlich ist. Die Gruppe um Salazar zeigte 2008 auf, dass vorwiegend FR α auf Tumorzellen überexprimiert wird und damit ein guter Rezeptor für die Aufnahme von Folsäurekonjugaten darstellt.^[85-86] Diese Folatrezeptoren sind auf Tumorzellen der Eierstöcke wie auch des Uterus zu finden, ebenso sind sie Bestandteile der ependymalen Gehirn- und malignente Pleuramesotheliome, und sind auch auf der Oberfläche von Lungen-, Nieren-, Brust- und Darmkarzinomen gehäuft anzufinden.^[87-88] Die einzelnen Bindungsmodi des Rezeptors, ob α , β oder γ , sagen nichts darüber aus, welche und ob die α -oder γ - Carbonsäure der Folsäure mit der Bindetasche interagiert oder nicht. In den bisherigen Veröffentlichungen wurde die Anbindung über die γ -Carbonsäure gezeigt, jedoch nicht über die α -Carbonsäure, obwohl diese chemisch gleich reaktiv sind und beide mit Kupplungsreagenzien zur Aktivierung reagieren können.^[89-90]



Einige Systeme, die über Folatrezeptor-vermittelte Endocytose in die Zelle eingebracht werden, setzen ihren Wirkstoff lichtinduziert als sauerstofffreie Alternative zur Photodynamischen Therapie frei.^[90-91] Die Freisetzung des Therapeutikums fand in den ersten vier Minuten statt, jedoch besitzt die Photothermale Therapie die Einschränkung, dass es tiefere Gewebeschichten mit den verwendeten Wellenlängen nicht erreicht werden können.^[90]

Die Größe von Nanodiamantpartikeln und deren Aufnahme in die Zellen, sowie die Beladungskapazität mit Wirkstoff wurde von Ryu *et al.* 2015 untersucht.^[92] Sie stellten drei verschiedene Fraktionen von Nanodiamant-Konjugaten, beladen mit Folsäure und Doxorubicin, her (45,8, 102 und 207 nm) und untersuchten deren Aufnahme in KB-Zellen

(Zellen, die auf ihrer Oberfläche Folsäurerezeptoren überexprimiert haben) mit zwei unterschiedlichen Nanodiamant-Konjugat-Konzentrationen (0.01 und 0.05 wt%). Die beste Zellaufnahme und Wirkstofffreisetzung zeigte sich bei den kleinsten Teilchen und in der Konzentration von 0.01 wt%. Das Zetapotential der Konjugate lag bei -40.2 mV. Bei der Zellaufnahme gab es bis zum Zeitpunkt von 20 h zwischen dem freien Doxorubicin und dem an Nanodiamant physisorbierten Wirkstoff keinen Unterschied. Danach jedoch stieg die Aufnahme des Konjugats, bis es ein Plateau erreichte, wohingegen der Spiegel des freien Wirkstoffs sank. Die Autoren führten dies auf den MDR (multidrug resistance)-Effekt zurück, der besagt, dass die Zelle vermehrt Pumpen in der Membran aktiviert, um den Wirkstoff wieder auszuschleusen. Ist er jedoch gebunden an Nanodiamant, wird er nicht erkannt und kann in der Zelle verweilen. So findet bei einer geringen Konzentration an Wirkstoff kein Efflux aus der Zelle statt, der Wirkstoff wird kontinuierlich freigesetzt und kann selbst nach 72 h sein Wirkprofil entfalten. Somit wäre eine bessere Verträglichkeit gewährleistet, denn aufgrund des niedrigen Wirkstoffspiegels würden auch mögliche Nebenwirkungen reduziert. In einem neueren Paper wurde die Aufnahme von Nanodiamant-Folsäure/Doxorubicin-Konjugaten über einen längeren Zeitraum untersucht.^[93] Die Größe der Konjugatpartikel betrug 61.9 nm und das Zetapotential lag bei +27.4 mV. Ebenfalls untersuchten Ryu *et al.* die kolloidale Stabilität der Partikel und das Zetapotential in PBS, das mit 20% FBS versetzt war, und konnten feststellen, dass sie über einen Zeitraum von 14 Tagen stabil waren. Das Konjugat wurde Mäusen über die Schwanzvene injiziert, die mehrere Tumore aufwiesen. Einzig bei Gabe des Folsäure/Doxorubicin-Nanodiamant-Konjugats konnte eine Verkleinerung des Tumors nach 14 Tagen festgestellt werden. Alle anderen Testgruppen, die nur Nanodiamant, Folsäure-Nanodiamant-Konjugat oder Doxorubicin-Nanodiamant-Konjugat erhielten, wiesen weiteres Tumorstadium auf.

Neuere Arbeiten verwenden den Vorteil, mehrere unterschiedliche Moleküle auf der Nanodiamantoberfläche anzubinden. So wurde inzwischen ein Nanodiamantsystem entwickelt, das Doxorubicin, welches durch p-glycoproteingesteuerte Effluxpumpen ausgeschleust wird, und Malaridin, welches einen Inhibitor des p-Glycoproteins darstellt, trägt.^[94] Durch die vermehrte Ausbildung von Effluxpumpen, hervorgerufen durch den MDR-Effekt, führt eine Kombination dieser beiden Wirkstoffe zu einer verbesserten Wirkung. So kann Malaridin die Effluxpumpen inhibieren und das gleichzeitig eingeschleuste Doxorubicin seine volle Wirkung entfalten.

Zusätzlich kann man am Nanodiamanten neben dem Wirkstoff noch eine funktionelle Gruppe, z.B. eine Alkin- oder Azideinheit, anbringen, die kovalent mit einem Azid oder Alkin verknüpft werden kann. Hier können z.B. Signalmoleküle wie Folsäure oder Hyaluronsäure, die mit einem Azid versehen sind, am Nanodiamanten gebunden werden, so dass eine Aufnahme über Rezeptoren in die Zelle ermöglicht wird, um gezielt den Wirkstoff in der Zelle freizusetzen.

1.1.5.2 Nanopartikel in biologischen Medien

Setzt man Nanopartikel einem Medium mit hohem Salzgehalt aus, so kann es zur Aggregation kommen.^[95] Ähnliches passiert, wenn ein Nanopartikel einem biologischem Medium, z.B. Plasmaserum, ausgesetzt wird und sich in kürzester Zeit eine Proteincorona um den Partikel bildet.

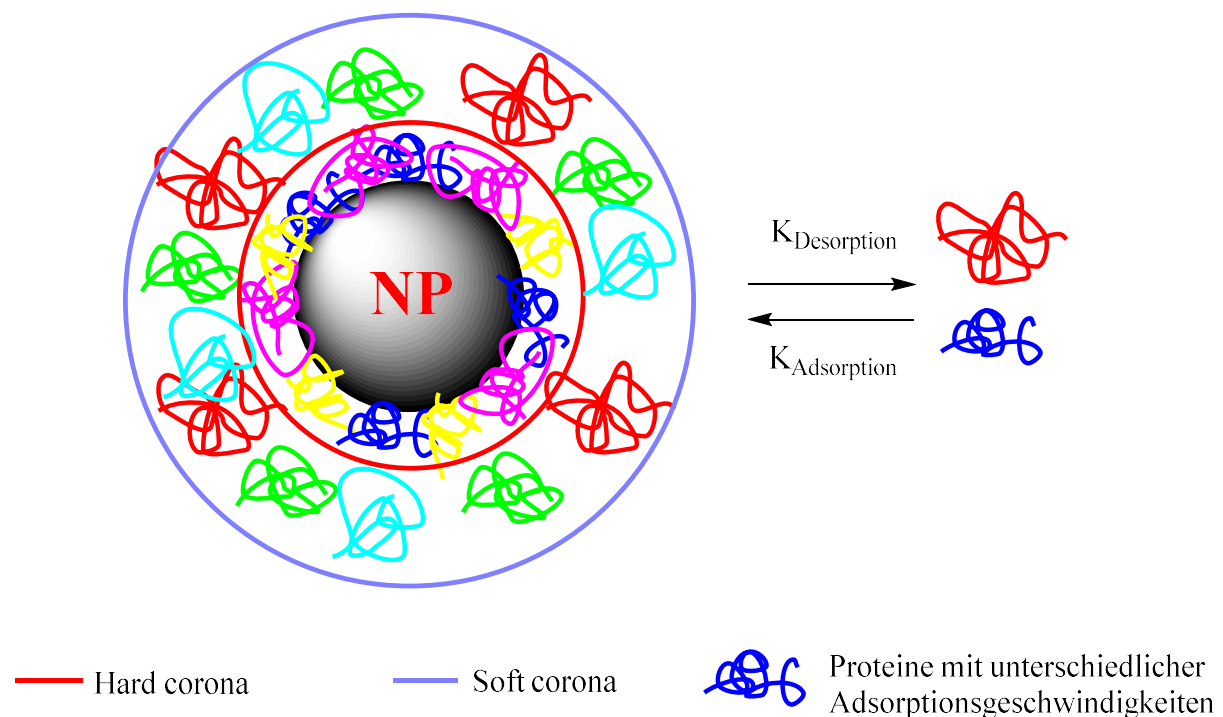


Abb. 5: Nanopartikel mit einer „hard corona“ und „soft corona“. Die unterschiedlichen Proteine binden unterschiedlich stark, schnell und lange am Partikel (in Anlehnung an Lit. [97]).

Diese Corona besteht aus einer sogenannten „hard corona“, die den Partikel direkt umgibt und mit ihm über unterschiedliche Wechselwirkungen interagiert, und eine „soft corona“, die sehr dynamisch die Proteinzusammensetzung wechseln kann. Hier sind die Wechselwirkungen eher schwach (Abb. 5).^[50, 96-97]

Die Entstehung einer umgebenden Hülle hat also einen großen Einfluss auf den „Werdegang“ des Nanopartikels. Im Zusammenhang mit einem Nanopartikel im biologischen Medium, so bedeutet dies eine Beeinflussung der Biodistribution, Cytotoxizität und Endocytose von Nanopartikeln.^[98]

Mirshafiee *et al.* versuchten die Herausforderung, dass die Proteinhülle, die sich bei Eintritt der Nanopartikel in biologische Medien um sie herum bildet und damit eine effiziente Wirkung der funktionalisierten Oberfläche verhindert, damit zu beeinflussen, dass sie vor dem Einbringen ins Medium schon den Partikel mit γ -Globulinen „umhüllen“.^[99] Damit wollten sie erreichen, dass die Globuline, die die sogenannte „hard corona“ bilden, von Opsoninen und Komplementärfaktoren, z.B. im Blut, erkannt und gleich der Phagozytose durch Makrophagen zugeführt werden. Die Makrophagen stellen in dem gewählten Beispiel den Wirkort des Partikels dar. Jedoch beobachtete die Gruppe, dass die Opsonine und Komplementärfaktoren, die sich angelagerten, wiederum von anderen Proteinen aus der gebildeten sogenannten „soft corona“ gegen eine phagozytotische Aufnahme abgeschirmt wurden. Sie gaben γ -Globulin umhüllte Partikel, die zuvor nicht einem Zellmedium ausgesetzt waren, in ein Medium mit Makrophagen, um zu beobachten, ob eine Aufnahme im Vergleich mit den „corona“-umhüllten Globulin-Partikeln, also mit Opsoninen dekoriert, geschieht. Das Resultat war, dass die reinen Globulin-Nanopartikel vermehrt aufgenommen wurden im Gegensatz zu den mit Opsoninen belegten Partikeln. Dieses Ergebnis unterstützt ihre Hypothese, dass die „soft corona“ für das Ausbleiben einer erfolgreichen Zellaufnahme in Makrophagen verantwortlich ist. Mirshafiee vertritt die Ansicht, dass man sich nicht nur die „hard corona“-Struktur und die Proteinzusammensetzung anschauen sollte, um auf die grundsätzlichen Interaktionen zwischen Partikel und Biomedium zu schließen.

Bisher wurden diese Wechselwirkungen intensiv für Silica-, Zinkoxid-, Gold-, Silber- oder auch Polystyren-Partikel untersucht, zu Nanodiamant und deren Wechselwirkungen mit Proteinen liegen bisher nur wenige Ergebnisse vor.^[100]

Hier stellt sich nun die Frage, welche Proteine bilden die „hard corona“ und welche überwiegend die „soft corona“. Diese Corona beeinflusst die Bioverfügbarkeit des Partikels, da die auf der Oberfläche befindlichen funktionellen Gruppen nicht mehr zugänglich sind, bzw. von den Proteinen bedeckt sind. Zudem wird die Partikelgröße stark beeinflusst und somit auch die Erreichbarkeit des Wirkorts enorm eingegrenzt. Der Zweck der Aggregation der Proteine

mit dem Nanopartikel dient der Erkennung durch z.B. Makrophagen und fördert eine schnelle Eliminierung dieser „Fremdkörper“. Somit ist der Aufenthalt des Partikels im Körper begrenzt oder es können sich z.B. Thromboembolien bilden.^[101]

Je nachdem, was sich für Proteine anlagern, wird eine schnelle Opsonierung eingeleitet, d.h. Fremdzellen werden von Faktoren des Komplementsystems bedeckt und können somit von z.B. Makrophagen entdeckt, aufgenommen und eliminiert werden. Andere Proteine, die sich anlagern können, entscheiden über eine schnelle Einschleusung in Zielzellen oder die Anlagerung an die Zellwand derselben. So werden Apolipoprotein H- umhüllte Nanopartikel hauptsächlich in die Zelle aufgenommen, wohingegen Apolipoproteine ApoA4 und ApoC3 wenig aufgenommen werden, ungeachtet der Funktionalisierung der Oberfläche der untersuchten Polystyrolpartikel.^[98]

Ebenfalls wurde eine zeitabhängige Proteincorona-Bildung untersucht, wobei unterschiedlich große, negativ bzw. positiv geladene Polystyrol- und Silicapartikel nach unterschiedlichen Verweilzeiten (0.5 Minuten und 480 Minuten) im Plasma beobachtet wurden.^[48] Die Anlagerung der Proteine beruht auf dem sogenannten Vroman-Effekt, der besagt, dass sich die Identität der adsorbierten Proteine über die Zeit verändern kann, auch wenn die Anzahl gleich bleibt.^[49] Die schnelle Anlagerung der Proteine stabilisiert die Nanopartikel gegen Aggregation im biologischen Medium und ist auch abhängig vom Nanomaterial selbst. Jedoch wurde auch ersichtlich, dass die Proteine, die den größten Anteil an der Proteincorona bilden, sich schon nach 0.5 Minuten angelagert haben. Diejenigen, die über die Zeit hinweg noch variieren, sind eher die Proteine, die wenig zur Coronabildung beitragen.^[48] Mit reinen Silicananopartikeln kam es zur Haemolyse der Erythrozyten *in vitro*, bei den umhüllten Partikeln fand diese nicht statt.^[48] Die Gruppe um Walkey *et al.* führte fünf Kenngrößen für die Charakterisierung der Proteincorona und –zusammensetzung an.^[49] Dicke und Dichte, Identität und Quantität, Orientierung und Anordnung, Konfirmation sowie Affinität gaben ihrer Meinung nach die Interaktion des Partikels mit dem biologischen Medium wieder. Dicke und Dichte bestimmen die Gesamtgröße des Nanopartikels und die Exposition der tieferliegenden Oberfläche, die Identität und Quantität der adsorbierten Proteine gibt die möglichen Wechselwirkungen mit dem biologischen Medium an, die Orientierung und Anordnung ist ein Maß für die Erreichbarkeit für mögliche Bindungs- und katalytische Domänen, die Konformation beeinflusst die Proteinaktivität und die Affinität gibt an, ob das Protein adsorbiert, bindet oder während der Proteininteraktionen wieder dissoziiert. Zudem adsorbieren geladene oder

hydrophobe Nanomaterialien eine höhere Proteinmenge und deren Konformation wird stärker verändert als bei hydrophilen Partikeln. Die Ausbildung der Proteincorona kann in frühe und späte Stadien unterteilt und die Proteine analysiert werden, die vorwiegend daran beteiligt sind. In der frühen Phase der Proteinadsorption werden die Proteine Albumin, IgG und Fibrinogen adsorbiert, die dann wiederum gegen Apolipoproteine und Koagulationsfaktoren ausgetauscht werden. Jedoch wird diese frühe Phase nicht bei jedem Material beobachtet.^[102] Die Zusammensetzung der Proteinhülle ist nanomaterialabhängig und viele der Proteine sind in wichtigen Zellprozessen involviert, wie z.B. Lipidtransport, Blutgerinnung, Komplementfaktorenaktivierung, Erkennung von Krankheitserregern und Ionentransport.^[103] Hauptsächlich sind aber zwei bis sechs Proteine an der Hüllenformation beteiligt, alle weiteren kommen nur in geringen Konzentrationen vor. So wurden schon carboxylierte Nanodiamanten der Größe 5 nm und 100 nm hinsichtlich ihrer Auswirkung auf menschliches Blutplasma untersucht. Dabei zeigte sich, dass keine Koagulation selbst bei höheren Konzentrationen eintritt und keine signifikante Änderung der Plasmaproteinkonformation auftritt.^[104] Somit lagern sich keine Proteine an Nanodiamant an, die eine Komplementfaktoraktivierung oder eine Phagozytose einleiten.

Die Formation der Proteincorona hat einen erheblichen Einfluss auf die Identität der Nanopartikel, da die Proteinhülle die Oberflächenenergie verringert und die Verteilung im Körper dadurch begünstigt wird.^[50] Auch wenn viele Gruppen das Problem der Coronabildung über die Belegung der Oberfläche der Nanopartikel mit Polyethylenglykolgruppen zu umgehen versuchen und dadurch die Proteinadsorption abschwächen, so ist es nicht möglich, Partikel komplett ohne Proteinhülle in biologischen Medien zu erhalten. Wenn ein Partikel z.B. alveolar, d.h. über die Atemwege aufgenommen wird, so können Proteine, die vorwiegend in der Lunge vorkommen, sich an die Nanopartikel haften und deren Wechselwirkungen mit nachfolgenden Zellen stark beeinflussen. Nach wie vor gibt es starke Anhaltspunkte, dass die Oberflächenkrümmung einen entscheidenden Einfluss auf die Oberflächenenergie und damit auch auf die Auswahl der Proteine, die die Proteincorona ausbilden, hat.^[50]

Durch die Präsentation der unterschiedlichen funktionellen Gruppen auf der Nanodiamantoberfläche können auch unterschiedliche Proteine adsorbiert werden und es bildet sich eine unterschiedliche Corona aus.^[105] Aber auch physikalische Eigenschaften wie Partikelgröße, -form und Oberflächeneigenschaften spielen eine große Rolle in der Beeinflussung der Bindung zwischen Protein und Nanodiamant.^[105-106] Erste Versuche, die Oberfläche von HPHT-

Nanodiamanten (HPHT-ND) mit Serumalbumin zu belegen, zeigten ein gutes Dispersionsverhalten in biologischen Medien wie Phosphatpuffer.^[107] Es wurde auch genauer die Konformation des Proteins betrachtet und anhand unterschiedlicher spektroskopischer Methoden gezeigt, dass sich die Konformation des Serumalbumins ändert.^[108] Eine Strukturänderung eines Proteins bedeutet meist auch eine Veränderung der Funktion.^[108] Bei BSA (bovine serum albumine) jedoch zeigte sich, dass trotz Konformationsänderung die Funktion erhalten blieb. Es zeigte sich sogar einen Vorteil: BSA bindet so stark an Detonationsnanodiamant, das es in der Lage ist, die Aggregate aufzubrechen und kleinere ND-BSA-Konjugate zu bilden. Dies wurde auch mit carboxyliertem Nanodiamanten durchgeführt und die Sauerstoffaufnahme, Aggregation der Thrombozyten und weitere Entzündungszeichen untersucht, die bei geringen Dosen keine Beeinflussung zeigten.^[109]

Es ist essentiell für die Nanopartikelforschung zu wissen, welche Proteine wie adsorbiert werden und welche weiteren Auswirkungen dies auch auf den Gesamtorganismus hat. Zudem soll untersucht werden, ob die Aggregation durch unterschiedliche Oberflächengruppen unterschiedlich schnell stattfindet und ob dies vom Ort, z.B. im Zielorgan oder Blut abhängig ist. Dann stellt sich anschließend die Frage, ob die Aggregation durch unterschiedliche Oberflächenmodifikation, wie PEG oder amphiphile Moleküle, eingedämmt werden kann oder ob schon eine Solvathülle, die eine höhere Affinität zu der Oberfläche als zu den Proteinen besitzt, für das Erreichen des Zielorts ausreicht.

1.2 Stimuli-Responsive Anbindung an Nanopartikel

Auf Nanopartikel können viele unterschiedliche Moleküle an der Oberfläche präsentiert werden, die unterschiedliche Wirkorte auf (Rezeptoren, Membranen, Kanäle) oder in (Nucleus, Membran, Cytoplasma) der Zelle adressieren.^[110]

Dabei werden unterschiedliche Stimuli angesprochen, die dies möglich machen sollen (Abb. 6).^[111-116] Hierbei unterscheidet man zwischen zwei unterschiedlichen Arten, wie dieser Stimuli auf den Nanopartikel wirken, der exogene und der endogene Anreiz, die dann auf unterschiedliche Weisen den Wirkstoff freisetzen. Zu den exogenen Parametern gehören die thermal-induzierte Wirkstofffreisetzung, die ultraschall-gestützte Responsive, eine über Strahlung induzierte Freisetzung und magnetisch erzeugte Anreize.^[113] Die endogenen Stimuli umfassen Redox-Systeme, Enzyme, Änderung des pH-Wertes sowie ebenfalls die Temperatur.

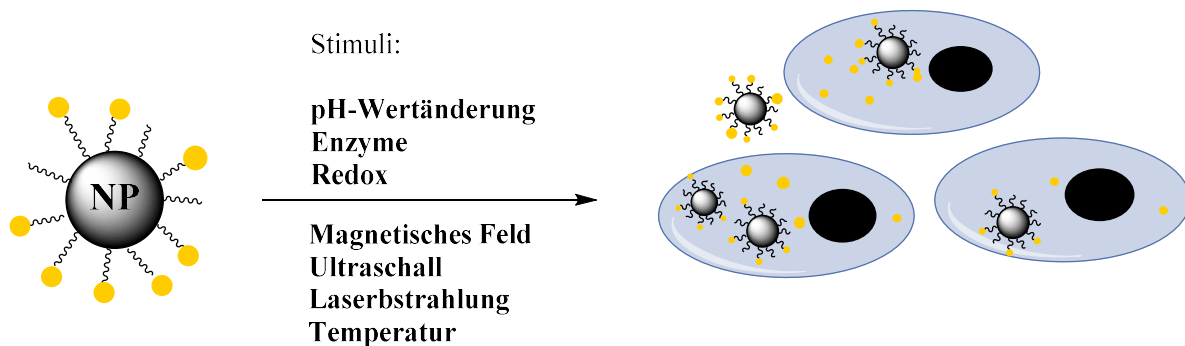


Abb. 6: Der beladene Nanopartikel setzt den Wirkstoff durch einen der aufgeführten Stimuli in der Zelle frei.

Auf Nanodiamant sind bisher nicht alle diese Anreize angewendet worden. Bisher gibt es Beispiele im Bereich der Wirkstofffreisetzung über enzymgesteuerte Freisetzung, pH-Wertänderung und Hyperthermie.^[74, 117-125]

Es befinden sich z.B. schon Nanomaterialien, die nicht auf Nanodiamant basieren, auf dem Markt oder in klinischen Studien, die mit Proteinen wie TAT (Trans-Activator of Transcription), Hemagglutinin oder mitochondrialen Lokalisierungssequenzen dekoriert sind, um besser in die jeweilige Zelle aufgenommen und dort den angehenden Wirkstoff freizusetzen.^[126] Zudem finden auch Präparate Einsatz, die den EPR-Effekt ausnutzen, durch Bestrahlung aktiviert werden oder als Kontrastmittel Anwendung finden. Sogenannte Prodrugs,

die einen kovalenten Molekülteil besitzen, der erst in der Zelle abgespalten wird und den eigentlichen Wirkstoff erst am Wirkort freisetzt, können den EPR-Effekt gut für sich nutzen.

Kurze Peptidsequenzen wurden synthetisiert und auf die Oberfläche von Nanodiamanten über einen *p*-Aminobenzylcarbonyl (PABC)-Spacer angebracht.^[127] Das Peptid-Linkersystem, bestehend aus dem Dipeptid Phenylalanin und Lysin, trägt am freien Ende Doxorubicin. Durch Cathepsin B erkannt, wird das Dipeptid gespalten, um Doxorubicin gezielt freizusetzen. Zusätzlich wurde noch eine TAT-Sequenz an Doxorubicin adsorbiert, um eine bessere Zellgängigkeit zu ermöglichen.^[127]

Die Gruppe um Kim *et al.* entwickelte Wirkstoff-geladene Kontaktlinsen, die enzym-gesteuert Timolol freisetzen.^[119] Dabei wurde die Oberfläche der Nanodiamanten zu Carbon-säuregruppen oxidiert und diese mit Polyethylenimin (PEI) umhüllt. Diese Partikel werden zusammen mit dem Wirkstoff Timolol in *N*-Acetyliertem Chitosan eingebettet und bilden ein Nanodiamant-Nanogel. Dieses Nanogel wird in die Polymermatrix der Kontaktlinse eingebracht und am Wirkort angekommen, baut Lysozym das Nanogel ab und setzt Timolol frei.

Aus vorherigen Arbeiten unserer und auch anderer Gruppen sind bereits pH-labile Linker, z.B. Hydrazone, die kovalent an Nanodiamanten gebunden werden, bekannt.^[125, 128] Diese funktionelle Gruppe kann Ketone, die z.B. in DOX vorkommen, anbinden, die sich dann pH-labil wieder ablösen. Um keine schnelle Immunantwort hervorzurufen und eine nicht-spezifische Zellaufnahme zu gewährleisten, wurde der Partikel von der Gruppe um Zhao *et al.* mit Polyethylenglykol umhüllt.^[125] Zur Steigerung der Zellaufnahme wurde über eine „Click-Reaktion“ kovalent eine RGD-Sequenz angebonden, die spezifisch von Integrin-Rezeptoren an der Zelloberfläche erkannt werden. So kann man einen gezielten Wirkstofftransport in ein saures Zellmedium generieren und der Wirkstoff wird in der Zelle vom Linker gespalten.

Li *et al.* untersuchte den Wirkstofftransport von Doxorubicin/*all-trans*-Retinsäure-Nanodiamantpartikeln.^[123] Doxorubicin wurde pH-sensitiv freigesetzt, ebenso die Retinsäure, die als Verstärker des Wirkstoffs in der Chemotherapie gilt. Eine noch bessere Wirkstofffreisetzung wird durch die zusätzliche Anwendung von Ultraschall generiert, da dieser die Zellwände permeabler macht und mehr Wirkstoff in die Zelle aufgenommen wird.

Weitere Beispiele der Stimuli-responsiven Freisetzung finden sich im Bereich der Hyperthermie. Hier entwickelten Cheng *et al.* Gold/Silber-Nanopartikel mit einer Seeigelartigen Struktur, die mit fluoreszentelem Nanodiamant konjugiert sind.^[121] Durch dieses Konjugat kann eine Verfolgung mittels der Fluoreszenzeigenschaften stattfinden, wie auch eine Hyperthermie induziert werden, sobald die Partikel ihren Wirkort erreicht haben.

Ebenfalls im Bereich der Hyperthermie können stark Bor-dotierte Nanodiamanten Anwendung finden.^[120] Die Gruppe um Vervald *et al.* untersuchte diesen Diamanttyp mittels Raman-spektroskopie und beobachtete, dass er in der Lage war, in wässrigen Lösungen mittels Laserbestrahlung mit einer Wellenlänge im sichtbaren Bereich das den Partikel umgebende Wasser stärker aufzuheizen als bei undotierten Nanodiamanten.

1.3 Verwendete Wirkstoffe

1.3.1 Chloramphenicol

Chloramphenicol (Abb. 7) wurde als Breitbandantibiotikum verwendet und wird aufgrund von Nebenwirkungen wie Neurotoxizität, aplastischer Anämie und allergischen Reaktionen nur noch als Reserveantibiotikum eingesetzt.^[129-132]

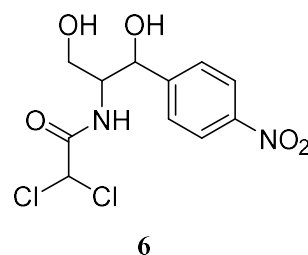


Abb. 7: Breitbandantibiotikum Chloramphenicol (6).

Obwohl von der topischen Anwendung abgeraten wurde, findet es immer noch Einsatz in Augensalben und -tropfen, so wie in Ohrentropfen und anderen Hautarzneien. Bei schweren Infektionen, die durch gram-positive Bakterien (auch MRSA-Stämme), gram-negative Bakterien und Anaerobier hervorgerufen werden, wird es angewendet. Darunter fallen Krankheiten wie Diphtherie, Ruhr, Fleckfieber, Typhus, Paratyphus, Pest und Malaria. Chloramphenicol

blockiert fundamentale ribosomale Funktionen und stört die Proteinbiosynthese. Es ist in der Lage, in tiefere Gewebsschichten zu penetrieren und auch die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden.

1.3.2 Folsäure

Folsäure (Abb. 8) ist auch bekannt unter dem Namen Vitamin B₉ und ist essenziell, d.h. es wird vom menschlichen Organismus benötigt, kann aber nicht selbst hergestellt werden. Nahrungsmittel, die einen hohen Gehalt an Folsäure aufweisen, sind Linsen, Kalbs- und Geflügelleber, frisches grünes Gemüse und Mohnsamen, es wird aber synthetisch aus Guanidin und Cyanoessigsäureethylester hergestellt.^[133-134] In einer anschließenden Reaktion mit 1,1,3-Trichloraceton und *N*-(4-Aminobenzoyl)-L-glutaminsäure entsteht Folsäure.

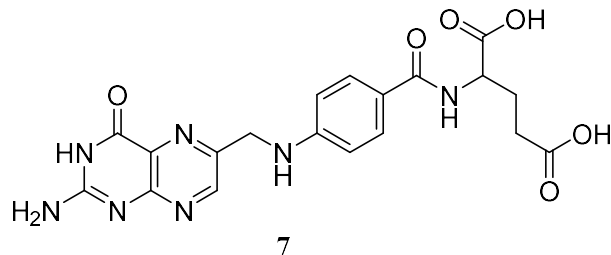


Abb. 8: Folsäure oder Vitamin B₉ (7).

Folsäure ist die Vorstufe zu dem Coenzym Tetrahydrofolsäure, das maßgeblich an der Synthese von Purinbasen und Desoxythymidinmonophosphat, einem DNA-Baustein, beteiligt ist. Sie ist ein wichtiger Bestandteil in der Embryonalentwicklung und spielt eine entscheidende Rolle bei der Zellteilung, z.B. die des Knochenmarks. Ein Defekt oder ein Mangel führt zu Neuralrohrdefekten des Embryos, hemmt die Sprachentwicklung und spielt eine Rolle im Zusammenhang mit Autismus.^[135-137] Eine Überversorgung kann jedoch einen Mangel an Vitamin B₁₂ verdecken, was zu einer Schädigung des Nervensystems führen kann. In dieser Arbeit ist von Interesse, dass Folsäurerezeptoren auf der Oberfläche von Zellen präsentiert werden und Tumorzellen auf ihrer Oberfläche eine erhöhte Anzahl an Folsäure- Rezeptoren aufweisen.^[138-139] Folsäure bindet an die Rezeptoren und wird so in die Zelle eingeschleust. Ist nun ein Nanopartikel mit Wirkstoff beladen und Folsäure ist ebenfalls angebunden, so kann dies die Aufnahme der Nanopartikel in die Zelle noch unterstützen.

1.3.3 Doxorubicin

Doxorubicin (Abb. 9) ist ein Anthracyclin und das Hydroxyderivat des Daunorubicins.^[140]

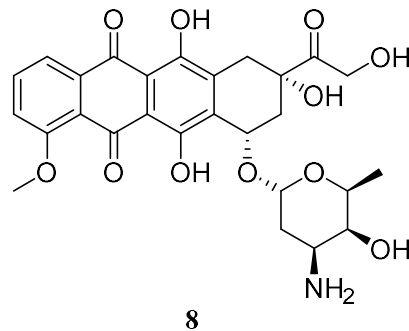


Abb. 9: Das Zytostatikum Doxorubicin (8).

Es wird als Zytostatikum eingesetzt und stört die DNA-Synthese. Hierbei lagern sich die Wirkstoffmoleküle zwischen die DNA-Basenpaare und stören die Replikation, so dass es zu Rastermutationen kommt. Ausserdem wird die Topoisomerase II, die für das Auflockern und Lösen der DNA-Doppelhelix zuständig ist, gehemmt und damit ebenfalls die Zellteilung gemindert.^[141] Durch seine guten Fluoreszenzeigenschaften kann es mikroskopisch hervorragend untersucht werden.^[140]

Es findet vorwiegend Anwendung bei Mammakarzinomen, Bronchialkarzinomen und Lymphomen und wird intravenös verabreicht.^[141] Da Doxorubicin chronische Toxizität, eine schwache Bioverfügbarkeit und zunehmende Resistenzbildung aufweist, müssen andere Möglichkeiten der Verabreichung gefunden werden.^[142] Als Nebenwirkungen sind vor allem Knochenmarksdepression, Nephrotoxizität, Kardiotoxizität, Ulcerationen und dermatoxische Effekte zu nennen.^[141, 143-144] Doxorubicin wird verwendet, da es eines der wichtigsten Antitumorantibiotika ist und einfache fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen möglich macht.

2 ZIELSETZUNG

Das Projektziel dieser Arbeit bestand darin, einen pH-labilen Linker, der Hydroxylgruppen bzw. Ketone bekannter Arzneistoffe oder anderen Wirkstoffe binden kann, zu synthetisieren und diese bei acidem pH-Wert wieder freizugeben. Konkreter bedeutet dies, dass der Wirkstoff zusammen mit dem Nanodiamanten ein Konjugat bei neutralem pH-Wert bildet und zusammen z.B. über die Blutbahn zu dem gewünschten Kompartiment, z.B. einer Zelle oder einem Zielorgan transportiert wird, dessen Zellmedium einen sauren pH-Wert besitzt. Dort wird dann der Wirkstoff vom Nanodiamanten freigesetzt, um in der Zelle, einem Zellkompartiment oder dem gewünschten Organ gezielt wirken zu können.

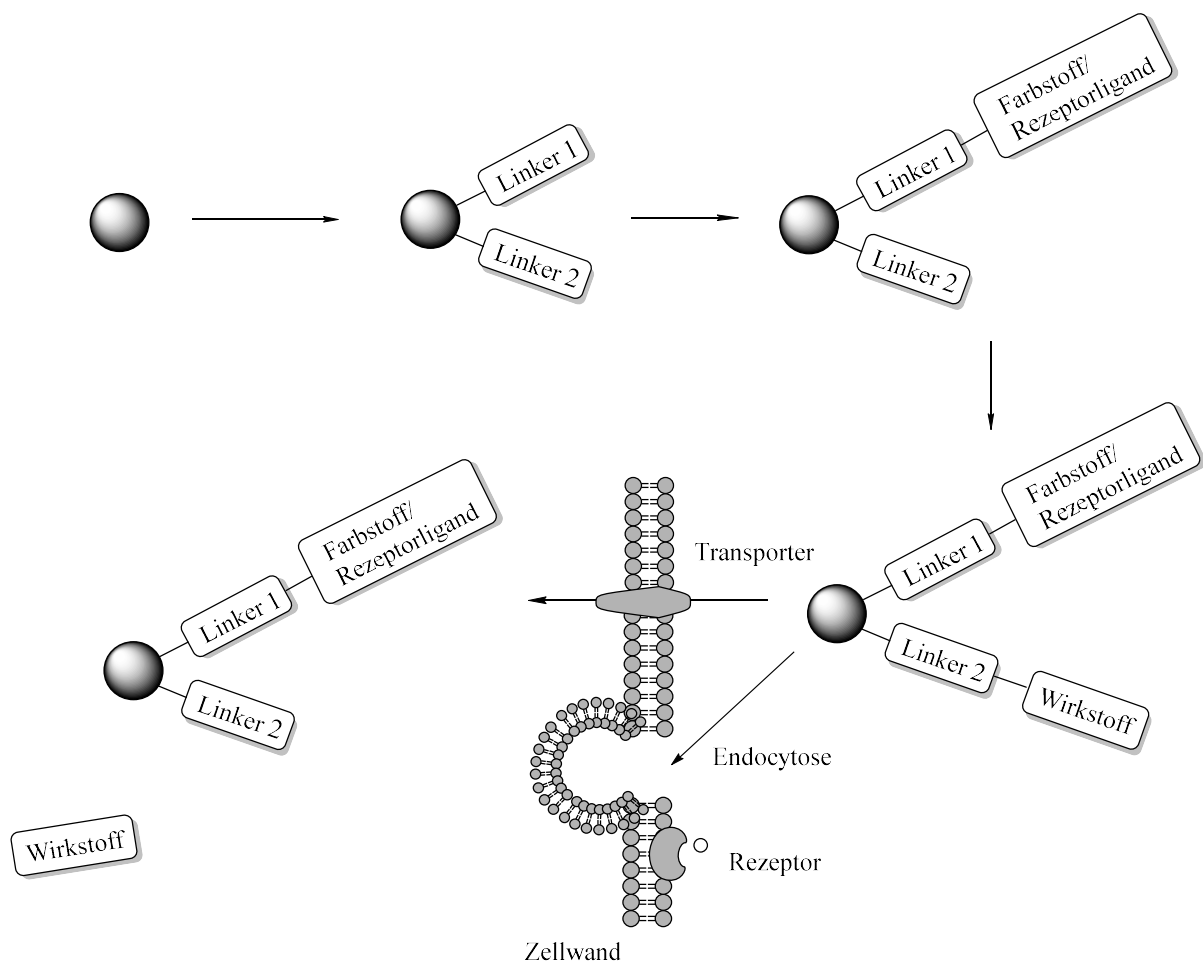


Abb. 10: Schematische Darstellung der orthogonalen Funktionalisierung der Nanodiamanten, anschließende Immobilisierung von Wirk- und Farbstoffen, sowie Rezeptorliganden und unterschiedlichen Aufnahmewege zur Freisetzung in der Zelle.

Hierfür sollen orthogonal-funktionalisierte Linkersysteme am Nanodiamanten angebunden werden, die zum einen stabil kovalent mit einem fluoreszenzaktiven Farbstoff oder einem Rezeptormolekül funktionalisiert werden und zum anderen mit dem zu synthetisierenden Linkersystem, das eine kovalent labile Anbindungsstelle besitzt, an der ein Wirkstoff angebunden werden soll, der sich dann im sauren pH-Milieu ablöst.

Desweiteren wurden grundlegende Stabilitäts- und Toxizitätsuntersuchungen von gemahlenem Detonationsdiamanten in biologischen Medien durchgeführt, sowie die Bildung der Proteincorona bei Wechselwirkung verschiedener Nanodiamantmaterialien mit physiologisch relevanten Medien untersucht.

3 HAUPTTEIL

Nanodiamant kann als vielseitiges Trägermaterial verwendet werden. In der Biomedizin kann es als „Trojanisches Pferd“ eingesetzt werden, um gezielt Wirkstoffe, Farbstoffe oder andere aktive Substanzen zu ihrem Wirkort zu bringen.^[145-149] Bisher werden die meisten Medikamente oral verabreicht oder aber, um einen schnellen Wirkeintritt zu erhalten, intravenös.^[150] Hierbei durchlaufen die verabreichten Substanzen mehrere Organe zum Aufnahmeort, so dass auch hier Wirkstoffe freigesetzt werden und wirken können.^[151] Bei vielen Medikamenten ist dies jedoch nicht erwünscht und Nebenwirkungen sind die Folge. Ein sehr bekanntes Beispiel findet man im Bereich der Krebstherapeutika.^[152] Während der Chemotherapie bekommt der Patient ein Therapeutikum in hohen Dosen, um auch wirklich alle erkrankten Zellen zu schwächen oder zu töten.^[153] Da der Wirkstoff nicht zwischen Tumorzelle und „gesunder“ Zelle differenzieren kann und alle Zellen gleichermaßen angreift, erfährt der Organismus eine extreme Belastung und Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Appetitlosigkeit und Haarausfall können auftreten.

Würde man nun ein System entwickeln, was den Wirkstoff erst in den Zielzellen oder –organen freisetzt und nicht schon im Blut oder anderen Organen, so könnte man niedrigere Dosierungen anstreben und damit auch weniger Nebenwirkungen wie auch bessere Verträglichkeiten erzielen.

Hier greift nun das Konzept eines pH-labilen Linkersystems ein, das bei einem pH-Wert von 7.4, dem pH-Wert von Blut, den Wirkstoff pH-sensitiv am Linker angebunden hat. Kommt es aber zu einem pH-Wert-Abfall auf z. B. Werte von 4.5 – 6.5, wie er in den meisten Krebszellen vorkommt, so wird der Wirkstoff freigesetzt und kann an Ort und Stelle wirken.^[154-156] Da der Wirkstoff erst bei Erreichen seines Wirkortes frei vorliegt, kann man dem Patienten geringere Dosen verabreichen, so dass es aufgrund dessen zu weniger Nebenwirkungen kommen kann. Ein Beispiel ist Doxil[®], das bei AIDS-Patienten mit Kaposi-Syndrom, Patienten mit metastasierendem Brustkrebs, fortgeschrittenem Eierstockkrebs oder bei wiederkehrenden bzw. refraktären multiplen Myelomen, angewendet wird.^[157-159] Dieses Wirkstoffsystem besteht aus dem Wirkstoff Doxorubicin, das in Liposomen, die Polyethylenglykolketten auf der Hülle tragen, eingekapselt ist.

Doxil® ist nur ein Beispiel für die erfolgreiche Anwendung von Nanopartikeln in der Medizin. Seitdem haben viele Wissenschaftler es sich zur Aufgabe gemacht, weitere Nanopartikel zu entwickeln und zu untersuchen, die Wirkstoffe einkapseln, adsorbieren oder kovalent anbinden können. Nanodiamant ist ebenfalls ein aussichtsreicher Kandidat in der Nanopartikelforschung durch die Möglichkeit der hohen Oberflächenbeladung gemessen am günstigen Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnisses und der nicht vorhandenen cytotoxischen Wirkung.^[15, 52, 160-167]

Unsere Arbeitsgruppe und auch andere Gruppen im Bereich der Nanodiamantchemie haben unterschiedliche Systeme für den pH-labilen Wirkstofftransport synthetisiert und vorgestellt. Ho *et al.* zeigten eine pH-abhängige Freisetzung von Doxorubicin, das an Nanodiamant physisorbiert ist.^[149] Bei der Herstellung des Konjugats wird ein pH-Wert von 8 verwendet. Bei einer Einschleusung über Endocytose in die Krebszelle wird der Wirkstoff freigesetzt, da in der Zelle ein aciderer pH-Wert herrscht.^[168] Die ersten kovalent angebondenen Systeme wurden von Liu *et al.* synthetisiert. Die Gruppe zeigte 2010 die kovalente Anbindung von Paclitaxel, ein Krebstherapeutikum, welches eine schlechte Wasserlöslichkeit besitzt, an Nanodiamanten über eine pH-labile Esterbindung.^[169-170] Jedoch wurde der Wirkstoff nicht direkt über die Hydroxylfunktion des Nanodiamanten angebonden, sondern es wurde ein Alkylspacer generiert, der eine Aminogruppe trägt (Abb. 11). Diese bildet dann mit Paclitaxel eine Amidbindung aus und der Wirkstoff wird im sauren Milieu wieder abgespalten. Neuere Konjugatsysteme basieren auf einem Co-Delivery. So zeigten Lin *et al.*, dass das zuvor gebildete Nanodiamant-Paclitaxel-System zusammen mit Cetuximab, einem monoklonalen Antikörper der gezielt den EGF-Rezeptor blockiert, komplexiert werden kann, um noch effizienter auf Krebszellen zu wirken.^[171]

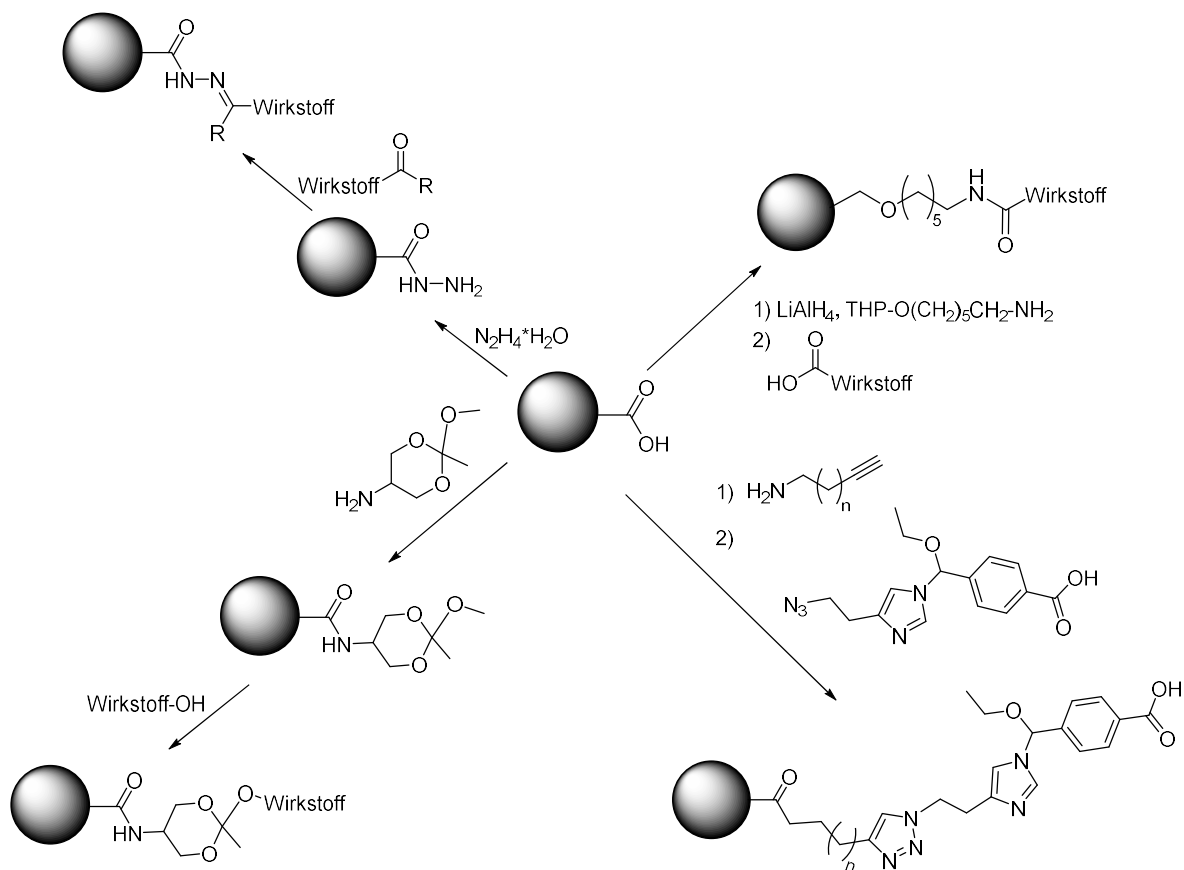


Abb. 11: Diverse pH-labile Linkersysteme zur Anbindung unterschiedlich funktionalisierter Wirkstoffe.

Eine weitere pH-labile Anbindungsmöglichkeit an Nanodiamant stellten Zhao *et al.* 2014 mit der Gruppe der Hydrazone vor. Doxorubicin wurde kovalent über das Hydrazone angebunden und zusätzlich über ein Triazol eine RGD-Einheit (Sequenz der drei Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure), die für die Einschleusung in Mitochondrien verantwortlich ist, angebunden.^[125] Auch gibt es Arbeiten, bei denen pH-sensitive *N*-Ethoxybenzylimidazole (NEBI) als Crosslinker eingesetzt werden (Abb. 11).^[172-173] Bei der Einwirkung von Säure wird es in ein Imidazol und in einen Aldehyd aufgespalten, so dass ein Wirkstoff, der eine Aldehydgruppe beinhaltet, freigesetzt werden kann.

Um das Feld der pH-lablen Linker noch zu erweitern, sollte in dieser Arbeit ein Orthoester-Linkersystem synthetisiert werden, um weitere Hydroxylgruppen-haltige Wirkstoffe direkt, ohne weiteren Alkylspacer, kovalent an Nanodiamant anbinden zu können.

3.1 Herstellung des Linkersystems zur Anbindung an Nanodiamant

3.1.1 Synthese des Orthoesters 1 und dessen versuchte Anbindung an Nanodiamant

Da Nanodiamanten eine gute Plattform als Wirkstoffträgersystem darstellen, kann man unterschiedliche Wirkstoffe daran adsorbieren oder kovalent binden. Um eine gezielte Freisetzung in der Zielzelle zu gewährleisten, werden die Wirkstoffe bevorzugt kovalent angebunden. Zhao *et al.* demonstrierten dies 2014 an Doxorubicin, einem Chemotherapeutikum, das sie kovalent über ein Hydrazon-Linkersystem immobilisierten.^[125]

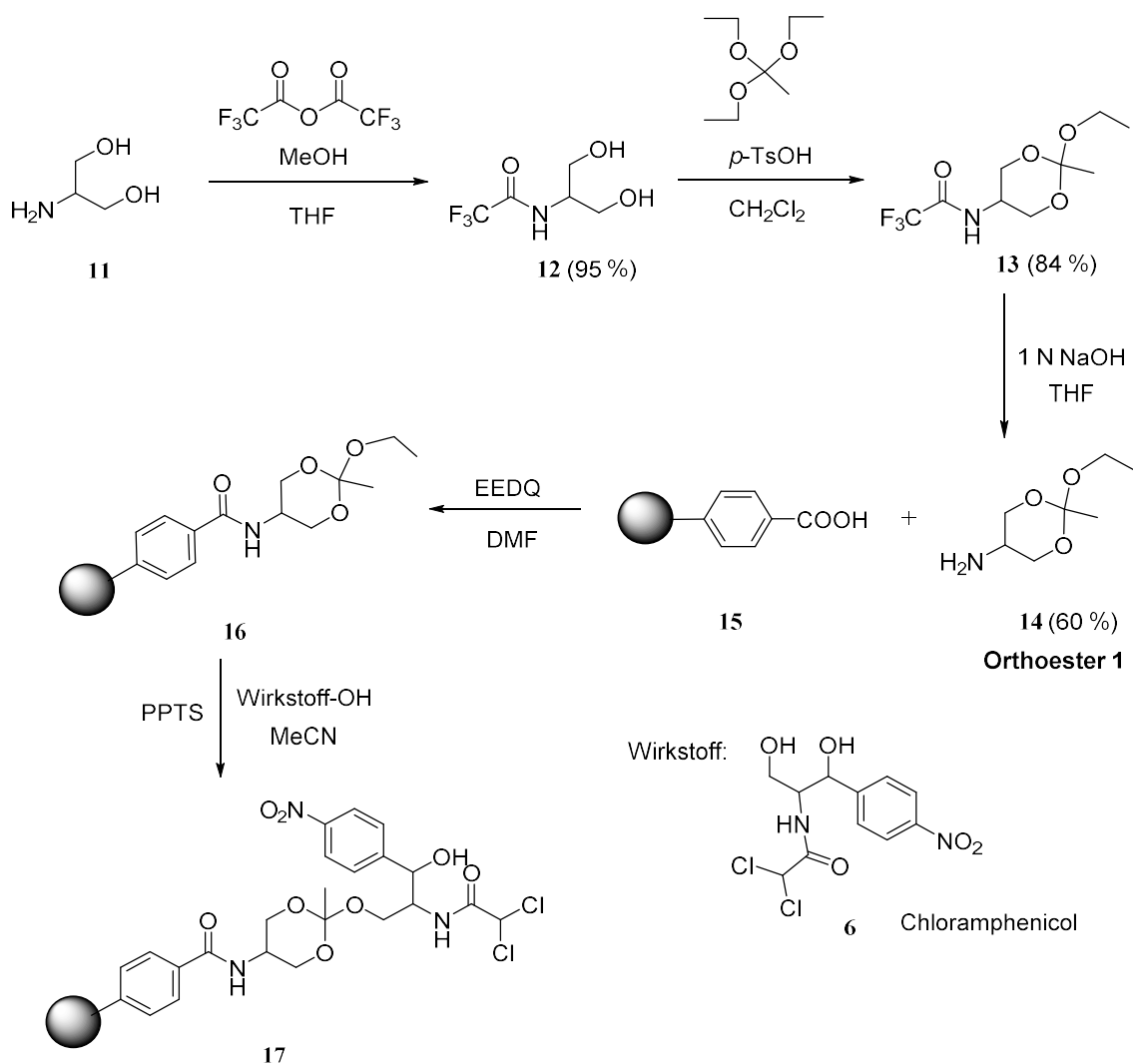


Abb. 12: Schema zur Herstellung des pH-labilen Linkersystems zur Anbindung an Nanodiamant.

Bis jetzt wurde noch kein Linkersystem synthetisiert und an Nanodiamanten gebunden, das kovalent Hydroxylgruppen binden kann und den Wirkstoff pH-labil im sauren Milieu wieder abspaltet. In Anlehnung an Masson *et al.* wurde folgendes Linkersystem erfolgreich hergestellt und an Nanodiamanten gebunden.^[174]

Ausgehend von dem im Handel erhältlichen Serinol (**11**) wurde die Aminofunktion mit einer Trifluoracetatgruppe durch Trifluoressigsäureanhydrid in absolutiertem THF geschützt. An dieser Stelle besteht schon ein Problem, das die Ausbeute stark erniedrigt. Trifluoressigsäureanhydrid ist auch in der Lage mit Alkoholen zu reagieren und so entstehen bei diesem Reaktionsschritt zwei weitere Produkte (Abb. 13).

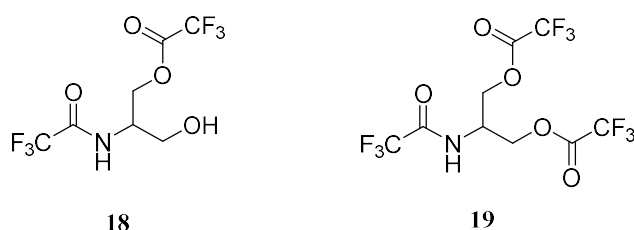


Abb. 13: Nebenprodukte, die bei der Schützung mit Trifluoressigsäureanhydrid entstehen.

Anfangs wurde versucht, das Produktgemisch säulenchromatographisch zu trennen, doch erhielt man *N*-(1,3-dihydroxypropan-2-yl)-2,2,2-trifluoroacetamid (**12**) stets mit Nebenprodukt **18** erhalten, trotz unterschiedlichen Laufverhaltens bei der Säulenchromatographie. Die Ausbeuten lagen bei Anwendung dieser Methode bei 27 %. Gab man nun aber zu dem vom Lösemittel befreiten Rückstand vor der säulenchromatographischen Aufreinigung wiederum frisches absolutiertes THF und absolutiertes Methanol, wurde die Ausbeute des Produktes auf 95 % gesteigert. Der Grund hierfür ist, dass der veresterte Alkohol durch die Zugabe von Methanol ganz einfach hydrolysiert werden kann und die Schutzgruppe der Aminofunktion dennoch bestehen bleibt (Abb. 13).

Der nächste Reaktionsschritt beinhaltete die Bildung des Orthoesters. Das geschützte Diol **12** wurde mit 1.60 Äquivalenten Triethylorthoacetat und 0.01 Äquivalenten *p*-Toluolsulfonsäure versetzt und bei Raumtemperatur 90 min. gerührt. Das entstandene *N*-(2-ethoxy-2-methyl-1,3-dioxan-5-yl)-2,2,2-trifluoroacetamid (**13**) wurde durch Umfällen in Dichlormethan/Pentan in 84 %iger Ausbeute erhalten. Dabei musste beachtet werden, dass **13** unterhalb von 250 mbar flüchtig ist.

Die Entschützung der Aminofunktion verlief unproblematisch. Der Orthoester **13** wurde mit 1 N Natronlauge in THF versetzt. Auch hier musste darauf geachtet werden, dass 2-Ethoxy-2-methyl-1,3-dioxan-5-amin (**14**) ebenfalls unterhalb von 250 mbar flüchtig ist.

Im nächsten Schritt wurde **14** an carboxylfunktionalisierten Nanodiamant (**15**) mittels eines Peptidkupplungsreagenzes angebunden.

Der carboxylfunktionalisierte Nanodiamant wurde mit in DMF gelöstem *N*-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinolin (EEDQ) versetzt, und nach zehnmütiger Ultraschallbehandlung im Ultraschallbad wird das primäre Amin **14** zugegeben. Nach 16 h Rühren bei 37 °C wurde die Suspension mehreren Waschzyklen unterzogen, bevor die Anbindung des Wirkstoffs stattfindet.

Der Austausch der Ethoxygruppe des Orthoesters gegen den Wirkstoff wurde von Pyridinium-*p*-toluolsulfonat (PPTS) katalysiert und das Reaktionsgemisch 3 h bei 90 °C in Acetonitril refluxiert, um das Wirkstoff-Nanodiamant-Konjugat **17** zu erhalten (Abb. 14).

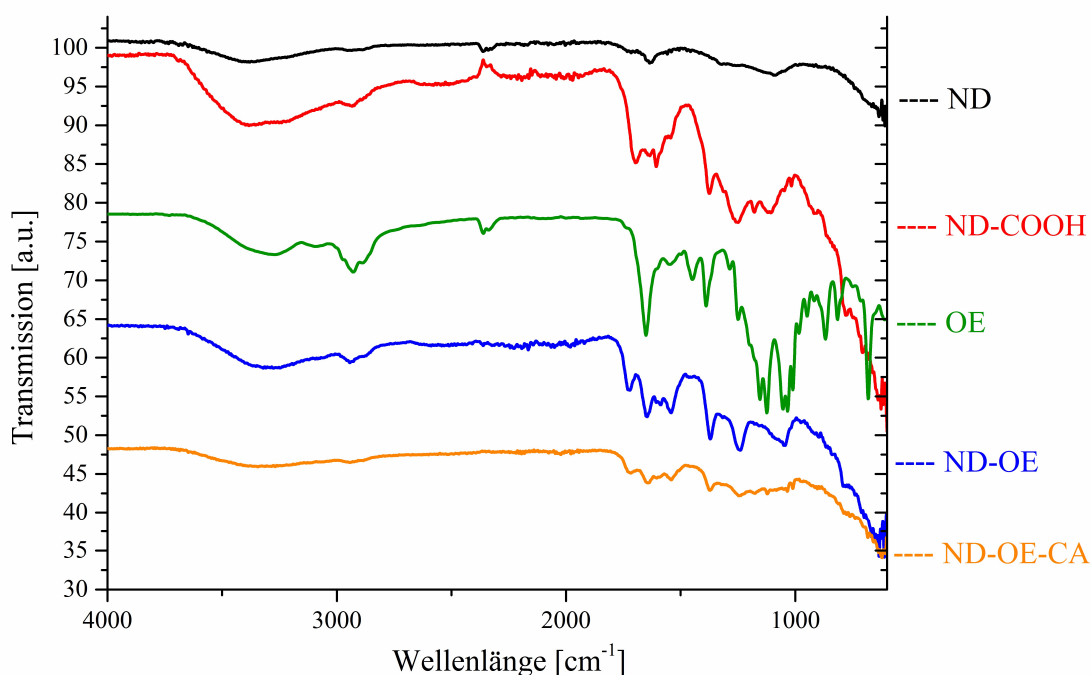


Abb. 14: Vergleich der IR-Spektren von Nanodiamant (ND), carboxyliertem Nanodiamant (ND-COOH), Orthoester (OE), Nanodiamant-Orthoester-Konjugat (ND-OE) und Nanodiamant-Orthoester-Chloramphenicol-Konjugat (ND-OE-CA).

Nach mehreren Waschzyklen wurde das erhaltene Konjugat einem Freisetzungstest unterworfen. Hierfür wurden je zweimal zwei Proben herangezogen. Zwei Proben wurden mit PBS-Puffer, der einen pH-Wert von 7.4 besitzt, und die zwei anderen Proben wurden mit einem PBS-Puffer, der einen pH-Wert von 4.6 besitzt, versetzt. Nach einer, zwei, vier und 64.5 Stunden wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand UV-spektroskopisch vermessen.

Es stellte sich heraus, dass eine Freisetzung des Wirkstoffes nicht erfolgte. Die Ursache hierfür ist nicht ersichtlich, jedoch liegt die Vermutung nahe, dass kein Austausch der Ethoxygruppe gegen den Wirkstoff stattgefunden hat.

Um die Möglichkeit des Austausches der Ethoxygruppe des Orthoesters durch den Wirkstoff zu belegen, wurde das Modellsystem ohne Nanodiamant hergestellt (Abb. 15).

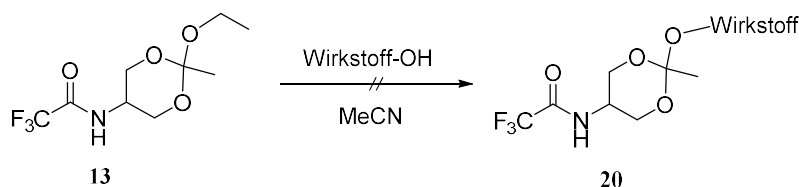


Abb. 15: Austausch der Ethoxygruppe ohne Anbindung an Nanodiamanten.

Hierbei wurde der Orthoester **13** mit dem Wirkstoff unter den gleichen Bedingungen wie bei der Wirkstoff-Nanodiamant-Konjugat-Bildung gegen die Ethoxygruppe ausgetauscht. Das so mit Chloramphenicol **6** hergestellte Konjugat **20** konnte nicht isoliert werden. Um die Ursache des Ausbleibens der Reaktion herauszufinden, wurden unterschiedliche Ansätze mit Chloramphenicol **6** getestet.

Da der geschützte Orthoester **13** einen Schmelzpunkt von 83 °C aufweist, besteht die Möglichkeit, dass Temperaturen größer 90 °C den Ester zersetzen. Daher wurde Acetonitril gegen Dichlormethan und auch THF ausgewechselt, um den Siedepunkt herabzusetzen und zu beobachten, ob die Temperatur eine entscheidene Rolle beim Ausbleiben des Produktes **20** spielt. Dies war jedoch nicht der Fall. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigt, dass die beiden Edukte nebeneinander vorliegen.

Nun wurde der Orthoester alleine unter den Bedingungen bei 90 °C gerührt und es zeigte sich eine Hydrolyse. Um zu sehen, ob dies temperaturabhängig ist, wurde der Orthoester bei

Raumtemperatur mit Pyridinium-*p*-toluolsulfonat gerührt. Ebenfalls wurde absolutiertes THF verwendet, um zu verhindern, dass Spuren von Wasser der Grund für die Hydrolyse sind. Aber auch hier zeigte sich, dass eine Umlagerung des Esters stattfindet, die eine weitere Reaktion verhindert (Abb. 16).

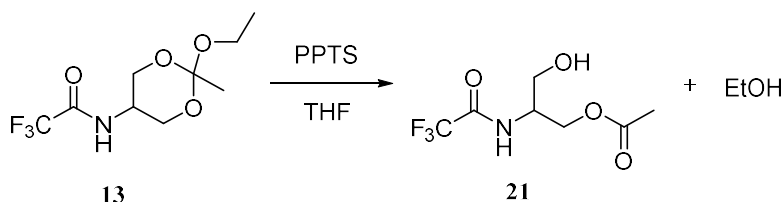


Abb. 16: Umlagerung des Orthoesters.

Da dies ein limitierender Schritt ist und der Orthoester essentiell für die erfolgreiche Anbindung des Wirkstoffs ist, musste an dieser Stelle ein neuer Ansatz gewählt werden.

3.1.2 Synthese des Orthoesters 2

3.1.2.1 Reaktion des Diols 27 mit Triethylorthoacetat zum Orthoester 29

Da die vorherige Linkersynthese nicht erfolgreich war, wurde ein weiterer Synthesepfad eines Orthoesters **28** entwickelt, der allerdings sechs Stufen umfasst (Abb. 17). Die Überlegung rührt daher, dass der Benzolring, der sich zwischen Aminogruppe und Orthoestergruppe befindet, die Umlagerung verhindert, bzw. die Orbitale des entstehenden Dioxans stabilisiert. Hinzu kommt, dass das angestrebte System einen höheren Siedepunkt haben muss und damit viele Lösemittel und höhere Reaktionstemperaturen möglich wären.

Ausgehend von 4-Brom-1-nitrobenzol (**22**) wurde Diethyl-2-(4-nitrophenyl)malonat (**24**) durch Umsetzung mit Diethylmalonat (**23**) hergestellt. Als Base zur Deprotonierung des Diketons dient Kalium-*tert*-butanolat in DMSO. Das gebildete Carbanion greift in einem Additions-Eliminierungs-Mechanismus am Brom-substituierten Kohlenstoffatom am Benzolring an. Anschließend wurde die Nitrogruppe von **24** an Palladium/Kohle mit Wasserstoff in 99 %iger Ausbeute reduziert. Der folgende Syntheseschritt gelang nur mit moderater Ausbeute. Die Reduktion der Estergruppen über Lithiumaluminiumhydrid in THF zu dem entsprechenden 2-(4-Aminophenyl)propan-1,3-diol (**26**) dauert vier Tage. Die Aufarbeitung gestaltete sich

schwierig, da **26** durch seine hydrophilen Gruppen in der Lage ist, in beiden Phasen (organisch/wässrig) vorhanden zu sein.

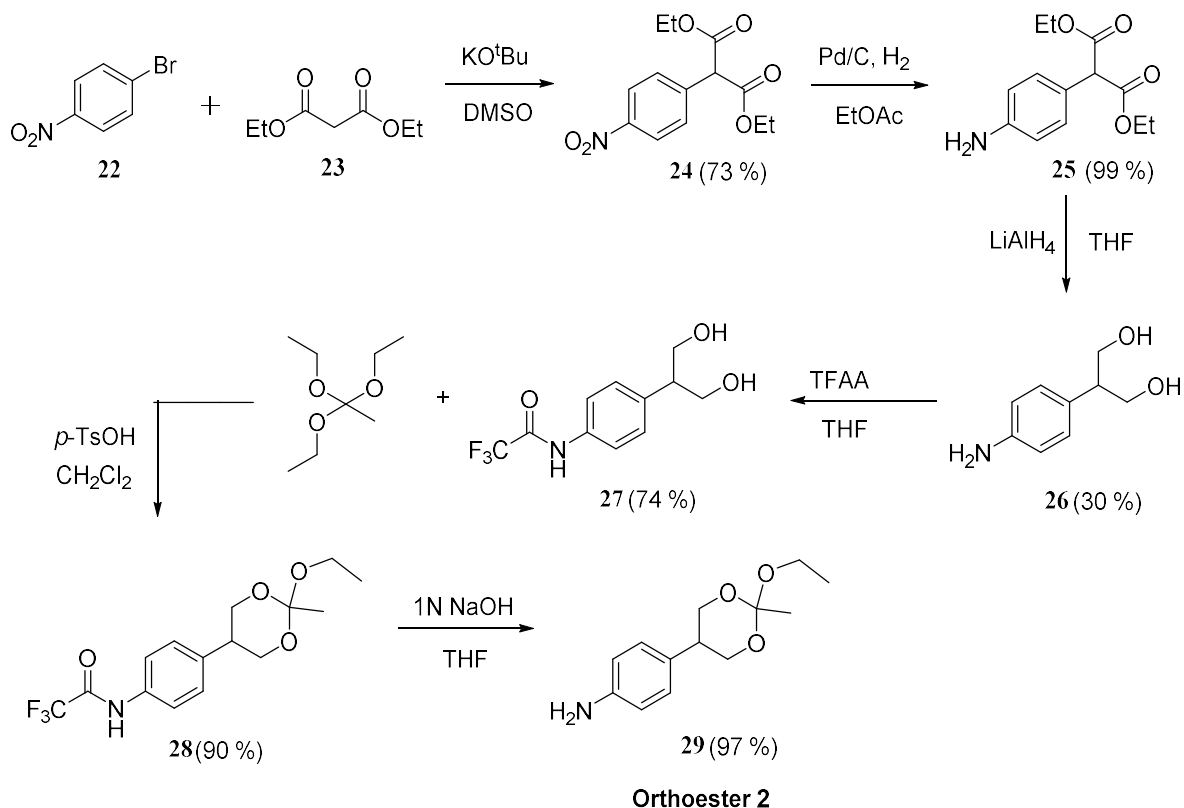


Abb. 17: Neue Synthese eines Orthoester-Linkersystems zur Anbindung an Nanodiamant.

Zehnmaliges Ausschütteln der wässrigen Phase mit Ethylacetat, welches über Kaliumcarbonat entsäuert wurde, reichte zur Isolierung nicht aus. Ein Aussalzen mit Natriumchlorid oder Natriumhydrogencarbonat brachte ebenfalls nicht den gewünschten Erfolg. Es wurde dazu übergegangen, die wässrige Phase durch Filtration von den Lithiumsalzen abzutrennen und eine Säulenchromatographie durchzuführen. Dies erbrachte eine zusätzliche Ausbeute von 16 %, so dass die Gesamtausbeute auf 46 % gesteigert wurde.

Die Schützung der Aminofunktion geschieht in Anlehnung an die Synthese von **12**. Hierbei wird **26** mit 1.7 Äquivalenten Trifluoressigsäureanhydrid versetzt und bei 0 °C gerührt. Auch hierbei entstehen die abgebildeten Nebenprodukte **30** und **31** (Abb. 18). Die Reaktion wird unter Schutzgas und mit trockenem Lösungsmittel durchgeführt.

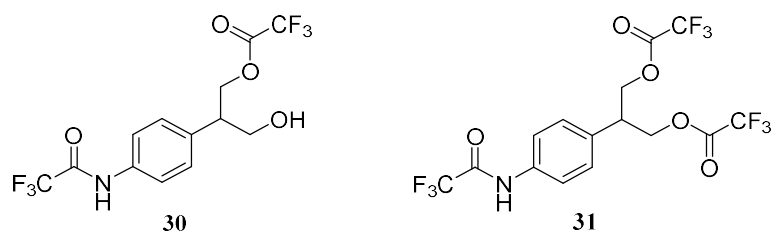


Abb. 18: Nebenprodukte, die bei der Schützung mit Trifluoressigsäureanhydrid entstehen.

Auch hier wurde zu dem erhaltenen Rohprodukt frisches absolutiertes THF und absolutiertes Methanol gegeben, um die entstandenen Ester **30** und **31** zu hydrolysieren. Die Amidgruppe bleibt bestehen und die Reaktion verläuft mit einer 74 %igen Ausbeute.

Das geschützte Diol **27** wurde mit Triethylorthoacetat umgesetzt und mit Toluol/Pentan umkristallisiert.

Als letzter Schritt wird der geschützte Orthoester **28** in Acetonitril vorgelegt und mit Pyridinium-*p*-toluolsulfonat und Chloramphenicol **6** versetzt (Abb. 19).

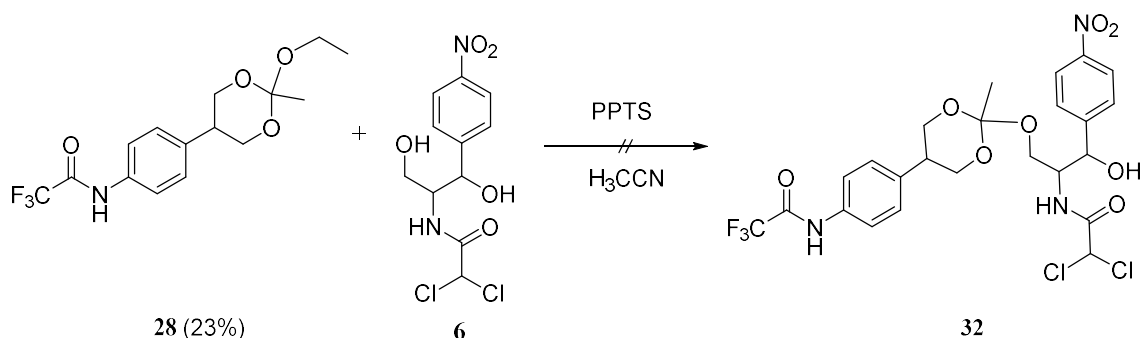


Abb. 19: Herstellung des Test-Linkersystems **32** mit versuchter Anbindung von Chloramphenicol.

Nach dreistündigem Refluxieren wird die Lösung i.Vak. eingeeignet und nochmals mit entsäuertem Ethylacetat ausgeschüttelt, um *N*-(4-(2-(2-(2,2-Dichloroacetamido)-3-hydroxy-3-(4-nitrophenyl)propoxy)-2-methyl-1,3-dioxan-5-yl)phenyl)-2,2,2-trifluoroacetamid (**32**) zu erhalten.

Das erste ¹H-Roh-NMR-Spektrum des zweiten Versuchs deutete an, dass sich der Orthoester geöffnet und umgelagert hat (Abb. 20) und der Wirkstoff nicht angebunden wurde.

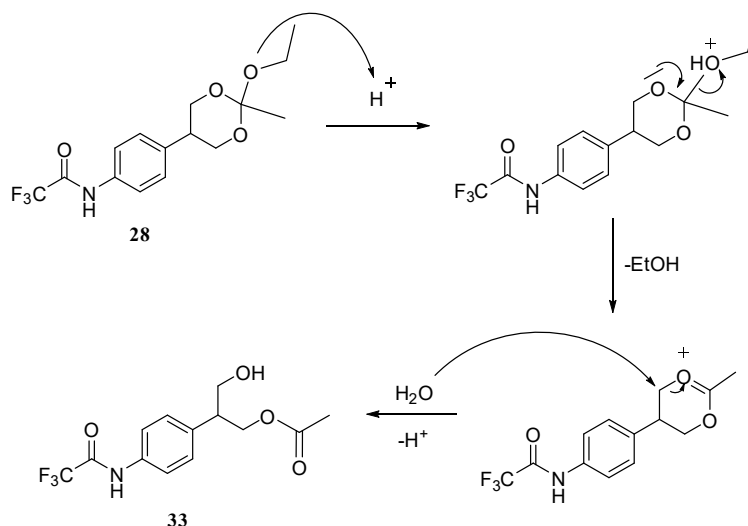


Abb. 20: Säurekatalysierte Umlagerung und Öffnung des Orthoesters.

Die Substanz wurde im Exsikkator gelagert, um das restliche Lösungsmittel zu entfernen und die NMR-Daten des geöffneten Esters aufzunehmen. Das erhaltene NMR (Abb. 21) wiederum zeigte keine Anzeichen eines geöffneten Ringes mehr, sondern stellte das vermeintliche Produkt dar.

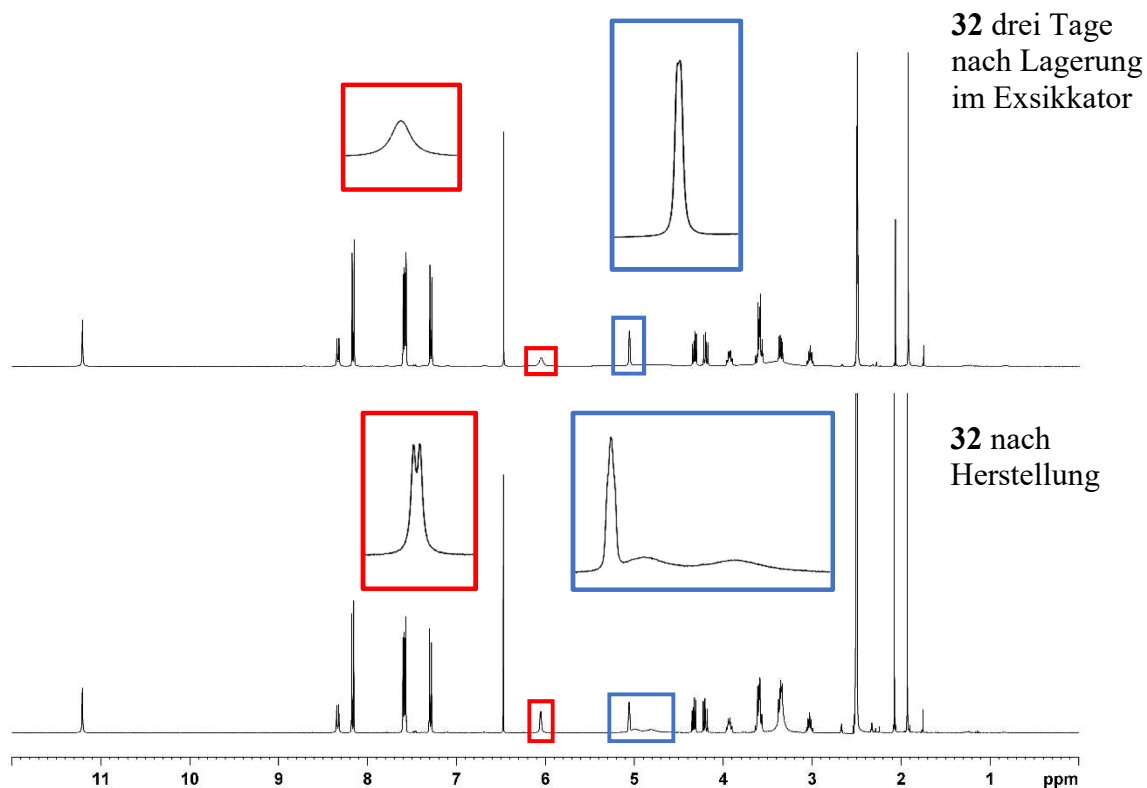


Abb. 21: 1H -NMR des vermeintlichen Produktes 32.

Das Dublett des Edukts Chloramphenicol **6** bei 6.05 ppm ist nun ein breites Signal für die verbleibende Hydroxygruppe und die beiden breiten Signale bei 5.0 ppm und niedriger sind nicht mehr vorhanden.

Weitere Aufklärung bietet das ^{13}C -NMR-Spektrum des vermeintlichen Produktes **32** (Abb. 22). Schaut man auf die Verschiebung des quartären C-Atoms des Orthoesters, so liegt er bei 170 ppm, einem Bereich, der für eine Carbonylgruppe und somit für eine Ringöffnung spricht. Der signifikante Peak bei ca. 110 ppm, der für ein quartäres C-Atom eines Orthoesters, wie das von **29**, spricht, ist nicht mehr vorhanden.

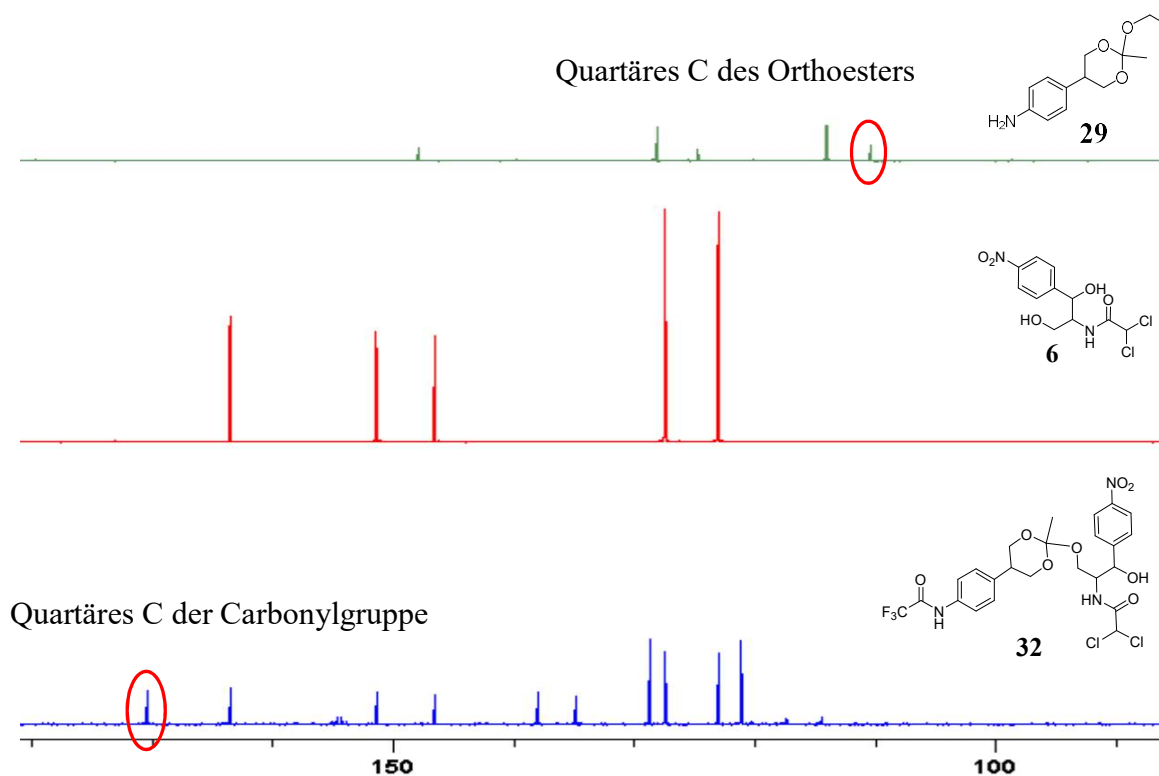


Abb. 22: ^{13}C -NMR-Spektren von **29**, **6** und **32** im Vergleich.

Da die augenommenen IR-Spektren der an Nanodiamanten angebotenen Linkersysteme nie eindeutig auf einen Orthoester hindeuten, wurden Modellsysteme synthetisiert, um das Verhalten der Orthoestergruppe zu untersuchen.

Als erstes wurde die Anbindung des Orthoesters an carboxyfunctionalisierten Nanodiamanten untersucht. Hierfür wurde eine Amidbindung zwischen Benzoesäure **34** und dem entschützten Orthoester **29** über *N*-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ) geknüpft (Abb. 23).

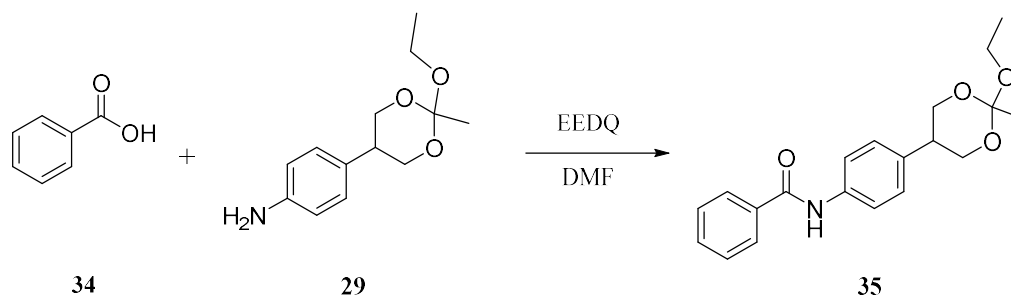


Abb. 23: Testreaktion mit EEDQ.

Die erhaltenen NMR-Daten zeigen eine erfolgreiche Anbindung des Orthoesters an die Carbonsäure. Dieser Schritt der Funktionalisierung stellt also kein Problem dar.

Nach der jetzigen Datenlage ist zu sagen, dass eine erfolgreiche Anbindung des Wirkstoffes **6** an den Orthoester **29** nicht stattgefunden hat.

Um die Umlagerung ein weiteres Mal zu vermeiden, wurden störendes Wasser oder andere Protonenträger entfernt. Dazu wurden unterschiedliche Synthesen hauptsächlich mit trockenen Lösungsmitteln und unter Schutzgas durchgeführt (Abb. 24).

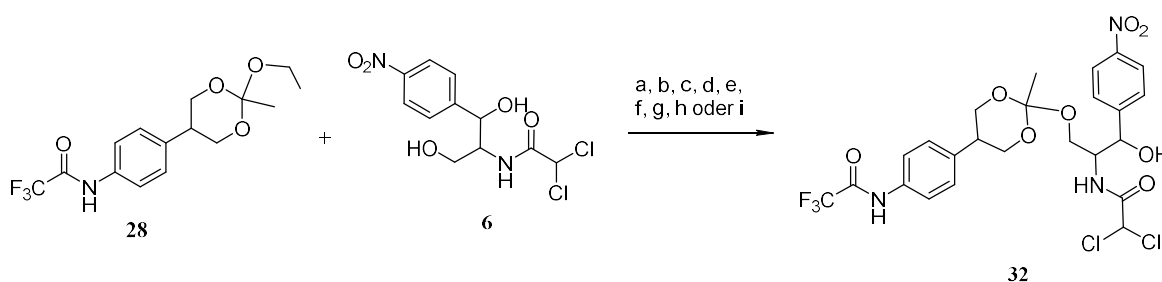


Abb. 24: Unterschiedliche Routen für den Austausch der Ethoxygruppe gegen den Wirkstoff **6**. a) PPTS, Toluol abs, Δ T, b) *p*TSA, THF/Toluol abs., c) PPTS, CH_2Cl_2 abs., Molsieb 4Å, d) PPTS, MeCN abs., e) *p*TSA, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeCN}$ abs., f) PPTS, Toluol abs., g) PPTS, MeCN abs., h) PPTS, DMF abs.

Es wurden verschiedene Katalysatoren und Lösungsmittel ausprobiert, um den gewünschten Orthoester zu synthetisieren, doch alle Versuche schlugen fehl.

Laut NMR-Spektren fand jedes Mal eine Hydrolyse statt, so dass kein Austausch der Hydroxylgruppen stattfinden konnte.

In der Literatur findet man Beispiele, auf denen die anfangs geäußerten Überlegungen beruhen. Tang *et al.* tauschte die Methoxygruppe von **36** gegen Ethylenglykol bei 130 °C aus und beobachtete keine Hydrolyse (Abb. 25).^[175] Das Lösungsmittel in diesem Fall war Toluol.

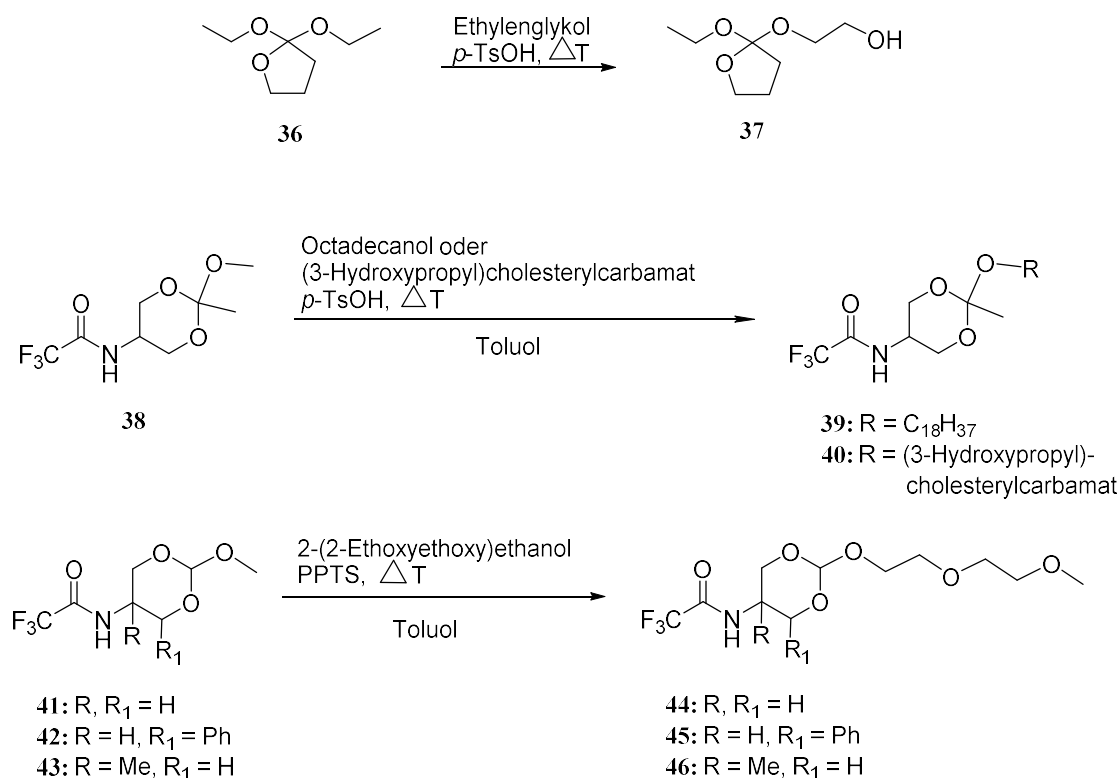


Abb. 25: Beispiele der Umesterung aus unterschiedlichen Literaturquellen.

Masson *et al.* zeigte den Austausch der Methoxygruppe gegen einen Octadecyl- sowie Cholesterylrest (**39** und **40**) (Abb. 25).^[176] Beide Systeme wurden als racemische Gemische isoliert, jedoch kam es nicht zur Hydrolyse.

Bruyère *et al.* zeigte an einem ähnlichem Molekül den Austausch der Methoxygruppe, bei der eine Phenylgruppe in Nachbarschaft positioniert ist (**45**) (Abb. 25).^[177] Auch hier fand ein Austausch statt, bei diesem Reaktionsschritt wurde ebenfalls keine Hydrolyse beobachtet.

Vergleicht man nun **32** mit den Molekülen und Synthesevorschriften aus der Literatur, so wird nicht ersichtlich, wieso es vorwiegend zu einer Hydrolyse kam. Der Wirkstoff **6** besitzt eine primäre und eine sekundäre Alkoholgruppe. Vergleichbar ist dies mit den Systemen von Masson, da der Cholesterylrest auch über einen sekundären Alkohol gegen die Methoxygruppe ausgetauscht wird, ohne dass Hydrolyseprodukte entstehen.

Nun wurde untersucht, ob der Wirkstoff sterisch zu anspruchsvoll ist, um ausgetauscht zu werden. Hierfür sollte Ethanol gegen *n*-Butanol **47**, einem primären Alkohol, ausgetauscht werden (Abb. 26). Auch dieser Versuch zeigte nicht die gewünschte Umesterung.

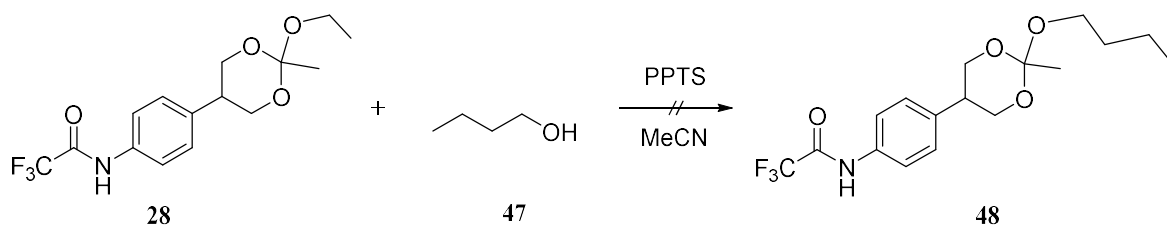


Abb. 26: Austausch der Ethoxygruppe gegen *n*-Butanol **47**.

Die Ursache für das Fehlschlagen der Umesterungen liegt in der Hydrolyse der Orthoester. Deslongchamps *et al.* untersuchte die Hydrolyserate von cyclischen Orthoestern und die Gruppe kam zu dem Schluss, dass je höher die Substitution am zentralen C-Atom vorliegt, desto schneller findet eine Hydrolyse statt.^[178] Der Grund hierfür liegt in der sterischen Dekompression bzw. in der Stabilität des entstehenden Alkoxy-Carbeniumions. Hinzu kommt die Basizität der Sauerstoffatome, die aufgrund ihrer antiperiplanaren Stellung zu der Abgangsgruppe, in diesem Fall Ethoxy, die Abgangsgüte noch erhöhen.^[179]

In der Abb. 27 ist die Umlagerung des Orthoesters mit der Methoxygruppe als Abgangsgruppe dargestellt. Aufgrund der Basizität und besseren Protonierbarkeit der Ethoxygruppe, die ja im Orthoester **28** vorhanden ist, ist eine Umlagerung noch wahrscheinlicher.^[178-179]

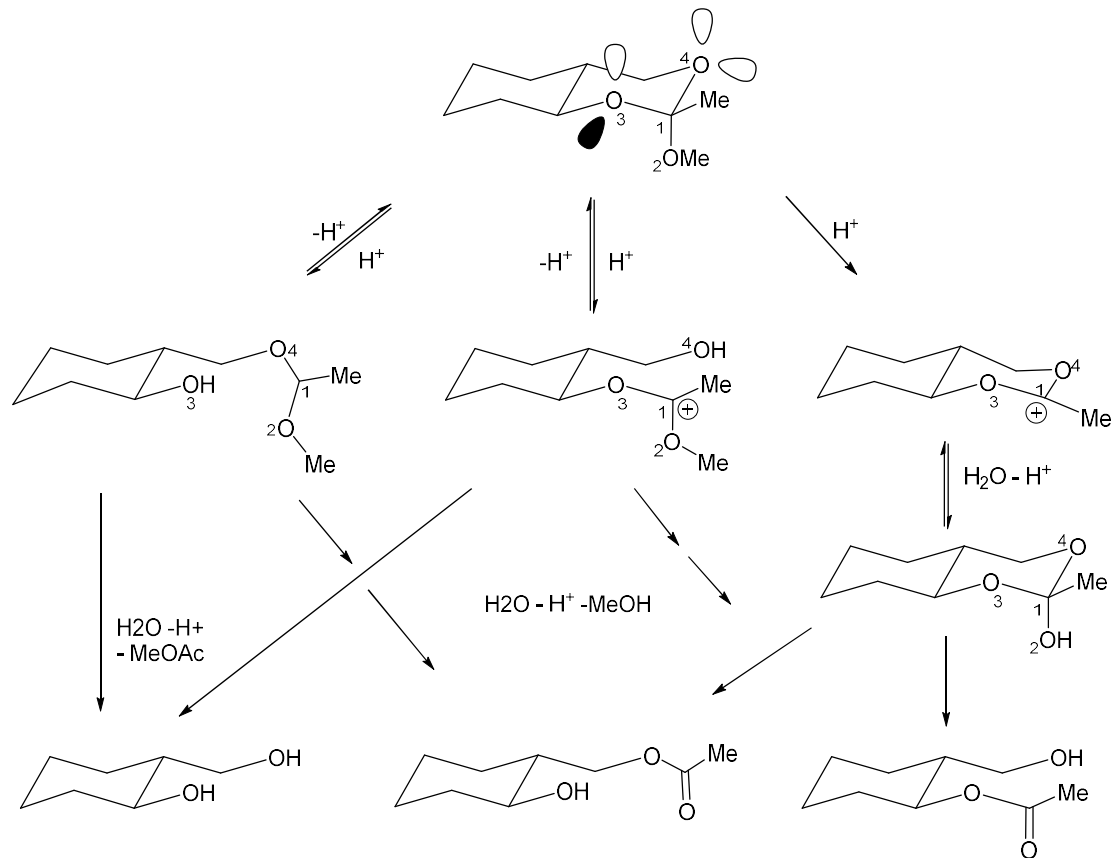


Abb. 27: Hydrolyse des Orthoesters (mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [178], Copyright 2010 Elsevier).

Repetto *et al.* haben ebenfalls die Hydrolyse von geminalen Ethern untersucht und geben als Grund für die schnelle Hydrolyse den kinetischen anomeren Effekt an. Sie unterstreichen das Resultat der Gruppe um Deslongchamps mit Kristallstrukturen, die eine verlängerte C – O Bindung zeigen, die bevorzugt von Lewissäuren gespalten wird (Abb. 28).^[180]

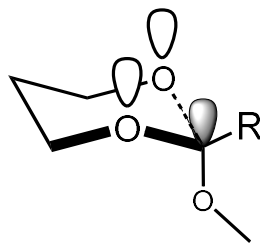


Abb. 28: Anomerer Effekt für die bevorzugte Abgangsgruppe nach Literatur [180]. Die gestrichelte Linie wird bevorzugt gespalten.

3.1.2.2 Reaktion des Chloramphenicols **6** mit Triethylorthoacetat und anschließender Reaktion mit **28** zum Orthoester **32**

Da der bisher beschriebene Syntheseweg zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis führte, wurde eine neue Syntheseroute entwickelt (Abb. 29).

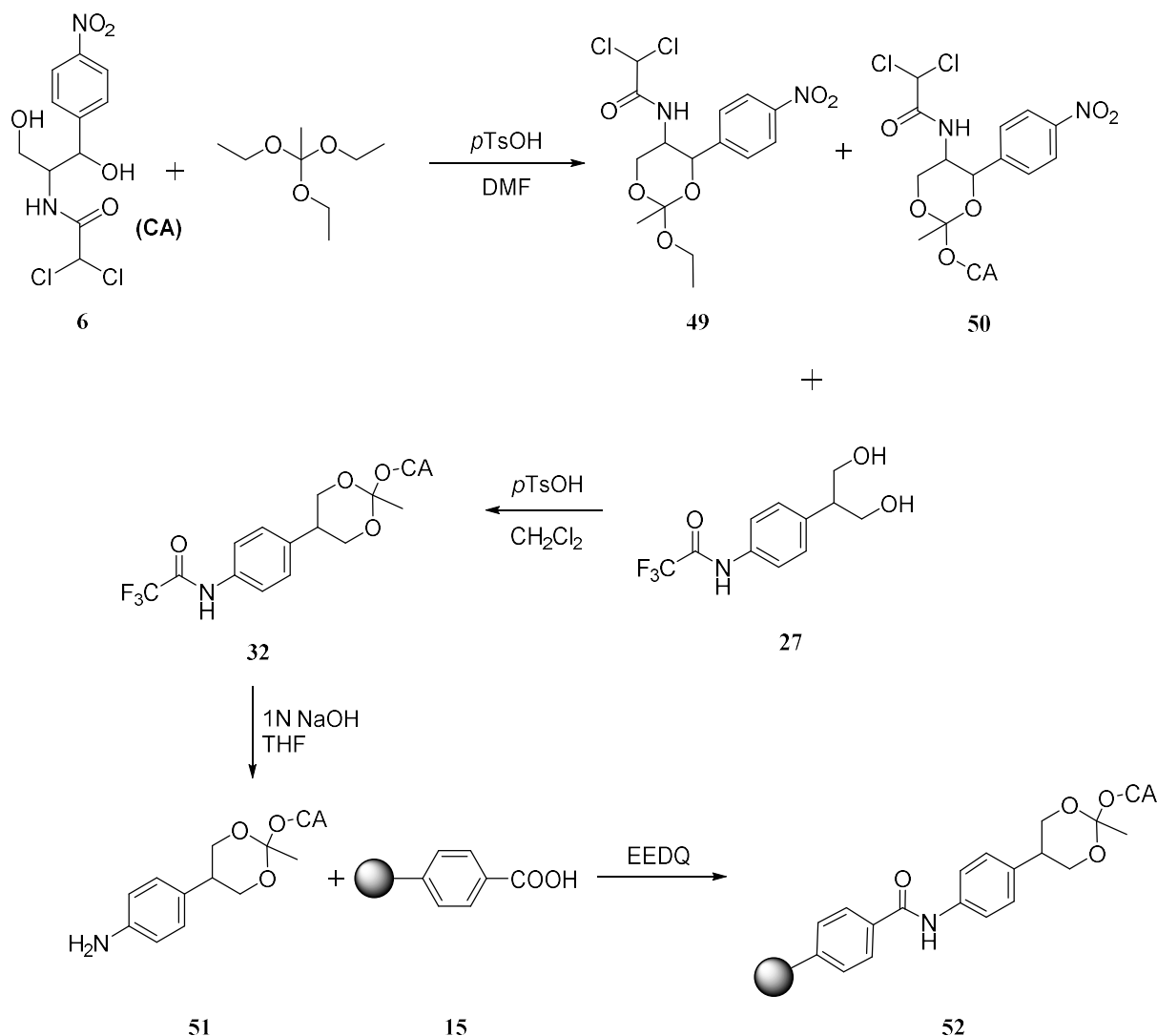


Abb. 29: Neue Syntheseroute zum gewünschten Orthoester **52**.

Zuerst wurde ein Überschuss an Chloramphenicol (**6**) mit Triethylorthoacetat umgesetzt, um das dreifach mit Chloramphenicol substituierte Produkt als Hauptprodukt zu erhalten. Dies blieb jedoch aus und es bildeten sich **49** und **50**, das einfach und zweifach substituierte Produkt, was mittels NMR nachgewiesen wurde. Durch Erhitzen am Wasserabscheider sollte das entstandene Wasser der Reaktion entzogen werden, um das Gleichgewicht auf die Produktseite

zu verschieben. Eine weitere Aufreinigung wurde mit aktiviertem Aluminiumoxid durchgeführt, um die entstandenen Produkte von überschüssigen Chloramphenicol (**6**) zu trennen. Dies gelang jedoch auch nach mehrmaliger chromatographischer Aufreinigung nur in geringer Ausbeute und es entstand immer ein Gemisch aus abgespaltenem Chloramphenicol (**6**) und Nebenprodukt. Die Fraktionen, die rein waren (**49**: 18.7 %, **50**: 27.3 %), wurden analysiert und beide wurden auch in einer weiteren Reaktion mit Diol **27** umgesetzt (Abb. 30).

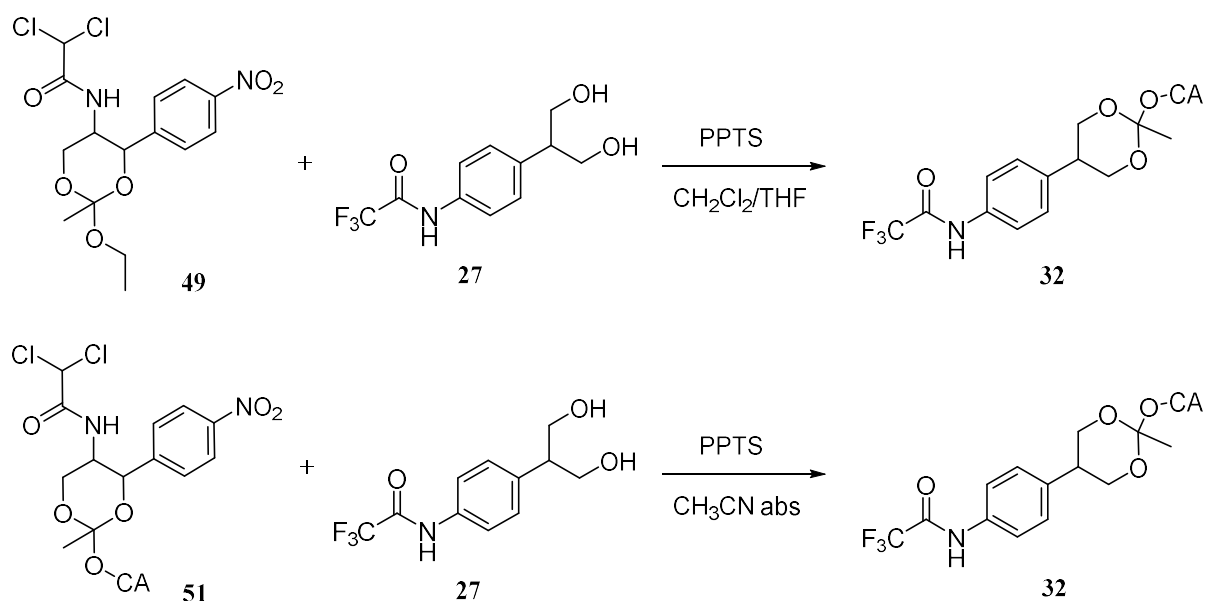


Abb. 30: Versuchte Umsetzung von **49** und **50** mit Diol **27** zum Produkt **32**.

Nach erfolgter Reaktion und säulenchromatographischer Aufreinigung an Aluminiumoxid konnte lediglich das Hydrolyseprodukt **33** bzw. die Abtrennung des Chloramphenicols **6** über NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden.

Daraufhin wurde das System geändert und Chloramphenicol (**6**) gegen Nitrobenzylalkohol ausgetauscht, um zu beobachten, ob die Umsetzung nur durch die Diol-Struktur scheitert oder generell problematisch in der Handhabung ist (Abb. 31).

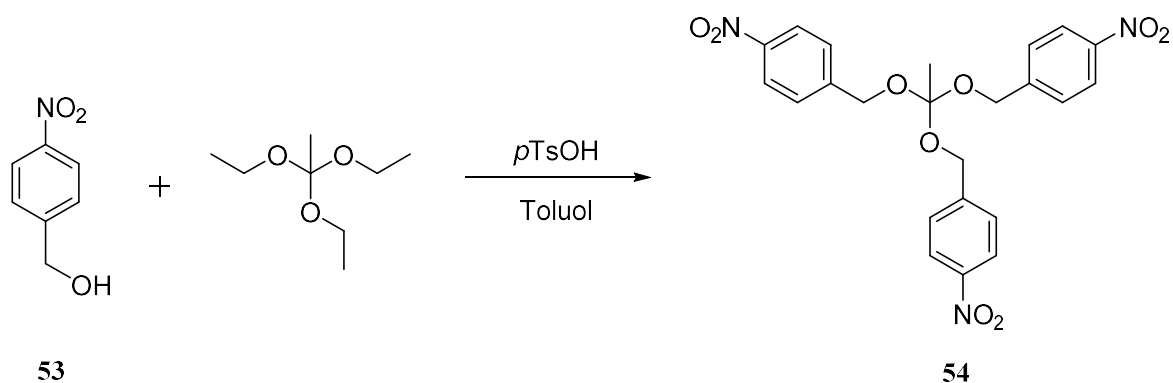


Abb. 31: Orthoester mit Nitrobenzylalkohol **53**.

Nach mehrmaliger chromatographischer Aufreinigung über basischem Aluminiumoxid Aktivitätsstufe II wurde das gewünschte Produkt in sehr geringer Menge isoliert und ein ^1H -NMR-Spektrum aufgenommen. Da die Ausbeute mit 0.39 % sehr gering ausfiel, wurde auch dieser Syntheseweg zum gewünschten Orthoester **32** verworfen.

3.1.3 Reaktionen der Diole **27** und **12** mit Acrolein

3.1.3.1 Reaktion des Diols **27** mit Acrolein zum Orthoester **58**

Für den folgenden Syntheseweg wurde ausgehend von Diol **27** eine weitere Alternative synthetisiert (Abb. 32). Hierfür wurde Diol **27** mit Acrolein umgesetzt, um das Vollacetal **55** zu erhalten. Ausgehend von **55** kommen zwei weitere Synthesemöglichkeiten in Frage, um zum gewünschten Produkt **58** zu gelangen. Zuerst wurde versucht, **58** in einer Eintopfsynthese herzustellen. Hierfür wurde ein Rutheniumkatalysator eingesetzt, um die endständige Doppelbindung zu isomerisieren.^[181] Laut Literatur ist dieser Katalysator dafür bestens geeignet. Nach erfolgter Isomerisierung der Doppelbindung sollte der Wirkstoff direkt zugegeben werden und Natriumcarbonat als Ethanol-/Wasserrfänger fungieren.^[182] In der Literatur wurde dies sogar mit einem phenolischen Wirkstoff durchgeführt.^[183] Daher wurde als Wirkstoff Dopamin-Hydrochlorid verwendet (Abb. 32).

Als weitere Route wurde die vorherige Isolierung der isomerisierten Zwischenstufe **56** vorgenommen, um von dieser Stufe aus den hydroxylhaltigen Wirkstoff anzubinden (Abb. 32). Ebenfalls wurde versucht, **56** über die Zugabe von Butyllithium und Ethylendiamin zu erhalten. Jedoch führte keine dieser Routen zum Erfolg.

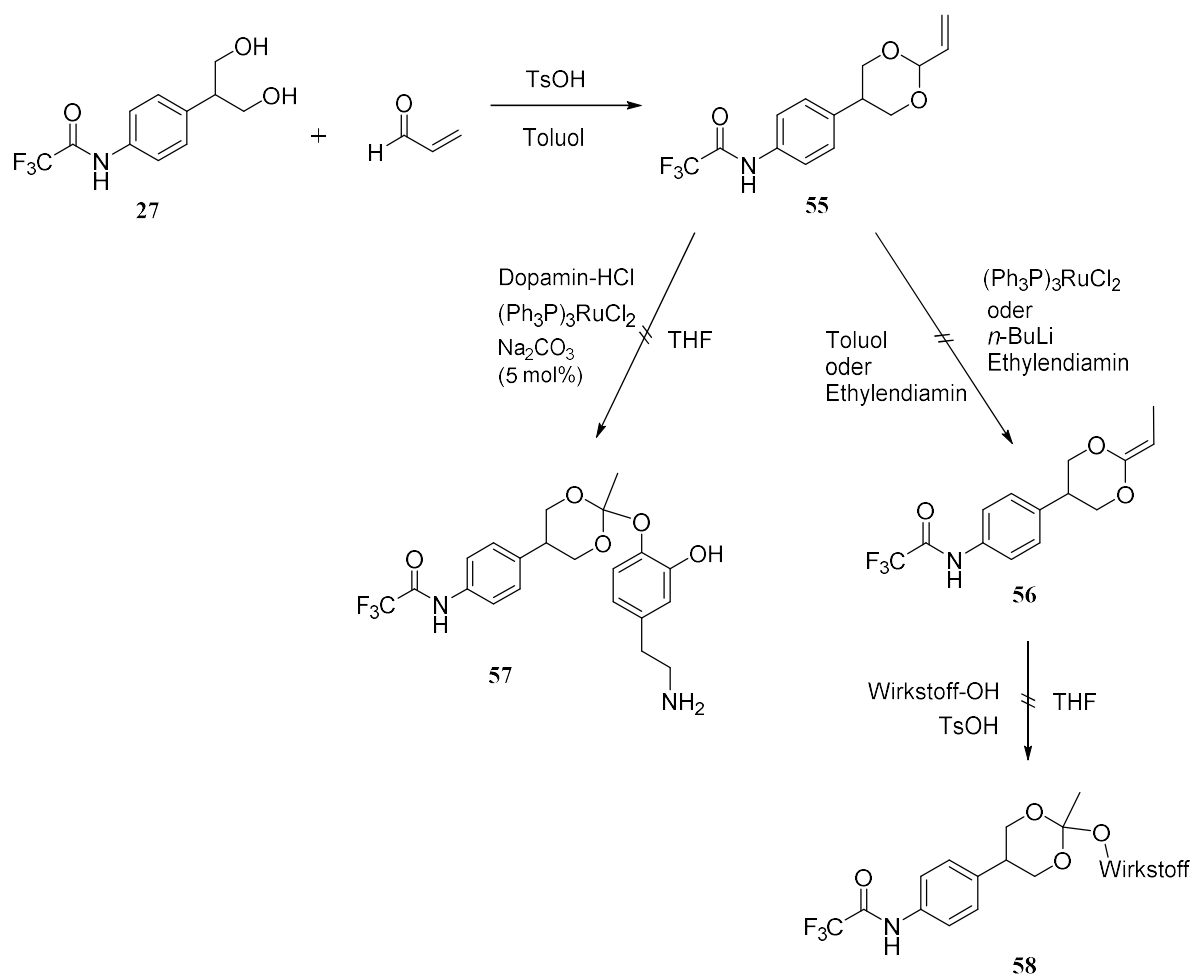


Abb. 32: Syntheseroute zum gewünschten Orthoester **58** über **55**.

Keine der gezeigten Syntheserouten führte zu einer Isomerisierung, so dass eine weitere Anbindung eines hydroxyhaltigen Wirkstoffs nicht möglich war.

3.1.3.2 Reaktion des Diols **12** mit Acrolein zum Orthoester **20**

Es konnte zum jetzigen Zeitpunkt keine erfolgreiche Syntheseroute zum Erhalt der Orthoester **32** oder **20** durchgeführt werden. Grund hierfür könnte das Lösungsmittel selbst sein. Da das Molekül **55** mit der terminalen Doppelbindung ein Feststoff ist, wurde es in Toluol gelöst. Laut Literatur könnte aber die Isomerisierung nur sehr langsam von statten gehen und auch Temperaturen von 190 °C wären notwendig.^[184] Es wird auch beschrieben, dass höhere Temperaturen die Isomerisierungsrate steigern, aber auch die Menge der Nebenprodukte erhöhen. Eine Verlängerung der Reaktionszeiten würde die Ausbeuten verringern und auch die Polymerisation begünstigen. Die Polymerisation würde sogar bei Anwesenheit von Spuren von

Säure stattfinden und auch eine Lagerung in Glasgefäßen würde ausreichen, eine spontane Polymerisation des Produktes durchzuführen. Es wurde die Überlegung unternommen, dass induktive und stabilisierende Effekte des Phenylringes die Polymerisation, aber auch eine Isomerisierung behindern würden. Daher wurde wieder das erste Testsystem herangezogen, um es mit Acrolein zum entsprechenden Orthoester **20** umzusetzen (Abb. 33).

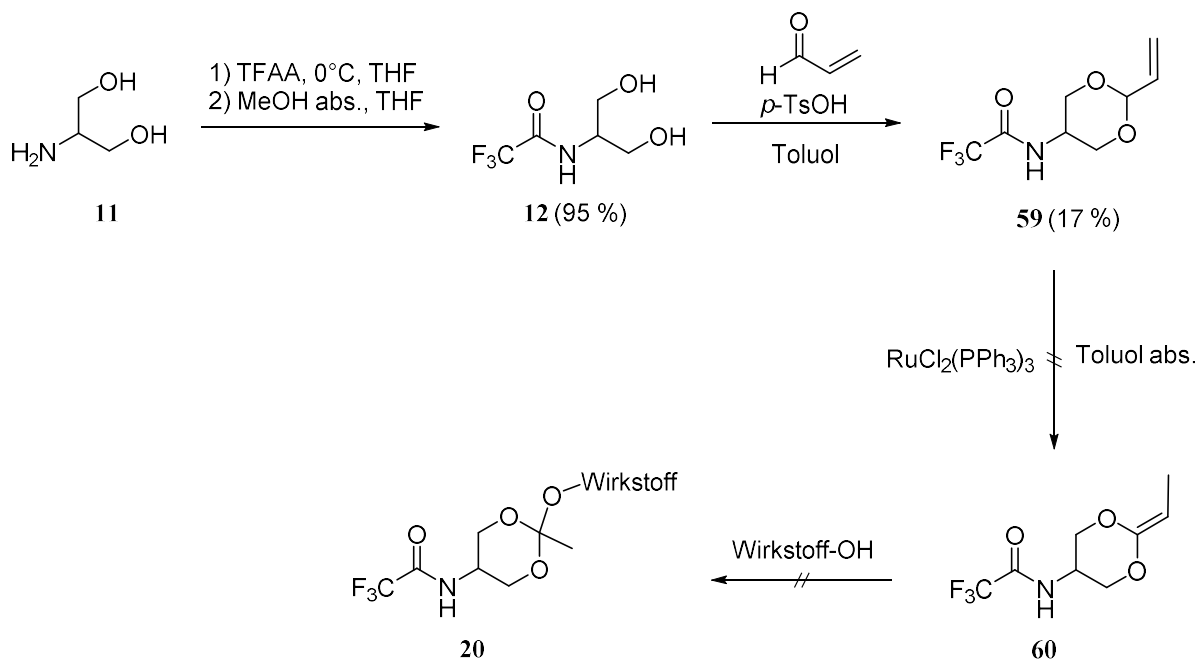


Abb. 33: Syntheseroute zum Orthoester **20**.

Jedoch kam es auch bei dieser Syntheseroute zu keinem gewünschten Produkt. Es stellte sich sogar heraus, dass der Phenylring für die Bildung des Orthoesters nötig ist. Es wäre aber auch möglich, dass das Edukt **12** der Temperatur von 125 °C, die für die Bildung notwendig ist, nicht über den benötigten Zeitraum standhält. Abschließend lässt sich sagen, dass es zu keiner gewünschten Produktbildung kommt.

3.1.4 Weitere Syntheseveruche zur Herstellung eines Orthoesters

Alle bisherigen Synthesen würden zu einem erhöhten Verbrauch an Wirkstoff führen, um eine geringe Menge an Nanodiamant-Wirkstoff-Konjugat herzustellen und daher sind die vorgestellten Routen ökonomisch nicht von Interesse. Ein letzter Versuch, um zu zeigen, dass

es zur Bildung eines Orthoesters mit einem Wirkstoff und dessen Freisetzung kommt, wurde nach folgenden Schemata durchgeführt (Abb. 34 und Abb. 35).

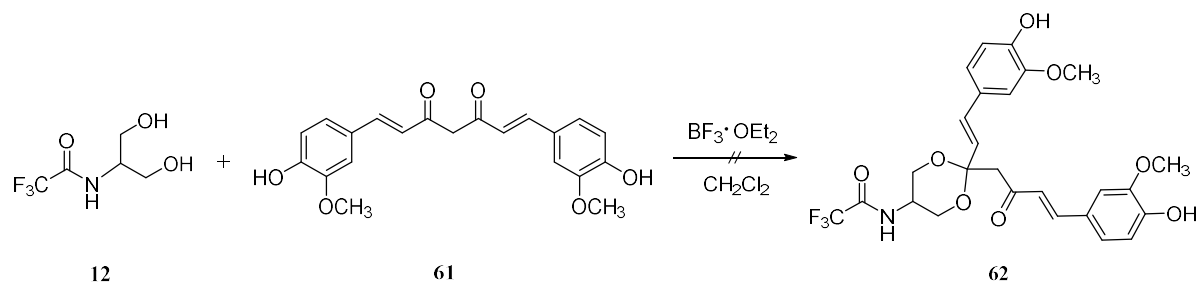


Abb. 34: Umsetzung des Diols **12** mit Curcumin **61**.

Zuerst wurde versucht, den Wirkstoff Curcumin (**61**) an das Diol **12** über den Mechanismus der Ketalbildung anzubinden. Jedoch wurde nach erfolgter säulenchromatographischer Aufreinigung kein gewünschtes Produkt, sondern beide Edukte isoliert.

Daraufhin wurde überlegt, ob auch hier der sperrige Wirkstoff eventuell eine Anbindung verhindern würde. Es wurde ein einfacheres System ausgewählt, was bei einer Freisetzung mittels UV-Vis-Spektroskopie detektierbar und nicht zu sperrig für eine Anbindung ist.

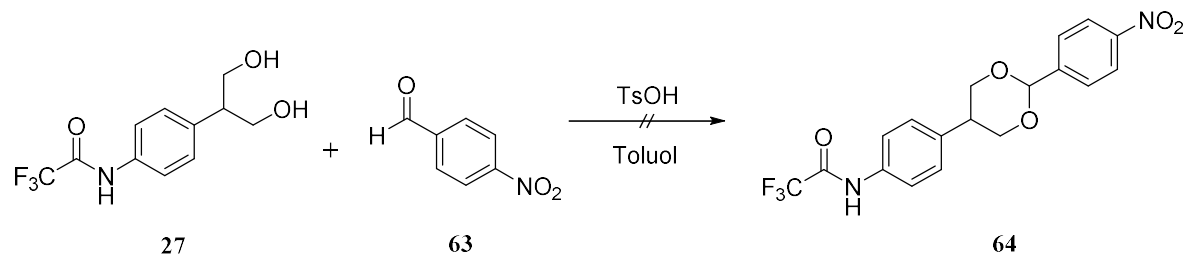


Abb. 35: Synthese des geschützten Acetals **64**.

Hierbei wird Diol **27** in Anlehnung an Literatur [185] mit Nitrobenzaldehyd **63** unter Reflux in Toluol mit Wasserabscheider umgesetzt, um das geschützte Acetal **64** zu erhalten. Nach erfolgter Synthese wurde das Produkt über neutralem Aluminiumoxid Stufe II säulenchromatographisch gereinigt. Es wurden jedoch zwei, nicht trennbare Produkte erhalten.

Da bisher keiner der zuvor dargestellten Synthesewege funktionierte, wurde eine weitere Synthesestrategie angewendet, um Wirkstoffe pH-labil anzubinden.

3.2 Synthese eines Hydrazons zur Anbindung an Nanodiamant

Aus vorherigen Arbeiten unserer und auch anderer Gruppen sind bereits pH-labile Hydrazone, die kovalent an Nanodiamanten gebunden werden, bekannt.^[125, 128] Diese funktionelle Gruppe kann Ketone anbinden, die sich dann pH-labil wieder abspalten. Um keine schnelle Immunantwort hervorzurufen und eine nicht-spezifische Zellaufnahme zu gewährleisten, wurde der Partikel von der Gruppe um Zhao *et al.* mit Polyethylenglykol umhüllt.^[125] Zur Steigerung der Zellaufnahme wurde kovalent eine RGD-Sequenz angebunden, die spezifisch von Integrin-Rezeptoren an der Zelloberfläche erkannt werden. So kann man einen gezielten Wirkstofftransport in ein saures Zellmedium generieren und der Wirkstoff wird in der Zelle vom Linker abgespalten.

Waag *et al.* hat ebenfalls pH-sensitive Systeme am Nanodiamanten angebunden. Hier wurde Isoniazid, ein Wirkstoff gegen Tuberkulose, der ein Hydrazid enthält, über Nanodiamant, der Acetophenon-Gruppen auf der Oberfläche trägt, angebunden.^[128] Die Freisetzung geschieht dann in Makrophagen, die als Fresszellen das Nanodiamant-Konjugat als Fremdstoff erkennen und phagozytieren.^[186-187] Auf diesem Wege wird gezielt der Wirkstoff am Wirkort freigesetzt.

3.2.1 Synthese eines Linkersystems zur pH-labilen Anbindung von DOX und kovalenten Anbindung von Folsäure

3.2.1.1 Funktionalisierung des Nanodiamanten **65** mit Alkin- und Carbonsäuregruppen

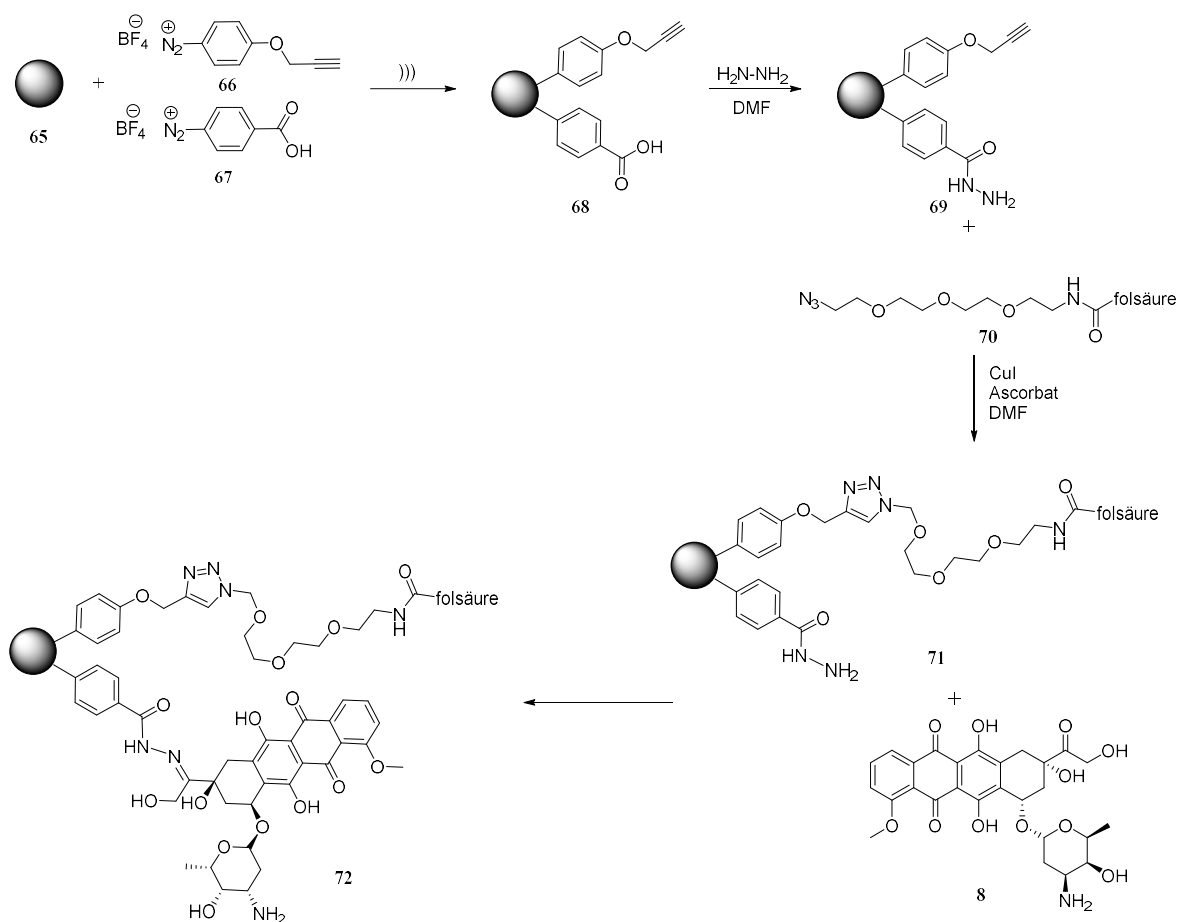


Abb. 36: Syntheseplan eines pH-labilen Linkersystems zur Anbindung von DOX über Hydrazon.

Die Sythesestrategie des beschriebenen Systems beruht auf der orthogonalen Funktionalisierung des Nanodiamant und die kovalente Anbindung von Folsäure, über welches eine verbesserte Rezeptoraufnahme stattfindet und die Anbindung eines Hydrazons, das pH-sensitiv DOX binden kann, um den Wirkstoff dann im sauren Milieu wieder freizusetzen. Hierfür wurden unterschiedliche Nanodiamant-Konjugat-Systeme entwickelt und untersucht.

Zuerst wurden beide Diazoniumsalze **66** und **67** an Nanodiamant **65** kovalent gebunden. Danach wird die Carboxylgruppe mit Hydrazin zum Hydrazid **69** umgesetzt und anschließend

die Azid-terminierte Folsäure **70** über eine Clickreaktion angebunden. Abschließend wird der Wirkstoff Doxorubicin **8** über das Hydrazid pH-labil angebunden (Abb. 36).

Um das Nanodiamant-Konjugat zu synthetisieren, wurde zuerst die funktionalisierte Folsäure **70** hergestellt.

3.2.1.2 Synthese der funktionalisierten Folsäure **70**

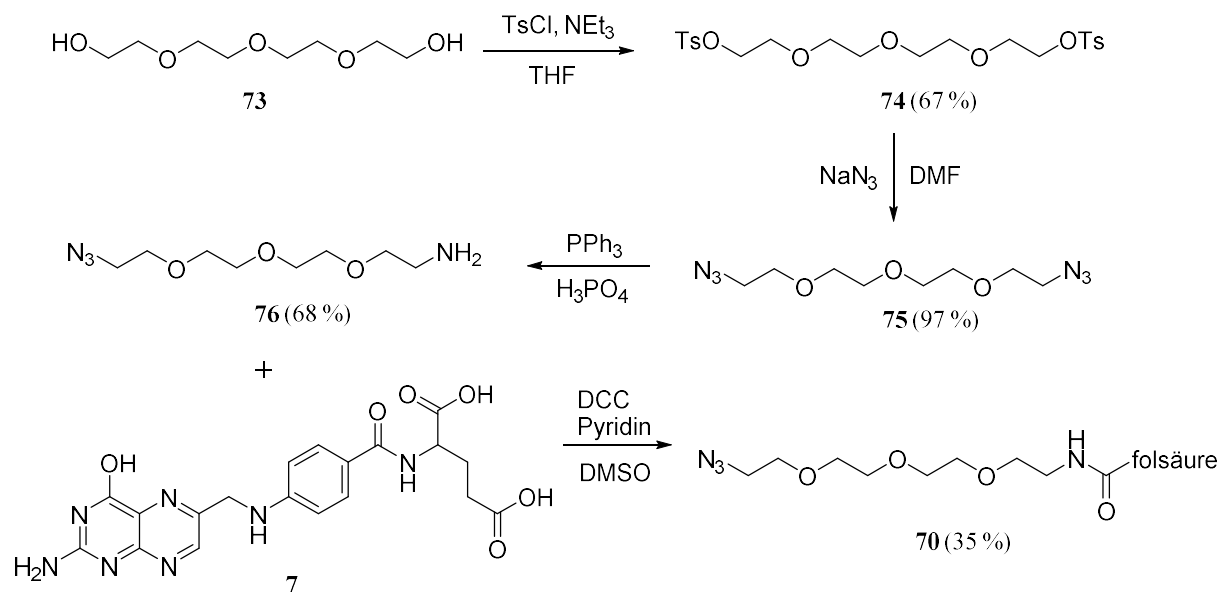


Abb. 37: Darstellung des Azido-Folsäure-Linkers **70** zur Anbindung an Nanodiamant.

Ausgehend von Tetraethylglykol **73** (TEG) wurde das doppelt tosylierte Derivat **74** hergestellt.^[188] Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde das erhaltene farblose Öl in Dimethylformamid mit Natriumazid versetzt, um **75** in 97%iger Ausbeute zu erhalten.^[189] Durch weitere Umsetzung mit Triphenylphosphin in Phosphorsäure wurde selektiv ein Azid zur Aminogruppe reduziert, um **76** zu erhalten.^[190] Folsäure wurde in DMSO mit DCC und Pyridin vorgelegt und eine Stunde gerührt, um die Carbonsäuren zu aktivieren. Anschließend wurde **76** zugegeben und über Nacht im Dunkeln gerührt (Abb. 37).

Aufgrund der Eigenschaften der Folsäure wie Hygroskopie, Lichtempfindlichkeit, Temperatur- und Sauerstoffempfindlichkeit stellte die Aufreinigung von **70** eine Herausforderung dar.^[191]

Laut Literatur [192] kann man die erhaltenen α - und γ - Isomere der Folsäurederivate über eine semi-präparative HPLC nicht trennen. Lediglich können die unreactierte Folsäure und das Nebenprodukt, bei dem beide Carbonsäuren funktionalisiert sind, getrennt werden. Die Autoren

fanden zudem heraus, dass es für eine Anbindung an die Folatezeptoren nicht von Bedeutung ist, ob Folsäure in α - oder γ - Position funktionalisiert ist, beide binden gleich affin.

Durch Aufreinigung über eine analytische HPLC-Säule konnte das disubstituierte Produkt nach 34 min Retentionszeit erhalten werden. Die erhaltene Reinsubstanzmenge genügte für die Messung eines $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums, um die Ergebnisse in der Literatur zu bestätigen.^[192] Unreagierte Folsäure **8**, wie auch das α - und γ -Isomer werden in den ersten acht Minuten detektiert und sind nicht trennbar. Die disubstituierte Folsäure erreichte eine Detektionszeit von 34 min und konnte isoliert werden.

Zudem wurde versucht, die Folsäure über Aktivierungsreagenzien zu aktivieren, so dass bevorzugt nur ein Isomer entsteht (Abb. 38).

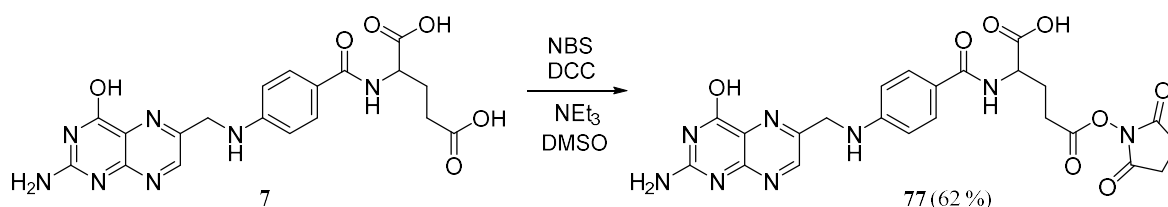


Abb. 38: Aktivierung der Carbonsäure von Folsäure **7**.

Hier ist leider nicht auszuschließen, dass auch die α -Position aktiviert wurde. Die Reaktion wurde in DMSO durchgeführt, was bei der Aufarbeitung als Restlösemittel im Produkt bleibt. Selbst zwei Tage an der Ölpumpe konnten nicht alle Reste des Lösungsmittels entfernen. Sinnvoll wäre es, den Feststoff mit einem Lösungsmittel zu waschen, was DMSO co-evapuriert, da die Signale unterhalb 2.5 ppm stören. In diesem Bereich werden die Protonensignale der Ethyleinheit zwischen den Carbonsäuren detektiert.

Für weitere Reaktionen wurde die zweifach substituierte Folsäure verwendet, da eine Herstellung des γ -Isomers nicht möglich war.

Für den Aufbau des Linkersystems wurde nun das erste Diamantsystem nach folgendem Schaubild erstellt (Abb. 39).

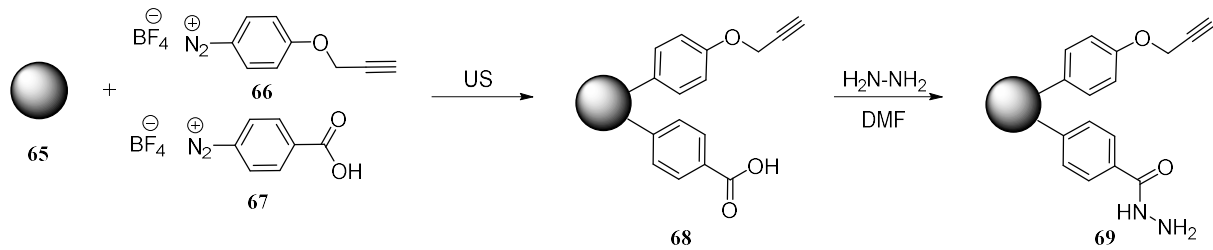


Abb. 39: Herstellung des orthogonal funktionalisierten Nanodiamanten **69**.

Gemahlener Nanodiamant **65** wurde in einer Reaktion mit Carbonsäure- (**67**) und Alkingruppen (**66**) funktionalisiert. Im nächsten Schritt wurde die Carbonsäure zum Hydrazid umgesetzt. Hier zeigte sich, dass die terminale Alkingruppe im FT-IR-Spektrum nicht mehr detektiert wurde. Es wurde davon ausgegangen, dass Hydrazinhydrat eine Reaktion mit dem Alkin eingeht, so dass die Dreifachbindung reduziert wird.^[193-194] Auch ein erneuter Syntheseversuch führte zum gleichen Ergebnis.

Aufgrund dieser Sachlage wurde das Linkersystem nochmals umgestellt und die Alkingruppe nach diesen auftretenden Schwierigkeiten gegen eine Azidgruppe getauscht.

3.2.1.3 Funktionalisierung des Nanodiamanten **78** mit Azid- und Carbonsäuregruppen

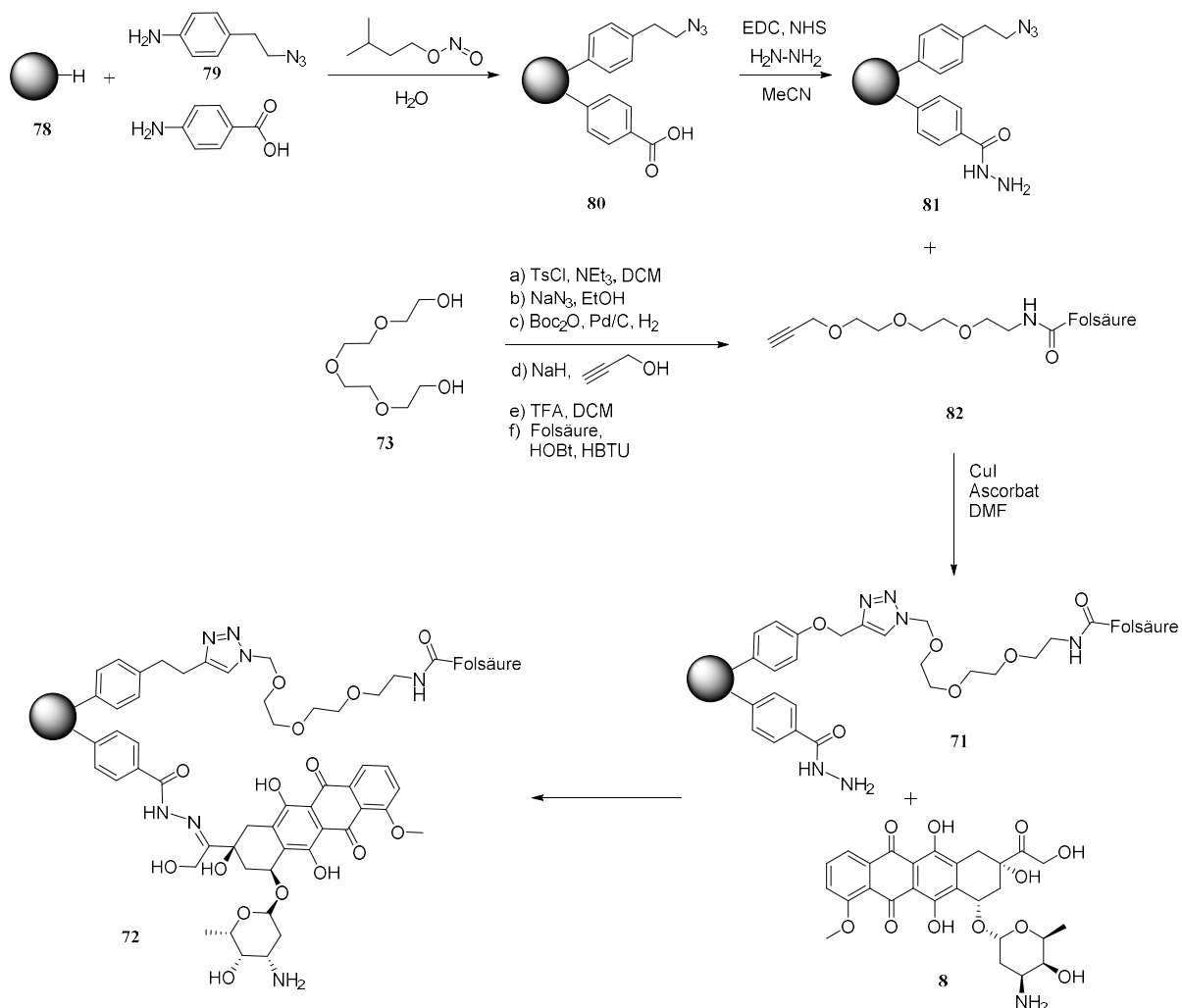


Abb. 40: Linkersystem zur Anbindung von Folsäure **7** und Doxoribicin **8**.

Wasserstoffterminierter Nanodiamant **78** wurde in einer Reaktion mit Carbonsäure- und Azidgruppen (**79**) funktionalisiert (Abb. 40). Im nächsten Schritt wurde die Carbonsäure zum Hydrazon umgesetzt. In den aufgenommenen FT-IR-Spektren ist eine Azidbande bei 2104 cm^{-1} in beiden Nanodiamant-Konjugaten erkennbar, sowie eine Verschiebung der Carbonylbande von 1687 cm^{-1} zu 1633 cm^{-1} , was für die Carbonylschwingung einer Amidbande spricht (Abb. 41). Ebenfalls ist eine Amid II-Schwingung bei 1545 cm^{-1} sichtbar, so dass von einer erfolgreichen Synthese des Hydrazids **81** ausgegangen wird.

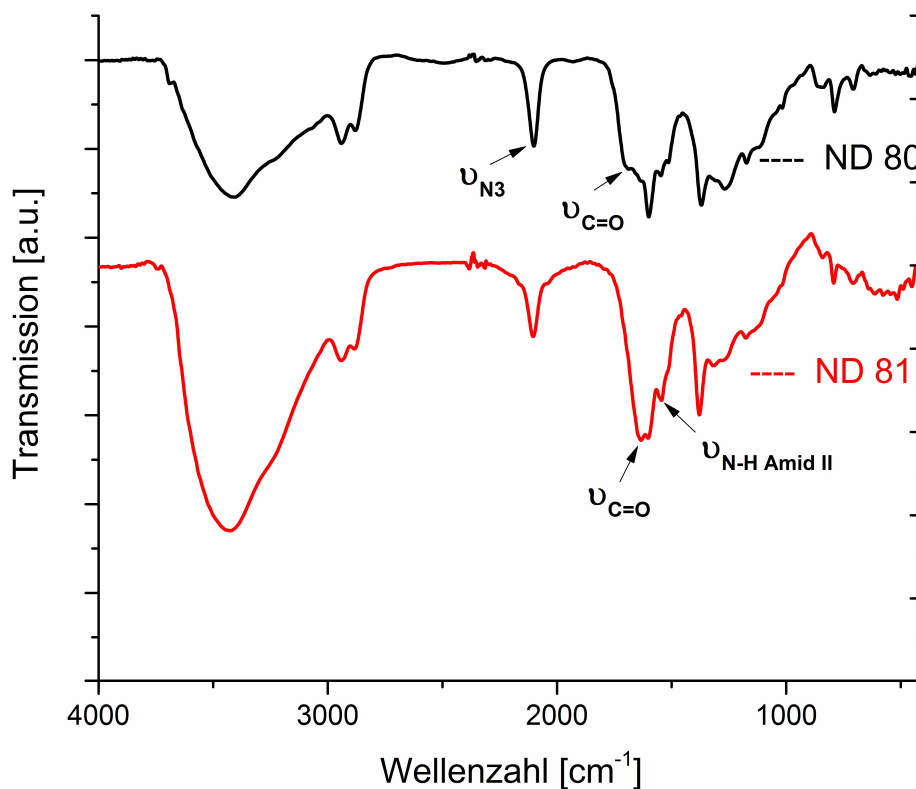


Abb. 41: Vergleich der FT-IR-Spektren der Nanodiamantsysteme **80** und **81**.

Da nun eine Azid- und keine Alkineinheit auf dem Diamanten vorhanden ist, musste auch das Linkersystem abgeändert werden.

3.2.1.4 Synthese des Linkersystems zur Anbindung der Folsäure

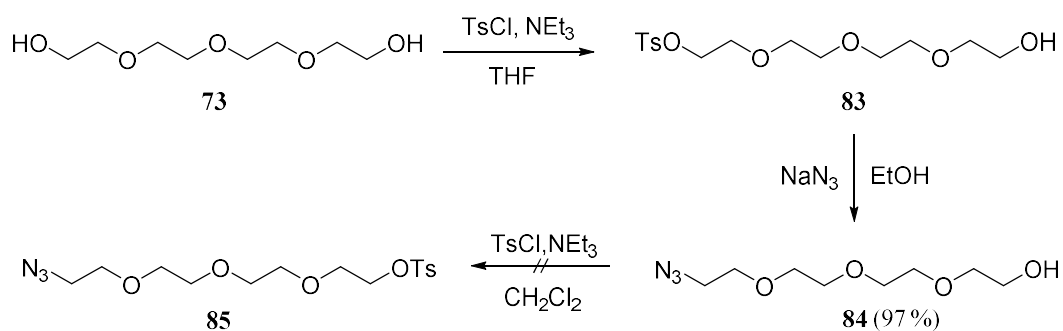


Abb. 42: Herstellung des Linkersystems zur Anbindung an Folsäure **7**.

Auch hier wurde ausgehend von Tetraethylglykoll **73** das einfach tosylierte Derivat **83** hergestellt. Das Zwischenprodukt **83** war mit 8 % in der Ausbeute sehr gering, was darauf zurückzuführen ist, dass es das Nebenprodukt und das doppelt tosylierte Derivat das Hauptprodukt darstellt. **83** wurde wiederum mit Natriumazid zu **84** umgesetzt (Abb. 42). Hier sollte nun die Hydroxygruppe ebenfalls tosyliert werden, nur schlug diese Reaktion fehl. Daraufhin wurde die Route erneut umgestellt und ausgehend von **73** das zweifach tosylierte Derivat **74** hergestellt, von dem aus dann eine Tosylgruppe gegen eine Azidgruppe ausgetauscht wurde, um **85** zu erhalten. Ausgehend von **85** wurde die Alkyngruppe eingeführt und anschließend das Azid zum Amin **87** reduziert (Abb. 43).

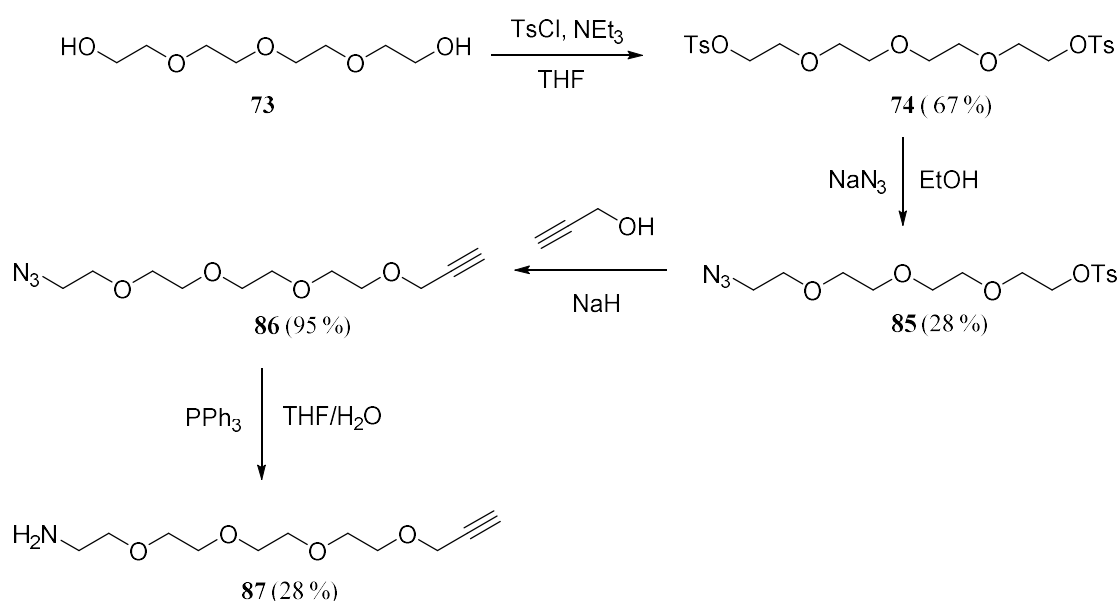


Abb. 43: Neues Linkersystem zur Anbindung an Nanodiamant **81**.

Die Aufreinigung des bei der Reduktion der Azidgruppe in **86** mittels Triphenylphosphin erhaltene Produkt **87** bereitete Schwierigkeiten. Ein Zusatz von Triethylamin zum Laufmittel war notwendig, um das Produkt durch Säulenchromatographie zu erhalten, jedoch mischte sich mit dem Produkt immer Triethylammoiumsalz, das zwar durch eine Extraktion mit Natronlauge abzutrennen war, wobei sich aber auch die Alkyngruppe von **87** zersetzte. Somit musste ein anderer Weg zur Herstellung der Aminogruppe in **87** besprochen werden (Abb. 43).

Die Umsetzung von **87** mit Kaliumphthalimid brachte ebenfalls nicht den gewünschten Erfolg. Das verwendete Imid hatte sich leider schon begonnen zu zersetzen, so dass der Linker zweimal an die Phthalsäure addierte (Abb. 44).

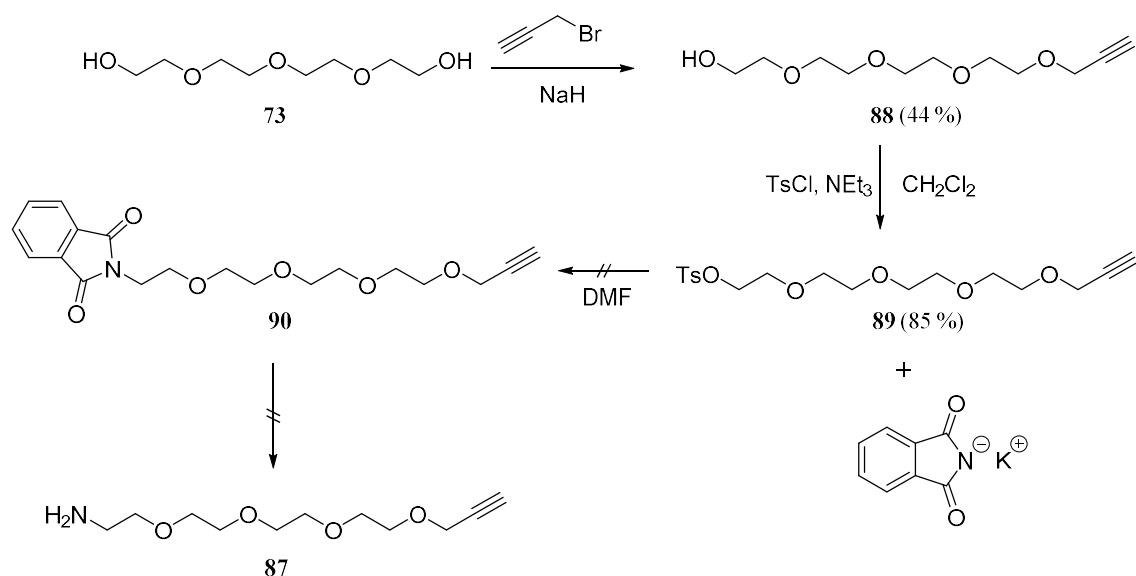


Abb. 44: Versuch der reinen Darstellung de PEG-Derivats **87**.

Die Reduktion von **85** mit Palladium/Kohle und gleichzeitiger Schützung der entstandenen Aminogruppe mit Di-*tert*-butyldicarbonat wurde mit 32 % Ausbeute durchgeführt (Abb. 45). Anschließend erfolgte die Umsetzung der aktivierten Alkoholgruppe in **91** mit Natriumhydrid und Propargylalkohol zum gewünschten Alkin **92** mit 92 % Ausbeute. Die Schutzgruppe wurde mittels Triflouressigsäure mit 89 %iger Ausbeute abgespalten und das Lösemittel i.Vak. entfernt, um das gewünschte Linkersystem **87** zu erhalten. Die Gesamtausbeute ausgehend von **73** ist mit 6 % über 5 Synthesestufen sehr gering.

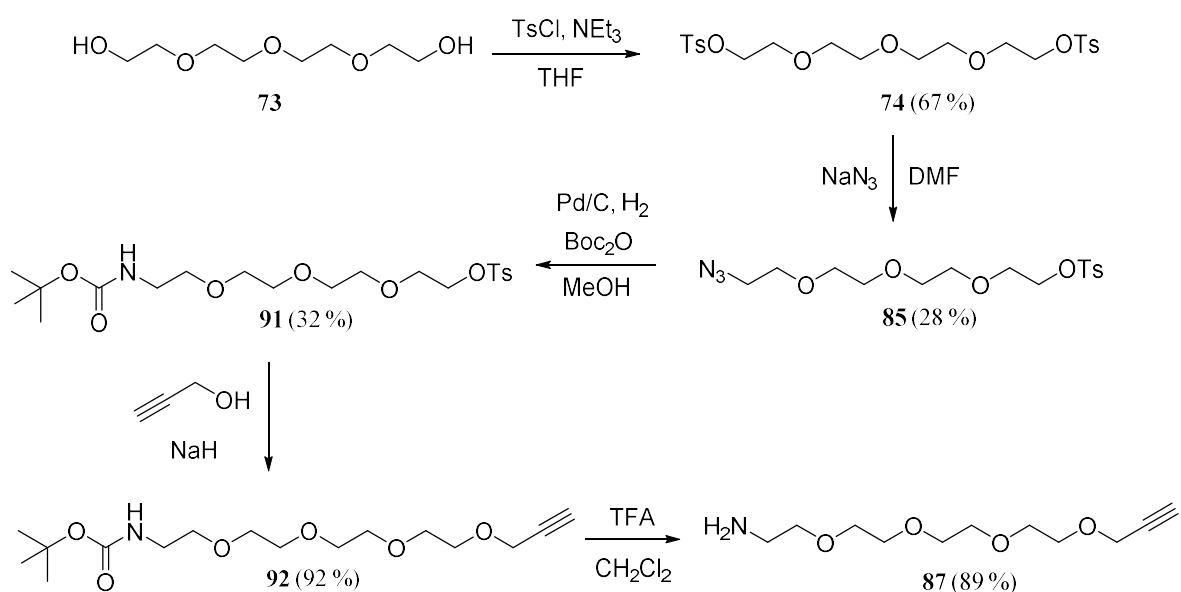


Abb. 45: Erfolgreiche Synthese des Linkersystems für die Anbindung an Folsäure **7**.

Ebenfalls wurde versucht, **92** aus der Azidverbindung **84** herzustellen. Hierfür wurde **84** mit Palladium/Kohle und gleichzeitiger Schützung der entstandenen Aminogruppe mit Di-*tert*-butyldicarbonat in 49 % Ausbeute zu **93** umgesetzt. Die anschließende Umsetzung des Alkohols mit Natriumhydrid und Propargylbromid blieb jedoch erfolglos (Abb. 46).

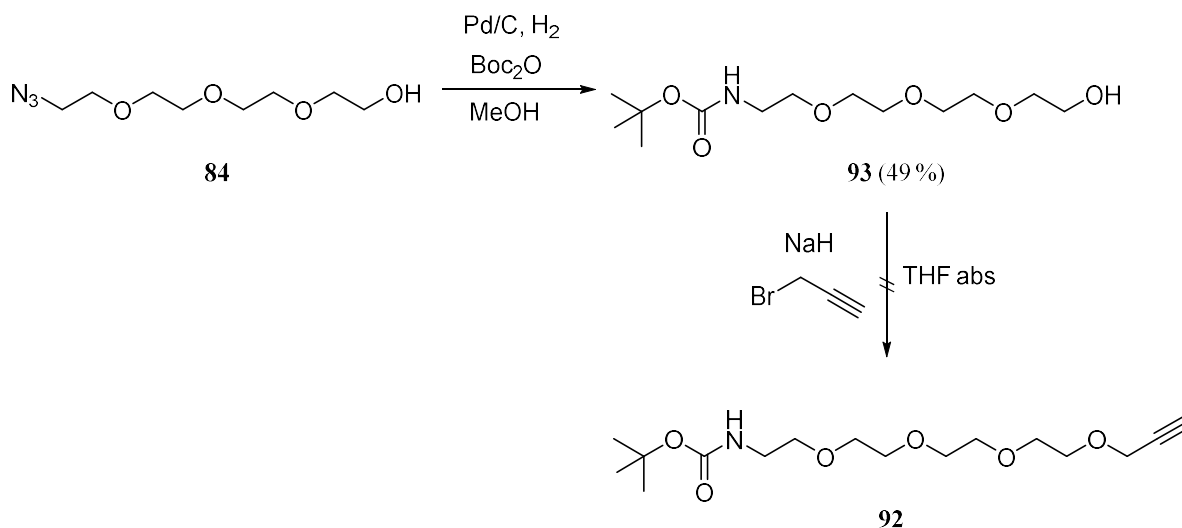


Abb. 46: Versuch der Darstellung von **92** ausgehend von **93**.

Da Folsäure zwei Carbonsäuren trägt und eine selektive Funktionalisierung auch nicht über die Anzahl der Äquivalente gesteuert werden kann, bekommt man eine Produktmischung aus mono- und difunktionalisierten Folsäurederivaten. Bei der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie wurden das disubstituierte Folsäurederivat und Folsäure erhalten. Das monosubstituierte Derivat konnte nicht isoliert werden.

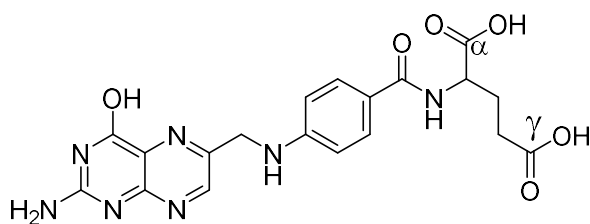


Abb. 47: Folsäure 7.

In der Literatur existieren widersprüchliche Aussagen über die Wirkungsweise von Folsäure, die entweder über die α - oder γ -Carbonsäuregruppe der in Folsäure enthaltenen Glutaminsäure angebunden ist (Abb. 47).^[60, 89] Es gibt Hinweise, dass es keinen Einfluss auf den Bindemechanismus hat, wenn beide Carbonsäuren gebunden werden.^[195-196] Stallivieri *et al.*

berichten jedoch, dass eine Anbindung über die α -Carbonsäure dazu führt, dass Folsäure nicht an den Rezeptor binden kann und somit eine gezielte Einschleusung in die Zelle ausbleibt.^[90]

3.2.1.5 Aufbau des Folsäurekonjugats **82**

Daher wurde dazu übergegangen, die Folsäure **7** zur Pteroinsäure **95** abzubauen, um dann gezielt eine Glutaminsäure, deren α -Carbonsäure geschützt ist, anzubinden (Abb. 48). Dies gelang nur mit 17 % Ausbeute, da die Umkristallisation von **96** sehr langsam und nicht vollständig erfolgte.

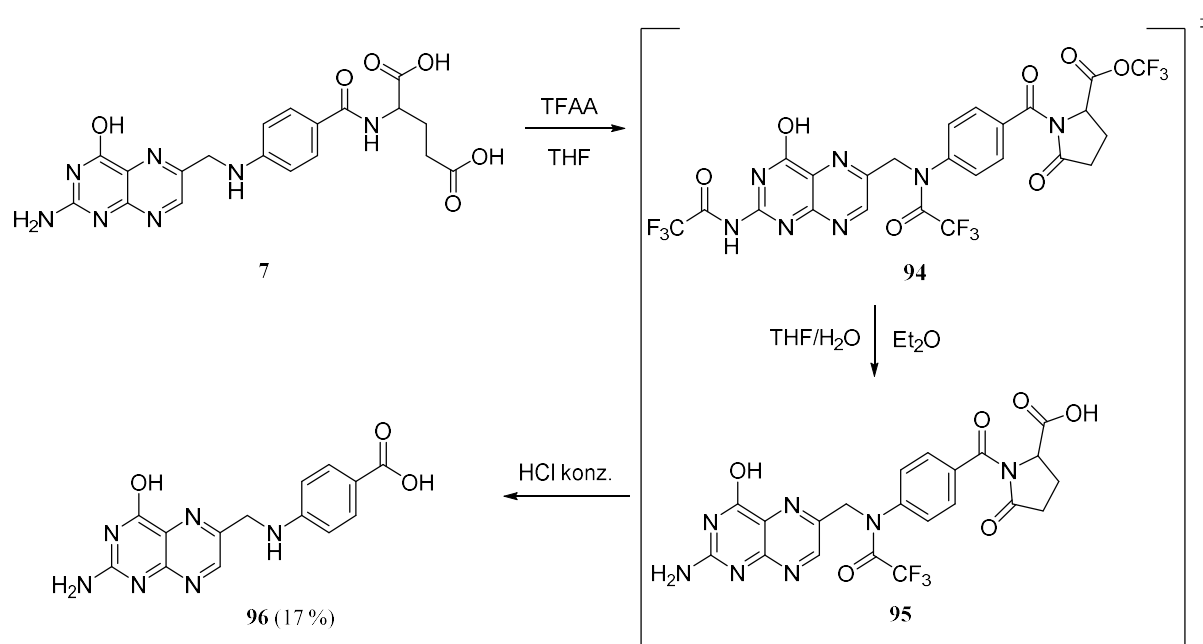


Abb. 48: Abbau der Folsäure **7** zur Pteroinsäure **96**.

Anschließend wurde die α -Carbonsäure der geschützten Glutaminsäure **97** durch einen Methoxyrest geschützt, die Umsetzung von **97** mit Dimethylsulfat lieferte **98** in 71 %iger Ausbeute. Daraufhin wurde die γ -Carbonsäure mittels Trifluoressigsäure in 75 %iger Ausbeute entschützt und **98** über HBTU und DIPEA an das synthetisierte Alkinderivat **87** angebunden (Abb. 49). Die nachfolgende Entschützung von **100** wurde ohne weitere Aufarbeitung mittels frisch destillierten DBU durchgeführt und schlug fehl. Daraufhin wurde die Anbindung von **87** an Folsäure durchgeführt und das disubstituierte Produkt erhalten.

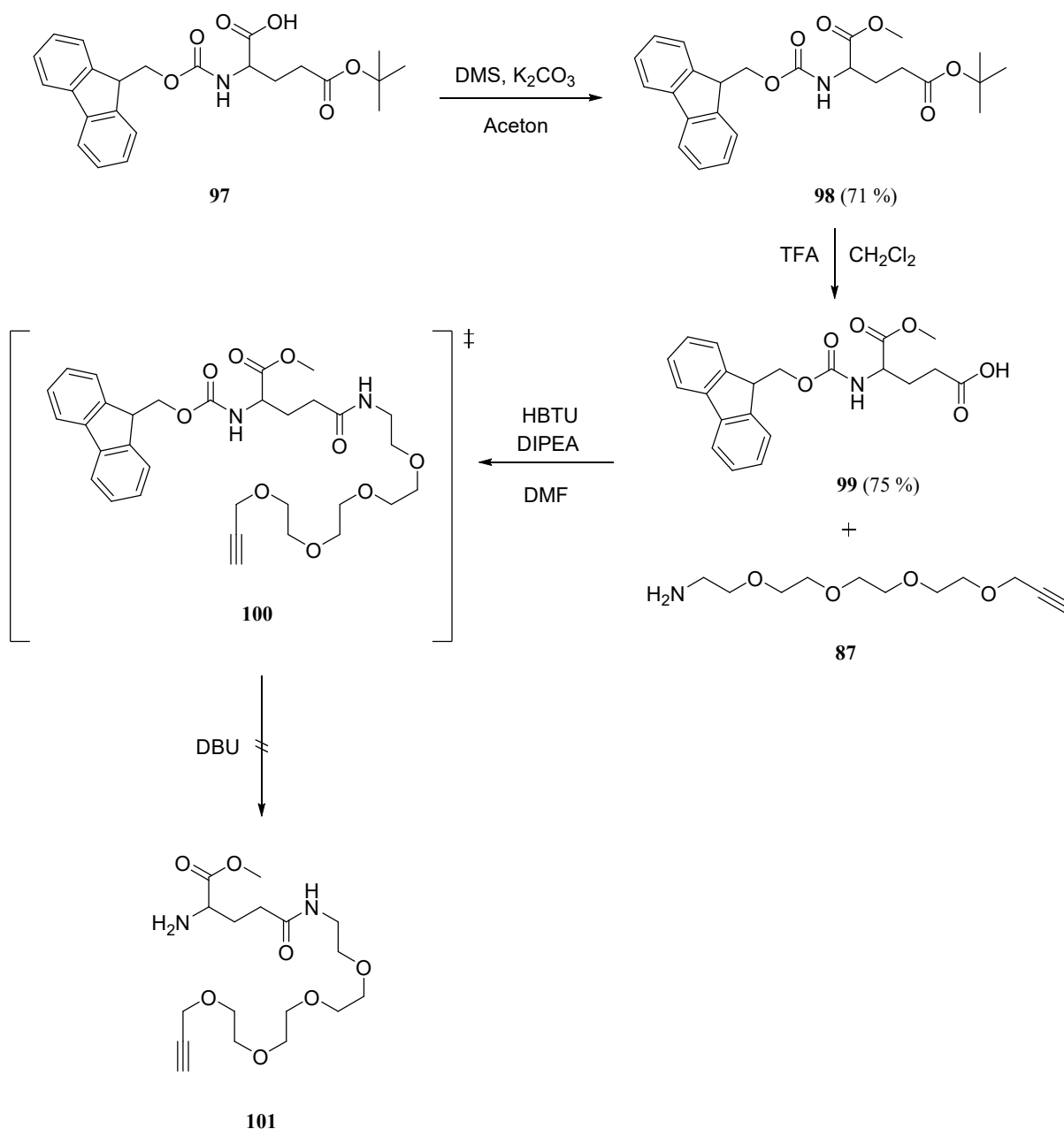


Abb. 49: Umschüttung der Glutaminsäure **97** und anschließende Kupplung mit **87**.

3.2.1.6 Anbindung des Linkers **87** an Folsäure **7**

Andere Gruppen wiederum gehen davon aus, dass, wenn beide Carbonsäurefunktionen gebunden sind, es keinen Einfluss auf den Bindemechanismus hat und die erhaltenen Resultate deren Versuchsreihen belegen dies.^[195-196] So wurde die direkte Funktionalisierung beider Carbonsäuren durchgeführt, was auch Gegenstand dieser Arbeit ist.

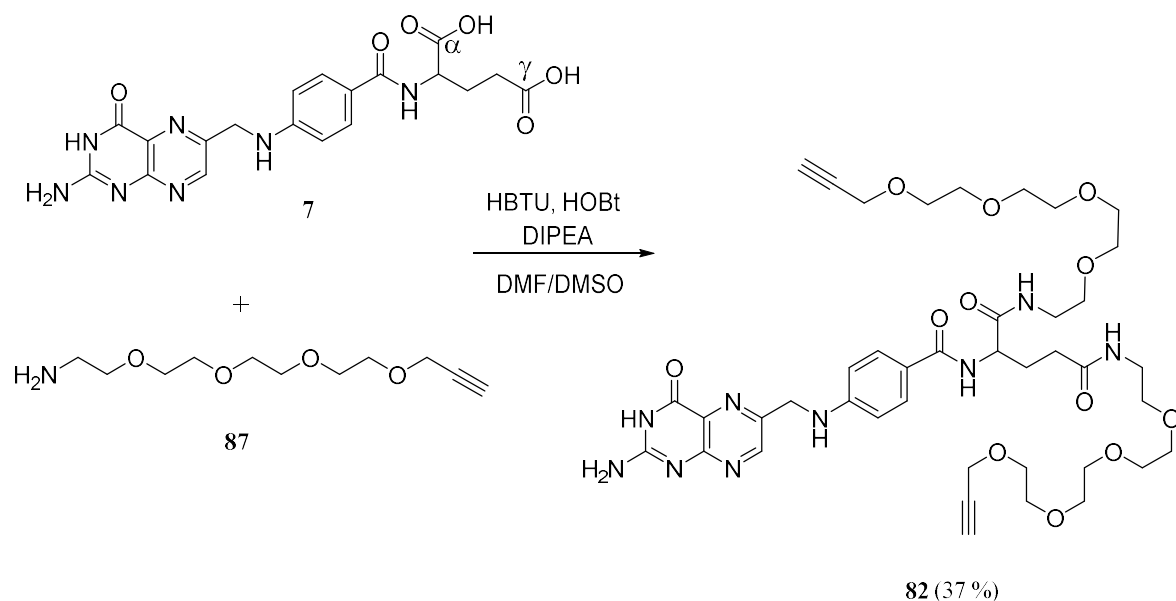


Abb. 50: Zweifache Funktionalisierung der Folsäure **7** mit **87**.

Folsäure **7** wurde über die Kupplungsreagenzien 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) an das synthetisierte Amin **87** angebunden (Abb. 50). Die Ausbeute hierbei betrug 37 %, da bei der Reaktion auch die monosubstituierten Derivate entstehen, die aber durch die Aufreinigung nicht rein isoliert werden konnten.

Nun wurden **81** und **82** in einer Clickreaktion miteinander zur Reaktion gebracht (Abb. 51).

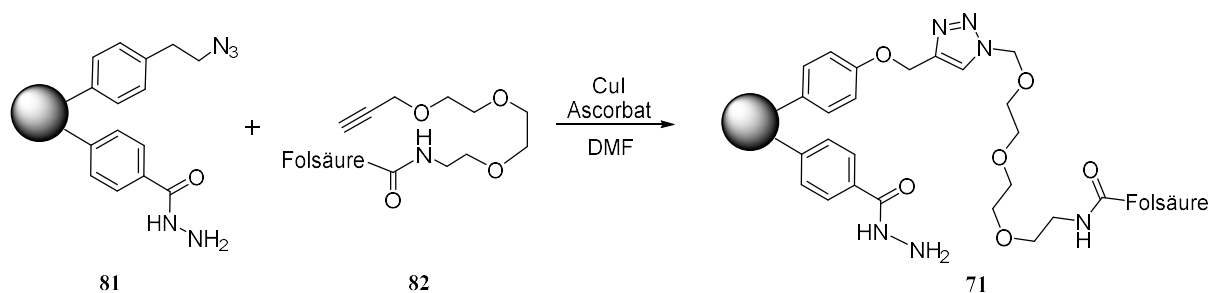


Abb. 51: Funktionalisierung des Nanodiamant-Konjugates **81** mit dem Folsäurederivat **82**.

Diese verlief problemlos. Die Teilchengröße von 90 % der Partikel lag bei 200 nm und das Zetapotential betrug +21.3 mV. Vergleicht man nun die aufgenommenen FT-IR-Spektren von **81** und **82** mit **71**, so erkennt man, dass die Azidbande bei 2104 cm^{-1} nicht mehr vorhanden ist, was für eine erfolgreiche Anbindung über „Click-Chemie“ spricht. Zudem sind Banden der

Ethylenschwingung bei 1097 cm^{-1} aus **82** in **71** sichtbar, was ebenfalls für eine erfolgreiche Funktionalisierung spricht (Abb. 52).

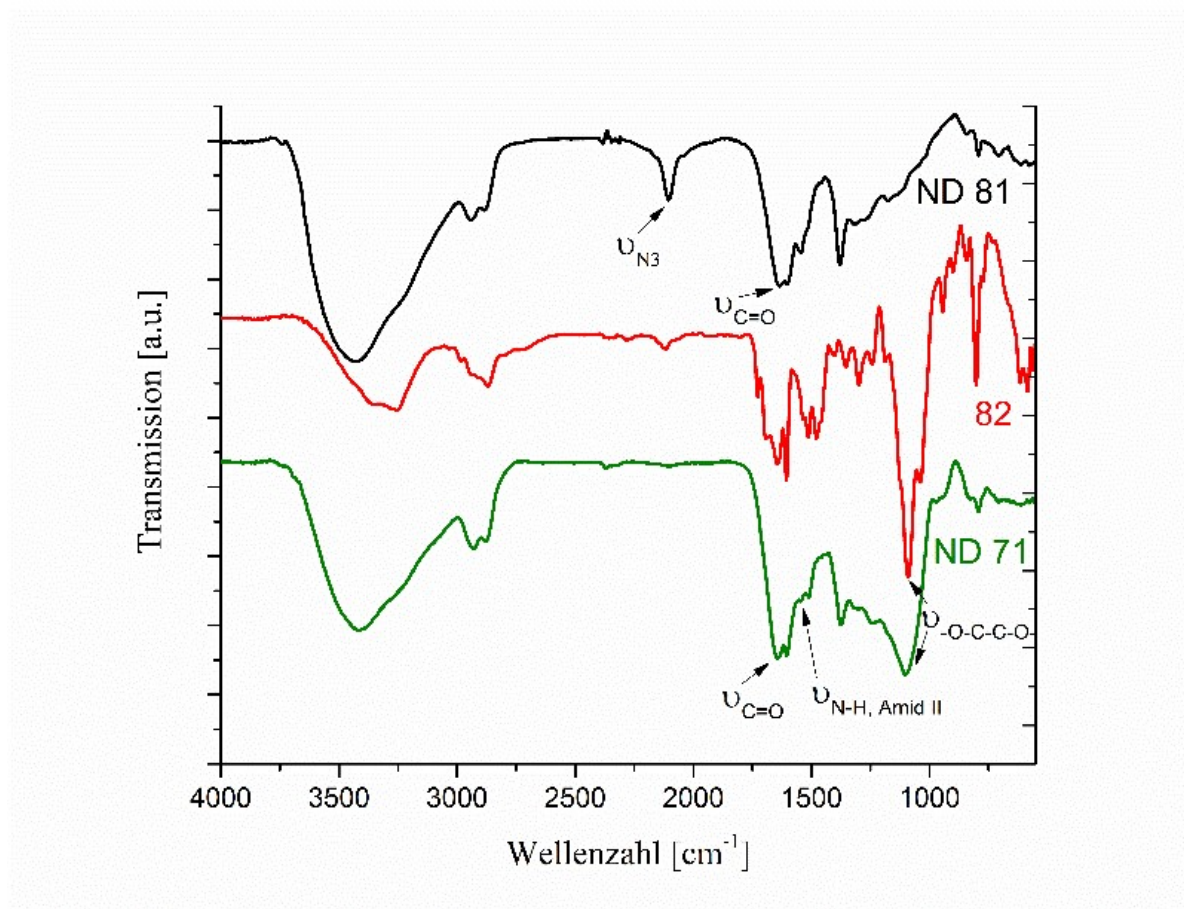


Abb. 52: Vergleich der FT-IR-Spektren der Nanodiamantsysteme **81** und des Produktes **82** mit **71**.

3.2.1.7 Anbindung von Doxorubicin **8** an die Nanodiamantsysteme **71** und **102**

Für den Vergleich der unterschiedlichen Zellaufnahme über die Zellrezeptoren durch die Anbindung von Folsäure wurde ein System aufgebaut, das nur Doxorubicin über Hydrazon angebunden trägt. So wurde Nanodiamant mit 4-Aminobenzoesäure funktionalisiert, die Säurefunktion zum Hydrazid über Hydrazinhydrat und EDC/NHS umgesetzt und anschließend Doxorubicin angebunden (Abb. 53).

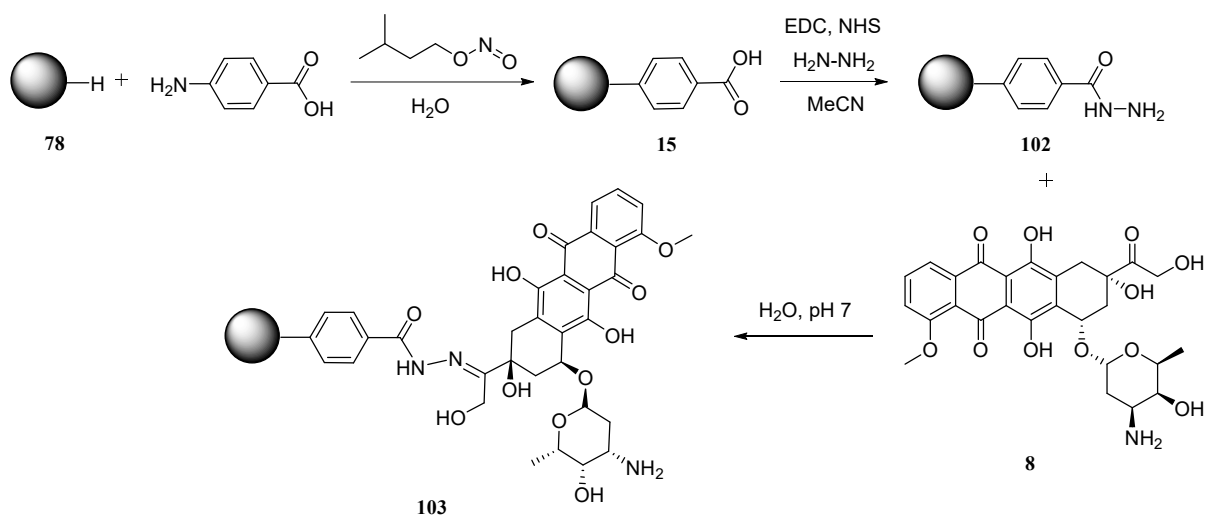


Abb. 53: Synthese des Nanodiamant-Konjugats **103**.

Ebenfalls wurde Doxorubicin **8** über das Hydrazon kovalent an das Nanodiamantsystem **71** angebunden (Abb. 54). Nach 24 h Rühren der Nanodiamant-Suspension **72** bei pH = 7 und 50 °C wurden die erhaltenen Konjugate mit Wasser, welches mit 25%iger Ammoniaklösung auf pH= 8 eingestellt wurde, gewaschen, bis kein Doxorubicin **8** mehr im Überstand über UV-Vis-Spektrometrie detektiert wurde.

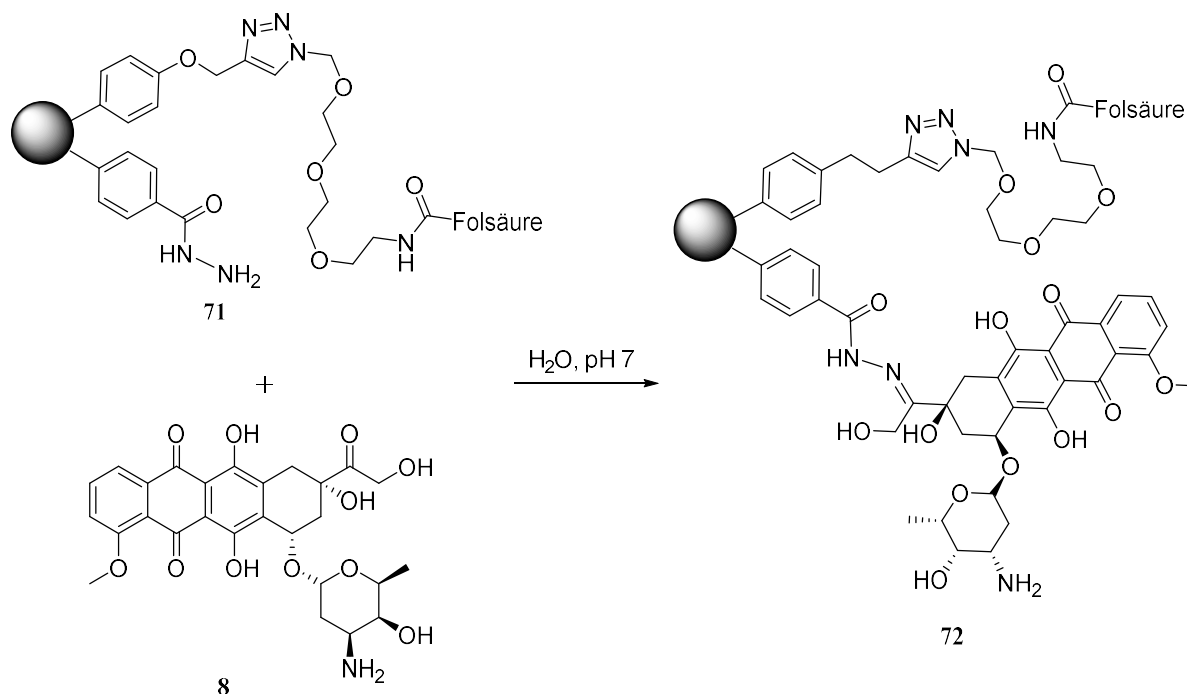


Abb. 54: Anbindung von Doxorubicin **8** an Nanodiamant-Konjugat **71**.

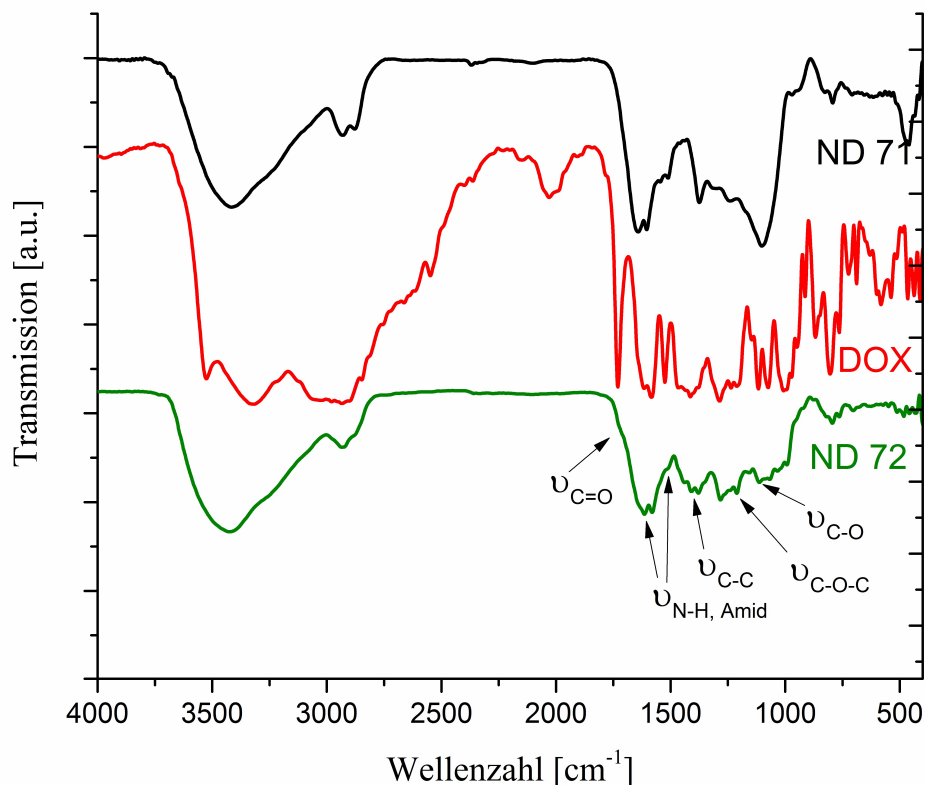


Abb. 55: Vergleich der FT-IR-Spektren von ND **71** und DOX **8** mit ND **72**.

Vergleicht man nun die FT-IR-Spektren beider Systeme **71** und **72** miteinander, so sind die Schwingungen des Konjugates **71** sowie die des Wirkstoffes **8** zu erkennen (Abb. 55). Die Amidschwingungen haben sich verschoben und resultieren aus **8** bei 1614 cm^{-1} und 1515 cm^{-1} . Die Carbonylschwingung des Doxorubicins bei 1722 cm^{-1} findet sich auch im Konjugat **72** wieder. Die C-O-C-Streckschwingung bei 1288 cm^{-1} , die C-C-Schwingung bei 1415 cm^{-1} und die C-O-Schwingung bei 1111 cm^{-1} weisen alle auf eine erfolgreiche Anbindung von Wirkstoff **8** hin.

Die aufgenommenen UV/Vis-Spektren der ND-Konjugate **71** und **72** zeigen ebenfalls eine erfolgreiche Funktionalisierung (Abb. 56). **71** zeigt keinerlei UV-Aktivität, wohingegen **72** klar die UV-Vis-Absorption des Wirkstoffes **8** aufweist.

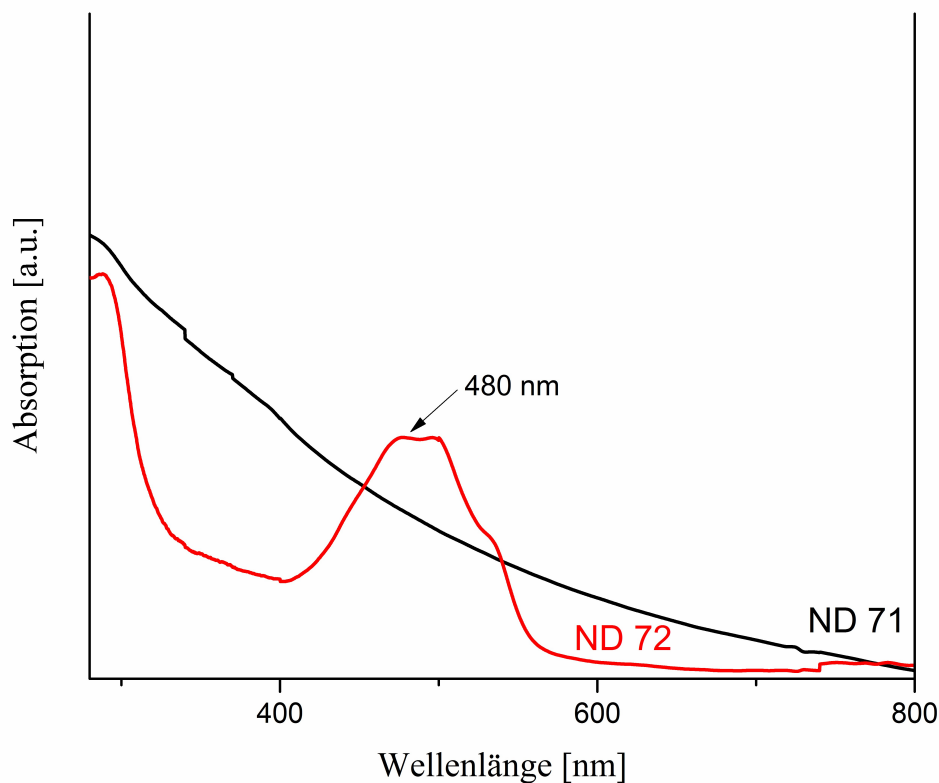


Abb. 56: UV/Vis- Spektren der ND-Konjugate **71** und **72**. Die Absorption von Doxorubicin ist bei 480 nm klar erkennbar.

Da viele Tumorzellen bekannterweise Folatrezeptoren auf ihrer Oberfläche überexprimieren, wurde das Nanodiamantsystem **81** mit dem Folsäurederivat **82** über eine Clickreaktion versehen und es wurde das Nanodiamantsystem **71** erhalten.^[138-139] Anschließend wurde kovalent über die Hydrazidfunktion Doxorubicin **8** angebunden. Die Erwartung an dieses Gesamtsystem **72** ist, dass der Wirkstoff Doxorubicin **8** über die Folatrezeptoren vermehrt in die Zelle aufgenommen und im Tumorgewebe angereichert werden kann. Dort soll der Wirkstoff **8** dann pH-gesteuert und lokal konzentriert freigesetzt werden.

3.2.1.8 Anbindung von Doxorubicin **8** an Hydrazinderivat **104**

Um zu zeigen, dass das gewünschte System **103** mit einer Anbindung über das Hydrazid vorliegt, wurde die Kontrollsubstanz **105** hergestellt.

Hierbei wurde Benzoesäure **34** erst zum Methylester und anschließend *in situ* zum Hydrazid **104** umgesetzt. Die Verbindung wurde nach der Isolierung in Methanol gelöst und unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur 24 Stunden mit **8** und einer katalytischen Menge Trifluoressigsäure gerührt. Nach anschließender Umkristallisation wurde Hydrazon **105** erhalten (Abb. 57). Dieses System soll verdeutlichen, dass Doxorubicin **8** über die funktionelle Gruppe des Hydrazids und nicht über eine andere funktionelle Gruppe angebunden wird.

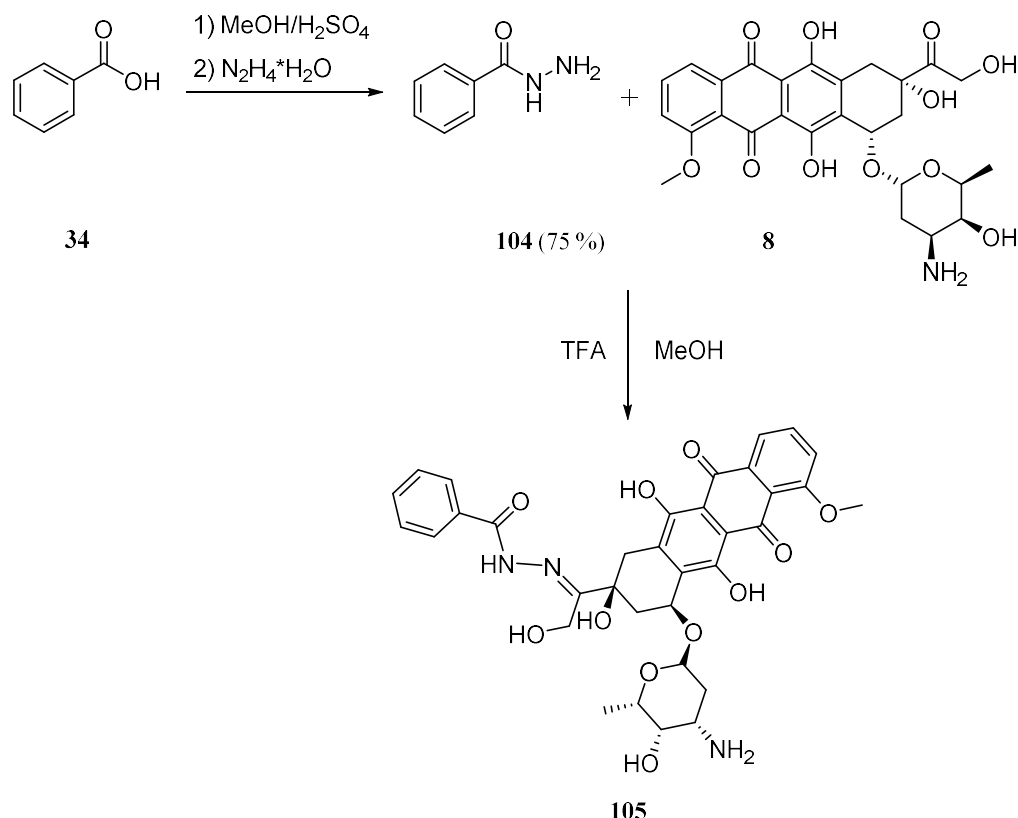


Abb. 57: Synthese der Kontrollverbindung **105**.

Mit dem System **103** wurden nun Freisetzungsversuche durchgeführt und die Wirkstoffmenge mittels Absorption in der UV-Vis-Spektroskopie detektiert. Als Vergleichssystem wurde das Nanodiamant-Konjugat **106** der Gruppe um Dean Ho herangezogen und nach deren Vorschrift hergestellt, nach der Doxorubicin **8** über die Änderung des pH-Wertes an Nanodiamant **65** physisorbiert wurde, wobei die Partikel aggregieren (Abb. 58).^[52]

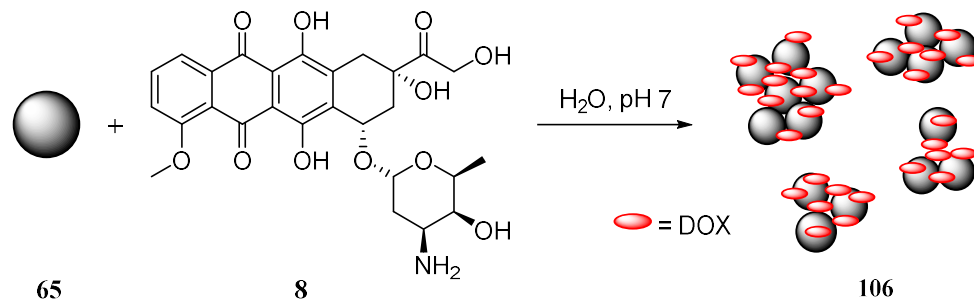


Abb. 58: Adsorption von Doxorubicin **8** an Nanodiamant **65**.

3.2.1.9 Freisetzung von Doxorubicin **8** der unterschiedlichen Nanodiamant-Konjugat-Systeme **103** und **106**

Um eine pH-Wert-abhängige Freisetzung zu zeigen, wurden die Nanodiamantkonjugate **103** und **106** mit PBS-Puffern, die unterschiedliche pH-Werte (4.6 und 7.4) aufweisen, vermischt und nach bestimmten Zeitabständen die Freisetzung des DOX **8** mittels UV/Vis-Spektroskopie gemessen. Hierfür wurde die Probe bei 10000 rpm für 5 min. zentrifugiert, der Überstand abgenommen und im UV/Vis-Spektrometer vermessen. Der Rückstand wurde erneut mit PBS-Puffer des jeweiligen pH-Wertes versetzt, redispergiert und nach einer bestimmten Zeit wiederum zentrifugiert, um den Gehalt an freigesetztem Wirkstoff **8** im abgenommenen Überstand zu vermessen. Diese Prozedur wurde so lange wiederholt, bis keine nennenswerten Mengen an **8** im Überstand UV-spektroskopisch detektiert werden konnten.

Die Freisetzungsdaten wurden in folgender Grafik zusammengestellt. Wie erwartet, wurde unabhängig davon, ob **103** oder **106** untersucht wurde, eine pH-Wert-abhängige Freisetzung beobachtet. Bei pH 4.6 wurde bei beiden untersuchten Nanodiamant-Konjugaten eine höhere Freisetzung von **8** gemessen als bei pH 7.4 (Abb. 59).

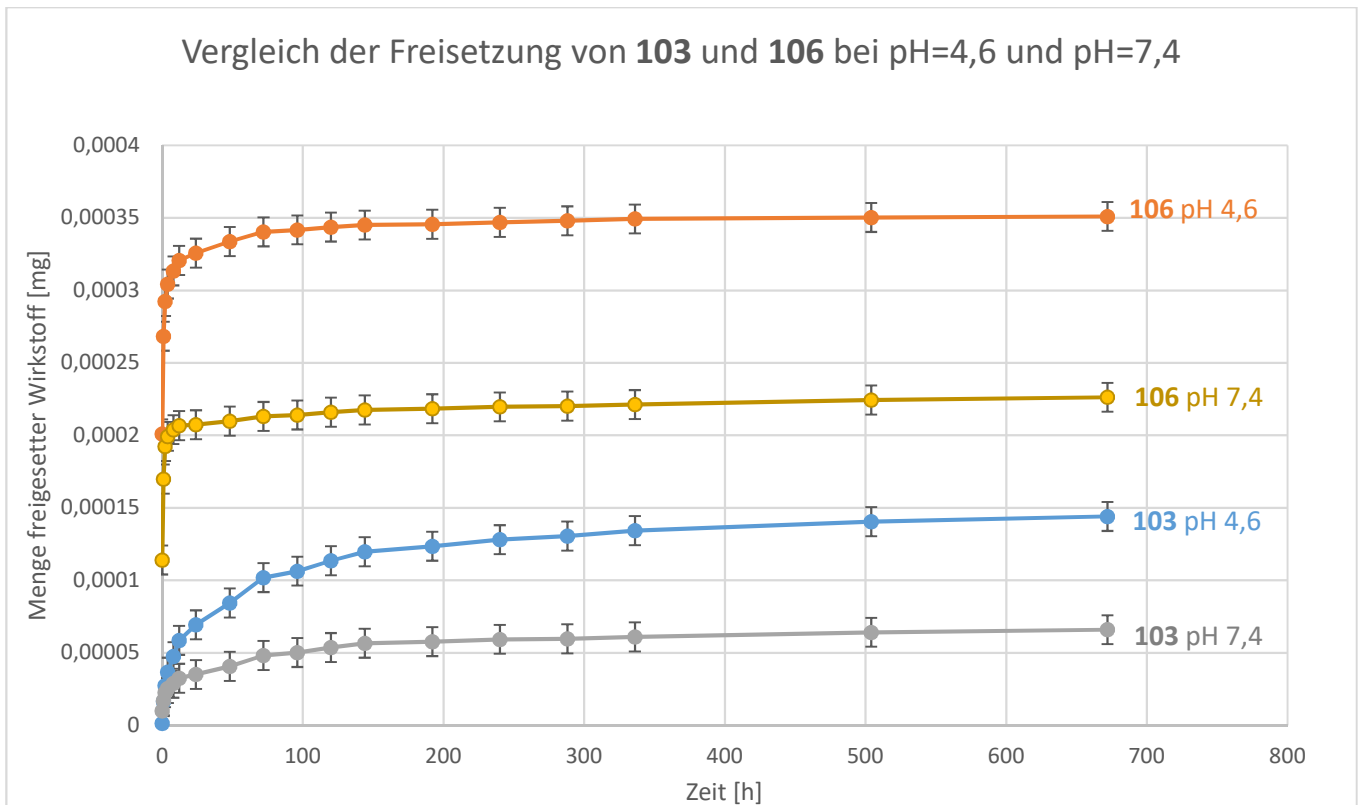


Abb. 59: Vergleich der Freisetzung von ND-DOX **103** und DOX adsorbiert **106** bei pH 4.6 und 7.4.

Das nicht-kovalent angebundene Konjugat **106** setzte direkt eine große Menge Wirkstoff **8** bei beiden pH-Werten frei, jedoch nähert es sich schnell einem Minimum an (Abb. 60 und Abb. 61). Diese Freisetzung zeigt, dass der Wirkstoff nicht-kovalent an Nanodiamant adsorbiert ist und der Hauptteil in den ersten Stunden freigesetzt wird.

Das kovalent angebundene Doxorubicin wurde langsam und gleichmäßig über mehrere Stunden und Wochen abgegeben. Die Freisetzung bei pH = 4.6 lag wie erwartet höher als bei pH = 7.4. Nach vier Wochen wurde die Versuchsreihe beendet, obwohl noch kein Abfall der freigesetzten Menge ersichtlich war (Abb. 60 und Abb. 61).

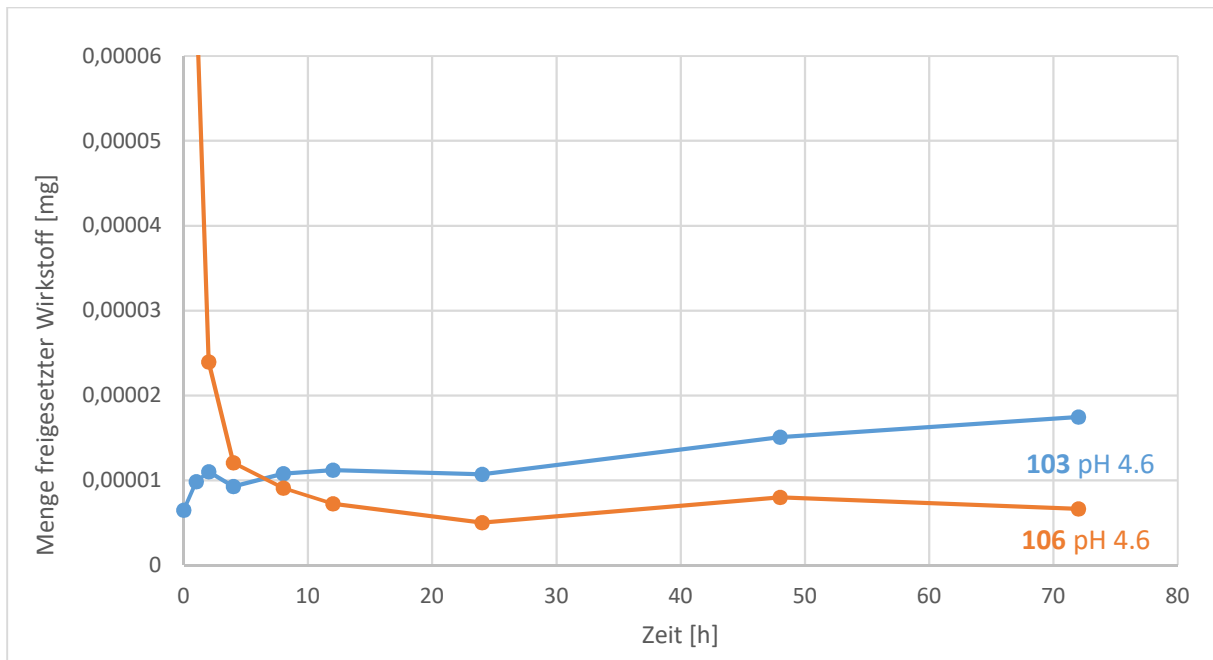


Abb. 60: Vergleich der Einzelmengen der Freisetzung von ND-DOX **103** und DOX adsorbiert **106** bei pH = 4.6 nach unterschiedlichen Zeitpunkten.

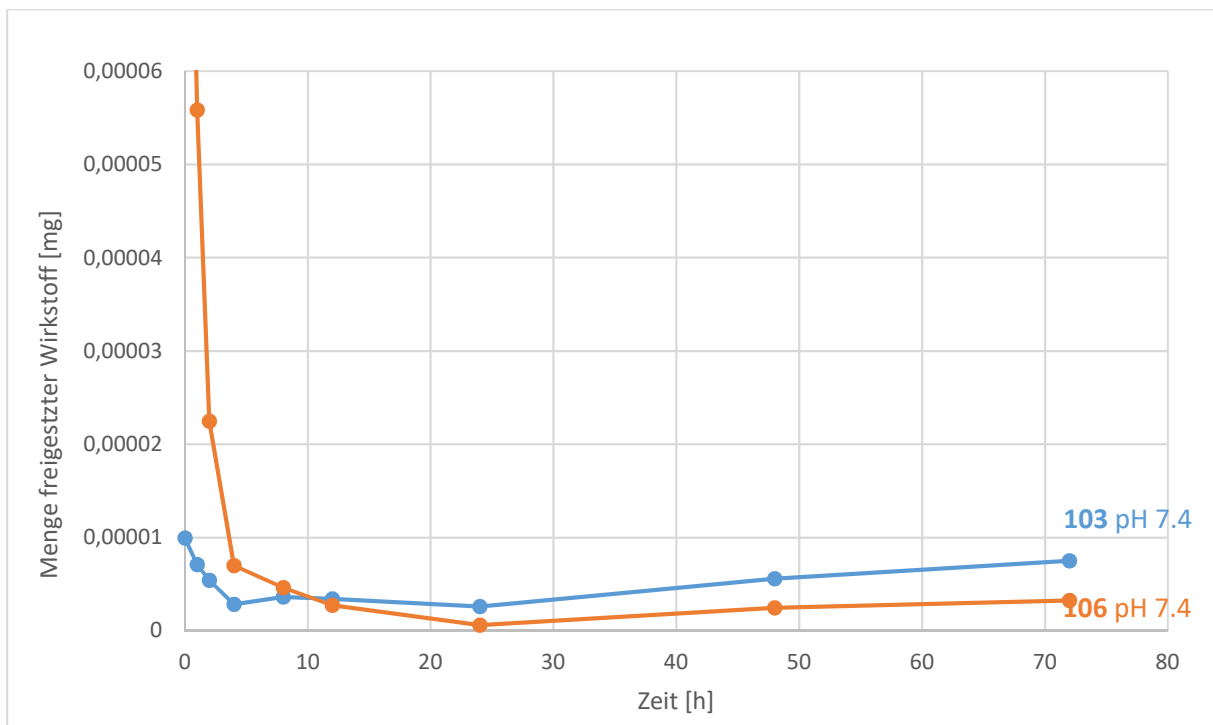


Abb. 61: Vergleich der Einzelkonzentrationen des Release von ND-DOX **103** und DOX adsorbiert **106** bei pH = 7.4.

Auch ein optischer Hinweis für die abnehmende Beladung der ND-Konjugate ist vorhanden. In Abb. 62 ist zu erkennen, dass die Partikel des nicht-kovalent-gebundenen Konjugates **106** schon deutlich ausbleichen verglichen mit dem konjugierten System **103**, wo die rote Farbe des Wirkstoffs noch deutlich zu erkennen ist. Die Lagerung der Proben war zu jedem Zeitpunkt gleich, so dass dies keinen Einfluss auf das Bleichen hat.

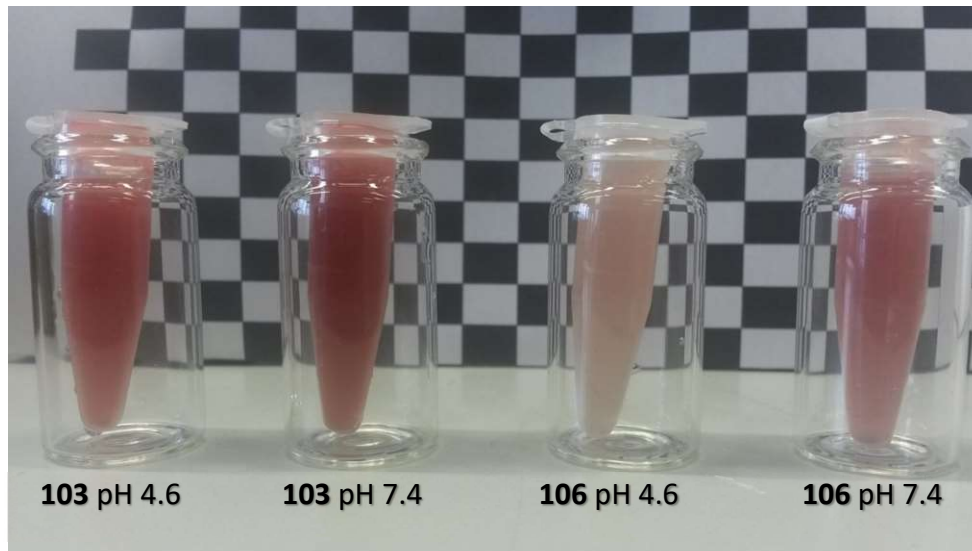


Abb. 62: Die Proben **103** und **106** bei verschiedenen pH-Werten im Vergleich nach 4 Wochen. Das Lösungsmittel war PBS-Puffer.

Unsere Kooperationspartner in Bergen haben sich bereit erklärt, Zell- und Toxizitätstests der erhaltenen Konjugate **103** durchzuführen (Abb. 63). Hierbei führten sie Viabilitätstests in drei unterschiedlichen Konzentrationen (0.02 mg/L, 0.20 mg/L, 2.00 mg/L) mit Knochenzellen des Typs saos2 durch, um zu erkennen, welche Konzentration benötigt wird, dass die Zellen die Apoptose einleiten. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um proliferierende Zellen des Osteosarkoms, die das Folat-Carrier-Protein exprimieren.^[197] Das Wachstum der Zellen nahm jedoch eher zu, als das sie zu grunde gingen. Bei den beiden niedrigsten Konzentrationen zeigten alle Partikel, die untersucht wurden (**65**, **72**, **81**, **102**, **103**) eine gleichmäßige Überlebensrate. Ab einer Konzentration von 2.00 mg/L zeigten sich erste Unterschiede. So wies **81** die stärkste Einschränkung auf und es überlebten nur noch 70 % der Zellen. Dies ist aufgrund der freien Azidfunktion nicht verwunderlich, da Azide als Zellgift wirken und unweigerlich zum Zelltod führen können.^[198] Auch die Nanopartikel **102** zeigten bei höheren Konzentrationen eine Apoptoseneigung. So lag ihre Viabilität nur bei 79 %. Die Verbindungen **72** und **103** wiesen eine Zellviabilität von 89 % und 88 % auf, und zeigten bei allen

Konzentrationen keine nennenswerten Apoptoseeigenschaften, so wie die Ausgangsverbindung **65** ebenfalls eine gute Viabilität von 91% lieferte. Zusammenfassend zeigen alle Verbindungen eine konzentrationsabhängige Abnahme des Überlebens der Zellen.

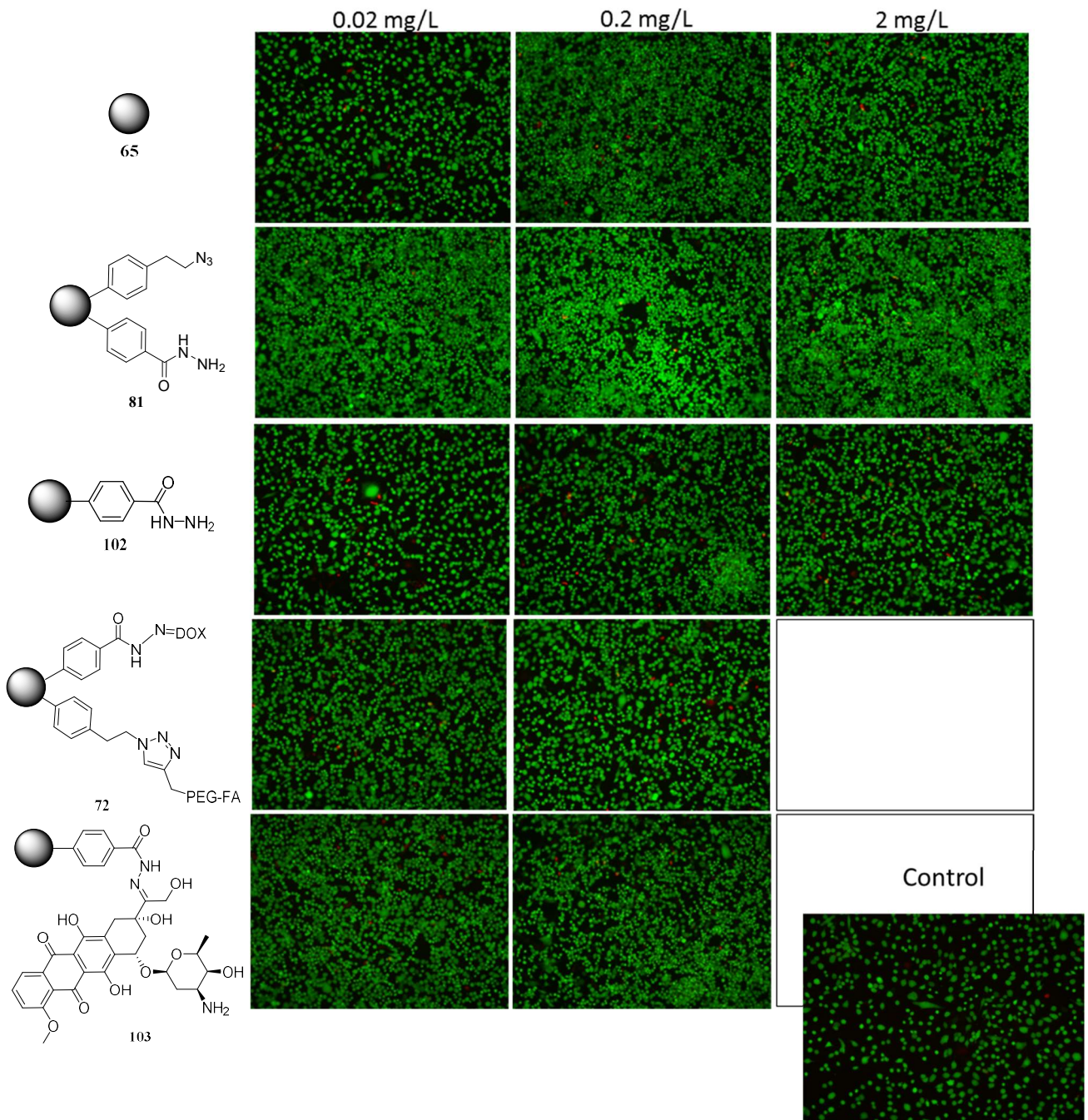


Abb. 63: Live (grün) Dead (rot) Stain des Zellviabilitätstests an Knochenzellen des Typ saos2 mit den Verbindungen **65**, **72**, **81**, **102** und **103**. Eine Konzentration von 2 mg/L konnte bei Verbindungen **72** und **103** nicht gemessen werden.

Desweiteren sollten noch Versuche mit höheren Konzentrationen durchgeführt werden, um eine genauere Differenzierung der Zellviabilitäten, die von den genannten Verbindungen verursacht werden, untersuchen zu können.

3.2.2 Anwendung der Nanodiamantsystem 71 und 102 auf weitere Keton-derivate

3.2.2.1 Anbindung von Ketonderivat 107 an Nanodiamantsystem 71 und 102

Um die hergestellten Nanodiamantsysteme **71** und **102** auch an anderen Zellen oder auch die Wirkung gegen Bakterien zu testen, wurde diese mit anderen Wirkstoffen versehen.

So wurde im Labor von Frau *Prof. Tanja Schirmeister* in Mainz von Herrn *Sascha Jung* ein Ketonderivat **107** hergestellt, welches an die Konjugate **71** und **102** angebunden wurde und auf seine Wirkung auf Trypanosomen untersucht wurde.

Trypanosomen sind Parasiten und rufen die Afrikanische Schlafkrankheit hervor.^[199] Überträger dieser Krankheit mit schwerem Verlauf sind hauptsächlich Tsetsefliegen, die über einen Stich die Trypanosomen in die Blutbahn einbringen.^[200] Hierbei wird hauptsächlich zwischen zwei Unterarten entschieden, den *Trypanosoma brucei gambiense* (Erreger der Westafrikanischen Schlafkrankheit) und den *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Erreger der Ostafrikanischen Schlafkrankheit).^[201] Wie auch Malaria ist diese Tropenkrankheit regional unterschiedlich stark verbreitet und kommt überwiegend in den afrikanischen Tropen vor. Der Krankheitsverlauf ist von dem auslösenden Erreger abhängig, bei der *Gambiense*-Unterart ist er langsamer, bei der *Rhodesiense*-Art ist er schneller und extremer. Es treten drei Krankheitsphasen auf. Das erste Stadium umfasst die Aufnahme des Parasiten ins Gehirn.^[202] Nach einigen Wochen treten Symptome wie Fieber, Schüttelfrost, Kopf- und Gliederschmerzen, Juckreiz und Lymphknotenschwellung auf. Besonders auffällig ist ein erhöhter Antikörperspiegel. Phase zwei tritt nach einigen Monaten ein, wobei der Patient Verwirrungszustände, Krampfanfälle, Koordinations- und Schlafstörungen sowie Apathie aufweist. Diese Symptome treten auf, wenn der Parasit ins Zentralnervensystem eingedrungen ist. Im Endstadium ist im Liquor eine Zellvermehrung der Granulozyten zu beobachten und der Patient fällt in einen Dämmerzustand; der Krankheitsverlauf endet tödlich. In den letzten Jahren

ist die Zahl der Erkrankungen gestiegen und es sind Medikamente entwickelt worden, die unterschiedliche Targets in der Zelle ansprechen.^[203-204]

Das Ketonderivat **107** stellt ein Modellmolekül für einen späteren Inhibitor dar und besteht aus einer Linkerkette mit einem „Warhead“, der die funktionelle Gruppe darstellt, die die aktive Bindung, auch später im Inhibitor, zum Rezeptor ausführt. Der Inhibitor soll dann in den Zellen Rhodesain, eine Cysteinprotease, inhibieren. Durch diese Inhibierung wird der Übertritt der Blut-Hirn-Schranke durch die Parasiten verhindert.^[205-207]

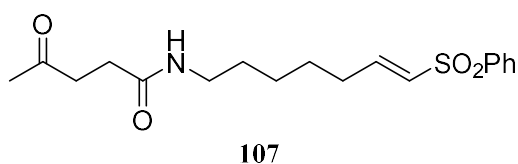


Abb. 64: Ketonderivat **107** zur kovalenten Anbindung an die Nanodiamantsysteme **71** und **102**.

Das Nanodiamantsystem **102** wurde mit **107** bei pH = 7 zur Ausbildung des Hydrazons 24 Stunden in einem Ethanol/Wasser-Gemisch gerührt (Abb. 65). Da sich das Ketonderivat aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften schlecht in Wasser löst, wurde Ethanol zur Lösungsvermittlung zugegeben.

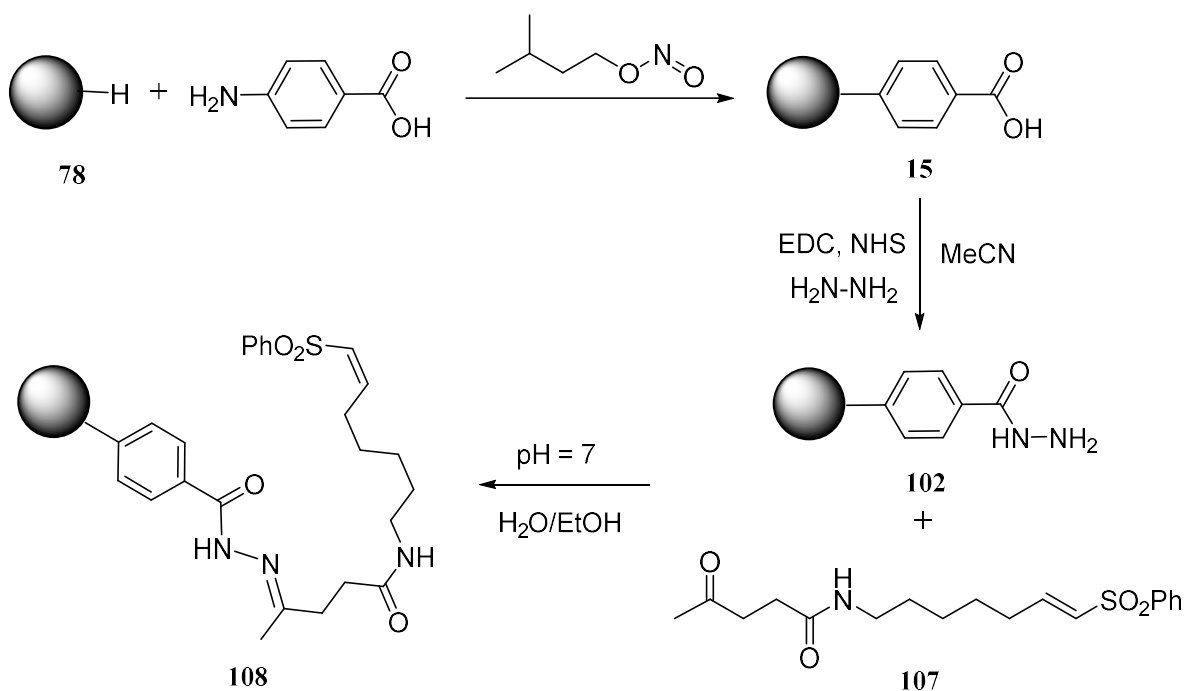


Abb. 65: Herstellung des funktionalisierten Nanodiamant-Konjugats **108**.

Nach 24 Stunden Rühren bei 50 °C wurde die Suspension mehrmals mit Wasser/Ethanol gewaschen, wobei das Gemisch mit 25 %iger Ammoniaklösung auf pH = 8 eingestellt wurde. Das erhaltene Konjugat wurde zur weiteren Testung an Trypanosomen an Frau *Annika Wagner* in Mainz versandt.

Vergleicht man nun die aufgenommenen FT-IR-Spektren der Nanodiamant-Konjugate **102**, **107** und **108** miteinander, so erkennt man eine erfolgreiche Funktionalisierung (Abb. 66). Die Valenzschwingungen der gesättigten Kohlenstoffe bei 2933 cm^{-1} und 2866 cm^{-1} , wie auch die Sulfonylgruppenschwingung bei 1142 cm^{-1} belegen dies. Ebenfalls sind Valenzschwingungen der aromatischen Kohlenwasserstoffe bei 1412 cm^{-1} sowie eine Deformationsschwingung der Amidfunktionen bei 1304 cm^{-1} zu erkennen.

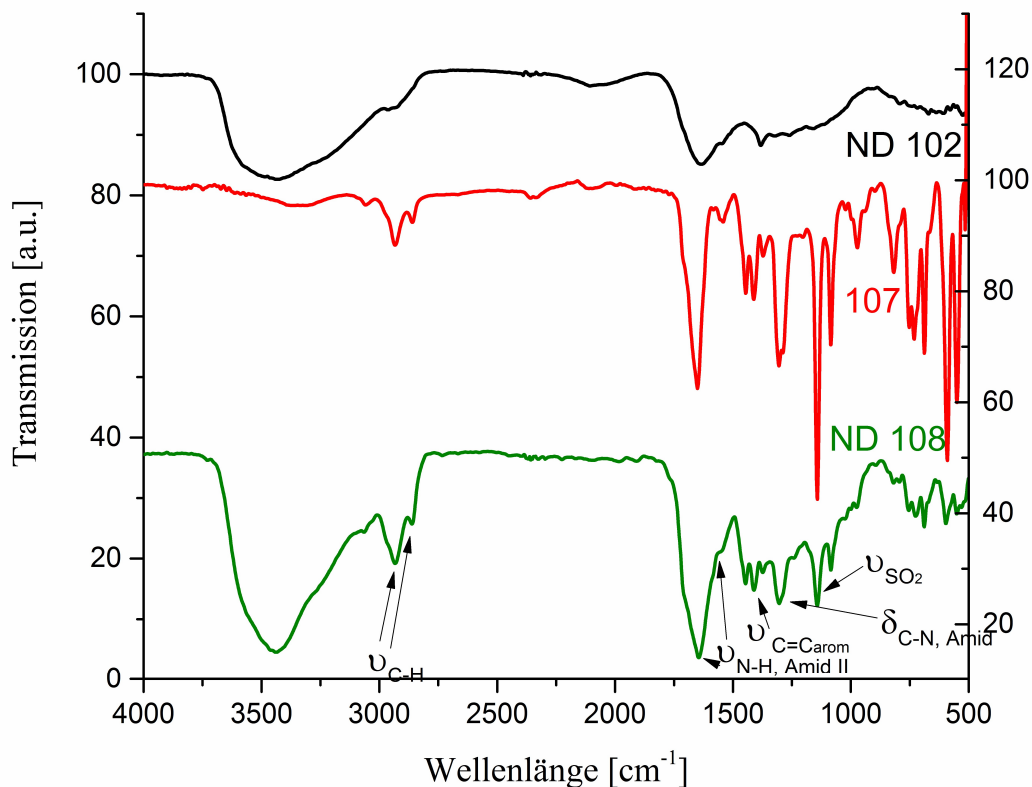


Abb. 66: Vergleich der FT-IR-Spektren der Nanodiamant-Konjugate **102**, **107** und **108**.

Die Partikelgröße von 90 % der Teilchen steigt von 173 nm bei Konjugat **102** auf 222 nm bei **108** an. Das Zetapotential fällt von +35.6 mV bei **102** bei einem pH-Wert von 6.17

auf -36.3 mV bei dem Keton-konjugierten Nanodiamant **108**, dessen pH-Wert bei 9.36 in wässriger Lösung liegt, ab. Phenylsulfongruppen besitzen ein negatives Zetapotential, so dass dieses Ergebnis ebenfalls ein Indiz für eine erfolgreiche Anbindung ist.^[208]

Es wurde auch **71** mit dem Ketonderivat **107** funktionalisiert (Abb. 67). Hier befindet sich zusätzlich Folsäure kovalent am Diamanten gebunden und es sollte untersucht werden, ob dies eine bessere Zellaufnahme bewirkt. Dazu wurde das Nanodiamantsystem **81** wie in 3.2.1.3 beschrieben hergestellt, der Folsäure-PEG-Linker **82** über eine Clickreaktion an den Nanodiamanten **81** angebunden und dann mit dem Keton **107** bei 50 °C über 24 Stunden in einem Ethanol/Wasser-Gemisch gerührt.

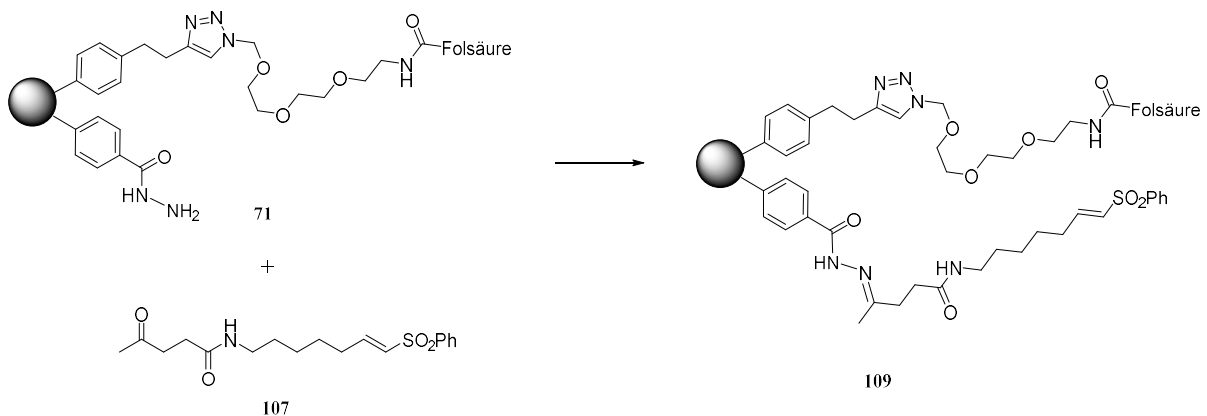


Abb. 67: Funktionalisierung des Nanodiamantsystems **71** mit Keton **107**.

Die Proben wurden anschließend wieder mit einem Wasser/Ethanol-Gemisch, das mit 25 %iger Ammoniaklösung auf $\text{pH} = 8$ eingestellt wurde, gewaschen und Frau *Annika Wagner* zugesandt, um sie in Zelltests an Trypanosomen zu untersuchen.

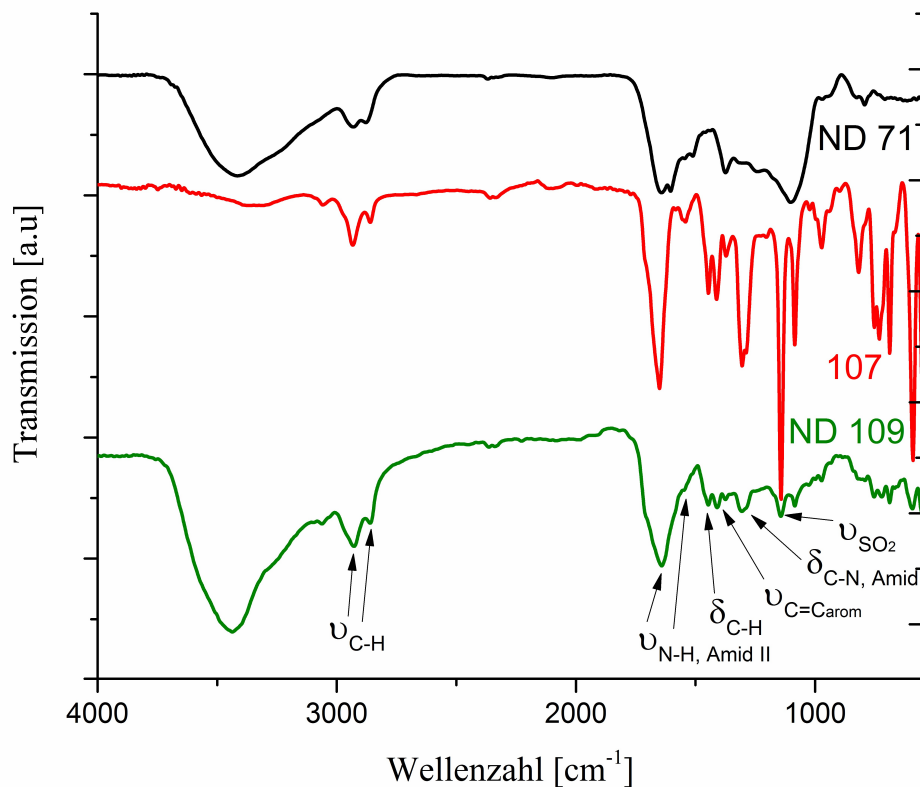


Abb. 68: Vergleich der FT-IR-Spektren der Nanodiamant-Konjugate **71**, **107** und **109**.

Werden nun die aufgenommenen FT-IR-Spektren der Nanodiamant-Konjugate **71**, **107** und **109** verglichen, so erkennt man eine erfolgreiche Funktionalisierung (Abb. 68). Die Valenzschwingungen der gesättigten Kohlenstoffe bei 2927 cm^{-1} und 2862 cm^{-1} , die Sulfonylgruppenschwingung bei 1144 cm^{-1} , die Valenzschwingungen der aromatischen Kohlenwasserstoffe bei 1410 cm^{-1} sowie eine Deformationsschwingung der Amidfunktionen bei 1306 cm^{-1} zu erkennen.

Die Teilchengröße von 90 % der Partikel sinkt von 200 nm bei Konjugat **71** auf 180 nm bei **109** ab. Das Zetapotential fällt von +21.3 mV bei **71** bei einem pH-Wert von 5.92 im wässrigen auf -30.1 mV bei dem Keton-konjugierten Nanodiamant **109**, dessen pH-Wert bei 9.31 in wässriger Lösung liegt, ab. Die Ergebnisse sind im Einklang mit der Literatur, laut der Phenylsulfongruppen ein negatives Zetapotential besitzen und die Ergebnisse weisen somit auf eine erfolgreiche Anbindung hin.^[208]

Die Nanodiamant-Konjugate **108** und **109** werden an *Trypanosoma brucei brucei* 449 cells (Lister strain 427) getestet. Erste Tests zeigen, dass Messungen von **108** und **109** im Bereich von 13 ng/mL bis 6.7 µg/mL keinen cytotoxischen Effekt auf die verwendeten Zellen aufweisen. Zu dem verwendeten Warhead wurden bisher noch keine Toxizitätstests durchgeführt, so dass man nicht mit Gewissheit sagen kann, dass der Warhead alleine schon eine inhibierende Wirkung auf Trypanosomen aufweist. Nanodiamant mit dem Warhead und Folsäure besitzen keine Wirkung auf Trypanosomen, die auf eine Toxizität in den verwendeten Mengen hinweisen.

3.3 Interaktionen von Nanodiamant mit physiologischen Medien und Proteinen

3.3.1 Stabilität von Nanodiamant in physiologischen Medien

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wird auch die kolloidale Stabilisierung von Nanodiamant in physiologischen Medien untersucht.

Der nach den bekannten Methoden hergestellte und desagglomerierte Nanodiamant liegt meist im wässrigen Medium vor und ist in diesem lange Zeit kolloidal stabil.^[24] Möchte man nun die Interaktion von Nanodiamant mit biologischen Medien untersuchen, so führt dies auch zu einem Wechsel des Mediums. Hierbei werden verschiedene Medien in Betracht gezogen: PBS-Puffer, Ringerlösung und eine 5%ige Glucoselösung. Nanodiamant neigt, wenn die Oberfläche nicht modifiziert ist, zur Agglomeration in biologischen Medien.^[95, 209] Würde eine Agglomeration in den Venen bei Versuchstieren erfolgen, so führte es zu Thrombosen und letztlich könnte ein Infarkt eine mögliche Folge sein.^[210]

3.3.1.1 Stabilität von Nanodiamant in physiologischer 5%iger Glucoselösung (110)

Zahlreiche Versuche zur Dispergierstabilität von Nanodiamant in verschiedenen Medien wurden durchgeführt. Einzig mit 5 %iger Glucose-Lösung kam es auch in fetalem Kälberserum

(FBS), was als Serumproteinquelle diente, nicht zu einer Agglomeration der Nanodiamantpartikel.

Hierfür wurden drei unterschiedliche Konzentrationen (2 mg Nanodiamant in 1 mL 5%iger Glucoselösung (b), 10 mg Nanodiamant in 1 mL 5%iger Glucoselösung (c) und 20 mg Nanodiamant in 1 mL 5%iger Glucoselösung (d)) (**110**) an Nanodiamant in einer physiologischen 5%igen Glucoselösung hergestellt (Abb. 69).



Abb. 69: Nanodiamant-Glucoselösung **110** mit einer Konzentration von 2 mg pro mL 5%iger Glucoselösung.

Die gemessenen Teilchengrößen und Zetapotentiale bleiben über einen Zeitraum von 20 Tagen konstant und auch eine Gelbildung, sowie eine Agglomeration treten nicht auf (Tab. 1 und Tab. 2).

Tab. 1: Stabilität der Nanopartikel via DLS-Messungen¹ von verschiedenen Lösungen zu verschiedenen Zeiten.

	ND Glucose 2mg [nm]	ND-Glucose 10mg [nm]	ND-Glucose 20mg [nm]
0	51.0	12.4	9.79
1 d	52.2	13.2	9.67
3 d	56.1	14.4	8.29
20 d	54.0	25.6	11.1

¹ alle Werte d(V, 90 %).

Tab. 2: Zetapotential von ND-Glucose-Lösungen verschiedener Konzentrationen.

	ND Glucose 2mg [mV]	ND-Glucose 10mg [mV]	ND-Glucose 20mg [mV]
1 d	+36.9	+37.8	+36.3
3 d	+33.4	+35.0	

Um nun die Interaktionen mit Serum zu untersuchen wurden je 20 μ L der Nanodiamant-Glucoselösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen, sowie eine Nanodiamantlösung in Wasser mit einer Konzentration von 28.3 mg/mL (a) in 1.5 mL FBS gegeben (Abb. 70).

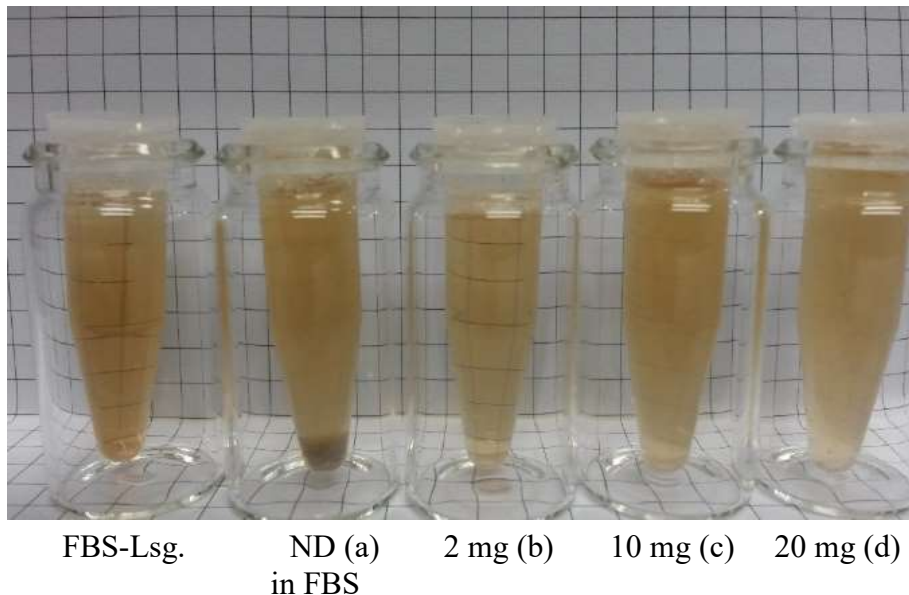


Abb. 70: Nanodiamant-Glucose-Lösung **110** in FBS nach Zugabe der Nanodiamant-Glucose-Lösung sowie eine Blindprobe (FBS-Lösung) zum Vergleich. Zu 1.5 mL FBS wurden jeweils 20 μ L a) wässriges Nanodiamant-Kolloid der Konzentration 28.3 mg/mL, b) 2 mg Nanodiamant in 1 mL 5 %iger Glucoselösung, c) 10 mg Nanodiamant in 1 mL 5 %iger Glucoselösung und d) 20 mg Nanodiamant in 1 mL 5 %iger Glucoselösung.

Die Nanodiamantprobe in Wasser (a) agglomerierte in FBS sofort und konnte mittels Ultraschall nicht mehr deagglomeriert werden.

Die Nanodiamantproben **110** b-d agglomerierten nicht und ließen sich sehr leicht dispergieren (Abb. 73). Nach drei Wochen kam es zu der Bildung eines Niederschlages bei den Proben **110** b-d, der sich jedoch nach kurzer Behandlung mit Ultraschall wieder auflöste (Abb. 71).

Nach Ultraschallbehandlung:

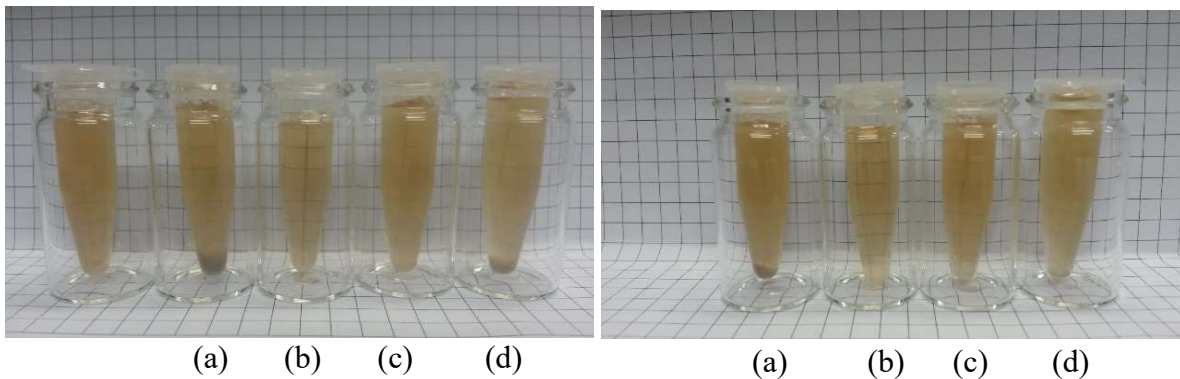


Abb. 71: Veränderung der Seren 21 Tage nach der Zugabe der Nanodiamant- bzw. Nanodiamant-Glucose-Lösung **110**. Die Konzentrationen und zugegebenen Volumina entsprechen den Angaben von Abb. 70.

Tab. 3: Partikelgröße der Nanopartikel via DLS-Messungen¹ von verschiedenen Lösungen zu verschiedenen Zeiten in FBS nach 23 Tagen.

	ND Glucose 2mg [nm]	ND-Glucose 10mg [nm]	ND-Glucose 20mg [nm]
vor US	7.88	1090	1930
Nach 5 min US	8.17	395	535

¹ alle Werte d(V, 90 %).

Wie aus den Tabellen 1-3 ersichtlich, neigt der Nanodiamant in Glucoselösung nicht zur Agglomeratbildung. Erste Vermutungen legen nahe, dass Glucose die Partikel umhüllt und so stark an der Oberfläche haftet, dass eine Interaktion der Partikeloberfläche mit den Wassermolekülen nicht stattfinden kann (Abb. 72).^[97]

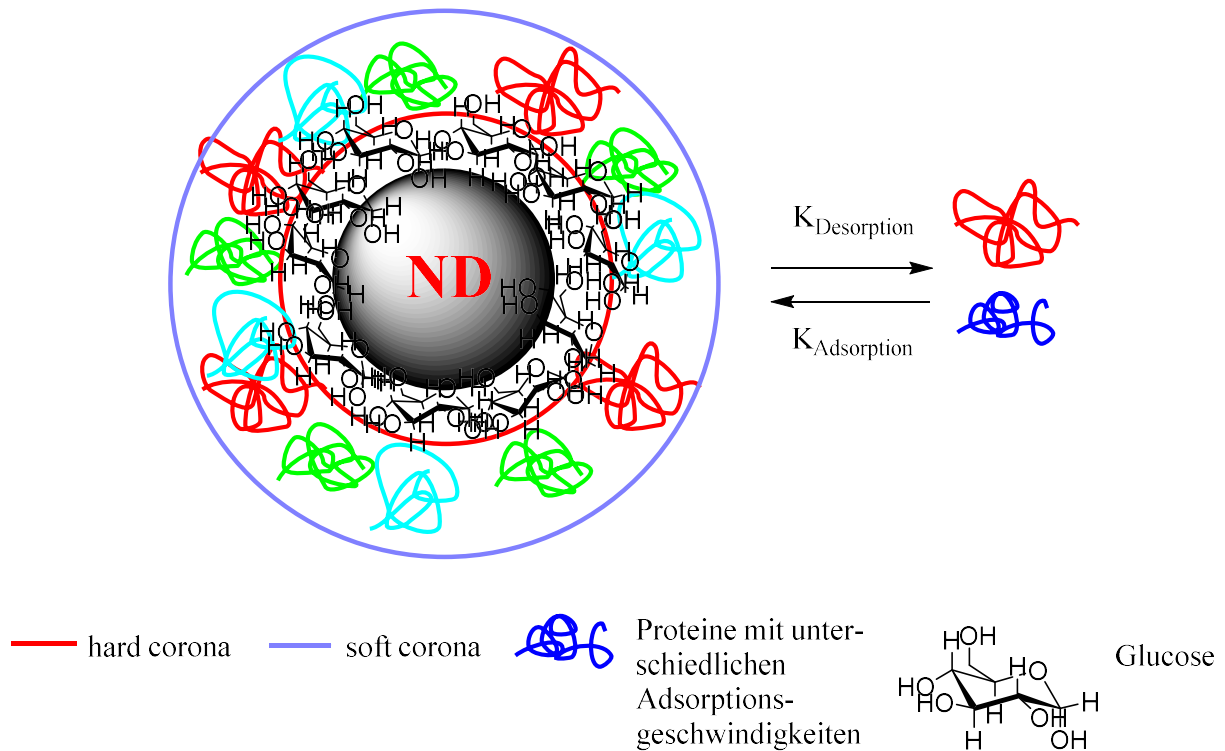


Abb. 72: Die Glucosemoleküle bilden eine hard corona um Nanodiamant. Die Proteine können gar nicht oder nur langsam mit der Partikeloberfläche interagieren.

Die Glucose bildet sozusagen die „hard corona“ des Partikels. Gibt man **110** in den unterschiedlichen Konzentrationen in FBS, so findet mit den Serumproteinen kein Austausch statt. Auch hier bilden die Glucosemoleküle sozusagen die „hard corona“ des Partikels und auch hier vermeidet diese „Glucosehülle“ wiederum eine Agglomeration der Partikel. Nach ein paar Tagen scheint es zur Ausbildung einer „soft corona“ zu kommen, die aber durch Ultraschall destabilisiert werden kann (Abb. 73).

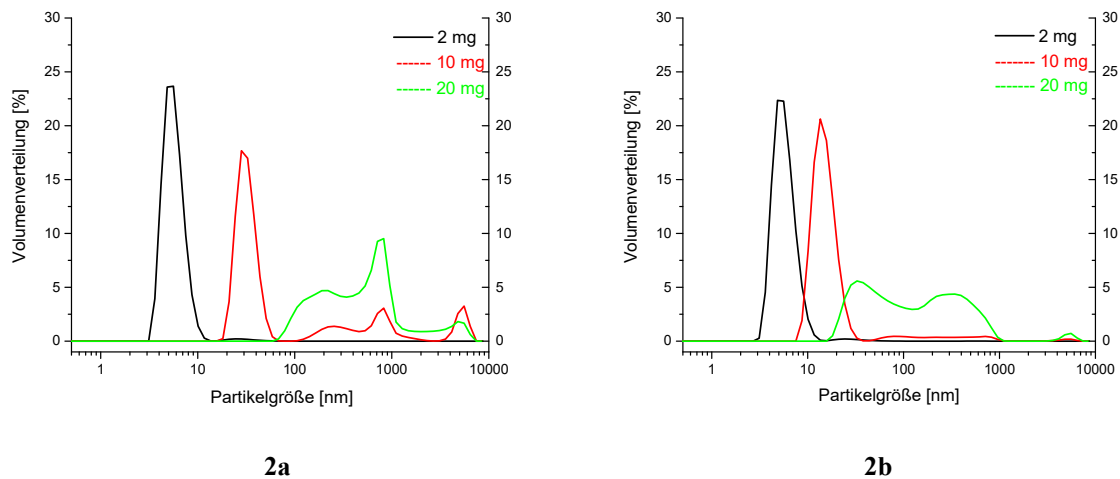


Abb. 73: a) Größe der Partikel der ND-Glucose-Lösung verschiedener Konzentrationen in Serum **vor** Ultraschallbehandlung nach 23 Tagen Inkubation. b) Größe der Partikel der ND-Glucose-Lösung verschiedener Konzentrationen in Serum **nach** Ultraschallbehandlung nach 23 Tagen Inkubation.

Nach 23 Tagen bilden sich Agglomerate in den Proben mit einer ND-Konzentration von 20 mg/mL. Hier scheinen die Glucose-Moleküle der gebildeten „hard corona“ des Nanodiamantpartikels erste Interaktionen mit den Serumproteinen einzugehen. So könnte sich eine „soft corona“ aus Serumproteinen noch um die „hard corona“ aus Glucose legen, die nur durch schwache Wechselwirkungen zu stande kommt.^[97] Die so gebildeten Agglomerate können über Ultraschall wieder aufgebrochen werden, so dass wieder kleinere Partikel entstehen.

Unsere Kooperationspartner in Bergen führten Toxizitätstests mit Ratten durch, um eine letale Dosis zu ermitteln. Den Ratten wurden in einem Zeitraum von drei Wochen wöchentlich je sieben mL von **110** in den Konzentrationen 2 mg/mL, 10 mg/mL und 20 mg/mL injiziert und beobachtet. Es konnten keine auffälligen toxischen Zustände beobachtet werden. Lediglich nahmen die Ratten an Gewicht zu, keine jedoch starb an den Folgen der Injektion. Nachdem die Tests beendet wurden, wurden Gewebeproben, in unserem Fall die Nieren entnommen, um den Verbleib der Nanodiamanten zu untersuchen. Die Gruppe um Prof. Dr. Francois Treussart im Laboratoire Aimé Cotton der Univ. Paris-Sud, Orsay konnte mittels Time delayed fluorescence analysis Nanodiamanten in den behandelten Ratten detektieren. Detaillierte Untersuchungen stehen noch aus.

3.3.2 Nanodiamanten und Proteine

Nanodiamanten können nicht nur durch die Ausbildung einer „hard corona“, die von Glucoselösung als Medium ausgeht, stabilisiert werden, sondern hierfür können auch Proteine in Betracht kommen.^[105, 211] Dafür geeignet sind besonders Proteine, die die Partikeloberfläche gegenüber anderen Proteinen, z.B. aus dem Serum, abschirmen und gleichzeitig am Wirkort den gewünschten Effekt erzielen. Angiopoietin-1, ein Protein, das als vaskulärer Wachstumsfaktor, vorallem in der Embryonalphase gilt, kann verwendet werden, um die Neubildung von Blutgefäßen in beschädigtem Gewebe zu unterstützen und direkt den Nanopartikel zu umhüllen.^[212] Hierbei sollte Nanodiamant auf β -Tricalciumphosphat (β -TCP-Implantatmaterialien) als Additiv dienen und Angiopoietin-1 adsorbieren, das bei der Gefäßneubildung im beschädigten Gewebe unterstützend wirken soll.^[213]

3.3.2.1 Nanodiamant und Angiopoietin-1 (111)

Angiopoietin-1 wurde an gemahlenem Nanodiamant **65** physisorbiert. Hierfür wurden 7.50 μ L Angiopoietin-Lösung in bidestilliertem Wasser zu 5.00 mg ND **65** (in 625 μ L kolloidal gelöst) gegeben und bei RT gerührt. Die Suspension wurde zentrifugiert und der Rückstand mehrmals mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Die gemessenen Teilchengrößen bleiben über einen Zeitraum von 11 Tagen stabil und zeigen keine Agglomeratbildung (Tab. 4). Das gemessene Zetapotential liegt bei +43.2 mV bei einem pH-Wert von 5.93.

Tab. 4: Die Teilchengrößen via DLS-Messungen nach 1 d und 11 d. Es sind die Verteilungen der Partikel angegeben, 90% der Teilchen haben einen Durchmesser von 18.7 nm nach 1 d.

ND Ang-1 (111)	d (10%) [nm]	d (50%) [nm]	d (90%) [nm]
1 d	5.46	7.45	18.7
11 d	6.87	9.63	17.4

Die aufgenommenen FT-IR-Spektren belegen eine erfolgreiche Anlagerung des Proteins (Abb. 74). Die typischen Schwingungen der Amid I- und Amid II-Bande bei 1622 cm^{-1} und 1591 cm^{-1} sind eindeutig zu erkennen, sowie eine OH-Schwingung bei 1389 cm^{-1} , welche aus dem Protein resultiert, ist ebenfalls vorhanden.

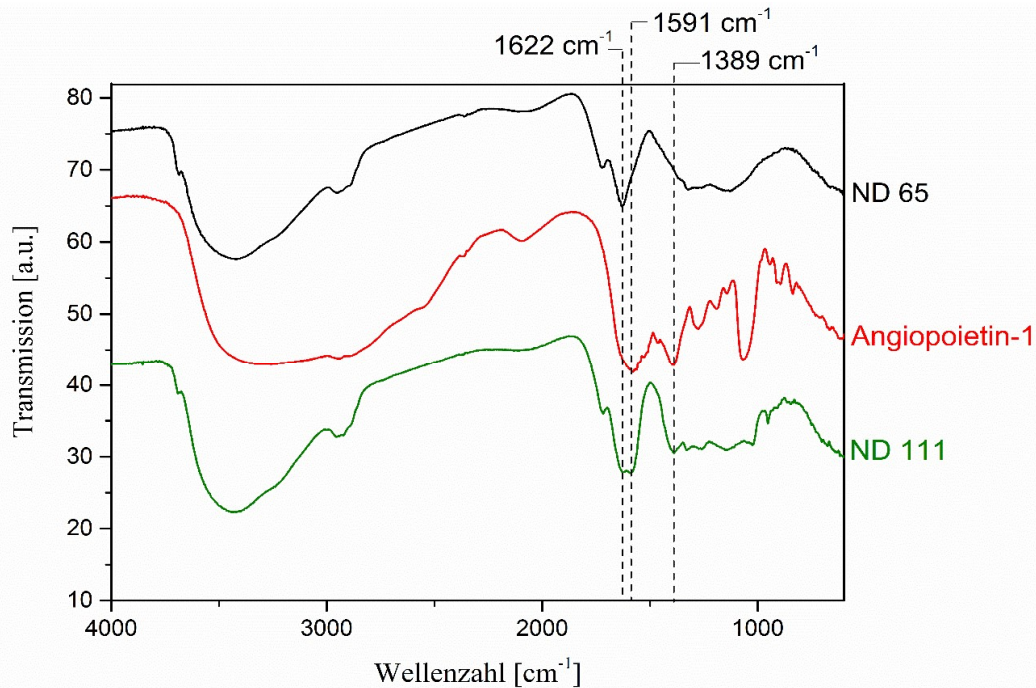


Abb. 74: Vergleich der IR-Spektren von **65** und Angiopoietin-1 mit **111**.

3.3.2.2 Nanodiamant (Cerasorb/Diasorb) in Humanserum (112)

Wenn Nanopartikel einem biologischen Medium ausgesetzt werden, so finden Interaktionen mit Proteinen statt.^[214] Diese Wechselwirkungen resultieren meist in der Entstehung einer umgebenden Hülle, die einen großen Einfluss auf den „Werdegang“ des Nanopartikels hat.^[98]

Die Formation dieser Proteincorona beeinflusst die Identität der Nanopartikel, da die Proteinhülle die Oberflächenenergie verringert und dadurch die Verteilung im Körper begünstigt wird.^[50] Physikalische Eigenschaften wie Partikelgröße, -form und Oberflächeneigenschaften spielen ebenfalls eine große Rolle in der Beeinflussung der Bindung zwischen Protein und Nanodiamant.^[105-106] Auch wenn viele Gruppen das Problem der Coronabildung über die Belegung der Oberfläche der Nanopartikel mit Polyethylenglykolgruppen zu umgehen versuchen und dadurch die Proteinadsorption abschwächen, so ist es nicht möglich, Partikel komplett ohne Proteinhülle in biologischen Medien zu erhalten. Daher ist es unerlässlich, dass auch die Bildung der Proteinhülle sowie der Metabolismus im Körper untersucht werden.

Zur Zeit wird intensiv daran geforscht, wie genau sich Nanodiamant in biologischen Medien, wie z. B. Plasmaserum verhält. Untersucht wurde carboxylierter Nanodiamant und ob eine

unterschiedliche Partikelgröße (5 nm und 100 nm) einen Einfluss darauf hat.^[215] Beide Partikelgrößen des Nanodiamanten weisen keine Beeinflussung der Konfirmation der Blutplasma-Proteine, sowie Koagulation des Blutes auf. Lin *et al.* untersuchte drei unterschiedliche Proteine, Myoglobin (Mb), bovines Serumalbumin (BSA) und Insulin (Ins), auf ihre Bindungsaffinitäten zu zwei unterschiedlichen Diamanttypen, HPHT-ND mit negativem Zetapotential und DND mit positivem Zetapotential.^[105] HPHT-ND bildet bevorzugt Monoschichten aus Proteinen um sich, wohingegen DND mit Mb und BSA 1:1-Komplexe bildet und zusammen mit Ins einen Partikeldurchmesser von 13 nm erreicht. Li *et al.* untersuchte das Verhalten von Nanodiamant in unterschiedlichen Zellmedien und fand heraus, dass in dem Zellmedium, das Serumproteine enthielt, keine cytotoxischen Effekte auftraten, wohingegen im Zellmedium, welches keine Serumproteine beinhalten, es zu cytotoxischen Effekten kam.^[216] Dies deutet auf eine Proteincoronabildung hin, die die Partikeloberfläche von den Zellorganellen abschirmt, so dass eventuell angebundene Substanzen ihre Wirkung nicht entfalten können. Neueste Arbeiten zeigen, dass es sogar möglich ist, Nanodiamant-Protein-Wechselwirkungen zu nutzen, um das Zellwachstum zu beeinflussen.^[211] Hierbei interagierten DND mit einem positiven Zetapotential mit Fibroblasten- Wachstumsfaktoren (FGF), um inhibitorische Effekte auf das Zellwachstum abzumildern. FGF sind Wachstumsfaktoren, die die Differenzierung von Zellen regulieren. Dabei bilden FGF eine Proteincorona um den Nanopartikel, die auf so starken Wechselwirkungen beruht, dass andere Signalproteine wie TGF β (Transformierender Wachstumsfaktor β), IL6 (Interleukin 6) oder EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor) keinen Einfluss auf das Zellwachstum besitzen. Anhand eines Explantat-Modells einer Maus konnte auch erfolgreich die Wiederherstellung des Knorpelwachstums in Gliedmaßen mit einer 4 nM ND-Kolloid-Lösung erzielt werden.^[211]

Im Rahmen der Dissertation sollte nun die Proteinadsorption an Cera- und Diasorb in Humanserum untersucht und analysiert werden. Cerasorb besteht aus Calciumapatit, das das Knochematerial darstellen bzw. ersetzen soll. Diasorb ist Cerasorb, auf dessen Oberfläche Nanodiamant in unterschiedlichen Konzentrationen (4 %ig, entspricht 40 mg/mL Nanodiamant auf Cerasorb und 8 %ig entspricht 80 mg/mL Nanodiamant auf Cerasorb) aufgebracht worden ist (Abb. 75).

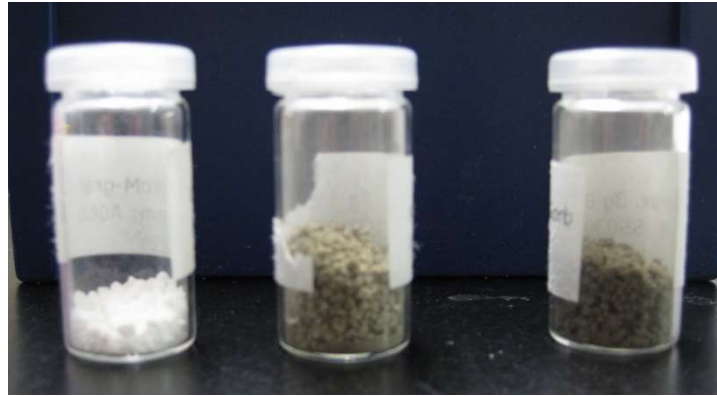


Abb. 75: Partikel aus Calciumapatit namens Cerasorb® (links), Cerasorb mit physisorbierten Nanodiamant mit einer Konzentration von 4% wt (Diasorb®, Mitte) und Cerasorb mit physisorbierten Nanodiamant mit einer Konzentration von 8% wt (Diasorb®, rechts).

Hierzu wurde ein dreiwöchiger Aufenthalt in den Laboren von Kenneth Dawson in Dublin durchgeführt, die gesammelten Daten der entwickelten Methode ausgewertet und in den nachfolgenden Tabellen veranschaulicht.

3.0 mg Cera- oder Diasorb wurden in je ein Eppendorf-Gefäß eingewogen und mit 0.5 ml Humanplasma bei 37 °C für 1 h inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert, der Überstand abgenommen (Supernatant), der Rückstand mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend wurde die Probe erneut zentrifugiert.^[217-218] Der resultierende Überstand dieser Probenbehandlung wurde Wash 1 genannt. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt und nach jedem Waschgang wurde das Eppendorf-Cap gewechselt, um eine Proteinadsorption an der Gefäßwand, die durch alle weiteren Waschgänge mitgeschleppt wird, zu vermeiden. Als Kontrolle wurde PBS-Puffer verwendet. Die einzelnen isolierten Proben wurden dann einer SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrymid-Gelelektrophorese) unterworfen, um die Proteine nach ihrer Größe und Masse zu trennen. Hierfür wurden Diasorb/Cerasorb, Wash 4 und Kontrolle mit 20 µl PBS und 10 µl Ladepuffer verdünnt und für 5 min bei 100 °C inkubiert. Alle Proben wurden dann auf das vorbereitete Gel für SDS-PAGE aufgetragen und Spannung angelegt, um das Gel zu entwickeln (Abb. 76). Nach ca. 120 min ist die Gelelektrophorese beendet und das Gel kann mit Silberfärbung angefärbt werden, um die Proteinbanden sichtbar zu machen.

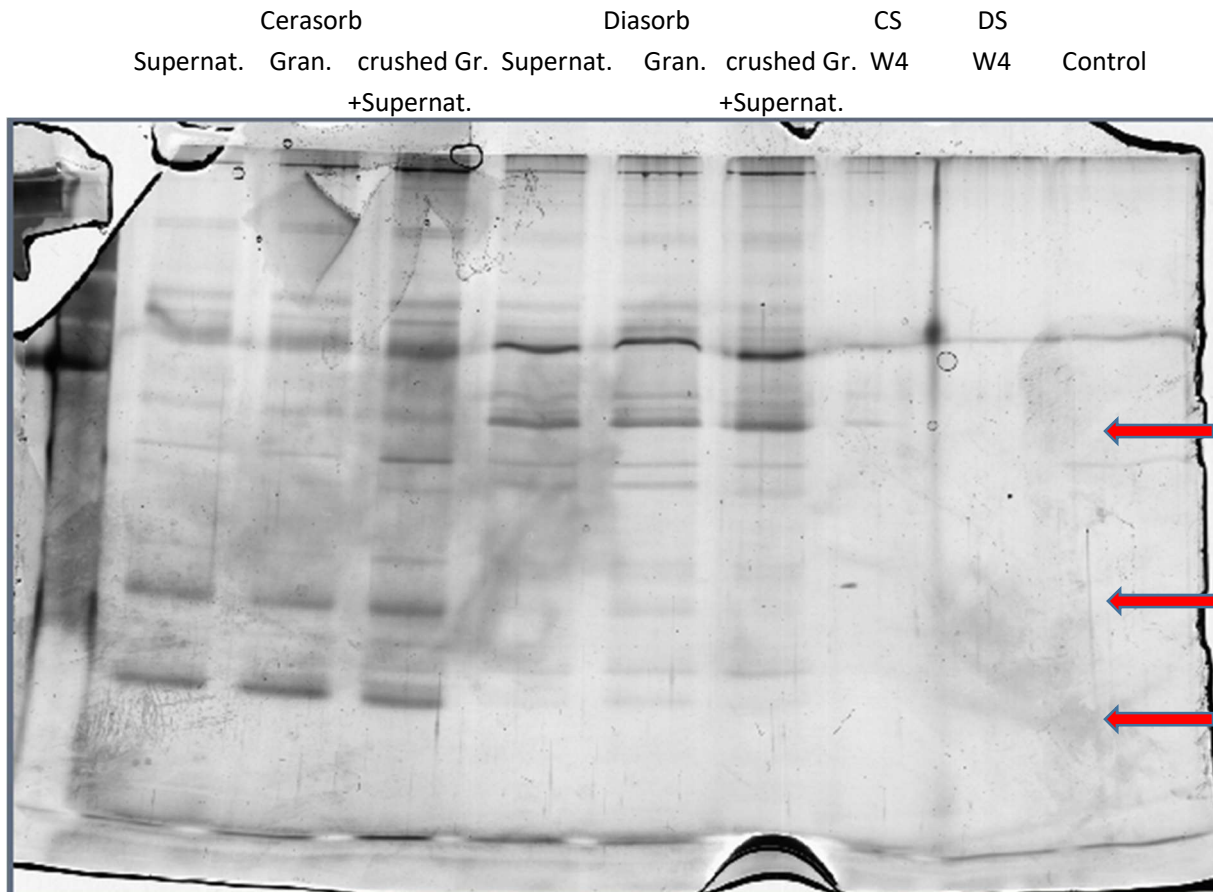


Abb. 76: SDS-PAGE mit Cera- (CS) und Diasorb (DS) mit unterschiedlichen Probenpräparationen. Gran. sind die einzelnen Granulen und crushed Gr. zeigt die zerkleinerten Granulen, da davon ausgegangen wird, dass auch Proteine in die Poren der Granulen diffundieren. W4 steht für vierten Waschgang des Rückstandes der mit Proteinen behafteten Cera- oder Diasorb-Granulen.

Die Banden wurden ausgeschnitten und einem Trypsin-Verdau unterworfen, um die Proteine, die an die Partikel anlagern, mittels Massenspektrometrie zu analysieren.^[49, 219] Die folgenden Diagramme zeigen die unterschiedlichen Proteine, die auf Cerasorb und Diasorb die Proteincorona ausgebildet haben (Abb. 77 und Abb. 78).

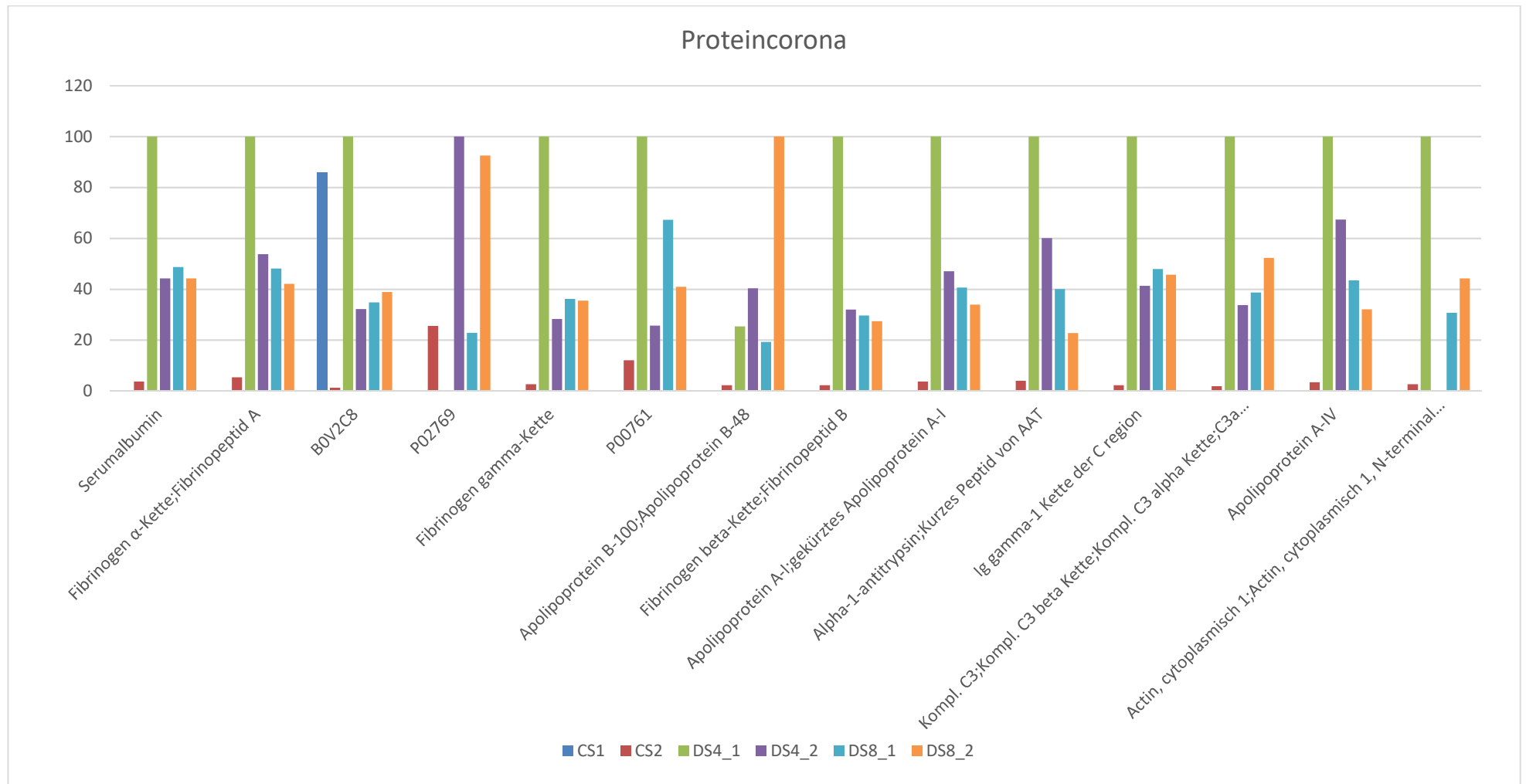


Abb. 77: Proteine, die auf CS1 (Cerasorb 1. Waschgang), CS2 (Cerasorb 2. Waschgang), DS4_1 (Diasorb 4% 1. Waschgang), DS4_2 (Diasorb 4% 2. Waschgang), DS8_1 (Diasorb 8% 1. Waschgang) und DS8_2 (Diasorb 8% 2. Waschgang) adsorbierten und in den unterschiedlichen Waschgängen vorhanden waren.

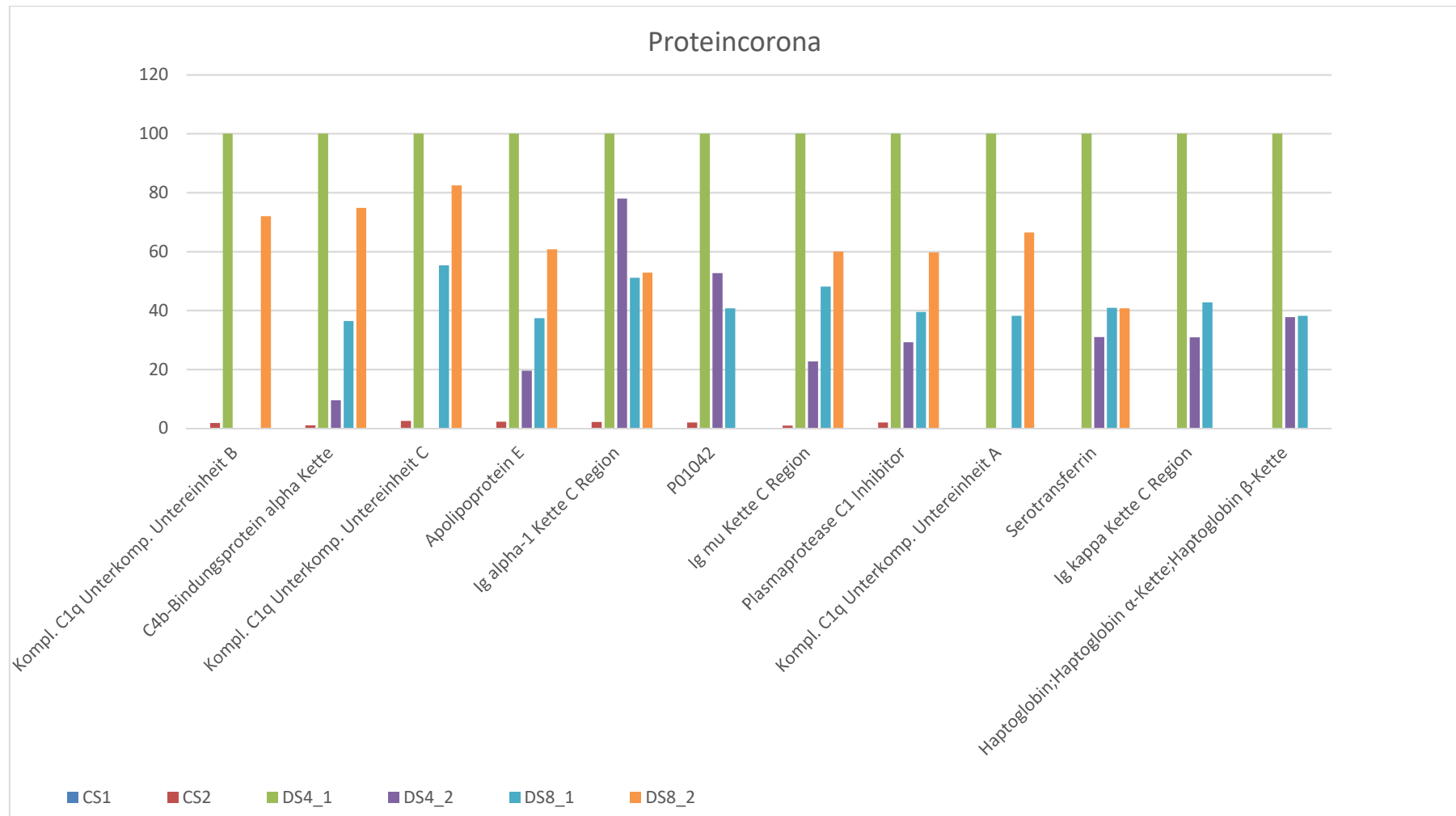


Abb.78: Proteine, die auf CS1 (Cerasorb 1. Waschgang), CS2 (Cerasorb 2. Waschgang), DS4_1 (Diasorb 4% 1. Waschgang), DS4_2 (Diasorb 4% 2. Waschgang), DS8_1 (Diasorb 8% 1. Waschgang) und DS8_2 (Diasorb 8% 2. Waschgang) adsorbierten und in den unterschiedlichen Waschgängen vorhanden waren.

Die Daten zeigen, dass z. B. Lipoproteinlipase (hydrolysiert Triglyceride in Lipoprotein), Insulin-ähnliches Wachstumsfaktor-bindendes Protein 3 (Trägerprotein für IGF (Insulin-like growth factor), welches zur Apoptose durch Proteinkinase B führt), Transketolase oder Phospholipid-Transferprotein (involviert in Cholesterinmetabolismus) an Cerasorb binden, jedoch nicht an Diasorb. Hier binden z. B. Serotransferrin (verantwortlich für Eisentransport im Blut) oder Haptoglobin (Bindung von Hämoglobin und Zuführung zum RES).

Diese unterschiedlichen Proteine zeigen, dass Nanodiamant einen Einfluss auf die Art der Proteine hat, die sich anlagern. Auffällig ist, dass an Diasorb 4% oder 8% keine Proteine binden, die dafür bekannt sind Apoptose hervorrufen können.

Eine genauere Untersuchung sollte noch in weiteren Experimenten durchgeführt werden, so dass weitere Aufschlüsse über die Proteinadsorption an Nanodiamant gewonnen werden können.

4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Nanodiamant bietet in der Medizin und in der Biologie zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten aufgrund der guten Biokompatibilität und geringen Toxizität. Durch die umfangreichen Funktionalisierungsmöglichkeiten der Oberfläche der nanometergroßen Partikel können viele unterschiedliche Wirkstoffe, Rezeptormoleküle oder Peptidsequenzen angebonden werden, die zusammen mit Nanodiamant ein anderes, durchaus besseres Wirkprofil aufweisen als der Wirkstoff allein.^[52]

Ziel dieser Arbeit war die Synthese eines pH-labilen Linkersystems, das hydroxylhaltige Wirkstoffe kovalent bindet und zusammen mit Nanodiamant in die Zellen bzw. Zellkompartimente, in denen ein saurer pH-Wert herrscht, eingeschleust werden. Über die Änderung des pH-Wertes in der Zelle soll der Wirkstoff freigesetzt werden und seine Wirkung entfalten können. Die zu synthetisierenden Linker **14** und **29** stellten sich als instabil heraus und neigten dazu, Umlagerungen einzugehen, so dass eine erfolgreiche Anwendung in wässrigen Medien nicht möglich war (Abb. 79).

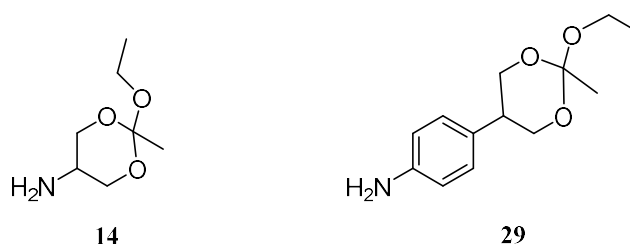


Abb. 79: pH-labile Orthoestersysteme **14** und **29** zur Anbindung von hydroxylhaltigen Wirkstoffen.

Daraufhin wurde ein pH-labiles Linkersystem auf der Basis eines Hydrazons hergestellt. Über das synthetisierte Hydrazinderivat **70** können Wirkstoffe, die über eine Aldehyd- oder Ketonfunktion verfügen, hier Doxorubicin (**8**), angebonden werden und pH-Wert-kontrolliert in der Zelle freigesetzt werden. Zusätzlich trägt der Nanodiamant ein kovalent angebondenes Targeting-Molekül, hier Folsäure, welches eine verbesserte Adressierung der Wirkorte gewährleisten soll. Für eine Anbindung über Clickchemie musste die Folsäure ebenfalls modifiziert werden (**81**, s. Abb. 80). Die Freisetzung wurde mittels UV-Vis-Spektroskopie detektiert und ausgewertet.

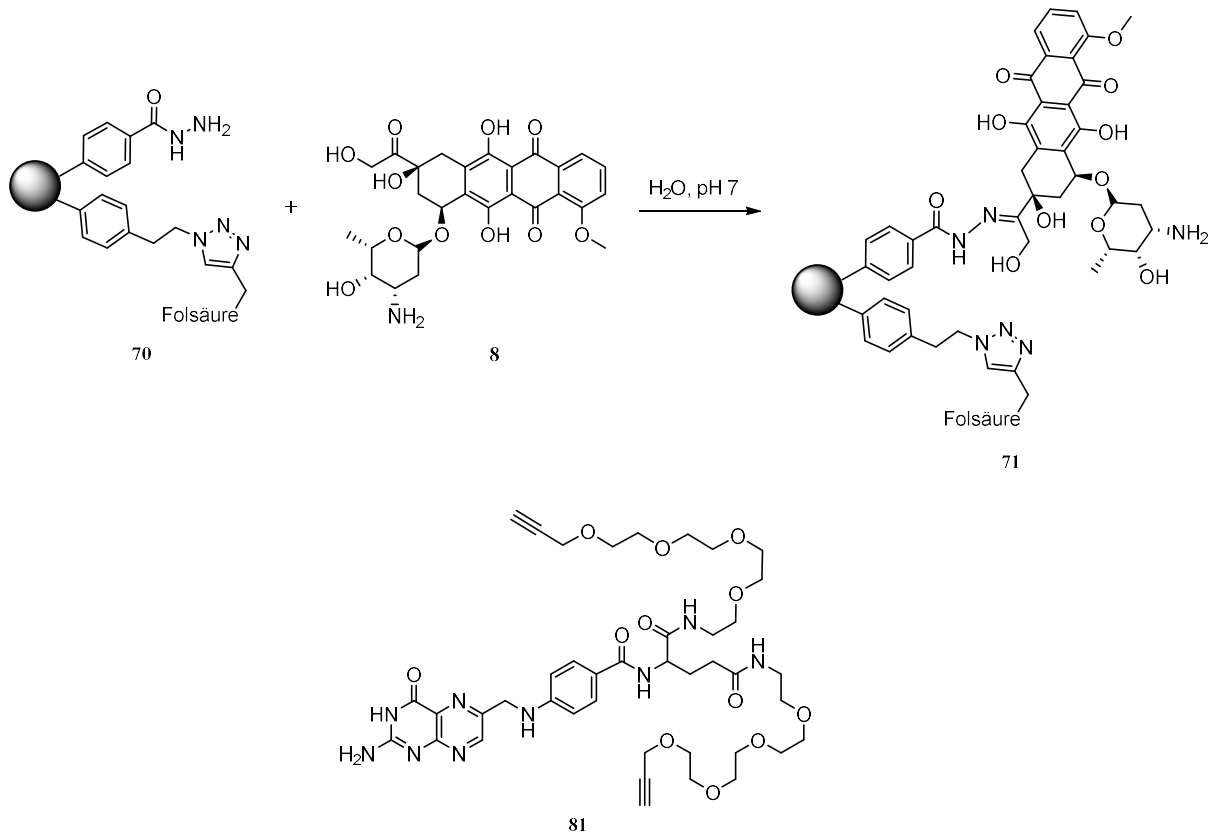


Abb.80: Anbindung von Doxorubicin (8) an dem Hydrazid-funktionalisiertem Nanodiamant 70 (oben); die zur Herstellung von 70 benötigte, modifizierte Folsäure 81 (unten).

Neben der spezifischen Funktionalisierung von Nanodiamant besitzt auch die Interaktion der Nanodiamantpartikel mit biologischen Medien eine besondere Bedeutung für zukünftige biomedizinische Anwendungen. Wenn die Partikeloberfläche durch Proteinadsorption gegenüber dem Wirkort abgeschirmt wird, so kann der angebundene Wirkstoff gegebenenfalls nicht freigesetzt werden und somit nicht seine Wirkung entfalten und bleibt letztlich ungenutzt. So war es von besonderem Interesse, die Wechselwirkungen von Nanodiamant in Humanserum und auch weiteren physiologischen Medien zu untersuchen. Dabei wurden sowohl freie Nanodiamantpartikel als auch solche, die auf klinisch bereits eingesetzten Gerüstmaterialien im Bereich der Therapie großer Knochendefekte adsorbiert waren, untersucht. Es zeigte sich eine unterschiedliche Proteinadsorption an Nanodiamant, der an Calciumapatit-partikeln physisorbiert war verglichen mit der Adsorption an den gleichen Calciumapatit-partikeln ohne Nanodiamant (Abb. 81).

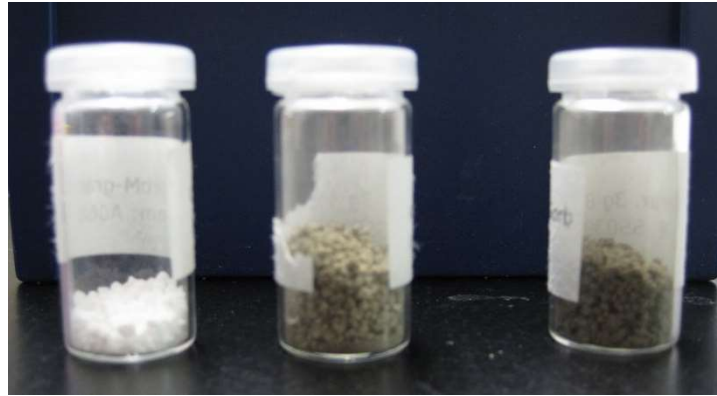


Abb. 81: Partikel aus Calciumapatit der Marke Cerisorb® (links), Cerisorb mit physisorbierten Nanodiamant mit einer Konzentration von 4% wt (Diasorb®, Mitte) und Cerisorb mit physisorbierten Nanodiamant mit einer Konzentration von 8% wt (Diasorb®, rechts).

Auch wurden die Wechselwirkungen von Nanodiamant mit der physiologischen Umgebung untersucht, die zur Agglomeration der Nanopartikel führen können. Es wurde ein unterschiedliches Agglomerationsverhalten der Nanodiamanten in wässriger Umgebung verglichen mit Nanodiamanten in Glucoselösung sowie deren Stabilität im Serum beobachtet. So wurden sehr gute Ergebnisse mit Nanodiamant in Glucoselösung erzielt (Abb. 82).

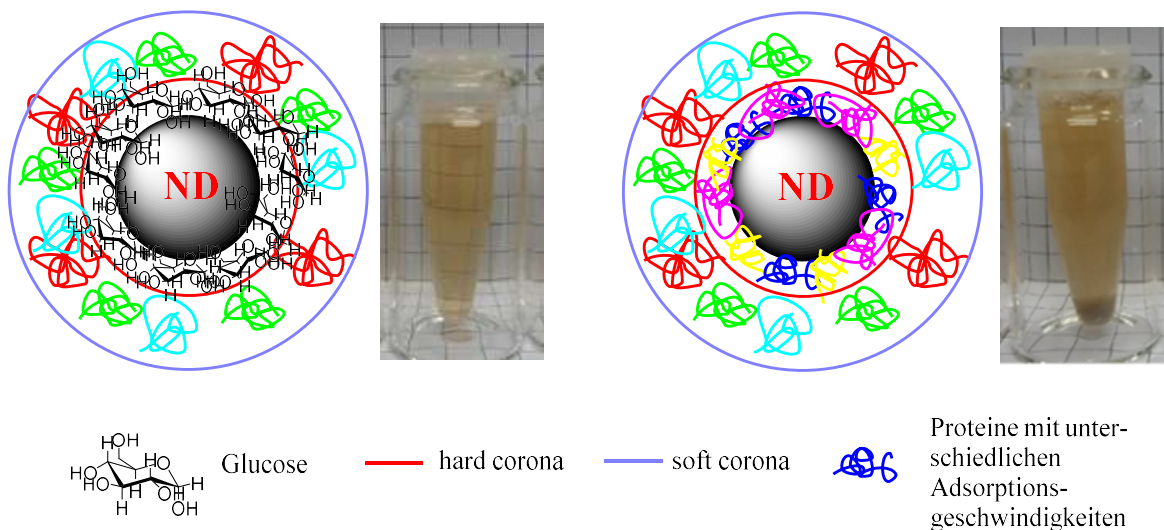


Abb. 82: Schematische Darstellung von Nanodiamant-Glucose-Lösung **110** in FBS nach Zugabe der Nanodiamant-Glucose-Lösung sowie die Coronabildung um Nanodiamant in wässrigen Medium zum Vergleich.

Durch die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen konnten wichtige Erkenntnisse zur Wechselwirkung verschieden präparierter und funktionalisierter Nanodiamanten mit physiologisch relevanten Umgebungen sowie zur stimuli-responsiven Wirkstofffreisetzung aus

Nanodiamant-Konjugaten gewonnen werden. In der Zukunft müssen diese Konjugate nun durch *in vitro*- und *in vivo*-Tests biologisch weiter untersucht werden. Des Weiteren sollten andere Wirkstoffe, bestimmte Zellorte adressierende Peptide usw. angebunden werden, um die Effizienz des Targetings und die Anwendungsbreite der Nanodiamant-Konjugate zu verbessern. Dies kann sowohl über die Clickchemie als auch die labile Anbindung mittels Hydrazonbildung erreicht werden, die sich in dieser Arbeit erneut als sehr effizient erwiesen haben.

Zudem wurde mit der Untersuchung der angelagerten Proteine um Nanodiamant ein erster Schritt in Richtung eines umfassenden Verständnisses der Wechselwirkung dieses Materials mit biologischen Umgebungen unternommen. Auch wenn diese Wechselwirkungen, insbesondere mit Humanserum, sehr komplex sind, so sind erste Aussagen bezüglich der Art der angelagerten Proteine möglich. Erste Versuche der Stabilisierung von Nanodiamant in physiologischen Medien wurden ebenfalls erfolgreich durchgeführt und zeigen eine effiziente und einfache Möglichkeit, Nanodiamant in biologischen Medien vor der Agglomeration zu bewahren. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse bezüglich mehrfacher Funktionalisierungsmöglichkeiten von Nanodiamant sowie dessen Stabilisierung in physiologischen Medien zeigen die breite Anwendungsmöglichkeit und das enorme Potential von Nanodiamant im Bereich medizinischer und biologischer Anwendungen auf.

5 SUMMARY AND OUTLOOK

Nanodiamond offers various possible applications in medicine and biology because of its good biocompatibility and low toxicity. Due to the extensive opportunities functionalizing the surface of the nanosized particles, it is possible to bind a variety of different active pharmaceutical ingredients (API), receptor molecules or peptide sequences. This functionalization can result in an improved efficacy compared to the profile of the drug alone.^[52]

The aim of this thesis was the synthesis of a pH-labile linker system which covalently binds hydroxyl group-containing APIs and transfers them together with nanodiamond into cells or cell compartments, where an acidic environment is predominant. Because of the change of the pH-value, the drug gets released and can act on its effect. The synthesized linker systems **14** and **29** were not stable and tend to rearrange so that a successful application in aqueous media was unfeasible (Abb. 83).

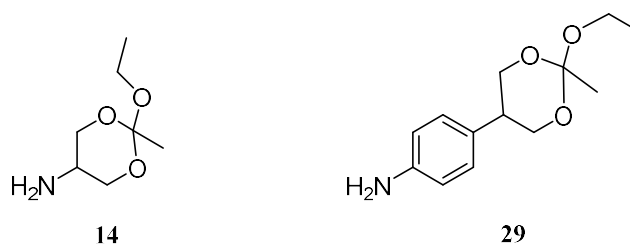


Fig. 83: pH-labile orthoester-systems **14** and **29** for linkage of hydroxyl group-containing drugs.

Thereupon a pH-labile linker system based on the formation of a hydrazone bond was synthesized. APIs containing an aldehyde or a ketone, such as doxorubicin (**8**), can be linked to the synthesized hydrazine derivative **70** and be released in cells due to the acid labile bond (Fig. 84). Additionally, the nanodiamond carries a covalently bound targeting molecule, i.e. folic acid, to assure an improved uptake into certain cells exhibiting an increased number of folate receptors. To bind folic acid through click chemistry to nanodiamond, it had to be modified in advance (**81**, Fig. 84). The release of Doxorubicin was detected and evaluated via UV-Vis-spectroscopy.

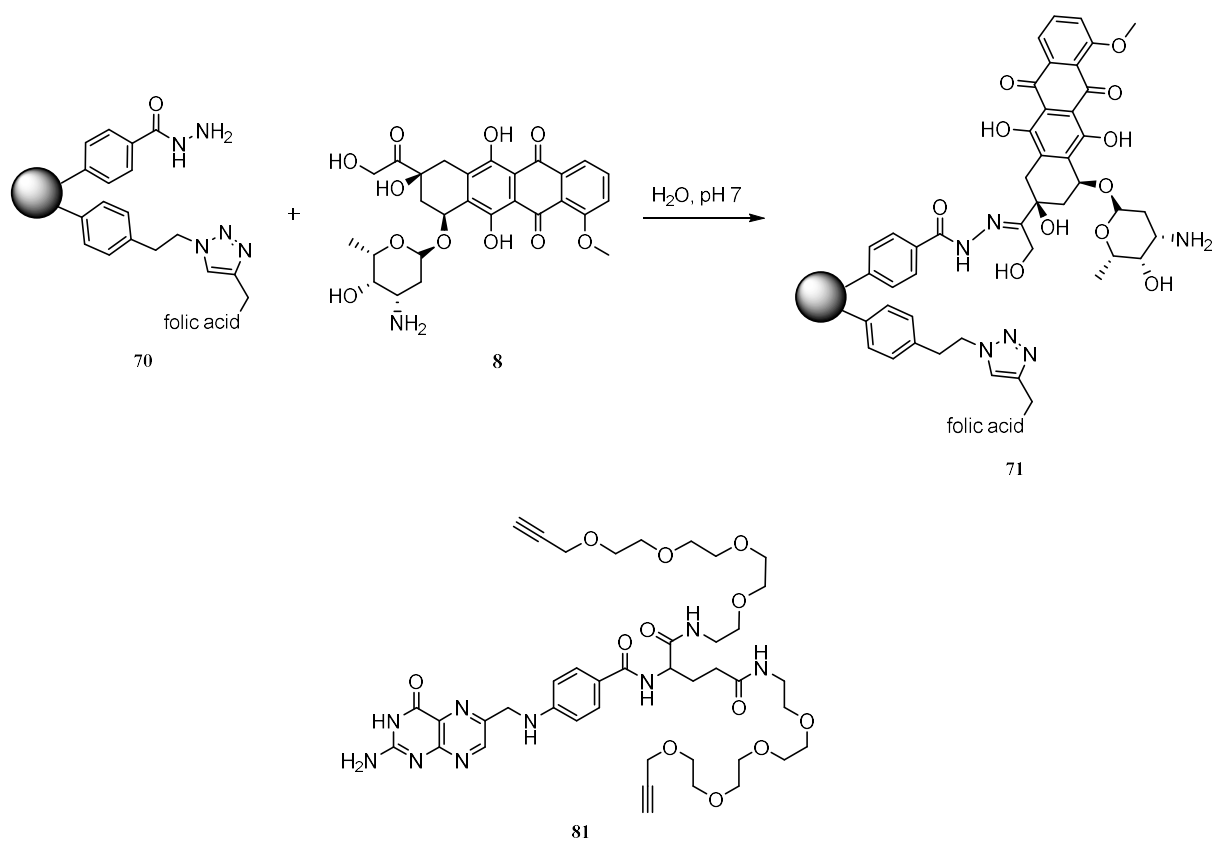


Fig. 84: Linkage of Doxorubicin (**8**) to the hydrazide-functionalized nanodiamond **70** (top); the modified folic acid **81** used for the generation of **70** (bottom).

Besides the specific functionalization, the interaction of nanodiamond particles with biological media is gaining more and more importance regarding future biomedical applications. If the particle surface is shielded with proteins it is possible that the linked drug can not be released, remains unused and cannot develop its desired effect. Because of this reason it was of great interest to examine the interactions of nanodiamond in human serum and further physiological media. Nanodiamond without further functionalisation as well as nanodiamonds which are adsorbed on materials that are already in clinical usage in the field of large bone defects were analysed. The results show a different protein adsorption for materials where nanodiamonds are physisorbed to calcium apatite compared to calcium apatite alone (Fig. 85).



Fig. 85: Cerasorb[®] particles made from calciumapatite (left), Cerasorb with physisorbed nanodiamond with a concentration of 4% wt (Diasorb[®], centre) and Cerasorb with physisorbed nanodiamond with a concentration of 8% wt (Diasorb[®], right).

The interactions of nanodiamond with a physiological environment which can lead to the agglomeration of the particles was also examined. A different agglomeration behaviour of nanodiamond in aqueous media was compared to nanodiamond in glucose solution as well as their stability in serum. Very good results were achieved for nanodiamond in glucose solution (Fig. 86).

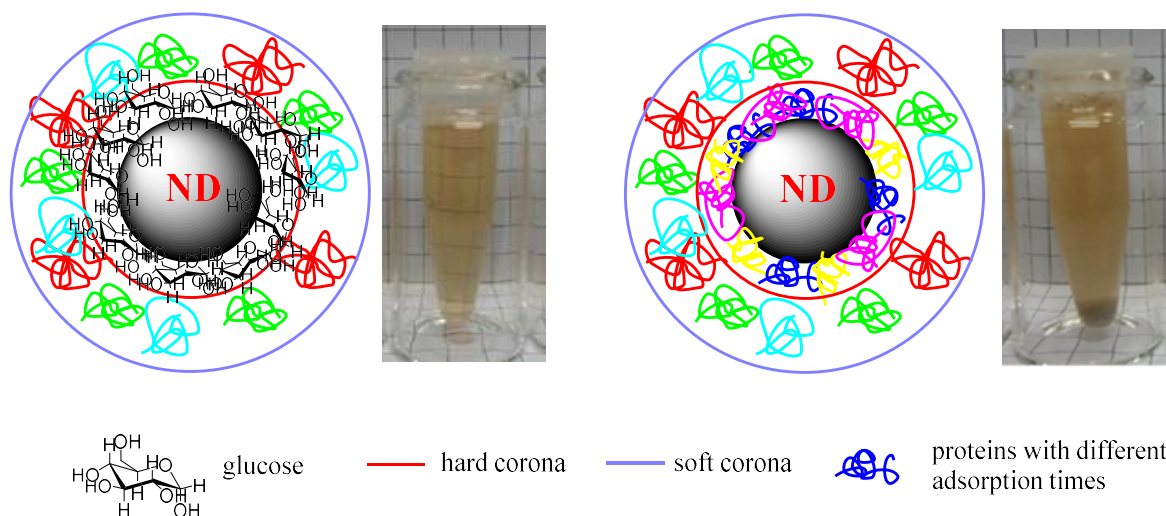


Fig. 86: Schematic diagram of nanodiamond-glucose-solution **110** in FBS after addition of the nano-diamond-glucose-solution as well as the corona formation around nanodiamond in aqueous media for comparison.

From the presented studies in this thesis important insights into the interactions of functionalized and different prepared nanodiamonds with physiological relevant environments as well as with stimuli-responsive drug release from nanodiamond conjugates were obtained.

Further biological investigations *in vitro* and *in vivo* have to be carried out in the near future. In addition, other drugs, targeting peptides etc. have to be linked to the nanodiamond conjugate to improve the targeting efficiency and to broaden the range of applications. This goal can be achieved through click chemistry or formation of a labile hydrazone bond which was shown again to be very efficient in this thesis.

Furthermore, the examination of the attached proteins around nanodiamond is the first step towards a better comprehensive understanding of the interactions of this material with its biological environment. Even if these interactions are very complex, especially in the case of human serum, first statements according to the type of attached proteins are possible. First trials of stabilizing nanodiamond in physiological media have been carried out successfully and demonstrate an easy and effective way to hinder agglomeration of nanodiamond in biological media. Finally, the insights gained in this thesis regarding the multiple possibilities of nanodiamond as well as their stabilization in physiological media offer a broad range of applications and show the potential of nanodiamond in the field of medical and biological research.

6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Chemikalien

Alle zur Synthese eingesetzten Chemikalien wurden kommerziell erworben und ohne weitere Reinigungsschritte verwendet. Die eingesetzten Lösemittel wurden destillativ gereinigt.

Absoluierte Lösemittel wurden gemäß gängiger Standardmethoden über entsprechenden Trockenmitteln getrocknet. Es wurde generell vollentsalztes, bei Reaktionen mit Nanodiamant stets doppelt destilliertes Wasser (pH = 7.0) oder Milliporewasser verwendet.

Ninhydrin Lösung: Sprühreagenz aus 0.3 g Ninhydrin und 3 ml Eisessig in 100 ml *iso*-Propanol; Detektion durch Erhitzen auf 130 °C.

Kommerzieller Detonationsnanodiamant wurde von der *Gansu Lingyun Corp.* (China) erworben mit der Chargenbezeichnung ND-0048 und ND-0062.

Der wasserstoffterminierte Nanodiamant wurde von *Carbodeon* aus Finnland erhalten mit der Chargenbezeichnung 700224.

Als Schutzgas kam Stickstoff (99.9990%) der Firma *Linde* zum Einsatz.

6.2 Analysemethoden und Geräte

Dünnschichtchromatographie (DC)

Material: *Macherey-Nagel* DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm Folien)

Reaktionskontrollen mittels DC wurden auf Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichteten Aluminiumplatten der Firma *Macherey-Nagel* durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte mittels Fluoreszenzlöschung des Indikators bei 254 nm bzw. durch die Fluoreszenz der aufgetragenen Stoffe bei 254 nm respektive 366 nm unter der UV-Lampe oder mit Hilfe von Anfärbe-reagenzien (Iod, Kaliumpermanganat). Die Zusammensetzungen der Laufmittelgemische sind stets in Volumenverhältnissen (v:v) angegeben.

Säulenchromatographie

Material: *Merck* Geduran® Kieselgel 60 (0.040-0.063 mm)

Macherey-Nagel Aluminiumoxid 90 basisch (Aktivitätsstufe I, Partikelgröße 0.050–0.200 mm, spezifische Oberfläche (BET) ~ 130 m²/g, pH 9.5 ± 0,3)

Macherey-Nagel Aluminiumoxid 90 neutral (Aktivitätsstufe I, Partikelgröße 0.050–0.200 mm, spezifische Oberfläche (BET) ~ 130 m²/g, pH 7 ± 0,5)

Säulenchromatographie wurde mit Hilfe von Kieselgel der Firma *Merck* oder *Macherey-Nagel* durchgeführt. Bei Aluminiumoxid (ALOX) muss noch eine Vorbehandlung stattfinden. Hierfür wird das ALOX im Trockenschrank für 4 h erhitzt, um Wasser zu entfernen und anschließend die gewünschte Aktivitätsstufe eingestellt. Die jeweiligen Aktivitätsstufen werden nach folgender Tabelle eingeteilt:

Aktivitätsstufe	Wassergehalt (%)
I	0
II	3
III	6
IV	10
V	15

Aluminiumoxid mit der Aktivitätsstufe II wird erhalten, indem zu der abgewogenen Menge Aluminiumoxid 3 % Wasser hinzu gegeben wird und verteilt dieses durch gleichmäßiges Schütteln in einem verschlossenen Rundkolben.

Das erhaltene Aluminiumoxid der entsprechenden Aktivitätsstufe wird mind. 12 h im geschlossenen Rundkolben bis zur Säulenchromatographie aufbewahrt, um eine gleichmäßige Durchmischung des Aluminiumoxids mit Wasser zu gewährleisten.

Länge und Durchmesser der Säule wurden produkt- und mengenspezifisch abgestimmt. Die verwendeten Lösemittelgemische sind in Volumenanteilen (v:v) angegeben.

NMR-Spektroskopie

Gerät: *Bruker* AVANCE 400 MHz FT-NMR-Spektrometer
(^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz)

Die Spektren wurden bei einer Umgebungstemperatur von 27 °C aufgenommen.

Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm angegeben. Als interner Standard diente bei ^1H -Spektren das ^1H -Resonanzsignal des verwendeten Lösemittels, bei ^{13}C -Spektren das ^{13}C -Resonanzsignal. Die Zuordnung der Signale im protonenkoppelten ^{13}C -Spektrum wurde durch DEPT-90- und DEPT-135-Spektren unterstützt. Bei literaturunbekannten Substanzen wurde die Signalzuordnung zusätzlich durch COSY, HSQC- und HMBC- Spektren unterstützt.

FT-IR-Spektroskopie

Geräte: *Jasco* FT-IR-410 mit ATR-Aufsatz bzw Halterung für KBr-Presslinge

Thermo Fisher Scientific Nicolet iS5 mit DRIFTS-Einheit

Es wurde ein Messbereich von 4000–600 cm^{-1} (ATR und KBr-Presslinge) bzw. 4000–400 cm^{-1} (DRIFTS) erfasst.

Herstellung KBr-Presslinge

Die KBr-Presslinge wurden wie folgt hergestellt: Ein KBr-Pressling wurde für 15 min bei 10 bar gepresst, der Stempel wurde zur Hälfte herausgedreht und abgenommen, Substanz wurde mittig auf den Pressling aufgetragen, der Stempel daraufgelegt und erneut bei 6 bar für 3 min gepresst.

Elementaranalyse

Gerät: *Elementar* „Vario Micro Cube“

Aufgrund von leichten Schwankungen der Analyseergebnisse bei der Messung von Nanodiamantproben, wurde eine auf der Elementaranalyse basierende Berechnung der Oberflächenbeladung für die funktionalisierten Nanodiamantpartikel nicht durchgeführt.

UV/Vis-Spektroskopie

Gerät: *JASCO V-630*

Sämtliche Spektren wurden in den angegebenen Lösungsmitteln mit den jeweils angegebenen Konzentrationen aufgenommen. Der Messbereich lag in einem Bereich von 200–800 nm, die Küvette von *Hellma Analytics* bestand aus Quarz und besass eine Schichtdicke von 1 cm. Die Referenzmessungen wurden mit dem jeweiligen Lösungsmittel vorgenommen.

Massenspektrometrie

Gerät: *Finnigan MAT Incos 500 oder MAT 90 (Elektronenionisation)*

Bruker Daltonics mircOTOF Focus (Elektronenspray Ionisation)

Schmelzpunktbestimmung

Gerät: *Reichert Kofler-Heiztisch*

Die Werte der gemessenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert. Es konnten Werte im Messbereich von 22–330 °C erfasst werden.

Thermogravimetrische Analyse

Gerät: *Perkin Elmer STA 6000*

Die Messungen wurden in hochreinem Stickstoff (> 99.9990 %) durchgeführt. Bei jeder Messung wurde von 50–130 °C mit einer Heizrate von 10°K/min aufgeheizt, die Temperatur für 60 min bei 130 °C gehalten und von 130 °C-900 °C mit einer Rate von 5 °K/min weiter geheizt.

Partikelgrößenmessung

Gerät: *Malvern Zetasizer Nano ZS (DLS, 173° backscatter)*

Partikelgrößen wurden ohne weitere Vorbehandlung bei jeder Diamantreaktion direkt aus stabilen Überständen nach dem letzten Waschvorgang mit bidest. Wasser gemessen.

ZetaPotential-Bestimmung

Gerät: *Malvern Zetasizer Nano ZS mit MPT-2-Autotitrator*

Für Zetapotential-Messungen wurden die Nanodiamantproben in Millipore- oder bidest. Wasser im Ultraschallbad dispergiert. Der pH-Wert der Dispersionen wurde mit Hilfe der pH-Elektrode des Autotitrators bestimmt.

Ultraschallbehandlung

Gerät: Ultraschallbad: *Bandelin Sonorex Digitec Typ DT52 (max. 80 W, 35 Hz)*

Ultraschallhorn: *Branson Sonifier II W-450 (max. 400 W, 19850–20050 Hz) mit Titan-Mikrospitze (5 mm, konisch)*

Zentrifugen

Gerät: *Hettich EBA 21 Typ 1004 Tischzentrifuge mit Festwinkelrotor*

Thermo Scientific Sorvall MTX 150 Ultrazentrifuge mit Ausschwingrotor

Vakuumpumpen

Geräte: *Vacuubrand*

Membranpumpen verschiedener Modellarten.

Entgasung von Reaktionslösungen

Im Rahmen der durchgeführten Sonogashira-Reaktionen wurde zur Entgasung der Reaktionslösungen die sog. „Freeze-Pump-Thaw“-Methode angewandt. Hierzu wurde die

Reaktionslösung nach Einfrieren mit flüssigem Stickstoff i. Vak. entgast, bevor sie im geschlossenen Kolben i. Vak. wieder auftaute. Dieser Vorgang wurde, sofern nicht anders angegeben, dreimal wiederholt.

Herstellung der PBS-Pufferlösungen

Zunächst wurden zwei Stammlösungen **A** und **B** hergestellt:

Tab. 5: Menge an Stammlösung **A** und **B** zur Herstellung der PBS-Pufferlösungen.

A: KH_2PO_4	9.078 g	66.70 mmol	Mit dest. Wasser auf 1 L auffüllen
B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	11.876 g	66.70 mmol	Mit dest. Wasser auf 1 L auffüllen

Für die Herstellung der PBS-Pufferlösungen mit den gewünschten pH-Werten wurden die in Tab. 5 angegebenen Volumina der Stammlösung **B** mit Stammlösung **A** auf 100 ml aufgefüllt. Zur genauen Einstellung der jeweiligen pH-Werte wurden die Pufferlösungen bei Bedarf entweder mit verdünnter Salzsäure oder verdünnter Natriumhydroxidlösung versetzt.^[220]

Tab. 6: pH-Werte und Volumina der Stammlösung **B** der für verschiedene Experimente notwendigen PBS-Pufferlösungen.

pH-Wert	V Stammlösung B [ml]
4.6	0.6
6.0	12.1
7.4	81.8
8.0	96.9

Freisetzungsexperimente

Es wurde eine Kalibriergerade von Doxorubicin mittels UV-Vis-Spektroskopie (Emission 480 nm, Excitation: 550 nm) in PBS-Puffer mit einem pH von 4.6 und 7.4 ermittelt.

DOX-Konzentrationen: 1mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.05 mg/mL, 0.02 mg/mL und 0.01 mg/mL.

Jede Messung wurde je dreimal wiederholt, daraus ein Mittelwert ermittelt und aus den erhaltenen Messpunkten wurde eine Kalibriergerade zur Ermittlung der Doxorubicin-Konzentration bei pH4.6 und 7.4 erstellt. Anhand dieser Kurven kann mittels der erhaltenen Absorption die Konzentration in den Überständen der Nanodiamant-Lösungen ermittelt werden.

Die Nanodiamantproben wurden jeweils im Ultraschallbad in 1.5 mL PBS-Pufferlösung (pH = 4.6 und pH =7.4) dispergiert und bei 37 °C inkubiert.

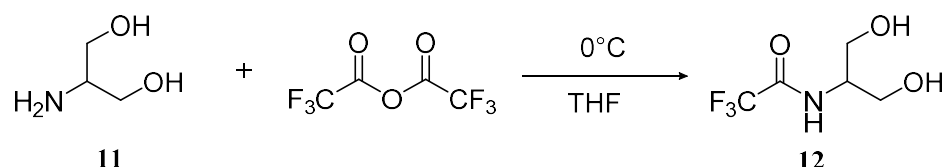
Für die Abnahme des Überstandes wurden die Proben in der Tischzentrifuge zentrifugiert (15000 rpm, 7 min) und nach der Abnahme erneut mit dem jeweiligen Puffer versetzt, redispergiert und bis zur nächsten Abnahme wieder im Wasserbad bei 37 °C gehalten.

Die Abnahmezeiten sind: 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 20 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 8 d, 10 d, 14 d, 21 d und 28 d.

6.3 Synthesen

6.3.1 Synthesen organischer Verbindungen

Darstellung von 2,2,2-Trifluor-N-(2-hydroxy-1-hydroxymethyl-ethyl)-acetamid (**12**)^[176]



In einen 100 mL Kolben wurden 2.57 g (28.2 mmol) **11** mit 50 mL THF abs. versetzt und mittels Eisbad auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden tropfenweise 15.5 mL (14.8 g, 70.5 mmol) Trifluoressigsäureanhydrid zugegeben, nach 30 min wurde das Eisbad entfernt und Reaktionslösung bei Raumtemperatur für 6 d gerührt. Laut DC-Kontrolle (CyH/EtOAc = 2/1, angefärbt mit KMnO₄) war kein Edukt mehr vorhanden und die Lösung wurde i.Vak vom Lösemittel befreit. Der Rückstand wurde in 30 mL THF abs. gelöst und unter Schutzgas mit 45 mL MeOH abs. versetzt und für 2 d bei RT gerührt. Nach Beenden der Reaktion (DC-Kontrolle, CyH/EtOAc = 1/1, mit KMnO₄ angefärbt) wurde die Reaktion am Rotationsverdampfer eingengt und einer Säulenchromatographie (Cyclohexan/EtOAc= 1/1, später Wechsel auf reines EtOAc) unterzogen, um das Produkt als farblosen Feststoff zu erhalten.

Ausbeute: 5.03 g (26.9 mmol, 95 %, Lit. 99 %)^[176];

Smp.: 61 – 63 °C;

UV/VIS (Acetonitril): λ_{max} = 298 nm, ϵ = $1.88 \cdot 10^2 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$;

λ_{max} = 317 nm, ϵ = $1.77 \cdot 10^2 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$;

λ_{max} = 332 nm, ϵ = $9.01 \cdot 10^1 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$;

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.87 (dd, ²*J* = 11.0 Hz, ³*J* = 4.20 Hz, 2H, CHCH₂O), 3.99 (dd, ²*J* = 11.0 Hz, ³*J* = 3.36 Hz, 2H, CHCH₂O), 4.03–4.08 (m, 1 H, CHCH₂O), 7.08 (br. s, 1H, NH) ppm;

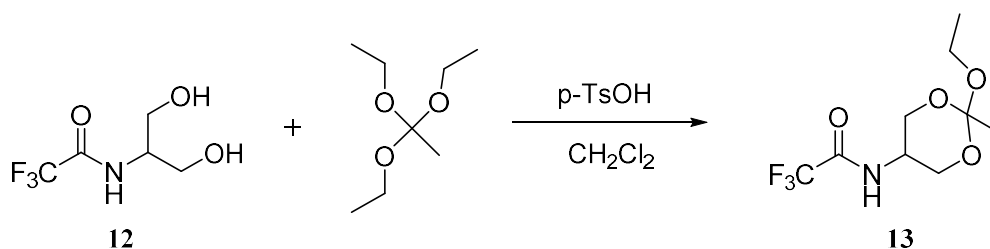
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 51.9 (CHCH₂OH), 53.2 (2 x CHCH₂OH) ppm; CF₃ und CO nicht detektiert;

MS (EI, 70 eV): *m/z* = 188 (M⁺, 1 %), 156 (M⁺-CH₂OH, 100 %), 139 (M⁺-(CH₂OH, OH) 79 %), 69 (CF₃⁺, 44 %), 42 (NHCH₂CH₂, 31 %), 31 (CH₂OH, 28 %);

EA: ber.: C: 32.09 %, H: 4.31 %, N: 7.49 %; gef.: C: 32.43 %, H: 4.26 %, N: 7.69 %;

FT-IR (ATR): 3512 (m, -OH), 3435 (m, -OH), 3230 (m, -CONH-), 3086 (m, -CONH-), 2931 (m, -CH₃, -CH₂-), 2866 (m, -CH₃, -CH₂-), 1705 (s, C=O), 1560 (m, -CONH-), 1454 (m, -CH₃, -CH₂-), 1369 (m, CF₃), 1203, 1149, 1038, 1001, 982, 920, 798, 771, 723, 706, 638 cm⁻¹.

Darstellung von 2,2,2-Trifluor-N-(2-ethoxy-2-methyl-1,3-dioxan-5-yl)-acetamid (13)



1.45 g (7.70 mmol) Diol **12** wurden in 40 mL Dichlormethan gelöst und unter Rühren mit 2.3 mL (2.01 g, 12.4 mmol) und bei RT 90 min gerührt. Laut DC-Kontrolle (CyH/EtOAc = 2/1, angefärbt mit KMnO₄) war kein Edukt mehr vorhanden. Die Reaktionsmischung wurde viermal mit je 30 mL bidest. Wasser extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und mit K₂CO₃ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert, der Rückstand mit 2 mL Dichlormethan und 10 mL *n*-Pentan versetzt und das Lösemittel bei 250 mbar abdestilliert, um **13** als farblosen Feststoff zu erhalten.

Ausbeute: 1.38 g (5.37 mmol, 70 %);

Smp.: 83 – 84 °C;

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.17$ (t, $^3J = 7.04$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 1.39 (s, 3H, CCH_3), 3.46 (q, $^3J = 7.04$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 3.65–3.8 (m, 2H, CHCH_2O), 3.70 (m, 1H, CHCH_2O), 4.13–4.16 (m, 2H, CHCH_2O), 9.74 (br. s, 1H, NH) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 15.1$ (OCH_2CH_3), 22.5 (CH_3), 43.9 (CHCH_2O), 57.8 (OCH_2CH_3), 60.4 (2 x CHCH_2O), 15.1 (COCH_2CH_3), 115.8 (CF_3) und 156.6 (CO) ppm;

UV/VIS (Acetonitril): $\lambda_{\text{max}} = 297.2$ nm, $\epsilon_{\lambda} = 1.03 \cdot 10^5$ L $\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1}$;

$\lambda_{\text{max}} = 308.8$ nm, $\epsilon_{\lambda} = 1.07 \cdot 10^5$ L $\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1}$;

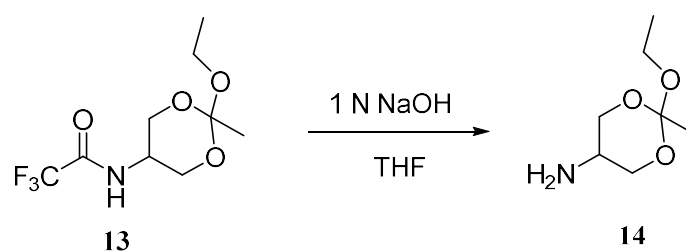
$\lambda_{\text{max}} = 329.4$ nm, $\epsilon_{\lambda} = 1.14 \cdot 10^5$ L $\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1}$;

MS (EI, 70 eV): $m/z = 272$ (10 %), 230 ($\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{CH}_3$, 5 %), 212 ($\text{M}^+ - \text{OCH}_2\text{CH}_3$, 100 %), 170 (75 %), 139 (40), 43 (94);

EA: ber.: C: 42.03 %, H: 5.49 %, N: 5.45 %; gef.: C: 41.80 %, H: 5.49 %, N: 5.68 %;

FT-IR (ATR): 3298 (m, -OH), 3091 (m, -CONH-), 3010 (m, -CONH-), 2987 (m, -CH₃, -CH₂-), 2956 (m, -CH₃, -CH₂-), 2894 (m, -CH₃, -CH₂-), 1693 (s, $-(\text{CH}_2\text{O})_2\text{C}(\text{OR})\text{CH}_3$), 1556 (m, -NH-), 1452 (w, -CH₃, -CH₂-), 1387 (m, -CH₃), 1279, 1250, 1186 und 1146 (Ester), 1090, 1057, 984, 949, 922, 870, 808, 725, 631 cm^{-1} .

Darstellung von 2-Ethoxy-2-methyl-1,3-dioxan-5-amin (**14**)



In einem 50 mL-Rundkolben wurden 930 mg (3.62 mmol) Orthoester **13** in 15 mL THF abs. gelöst und mit 15 mL 1 N NaOH versetzt. Die Lösung wurde für 4.5 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde mit 15 mL Dichlormethan versetzt und dreimal mit je 30 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Kaliumcarbonat getrocknet und i.

Vak. vom Lösemittel befreit, um den Aminoorthoester **14** als farbloses Öl zu erhalten, das bei längerem Stehen auskristallisierte.

Ausbeute: 484 mg (3.00 mmol, 83 %);

Smp.: 52 - 54 °C;

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.14 (t, ³J = 7.08 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.34 (s, 3H, CCH₃), 1.80 (br. s, 2H, NH₂), 2.57 (m, 1H, CHCH₂O), 3.35–3.38 (m, 2H, CHCH₂O), 3.44 (q, ³J = 7.08 Hz, 2H, CH₂CH₃), 4.03–4.07 (m, 2H, CHCH₂O) ppm;

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 15.2 (OCH₂CH₃), 22.7 (CH₃), 43.9 (CHCH₂O), 57.5 (OCH₂CH₃), 65.3 (2 x CHCH₂O), 110.7 (COCH₂CH₃) ppm;

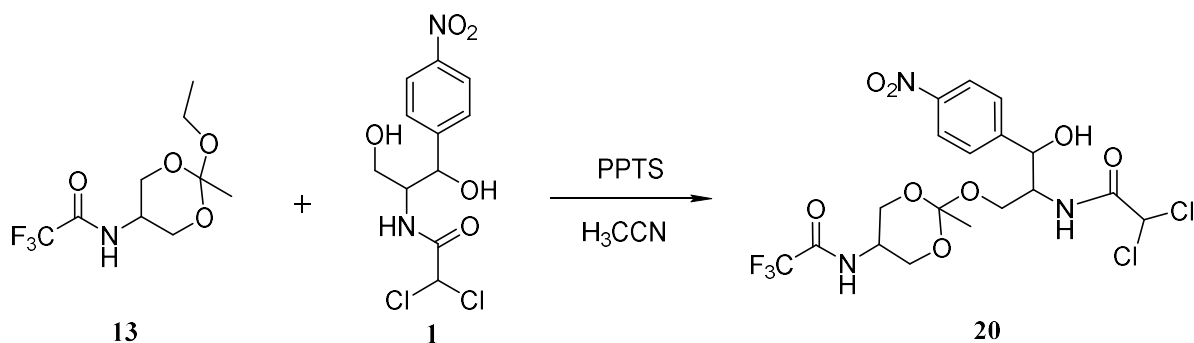
UV/VIS (Acetonitril): nicht detektiert;

FT-IR (ATR): 3377 (m, -NH₂), 2976 (m, -CH₃, -CH₂-), 2937 (m, -CH₃, -CH₂-), 2883 (m, -CH₃, -CH₂-), 1591 (m, -NH₂), 1454 (m, -CH₃, -CH₂-), 1381 (s, -C-O-CH₂CH₃), 1300, 1252 (CF₃), 1155 und 1132 (-(CH₂O)₂C(OC₂H₅)CH₃), 1059, 1032, 984, 947, 914, 868, 812, 754, 716 cm⁻¹;

MS (ESI, pos.): gef.: 162.11247, ber.: 162.1130 (C₇H₁₆NO₃);

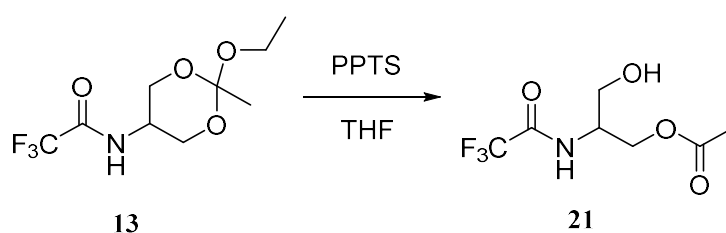
HR-MS (ASAP, pos.): gef.: 162.1125, ber.: 162.1130 (C₇H₁₆NO₃);

Darstellungsversuche des Testsystems 2,2,2-Trifluor-N-(2-(2-(2,2-dichloracetamido)-3-hydroxy-3-(4-nitrophenyl)propoxy)-2-methyl-1,3-dioxan-5-yl)-acetamid (20)



300 mg (1.17 mmol) des geschützten Orthoesters **13** wurden in 25 mL Acetonitril gelöst, mit 380 mg (1.18 mmol) **1** und 3.00 mg (11.9 μmol) PPTS versetzt und für 3.5 h auf 105 °C erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung wurde diese i. Vak. eingeeengt, mit 20 mL Ethylacetat, das über Kaliumcarbonat gelagert wurde, versetzt und dreimal mit je 30 mL bidest. Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und i.Vak. vom Lösemittel befreit, jedoch wurde kein gewünschtes Produkt erhalten.

*Umlagerung des Orthoesters **13** zu 3-Hydroxy-2-(2,2,2-trifluoracetamido)-propylacetat (**21**)*



835 mg (3.25 mmol) des Orthoesters **13** wurden in 20 mL THF gelöst und mit 2.00 mg PPTS (7.96 μmol) versetzt und bei RT für 18 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde i.Vak. vom Lösemittel befreit, mit Diethylether und halbgesättigter NaCl-Lösung versetzt und die wässrige Phase zweimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Kaliumcarbonat getrocknet und i.Vak. vom Lösemittel befreit, um **21** als farbloses Öl zu erhalten.

Ausbeute: 629 mg (2.74 mmol, 84%);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.99 (s, 3H, COCH₃), 3.45–3.56 (m, 1H, CHCH₂O), 3.57–3.65 (m, 1H, CHCH₂O), 4.00–4.03 (m, 1H, CHCH₂O), 4.14–4.17 (m, 1H, CHCH₂O), 4.19–4.21 (m, 1H, CHCH₂O), 4.99–5.01 (m, 1H, OH), 9.40 (br. s, 1H, NH) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 20.6 (OCH₃), 48.9 (CHCH₂O), 62.3 (CHCH₂CO), 64.8 (CHCH₂OH), 170.2 (COCH₃) ppm;

UV/VIS (Acetonitril): λ_{max} = 298.4 nm, ϵ = 7.34*10¹ L cm⁻¹mol⁻¹;

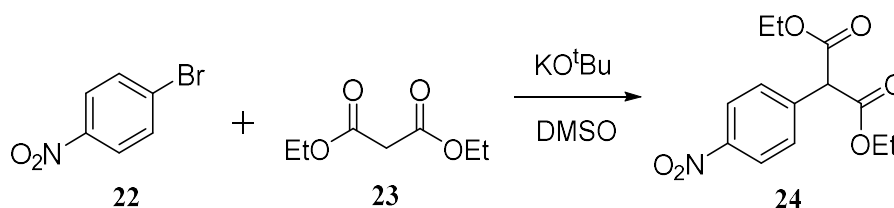
λ_{max} = 316.6 nm, ϵ = 6.01*10¹ L cm⁻¹mol⁻¹;

λ_{max} = 331.2 nm, ϵ = 4.75*10¹ L cm⁻¹mol⁻¹;

MS (ESI, pos.): gef.: 252.0455, ber. 252.0454 (C₇H₁₀F₃NO₄Na);

FT-IR (ATR): 3419 (m, -OH), 3309 (m, -CONH-), 3095 (m, -CONH-), 2958 (m, -CH₃, -CH₂-), 2891 (m, -CH₃, -CH₂-), 1709 (s, v(CO)), 1558 (m, -NH-), 1462 (w, -CH₃, -CH₂-), 1369 (m, -CH₃), 1209, 1176 und 1155 (s, -CH₂-O-CO-CH₃), 1047, 984, 928, 885, 854, 727, 633 cm⁻¹.

Darstellung von Diethyl-2-(4-nitrophenyl)malonat (24)^[221]



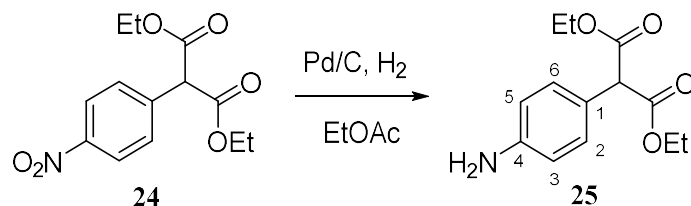
Zu einer Lösung aus 14.0 g (125 mmol) Kalium-*tert*-butanolat in 100 mL trockenem DMSO wurde unter Schutzgasatmosphäre 18.9 mL (20.0 g, 125 mmol) Diethyl-2-(4-nitrophenyl)malonat (**22**) über einen Zeitraum von 20 min zugetropft. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung auf RT wurde portionsweise 9.15 g (45.3 mmol) 4-Nitrobrombenzol (**23**) innerhalb von 30 min zugegeben. Die Reaktionsmischung färbte sich dunkelviolett und wurde anschließend 3 h lang auf 105 °C erhitzt. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach vollständiger Umsetzung des Edukts wurde die Lösung mit 200 mL Wasser versetzt und anschließend sechsmal mit 150 mL EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde i.Vak. entfernt und die rotbraune Flüssigkeit mittels Säulenchromatographie (CyH/EtOAc = 10/1) aufgearbeitet. Anschließend wurde eine Kugelrohrdestillation bei 75 °C durchgeführt, um das Produkt als gelbes Öl zu erhalten, welches später auskristallisierte.

Ausbeute: 9.30 g (33.1 mmol, 73 %, Lit. 84.2 %);

Smp.: 58 °C;

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.25 (t, 6H, CH₃-CH₂, ³J = 7.1 Hz), 4.15–4.32 (m, 4H, CH₂CH₃), 4.70 (s, 1H, COHCCO), 7.58 (dd, 2H, H₃ und H₅, ³J_{5,6}, ³J_{2,3} = 6.8 Hz), 8.20 (dd, 2H, H₂ und H₆, ³J_{5,6}, ³J_{2,3} = 6.5 Hz) ppm;

Die erhaltenen Daten stimmen mit der Literatur überein.^[221]

Darstellung von Diethyl-2-(4-aminophenyl)malonat (**25**)

6.10 g (21.7 mmol) Diethyl-2-(4-nitrophenyl)malonat (**24**) wurden in einem 250 mL-Schlenkkolben mit 110 mL Ethylacetat versetzt. Unter Schutzgasatmosphäre wurden 250 mg Pd/C-Katalysator hinzugefügt und anschließend ein Ballon mit Wasserstofffüllung aufgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei RT gerührt und der Reaktionsverlauf dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach vollständiger Umsetzung wurde der Katalysator mittels Filtration und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, um das Produkt **25** als gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 5.36 g (21.4 mmol, 99%);

R_f-Wert: 0.37 (CyH/EtOAc = 2/1);

UV/VIS (Acetonitril): $\lambda_{\max} = 249.6 \text{ nm}, 292.8 \text{ nm}, \epsilon = 4.28 \cdot 10^4 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$;

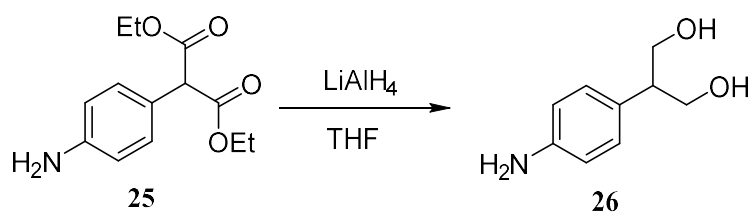
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 1.16$ (t, 6H, CH₃-CH₂, ³J = 7.1 Hz), 4.03–4.20 (m, 4H, CH₂CH₃), 4.62 (s, 1H, COHCCO), 5.17 (s, 2H, NH₂), 6.52 (dd, 2H, H₃ und H₅, ³J_{5,6}, ³J_{2,3} = 6.5 Hz), 6.99 (dd, 2H, H₂ und H₆, ³J_{5,6}, ³J_{2,3} = 6.5 Hz) ppm;

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 13.9$ (2 x CH₃CH₂), 56.1 (COCHCO), 60.9 (2 x CH₃CH₂), 113.6 (C_{2,6}), 119.7 (C_{3,5}), 129.7 (C₁), 148.4 (C₄), 168.5 (2 x COOCH₂) ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3468$ (m, v(N-H)), 3378 (m, v(N-H)), 2982 (m, v(C-H)), 1724 (s, v(C=O)), 1624 (w, v(C=C_{arom})), 1517 (m, δ (N-H)), 1269 (m, δ (=C_{arom}-H)), 1142 (s, v(C-O)), 1028 (s), 834 (w) cm⁻¹;

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 251.1 ([M⁺], 32), 178.1 ([M⁺-(COOHCH₂CH₃)], 100), 150.1 (20), 122.1 (22), 106.1 ([M⁺-(C₆H₁₀O₄)], 51).

EA: ber.: C: 62.14 %, H: 6.82 %, N: 5.97 %; gef.: C: 62.00 %, H: 6.97 %, N: 6.35 %.

Darstellung von 2-(4-Aminophenyl)propan-1,3-diol (**26**)

5.36 g (21.4 mmol) Diethyl-2-(4-aminophenyl)malonat (**25**) wurden unter Schutzgasatmosphäre mit 120 mL THF versetzt und bei 0 °C portionsweise 3.66 g (96.4 mmol) Lithiumaluminiumhydrid hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde für 96 h auf 70 °C erhitzt und der Reaktionsverlauf chromatographisch verfolgt. Nach vollständiger Umsetzung des Malonats **25** wurde die Lösung nacheinander vorsichtig mit 30 mL 10%iger Kaliumhydroxidlösung und 200 mL bidest. Wasser versetzt und anschließend zehnmal mit je 200 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. destillativ entfernt. Die Aufarbeitung erfolgt mittels Säulenchromatographie (SiO₂; EtOAc:/CyH = /:1), um **26** als gelbe, ölige Flüssigkeit zu erhalten.

Ausbeute: 1.09 g (6.52mmol, 30%);

R_f-Wert: 0.15 (EtOAc:Cyclohexan = 9:1);

UV/VIS (Acetonitril): λ_{max} =242.0nm, 289.2 nm, $\epsilon = 1.03 \cdot 10^4 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$;

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ =2.56–2.62 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 3.45–3.62 (m, 4H, CHCH₂), 4.37 (t, 2H, CH₂OH, ³*J* = 5.2 Hz), 4.79 (s, 2H, NH₂), 6.47 (dd, 2H, *H*₃ und *H*₅, ³*J*_{5,6}, ³*J*_{2,3} = 6.5 Hz); 6.84 (dd, 2H, *H*₂ und *H*₆, ³*J*_{5,6}, ³*J*_{2,3} = 6.5 Hz) ppm;

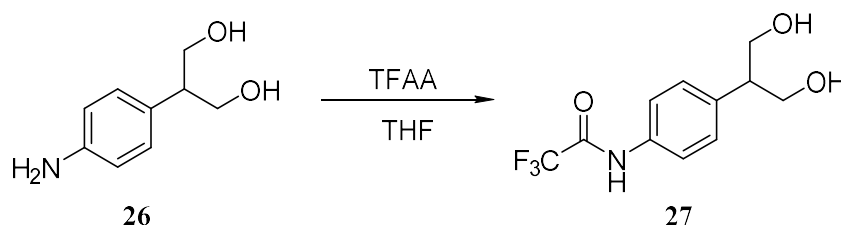
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 49.7 (CH₂CH), 63.3 (2x CH₂CH), 113.8 (*C*_{3,5}), 128.5 (*C*_{2,6}), 129.0 (*C*₁), 146.8 (*C*₄) ppm;

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 167.1 ([M⁺], 31), 136.1 ([M⁺-(CH₂OH)], 100), 118.1 ([M⁺-(CH₂OH, OH)], 27), 106.1 ([M⁺-(2x CH₂OH)], 35], 91.1 (13);

EA: ber.: C: 64.65 %, H: 7.84 %, N: 8.38 %; gef.: C: 64.88 %, H: 8.05 %, N: 8.26 %;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3338(s, $\nu(\text{O-H})$), 2927(m, $\nu(\text{C-H})$), 2875(m, $\nu(\text{C-H})$), 1614 (m, $\delta(\text{N-H})$), 1515 (s, $\nu(\text{C=Carom})$), 1257 (w, $\delta(\text{=Carom-H})$), 1024 (s), 826(s) cm^{-1} .

Darstellung von N-(4-(1,3-Dihydroxypropan-2-yl)phenyl)-2,2,2-trifluoracetamid (27)



1.09 g (6.52 mmol) 2-(4-Aminophenyl)propan-1,3-diol (**26**) wurden in einem Schlenkkolben vorgelegt und unter Stickstoffatmosphäre mit 150 mL trockenem THF versetzt. Bei 0 °C wird die Lösung langsam mit 1.50 mL (10.8 mmol, 2.27 g) Trifluoressigsäureanhydrid versetzt und 2 h bei RT gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde chromatographisch verfolgt, nach vollständiger Umsetzung von **26** wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer eingengt. Nun wurden nochmals 50 mL trockenes THF und 20 mL trockenes Methanol zugegeben und 16 h bei RT unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Rückstand i.Vak. vom Lösemittel befreit und einer Säulenchromatographie unterzogen (SiO_2 ; $\text{EtOAc}/\text{CyH} = 2/1$), um **27** als gelben Feststoff zu liefern.

Ausbeute: 1.27 g (4.82 mmol, 74%);

Schmelzpunkt: 138 °C;

R_f- Wert: 0.20 ($\text{CyH}/\text{EtOAc} = 1/2$);

UV/VIS (Acetonitril): $\lambda_{\text{max}} = 249 \text{ nm}$, $\epsilon = 2.59 \cdot 10^4 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$;

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ = 2.75–2.83 (m, 1H, CH_2CHCH_2), 3.5–3.70 (m, 4H, HOCH_2CH), 4.54 (t, 2H, CH_2OH , $^3J = 5.2 \text{ Hz}$), 7.24 (dd, 2H, H_2 und H_6 , $^3J_{5,6}$, $^3J_{2,3} = 6.7 \text{ Hz}$), 7.54 (dd, 2H, H_3 und H_5 , $^3J_{5,6}$, $^3J_{2,3} = 6.7 \text{ Hz}$), 11.17 (s, 1H, NH) ppm;

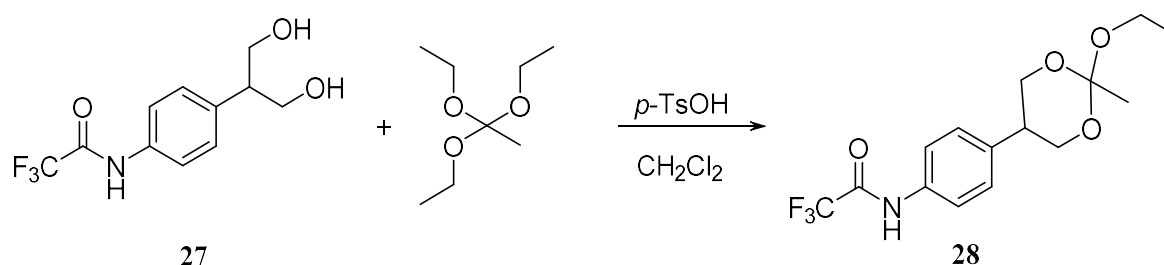
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 50.2 (CH_2CH), 62.7 (2x CH_2CH), 116.1 (q, $^1J_{\text{CF}} = 288.9 \text{ Hz}$, CF_3) 120.9 ($\text{C}_{2,6}$), 128.7 ($\text{C}_{3,5}$), 134.3 (C_1), 139.8 (C_4), 154.4 (q, $^2J_{\text{CF}} = 36.6 \text{ Hz}$, CF_3CO) ppm;

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 263.1 ($[M^+]$, 10), 232.1 ($[M^+-(CH_2OH)]$, 100), 215.1 ($[M^+-(CH_2OH, OH)]$, 100), 149.1 (15), 91.2 (18);

EA: gef.: C 50.4, H 4.67, N 5.25; ber. für $C_{11}H_{12}F_3NO_3$: C 50.19, H 4.60, N 5.32 %;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3289 (s, $\nu(O-H)$), 2943 (m, $\nu(C-H)$), 2883(m, $\nu(C-H)$), 1705 (m, $\nu(C=O)$), 1599 (s, $\nu(C=C_{arom})$), 1537 (s), 1421 (m), 1377 (m), 1346 (m), 1248 (m, $\delta(C=C_{arom}-H)$), 1180 (m), 1149 (m), 1070 (m), 1018 (m), 976, 947, 825, 716, 677 cm^{-1} .

Darstellung von N-(4-(2-Ethoxy-2-methyl-1,3-dioxan-5-yl)phenyl)-2,2,2-trifluoracetamid (28)



421 mg (1.57 mmol) *N*-(4-(1,3-Dihydroxypropan-2-yl)phenyl)-2,2,2-trifluoroacetamid (**27**), 0.47 mL (415 mg, 2.56 mmol) Triethylorthoacetat und 2.80 mg (16.0 μ mol) *p*-Toluolsulfonsäure wurden in 40 mL Dichlormethan gelöst und 90 min bei RT gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde chromatographisch verfolgt und nach vollständiger Reaktion des Edukts **27** wurde die Reaktionslösung mit bidest. Wasser gewaschen und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Phasen mit Kaliumcarbonat wurde das Lösungsmittel destillativ i. Vak. entfernt und der verbleibende Rückstand über Säulenchromatographie (CyH/EtOAc = 1/1) mit ALOX (Stufe III) aufgereinigt. Es entstand **28** als farbloser Feststoff.

Ausbeute: 477 mg (1.43 mmol, 90%);

Schmelzpunkt: 112-113 $^{\circ}C$;

R_f-Wert: 0.93 (ALOX; CyH/EtOAc:1:3);

EA: (+V₂O₅) gef.: C 53.94, H 5.40, N 4.43 %; ber.: C 54.05, H 5.44, N 4.20 %;

UV/VIS (Acetonitril): $\lambda_{\max} = 248 \text{ nm}$; $\epsilon = 1.02 \cdot 10^4 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$;

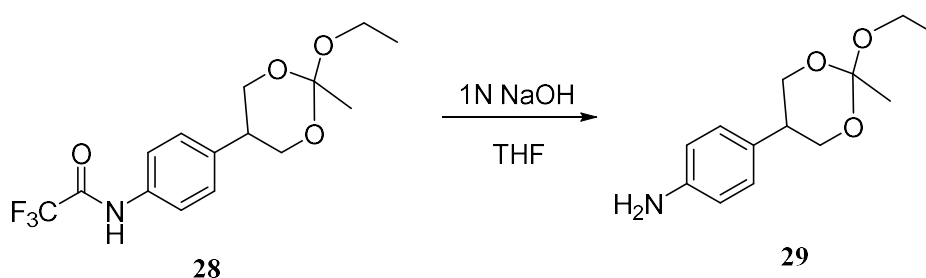
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 1.22$ (t, 3H, CH_2CH_3 , $^3J = 7.08 \text{ Hz}$), 1.40 (s, 3H, CH_3COOO), 3.10–3.18 (m, 1H, CH_2CHCH_2), 3.50 (q, 2H, CH_2CH_3 , $^3J = 7.04 \text{ Hz}$), 3.71–3.75 (m, 2H, CH_2CH), 3.98–4.04 (m, 2H, CH_2CH), 7.29 (dd, 2H, H_3 und H_5 , $^3J_{5,6}$, $^3J_{2,3} = 6.68 \text{ Hz}$), 7.62 (dd, 2H, H_2 und H_6 , $^3J_{5,6}$, $^3J_{2,3} = 6.68 \text{ Hz}$), 11.3 (s, 1H, NH) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 15.2$ (CH_2CH_3), 22.5 (CH_3COOO), 38.5 (CH_2CH), 57.7 (CH_2CH_3), 63.2 (2x CH_2CH), 110.4 (CH_3COOO), 115.8 (q, $^1J_{\text{CF}} = 288.7 \text{ Hz}$, CF_3) 121.3 ($\text{C}_{2,6}$), 128.2 ($\text{C}_{3,5}$), 135.3 (C_4), 135.4 (C_1), 154.4 (q, $^2J_{\text{CF}} = 36.9 \text{ Hz}$, CF_3CO) ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3213$ (m, $\nu(\text{N-H})$), 2979 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2929 (m, $\nu(\text{C-H})$), 1703 (s, $\nu(\text{C=O})$), 1610 (s, $\nu(\text{C=C}_{\text{arom}})$), 1551 (m), 1520 (w), 1296 (m), 1246 (s, $\delta(\text{C=C}_{\text{arom-H}})$), 1142 (s, $\nu(\text{C-O})$), 1041 (s), 1014 (s), 947 (s), 883, 866, 827, 762, 735, 681 cm^{-1} ;

MS (ESI, pos.): gef.: 356.1089, ber. 356.1080 ($\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{NO}_4\text{Na}$).

Darstellung von 4-(2-Ethoxy-2-methyl-1,3-dioxan-5-yl)anilin (**29**)



In einem 50 mL Rundkolben wurden 119 mg (356 μmol) Orthoester **28** in 10 mL THF abs. gelöst und mit 10 mL 1N NaOH versetzt. Die Lösung wurde für 4.5 h bei RT gerührt und nach vollendeter Reaktion mit 15 mL Dichlormethan versetzt und dreimal mit je 30 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Kaliumcarbonat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeeengt, um den Aminoorthoester **29** als farbloses Öl zu erhalten.

Ausbeute: 81.6 mg (344 μmol , 97 %);

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.20 (t, 3H, OCH₂CH₃, ³*J* = 7.0 Hz), 1.37 (s, 3H, CH₃COOO), 2.87–2.95 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 3.48 (q, 2H, OCH₂CH₃, ³*J* = 7.0 Hz), 3.60–3.64 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 3.88–3.94 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 4.98 (s br., 2H, NH₂), 6.50 (dd, 2H, *H*₂ und *H*₆, ³*J*_{5,6}, ³*J*_{2,3} = 6.5 Hz); 6.86 (dd, 2H, *H*₃ und *H*₅, ³*J*_{5,6}, ³*J*_{2,3} = 6.5 Hz) ppm;

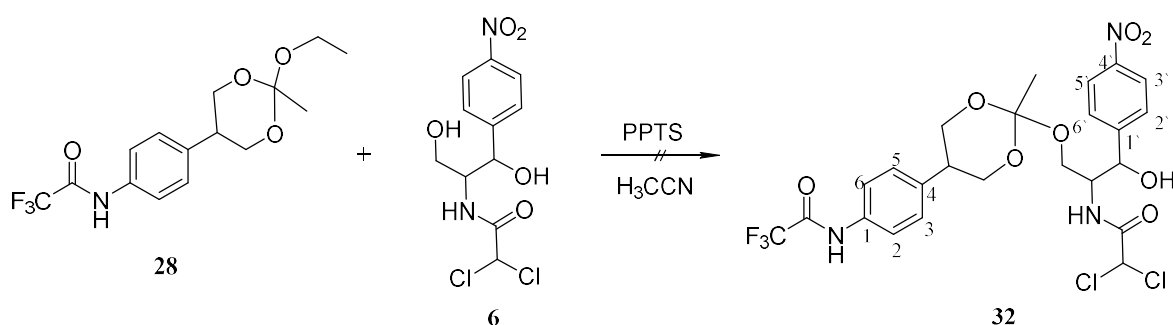
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 15.2 (OCH₂CH₃), 22.9 (CH₃COOO), 38.2 (CH₂CHCH₂), 57.7 (OCH₂CH₃), 63.7 (CH₂CHCH₂), 110.3 (CH₃COOO), 114.0 (C_{2,6}), 124.6 (C₄), 128.0 (C_{3,5}), 147.8 (C₁) ppm;

UV/VIS (Acetonitril): nicht detektiert;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3462 (m, v(N-H)), 3365 (m, v(N-H)), 2970 (m, v(C-H)), 2889 (m, v(C-H)), 1726, 1635 (m, δ (-N-H)), 1614 (m, v(C=C_{arom})), 1518 (s, v(C=C_{arom})), 1452, 1385 (s, δ (-CH₃)), 1292 (m, δ (C-N)), 1252 (s, δ (C-N)), 1140 (ss, v(-C-O-C-)), 1034 (ss, v(-C-O-C-)), 947 (s), 881 (s), 864 (m), 825 (s), 735 (w) cm⁻¹;

MS (ESI, pos.): gef.: 238.1433, ber. 238.1438 (C₁₃H₂₀NO₃).

Versuch der Darstellung von N-(4-(2-(2-(2,2-Dichloracetamido)-3-hydroxy-3-(4-nitro-phenyl)propoxy)-2-methyl-1,3-dioxan-5-yl)phenyl)-2,2,2-trifluoracetamid (32)

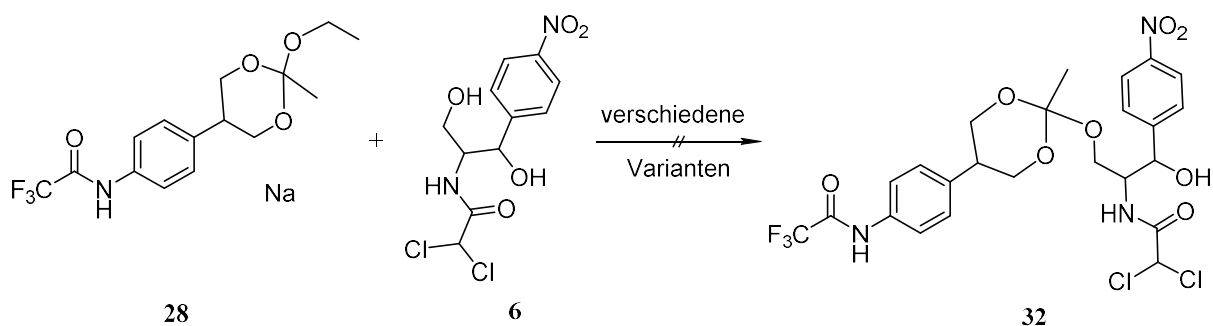


80.0 mg (240 μ mol) des geschützten Orthoesters **28** wurden in 15 mL trockenem Acetonitril gelöst und mit 77.0 mg (240 μ mol) **6** und 800 μ g (2.40 μ mol) PPTS versetzt. Die Reaktion wurde für 3.5 h bei 80 °C erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung wurde diese i. Vak. eingengt, um 120 mg eines farblosen Öls zu erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.93 (s, 3H, CH₃COOO), 3.01–3.05 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 3.34–3.38 (m, 1H, CH₂CHNHCOCHCl₂), 3.56–3.64 (m, 3H, OCH₂CH, CH₂CHNHCOCHCl₂), 3.91–3.95 (m, 1H, CH₂CHNHCOCHCl₂), 4.18–4.23 (m, 1H, OCH₂CH), 4.31–4.35 (m, 1H, OCH₂CH), 6.05 (s, 1H, CHOH), 6.05 (s br., 1H, CHOH), 6.47 (s, 1H, CH₂CHNHCOCHCl₂), 7.28–7.31 (m, 2H, H_{3,5}), 7.56–7.61 (m, 4H, H_{2,6}' und H_{2,6}), 8.15–8.18 (m, 2H, H_{3,5}'), 8.33 (d, 1H, NHCOCHCl₂), 11.2 (s, 1H, NHCOCF₃) ppm;

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 20.7 (CH₃COOO), 46.4 (CH₂CHCH₂), 56.9 (CH₂CHNHCOCHCl₂), 60.3 (CH₂CHNHCOCHCl₂), 62.3 (CH₂CHCH₂), 64.9 (CH₂CHCH₂), 66.5 (CHCl₂), 69.0 (CHOH), 115.9 (q, ¹J_{CF} = 288.7 Hz, CF₃), 117.3 (C_{3,5}'), 121.1 (C_{2,6}'), 127.4 (C_{2,6}), 128.6 (C_{3,5}), 146.5 (C₁'), 151.3 (C₄'), 154.4 (q, ²J_{CF} = 36.8 Hz, CF₃CO), 163.4 (COCHCl₂), 170.4 (CH₃COOO);

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3298 (m, -OH), 3077 (m, -CONH-), 2956 (m, ν (C-H)), 2895 (m, ν (C-H)), 1712 (s, ν (C=O)), 1610 (s, ν (C=C_{arom})), 1550 (s, -NH-), 1516, 1466 (w), 1421 (m), 1244 (s), 1200 (s), 1149 (s), 1105 (w), 1036 (s, ν (C-O)), 903 (m), 829 (s), 723, 650 cm⁻¹.



Variante a: PPTS, Toluol abs.

In einem Zweihalskolben wurden 150.0 mg (450 μ mol) des geschützten Orthoesters **28** und 72.0 mg (223 μ mol) **6** vorgelegt und 20 mL Toluol abs. und 1.00 mg (3.98 μ mol) PPTS zugegeben. Die Reaktion wurde für 4 h auf 150 °C erhitzt, um entstehendes Ethanol und Wasser abdestillieren. Nach Abkühlen der Lösung wurde diese i. Vak. eingengt, und ein ¹H-NMR-Spektrum des Reaktionsgemischses vermessen. Dies zeigt das Produkt der im Hauptteil diskutierten Umlagerung (Kapitel 3.1.2.1).

Variante b: *p*-TsOH, THFabs./Toluol abs.

In einen 50 mL-Dreihalskolben wurden 150.0 mg (464 μmol) **6** in 20 mL THFabs./Toluol abs. vorgelegt und mit 52.0 mg (156 μmol) des geschützten Orthoesters **28** und 5.60 mg (32.5 μmol) *p*-TsOH versetzt. Die Reaktion wurde für 4.5 h bei 100 °C destilliert, um entstehendes Ethanol und Wasser abzudestillieren. Nach Abkühlen der Lösung wurde diese mit 0.05 mL Triethylamin versetzt, i. Vak. eingengt, und ein ^1H -NMR-Spektrum des Reaktionsgemisches vermessen. Dies zeigt das Produkt der im Hauptteil diskutierten Umlagerung (Kapitel 3.1.2.1).

Variante c: PPTS, CH_2Cl_2 abs., Molsieb 4 Å

2.00 g vorgetrocknetes Molsieb 4 Å wurden in einen 50 mL Schlenkkolben vorgelegt und unter Schutzgas 61.0 mg (180 μmol) der geschützte Orthoester **28**, 59.0 mg (183 μmol) **6** und 10 mL CH_2Cl_2 abs. zugegeben. Anschließend wurden 600 μg (2.40 μmol) PPTS der Reaktion zugeführt und bei 40 °C gerührt. Nach 4 h wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 200 μL Pyridin versetzt. Die Lösung wurde vom Molsieb abfiltriert und i. Vak. vom Lösemittel befreit, um den umgelagerten Orthoester zu erhalten.

Variante d: PPTS, MeCN abs.

75.0 mg (225 μmol) **28** wurden in einem Schlenkkolben vorgelegt und mit 20 mL abs. MeCN versetzt. Unter Rühren wurden 48.5 mg (150 μmol) **6** und eine katalytische Menge PPTS zugefügt. Die Reaktion wurde für 1 h auf 55 °C erhitzt und, nach Abkühlen auf RT, mit 50 mg festem Natriumcarbonat und anschließend wässriger Natriumcarbonat-Lösung versetzt. Die Reaktionslösung wurde viermal mit Dichlormethan extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über Kaliumcarbonat getrocknet und i. Vak. vom Lösemittel befreit. Um alle Lösemittelreste zu entfernen wurde anschließend das Öl noch an der Ölpumpe getrocknet. Das ^1H -NMR-Spektrum des Reaktionsgemisches zeigte jedoch das Produkt der im Hauptteil diskutierten Umlagerung (Kapitel 3.1.2.1).

Variante e: *p*-TsOH, CH_2Cl_2 abs./MeCN abs.

60.0 mg (180 μmol) **28** wurden in 20 mL CH_2Cl_2 abs. gelöst und mit 116 mg (360 μmol) **6** und einer katalytischen Menge *p*-TsOH versetzt und bei RT gerührt. Da sich **6** nicht in CH_2Cl_2 löst, wurde zusätzlich noch 10 mL MeCN abs. zugegeben. Nach zwei Stunden wurde eine DC-Kontrolle durchgeführt und anschließend nochmals 2 mg *p*-TsOH zugegeben, da es zu keiner Reaktion der Edukte kam. Nach sechs Stunden und erfolgter DC-Kontrolle wurde eine Umsetzung erhalten. Daher wurde die Lösung einrotiert und ein ^1H -NMR-Spektrum des

Rohproduktes gemessen. Dies zeigt das Produkt der im Hauptteil diskutierten Umlagerung (Kapitel 3.1.2.1).

Variante f: PPTS, Toluol abs.

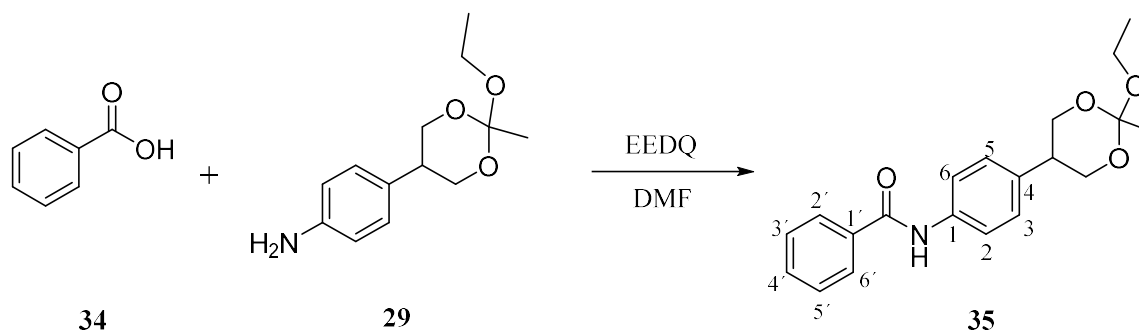
100 mg (300 μ mol) **28** wurden in einem evakuiert und bestickten Schlenkkolben vorgelegt und mit 20 mL Toluol abs. versetzt. Anschließend wurden 65.0 mg (200 μ mol) **6** und zwei Kristalle PPTS zugegeben und bei RT gerührt. Da sich die Substanzen nicht lösen wurde die Reaktion auf 110 °C für 3 h erhitzt. Beim Abkühlen fiel ein weißer Feststoff aus, der sich in Chloroform nicht löst. Das Kontroll-DC zeigte die Umsetzung zum Umlagerungsprodukt.

Variante g: PPTS, MeCN abs.

100 mg (300 μ mol) **28** wurden in einem zunächst evakuierten und anschließend mit Stickstoff befüllten Schlenkkolben vorgelegt und mit 20 mL MeCN abs. versetzt. Anschließend wurden 65.0 mg (200 μ mol) **6** und zwei Kristalle PPTS zugegeben und auf 55 °C für 1 h erhitzt. Das Kontroll-DC zeigte eine Umsetzung, jedoch zeigte das gemessene ¹H-NMR-Spektrum des Reaktionsgemisches, dass das Umlagerungsprodukt entstand.

Variante h: PPTS, DMF abs.

100 mg (300 μ mol) **28** wurden in einem zunächst evakuierten und anschließend mit Stickstoff befüllten Schlenkkolben vorgelegt und mit 20 mL DMF abs. versetzt. Anschließend wurden 65.0 mg (200 μ mol) **6** und zwei Kristalle PPTS zugegeben und 1 h bei RT im Dunkeln gerührt. Die Lösung wurde i.Vak. vom Lösemittel entfernt, jedoch zeigte das gemessene ¹H-NMR-Spektrum des Rohproduktes lediglich den umgelagerten Orthoester.

Darstellung von *N*-(4-(2-Ethoxy-2-methyl-1,3-dioxan-5-yl)phenyl)benzamid (**35**)

18.0 mg (147 μmol) Benzoesäure **34** wurden in 2 mL DMF gelöst und mit 100 μg EEDQ (gelöst in 1 mL DMF) versetzt und fünf Minuten im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurden 80.0 mg 4-(2-Ethoxy-2-methyl-1,3-dioxan-5-yl)anilin (**29**) in 2 mL DMF gelöst und zu der Reaktion gegeben. Die Reaktion wurde 18 h bei RT gerührt und anschließend mit 20 mL Dichlormethan versetzt. Die organische Phase wurde viermal mit je 20 mL bidest. Wasser extrahiert, mit Kaliumcarbonat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert, um **35** als farbloses Öl zu erhalten.

Ausbeute: 21.0 mg (61.5 μmol ; 42 %);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.22 (t, 3H, CH_2CH_3 , $^3J = 7.09$ Hz), 1.41 (s, 3H, CH_3COOO), 3.07–3.14 (m, 1H, CH_2CHCH_2), 3.51 (q, 2H, CH_2CH_3 , $^3J = 7.10$ Hz), 3.70–3.76 (m, 2H, CH_2CH), 3.99–4.05 (m, 2H, CH_2CH), 7.22 (dd, 2H, H_3 und H_5 , $^3J_{5,6}$, $^3J_{2,3} = 8.50$ Hz), 7.50–7.55 (m, 2H, $H_{3'}$ und $H_{5'}$), 7.57–7.61 (m, 1H, $H_{4'}$), 7.74 (dd, 2H, H_2 und H_6 , $^3J_{5,6}$, $^3J_{2,3} = 8.40$ Hz), 7.93–7.96 (m, 2H, $H_{2'}$ und $H_{6'}$), 10.2 (s, 1H, NH) ppm;

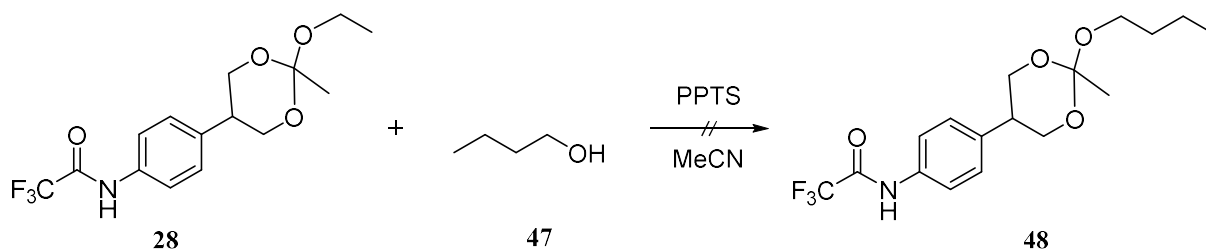
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 15.2 (CH_2CH_3), 22.9 (CH_3COOO), 38.3 (CH_2CH), 57.7 (CH_2CH_3), 63.4 (2x CH_2CH), 110.4 (CH_3COOO), 120.5 ($\text{C}_{2,6}$), 127.7 ($\text{C}_{2',6'}$), 127.8 ($\text{C}_{3,5}$), 128.4 ($\text{C}_{3',5'}$), 131.6 ($\text{C}_{4'}$), 133.2 (C_4), 134.9 ($\text{C}_{1'}$), 138.2 (C_1), 165.5 (NHCO) ppm;

UV/Vis (Acetonitril): nicht detektiert;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3309, 2929 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2887 (m, $\nu(\text{C-H})$), 1720 (m), 1655 (m), 1601 (m), 1520 (s), 1416 (m), 1385 (m), 1321 (m), 1238 (s), 1153 (m), 1142 (m), 1039 (s), 947 (m), 885, 829, 768, 708 cm^{-1} .

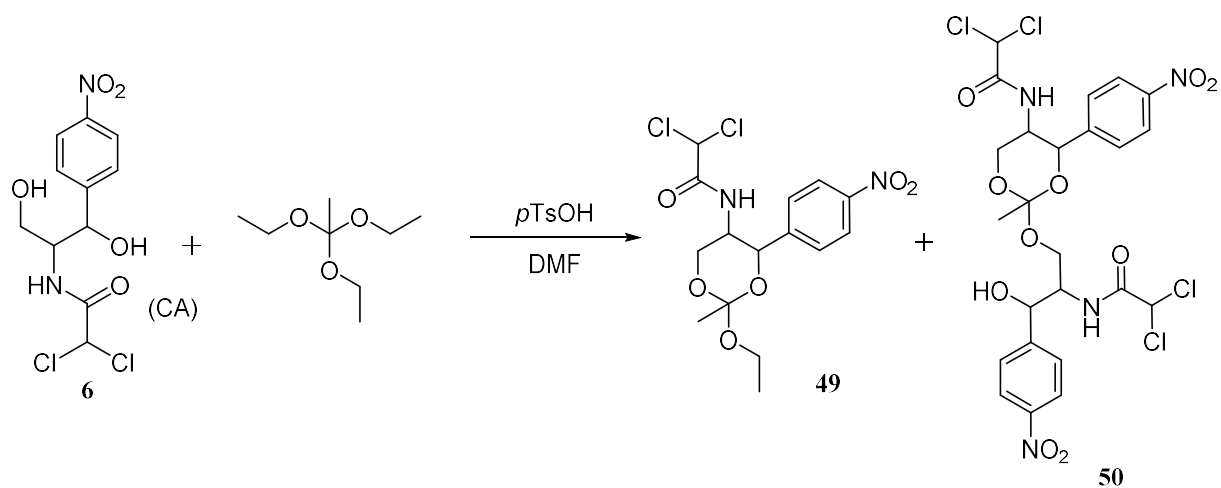
MS (ESI, pos.): gef.: 364.1520, ber. 364.1519 (C₂₀H₂₃NO₄Na).

Versuche der Darstellung von N-(4-(2-Butoxy-2-methyl-1,3-dioxan-5-yl)phenyl)-2,2,2-trifluoracetamid (48)



160 mg (480 μ mol) **28** wurden in 8 mL MeCN gelöst und mit 29.0 μ L (23.5 mg, 317 μ mol) *n*-Butanol (**47**) versetzt. Es wurden zwei Kristalle PPTS zugegeben und die Reaktionslösung für 1 h bei 55 °C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Lösung mit 10 mL CH₂Cl₂ und 15 mL Milliporewasser, das mit Ammoniak-Lösung auf pH = 8 eingestellt wurde, versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 30 mL CH₂Cl₂ extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, mit Kaliumcarbonat getrocknet und das Lösemittel i.Vak. entfernt. Das aufgenommene ¹H-NMR des Rohproduktes zeigte die Signale des Umlagerungsproduktes.

Darstellung von 2,2-Dichlor-N-(2-ethoxy-2-methyl-4-(4-nitrophenyl)-1,3-dioxan-5-yl)acetamid (49) und 2,2-Dichlor-N-(3-((5-(2,2-dichloracetamido)-2-methyl-4-(4-nitrophenyl)-1,3-dioxan-2-yl)oxy)-1-hydroxy-1-(4-nitrophenyl)propan-2-yl)acetamid (50)



6.97 g (21.6 mol) **6** wurden in einem Dreihalskolben in 40 mL DMF abs. gelöst, mit 1.30 mg *p*-TsOH versetzt und mit Wasserabscheider auf 50 °C erhitzt. Bei Erreichen von 50 °C wurden 1.13 mL (1.00 g, 6.17 mmol) Triethylorthoacetat langsam zugetropft und die Reaktion für 3 h bei 90 °C und anschließend 1 h bei 110 °C erhitzt. Anschließend wurde die Lösung auf RT gekühlt, das Lösemittel i.Vak. entfernt und der Rückstand durch Säulenchromatographie (CyH/EtOAc = 1/1) mit ALOX (Aktivitätsstufe III) aufgereinigt. Die einzelnen Fraktionen wurden i.Vak. vom Lösemittel befreit, um unterschiedliche Produktgemische zu erhalten. Rein isolierte Produkte **49** wurde als gelbes Öl und **50** als gelber Feststoff erhalten und analysiert.

Produkt 49:

Ausbeute: 453 mg des reinen Produkts (1.15 mmol, 19%);

R_f-Wert: 0.80 (ALOX; CyH/EtOAc = 1/1);

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.20 (t, 3H, OCH₂CH₃, ³J = 7.04), 1.59 (s, 3H, CCH₃), 3.51 (q, 2H, OCH₂CH₃, ³J = 7.08), 3.61 (dd, 1H, NHCHCH₂OCCH₃, ³J = 10.0, ²J = 11.6), 4.23 (ddd, 1H, NHCHCH₂OCCH₃, ³J = 9.56, ³J = 1.96), 4.40 (dd, 1H, NHCHCH₂OCCH₃, ³J = 9.52, ²J = 11.6), 5.54 (d, 1H, C₄CHNH, ³J = 2.04), 6.46 (s, 1H, CHCl₂), 7.61 (dd, 2H, H₂ und H₆, ³J_{5,6}, ³J_{2,3} = 8.84 Hz), 8.18 (dd, 2H, H₃ und H₅, ³J_{5,6}, ³J_{2,3} = 8.80 Hz), 8.62 (s, 1H, NH) ppm;

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 15.1 (OCH₂CH₃), 22.8 (CCH₃), 46.0 (NHCHCH₂OCCH₃), 58.3 (OCH₂CH₃), 63.0 (NHCHCH₂OCCH₃), 66.0 (CHCl₂), 70.3 (C₄CHNH), 112.1 (CCH₃), 123.0 (C_{2,6}), 127.2 (C_{3,5}), 145.6 (C₄), 146.7 (C₁) und 163.2 (CO) ppm;

UV/Vis (Acetonitril): nicht detektiert;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3417 (m, ν(CON-H)), 3315 (m), 2979 (m, ν(C-H)), 2935 (w), 2892 (m, ν(C-H)), 1687 (s, ν(C=O)), 1604(m, ν(C=C_{arom})), 1518 (s, NO₂), 1390 (m), 1346 (s), 1269 (m), 1238 (m), 1136 (s, ν(C-O)), 1055 (s, ν(C-O)), 945 (m), 876, 850, 810, 741, 704 cm⁻¹.

Produkt 50:

Ausbeute: 1.13 g des reinen Produkts (1.69 mmol, 27%);

R_f-Wert: 0.43 (ALOX; CyH/EtOAc:1:1);

Smp.: 103 °C;

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.63 (s, 3H, CCH₃), 3.44–3.46 (m, 1H, COCH₂CH), 3.62–3.66 (m, 1H, OCH₂CHCHO), 3.75–3.77 (m, 1H, COCH₂CH), 4.16–4.24 (m, 2H, OCH₂CHCHO und COCH₂CH), 4.43–4.46 (m, 1H, OCH₂CHCHO), 5.08–5.10 (m, 1H, CHOH), 5.49–5.50 (m, 1H, OCH₂CHCHO), 6.17–6.18 (m, 1H OH), 6.44 und 6.48 (s, 2H, CHCl₂), 7.57–7.67 (m, 4H, H₂ und H₆ oder H₃ und H₅), 8.16–8.23 (m, 4H, H₂ und H₆ oder H₃ und H₅), 8.66–8.70 (m, 2H, NH) ppm;

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 22.8 (CCH₃), 45.9 (NHCHCH₂OCCH₃), 63.0 (NHCHCH₂OCCH₃ und OCH₂CHCHOH), 63.3 (OCH₂CHCHOH), 65.9 und 66.4 (CHCl₂), 69.9 (OCH₂CHCHOH), 70.4 (C₄CHNH), 112.2 (CCH₃), 123.0 (C_{2,6}), 127.4 und 127.5 (C_{3,5}), 146.6 (C₄), 150.6 (C₁) und 163.5 (CO) ppm;

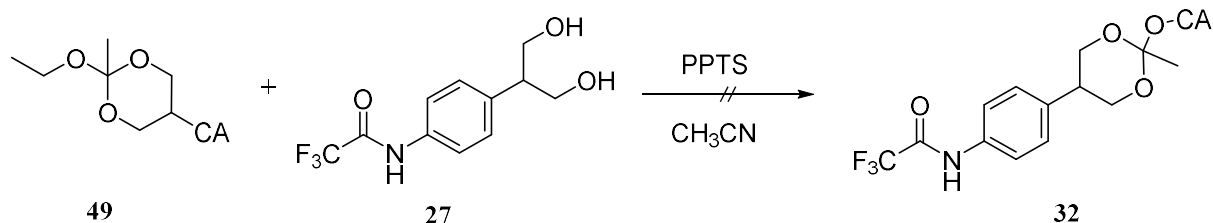
UV/Vis (Acetonitril): nicht detektiert;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3388 (m, v(CON-H)), 3284 (m, v(CON-H)), 3211 (m), 3039 (m, v(C-H)), 3008 (m, v(C-H)), 2960 (m, v(C-H)), 2929 (m, v(C-H)), 2935 (w), 2883 (m, v(C-H)), 1651 (s, v(C=O)), 1604(m, v(C=C_{arom})), 1514 (s, NO₂), 1387 (m), 1342 (s), 1276 (w), 1241 (m), 1132 (s, v (C-O)), 1101 (s, v (C-O)), 1080 (s, v (C-O)), 1053 (s, v (C-O)), 947 (m), 920, 887, 854, 812, 760, 731, 706, 661 cm⁻¹;

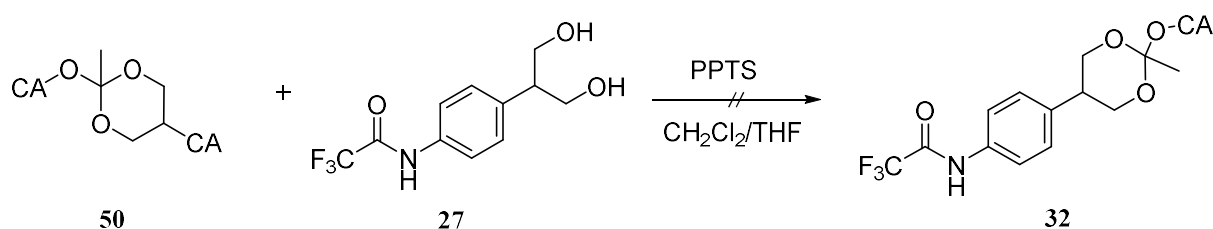
EA (%): ber. C 43.01, H 3.61, Cl 17.49 N 7.77; gef. (+V₂O₅) C 55.83, H 4.68, N 4.67;

MS (ESI, pos.): gef.: 691.0136, ber. 691.0139 (C₂₄H₂₄Cl₄N₄O₁₀Na).

Versuche der Darstellung von 2,2,2-Trifluor-N-(4-(2-(2-(2,2-dichloracetamido)-3-hydroxy-3-(4-nitro-phenyl)propoxy)-2-methyl-1,3-dioxan-5-yl)phenyl)-acetamid (42)

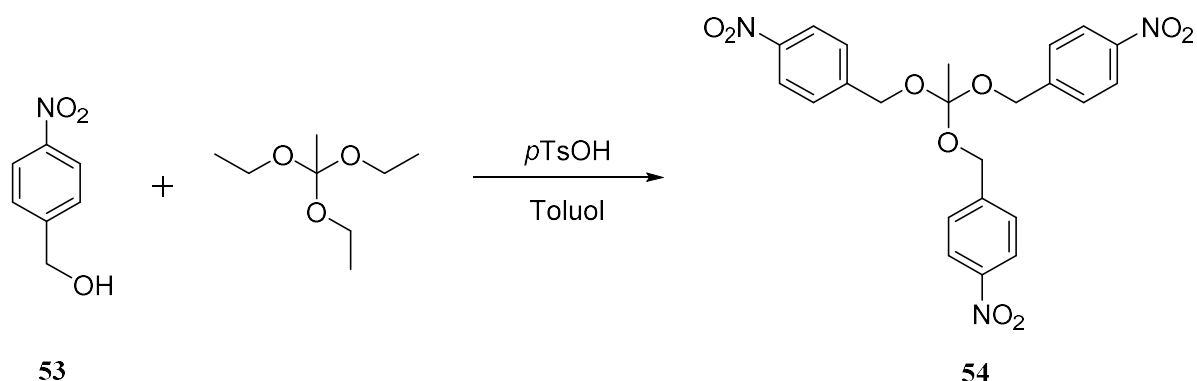


100 mg (380 μmol) Diol **27** und 315 mg (801 μmol) Orthoester **49** wurden unter Schutzgas in einem Schlenkcolben in 10 mL CH_3CN abs. gelöst, mit einer katalytischen Menge PPTS versetzt und für 1 h auf 55 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wurde mit CHCl_3 (über Kaliumcarbonat entsäuert) versetzt, um überschüssiges Chloramphenicol auszufällen. Jedoch zeigte sich keine Produktbildung.



150 mg (570 μmol) Diol **27** und 611 mg (912 μmol) Orthoester **50** wurden vermischt und mit 20 mL CH_2Cl_2 abs. versetzt. Eine katalytische Menge PPTS wurde zugegeben und die Lösung für 2 h bei RT gerührt. Da sich der Rückstand nicht löste, wurden zusätzlich 10 mL THF zugegeben. Nach 4.5 h wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer eingengt und säulenchromatographisch mit ALOX (neutral, Stufe II, $\text{CyH}/\text{EtOAc} = 1/3$) gereinigt. Das erhaltene NMR-Spektrum zeigte lediglich das im Kapitel 3.1.2.1 diskutierte Umlagerungsprodukt.

Versuche der Darstellung von 4,4',4''-((Ethan-1,1,1-triyltris(oxy))tris(methylen))tris(nitrobenzol) (**54**)



6.60 g (43.2 mmol) Nitrobenzol **53** wurden in 50.0 mL Toluol vorgelegt, mit 5.00 mg (290 μmol) *p*-TsOH versetzt und mit einem Wasserabscheider versehen. Anschließend wurden 2.00 g (2.26 mL, 12.3 mmol) Triethylorthoacetat zugetropft und bei 120 °C über Nacht gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Reaktionsmischung mit 30 mL 1 %iger Kaliumcarbonat-Lösung und 20 mL EtOAc versetzt und die organische Phase dreimal mit je 40 mL 1 %iger Kaliumcarbonat-Lösung extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden zweimal mit je 30 mL EtOAc extrahiert und alle organischen Phasen mit Kaliumcarbonat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde i.Vak. entfernt, um ein Gemisch zu erhalten, welches zweimal durch Säulenchromatographie mit Kieselgel, welches mit 7 % Ammoniak behandelt wurde, gereinigt wurde. Man erhielt nur eine kleine Fraktion eines gelben Feststoffes, die für eine Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie ausreichte. Weitere Reinigungsversuche führten jeweils zu einer Abspaltung der Nitrobenzolgruppe des Produktes und das NMR-Spektrum zeigte bei jeder der anschließenden Messungen Spuren des Edukts. Daher wurde auf eine vollständige Charakterisierung des Produktgemisches verzichtet.

Ausbeute: 23 mg des reinen Produkts (47.6 μmol , 0.39 %);

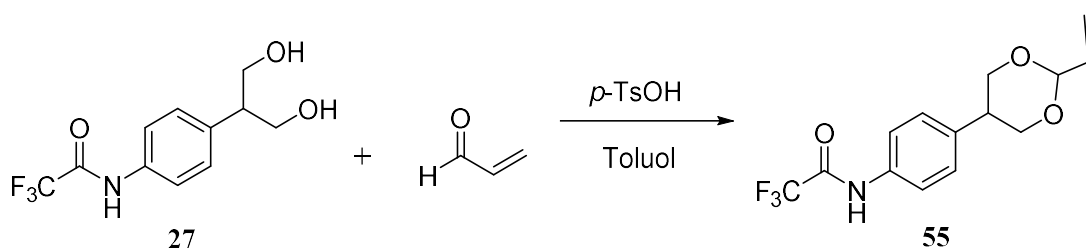
R_f-Wert: 0.20 (ALOX St. I; CyH/EtOAc = 2/1);

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.73 (s, 3H, CCH₃), 4.83 (s, 6H, C₄CH₂OCCH₃), 7.63 (dd, 2H, *H*₃ und *H*₅, ³*J*_{5,6}, ³*J*_{2,3} = 8.84 Hz), 8.19 (dd, 2H, *H*₂ und *H*₆, ³*J*_{5,6}, ³*J*_{2,3} = 8.80 Hz) ppm;

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 20.5 (CCH₃), 63.2 (C₄CH₂OCCH₃), 115.2 (CCH₃), 123.3 (C_{2,6}), 127.9 (C_{3,5}), 146.2 (C₄), 146.7 (C₁) ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3505 (m, $\nu(\text{CON-H})$), 3114 (m), 2945 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2914 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2875 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2845 (m, $\nu(\text{C-H})$), 1602 (m, $\nu(\text{C}=\text{C}_{\text{arom}}$), 1512 (s, NO_2), 1450 (m), 1387 (m), 1342 (s), 1300 (w), 1223 (m), 1205 (m), 1178 (s, $\nu(\text{C-O})$), 1134 (s, $\nu(\text{C-O})$), 1055 (s), 1014 (m), 930 (s), 858, 833, 733, 681 cm^{-1} .

Darstellung von 2,2,2-Trifluor-N-(4-(2-vinyl-1,3-dioxan-5-yl)phenyl)acetamid (55)



500 mg (1.90 mmol) Diol **27** und 107 mg (127 μL , 1.90 mmol) Acrolein wurden in 15.0 mL Toluol abs. vorgelegt und mit einer katalytischen Menge *p*-TsOH versetzt. Ein Wasserabscheider wurde mit ges. NaCl-Lösung befüllt und ein NaCl-Kristall zugegeben, um zu verhindern, dass Acrolein sich in Wasser löst. Die Reaktionsmischung wurde für 5 h bei 120 °C gerührt und nach erfolgter Reaktionskontrolle i.Vak. vom Lösemittel befreit. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie mit neutralem ALOX (Aktivitätsstufe II, CyH/EtOAc = 1/1) gereinigt, um das Produkt **55** als farblosen Feststoff zu erhalten.

Ausbeute: 367 mg (1.22 mmol; 64%);

Schmelzpunkt: 157-159 °C;

R_f-Wert: 0.57 (ALOX St. II; CyH/EtOAc = 2/1);

EA: ber. C 55.82, H 4.68, N 4.65; gef. (+V₂O₅) C 55.83, H 4.68, N 4.67;

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.24–3.30 (m, 1H, CH₂CHCH₂), 3.84–3.90 (m, 2H, CH₂CHCH₂), 4.22–4.26 (m, 2H, CH₂CHCH₂), 5.04 (dd, 1H, CHCHCH_{cis}H_{trans}, ³J = 4.52 Hz), 5.36 (dd, 1H, CHCHCH_{cis}H_{trans}, ³J = 10.72 Hz, ²J = 1.28 Hz), 5.53 (dd, 1H, CHCHCH_{cis}H_{trans}, ³J = 17.41 Hz, ²J = 1.28 Hz), 5.92 (ddd, 1H, CHCHCH_{cis}H_{trans}, ³J = 17.45 Hz, ³J = 10.68 Hz,

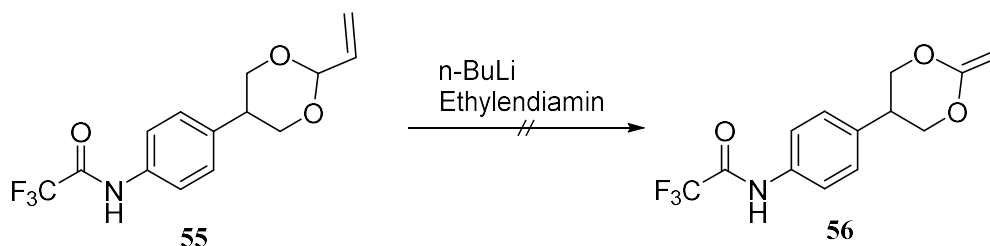
$^3J = 4.52$ Hz), 7.23 (dd, 2H, H_3 und H_5 , $^3J_{5,6}$, $^3J_{2,3} = 8.52$ Hz), 7.54 (dd, 2H, H_2 und H_6 , $^3J_{5,6}$, $^3J_{2,3} = 8.64$ Hz), 7.91 (s, 1H, NH) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 40.7$ (CH_2CHCH_2), 71.8 (CH_2CHCH_2), 100.7 ($\text{CHCHCH}_{\text{cis}}\text{H}_{\text{trans}}$), 115.8 (q, $^1J_{\text{CF}} = 288.7$ Hz, CF_3), 119.2 ($\text{CHCHCH}_{\text{cis}}\text{H}_{\text{trans}}$), 121.0 ($\text{C}_{2,6}$), 128.7 ($\text{C}_{3,5}$), 134.4 (C_1), 134.5 (CHCHCH_2), 136.0 (C_1), 154.9 (q, $^2J_{\text{CF}} = 37.4$ Hz, CF_3CO) ppm;

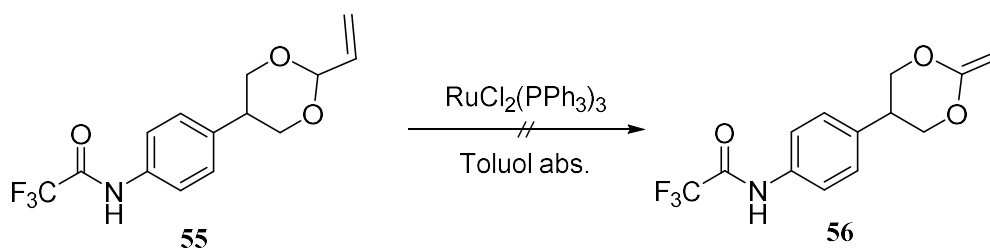
FT-IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3280$ (m, $\nu(\text{CON-H})$), 3209 (m), 3141 (m, $\nu(\text{CON-H})$), 3101 (m, $\nu(\text{CON-H})$), 2968 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2926 (w), 2864 (m, $\nu(\text{C-H})$), 1695 (s, $\nu(\text{C=O})$), 1616 (m, $\nu(\text{C=C}_{\text{arom}}$), 1554 (m), 1516 (m), 1244 (m), 1200 (s, $\delta(\text{C=C}_{\text{arom}}\text{-H})$), 1147 (s, $\nu(\text{C-O})$), 1078 (s, $\nu(\text{C-O})$), 1018 (m), 989 (m), 945 (m), 897, 831, 733, 706 cm^{-1} ;

MS (ESI, pos.): gef. 324.0808, ber. 324.08238 ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{F}_3\text{NO}_3\text{Na}$).

Versuche zur Darstellung von *N*-(4-(2-Ethyliden-1,3-dioxan-5-yl)phenyl)-2,2,2-trifluoracetamid (**56**)

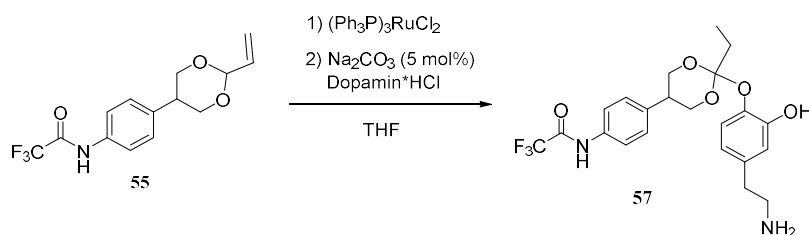


15.0 mL Ethylendiamin wurden in einem 50 mL Schlenkkolben vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Über ein Septum wurden 0.1 mL (199 μmol) *n*-BuLi zugetropft, wobei sich die Lösung trübte. Anschließend wurden 60.0 mg (199 μmol) des Orthoesters **55** in 10.0 mL Ethylendiamin gelöst und der Reaktion zugeführt. Dabei fand eine Rauchentwicklung statt. Die Lösung wurde auf 10 °C erwärmt, wobei sie wieder klar wurde. Nach 3 h wurde eine Reaktionskontrolle mittels DC durchgeführt, die auf eine Umsetzung hindeutet. Die Reaktionslösung wurde auf Eis gegeben, mit EtOAc versetzt und die wässrige Phase dreimal mit je 50 mL EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit Kaliumcarbonat getrocknet und i.Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie mit neutralem ALOX (Stufe II, CyH/EtOAc = 2/1) aufgereinigt, wobei sich herausstellte, dass lediglich die Schutzgruppe abgespalten wurde, jedoch sonst keine Reaktion stattfand.



In einem 50 mL-Zweihalskolben wurden 120 mg (398 μmol) des Orthoesters **55** mit 10 mL Toluol abs. und 0.10 mg Ru-Katalysator versetzt. Durch die Lösung wurde 20 min lang Argon durchgeleitet und anschließend auf 125 °C für 6 h erhitzt. Die anschließende Reaktionskontrolle mittels DC zeigte keinen Umsatz, so dass noch weitere 5 h erhitzt wurde. Danach wurde eine Reaktionskontrolle mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie durchgeführt und es wurde ersichtlich, dass keine Produktbildung stattgefunden hat.

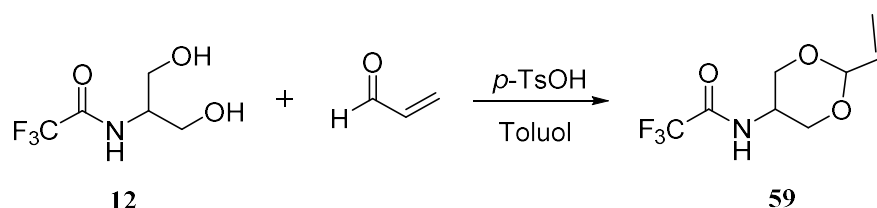
Versuche der Darstellung von N-(4-(2-(4-(2-Aminoethyl)-2-hydroxyphenoxy))-2-ethyl-1,3-dioxan-5-yl)phenyl)-2,2,2-trifluoracetamid (57)



66.7 mg (221 μmol) des Orthoesters **52** wurden in einem 25 mL Schlenkkolben evakuiert und dieser anschließend mit Argon befüllt und mit 8 mL THF abs. versetzt. 50 μg (1 mol%) $(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RuCl}_2$ wurden zugegeben und bei 70 °C gerührt. Die Reaktionskontrolle nach 3 h zeigte keine Umsetzung. Daraufhin wurde das Lösungsmittel im Argonstrom abgeblasen und erneut mit 8 mL THF abs. versetzt und bei 95 °C 5 h gerührt. Eine erneute Reaktionskontrolle mittels NMR-Spektroskopie zeigte wiederum keine Isomerisierung, so dass erneut Katalysator zugegeben wurde und insgesamt 5 mol % zugeführt wurden. Nach 6 h wurden zu der Reaktionsmischung 1.16 mg (5 mol %) Natriumcarbonat und 33.6 mg (177 μmol) Dopamin-Hydrochlorid zugegeben. Die Mischung wurde erneut für 3 h bei 100 °C gerührt. Die Reaktionskontrolle mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie zeigte keine Umsetzung. Das Lösungsmittel wurde im Argonstrom entfernt und der Rückstand unter Argon mit 8 mL 1,4-Dioxan abs. versetzt. Anschließend wurden 60.0 mg (392 μmol) Dopamin-Hydrochlorid

und eine Spatelspitze Ru-Katalysator zugegeben. Die Reaktion wurde 3 h bei 120 °C gerührt. Die Reaktionskontrolle mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie zeigte keine Umsetzung und das Edukt wurde durch Säulenchromatographie mit ALOX (Stufe II, EtOAc/CyH = 2/1) zurückgewonnen.

Darstellung von 2,2,2-Trifluor-*N*-(2-vinyl-1,3-dioxan-5-yl)acetamid (**59**)



Variante a:

936 mg (5.00 mmol) *N*-(1,3-Dihydroxyprop-2-yl)-2,2,2-trifluoroacetamid **12** wurden in einem Dreihalskolben mit 10.0 mL Toluol abs. versetzt und ein Wasserabscheider mit Rückflusskühler und Gasableitungsrohr aufgesetzt. Im Wasserabscheider befanden sich 10 mL gesättigte NaCl-Lösung und ein NaCl-Kristall, um zu vermeiden, dass sich Acrolein darin löste. Der Reaktion wurde eine Spatelspitze *p*-TsOH zugefügt, über ein Septum wurden 340 μL (286 mg, 5.09 mmol) Acrolein zugetropft und die Lösung anschließend bei 120 °C für 6 h erhitzt. Da die erfolgte DC-Kontrolle nicht eindeutig war, wurde die Reaktion vom Lösungsmittel befreit und ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen. Der Rückstand wurde in einem Gemisch aus CH_2Cl_2 , EtOAc und Acetonitril gelöst, mit 1 %iger Kaliumcarbonatlösung extrahiert und die organischen Phasen vereinigt. Nun wurde die organische Phase mit Kaliumcarbonat getrocknet, das Lösungsmittel i.Vak. entfernt und der Rückstand durch Säulenchromatographie mit neutralem ALOX (Stufe II, CyH/EtOAc = 2/1) aufgereinigt, um einen farblosen Feststoff zu erhalten.

Variante b:

500 mg (2.67 mmol) *N*-(1,3-Dihydroxyprop-2-yl)-2,2,2-trifluoroacetamid **12** werden in einem 250 mL-Dreihalskolben mit 120 mL CH_2Cl_2 abs., 7.00 mg (407 μmol) *p*-TsOH und 350 mg (2.19 mmol) Kupfersulfat versetzt und über ein Septum werden 900 μL (756 mg, 13.5 mmol) Acrolein zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 5 d bei RT gerührt. Der Rückstand wurde in

einem Gemisch aus CH_2Cl_2 , EtOAc und Acetonitril gelöst, mit 1 %iger Kaliumcarbonatlösung ausgeschüttelt und die organischen Phasen vereinigt. Nun wurde die organische Phase mit Kaliumcarbonat getrocknet, das Lösungsmittel i.Vak. entfernt und der Rückstand durch Säulenchromatographie mit basischem ALOX (Stufe II, CyH/EtOAc = 2/1) aufgereinigt, um einen farblosen Feststoff zu erhalten.

Die NMR-Daten weisen bei beiden Varianten auf die Ausbildung eines Isomergemisches hin.

Ausbeute:

Variante a: 40.0 mg (146 μmol ; 4%);

Variante b: 101 mg (449 μmol ; 17%);

Schmelzpunkt: 133 °C;

EA: ber. C 42.67, H 4.48, N 6.22; gef. (+ V_2O_5) C 44.34, H 4.85, N 5.70;

Variante a: * kennzeichnet das Isomer

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 3.57\text{--}3.63$ (m, 2H, CH_2CHCH_2), 3.67* (s, 1H, CH_2CHCH_2), 3.92–4.00 (m, 1H, CH_2CHCH_2), 4.02–4.03* (m, 4H, CH_2CHCH_2), 4.04–4.09 (m, 2H, CH_2CHCH_2), 4.92* (dd, 1H, $\text{CHCHCH}_{\text{cisH}_{\text{trans}}}$, $^3J = 4.52$ Hz), 5.08 (dd, 1H, $\text{CHCHCH}_{\text{cisH}_{\text{trans}}}$, $^3J = 4.68$ Hz), 5.26–5.30 und * (m, 1H, $\text{CHCHCH}_{\text{cisH}_{\text{trans}}}$), 5.40–5.44 (m, 2H, $\text{CHCHCH}_{\text{cisH}_{\text{trans}}}$), 5.79* (ddd, 1H, $\text{CHCHCH}_{\text{cisH}_{\text{trans}}}$, $^3J = 4.52$ Hz), 5.85 (ddd, 1H, $\text{CHCHCH}_{\text{cisH}_{\text{trans}}}$, $^3J = 4.68$ Hz), 9.34* (s, 1H, NH), 9.77 (s, 1H, NH) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 42.7$ (CH_2CHCH_2), 45.3* (CH_2CHCH_2), 67.4 (CH_2CHCH_2), 67.5* (CH_2CHCH_2), 99.8 ($\text{CHCHCH}_{\text{cisH}_{\text{trans}}}$), 100.1* ($\text{CHCHCH}_{\text{cisH}_{\text{trans}}}$), 118.8* ($\text{CHCHCH}_{\text{cisH}_{\text{trans}}}$), 118.9 ($\text{CHCHCH}_{\text{cisH}_{\text{trans}}}$), 134.4 ($\text{CHCHCH}_{\text{cisH}_{\text{trans}}}$), 134.9* ($\text{CHCHCH}_{\text{cisH}_{\text{trans}}}$) ppm, CO und CF_3 nicht detektiert;

Variante b: * kennzeichnet das Isomer

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.58\text{--}3.63$ (m, 2H, CH_2CHCH_2), 3.98–4.00* (m, 1H, CH_2CHCH_2), 4.060–4.064* (m, 4H, CH_2CHCH_2), 4.18–4.28 (m, 1H, CH_2CHCH_2), 4.29–4.30 (m, 2H, CH_2CHCH_2), 5.04* (dd, 1H, $\text{CHCHCH}_{\text{cisH}_{\text{trans}}}$, $^3J = 4.52$ Hz), 5.08 (dd, 1H, $\text{CHCHCH}_{\text{cisH}_{\text{trans}}}$, $^3J = 1.20$ Hz), 5.37* (dd, 1H, $\text{CHCHCH}_{\text{cisH}_{\text{trans}}}$, $^3J = 10.72$ Hz,

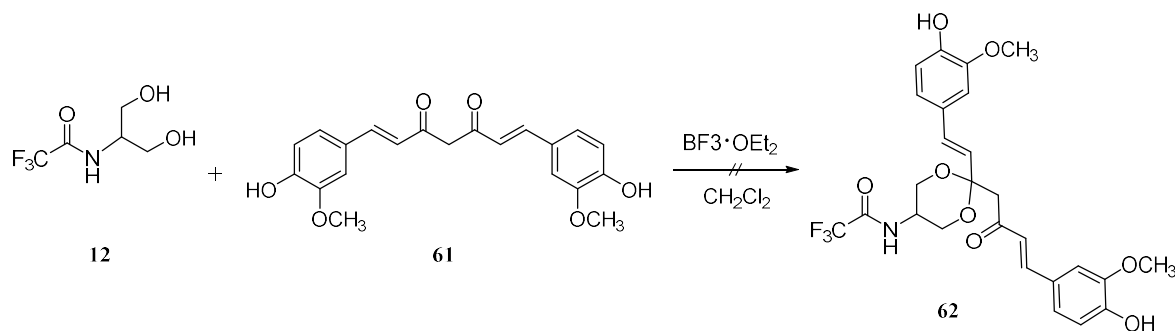
$^2J = 1.20$ Hz), 5.41 (dd, 1H, CHCHCH_{cis}H_{trans}, $^3J = 10.76$ Hz, $^2J = 1.32$ Hz), 5.51* (dd, 1H, CHCHCH_{cis}H_{trans}, $^3J = 17.44$ Hz, $^2J = 1.20$ Hz), 5.51 (dd, 1H, CHCHCH_{cis}H_{trans}, $^3J = 17.52$ Hz, $^2J = 1.32$ Hz), 5.85 mit * (m, 2H, CHCHCH_{cis}H_{trans}), 6.27* (s, 1H, NH), 7.21 (s, 1H, NH) ppm;

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 43.5^*$ (CH₂CHCH₂), 44.7 (CH₂CHCH₂), 67.3 (CH₂CHCH₂), 69.6* (CH₂CHCH₂), 99.7 (CHCHCH_{cis}H_{trans}), 101.5* (CHCHCH_{cis}H_{trans}), 119.8* (CHCHCH_{cis}H_{trans}), 120.2 (CHCHCH_{cis}H_{trans}), 133.3 (CHCHCH_{cis}H_{trans}), 133.7* (CHCHCH_{cis}H_{trans}) ppm, CO und CF₃ nicht detektiert;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3294$ (m, ν (NH)), 3099 (w, ν (NH)), 3068 (w, ν (NH)), 2979 (w, -CH₂-), 2945 (w, -CH₂-), 2879 (w, -CH₂-), 1714 (s, ν (C=O)), 1541 (m, -CH=CH₂), 1442 (w, ν (-CH₂-)), 1365 (m), 1147 und 1086 (Ester), 980 (s), 941 (s), 906 (s), 806, 721, 671, 636 cm⁻¹;

MS (ESI, neg.): m/z (%) = gef. 224.0544 (C₈H₉F₃NO₃), ber. 224.05400 (C₈H₉F₃NO₃).

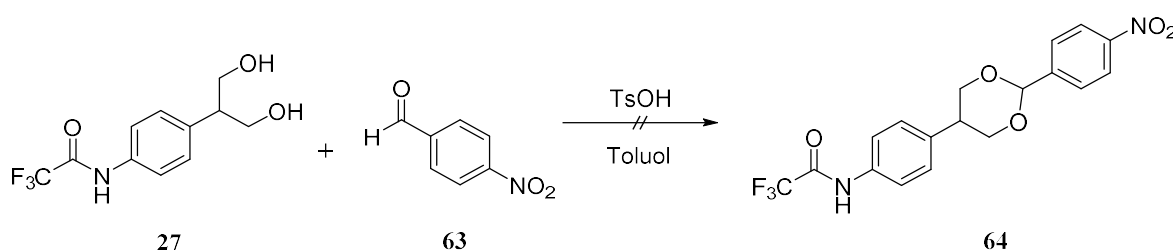
Versuche der Darstellung von 2,2,2-Trifluor-N-(2-((E)-4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-oxobut-3-en-1-yl)-2-((E)-4-hydroxy-3-methoxystyryl)-1,3-dioxan-5-yl)acetamid (62)



In einem ausgeheizten und evakuierten 250 mL-Schlenkkolben, der anschließend mit Stickstoff befüllt wurde, wurden 200 mg (1.07 mmol) Diol **12** und 269 mg (729 μ mol) Curcumin **61** vorgelegt und mit 100 mL CH₂Cl₂ abs. versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt und mit 15 μ L BF₃·OEt₂ langsam versetzt. Die Lösung wurde für 20 min bei 0 °C gerührt, anschließend auf RT erwärmt und über Nacht weiter gerührt. Das Kontroll-DC zeigte eine Änderung, woraufhin die Lösung aufgearbeitet wurde. Hierfür wurde die Lösung vorsichtig auf ein Eisbad gegeben und mit Kaliumcarbonat-Lösung versetzt. Anschließend wurde CH₂Cl₂ und

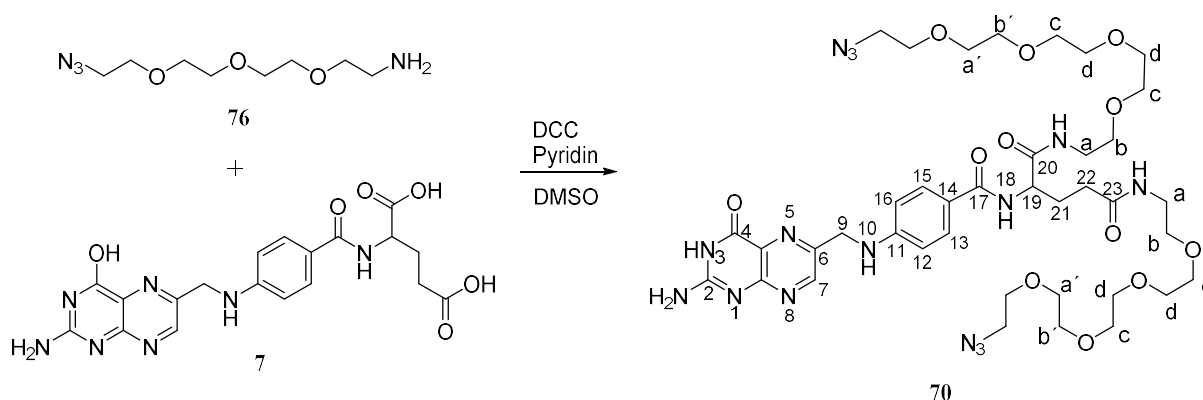
EtOAc zugegeben und die Lösung färbte sich blau-grün. Die wässrige Phase wurde zehnmal mit je 50 mL EtOAc extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch mit Kieselgel (7 % Ammoniak-Lsg, CyH/EtOAc/CH₂Cl₂ = 5/3/2) aufgereinigt und es wurden vier Fraktionen erhalten, wobei keine das gewünschte Produkt enthielt. Es wurde lediglich deprotiertes Edukt detektiert.

Versuche der Darstellung von 2,2,2-Trifluor-N-(4-(2-(4-nitrophenyl)-1,3-dioxan-5-yl)phenyl)acetamid (64)



200 mg (796 μ mol) Diol **27** und 294 mg (1.95 mmol) Benzaldehyd **63** wurden in 20.0 ml Toluol abs. vorgelegt und mit 3.30 mg (19.2 μ mol) *p*-TsOH versetzt. Die Reaktionsmischung wurde mit einem Wasserabscheider für 12 h auf 120 °C Ölbadtemperatur erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf RT gekühlt und nach erfolgter DC-Kontrolle mit NaHCO₃-Lösung gegeneht. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc extrahiert und säulenchromatographisch mit ALOX (Stufe II, CyH/EtOAc = 5/1) gereinigt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung wurde mittels DC eine teilweise Zersetzung des Produktes detektiert. Das aufgenommene ¹H-NMR-Spektrum wies Signale auf, die auf das Produkt hindeuteten, jedoch mit Verunreinigungen. Weitere Aufreinigungen blieben ohne Erfolg. Das Produkt wies immer wieder Zersetzungsprodukte im ¹H-NMR-Spektrum auf.

Darstellung von 16-(4-(((2-Amino-4-hydroxypteridin-6-yl)methyl)amino)benzamido)-1-azido-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecan-17-säure (70)



500 mg (1.13 mmol) Folsäure **7** wurde unter Schutzgas in einem 100 mL-Schlenkkolben mit 25 mL DMSO abs. und 5 mL Pyridin abs. versetzt. Anschließend wurden 470 mg (2.27 mmol) Dicyclohexacarbodiimid zugegeben, 1 h im Dunkeln bei RT gerührt, dann 200 mg (916 μ mol) Aminoazid **76** hinzugegeben und über Nacht gerührt. Das entstandene Harnstoffderivat wurde abfiltriert, das Filtrat auf kalten Diethylether (200 mL) unter ständigem Rühren geschüttet und im Kühlschrank für 1 h zur Fällung gebracht. Der entstandene Feststoff wurde mit einer Glasfritte abfiltriert, mit kaltem Ether nachgewaschen, wiederum in Aceton gelöst und mit Ether ausgefällt. Der Feststoff wurde erneut abfiltriert und an der Ölpumpe für 3 h getrocknet, um **70** als gelben Feststoff zu erhalten. Das Gemisch wurde mittels semi-präparativer HPLC aufgereinigt. Der Rückstand wurde in einer Mischung aus H₂O/Acetonitril/ DMSO/ Triethylamin (6/1.6/0.2/0.2) gelöst und mit einem linearen Gradienten A(H₂O) : B(Acetonitril) = 80:20 \rightarrow 70:30 innerhalb von 20 min und danach konstant für 30 min. eluiert. Das disubstituierte Produkt wies eine Retentionszeit von 34 min. auf.

Ausbeute: 253 mg (394 μ mol; 35%);

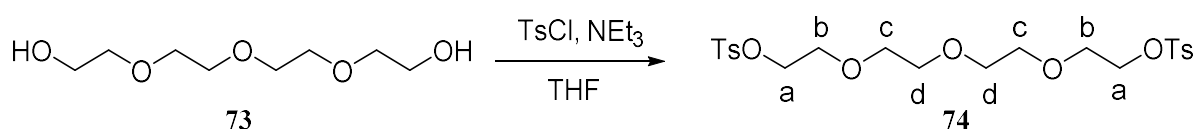
Smp.: 205 °C (Zersetzung)^[192];

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.04–1.16 (m, 2H, C₂₁H₂C₂₂H₂), 1.75–2.07 (m, 2H, C₂₁H₂C₂₂H₂), 2.19–2.40 (m, 2H, CH₂N₃), 3.16–3.25 (m, 2H, CH₂CH₂N₃), 3.36–3.40 (m, 2H, C_bH₂C_aH₂NH), 3.48–3.55 (m, 8H, (C_cH₂C_dH₂O)₂), 3.56–3.59 (m, 2H, C_aH₂NH), 4.32–4.38 (m, 1H, C₁₉H), 4.47–4.49 (m, 2H, C₉H₂), 6.60–6.65 (m, 2H, C₁₂H und C₁₆H), 6.63 (br.s, 2H, NH₂), 6.93–6.96 (m, 1H, C₉H₂NH), 7.63–7.67 (m, 2H, C₁₂H und C₁₆H), 7.84–7.98 (m, 1H, C₁₇ONH), 8.64 (s, 1H, C₇H), 11.4 (br. s, 1H, COOH) ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3257 und 3149 (m, $\nu(\text{N-H})$), 2929 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2868 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2100 (m, $\nu(\text{N}\equiv\text{N})$), 1811 (m), 1693 (s), 1647 (s), 1603 (s), 1522 (s), 1491 (s), 1412 (m), 1292 (s), 1234 (s), 1182 (m), 1124 (m), 1024 (m), 947 (m), 881, 839, 768, 739 cm^{-1} .

Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.^[192]

Darstellung von 3,6,9-Trioxaundecyl-1,11-bis(4'-methylbenzolsulfonat) (74)^[188]



In einen 500 mL-Rundkolben wurden 10.0 g (51.5 mmol) Tetraethylglykol (**73**) in 100 mL THF und 114 mL Triethylamin (83.4 g, 824 mmol) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Portionsweise wurden 38.5 g (202 mmol) Tosylchlorid zugegeben und bei RT 16 h gerührt. Nach erfolgter DC-Kontrolle wurde die Lösung i.Vak. vom Lösemittel befreit und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (CyH/EtOAc = 2/1 → 0/1) aufgereinigt, um **74** als farbloses Öl zu erhalten.

Ausbeute: 17.4 g (33.7 mmol; 67%, Lit. 22 %);

R_f-Wert: 0.28 (SiO₂; CyH/EtOAc = 1/1);

EA: gef. C 52.71, H 6.17, S 12.78; ber. C 52.58, H 6.02, S 12.76;

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.44 (s, 6H, CH₃), 3.53–3.59 (m, 8H, C_cH₂C_dH₂), 3.67 (t 4H, C_bH₂, ³J = 9.64 Hz), 4.15 (t 4H, C_aH₂, ³J = 9.64 Hz), 7.34 (dd, 2H, H₂ und H₆, ³J_{5,6}, ³J_{2,3} = 11.2 Hz), 7.79 (dd, 2H, H₃ und H₅, ³J_{5,6}, ³J_{2,3} = 12.4 Hz) ppm;

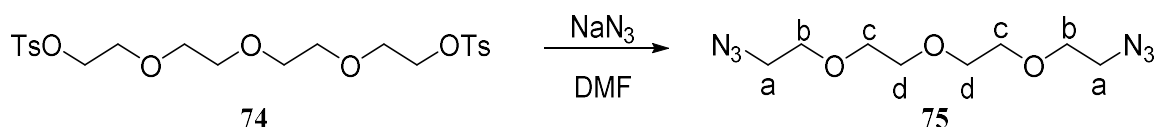
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 21.8 (CH₃), 68.8 (C_bH₂), 69.4 (C_aH₂), 70.7 und 70.9 (C_cH₂C_dH₂), 128.1 (C_{3,5}), 128.3 (C_{2,6}), 133.1 (C₄), 145.0 (C₁) ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2949 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2872 (m, $\nu(\text{C-H})$), 1597 (s, $\nu(\text{C}=\text{C}_{\text{arom}})$), 1452 (m, -CH₂-), 1354 (s, $\nu(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-)$), 1174 (s), 1097 (s), 1012 (m), 918 (s), 814, 773, 661 cm^{-1} ;

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 503.2 ($[M+H^+]$, 2.17), 243.1 (1/2 $[M\bullet]$, 13), 199.1 ($[Tos-OCH_2C\bullet]$, 100), 155.1 (35), 91.1 (47).

Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.^[188]

Darstellung von 1-Azido-2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethan (75)^[189]



6.47 g (12.9 mmol) ditosyliertes Tetraethylenglykol **74** wurden unter Schutzgas in einem Schlenkkolben mit 40.0 mL DMF abs. versetzt. Portionsweise wurden 8.38 g (129 mmol) Natriumazid zugegeben und die Mischung wurde bei 80 °C gerührt. Nach 48 h wurde die Lösung auf RT gekühlt, i. Vak. vom Lösungsmittel befreit und mit 150 mL H₂O bidest. versetzt. Die wässrige Phase wurde siebenmal mit je 100 mL CH₂Cl₂ extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und mit 150 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden wiederum zweimal mit je 100 mL CH₂Cl₂ extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit, um **75** als braunes Öl ohne weitere Reinigung zu erhalten.

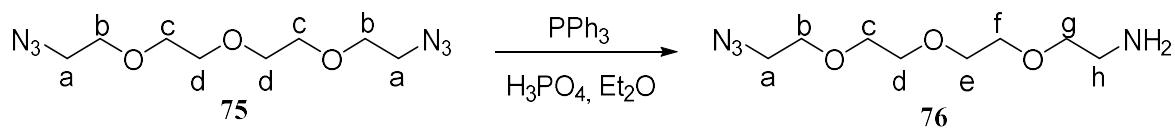
Ausbeute: 3.06 g (12.5 mmol; 97%, Lit. 77.2 %);

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.36–3.39 (m, 4H, C_aH₂N₃), 3.64–3.68 (m, 12H, C_bH₂C_cH₂C_dH₂) ppm;

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 50.8 (C_aH₂N₃), 70.1 (C_bH₂), 70.78 und 70.79 (C_cH₂C_dH₂) ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2920 (m, ν (C-H)), 2868 (m, ν (C-H)), 2094 (s, ν (N≡N)), 1676 (s, ν (-CH₂-)), 1442 (m, (-CH₂-)), 1385 (s, ν (-O-CH₂-CH₂-O-)), 1284 (s), 1117 (s), 1093 (s), 935 (m), 850, 831, 656 cm⁻¹.

Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.^[189]

Darstellung von 2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-amin (**76**)^[190]

4.27 g (17.6 mmol) Diazid **75** wurden unter Schutzgas in 40.0 mL 0.65 M H_3PO_4 vorgelegt und 3.99 g (15.2 mmol) Triphenylphosphin, gelöst in 30.0 mL Et_2O , über 45 min zugetropft. Der aufgesetzte Tropftrichter wurde mit 4 mL Et_2O nachgespült und die Lösung über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde dreimal mit je 100 mL Et_2O gewaschen, die wässrige Phase wurde mit 3.20 g Kaliumhydroxid versetzt. Ein Teil vom Lösemittel wurde i.Vak. entfernt und das restliche Reaktionsgemisch auf 4 °C gekühlt. Nach 5 h wurde das entstandene Triphenylphosphinoxid abfiltriert, die wässrige Phase wiederum mit 9.20 g Kaliumhydroxid versetzt und 16mal mit je 30 mL kaltem CH_2Cl_2 extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und i.Vak. vom Lösemittel befreit. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie mit Kieselgel ($\text{EtOH}/\text{NEt}_3 = 100/1$) aufgereinigt, um **76** als braunes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 2.61 g (12.0 mmol; 68%, Lit. 82 %);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.86$ (t, 2H, $\text{C}_a\text{H}_2\text{N}_3$, $^3J = 5.16$ Hz), 3.39 (t, 2H, $\text{C}_h\text{H}_2\text{NH}_2$, $^3J = 5.24$ Hz), 3.51 (t, 2H, $\text{C}_b\text{H}_2\text{C}_a\text{H}_2\text{N}_3$, $^3J = 5.32$ Hz), 3.61–3.69 (m, 10H, $\text{C}_c\text{H}_2\text{C}_d\text{H}_2\text{C}_e\text{H}_2\text{C}_f\text{H}_2\text{C}_g\text{H}_2$) ppm;

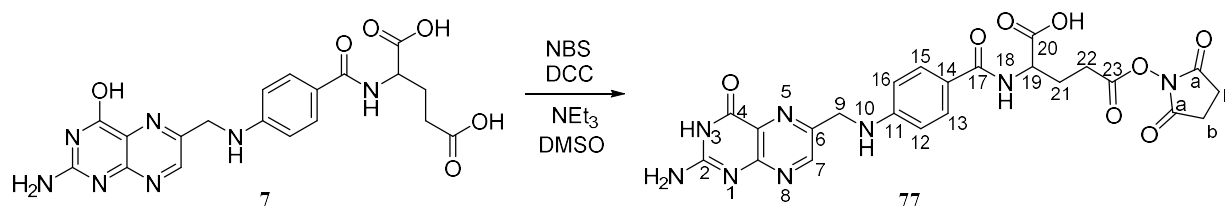
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 41.9$ ($\text{C}_a\text{H}_2\text{N}_3$), 50.8 ($\text{C}_h\text{H}_2\text{NH}_2$), 70.4 ($\text{C}_c\text{H}_2\text{C}_d\text{H}_2\text{C}_e\text{H}_2\text{C}_f\text{H}_2\text{C}_g\text{H}_2$), 73.6 (C_bH_2) ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3373$ und 3302 (m, $\nu(\text{N-H})$), 2912 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2866 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2098 (s, $\nu(\text{N}\equiv\text{N})$), 1591 (w), 1452 (m), 1348 (m), 1286 (m), 1107 (s, $\nu(-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-)$), 930 (m), 851 , 827 , 644 cm^{-1} ;

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 219.1 ($[\text{M}+\text{H}^+]$, 2.59), 87.1 ($\text{C}_4\text{H}_8\text{NO}$, 17.5), 44.1 ($[\text{C}_2\text{H}_4\text{O}^{2+}]$, 54.4), 30.1 ($\text{CH}_4\text{N}^\bullet$, 100).

Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.^[190]

Darstellung von 2-(4-(((2-Amino-4-hydroxypteridin-6-yl)methyl)-amino)benzamido)-5-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-5-oxopentansäure (77)^[222]



In einem Schlenkkolben wurden unter Schutzgas 40 mL DMSO abs. vorgelegt, im Dunkeln 1.00 g (2.30 mmol) Folsäure **7** zugegeben und bei RT gerührt, bis diese sich gelöst hatte. Anschließend wurden 500 mg (2.40 mmol) Dicyclohexacarbodiimid und 260 mg (2.30 mmol) NHS zugegeben und über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde über einen Faltenfilter vom Harnstoff-Nebenprodukt befreit und auf 300 mL EtOAc gegeben, wobei ein gelber Feststoff ausfiel. Nach 4 h im Kühlschrank wurde die Lösung abfiltriert und der Feststoff i. Vak. an der Ölpumpe getrocknet, um **77** als gelben Feststoff ohne weitere Reinigung zu erhalten.

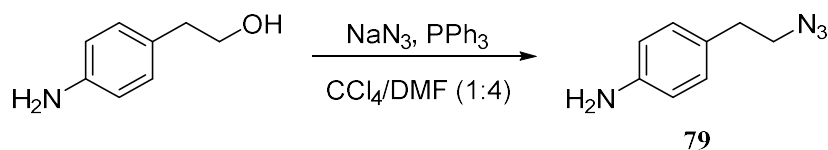
Ausbeute: 756 mg (1.40 mmol; 62%, Lit. 74 %);

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.89–2.01 (m, 2H, C₂₁H₂), 2.24–2.37 (m, 2H, C₂₂H₂), 2.47 (s, 4H, CH_b), 4.24–4.28 (m, 1H, C₁₉H), 4.46–4.50 (m, 2H, C₉H₂), 6.59–6.67 (m, 2H, C₁₂H und C₁₆H), 6.91–6.94 (m, 1H, C₉H₂NH), 7.14 (br. s, NH₂), 7.17–7.63 (m, 2H, C₁₃H und C₁₅H), 7.96–7.98 (m, 1H, C₁₇ONH), 8.63–8.65 (m, 1H, C₇H), 11.9 (s br., 1H, OH) ppm;

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 26.9 (C₂₁), 31.2 (C₂₂), 31.8 (C_a), 45.9 (C₉), 52.9 (C₁₉), 111.2 (C₁₂ und C₁₆), 121.6 (C₁₄), 128.0 (C_{4a}), 128.8 (C₁₃ und C₁₅), 148.1 (C₆), 148.6 (C₈), 150.7 (C₁₁), 151.9 (C_{8a}), 154.2 (C₂), 165.9 (C₁₇), 169.4 (C_b), 174.2 (C₂₀), 174.3 (C₂₃), 174.4 (C₄) ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3255 und 3149 (m, ν (N-H)), 2995 (m, ν (C-H)), 2945 (m, ν (C-H)), 2790, 2727, 1691 (s), 1601 (s), 1512 (s), 1487 (s), 1402 (w), 1273 (m), 1234 (m), 1180 (s), 1126 (m), 1016 (m), 949 (m), 879, 839, 768, 737 cm⁻¹.

Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.^[222]

Darstellung von 4-(2-Azidoethyl)anilin (**79**)

In einem 100 mL-Rundkolben wurden 1.50 g (11.0 mmol) Aminophenylethanol, 840 mg (13.0 mmol) Natriumazid und 2.90 g (11.0 mmol) Triphenylphosphin mit einem 1:4-Gemisch aus Tetrachlorkohlenstoff und DMF (40.0 mL) versetzt und 18 h bei 90 °C gerührt. Nach erfolgter dünnschichtchromatographischer Kontrolle wurde die Lösung mit 30.0 mL bidest. Wasser versetzt und weitere 10 min bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit 50 mL Diethylether versetzt und zweimal mit je 50 mL Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und dreimal mit je 30 mL bidest. Wasser extrahiert. Die organischen Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösemittel befreit, um **79** als gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 1.10 g (6.78 mmol; 62 %, Lit. 58 %);

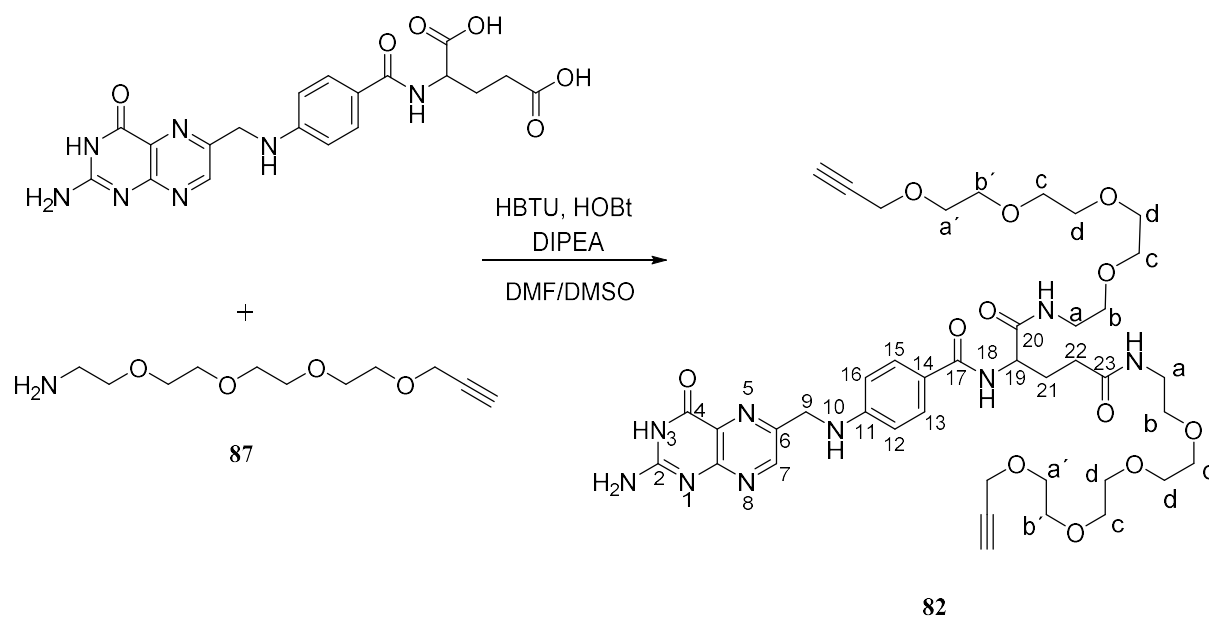
R_f-Wert: 0.33 (SiO₂; CyH/EtOAc = 1/1);

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.79 (t, 2H, CH₂CH₂N₃, ³J = 7.28 Hz), 3.43 (t, 2H, CH₂CH₂N₃, ³J = 7.28 Hz), 3.63 (br. s, 2H, NH₂), 6.65 (dd, 2H, H₃ und H₅, ³J_{5,6}, ³J_{2,3} = 8.49 Hz), 7.01 (dd, 2H, H₂ und H₆, ³J_{5,6}, ³J_{2,3} = 8.12 Hz) ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3442 und 3359 (m, ν (N-H)), 3018 (m, ν (C-H)), 2927 (m, ν (C-H)), 2870 (m, ν (C-H)), 2090 (s, ν (N≡N)), 1622 (s), 1516 (s), 1439 (m), 1346 (m), 1271 (s), 1180 (m), 1124 (m), 1088 (w), 1032 (w), 924 (m), 899, 822, 640 cm⁻¹.

Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.^[223]

Darstellung von 2-(4-(((2-Amino-4-oxo-3,4-dihydropteridin-6-yl)methyl)amino)-benzamido)-N1,N5-di(3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-in-1-yl)pentandiamid (82)



In einem 100 mL-Schlenkkolben wurden unter Schutzgas 348 mg (789 μmol) Folsäure **7** in einem DMF/DMSO (1:2)-Gemisch gelöst, mit 388 mg (1.02 mmol) HBTU, 138 mg (1.02 mmol) HOBT und 192 mg (1.02 mmol) DIPEA versetzt und 30 min. bei RT gerührt. Das Amin **87** wurde in 5.00 mL DMF abs. gelöst, innerhalb von 30 min. zu der Reaktionslösung getropft und 18 h bei 50 °C gerührt. Zu der Lösung wurden 70.0 mL kalter Diethylether gegeben, um das Folsäure-Konjugat **82** auszufällen. Das Rohprodukt wurde anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO_2 ; $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 10/1$), um **82** als gelben Feststoff zu erhalten.

Ausbeute: 241 mg (278 μmol ; 35 %);

R_f-Wert: 0.21 (SiO_2 ; $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 10/1$);

Smp.: 109 °C;

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 1.77\text{--}1.86$ (m, 1H, C₂₁H₂), 1.88–1.97 (m, 1H, C₂₂H₂), 2.08–2.18 (m, 2H, C₂₁H₂C₂₂H₂), 3.13–3.24 (m, 4H, C_aH₂), 3.37–3.39 (m, 14H, NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂), 3.42–3.43 (t, 2H, C \equiv CH), 3.47–3.52 (m, 14H, NHCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂OCH₂CH₂), 4.13 (d, 4H, CH₂C \equiv CH, ³J = 2.28 Hz), 4.29–4.30 (m, 1H, C₁₉H), 4.47–4.49 (m, 2H, C₉H₂), 6.61–6.62 (m, 2H, C₁₂H und C₁₆H), 6.64–6.97 (m, 1H,

C_9H_2NH), 7.64–7.66 (m, 2H, $C_{13}H$ und $C_{15}H$), 7.85–7.89 (m, 2H, NH -PEG), 8.01–8.02 (m, 1H, $C_{17}ONH$), 8.63 (s, 1H, C_7H) ppm;

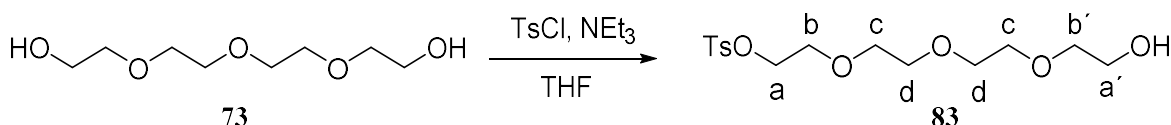
^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 27.7 (C_{22}), 32.0 (C_{21}), 38.5 (C_a), 45.8 (C_9), 52.0 ($C_bO(C_cC_dO)_2C_b \cdot C_{a'}$), 53.2 (C_{19}), 57.5 ($CH_2C \equiv CH$), 68.5, 69.0, 69.7 ($C_bO(C_cC_dO)_2C_b \cdot C_{a'}$), 72.3 ($C \equiv CH$), 77.2 ($C \equiv CH$), 111.2 (C_{12} und C_{16}), 121.4 (C_{14}), 128.0 (C_{4a}), 129.1 (C_{13} und C_{15}), 148.7 (C_6), 150.8 (C_{11}), 166.1 (C_{17}), 171.88 (C_{20}), 171.95 (C_{23}) ppm, C_2 , C_4 und C_{8a} nicht detektiert;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3354 (m), 3255 (m), 2983 (w), 2937 (m, $\nu(C-H)$), 2870 (m, $\nu(C-H)$), 2117 (w, $\nu(C \equiv C)$), 1728 (m), 1689 (m, $\nu(-NH_2)$, Amid I), 1645 (m, $\nu(-NH_2)$, Amid II), 1606 (m), 1533(m), 1513 (m), 1477 (m, $(-CH_2-)$), 1402 (m), 1354 (m, $\nu(-O-CH_2-CH_2-O-)$), 1300 (m), 1242 (m), 1188 (m), 1090 (s), 1039 (m), 943 (m), 901, 843, 802, 771, 615 cm^{-1} .

UV/Vis (Acetonitril): λ_{max} = 367 nm, ϵ = $8.58 \cdot 10^2$ L $cm^{-1}mol^{-1}$;

MS (ESI,+): gem.: 890.4012 ($C_{41}H_{57}N_9NaO_{12}$), ber. für $C_{41}H_{57}N_9NaO_{12}$: 890.4019.

Darstellung von 2-(2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-4-methylbenzolsulfonat (83)^[224]



In einen 500 mL-Rundkolben wurden 19.6 g (51.5 mmol) Tetraethylglykol **73** in 200 mL THF abs. und 112 mL Triethylamin (81.7 g, 824 mmol) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Portionsweise wurden 18.6 g (97.7 mmol) Tosylchlorid zugegeben und bei RT 16 h gerührt. Nach erfolgter DC-Kontrolle wurde die Lösung langsam mit 300 mL 2 N Salzsäure versetzt und fünfmal mit je 200 mL CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden vereinigt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und der Rückstand säulenchromatographisch mit Kieselgel (CyH/EtOAc = 1/1) gereinigt, um **83** als farbloses Öl zu erhalten.

Ausbeute: 2.82 g (8.11 mmol; 8%, Lit. 39 %);

R_f-Wert: 0.24 (SiO₂; CyH/EtOAc = 1/1);

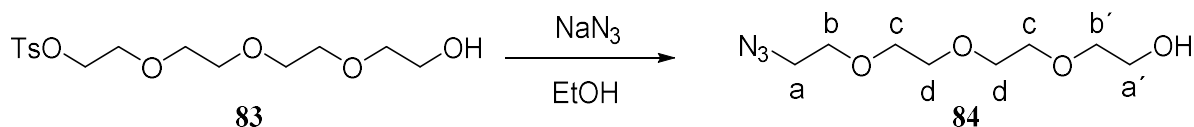
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.45 (s, 6H, CH₃), 3.59–3.73 (m, 12H, C_bH₂OC_cH₂C_dH₂ und C_aH₂), 3.75–3.76 (m, 2H, C_bH₂), 4.14–4.17 (m, 2H, C_aH₂), 7.34 (dd, 2H, H₂ und H₆, ³J_{5,6}, ³J_{2,3} = 11.2 Hz), 7.79 (dd, 2H, H₃ und H₅, ³J_{5,6}, ³J_{2,3} = 12.4 Hz) ppm;

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 21.8 (CH₃), 42.9 (C_aH₂), 68.8 (C_bH₂), 69.4 (C_aH₂), 70.7, 70.8, 70.8 und 70.9 (C_cH₂C_dH₂), 71.5 (C_bH₂), 128.1 (C_{3,5}), 130.0 (C_{2,6}), 133.1 (C₁), 145.0 (C₄) ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2945 (m, ν (C-H)), 2872 (m, ν (C-H)), 1734 (m), 1597 (m), 1452 (m), 1354 (s), 1298 (m), 1244 (m), 1174 (s), 1097 (s), 1043 (w), 1014 (m), 918 (s), 814, 773, 661 cm⁻¹.

Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein. [224]

*Darstellung von 2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-ol (**84**)* [225]



2.82 g (8.11 mmol) monotosyliertes Tetraethylenglykol **83** wurden mit 80.0 mL Ethanol abs. in einem 250 mL-Rundkolben versetzt, portionsweise wurden 1.58 g (24.3 mmol) Natriumazid zugegeben und die Mischung wurde bei 80 °C gerührt. Nach 48 h wurde die Lösung auf RT gekühlt, mit 50.0 mL ges. NaCl-Lösung versetzt und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 100 mL CHCl₃ extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und mit 150 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde einer Säulenchromatographie (SiO₂; CyH/EtOAc = 1/2) unterzogen, um **84** als braunes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 1.72 g (7.83 mmol; 97%, Lit. 81 %);

R_f-Wert: 0.58 (SiO₂; CyH/EtOAc = 1/2);

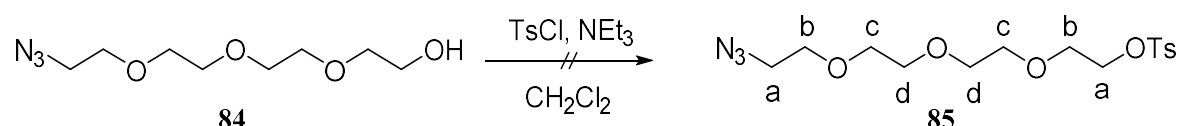
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.38\text{--}3.40$ (m, 2H, $\text{C}_a\text{H}_2\text{N}_3$), $3.62\text{--}3.65$ (m, 2H, $\text{C}_a'\text{H}_2\text{OH}$), $3.67\text{--}3.69$ (m, 10H, $\text{C}_b\text{H}_2\text{C}_c\text{H}_2\text{C}_d\text{H}_2$), $3.74\text{--}3.77$ (m, 2H, $\text{C}_b'\text{H}_2\text{C}_a'\text{H}_2\text{OH}$) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 42.9$ ($\text{C}_a'\text{H}_2\text{OH}$), 50.8 ($\text{C}_a\text{H}_2\text{N}_3$), 70.2 (C_bH_2), 70.81 und 70.85 ($\text{C}_c\text{H}_2\text{C}_d\text{H}_2$), 71.5 ($\text{C}_b'\text{H}_2$), ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2868$ (m, $\nu(\text{C-H})$), 2098 (s, $\nu(\text{N}\equiv\text{N})$), 1446 (m), 1350 (m), 1296 (s), 1250 (w), 1111 (s), 933 (m), 848 , 831 , 744 , 663 cm^{-1} .

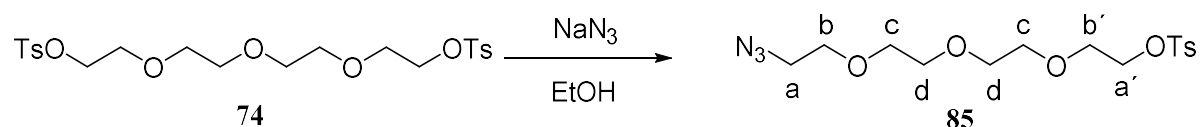
Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.^[225]

Versuch der Darstellung von 2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-4-methylbenzolsulfonat (85)



1.02 g (4.66 mmol) Azid-funktionalisiertes Tetraethylenglykol **84** wurden mit 50.0 mL Dichlormethan und 2.00 mL Triethylamin (1.41 g, 14.0 mmol) versetzt und auf 0°C gekühlt. Anschließend wurden 2.66 g (14.0 mmol) Tosylchlorid zugegeben, auf RT gebracht und 48 h gerührt. Eine durchgeführte DC-Reaktionskontrolle zeigte keine Umsetzung. Nach einer weiteren Woche war nur das Edukt dünnschichtchromatographisch zu erkennen und es wurden 5.70 mg (46.6 μmol) 4-DMAP zugesetzt und 18 h gerührt. Nach einer weiteren Woche wurde keine Umsetzung festgestellt und das Edukt wurde reisoliert.

Darstellung von 2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-4-methylbenzolsulfonat (85)^[224]



3.60 g (7.16 mmol) ditosyliertes Tetraethylenglykol **74** wurden mit 50.0 mL Ethanol abs. versetzt, portionsweise wurden 0.51 g (7.88 mmol) Natriumazid zugegeben und die Mischung bei 80 °C gerührt. Nach 48 h wurde die Lösung auf RT gekühlt, mit 50.0 mL ges. NaCl-Lösung versetzt und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 50 mL CHCl₃ extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und mit 50 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde einer Säulenchromatographie (SiO₂; CyH/EtOAc = 1/1) unterzogen, um **85** als braunes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 741 mg (1.98 mmol; 28%, Lit. 86 %);

R_f-Wert: 0.48 (SiO₂; CyH/EtOAc = 1/1);

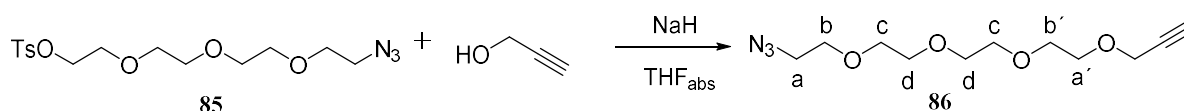
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.45 (s, 3H, CH₃), 3.37–3.39 (m, 2H, C_aH₂), 3.57–3.64 (m, 8H, OC_cH₂C_dH₂), 3.65–3.68 (m, 2H, C_bH₂), 3.68–3.70 (m, 2H, C_b'H₂), 4.14–4.17 (m, 2H, C_a'H₂), 7.34 (dd, 2H, H₃ und H₅, ³J_{5,6}, ³J_{2,3} = 8.04 Hz), 7.80 (dd, 2H, H₂ und H₆, ³J_{5,6}, ³J_{2,3} = 8.28 Hz) ppm;

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 21.8 (CH₃), 50.8 (C_aH₂), 68.8 (C_bH₂), 69.4 (C_a'H₂), 70.2 (C_bH₂), 70.0, 70.8, 70.8 und 70.9 (C_cH₂C_dH₂), 71.5 (C_b'H₂), 128.1 (C_{2,6}), 130.0 (C_{3,5}), 133.1 (C₁), 145.0 (C₄) ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2922 (m, ν(C-H)), 2870 (m, ν(C-H)), 2100 (m, ν(N≡N)), 1597 (m), 1450 (m), 1354 (s), 1290 (m), 1254 (m), 1174 (s), 1097 (s), 1014 (m), 918 (s), 816, 773, 661 cm⁻¹.

Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein. [224]

Darstellung von 1-Azido-3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-in (**86**)^[226]



In einem 50 mL-Schlenkkolben wurden unter Schutzgasatmosphäre 286 µL (278 mg, 4.96 mmol) Propargylalkohol in 20.0 mL THF abs. gelöst und auf 0 °C gekühlt. Unter

Schutzgas wurden portionsweise 120 mg Natriumhydrid (4.96 mmol) zugegeben und 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurden 741 mg (1.98 mmol) des Tetraethylglykol-Derivats **85** in 10.0 mL THF abs. gelöst, tropfenweise der Lösung zugeführt und 30 min bei 0 °C gerührt. Die Lösung wurde auf RT gebracht, 18 h gerührt und anschließend mit 10%iger NH₄OH-Lösung versetzt, bis die Trübung verschwand. Das Lösemittel wurde i.Vak. entfernt und der Rückstand mit Dichlormethan versetzt. Die organische Phase wurde dreimal mit je 50 mL H₂O extrahiert, die wässrigen Phasen vereinigt und mit 50 mL CH₂Cl₂ extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und i.Vak. vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde einer Säulenchromatographie (SiO₂; CyH/EtOAc = 2/3) unterzogen, um **86** als gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 486 mg (1.89 mmol; 95%, Lit. 86 %);

R_f-Wert: 0.47 (SiO₂; CyH/EtOAc = 2/3);

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.42 (t, 1H, C \equiv CH, ³J = 2.40 Hz), 3.38–3.40 (m, 2H, C_aH₂N₃), 3.64–3.68 (m, 14H, C_aH₂C_bH₂(OC_cH₂C_dH₂O)₂C_aH₂C_bH₂), 4.20 (d, 2H, CH₂C \equiv CH, ³J = 2.40 Hz) ppm;

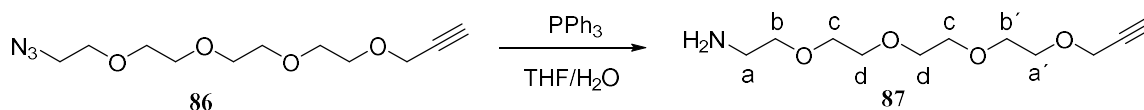
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 50.8 (C_aH₂N₃), 58.6 (CH₂C \equiv CH), 69.3 (C_aH₂), 70.2 (C_bH₂), 70.6, 70.76, 70.79, 70.79 und 70.84 (C_cH₂C_dH₂), 74.6 (C \equiv CH), 79.8 (C \equiv CH) ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3288 (w), 3253 (w), 2908 (m, ν (C-H)), 2868 (m, ν (C-H)), 2100 (s, ν (N \equiv N)), 1444 (m, (-CH₂-)), 1348 (m, ν (-O-CH₂-CH₂-O-)), 1286 (s), 1117 (s), 1095 (s), 935 (m), 922, 845, 667, 644 cm⁻¹;

UV/VIS (Acetonitril): λ_{\max} = 249.4 nm, ϵ = 7.13*10⁴ L cm⁻¹mol⁻¹;

λ_{\max} = 285.0 nm, ϵ = 8.15*10⁴ L cm⁻¹mol⁻¹;

Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.^[226]

Darstellung von 3,6,9,12-Tetraoxapentadec-14-in-1-amin (**87**)^[227]

586 mg (2.28 mmol) Tetraethylglykolderivat **86** wurden in einem 50 mL-Schlenkkolben dreimal evakuiert und mit Stickstoff gespült, mit 10.0 mL THF abs. versetzt, 0.50 mL H₂O und 1.49 g (5.69 mmol) Triphenylphosphin zugegeben. Nach 3 h Rühren bei RT wurde das Lösemittel i.Vak. entfernt und der Rückstand einer Säulenchromatographie (SiO₂; CH₂Cl₂/NEt₃ = 1/0.1) unterzogen. Das ¹H-NMR-Spektrum des Isolats zeigte jedoch einige Signale, die protoniertem Triethylamin zuzuordnen waren. Daher wurde eine zweite Säulenchromatographie (SiO₂; CH₂Cl₂/MeOH = 10/1) durchgeführt, um **87** als braunes Öl zu erhalten. Die verunreinigten Fraktionen wurden einer Extraktion mit 0.05 M NaOH und Dichlormethan unterworfen, die vereinigten organischen Phasen mit Magnesiumsulfat getrocknet und i.Vak. vom Lösemittel befreit. Der erhaltene Rückstand zeigte im ¹H-NMR-Spektrum jedoch kein Signal für das Alkinproton. Dieser Teil der Reaktionsmischung wurde verworfen und es wurde mit dem gewonnenen Produkt der zweiten Säulenchromatographie weiter gearbeitet.

Ausbeute: 147 mg (637 μmol; 28%, Lit. 85 %);

R_f-Wert: 0.163 (SiO₂; CH₂Cl₂/NEt₃ = 10/1);

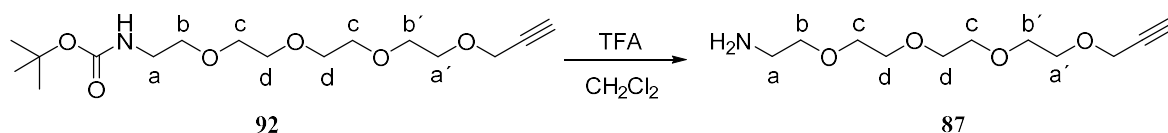
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.17 (s, 2H, NH₂), 2.44 (t, 1H, C≡CH, ³J = 2.40 Hz), 2.92 (t, 2H, C_aH₂NH₂, ³J = 5.08 Hz), 3.59 (t, 2H, C_bH₂, ³J = 5.08 Hz), 3.68–3.72 (m, 12H, (OC_cH₂C_dH₂O)₂C_aH₂C_bH₂), 4.21 (d, 2H, CH₂C≡CH, ³J = 2.40 Hz) ppm;

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 41.7 (C_aH₂NH₂), 58.6 (CH₂C≡CH), 69.3 (C_aH₂), 70.44, 70.46, 70.63, 70.65 und 70.66 ((C_cH₂C_dH₂O)₂C_bH₂), 72.3 (C_bH₂), 74.8 (C≡CH), 78.7 (C≡CH) ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3400 und 3248 (m, ν(N-H)), 2912 (m, ν(C-H)), 2877 (m, ν(C-H)), 2112 (m, ν(C≡CH)), 1630 (m), 1514 (m), 1456 (m), 1352 (m), 1288 (w), 1248 (w), 1088 (s), 1030 (m), 937 (m), 879, 839, 681, 625 cm⁻¹.

Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.^[227]

Darstellung von 3,6,9,12-Tetraoxapentadec-14-in-1-amin (87)^[228]



In einem 50 mL-Rundkolben wurde das Alkin **92** vorgelegt, mit 5.00 mL CH₂Cl₂ und 5.00 mL Trifluoressigsäure versetzt und 3 h bei RT gerührt. Nach erfolgter Reaktion wurde das Lösemittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in bidest. Wasser gelöst und mit NaOH auf pH 14 gebracht. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 50 mL CH₂Cl₂ extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und mit Magnesiumsulfat getrocknet, um **87** als gelbes Öl zu erhalten.

Ausbeute: 174 mg (752 μmol; 89 %, Lit. 96 %);

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.76 (br. s, 2H, NH₂), 2.43 (t, 1H, C≡CH, ³J = 2.40 Hz), 2.88 (t, 2H, C_aH₂, ³J = 5.16 Hz), 3.53 (t, 2H, C_bH₂, ³J = 5.16 Hz), 3.63–3.72 (m, 12H, (OC_cH₂C_dH₂O)₂CH_a·CH_b·), 4.21 (d, 2H, CH₂C≡CH, ³J = 2.40 Hz) ppm;

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 48.9 (C_aH₂), 58.6 (CH₂C≡CH), 69.3 (C_a'H₂), 70.46, 70.52, 70.70, 70.72 und 70.73 (C_cH₂C_dH₂C_b'H₂), 73.3 (C_bH₂), 74.7 (C≡CH), 79.7 (C≡CH) ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3371 (w), 3288 (w), 3244 (w), 2912 (m, ν(C-H)), 2865 (m, ν(C-H)), 2112 (w, ν(C≡C)), 1691 (m, ν(-NH₂), Amid I), 1597 (m, ν(-NH₂), Amid II), 1456 (m, (-CH₂-)), 1350 (m, ν(-O-CH₂-CH₂-O-)), 1292 (s), 1117 (s), 1093 (s), 1034 (m), 941 (m), 920, 843, 802, 679 cm⁻¹;

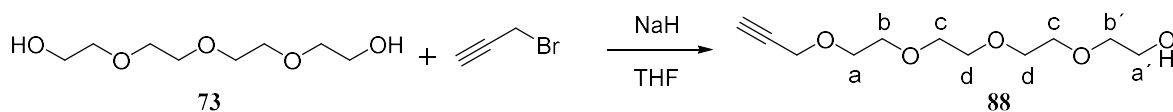
UV/VIS (Acetonitril): λ_{max} = 255.8 nm, ε = 8.96*10⁴ L cm⁻¹mol⁻¹;

λ_{max} = 289.4 nm, ε = 1.01*10⁵ L cm⁻¹mol⁻¹;

MS (ESI,+): gem.: 232.1547 (C₁₁H₂₂NO₄), ber. für C₁₁H₂₂NO₄: 232.15488.

Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.^[228]

Darstellung von 3,6,9,12-Tetraoxapentadec-14-in-1-ol (88)^[229]



In einem 50 mL- Schlenkkolben wurden unter Schutzgasatmosphäre 5.00 g (25.7 mmol) Tetraethylenglykol **73** in 50.0 mL THF abs vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Es wurden portionsweise 610 mg (15.3 mmol) Natriumhydrid zugegeben, die Lösung wurde auf RT erwärmt und für 2 h gerührt. Anschließend wurde die Suspension wieder auf 0 °C gekühlt und über ein Septum 3.06 g (2.29 mL, 25.7 mmol) Propargylbromid innerhalb von 30 min. zutropft. Die Lösung wurde auf RT erwärmt und 2 h gerührt, bevor sie i. Vak. vom Lösemittel befreit wurde. Der Rückstand wurde mit Wasser und CH₂Cl₂ versetzt, dreimal mit je 50 mL CH₂Cl₂ extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. vom Lösemittel befreit. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO₂; Petrol-ether/Aceton = 1/1) gereinigt, um **88** als farbloses Öl zu erhalten.

Ausbeute: 2.63 g (11.3 mmol; 44 %, Lit. 47 %);

R_f-Wert: 0.37 (SiO₂; Aceton/PE = 1/1);

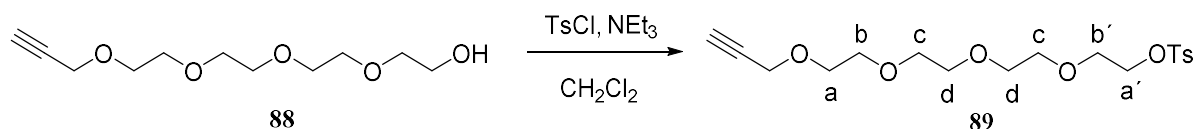
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 2.29 (br. s, 1H, OH), 2.43 (t, 1H, C≡CH, ³J = 2.40 Hz), 3.60–3.62 (m, 2H, C_aH₂NH₂), 3.68–3.672 (m, 14H, CH_aCH_b(OC_cH₂C_dH₂O)₂C_bH₂), 4.20 (d, 2H, CH₂C≡CH, ³J = 2.40 Hz) ppm;

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 58.6 (CH₂C≡CH), 61.9 (C_bH₂), 69.3, 70.48, 70.54, 70.69, 70.72 und 70.77 (CH_aCH_b(C_cH₂C_dH₂O)₂C_bH₂), 72.7 (C_aH₂), 74.7 (C≡CH), 79.8 (C≡CH) ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3419 (m, ν(OH)), 2873 (m, ν(C-H)), 2116 (w, ν(C≡CH)), 1643 (m), 1456 (m), 1350 (m), 1292 (m), 1248 (m), 1090 (s), 1034 (m), 939 (m), 883, 837, 617 cm⁻¹.

Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.^[229]

Darstellung von 3,6,9,12-Tetraoxapentadec-14-in-1-yl-4-methylbenzolsulfonat (89)^[229]



In einen 250mL-Schlenkkolben wurden 1.40 g (6.03 mmol) des Alkinols **88** und 2.66 mL (1.94 g, 19.2 mmol) Triethylamin in CH_2Cl_2 abs. vorgelegt und auf 0°C gekühlt. Portionsweise wurden 1.44 g (7.55 mmol) Tosylchlorid zugegeben, nach 30 min. Rühren das Eisbad entfernt und 18 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 50.0 mL NH_4Cl -Lösung und 50.0 mL CH_2Cl_2 versetzt und 10 min. gerührt. Die wässrige Phase wurde viermal mit je 50.0 mL CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit je 50.0 mL 1 N Salzsäure und ges. NaCl -Lösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und i.Vak. vom Lösemittel befreit. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO_2 ; $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 99/1 \rightarrow 90/3$) wurde das Produkt wiederum vom Lösemittel i.Vak. befreit, um **89** als farbloses Öl zu erhalten.

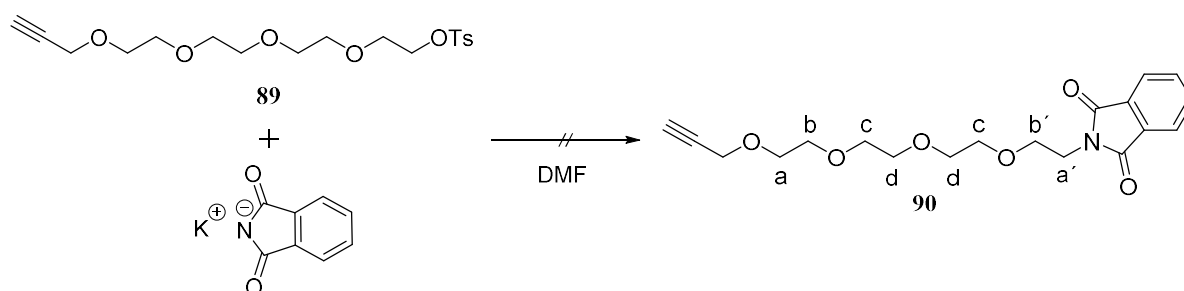
Ausbeute: 1.97 g (5.09 mmol; 85 %, Lit. 90 %);

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.42$ (t, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$, $^3J = 2.41$ Hz), 2.45 (s, 3H, CH_3), 3.56–3.72 (m, 14H, $\text{CH}_a\text{CH}_b(\text{OC}_c\text{H}_2\text{C}_d\text{H}_2\text{O})_2\text{C}_b'\text{H}_2$), 4.15–4.17 (m, 2H, $\text{C}_a'\text{H}_2$), 4.20 (d, 2H, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, $^3J = 2.40$ Hz), 7.34 (dd, 2H, H_3 und H_5 , $^3J_{5,6}$, $^3J_{2,3} = 8.21$ Hz), 7.79 (dd, 2H, H_2 und H_6 , $^3J_{5,6}$, $^3J_{2,3} = 8.49$ Hz) ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2947$ (m, $\nu(\text{C-H})$), 2870 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2114 (w, $\nu(\text{C}\equiv\text{CH})$), 1597 (w), 1489 (w), 1452 (m), 1352 (s), 1292 (m), 1248 (m), 1174 (s), 1095 (s), 1012 (m), 918 (s), 816, 773, 661 cm^{-1} .

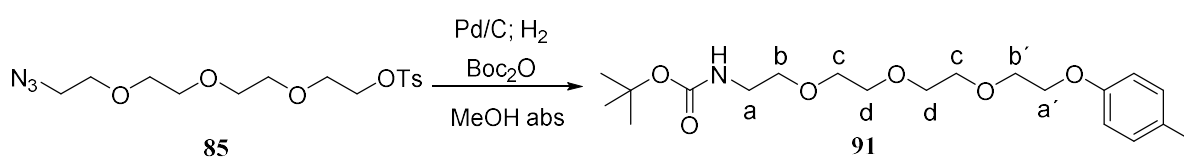
Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.^[229]

Versuch der Darstellung von 2-(3,6,9,12-Tetraoxapentadec-14-in-1-yl)isoindolin-1,3-dion (90)



1.73 g (4.47 mmol) des Alkins **89** wurden unter Schlenkbedingungen in 10 mL DMF abs. gelöst und mit 1.37 g (6.71 mmol) Kaliumphthalimid versetzt. Die resultierende Lösung wurde bei 110 °C 18 h gerührt und anschließend i.Vak. vom Lösemittel befreit. Der Rückstand wurde in Diethylether gelöst, der verbleibende Feststoff über eine Fritte abfiltriert und die resultierende Lösung i.Vak vom Lösemittel befreit. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das gewünschte Produkt nicht isoliert werden. Es zeigte sich im ¹H- NMR-Spektrum, dass sich das Phthalimid zur Phthalsäure zersetzt hatte und somit das Alkin über eine Esterbindung jeweils mit der Säuregruppe reagiert hatte. Das Produkt wurde verworfen.

Darstellung von 2,2-Dimethyl-4-oxo-3,8,11,14-tetraoxa-5-azahexadecan-16-yl-4-methylbenzenesulfonat (91)^[224]



1.48 g (3.96 mmol) **85** wurden in einem 50 mL-Schlenkkolben unter Schutzgasatmosphäre in 10 mL MeOH abs. gelöst und mit 500 mg Palladium/Kohle versetzt. Die Reaktionsmischung wurde mittels Eisbad auf 0 °C gekühlt und langsam 1.10 mL (1.03 g, 4.74 mmol) Di-*tert*-butyl-dicarbonat zugetropft. Nach 10 min wurde das Eisbad entfernt, ein mit Wasserstoff gefüllter Luftballon aufgesetzt und die Reaktion 18 h bei RT gerührt. Nach erfolgter Reaktion wurde der Feststoff über einen Blaubandfilter entfernt, das Lösemittel i.Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂; CyH/EtOAc = 1/1), um **91** als farbloses Öl zu erhalten.

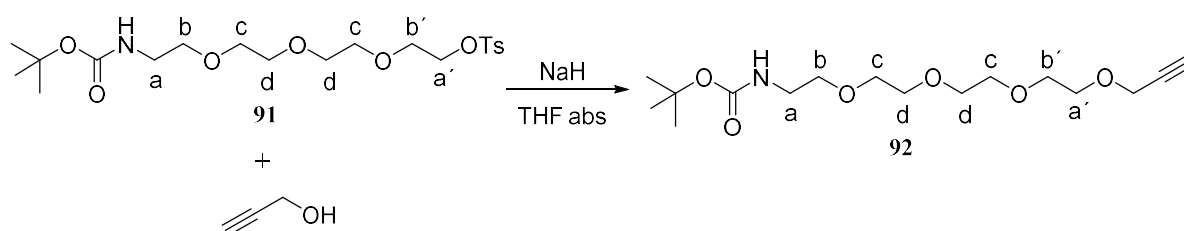
Ausbeute: 564 mg (1.26 mmol; 32 %, Lit. 63 %);

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.45 (s, 3H, CH₃), 3.30 (q, 2H, C_aH₂, ³J = 4.92 Hz), 3.53 (t, 2H, C_bH₂, ³J = 5.04 Hz), 3.58–3.62 (m, 8H, (OC_cH₂C_dH₂O)₂), 3.68–3.71 (m, 2H, C_bH₂), 4.15–4.17 (m, 2H, C_aH₂), 4.99 (br. s, 1H, NH), 7.34 (dd, 2H, H₃ und H₅, ³J_{5,6}, ³J_{2,3} = 8.60 Hz), 7.80 (dd, 2H, H₂ und H₆, ³J_{5,6}, ³J_{2,3} = 8.26 Hz) ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3359 (m, ν (N-H)), 2972, 2924 und 2871 (m, ν (C-H)), 1707 (s, ν (C=O)), 1597 (w), 1514, 1454 (m), 1389 (w), 1358 (s), 1273 (m), 1250 (m), 1173 (s), 1097 (s), 1014 (m), 918 (m), 864, 816, 775, 662 cm⁻¹.

Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.^[224]

Darstellung von *tert*-Butyl-(3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-in-1-yl)carbammat (**92**)



Unter Schlenkbedingungen wurden 170 μ L (164 mg, 2.92 mmol) Propargylalkohol in 20 mL THF abs. in einem 50 mL-Schlenkcolben vorgelegt und mittels Eisbad auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden langsam 70 mg (2.92 mmol) Natriumhydrid, welches vorher mit *n*-Pentan gewaschen wurde, in Portionen zugegeben, nach 10 min. langsam das in 10 mL THF abs. gelöste tosylierte Tetraethylglykolderivat **91** zugetropft und weitere 30 min. bei 0 °C gerührt. Das Eisbad wurde entfernt und die Reaktion bei RT für 18 h gerührt. Die Reaktion wurde mit 15 mL 10%iger NH₄OH-Lsg. versetzt, bis die Trübung verschwand und mit 20 mL CH₂Cl₂ versetzt. Die organische Phase wurde dreimal mit je 50 mL bidest. Wasser extrahiert, die vereinigten wässrigen Phasen dreimal mit je 50 mL CH₂Cl₂ gewaschen, die organischen Phasen vereinigt und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde i.Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂; CyH/EtOAc = 2/1), um **92** als farbloses Öl zu erhalten.

Ausbeute: 375 mg (1.08 mmol; 92 %);

R_f-Wert: 0.63 (SiO₂; CyH/EtOAc = 1/2);

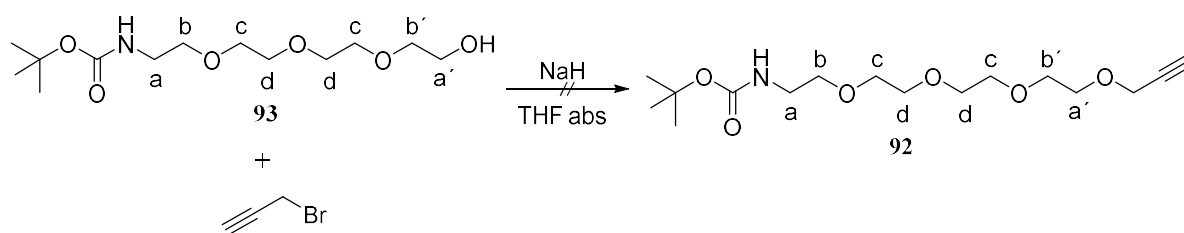
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.44 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.42 (t, 1H, C \equiv CH, ³J = 2.40 Hz), 3.31–3.32 (m, 2H, C_aH₂), 3.53–3.55 (m, 2H, C_aH₂), 3.60–3.72 (m, 12H, CH_b(OC_cH₂C_dH₂O)₂CH_{a'}), 4.21 (d, 2H, CH₂C \equiv CH, ³J = 2.40 Hz), 5.03 (br. s, 1H, NH) ppm;

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 28.6 (C(CH₃)₃), 40.5 (C_aH₂), 58.6 (CH₂C \equiv CH), 69.3 (C_aH₂), 70.4 (C_bH₂), 70.57, 70.69, 70.74 und 70.77 (C_cH₂C_dH₂ and C_bH₂), 74.7 (C \equiv CH), 79.2 (C(CH₃)₃), 79.8 (C \equiv CH) ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3352, 3248, 2970, 2925, 2870 (m, ν (C-H)), 2112 (w, ν (C \equiv C)), 1705 (s, ν (C=O)), 1514 (m, ν (-NH-)), 1454 (m, (-CH₂-)), 1390, 1364 (m, ν (-O-CH₂-CH₂-O-)), 1271 (m), 1248 (m), 1171 (m, COOC(CH₃)₃), 1097 (s, COOC(CH₃)₃), 1036 (m), 945, 922, 864, 779, 758, 663, 613 cm⁻¹;

MS (ESI,+): gem.: 354.1889 (C₁₆H₂₉NNaO₆), ber. für C₁₆H₂₆NNaO₆: 354.18926.

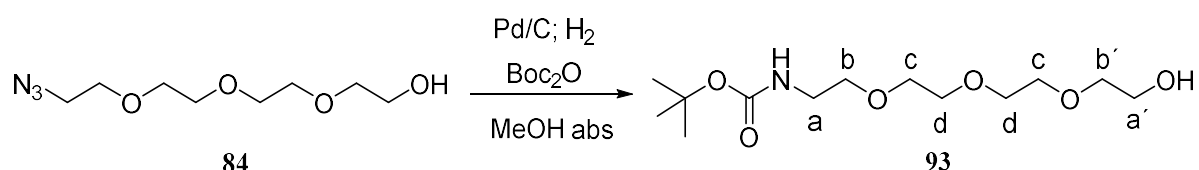
Versuch der Darstellung von *tert*-Butyl-(3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-in-1-yl)carbammat (**92**)



In einem 50 mL-Schlenkcolben wurden 562 mg (1.92 mmol) Amid **93** unter Schutzgasatmosphäre in 20 mL THF abs. gelöst und mit 52 mg (2.18 mmol) Natriumhydrid versetzt. Nach 10 min. wurde die Reaktion auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit 220 μ L (342 μ g, 2.87 mmol) Propargylbromid versetzt. Nach 40 min. wurde das Eisbad entfernt und die Reaktion für weitere 18 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde i.Vak. entfernt, der Rückstand in CH₂Cl₂ gelöst und mit 50 mL ges. NaCl-Lösung und 50 mL bidest. Wasser extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit CH₂Cl₂ extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel i.Vak. entfernt. Nach

säulenchromatographischer Aufreinigung (SiO₂; CyH/EtOAc = 1/1) wurde ein Produkt als farbloses Öl erhalten, jedoch war kein eindeutiges CH₂-Signal der Alkylgruppe im ¹H-NMR-Spektrum sowie im IR-Spektrum erkennbar. Der Ansatz wurde verworfen.

Darstellung von tert-Butyl-(2-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-carbammat (93)^[230]



In einem 50 mL-Schlenkkolben wurden 933 mg (4.25 mmol) **84** in 10 mL MeOH abs gelöst, mit 300 mg Pd/C versetzt und unter Argon auf 0 °C mittels Eisbad gekühlt. Anschließend wurden 1.17 mL (1.11 g, 5.11 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat zugegeben und 30 min. bei 0 °C gerührt. Nun wurde Wasserstoff in die Reaktionsmischung für 20 h geleitet. Der Feststoff wurde mit einem Blaubandfilter abgetrennt, das Lösemittel i.Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (SiO₂; CyH/EtOAc = 1/1) gereinigt, um **93** als farbloses Öl zu erhalten.

Ausbeute: 610 mg (2.08 mmol; 49 %, Lit. 56 %);

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.17 (s, 1H, OH), 3.30–3.33 (m, 2H, C_aH₂), 3.54 (t, 2H, C_{a'}H₂, ³J = 5.34 Hz), 3.61–3.71 (m, 10H, CH_b(OC_cH₂C_dH₂O)₂), 3.77 (t, 2H, C_{b'}H₂, ³J = 5.28 Hz), 5.01 (br. s, 1H, NH) ppm;

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 28.4 (C(CH₃)₃), 40.6 (C_aH₂), 70.4 (C_aH₂), 70.74 und 70.82 (C_cH₂C_dH₂ and C_bH₂), 71.5 (C_{b'}H₂), 79.3 (C(CH₃)₃) ppm, CO wurde nicht detektiert;

UV/VIS (Acetonitril): λ_{\max} = 243.4 nm, ϵ = 1.40*10⁵ L cm⁻¹mol⁻¹;

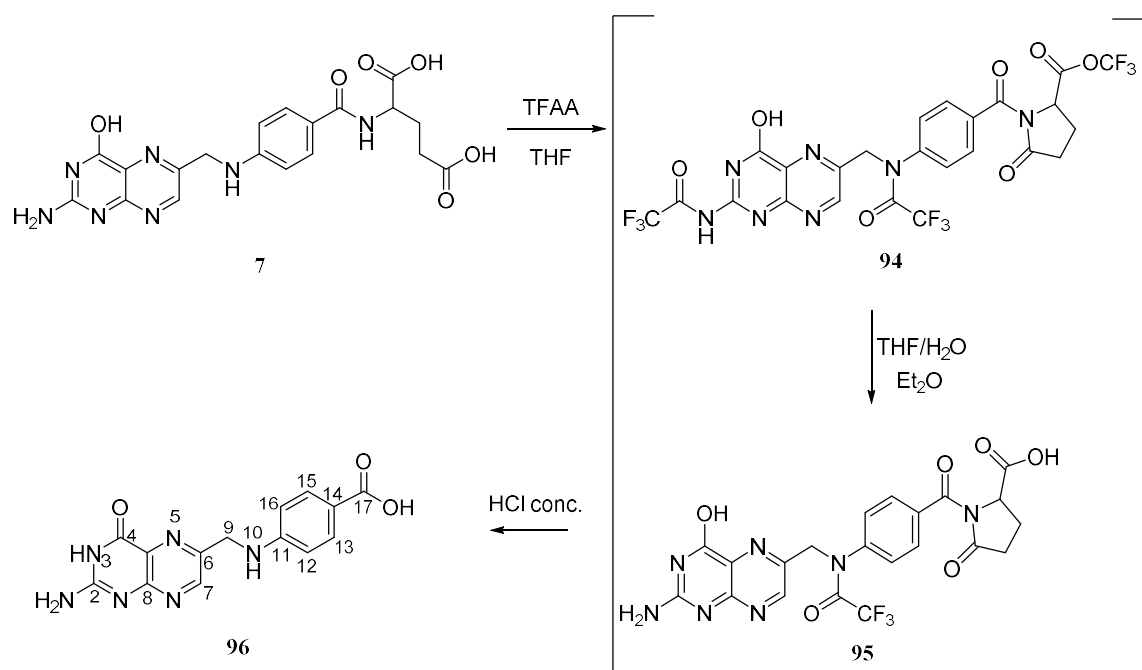
λ_{\max} = 283.0 nm, ϵ = 1.63*10⁵ L cm⁻¹mol⁻¹;

λ_{\max} = 299.6 nm, ϵ = 1.72*10⁵ L cm⁻¹mol⁻¹;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3562 und 3354 (m, v(N-H)), 2972 (m, v(C-H)), 2926 und 2870 (m, v(C-H)), 1705 (s, v(C=O)), 1513 (4), 1454 (w), 1390 (w), 1365 (m), 1248 (m), 1169 (s), 1103 (s), 1043 (w), 968 (w), 937, 864, 781, 748, 663 cm^{-1} .

Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.^[230]

Darstellung von 4-(((2-Amino-4-hydroxypteridin-6-yl)methyl)amino)benzoesäure (96)^[231]



In einem 250 mL-Schlenkkolben wurden 100 mL THF abs. unter Schutzgas vorgelegt, im Dunkeln 10.0 g (22.7 mmol) Folsäure (7) zugegeben und auf 0 °C mittels Eisbad gekühlt. Anschließend wurden 38.0 g (25.5 mL, 2181 mmol) Trifluoressigsäureanhydrid über ein Septum innerhalb von 20 min zugetropft und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde eingengt, auf 350 mL Toluol gegeben und über Nacht im Kühlschrank auskristallisiert. Der ausgefallene Niederschlag wurde mit einer P4-Fritte abfiltriert, mit Diethylether nachgewaschen und im Vakuum getrocknet, um Trifluormethyl-5-oxo-1-(4-(2,2,2-trifluoro-*N*-((4-hydroxy-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)pteridin-6-yl)methyl)acetamido)benzoyl)pyrrolidin-2-carboxylat **94** als gelben Feststoff zu erhalten. **94** wurde in THF gelöst, mit Eis versetzt und über Nacht unter Kühlung gerührt, wobei sich ein schwarzer Feststoff bildete. Die gesamte

Lösung wurde auf 300 mL Diethylether gegeben und sechs Stunden gerührt. Der entstandene gelbe Feststoff wurde mit einer Fritte abfiltriert, im Ölpumpenvakuum getrocknet, in 50 mL konzentrierter Salzsäure gelöst und 18 h auf 60 °C erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 2.5 h auf 116 °C erhitzt und nach Abkühlen auf 500 mL Eis gegeben. Der Rückstand wurde mit einer Fritte abgefrittet und die Mutterlauge mit Natronlauge auf pH=4 gebracht. Der Niederschlag wurde mit einer Fritte abfiltriert, in Diisopropylether erhitzt, abwechselnd mit H₂O und MeOH versetzt, bis er sich gelöst hat und im Kühlschrank zur Kristallisation gebracht. Der entstandene gelbe Niederschlag wurde mit einer P4-Fritte abfiltriert und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1.17 g (3.75 mmol; 17 %);

Smp.: 308 °C (Zers), Lit.: 310 °C;

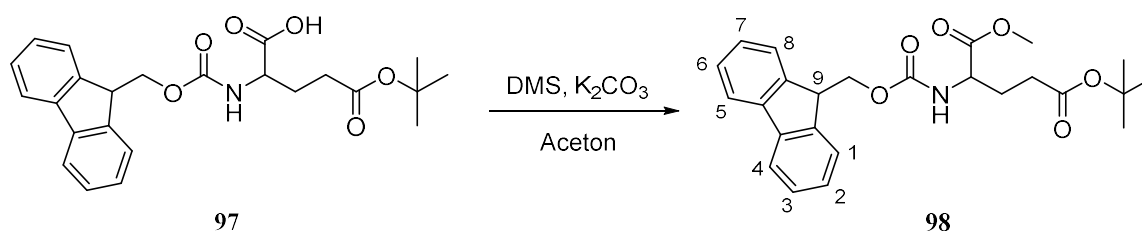
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 4.48 (d, 2H, C₉H₂NH, 3J = 5.80 Hz), 6.64 (d, 2H, C₁₂H und C₁₆H, 3J = 8.60 Hz), 6.94 (br. s, 2H, NH₂), 7.16 (t, 1H, C₉H₂NH, 3J = 5.80 Hz), 7.66 (d, 2H, C₁₃H und C₁₅H, 3J = 8.60 Hz), 8.64 (s, 1H, C₇H), 11.4 (br. s, 1H, C₄NH), 12.1 (s, 1H, OH) ppm;

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 45.8 (C₉), 111.3 (C₁₂ und C₁₆), 117.7 (C₁₃), 128.9 (C_{4a}), 131.2 (C₁₃ und C₁₅), 148.3 (C₈), 148.8 (C₉), 152.0 (C₁₁), 156.8 (C₆), 167.4 (C₁₇), 181.8 (C₄) ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3350 und 3251 (m, ν (N-H)), 3045 (m, ν (C-H)), 2794 (m, ν (C-H)), 1682 (m, ν (C=O)), 1603 (m, ν (C=C_{arom})), 1533 (w), 1487 (w), 1414 (w), 1373 (w), 1336 (w), 1325 (w), 1294 (w), 1173 (m, ν (C-O)), 1045 (s), 897, 854, 820, 795, 779, 700, 671, 629 cm⁻¹.

Die erhaltenen Werte stimmen mit denen in der Literatur überein.^[231]

Darstellung von 5-(*tert*-Butyl)-1-methyl-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-glutamat (**98**)^[232]



In einem 100 mL-Rundkolben wurden 5.00 g (11.8 mmol) *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-glutaminsäure γ -*tert*-butylester (**97**) gegeben, in 25 mL Aceton gelöst, mit 4.10 g (29.6 mmol) Kaliumcarbonat versetzt und 10 min bei RT gerührt. Anschließend wurde 1.55 mL (2.06 g, 16.3 mmol) Dimethylsulfat zugegeben und für 48 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde i. Vak. entfernt, der Rückstand in bidest. Wasser gelöst und die wässrige Phase viermal mit je 100 mL EtOAc extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde i. Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂; CyH/EtOAc = 3/1), um **98** als farblosen Feststoff zu erhalten.

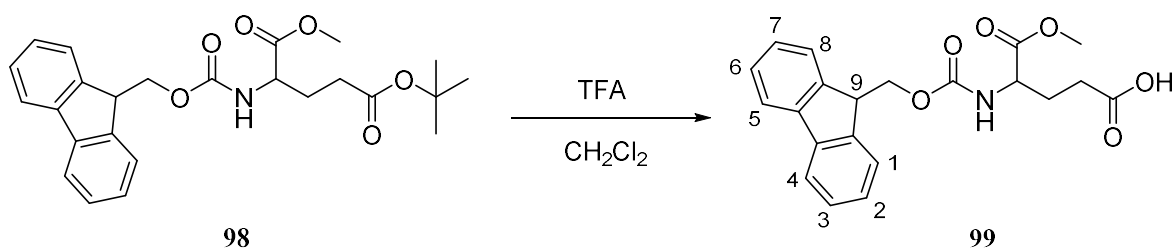
Ausbeute: 3.65 g (8.30 mmol; 71 %, Lit. 94 %);

Smp.: nicht detektiert;

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.39 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.75–1.81 (m, 1H, CH₂CH₂ oder CH₂CH₂), 1.90–1.98 (m, 1H, CH₂CH₂ oder CH₂CH₂), 2.26–2.30 (m, 2H, CH₂CH₂), 3.63 (s, 3H, OCH₃), 4.05–4.10 (m, 1H, NHCHCH₂), 4.21–4.24 (m, 1H, C₉H), 4.31 (d, 2H, C₉HCH₂, ³*J* = 6.48 Hz), 7.33 (t, 2H, C₃H und C₆H, ³*J* = 7.37 Hz), 7.42 (t, 2H, C₂H und C₇H, ³*J* = 7.41 Hz), 7.70–7.73 (m, 2H, C₁H und C₈H), 7.79 (d, 1H, NH, ³*J* = 7.92 Hz), 7.90 (d, 2H, C₄H und C₅H, ³*J* = 7.48 Hz) ppm;

Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.^[232]

Darstellung von N-9-Fluorenylmethoxycarbonylglutaminsäure- α -methylester (99)^[233]



In einem 100 mL-Rundkolben wurden 3.65 g geschützte Glutaminsäure **98** mit 20 mL CH₂Cl₂ versetzt und langsam 12.0 mL TFA zugetropft. Nach 3 h Rühren bei RT wurde der Reaktionslösung 10 mL bidest. Wasser zugegeben und die wässrige Phase viermal mit je 40 mL CH₂Cl₂ extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit Magnesiumsulfat getrocknet und i.Vak. vom Lösemittel entfernt. Der Rückstand wurde in Diethylether/*n*-Hexan (2/3) umkristallisiert, um **99** als farblosen Feststoff zu erhalten.

Ausbeute: 2.39 g (6.22 mmol; 75 %, Lit. 92 %);

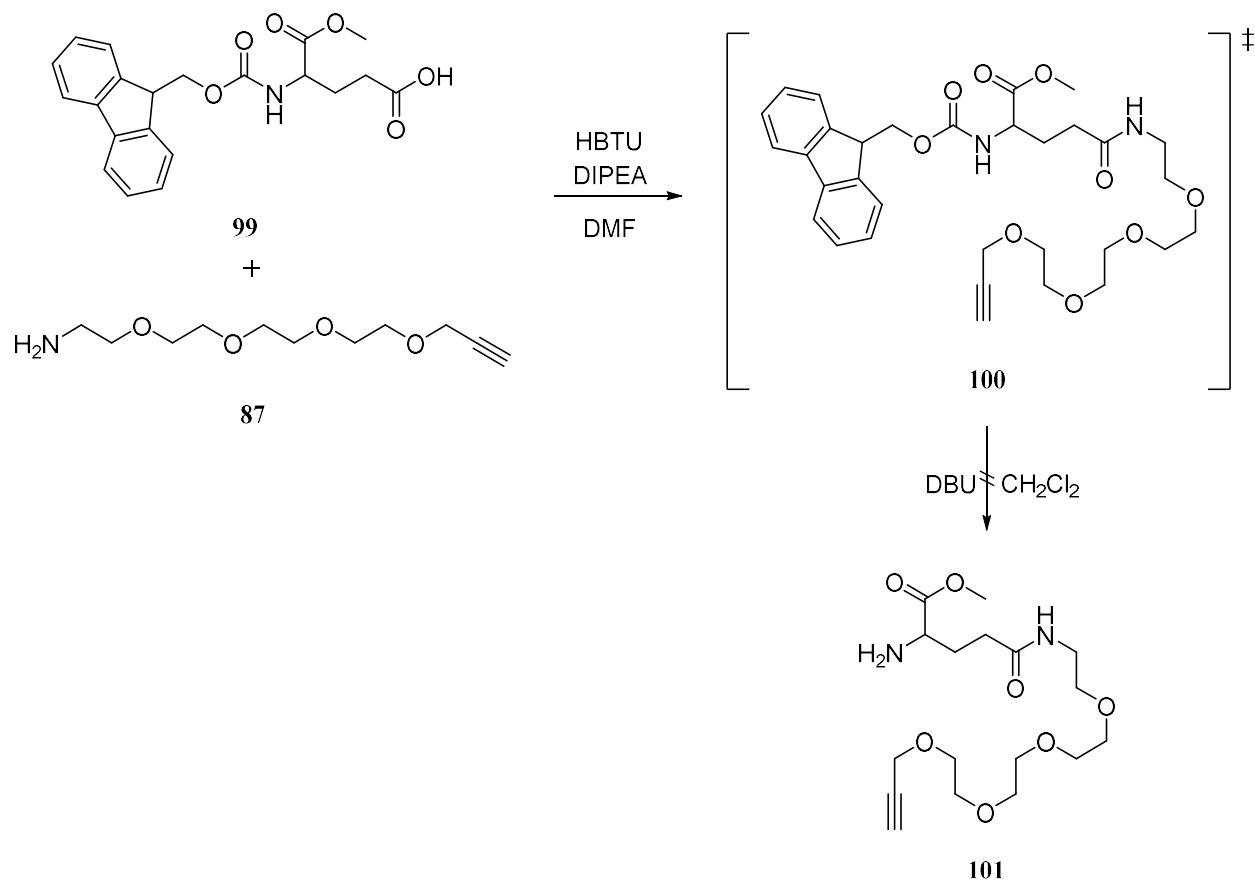
Smp.: nicht detektiert;

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.83–1.91 (m, 1H, CH₂CH₂ oder CH₂CH₂), 1.92–2.01 (m, 1H, CH₂CH₂ oder CH₂CH₂), 2.29–2.33 (m, 2H, CH₂CH₂), 3.63 (s, 3H, OCH₃), 4.05–4.11 (m, 1H, NHCHCH₂), 4.21–4.25 (m, 1H, C₉H), 4.31 (d, 2H, C₉HCH₂, ³J = 7.84 Hz), 7.34 (t, 2H, C₂H und C₇H, ³J = 7.44 Hz), 7.42 (t, 2H, C₃H und C₆H, ³J = 7.44 Hz), 7.71 (d, 2H, C₁H und C₈H, ³J = 7.48 Hz), 7.81 (d, 1H, NH, ³J = 7.88 Hz), 7.90 (d, 2H, C₄H und C₅H, ³J = 7.48 Hz), 12.2 (br. s, 1H, COOH) ppm;

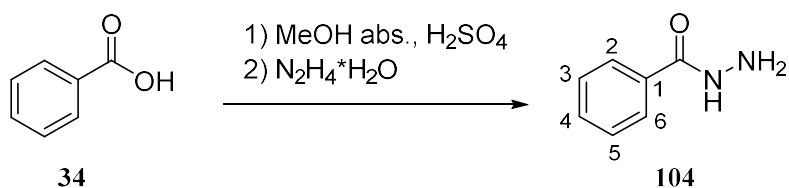
FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3344 (m, ν (OH)), 3018 (m, ν (N-H)), 2952 (m, ν (C-H)), 1741 (m, ν (C=O)), 1689 (s, ν (-NH₂), Amid I), 1527 (s, ν (-NH₂), Amid II), 1444 (m, (-CH₂-)), 1411 (w), 1362 (w), 1292 (m), 1253 (m), 1217 (s), 1169 (s), 1090 (m), 1043 (m), 991 (m), 949, 879, 781, 758, 737, 615 cm⁻¹.

Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.^[233]

Versuch der Darstellung von Methyl-20-amino-17-oxo-4,7,10,13-tetraoxa-16-azahenicos-1-in-21-olat (**101**)



301 mg (785 μ mol) der geschützten Glutaminsäure **99** wurden in 10 mL DMF abs. gelöst, mit 388 mg (1.02 mmol) HBTU und 174 μ L (192 mg, 1.02 mmol) DIPEA versetzt und 30 min bei RT gerührt. Anschließend wurden 200 mg (869 μ mol) Amin **87** in 10 mL DMF abs. gelöst, zu der aktivierten Aminosäure getropft und die Reaktionsmischung bei 50 °C 18 h gerührt. Das Lösemittel wurde i.Vak. entfernt, der Rückstand in 20 mL EtOAc und 20 mL ges. NaCl-Lösung gelöst und die wässrige Phase viermal mit je 50 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösemittel i.Vak. entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂; CH₂Cl₂/MeOH = 150/1 \rightarrow 100/1 \rightarrow 80/1 \rightarrow 10/1). Das erhaltene Produkt wurde in 8.00 mL CH₂Cl₂ gelöst, mit 860 μ L (873 mg, 5.73 mmol) frisch destilliertem DBU versetzt und bei 30 °C für 2 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde i.Vak. vom Lösemittel befreit und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂; CH₂Cl₂/MeOH = 100/1 \rightarrow 80/1 \rightarrow 10/1). Es konnte kein Produkt **101** erhalten werden, es wurde lediglich abgespaltenes Fmoc isoliert.

Darstellung von Benzhydrazid (**104**)^[234]

2.44 g (20.0 mmol) Benzoesäure **34** wurden in einem 50 mL-Schlenkkolben unter Schutzgas mit 20.0 mL Methanol abs. versetzt. Zu der Reaktionslösung wurden 0.50 mL Schwefelsäure gegeben und 24 h bei 90 °C gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf RT gekühlt und mit 10.0 mL (312 µmol) Hydrazinhydrat versetzt, 30 min bei 90 °C und anschließend 16 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde i.Vak entfernt, mit EtOAc und Wasser versetzt. Zur verbesserten Phasentrennung wurde ein Spatel Natriumchlorid zugegeben und die wässrige Phase fünfmal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel i.Vak. entfernt, um **104** als farblosen Feststoff zu erhalten.

Ausbeute: 2.05 g (15.0 mmol; 75 %, Lit. 86 %);

Smp.: nicht detektiert;

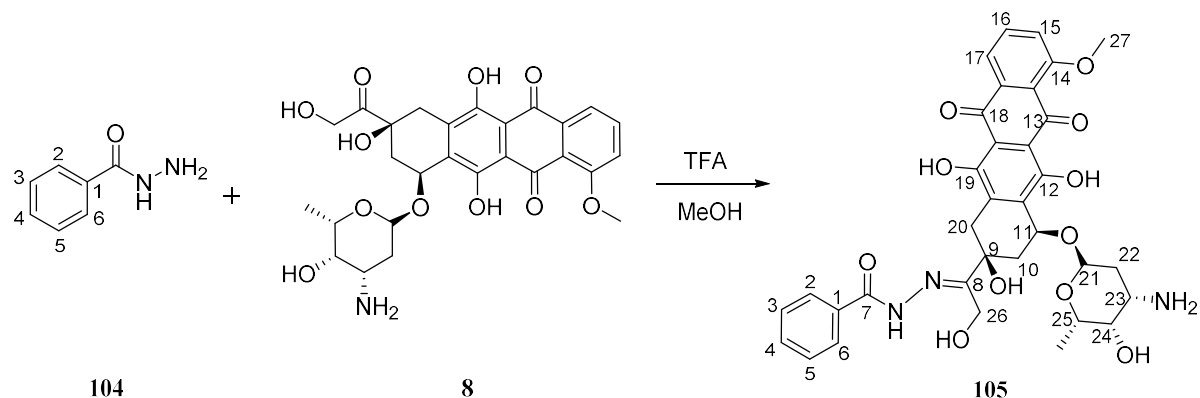
R_f-Wert: 0.12 (SiO₂; EtOAc/CyH = 2/1);

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 4.49 (br. s, 2H, NH₂), 7.42–7.53 (m, 3H, C₃H, C₄H und C₅H), 7.80–7.83 (m, 2H, C₂H und C₆H), 9.77 (br. s, 1H, NH) ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3300 (m), 3197 (m), 3051 (m), 3018 (m), 2875 (m, ν(C-H)), 1658 (m, ν(-NH₂), Amid I), 1608 (m), 1556 (m), 1485 (m), 1444 (w), 1342 (m), 1296 (w), 1184 (w), 1117 (s), 1070 (w), 985 (m), 920, 881, 802, 754, 671 cm⁻¹.

Die erhaltenen analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.^[234]

*Darstellung von N'-((E)-1-((2S,4S)-4-(((2S,4S,5S,6S)-4-Amino-5-hydroxy-6-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2,5,12-trihydroxy-7-methoxy-6,11-dioxo-1,2,3,4,6,11-hexahydrotetracen-2-yl)-2-hydroxyethyliden)benzhydrazid (**105**)*



13.6 mg (99.9 μmol) Benzhydrazid **104** und 60.0 mg (103 μmol) Doxorubicin **8** wurden in einem 50 mL-Rundkolben mit 20.0 mL Methanol abs. versetzt. Zu der Reaktionslösung wurden 100 μL Trifluoressigsäure gegeben und 24 h bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Das Lösemittel wurde i.Vak entfernt, dann mit 10 mL Methanol und anschließend mit 15 mL Diethylether bis zur Fällung versetzt. Der rote Feststoff wurde abfiltriert und mit Ether nachgewaschen, um **105** als roten Feststoff zu erhalten.

Ausbeute: 49.6 mg (74.9 μmol ; 75 %);

Smp.: nicht detektiert;

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.17 (d, 3H, C25CH₃, 3J = 6.6 Hz), 1.66–1.72 (m, 1H, C22H_aH_b oder C22H_aH_b), 1.86–1.93 (m, 1H, C10H_aH_b oder C10H_aH_b), 2.14–2.26 (m, 2H, C22H_aH_b oder C22H_aH_b und C10H_aH_b oder C10H_aH_b), 2.91–3.03 (m, 1H, C23H), 3.20–3.24 (m, 1H, C20H_aH_b oder C20H_aH_b), 3.37–3.41 (m, 1H, C25H), 3.55–3.56 (m, 1H, C20H_aH_b oder C20H_aH_b), 3.99 (s, 3H, C27H₃), 4.15–4.21 (m, 1H, C24H), 4.57–4.71 (m, 2H, C26H₂), 4.87–4.97 (m, 1H, C9OH), 5.14–5.25 (m, 1H, C26OH), 5.24–5.33 (m, 2H, C11H und C21H), 5.45–5.46 (m, 1H, C24OH), 7.51–7.85 (m, 6H, C₂H, C₃H, C₄H, C₅H C₆H und C₁₅H), 7.91–7.95 (m, 2H, C₁₆H und C₁₇H), 11.9 (br. s, 1H, NH) ppm;

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 16.6 (C25CH₃), 28.5 (C10), 32.2 (C20) 36.6 (C22), 39.7 (C23), 46.8 (C25), 56.7 (C27), 63.8 (C26), 66.1 (C24), 71.8 (C9), 99.2 (C11), 110.6 (C21), 110.8 (C12a und C18a), 119.2 (C17), 119.3 (C15), 119.8 (C13a), 126.8 (C2 und C6), 128.9 (C3

und C5), 133.2 (C17a), 134.7 (C4), 135.8 (C1), 136.3 (C16), 136.4 (C11a), 137.7 (C19a), 154.5 (C8), 160.8 (C14), 162.1 (C7), 166.1 (C19), 166.8 (C12), 186.5 (C13), 186.6 (C18) ppm;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3386 (m), 3242 (m), 2981 (w), 2897 (w, v(C-H)), 1657 (m, v(-NH₂), Amid I), 1614 (m, v(-NH₂), Amid II), 1578 (m), 1522 (m), 1442 (m, (-CH₂-)), 1408 (m), 1383 (w), 1279 (m), 1242 (m), 1188 (m), 1090 (s), 1039 (m), 943 (m), 901, 843, 802, 771, 615 cm⁻¹;

UV/Vis (Acetonitril): λ_{\max} = 252 nm, ϵ = 3.65*10³ L cm⁻¹mol⁻¹;

λ_{\max} = 478 nm, ϵ = 1.29*10³ L cm⁻¹mol⁻¹;

λ_{\max} = 494 nm, ϵ = 1.26*10³ L cm⁻¹mol⁻¹;

λ_{\max} = 528 nm, ϵ = 7.69*10² L cm⁻¹mol⁻¹;

MS (ESI,+): gem.: 662.2336 (C₃₄H₃₆N₃O₁₁), ber. für C₃₄H₃₆N₃O₁₁: 662.2344.

6.3.2 Herstellung und Funktionalisierung von Nanodiamant

Nanodiamant-Vermahlung (65)



65

25 g Detonationsnanodiamant wurden in 200 mL bidest. Wasser portionsweise über 3 h im Ultraschallbad dispergiert und anschließend in der Rührwerkskugelmühle bei 4000 rpm mit Hilfe von 150 g Zirkoniumdioxid-Mahlkörpern (d = 50 µm) vermahlen. Es wurden weitere 200 mL bidest. Wasser zugegeben und sobald die gewünschte Teilchengröße erreicht wurde, wurde der Mahlgang beendet und die Dispersion von den Mahlkörpern abgetrennt.

Konzentration: 38,8 mg/ml; total: 500 mL;

Teilchengröße (H₂O): 10 % ≤ 2.19 nm, 50 % ≤ 3.23 nm, 90 % ≤ 5.18 nm;

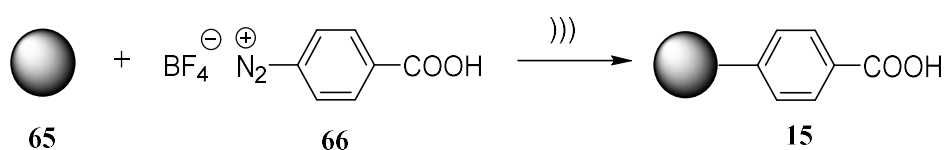
Zetapotential (mV) (pH = 5.9): +43.2;

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3380 (s, $\nu(\text{O-H})$), 1718 (m, $\nu(\text{C=O})$), 1634 (m, $\delta(\text{OH})$), 1313(m), 1090 (m), 668, 653, 642, 636 cm^{-1} .

Oberflächenbelegung (TGA): keine funktionellen Gruppen nachweisbar.

Darstellung von Carbonsäure-funktionalisierten Nanodiamantpartikeln 15

Variante a:



200 mg (7 mL) gemahlener Nanodiamant **65** wurden zusammen mit 200 mg 4-Carboxybenzodiazoniumtetrafluoroborat (**66**) mit Ultraschall für 55 min unter Wasserbadkühlung und anschließend ohne Kühlung weitere 15 min behandelt (Output 1 ½, hold, gepulst). Nach Beenden der Reaktion wurde die Suspension auf vier Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und zentrifugiert (15 min, 52000 rpm). Der Rückstand wurde dreimal mit bidest. Wasser (15 min, 15000 rpm), siebenmal mit DMSO (60 min, 52000 rpm), einmal mit Aceton (5 min, 52000 rpm) und dreimal mit bidest. Wasser (15 min, 15000 rpm) gewaschen.

Rückgewinnung: 140 mg (70 %);

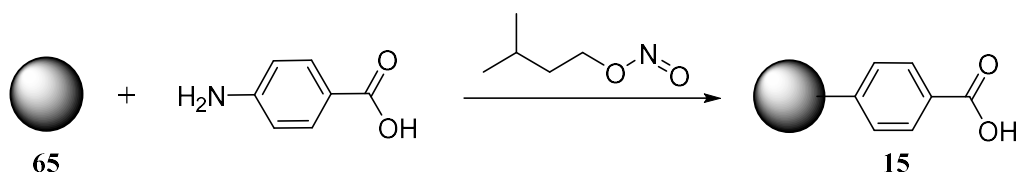
FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3353 (s, $\nu(\text{O-H})$), 2945(m, $\nu(\text{C-H})$), 1699 (m, $\nu(\text{C=O})$), 1683 (m, Aryl), 1637 (m), 1591 (m), 1558 (m), 1544 (m), 1371 (m), 1315 (m), 1257 (m), 1174 (m), 1172 (m), 1101 (m), 633, 621 cm^{-1} ;

Teilchengröße (H_2O): 10 % \leq 53 nm, 50 % \leq 98 nm, 90 % \leq 254 nm;

Zetapotential (mV) (pH = 5.32): -24.3;

EA: gef. C: 89.75, H: 0.98, N: 2.40 %;

Oberflächenbelegung (TGA): 0.76 mmol/g.

Variante b:

5.50 mL (150 mg, 29.1 mg/mL) einer ND-Suspension **65** wurden in einen 50 mL-Rundkolben gegeben, mit 10.0 mL Millipore-Wasser versetzt, auf 80 °C erhitzt und mit 300 mg (2.19 mmol) 4-Aminobenzoesäure und 300 μ L (260 μ g, 2.23 mmol) Isoamylnitrit versetzt. Anschließend wurden der Reaktionsmischung 20.0 mL Millipore-Wasser zugegeben und bei 80 °C für 18 h gerührt. Die entstandene Suspension wurde auf RT gekühlt, auf vier Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und zentrifugiert (25000 rpm, 15 min). Die überstehende Lösung wurde abgenommen und der Rückstand neu mit DMSO versetzt, dispergiert und erneut zentrifugiert (52000 rpm, 90 min.). Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Dann wurde das Lösungsmittel auf Millipore-Wasser (52000 rpm, 15 min., einen Waschgang) und Aceton gewechselt und die Waschvorgänge (52000 rpm, 10 min.) dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Partikel nochmals mit Millipore-Wasser dreimal gewaschen (52000 rpm, 15 min.).

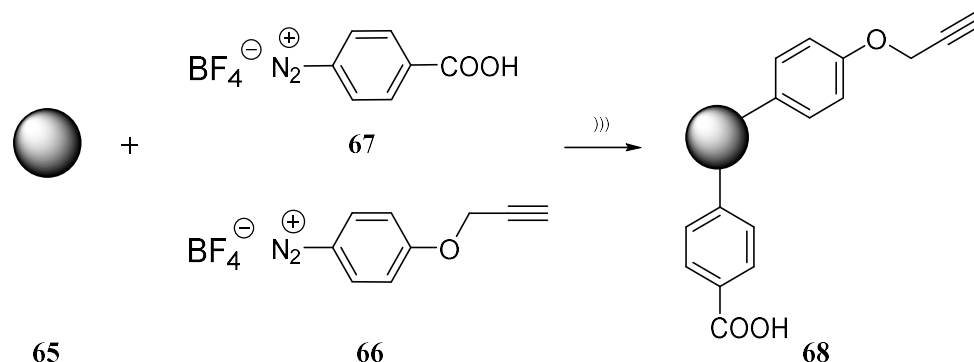
Rückgewinnung: 120 mg (80 %);

FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3425 (s, $\nu(\text{O-H})$), 2956 und 2925 (m, $\nu(\text{C-H})$), 1685 (m, $\nu(\text{C=O})$), 1651 (s), 1593 (m), 1545 (m), 1383 (m), 1313 (w), 1267 (w), 1169 (w), 914, 862, 837, 791, 735 cm^{-1} ;

Teilchengröße (H₂O): 10 % \leq 37.6 nm, 50 % \leq 56.6 nm, 90 % \leq 115 nm;

Zetapotential (mV) (pH = 5.72): -24.7;

Oberflächenbelegung (TGA): 0.46 mmol/g.

Darstellung des orthogonal funktionalisierten Nanodiamanten 68

200 mg gemahlener Nanodiamant **65** (7 mL) wurden mit 50.0 mg 4-Carboxybenzoldiazonium-tetrafluoroborat (**67**) und 65.0 mg 4-(Prop-2-in-1-yloxy)benzoldiazoniumtetrafluoroborat (**66**) versetzt und mittels eines Ultraschallhorns (1,5 Output, gepulst) mit Ultraschall 70 min. behandelt. Die Reaktionsmischung wurde auf vier Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und zentrifugiert (15000 rpm, 15 min). Der Rückstand wurde fünfmal mit DMSO (52000 rpm, 60 min), einmal mit Aceton (52000 rpm, 5 min) und dreimal mit bidest. Wasser (25000 rpm, 20 min) gewaschen.

Rückgewinnung: 108 mg (54 %);

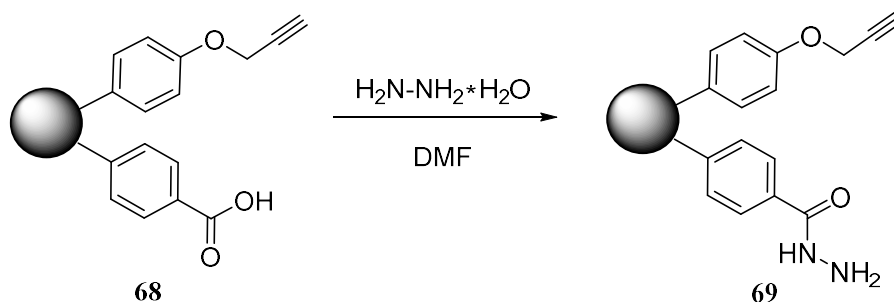
FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3441 (s, -OH), 2958 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2925 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2120 (w, $\nu(\text{C}\equiv\text{C})$), 1695 (m, $\nu(\text{C=O})$), 1633 (m, Aryl), 1505 (m), 1455 (m), 1382 (m), 1237 (m), 1176 (m), 1021 (m), 833cm^{-1} ;

Oberflächenbelegung (TGA): 0.41 mmol/g;

EA: gef.: C 88.89, H 1.57, N 2.34;

Teilchengröße (H₂O): 10 % \leq 56 nm, 50 % \leq 98 nm, 90 % \leq 211 nm;

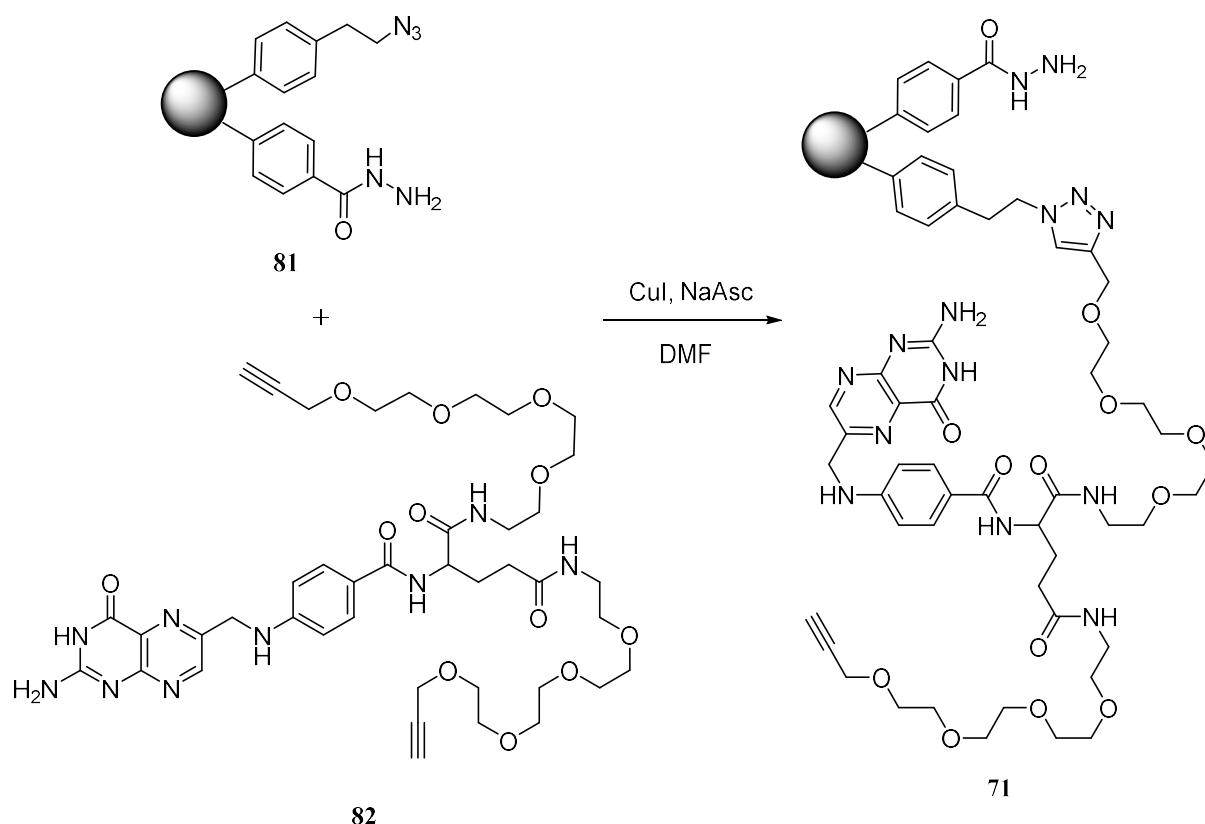
Zetapotential (mV) (pH = 6.51): +37.5.

Darstellung von orthogonal funktionalisierten Nanodiamanten mit Hydrazid- und Alkineinheiten 69

144 mg alkin- und carboxylatfunktionalisierter Nanodiamant **68** wurden in DMF 30 Minuten mit Ultraschall im Ultraschallbad behandelt. Nun wurden 3.00 mL (3.10 g, 61.8 mmol) Hydrazinhydrat zugegeben und bei 90 °C für 18 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf acht Eppendorf-Gefäße verteilt, zentrifugiert (15000 rpm, 10 min), neu mit DMF versetzt und redispersiert. Die Diamantsuspension wurde achtmal mit DMF/H₂O (1:1) (15000 rpm, 30 min.) und zweimal mit bidest. Wasser (15000 rpm, 20 min) gewaschen. Die aufgenommenen FT-IR-Spektren wiesen keine Alkinbande mehr auf.

Rückgewinnung: 191 mg (15.9 mg/mL; total: 12.0 mL);

Darstellung von orthogonal funktionalisiertem Nanodiamant mit Hydrazid- und Folsäureeinheiten 71



21.0 mg ND **81** wurden in DMF umgewaschen, in einen 50 mL-Rundkolben überführt, mit 23.0 mg (26.5 μ mol) Alkin **82** und 9.00 mg (45.4 μ mol) Natriumascorbat versetzt und 10 min mit Stickstoff überblasen. Mit der Reaktionslösung wurde nun das „Pump-Freeze-Thaw“-Verfahren durchgeführt und anschließend im Stickstoffstrom 7.00 mg (47.3 μ mol) Kupfer-(I)-iodid zugegeben. Dann wurde die Reaktionslösung für weitere 10 min. im Ultraschallbad behandelt und weitere 18 h bei RT gerührt. Nach erfolgter Kontrolle im DRIFTS-IR, um die Umsetzung des Azids zu betrachten, wurde die Lösung auf sechs Eppendorf- Gefäße verteilt und zentrifugiert (15000 rpm, 30 min.). Der Überstand wurde abgenommen und der Rückstand neu mit 9.00 mL DMF versetzt, redispersiert und wiederum zentrifugiert (15000 rpm, 30 min.). Dieser Waschgang wurde viermal mit DMF, einmal mit Millipore-Wasser (15000 rpm, 20 min.), dreimal mit 0.1 M Na₂EDTA-Lsg. (15000 rpm, 15 min.) und wiederum dreimal mit Millipore-Wasser (15000 rpm, 15 min.) wiederholt.

Rückgewinnung: 18.5 mg (88 %);

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3415$ (s, $\nu(\text{O-H})$), 2929 und 2877 (m, $\nu(\text{C-H})$), 1641 (s, $\nu(\text{NH}_2)$, Amid I), 1604 (s), 1545 (m, $\nu(\text{NH}_2)$, Amid II), 1514 (w), 1375 (m), 1311 (w), 1250 (w), 1103 (w), 972, 825, 793, 710 cm^{-1} ;

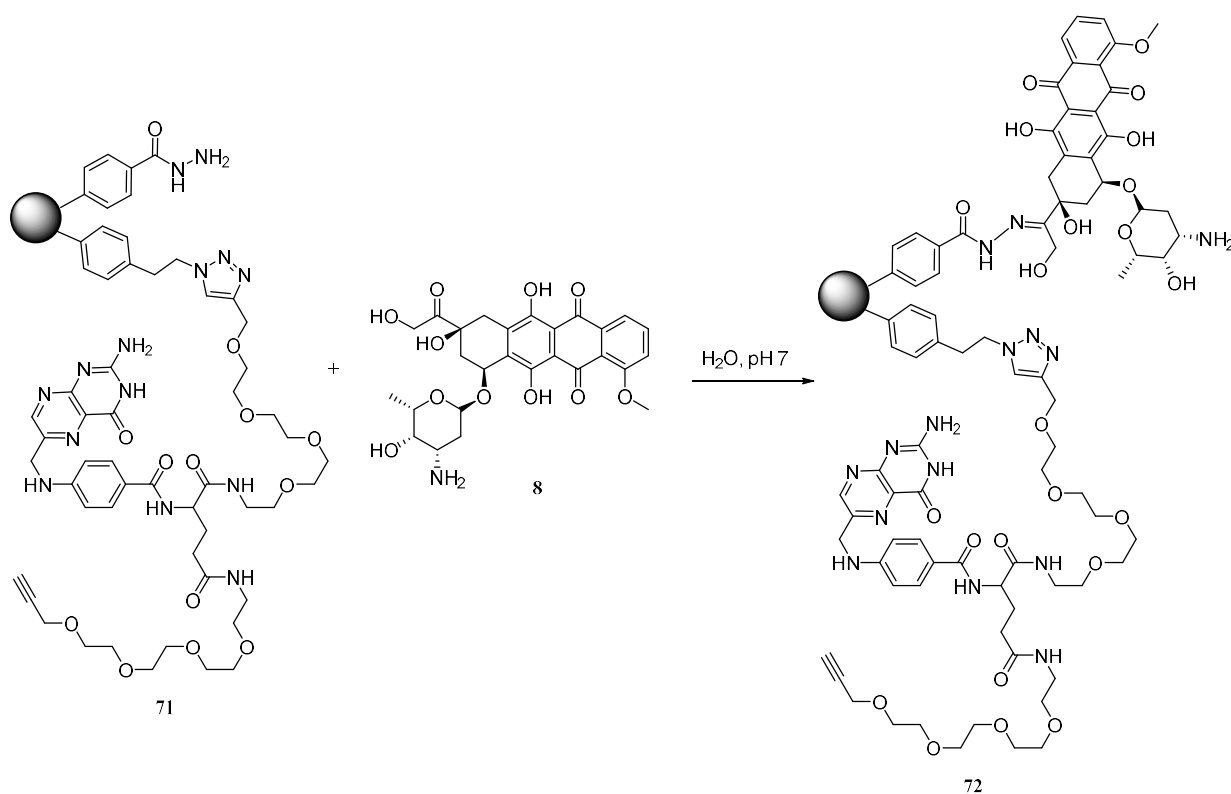
Teilchengröße (H_2O): 10 % ≤ 74.9 nm, 50 % ≤ 115 nm, 90 % ≤ 200 nm;

Zetapotential (mV) (pH = 5.92): +21.3;

UV/VIS (Acetonitril): $\lambda_{\text{max}} = 274.8$ nm, 392.2 nm;

Oberflächenbelegung (TGA): 0.12 mmol/g.

Darstellung von Doxorubicin- und Folsäure-funktionalisiertem Nanodiamant **72**



4.00 mL (4.00 mg, 2.05 mg/mL) einer Suspension von **71** in Wasser wurden in einen 10 mL-Rundkolben gegeben, mit 3.00 mL Millipore-Wasser verdünnt und mit 2.50 mg (4.60 μmol) Doxorubicin versetzt. Die Lösung wurde 5 min. mit Ultraschall im Ultraschallbad behandelt, der pH-Wert mit 0.05 M NaOH-Lösung auf pH = 7 eingestellt und anschließend bei 50 °C für 24 h gerührt. Die entstandene Suspension wurde auf vier Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und

zentrifugiert (40000 rpm, 15 min). Die überstehende Lösung wurde abgenommen und der Rückstand neu mit Wasser, welches mit einer wässrigen Ammoniak-Lösung auf pH 8 eingestellt ist, versetzt, dispergiert und erneut zentrifugiert (40000 rpm, 20 min.). Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt.

Rückgewinnung: 8.50 mg (2.13 mg/mL; total: 4.00 mL);

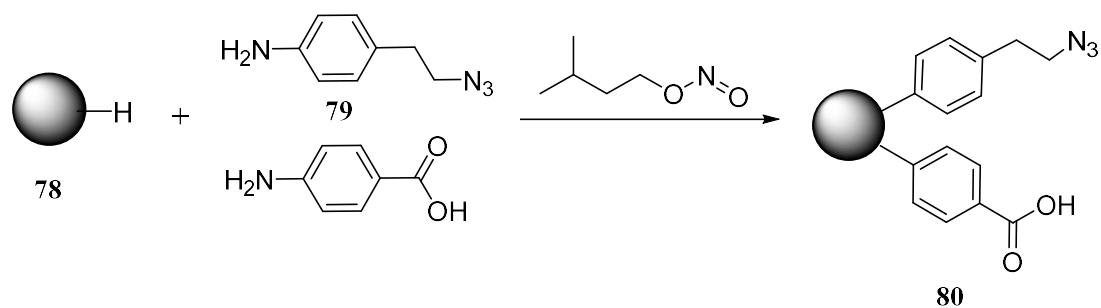
FT-IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3423$ (s, $\nu(\text{O-H})$), 2933 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2887 (m), 1614 (s), 1579 (s), 1439 (m), 1379 (m), 1306 (m), 1282 (m), 1246 (w), 1213 (m), 1157 (w), 1113 (w), 1065 (m), 1034, 993, 972, 876, 820, 795, 762, 704, 677, 636, 625 cm^{-1} ;

Teilchengröße (H_2O): 10 % \leq 181 nm, 50 % \leq 285 nm, 90 % \leq 443 nm;

Zetapotential (mV) (pH = 9.31): -23.9.

Oberflächenbelegung (TGA): 0.08 mmol/g.

*Darstellung von orthogonal funktionalisiertem Nanodiamant mit Carbonsäure- und Azideinheiten **80***



6.00 mL einer Suspension von ND-H (**78**, Gesamtgehalt 150 mg) in 6.00 mL bidest. Wasser wurden in einen 50 mL Rundkolben gegeben, auf 80 °C erhitzt und mit 162 mg (1.00 mmol) 4-Aminobenzoesäure, 137 mg (1.00 mmol) **79** und 280 μL (244 μg , 2.08 μmol) Isoamylnitrit versetzt. Anschließend wurde der Reaktionsmischung 20.0 mL Millipore-Wasser zugegeben und bei 80 °C für 48 h gerührt. Die entstandene Suspension wurde auf vier Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und zentrifugiert (52000 rpm, 45 min). Die überstehende Lösung wurde abgenommen und der Rückstand neu mit DMSO versetzt, dispergiert und erneut zentrifugiert (52000 rpm, 60 min.). Dieser Vorgang wurde siebenmal wiederholt. Dann wurde

das Lösungsmittel auf Millipore-Wasser gewechselt und die Waschvorgänge (52000 rpm, 30 min.) viermal wiederholt. Der Rückstand wurde mit Acetonitril versetzt und dieser Waschgang (52000 rpm, 40 min.) wird ebenfalls dreimal wiederholt. Abschließend wurden die Diamanten zweimal mit Millipore-Wasser gewaschen (52000 rpm, 30 min.).

Rückgewinnung: 186 mg (99 %);

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3401 (s, $\nu(\text{O-H})$), 2941 und 2879 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2100 (s, $\nu(-\text{N}\equiv\text{N})$), 1687 (s, $\nu(\text{CO})$), 1601 (s), 1549 (m), 1369 (s), 1269 (m), 1173 (m), 1120 (w), 1018 (w), 841, 789, 708, 636 cm^{-1} ;

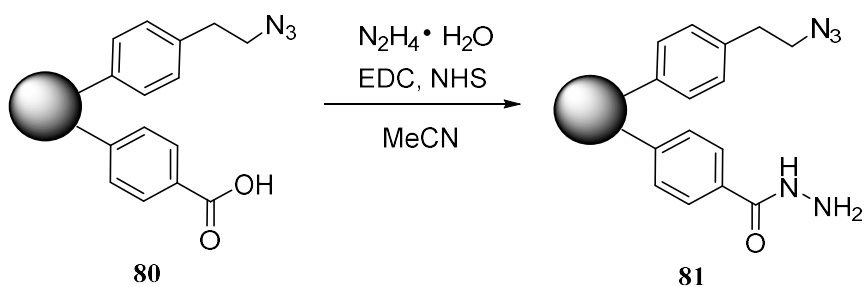
Teilchengröße (H₂O): 10 % \leq 203 nm, 50 % \leq 254 nm, 90 % \leq 320 nm;

Zetapotential (mV) (pH = +5.97): -10.2;

UV/VIS (Acetonitril): λ_{max} = 271.6 nm;

Oberflächenbelegung (TGA): 0.23 mmol/g.

Darstellung von orthogonal funktionalisiertem Nanodiamant mit Hydrazid- und Azideinheiten 81



50.0 mg ND **80** wurden in 20 mL Acetonitril in einen 50 mL-Rundkolben vorgelegt, mit 58.0 mg (300 μmol) EDC und 34.5 mg (300 μmol) NHS versetzt und 4 h bei RT gerührt. Anschließend wurden 50 μL (50.5 mg, 1.01 mmol) Hydrazinhydrat zugegeben und 18 h bei RT gerührt. Die entstandene Suspension wurde auf acht Eppendorf-Gefäße verteilt und

zentrifugiert (10000 rpm, 15 min). Die überstehende Lösung wurde abgenommen und der Rückstand neu mit Wasser, welches mit einer wässrigen Ammoniak-Lösung auf pH 8 eingestellt wurde, versetzt, dispergiert und erneut zentrifugiert (15000 rpm, 30 min.). Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt.

Rückgewinnung: 42.0 mg (84 %);

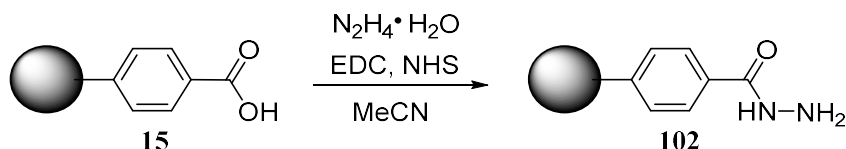
FT-IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3425 (s, $\nu(\text{O-H})$), 2943 und 2885 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2104 (s, $\nu(-\text{N}\equiv\text{N})$), 1633 (s, $\nu(\text{C=O})$), 1603 (s), 1545 (m, $\nu(\text{NH}_2)$, Amid II), 1379 (s), 1317 (w), 1273 (w), 1176 (w), 1130 (w), 843, 793, 708, 642 cm^{-1} ;

Teilchengröße (H₂O): 10 % \leq 58.9 nm, 50 % \leq 88.9 nm, 90 % \leq 154 nm;

Zetapotential (mV) (pH = 5.89): +47.2;

Oberflächenbelegung (TGA): 0.32 mmol/g.

Darstellung von Benzhydrid-funktionalisierten Nanodiamanten(102)



86.0 mg **15** in 20 mL Acetonitril wurden in einen 25 mL-Rundkolben gegeben, mit 134 mg (700 μmol) EDC und 80.6 mg (700 μmol) NHS versetzt und 3.5 h bei RT gerührt. Anschließend wurden 78.0 μL (80.1 mg, 1.60 mmol) Hydrazinhydrat zugegeben und bei RT für 18 h gerührt. Die entstandene Suspension wurde auf zehn Eppendorf-Gefäße verteilt und zentrifugiert (15000 rpm, 15 min). Die überstehende Lösung wurde abgenommen, der Rückstand neu mit Acetonitril versetzt, dispergiert und erneut zentrifugiert (15000 rpm, 15 min.). Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Dann wurde die Suspension mit Millipore-Wasser (15000 rpm, 30 min.) gewaschen und die Waschvorgänge fünfmal wiederholt.

Rückgewinnung: 100 mg (99 %);

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3438$ (s, $\nu(\text{NH}_2)$), 2964 und 2931 (m, $\nu(\text{C-H})$), 1635 (s, $\nu(\text{NH})$, Amid I), 1543 (m, $\nu(\text{NH})$, Amid II), 1383 (m), 1323 (w), 1257 (w), 1157 (w), 910, 833, 791, 741, 717, 671, 640, 609 cm^{-1} ;

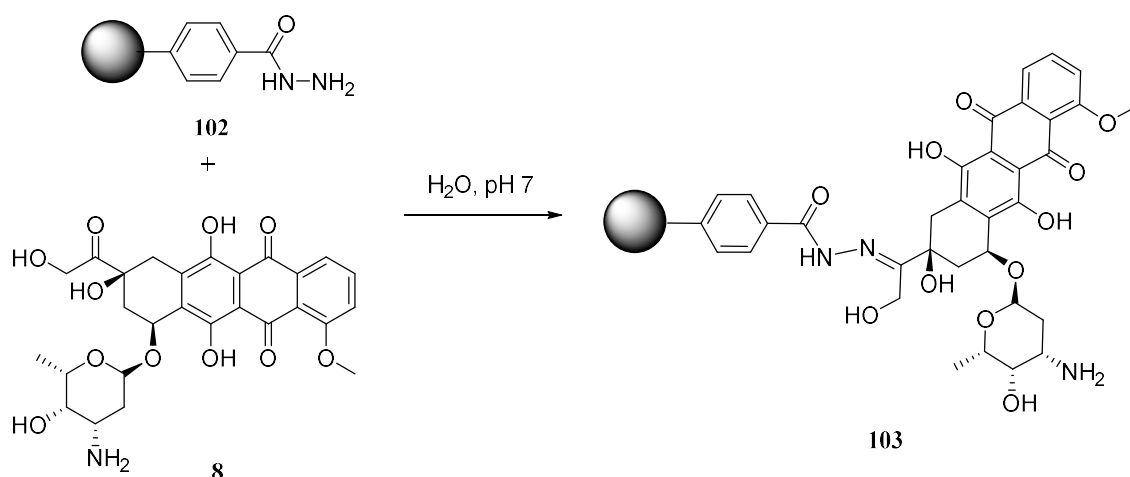
Teilchengröße (H₂O): 10 % \leq 38.1 nm, 50 % \leq 60.5 nm, 90 % \leq 173 nm;

Zetapotential (mV) (pH = 6.17): +35.6;

UV/VIS (Acetonitril): $\lambda_{\text{max}} = 270.4$ nm.

Oberflächenbelegung (TGA): 0.21 mmol/g.

Darstellung von Doxorubicin-funktionalisierten Nanodiamanten **103**



1.50 mL (10.0 mg, 7.40 mg/mL) einer ND-Suspension **102** wurden in einen 25 mL Rundkolben gegeben, mit 4.00 mL Millipore Wasser verdünnt und mit 5.00 mg (8.62 μmol) Doxorubicin **8** versetzt. Die Lösung wurde 5 min. mit Ultraschall im Ultraschallbad behandelt, mit 0.05 M NaOH-Lösung auf pH = 7 eingestellt und anschließend bei 50 °C für 24 h gerührt. Die entstandene Suspension wurde auf vier Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und zentrifugiert (52000 rpm, 20 min). Die überstehende Lösung wurde abgenommen und der Rückstand neu mit Wasser, welches mit einer wässrigen Ammoniak-Lösung auf pH 8 eingestellt wurde, versetzt, dispergiert und erneut zentrifugiert (52000 rpm, 20 min.). Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Anschließend wurde für die Analytik 2 mL entnommen und bis zur Trockene eingedampft. Die restlichen 6 mL wurden auf sechs Eppendorf-Gefäße verteilt,

zentrifugiert (15000 rpm, 15 min.), mit PBS-Puffer (3 x pH 4.6 und 3 x pH 7.4, je 1.5 mL) versetzt, redispersiert und wiederum zentrifugiert (10000 rpm, 5 min.). Dies ist der Zeitpunkt 0 für die Release-Experimente.

Rückgewinnung: 11.6 mg (99 %);

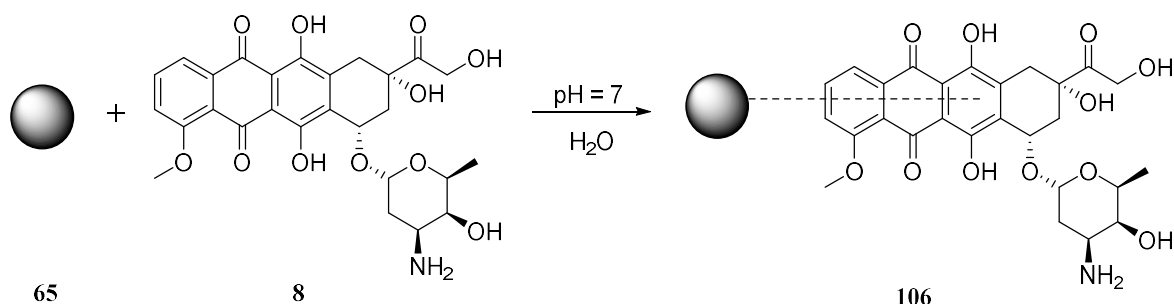
FT-IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3440$ (s, $\nu(\text{O-H})$), 2978 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2941 (m), 1718 (m, $\nu(\text{CO})$), 1614 (m), 1577 (m), 1524 (w), 1439 (m), 1412 (m), 1385 (m), 1281 (m), 1211 (w), 1117 (m), 1065 (m), 1014, 989, 912, 823, 764, 704, 669, 629 cm^{-1} ;

Teilchengröße (H_2O): 10 % ≤ 323 nm, 50 % ≤ 444 nm, 90 % ≤ 602 nm;

Zetapotential (mV) (pH = 7.08): -24.4.

Oberflächenbelegung (TGA): 0.37 mmol/g.

Darstellung von Nanodiamant mit physisorbiertem Doxorubicin (106)



300 μL (10.0 mg, 29.1 mg/mL) einer ND-Suspension **65** wurden in einen 25 mL-Rundkolben gegeben, mit 8.00 mL Millipore-Wasser und 5.00 mg (8.62 μmol) Doxorubicin (**8**) versetzt und 10 min im Ultraschall dispergiert. Anschließend wurde die Lösung mit 0.05 M NaOH-Lösung auf pH = 7 eingestellt, für 5 min. mit Ultraschall im Ultraschallbad behandelt, auf 7 Eppendorf-Gefäße verteilt und zentrifugiert (15000 rpm, 15 min.). Die überstehende Lösung wurde abgenommen und der Rückstand neu mit je 1.5 mL PBS-Puffer (3 x pH 4.6 und 3 x pH 7.4) versetzt, dispergiert und erneut zentrifugiert (10000 rpm, 5 min.). Dies ist der Zeitpunkt 0 für die Release-Experimente.

Rückgewinnung: 14.0 mg (99%);

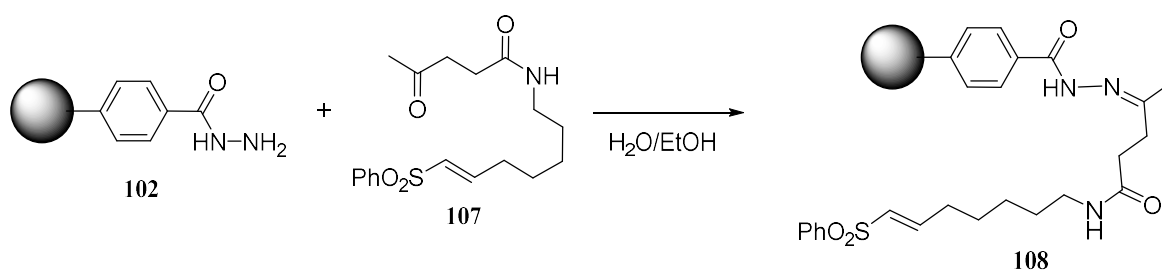
FT-IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3369$ (s, $\nu(\text{O-H})$), 2895 und 2837 (w, $\nu(\text{C-H})$), 1614 (s), 1578 (s), 1437 (w), 1408 (m), 1379 (m), 1344 (w), 1279 (m), 1209 (m), 1113 (w), 1065(w), 986, 789, 760, 658, 623 cm^{-1} ;

Teilchengröße (H_2O): 10 % \leq 1250 nm, 50 % \leq 1610 nm, 90 % \leq 2370 nm;

Zetapotential (mV) (pH = 7.02): -3.13.

Oberflächenbelegung (TGA): 0.65 mmol/g.

*Darstellung von 4-Oxo-N-(7-(phenylsulfonyl)hept-6-en-1-yl)pentanamid-funktionalisiertem Nanodiamant **108***



1.10 mL (8.00 mg, 7.40 mg/mL) einer ND-Suspension **102** wurden in einen 25 mL-Rundkolben gegeben, mit 3.00 mL Millipore-Wasser verdünnt und mit 8.40 mg (23.9 μmol) **107**, in 1.00 mL Ethanol gelöst, versetzt. Die Lösung wurde 5 min. mit Ultraschall im Ultraschallbad behandelt, mit 0.05 M NaOH-Lösung auf pH = 7 eingestellt und anschließend bei 50 °C für 24 h gerührt. Die entstandene Suspension wurde auf vier Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und zentrifugiert (40000 rpm, 15 min). Die überstehende Lösung wurde abgenommen und der Rückstand neu mit einem Wasser/Ethanol-Gemisch (1:1) versetzt, dispergiert und erneut zentrifugiert (40000 rpm, 15 min.). Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt.

Rückgewinnung: 12.4 mg (99 %);

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3438$ (s, $\nu(\text{O-H})$), 3068 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2933 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2866 (m, $\nu(\text{C-H})$), 1645 (s, Amid II), 1554 (m, Amid II), 1446 (m, $\delta(\text{C-H})$), 1412 (m, $\text{C}=\text{C}_{\text{arom}}$), 1373 (m, $\nu(-\text{SO}_2)$),

1304 (s, δ (Amid)), 1242 (w), 1142 (s, ν (-SO₂)), 1084 (m), 1026, 978, 895, 818, 796, 752, 725, 688 cm⁻¹;

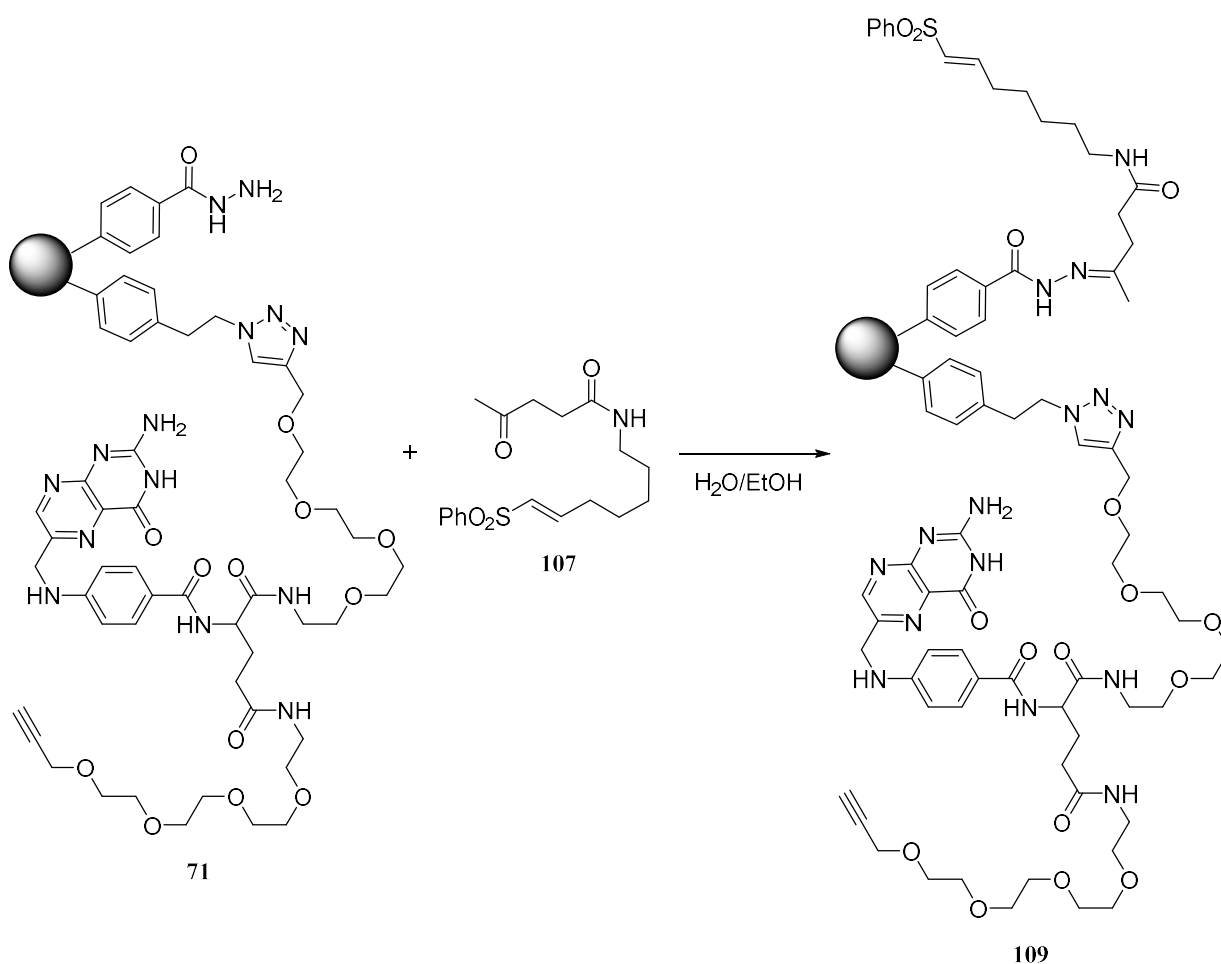
Teilchengröße (H₂O): 10 % ≤ 79.7 nm, 50 % ≤ 125 nm, 90 % ≤ 222 nm;

Zetapotential (mV) (pH = 9.36): -36.3;

UV/VIS (Acetonitril): λ_{max} = 225.2 nm.

Oberflächenbelegung (TGA): 0.20 mmol/g.

Darstellung von 4-Oxo-N-(7-(phenylsulfonyl)hept-6-en-1-yl)pentanamid- und Folsäure-funktionalisiertem Nanodiamant 109



4.00 mL (8.00 mg, 2.05mg/mL) einer ND-Suspension **71** in 4.00 mL bidest. Wasser wurden in einen 25 mL-Rundkolben gegeben, mit 3.00 mL Millipore-Wasser verdünnt und mit 9.10 mg

(25.9 μmol) **107**, in 1.00 mL Ethanol gelöst, versetzt. Die Lösung wurde fünf Min. mit Ultraschall im Ultraschallbad behandelt, mit 0.05 M NaOH-Lösung auf pH = 7 eingestellt und anschließend bei 50 °C für 24 h gerührt. Die entstandene Suspension wurde auf vier Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und zentrifugiert (40000 rpm, 15 min). Die überstehende Lösung wurde abgenommen und der Rückstand neu mit einem Wasser/Ethanol-Gemisch (1:1) versetzt, dispergiert und erneut zentrifugiert (40000 rpm, 15 min.). Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt.

Rückgewinnung: 7.2 mg (90%);

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3437 (s, $\nu(\text{O-H})$), 3059 (m, $\nu(\text{C-H})$), 2927 (m $\nu(\text{C-H})$), 2862 (m $\nu(\text{C-H})$), 1641 (s, $\nu(\text{CO})$), 1446 (m, $\delta(\text{C-H})$), 1410 (m, $\text{C}=\text{C}_{\text{arom}}$), 1373 (w, $\nu(-\text{SO}_2)$), 1306 (m, δ (Amid)), 1144 (m, $\nu(-\text{SO}_2)$), 1086 (m), 1024, 999, 972, 935, 818, 793, 750, 721, 688, 667, 654 cm^{-1} ;

Teilchengröße (H₂O): 10 % \leq 116 nm, 50 % \leq 145 nm, 90 % \leq 180 nm;

Zetapotential (mV) (pH = 9.31): -30.1;

UV/VIS (Acetonitril): λ_{max} = 225.6 nm.

Präparation von Nanodiamant in Glucoselösung (110)

Es wurden 9.294 mL Glucoselösung (5 Gew.%) in einem Schnappdeckelglas vorgelegt und unter Schütteln 0.706 mL einer ND-Lösung (28.3 mg/mL) **65** in Wasser langsam zugetropft. Die erhaltene Lösung wurde mit einem Spritzenfilter steril filtriert (Porengröße 150 nm Membranfilter PES, WICOM) und im Kühlschrank aufbewahrt.

Rückgewinnung: 20.0 mg (2.00 mg/mL; total: 10.0 mL);

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3397, 2950, 1633, 1327, 1093 cm^{-1} ;

Teilchengröße (H₂O): 10 % \leq 2.36 nm, 50 % \leq 3.16 nm, 90 % \leq 4.42 nm;

Zetapotential (mV) (pH = 6.34): +51.4.

Physisorption von Angiotensin-1 an Nanodiamant (111)

25 µg Angiotensin-1 wurden in 1 mL bidest. Wasser gelöst. 625 µl ND 65 (8 mg/mL) wurden in einen 5 mL-Rundkolben gegeben. 0.3 mL (7.5 µg) Angiotensin-1-Lsg. wurden zugegeben und 60 min bei RT gerührt. Die ND-Suspension wurde auf Eppendorf-Gefäße verteilt und zentrifugiert (5 min, 10000 rpm). Der Überstand wurde abgenommen und der Rückstand zweimal mit bidest. Wasser gewaschen (13 min, 13000 rpm). Die Rückstände wurden vereinigt und durch eine Gefriertrocknungsanlage gefriergetrocknet (4h).

FT-IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3424 (s, $\nu(\text{O-H})$), 2952 und 2927 (m, $\nu(\text{C-H})$), 1718 (m), 1626 (s, $\nu(\text{N-H})$), 1587 (s, $\nu(\text{N-H})$), 1389 (m), 1367 (m), 1151 (m), 1024 (m), 952 (m), 911, 826, 729, 669 cm^{-1} ;

Teilchengröße (H₂O): 1 d: 10 % \leq 5.46 nm, 50 % \leq 7.45 nm, 90 % \leq 18.7 nm;

11 d: 10 % \leq 6.87 nm, 50 % \leq 9.63 nm, 90 % \leq 17.4 nm;

Zetapotential (mV) (pH = 5.93): +43.2.

Präparation von Cerasorb und Diasorb in Humanserum (112)

3.0 mg Material (Cera- oder Diasorb) wurde in je ein Eppendorf-Gefäß gegeben und mit 0.5 ml Plasma bei 37 °C für 1 h inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, der Rückstand mit 0.25 ml PBS-Puffer gewaschen und für 10 min. bei 15000 rpm zentrifugiert. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt und nach jedem Waschgang wurde das Eppendorf-Gefäß gewechselt, um Proteinadsorption an der Gefäßwand zu vermeiden.

Diasorb/Cerasorb, der PBS-Puffer-Überstand vom letzten Waschgang (Wash 4) und PBS-Puffer (Kontroll) werden mit 20 µl PBS und 10 µl Ladepuffer verdünnt und für 5 min bei 100 °C inkubiert. Alle Proben wurden dann auf das Gel für SDS-Page aufgetragen und 120 min wurde eine Elektrophorese durchgeführt. Die Gele wurden anschließend mit Fixierlösung und Färbelösung (Coomassie Brilliant Blue-Färbung und Silberfärbung) behandelt.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

abs.	absolutiert
ALOX	Aluminiumoxid
ATR	<i>attenuated total reflection</i> (abgeschwächte Totalreflektion)
a. u.	<i>arbitrary units</i> (willkürliche Einheiten)
BASD	<i>bead-assisted sonic disintegration</i> (Mahlkörper-unterstützte Deagglomeration durch Schallwellen)
ber.	berechnet
BMP-2	<i>bone morphogenetic protein</i> (Knochenwachstumsfaktor)
DC	Dünnschichtchromatographie
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undecan-7
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DND	Detonations-Nanodiamant
EA	Elementaranalyse
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EEDQ	<i>N</i> -Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FT	Fourier-Transformation
gef.	gefunden
ges.	gesättigt

HBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
IR	Infrarot
i. Vak.	im Vakuum
kDa	Kilo-Dalton
konz.	konzentriert
MS	Massenspektrometrie
ND	Nanodiamant
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
NV	<i>nitrogen-vacancy</i> (Stickstoff-Fehlstelle)
quant.	quantitativ
org.	organisch
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
RPM	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
Smp.	Schmelzpunkt
TGA	Thermogravimetrische Analyse
THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultraviolett

8 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] L. F. Trueb, *J. Appl. Phys.* **1968**, *39*, 4707-4716.
- [2] A. Krueger, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1785-1786.
- [3] A. Krüger, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 2445-2449.
- [4] A. Krüger, *Chem. – Eur. J.* **2008**, *14*, 1382-1390.
- [5] A. Krüger, *Neue Kohlenstoffmaterialien*, 1. Aufl., B. G. Teubner Verlag/GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden, **2007**, S. 343.
- [6] A. Krüger, *Neue Kohlenstoffmaterialien*, 1. Aufl., B. G. Teubner Verlag/GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden, **2007**, S. 334.
- [7] A. Krüger, *Neue Kohlenstoffmaterialien*, 1. Aufl., B. G. Teubner Verlag/GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden, **2007**, S. 384.
- [8] A. Krüger, *Neue Kohlenstoffmaterialien*, 1. Aufl., B. G. Teubner Verlag/GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden, **2007**, S. 366.
- [9] H. Hirai, M. Terauchi, M. Tanaka, K. Kondo, *Diamond Rel. Mater.* **1999**, *8*, 1703-1706.
- [10] A. V. Okotrub, L. G. Bulusheva, V. L. Kuznetsov, D. V. Vyalikh, M. V. Poyguin, *Eur. Phys. J. D* **2005**, *34*, 157-160.
- [11] W. Gajewski, P. Achatz, O. A. Williams, K. Haenen, E. Bustarret, M. Stutzmann, J. A. Garrido, *Phys. Rev. B* **2009**, *79*, 045206.
- [12] A. Gruber, A. Dräbenstedt, C. Tietz, L. Fleury, J. Wrachtrup, C. v. Borczyskowski, *Science* **1997**, *276*, 2012-2014.
- [13] P. Neumann, R. Kolesov, V. Jacques, J. Beck, J. Tisler, A. Batalov, L. Rogers, N. B. Manson, G. Balasubramanian, F. Jelezko, J. Wrachtrup, *New J. Phys.* **2009**, *11*, 013017.
- [14] C. Kurtsiefer, S. Mayer, P. Zarda, H. Weinfurter, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *85*, 290-293.
- [15] S.-J. Yu, M.-W. Kang, H.-C. Chang, K.-M. Chen, Y.-C. Yu, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17604-17605.
- [16] T. Zhang, A. Neumann, J. Lindlau, Y. Wu, G. Pramanik, B. Naydenov, F. Jelezko, F. Schüder, S. Huber, M. Huber, F. Stehr, A. Högele, T. Weil, T. Liedl, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 9776-9779.
- [17] N. Mohan, C.-S. Chen, H.-H. Hsieh, Y.-C. Wu, H.-C. Chang, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 3692-3699.
- [18] O. A. Shenderova, V. V. Zhirnov, D. W. Brenner, *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* **2002**, *27*, 227-356.
- [19] A. Krüger, *Neue Kohlenstoffmaterialien*, 1. Aufl., B. G. Teubner Verlag/GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden, **2007**, S.344.
- [20] J. T. Paci, H. B. Man, B. Saha, D. Ho, G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 17256-17267.
- [21] A. Krueger, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 1485-1492.
- [22] A. M. Schrand, S. A. C. Hens, O. A. Shenderova, *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* **2009**, *34*, 18-74.
- [23] K. Xu, Q. Xue, *Diamond Rel. Mater.* **2007**, *16*, 277-282.
- [24] A. Krüger, F. Kataoka, M. Ozawa, T. Fujino, Y. Suzuki, A. E. Aleksenskii, A. Y. Vul', E. Ōsawa, *Carbon* **2005**, *43*, 1722-1730.
- [25] M. Ozawa, M. Inaguma, M. Takahashi, F. Kataoka, A. Krüger, E. Ōsawa, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1201-1206.
- [26] Y. Liang, T. Meinhardt, G. Jarre, M. Ozawa, P. Vrdoljak, A. Schöll, F. Reinert, A. Krueger, *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *354*, 23-30.

- [27] A. Pentecost, S. Gour, V. Mochalin, I. Knoke, Y. Gogotsi, *ACS Appl. Mater. Interf.* **2010**, *2*, 3289-3294.
- [28] V. F. Loktev, V. I. Makal'skii, I. V. Stoyanova, A. V. Kalinkin, V. A. Likholobov, V. N. Mit'kin, *Carbon* **1991**, *29*, 817-819.
- [29] A. Krueger, Y. Liang, G. Jarre, J. Stegk, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 2322-2328.
- [30] R. Martín, P. C. Heydorn, M. Alvaro, H. Garcia, *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 4505-4514.
- [31] H. A. Girard, J. C. Arnault, S. Perruchas, S. Saada, T. Gacoin, J. P. Boilot, P. Bergonzo, *Diamond Relat. Mater.* **2010**, *19*, 1117-1123.
- [32] P. Zhang, J. Yang, W. Li, W. Wang, C. Liu, M. Griffith, W. Liu, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 7755-7764.
- [33] D. G. Lim, J. H. Jung, H. W. Ko, E. Kang, S. H. Jeong, *ACS Appl. Mater. Interf.* **2016**, *8*, 23558-23567.
- [34] L. Kuang-Kai, Z. Wen-Wei, W. Chi-Ching, C. Yu-Chung, C. Chia-Liang, L. Yu-Shiu, C. Chinpiao, I. C. Jui, *Nanotechnol.* **2010**, *21*, 315106.
- [35] V. N. Mochalin, Y. Gogotsi, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4594-4595.
- [36] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *113*, 2056-2075.
- [37] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 1128-1137.
- [38] R. Huisgen, *Proc. Chem. Soc.* **1961**, 357-396.
- [39] J. Chen, S. Z. Deng, J. Chen, Z. X. Yu, N. S. Xu, *Appl. Phys. Lett.* **1999**, *74*, 3651-3653.
- [40] Y. V. Butenko, V. L. Kuznetsov, E. A. Paukshtis, A. I. Stadnichenko, I. N. Mazov, S. I. Moseenkov, A. I. Boronin, S. V. Kosheev, *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostruct.* **2006**, *14*, 557-564.
- [41] Z. Qiao, J. Li, N. Zhao, C. Shi, P. Nash, *Scripta Materialia* **2006**, *54*, 225-229.
- [42] E. Y. Choi, C. K. Kim, *Sci. Rep.* **2017**, *7*: 4178.
- [43] W. S. Yeap, S. Chen, K. P. Loh, *Langmuir* **2009**, *25*, 185-191.
- [44] B. Pelaz, C. Alexiou, R. A. Alvarez-Puebla, F. Alves, A. M. Andrews, S. Ashraf, L. P. Balogh, L. Ballerini, A. Bestetti, C. Brendel, S. Bosi, M. Carril, W. C. W. Chan, C. Chen, X. Chen, X. Chen, Z. Cheng, D. Cui, J. Du, C. Dullin, A. Escudero, N. Feliu, M. Gao, M. George, Y. Gogotsi, A. Grünweller, Z. Gu, N. J. Halas, N. Hampp, R. K. Hartmann, M. C. Hersam, P. Hunziker, J. Jian, X. Jiang, P. Jungebluth, P. Kadhiresan, K. Kataoka, A. Khademhosseini, J. Kopeček, N. A. Kotov, H. F. Krug, D. S. Lee, C.-M. Lehr, K. W. Leong, X.-J. Liang, M. Ling Lim, L. M. Liz-Marzán, X. Ma, P. Macchiarini, H. Meng, H. Möhwald, P. Mulvaney, A. E. Nel, S. Nie, P. Nordlander, T. Okano, J. Oliveira, T. H. Park, R. M. Penner, M. Prato, V. Puentes, V. M. Rotello, A. Samarakoon, R. E. Schaak, Y. Shen, S. Sjöqvist, A. G. Skirtach, M. G. Soliman, M. M. Stevens, H.-W. Sung, B. Z. Tang, R. Tietze, B. N. Udugama, J. S. VanEpps, T. Weil, P. S. Weiss, I. Willner, Y. Wu, L. Yang, Z. Yue, Q. Zhang, Q. Zhang, X.-E. Zhang, Y. Zhao, X. Zhou, W. J. Parak, *ACS Nano* **2017**, *11*, 2313-2381.
- [45] D. Ho, A. Zarrinpar, E. K.-H. Chow, *ACS Nano* **2016**, *10*, 9087-9092.
- [46] M. E. Davis, Z. Chen, D. M. Shin, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 771-782.
- [47] X. Zhang, S. Wang, M. Liu, J. Hui, B. Yang, L. Tao, Y. Wei, *Toxicol. Res.* **2013**, *2*, 335-342.
- [48] S. Tenzer, D. Docter, J. Kuharev, A. Musyanovych, V. Fetz, R. Hecht, F. Schlenk, D. Fischer, K. Kiouptsi, C. Reinhardt, K. Landfester, H. Schild, M. Maskos, S. K. Knauer, R. H. Stauber, *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 772-781.
- [49] C. D. Walkey, W. C. W. Chan, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2780-2799.
- [50] M. P. Monopoli, C. Aberg, A. Salvati, K. A. Dawson, *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 779-786.
- [51] Y. Malam, M. Loizidou, A. M. Seifalian, *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30*, 592-599.

- [52] Y. Zhu, J. Li, W. Li, Y. Zhang, X. Yang, N. Chen, Y. Sun, Y. Zhao, C. Fan, Q. Huang, *Theranostics* **2012**, *2*, 302-312.
- [53] K. M. El-Say, *J. Appl. Pharm. Sci.* **2011**, *1*, 29-29.
- [54] V. N. Mochalin, A. Pentecost, X.-M. Li, I. Neitzel, M. Nelson, C. Wei, T. He, F. Guo, Y. Gogotsi, *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 3728-3735.
- [55] M. I. Setyawati, V. N. Mochalin, D. T. Leong, *ACS Nano* **2016**, *10*, 1170-1181.
- [56] L. Moore, J. Yang, T. T. H. Lan, E. Osawa, D.-K. Lee, W. D. Johnson, J. Xi, E. K.-H. Chow, D. Ho, *ACS Nano* **2016**, *10*, 7385-7400.
- [57] O. Kayser, A. F. Kiderlen, *Expert Opin. Investig. Drugs* **2003**, *12*, 197-207.
- [58] V. Vaijayanthimala, H. C. Chang, *Nanomedicine* **2009**, *4*, 47-55.
- [59] H. Huang, E. Pierstorff, E. Osawa, D. Ho, *Nano Lett.* **2007**, *7* (11), 3305-3314.
- [60] S. A. Ansari, R. Satar, M. A. Jafri, M. Rasool, W. Ahmad, S. K. Zaidi, *Iran. J. Biotechnol.* **2016**, *14*, 130-141.
- [61] E. K. Chow, X. Q. Zhang, M. Chen, R. Lam, E. Robinson, H. J. Huang, *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3* (73), S. 73ra21.
- [62] Y.-A. Huang, C.-W. Kao, K.-K. Liu, H.-S. Huang, M.-H. Chiang, C.-R. Soo, H.-C. Chang, T.-W. Chiu, J.-I. Chao, E. Hwang, *Sci. Rep.* **2014**, *4*: 6919.
- [63] A. M. Schrand, H. Huang, C. Carlson, J. J. Schlager, E. Osawa, S. M. Hussain, L. Dai, *Phys. Chem B* **2007**, *111*, 2-7.
- [64] A. Akinc, G. Battaglia, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, 1-25.
- [65] O. P. Perumal, R. Inapagolla, S. Kannan, R. M. Kannan, *Biomater.* **2008**, *29*, 3469-3476.
- [66] A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, J.-P. Benoit, *Biomater.* **2006**, *27*, 4356-4373.
- [67] B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, W. C. W. Chan, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 662-668.
- [68] A. Verma, O. Uzun, Y. Hu, Y. Hu, H.-S. Han, N. Watson, S. Chen, D. J. Irvine, F. Stellacci, *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 588.
- [69] T. Tasaki, Y. Guo, Q. Meng, M. A. A. Mamun, Y. Kasahara, S. Akasaka, A. Fujimori, *ACS Appl. Mater. Interf.* **2017**, *9*, 14379-14390.
- [70] Z. Zhang, B. Niu, J. Chen, X. He, X. Bao, J. Zhu, H. Yu, Y. Li, *Biomater.* **2014**, *35*, 4565-4572.
- [71] G. Akash, M. S. Neveen, D. Riddha, F. L. Ryan, B. Arafef, M. Khatereh, C. Alexandre Rosa, P. Kenneth, M. Morteza, M. R. Vincent, *Nano Futures* **2017**, *1*, 015004.
- [72] M. Ray, Lee, Yi-Wei, Scaletti, Federica, Yu, Ruijin, Rotello, Vincent M, *Nanomed.* **2017**, *12*, 941-952.,
- [73] R. J. Lee, P. S. Low, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 3198-3204.
- [74] L. Li, L. Tian, Y. Wang, W. Zhao, F. Cheng, Y. Li, B. Yang, *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 5046-5058.
- [75] Y. Dong, R. Cao, Y. Li, Z. Wang, L. Li, L. Tian, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 82711-82716.
- [76] B. Zhang, Y. Li, C.-Y. Fang, C.-C. Chang, C.-S. Chen, Y.-Y. Chen, H.-C. Chang, *Small* **2009**, *5*, 2716-2721.
- [77] Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387-6392.
- [78] E. A. Azzopardi, E. L. Ferguson, D. W. Thomas, *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68*, 257-274.
- [79] X.-J. Du, J.-L. Wang, W.-W. Liu, J.-X. Yang, C.-Y. Sun, R. Sun, H.-J. Li, S. Shen, Y.-L. Luo, X.-D. Ye, Y.-H. Zhu, X.-Z. Yang, J. Wang, *Biomater.* **2015**, *69*, 1-11.
- [80] P. G. Mastroberardino, E. K. Hoffman, M. P. Horowitz, R. Betarbet, G. Taylor, D. Cheng, H. M. Na, C.-A. Gutekunst, M. Gearing, J. Q. Trojanowski, M. Anderson, C. T. Chu, J. Peng, J. T. Greenamyre, *Neurobiol. Dis.* **2009**, *34*, 417-431.
- [81] A. J. Clark, M. E. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, 12486-12491.

- [82] Z. Wang, Z. Tian, Y. Dong, L. Li, L. Tian, Y. Li, B. Yang, *Diamond Relat. Mater.* **2015**, *58*, 84-93.
- [83] A. S. Wibowo, M. Singh, K. M. Reeder, J. J. Carter, A. R. Kovach, W. Meng, M. Ratnam, F. Zhang, C. E. Dann, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 15180-15188.
- [84] J. A. Ledermann, S. Canevari, T. Thigpen, *Ann. Oncol.* **2015**, *26*, 2034-2043.
- [85] M. D. A. Salazar, M. Ratnam, *Cancer and Metastasis Rev.* **2007**, *26*, 141-152.
- [86] J. Sudimack, R. J. Lee, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *41*, 147-162.
- [87] J. Shia, D. S. Klimstra, J. R. Nitzkowski, P. S. Low, M. Gonen, R. Landmann, M. R. Weiser, W. A. Franklin, F. G. Prendergast, L. Murphy, L. H. Tang, L. Temple, J. G. Guillem, W. D. Wong, P. B. Paty, *Human Pathol.* **2008**, *39*, 498-505.
- [88] L. E. Kelemen, *Int. J. Cancer* **2006**, *119*, 243-250.
- [89] M. M. Dcona, J. E. Sheldon, D. Mitra, M. C. T. Hartman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 466-469.
- [90] A. Stallivieri, L. Colombeau, G. Jetpisbayeva, A. Moussaron, B. Myrzakhmetov, P. Arnoux, S. Acherar, R. Vanderesse, C. Frochot, *Bioorganic Med. Chem.* **2017**, *25*, 1-10.
- [91] K.-L. Dao, R. R. Sawant, J. A. Hendricks, V. Ronga, V. P. Torchilin, R. N. Hanson, *Biocon. Chem.* **2012**, *23*, 785-795.
- [92] T.-K. Ryu, G.-J. Lee, C.-K. Rhee, S.-W. Choi, *Macromol. Biosci.* **2015**, *15*, 1469-1475.
- [93] T. K. Ryu, S. W. Baek, G. J. Lee, C. K. Rhee, S. W. Choi, *Macromol. Biosci.* **2017**, *17*.
- [94] H. Zhu, Y. Wang, A. Hussain, Z. Zhang, Y. Shen, S. Guo, *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 3531-3540.
- [95] C. Desai, K. Chen, S. Mitra, *Environ. Sci. Processes Impacts* **2014**, *16*, 518-523.
- [96] M. Monopoli, A. Pitek, I. Lynch, K. Dawson, in *Nanomaterial Interfaces in Biology, Vol. 1025* (Eds.: P. Bergese, K. Hamad-Schifferli), Humana Press, **2013**, S. 137-155.
- [97] V. H. Nguyen, B.-J. Lee, *Int. J. Nanomed.* **2017**, *12*, 3137-3151.
- [98] S. Ritz, S. Schöttler, N. Kotman, G. Baier, A. Musyanovych, J. Kuharev, K. Landfester, H. Schild, O. Jahn, S. Tenzer, V. Mailänder, *Biomacromol.* **2015**, *16*, 1311-1321.
- [99] V. Mirshafiee, R. Kim, S. Park, M. Mahmoudi, M. L. Kraft, *Biomater.* **2016**, *75*, 295-304.
- [100] A. Sasidharan, J. E. Riviere, N. A. Monteiro-Riviere, *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 2075-2082.
- [101] S. Kumari, M. K. Singh, S. K. Singh, J. J. A. Grácio, D Dash, *Nanomed.* **2014**, *9*, 427-440.
- [102] T. M. Göppert, R. H. Müller, *Int. J. Pharm.* **2005**, *302*, 172-186.
- [103] M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall, K. A. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105*, 14265-14270.
- [104] J. Mona, C. J. Kuo, E. Perevedentseva, A. V. Priezzhev, C. L. Cheng, *Diamond Relat. Mater.* **2013**, *39*, 73-77.
- [105] C.-L. Lin, C.-H. Lin, H.-C. Chang, M.-C. Su, *J. Phys. Chem. A* **2015**, *119*, 7704-7711.
- [106] R. A. Shimkunas, E. Robinson, R. Lam, S. Lu, X. Xu, X.-Q. Zhang, H. Huang, E. Osawa, D. Ho, *Biomater.* **2009**, *30*, 5720-5728.
- [107] Y.-K. Tzeng, O. Faklaris, B.-M. Chang, Y. Kuo, J.-H. Hsu, H.-C. Chang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2262-2265.
- [108] W. Hai-Dong, N. Catherine Hui, Y. Qiaoqin, B. Ildiko, *Nanotechnol.* **2011**, *22*, 145703.
- [109] L.-W. Tsai, Y.-C. Lin, E. Perevedentseva, A. Lugovtsov, A. Priezzhev, C.-L. Cheng, *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1111.
- [110] D. Sobot, S. Mura, P. Couvreur, *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 5078-5100.
- [111] S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 991.

- [112] S. Li, W. Li, M. Khashab Niveen, in *Nanotechnol. Rev.*, **2012**, *1*, 493-513.
- [113] M. Liu, H. Du, W. Zhang, G. Zhai, *Mater. Sci. Eng. Curr.* **2017**, *71*, 1267-1280.
- [114] Z. Mengxue, W. Kaikai, B. Ying, L. Huiru, C. Jun, H. Yi, C. Zhifang, *Cur. Top. Med. Chem.* **2017**, *17*, 2319-2334.
- [115] M. Molina, M. Asadian-Birjand, J. Balach, J. Bergueiro, E. Miceli, M. Calderon, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 6161-6186.
- [116] P. Sifaka, N. Üstündağ Okur, E. Karavas, D. Bikiaris, *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1440.
- [117] E. K. Chow, X.-Q. Zhang, M. Chen, R. Lam, E. Robinson, H. Huang, D. Schaffer, E. Osawa, A. Goga, D. Ho, *Nanodiamond Therapeutic Delivery Agents Mediate Enhanced Chemoresistant Tumor Treatment*, **2011**, *3*, 73ra21.
- [118] A. A. Khomich, O. S. Kudryavtsev, T. A. Dolenko, A. A. Shiryaev, A. V. Fisenko, V. I. Konov, I. I. Vlasov, *Laser Phys. Lett.* **2017**, *14*, 025702.
- [119] H.-J. Kim, K. Zhang, L. Moore, D. Ho, *ACS Nano* **2014**, *8*, 2998-3005.
- [120] A. M. Vervald, S. A. Burikov, I. I. Vlasov, E. A. Ekimov, O. A. Shenderova, T. A. Dolenko, *Laser Phys. Lett.* **2017**, *14*, 045702.
- [121] L.-C. Cheng, H. M. Chen, T.-C. Lai, Y.-C. Chan, R.-S. Liu, J. C. Sung, M. Hsiao, C.-H. Chen, L.-J. Her, D. P. Tsai, *Nanoscale* **2013**, *5*, 3931-3940.
- [122] H. Huang, E. Pierstorff, E. Osawa, D. Ho, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3305-3314.
- [123] H. Li, D. Zeng, Z. Wang, L. Fang, F. Li, Z. Wang, *Nanomed.*, *13* (9), 981-996.
- [124] X. Wang, M. Gu, T. B. Toh, N. L. B. Abdullah, E. K.-H. Chow, *SLAS Technol.* **2018**, *23*, 44-56.
- [125] L. Zhao, Y.-H. Xu, T. Akasaka, S. Abe, N. Komatsu, F. Watari, X. Chen, *Biomater.* **2014**, *35*, 5393-5406.
- [126] M. S. Chan, L. S. Liu, H. M. Leung, P. K. Lo, *ACS Appl. Mater. Interf.* **2017**, *9*, 11780-11789.
- [127] S. Huang, J. Shao, L. Gao, Y. Qi, L. Ye, *Appl. Surf. Sci.* **2011**, *257*, 8617-8622.
- [128] T. Waag, Dissertation, Würzburg (University Würzburg), **2013**.
- [129] K. N. K. Nayan Bajaj, *Res. Rev.: J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *3*, 13-26.
- [130] G. Traversa, F. Menniti-Ippolito, R. D. Cas, A. Mele, A. Pulsoni, F. Mandelli, *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* **1998**, *7*, 113-123.
- [131] A. A. Yunis, *Rev. Bras. Pesqui. Med. Biol.* **1978**, *11*, 287-295.
- [132] M. P. White, H. W. Habboush, L. G. Alroomi, *Lancet* **1986**, *327*, 555-556.
- [133] E. Müller, *Folsäure*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2003**, S 70.
- [134] F. von Bruchhausen, H. Hager, B. Blümer-Schwinum, *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis*, *5. Aufl.*, Springer Berlin Heidelberg New York, **1993**, S. 284.
- [135] P. Surén, C. Roth, M. Bresnahan, et al., *JAMA* **2013**, *309*, 570-577.
- [136] C. Roth, P. Magnus, S. Schjølberg, et al., *JAMA* **2011**, *306*, 1566-1573.
- [137] *Pädiatrie: Kinder- und Jugendmedizin hautnah* **2016**, *28*, 3.
- [138] H. Shi, J. Guo, C. Li, Z. Wang, *Drug Des. Dev. Ther.* **2015**, *9*, 4989-4996.
- [139] G. L. Zwicke, G. A. Mansoori, C. J. Jeffery, *Nano Rev.* **2012**, *3*: 18496.
- [140] A. Vigevani, M. J. Williamson, in *Anal. Profiles Drug Subst.*, *Vol. 9* (Ed.: K. Florey), Academic Press (Cambridge), **1981**, S. 245-274.
- [141] C. F. Thorn, C. Oshiro, S. Marsh, T. Hernandez-Boussard, H. McLeod, T. E. Klein, R. B. Altman, *Pharmacogenet. Genomics* **2011**, *21*, 440-446.
- [142] S. Licata, A. Saponiero, A. Mordente, G. Minotti, *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 414-420.
- [143] S. Ayla, I. Seckin, G. Tanriverdi, M. Cengiz, M. Eser, B. C. Soner, G. Oktem, *Int. J. Cell Biol.* **2011**, *2011*.

- [144] P. Shivakumar, M. U. Rani, A. G. Reddy, Y. Anjaneyulu, *Toxicol. Int.* **2012**, *19*, 241-244.
- [145] R. Y. Yakovlev, A. S. Solomatin, N. B. Leonidov, I. I. Kulakova, G. V. Lisichkin, *Russ. J. Gen. Chem.* **2014**, *84*, 379-390.
- [146] D. Ho, C.-M. Ho, *Int. J. Smart Nano Mater.* **2010**, *1*, 69-81.
- [147] T.-K. Ryu, R.-H. Kang, K.-Y. Jeong, D.-R. Jun, J.-M. Koh, D. Kim, S. K. Bae, S.-W. Choi, *J. Contr. Release* **2016**, *232*, 152-160.
- [148] X.-Q. Zhang, R. Lam, X. Xu, E. K. Chow, H.-J. Kim, D. Ho, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 4770-4775.
- [149] E. K. Chow, X.-Q. Zhang, M. Chen, R. Lam, E. Robinson, H. Huang, D. Schaffer, E. Osawa, A. Goga, D. Ho, *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 73ra21-73ra21.
- [150] D. Eek, M. Krohe, I. Mazar, A. Horsfield, F. Pompilus, R. Friebe, A. L. Shields, *Patient Prefer. Adherence* **2016**, *10*, 1609-1621.
- [151] L. Z. Benet, *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **1978**, *6*, 559-585.
- [152] L. Astolfi, S. Ghiselli, V. Guaran, M. Chicca, E. D. I. Simoni, E. Olivetto, G. Lelli, A. Martini, *Oncol. Rep.* **2013**, *29*, 1285-1292.
- [153] M. Narvekar, H. Y. Xue, J. Y. Eoh, H. L. Wong, *AAPS PharmSciTech* **2014**, *15*, 822-833.
- [154] M. Bellone, A. Calcinotto, P. Filipazzi, A. De Milito, S. Fais, L. Rivoltini, *Oncoimmunol.* **2013**, *2*, e22058.
- [155] Y. Cao, R.-C. Qian, D.-W. Li, Y.-T. Long, *Chem. Comm.* **2015**, *51*, 17584-17587.
- [156] H. Hou, Y. Zhao, C. Li, M. Wang, X. Xu, Y. Jin, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1759.
- [157] N. Sekiya, A. Imamura, *Gan To Kagaku Ryoho*, **2008**, *35* (8), 1439-1443.
- [158] S. M. Rafiyath, M. Rasul, B. Lee, G. Wei, G. Lamba, D. Liu, *Exp. Hematol. Oncol.* **2012**, *1*: 10.
- [159] Y. Ngan, M. Gupta, *Arch. Pharm. Pract.* **2016**, *7*, 1-13.
- [160] R. Singh, J. W. Lillard, *Exp. Mol. Pathol.* **2009**, *86*, 215-223.
- [161] L. Kuang-Kai, C. Chia-Liang, C. Chia-Ching, I. C. Jui, *Nanotechnol.* **2007**, *18*, 325102.
- [162] K.-K. Liu, C.-C. Wang, C.-L. Cheng, J.-I. Chao, *Biomater.* **2009**, *30*, 4249-4259.
- [163] T. Lechleitner, F. Klauser, T. Seppi, J. Lechner, P. Jennings, P. Perco, B. Mayer, D. Steinmüller-Nethl, J. Preiner, P. Hinterdorfer, M. Hermann, E. Bertel, K. Pfaller, W. Pfaller, *Biomater.* **2008**, *29*, 4275-4284.
- [164] I. P. Chang, K. C. Hwang, C.-S. Chiang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15476-15481.
- [165] Z.-Y. Lien, T.-C. Hsu, K.-K. Liu, W.-S. Liao, K.-C. Hwang, J.-I. Chao, *Biomater.* **2012**, *33*, 6172-6185.
- [166] E. Reem, R. Manuela, O. Jörg, R. Yon, J. Wenjuan, N. Shikha, D. Cerasela Zoica, *Nanotechnol.* **2016**, *27*, 085107.
- [167] S. Haziza, N. Mohan, Y. Loe-Mie, A.-M. Lepagnol-Bestel, S. Massou, M.-P. Adam, X. L. Le, J. Viard, C. Plancon, R. Daudin, P. Koebel, E. Dorard, C. Rose, F.-J. Hsieh, C.-C. Wu, B. Potier, Y. Herault, C. Sala, A. Corvin, B. Allinquant, H.-C. Chang, F. Treussart, M. Simonneau, *Nat. Nanotechnol.* **2016**, *12*, 322.
- [168] H. B. Man, D. Ho, *J. Lab. Autom.* **2013**, *18*, 12-18.
- [169] L. Kuang-Kai, Z. Wen-Wei, W. Chi-Ching, C. Yu-Chung, C. Chia-Liang, L. Yu-Shiu, C. Chinpiao, I. C. Jui, *Nanotechnol.* **2010**, *21*, 315106.
- [170] Y.-H. Hsieh, K.-K. Liu, R. S. Sulake, J.-I. Chao, C. Chen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 2074-2077.
- [171] Y.-W. Lin, E. N. Raj, W.-S. Liao, J. Lin, K.-K. Liu, T.-H. Chen, H.-C. Cheng, C.-C. Wang, L. Y. Li, C. Chen, J.-I. Chao, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9814.

- [172] A. Luong, T. Issarapanichkit, S. D. Kong, R. Fong, J. Yang, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 5105-5109.
- [173] S. D. Kong, A. Luong, G. Manorek, S. B. Howell, J. Yang, *Bioconj. Chem.* **2007**, *18*, 293-296.
- [174] C. Masson, M. Garinot, N. Mignet, B. Wetzler, P. Mailhe, D. Scherman, M. Bessodes, *J Contr. Release* **2004**, *99*, 423-434.
- [175] R. Tang, W. Ji, D. Panus, R. N. Palumbo, C. Wang, *J. Contr. Release* **2011**, *151*, 18-27.
- [176] C. Masson, M. Garinot, N. Mignet, B. Wetzler, P. Mailhe, D. Scherman, M. Bessodes, *J. Contr. Release* **2004**, *99*, 423-434.
- [177] H. Bruyère, A. D. Westwell, A. T. Jones, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2200-2203.
- [178] P. Deslongchamps, Y. L. Dory, S. Li, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3533-3537.
- [179] S. Li, Y. L. Dory, P. Deslongchamps, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 14841-14854.
- [180] S. L. Repetto, J. F. Costello, C. P. Butts, J. K. W. Lam, N. M. Ratcliffe, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 1467-1475.
- [181] S. Krompiec, R. Penczek, M. Penkala, M. Krompiec, J. Rzepa, M. Matlengiewicz, J. Jaworska, S. Baj, *J. Mol. Catal. A Chem.* **2008**, *290*, 15-22.
- [182] S. Krompiec, R. Penczek, P. Bujak, E. Kubik, J. Malarz, M. Penkala, M. Krompiec, N. Kuźnik, H. Maciejewski, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1193-1195.
- [183] S. Venkateswarlu, M. Yoon, *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 18427-18437.
- [184] J. V. Crivello, R. Malik, Y. L. Lai, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **1996**, *34*, 3091-3102.
- [185] T. Ling, E. Griffith, K. Mitachi, F. Rivas, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5790-5793.
- [186] H. K.-J., L. C.-Y., L. Y.-C., L. C.-Y., P. E., H. S.-F., C. C.-L., *J. Biophotonics* **2017**, *10*, 1315-1326.
- [187] H. H. Gustafson, D. Holt-Casper, D. W. Grainger, H. Ghandehari, *Nano today* **2015**, *10*, 487-510.
- [188] J. Harder, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität (München), **2014**.
- [189] L. Xiong, L. Qiangjun, Z. Li, Q. Guirong, W. Yinghong, S. Lianxiang, Z. Ying, R. Jaime, A. Didier, G. Haibin, *Macromol. Rapid Commun.* **2017**, *38*, 1700448.
- [190] A. W. Schwabacher, J. W. Lane, M. W. Schiesher, K. M. Leigh, C. W. Johnson, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1727-1729.
- [191] H.-G. Zoch, *Environ. Sci. Eur.* **2004**, *16*, 67-68.
- [192] M. Thomas, J. Clarhaut, P.-O. Strale, I. Tranoy-Opalinski, J. Roche, S. Papot, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 1006-1010.
- [193] M. Rubén, W. Thomas, R. Frank, H. A. S. K., *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 6844-6848.
- [194] N. Menges, M. Balci, *Synlett* **2014**, *25*, 671-676.
- [195] T. Nakamura, K. Kawano, K. Shiraishi, M. Yokoyama, Y. Maitani, *Biol. Pharm. Bull.* **2014**, *37*, 521-527.
- [196] B. Asadishad, M. Vossoughi, I. Alemzadeh, *Ind. Engin. Chem. Res.* **2010**, *49*, 1958-1963.
- [197] I. Ilan, M. Issac, I. Josefin, A. Y. G., *Cancer* **2003**, *98*, 1958-1966.
- [198] C. L. Limoli, A. Hartmann, L. Shephard, C.-r. Yang, D. A. Boothman, J. Bartholomew, W. F. Morgan, *Cancer Res* **1998**, *58*, 3712-3718.
- [199] M. Duszenko, *Biol. Uns. Zeit* **1998**, *28*, 72-81.
- [200] P. Büscher, G. Cecchi, V. Jamonneau, G. Priotto, *Lancet* **2017**, *390*, 2397-2409.
- [201] P. G. E. Kennedy, *Lancet Neurol.* **2013**, *12*, 186-194.
- [202] U. Frevert, A. Movila, O. V. Nikolskaia, J. Raper, Z. B. Mackey, M. Abdulla, J. McKerrow, D. J. Grab, *PLOS ONE* **2012**, *7*, e43913.
- [203] A. Stich, *Pharm. Uns. Zeit* **2009**, *38*, 546-550.

- [204] M. Schlitzer, *Pharm. Uns. Zeit* **2009**, *38*, 552-558.
- [205] R. Ettari, L. Tamborini, I. C. Angelo, N. Micale, A. Pinto, C. De Micheli, P. Conti, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5637-5658.
- [206] T. Schirmeister, J. Schmitz, S. Jung, T. Schmenger, R. L. Krauth-Siegel, M. Gütschow, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 45-50.
- [207] E. Roberta, P. Santo, T. Lucia, C. Gregorio, G. Silvana, Z. Maria, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2016**, *16*, 1374-1391.
- [208] H. Xie, T. Saito, M. A. Hickner, *Langmuir* **2011**, *27*, 4721-4727.
- [209] O. A. Shenderova, G. E. McGuire, *Biointerphases* **2015**, *10*, 030802.
- [210] Y. F. T. H., A. J. K., T. J., M. H. J., C. G., *J. Thromb. Haemost.* **2011**, *9*, 481-488.
- [211] L. Balek, M. Buchtova, M. K. Bosakova, M. Varecha, S. Foldynova-Trantirkova, I. Gudernova, I. Vesela, J. Havlik, J. Neburkova, S. Turner, M. A. Krzyscik, M. Zakrzewska, L. Klimaschewski, P. Claus, L. Trantirek, P. Cigler, P. Krejci, *Biomater.* **2018**.
- [212] X. Yu, T. C. M. Seegar, A. C. Dalton, D. Tzvetkova-Robev, Y. Goldgur, K. R. Rajashankar, D. B. Nikolov, W. A. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110*, 7205-7210.
- [213] X. Wu, M. Bruschi, T. Waag, S. Schweetberg, Y. Tian, T. Meinhardt, R. Stigler, K. Larsson, M. Funk, D. Steinmuller-Nethl, M. Rasse, A. Krueger, *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 6629-6636.
- [214] A. E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 543.
- [215] J. Mona, C. J. Kuo, E. Perevedentseva, A. V. Priezhev, C. L. Cheng, *Diamond Relat. Mater.* **2013**, *39*, 73-77.
- [216] J. Li, Y. Zhu, W. X. Li, X. Y. Zhang, Y. Peng, Q. Huang, *Biomater.* **2010**, *31*.
- [217] I. Lynch, T. Cedervall, M. Lundqvist, C. Cabaleiro-Lago, S. Linse, K. A. Dawson, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2007**, *134-135*, 167-174.
- [218] T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggård, E. Thulin, H. Nilsson, K. A. Dawson, S. Linse, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 2050-2055.
- [219] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 850-858.
- [220] W. Bussler, *Z. Pflanzenk. Bodenkunde* **1968**, *121*, 78-79.
- [221] B. A. Howell, M. Liu, *Thermochimica Acta* **1994**, *243*, 169-179.
- [222] G. Xia, Z. An, Y. Wang, C. Zhao, M. Li, Z. Li, J. Ma, *Chem. Pharm. Bull.* **2013**, *61*, 390-398.
- [223] T. Meinhardt, D. Lang, H. Dill, A. Krueger, *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 494-500.
- [224] K. Brunner, J. Harder, T. Halbach, J. Willibald, F. Spada, F. Gnerlich, K. Sparrer, A. Beil, L. Möckl, C. Bräuchle, K. K. Conzelmann, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1946-1949.
- [225] B. C. Sanders, F. Friscourt, P. A. Ledin, N. E. Mbua, S. Arumugam, J. Guo, T. J. Boltje, V. V. Popik, G.-J. Boons, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 949-957.
- [226] R. P. Murelli, A. X. Zhang, J. Michel, W. L. Jorgensen, D. A. Spiegel, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17090-17092.
- [227] C. G. Parker, R. A. Domaoal, K. S. Anderson, D. A. Spiegel, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16392-16394.
- [228] J. K. Pokorski, K. Breitenkamp, L. O. Liepold, S. Qazi, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9242-9245.
- [229] S. Thompson, I. N. Fleming, D. O'Hagan, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 3120-3129.
- [230] K. Heller, P. Ochtrop, M. F. Albers, F. B. Zauner, A. Itzen, C. Hedberg, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10327-10330.

- [231] J. D. Thomas, H. Cui, P. J. North, T. Hofer, C. Rader, T. R. Burke, *Bioconj. Chem.* **2012**, *23*, 2007-2013.
- [232] S. Chakraborty, D.-F. Tai, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 2274-2276.
- [233] P. K. Mandal, D. Limbrick, D. R. Coleman, G. A. Dyer, Z. Ren, J. S. Birtwistle, C. Xiong, X. Chen, J. M. Briggs, J. S. McMurray, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2429-2442.
- [234] G. Karabanovich, J. Zemanová, T. Smutný, R. Székely, M. Šarkan, I. Centárová, A. Vocat, I. Pávková, P. Čonka, J. Němeček, J. Stolaříková, M. Vejsová, K. Vávrová, V. Klimešová, A. Hrabálek, P. Pávek, S. T. Cole, K. Mikušová, J. Roh, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2362-2380.