

Strukturmodell von Polymermizellen in Abhängigkeit von der Curcumin-Beladung mithilfe von Festkörper-NMR-Spektroskopie**

Ann-Christin Pöppler,* Michael M. Lübtow, Jonas Schlauersbach, Johannes Wiest, Lorenz Meinel und Robert Luxenhofer

Abstract: Detaillierte Einblicke in die Struktur von mit Wirkstoffen beladenen Polymermizellen sind rar, aber wichtig um gezielt optimierte Transportsysteme entwickeln zu können. Wir konnten beobachten, dass eine Erhöhung der Curcumin-Beladung von Triblockcopolymeren auf Basis von Poly(2-oxazolin) und Poly(2-oxazin) schlechtere Auflösungseigenschaften nach sich zieht. Mithilfe von Festkörper-NMR-Spektroskopie und komplementären Techniken ist es möglich, ein ladungsabhängiges Strukturmodell auf molekularer Ebene zu erstellen, das eine Erklärung für die beobachteten Unterschiede liefert. Dabei belegen die Änderungen der chemischen Verschiebungen und Kreuzsignale in 2D-NMR-Experimenten die Beteiligung des hydrophoben Polymerblocks an der Koordination der Curcumin-Moleküle, während bei höherer Beladung auch eine zunehmende Wechselwirkung mit dem hydrophilen Polymerblock beobachtet wird. Letztere könnte elementar für die Stabilisierung von ultrahochbeladenen Polymermizellen sowie das Design von verbesserten Wirkstofftransportsystemen sein.

Nur wenn Polymer-Wirkstoff-Formulierungen auf molekularer Ebene verstanden werden, können einzelne Komponenten gezielt modifiziert und die physikochemischen Eigenschaften optimiert werden. Idealerweise sollten diese Transportplattformen große Mengen an Wirkstoff enthalten,

während gleichzeitig eine ausreichende Stabilität und effiziente Freigabe erhalten bleibt. Generell haben Wirkstoffformulierungen, z.B. feste Dispersionen oder lösliche Wirkstofftransportsysteme (WTS) bestehend aus Polymermizellen, viel Aufmerksamkeit erregt^[1] und einige von ihnen konnten sich als Wirkstofftransportplattformen, Hygiene- oder Kosmetikartikel und Biomaterialien auf dem Markt behaupten.^[2] Dennoch spiegelt sich die große Anzahl an veröffentlichten Arbeiten zu WTS nicht direkt im therapeutischen Fortschritt und Nutzen für den Patienten wieder.^[3] Dabei sind besonders eine geringe Komplexität und hohe Reproduzierbarkeit wichtige Kriterien für Polymere in der Nanomedizin.^[4] Ein detailliertes Verständnis dieser „Makromolekül/Kleinmolekül“-Materialien auf molekularer Ebene, mit dem diese Punkte systematisch adressiert werden könnten, ist durch ihren komplexen Aufbau sowie das Fehlen von Fernordnung nur schwer zugänglich. Daher ist das in der Literatur vorherrschende Bild für selbstorganisierte Polymermizellen das eines wohldefinierten Kern-Schale-Partikels, in dem der hydrophobe Kern die Wirkstoffmoleküle enthält und die hydrophile Schale des Partikels für die Abschirmung und Stabilität verantwortlich ist.^[5] Der Fokus liegt hierbei auf der Betrachtung von außen. In diesem Kontext war die Arbeit von Callari et al. inspirierend, weil sie zu den ersten gehören, die analysiert haben, wie die Struktur der Polymermizellen durch die Anwesenheit der Wirkstoffmoleküle beeinflusst wird.^[6] Sie konnten zeigen, dass eine höhere Beladung die zelluläre Aufnahme sowie die Zytotoxizität *in vitro* reduziert, was sie auf die größere Packungsdichte des Teilchens zurückführten. Bei dem Polymer handelte es sich um ein Glycopolymer mit definierten Ankerpunkten für den Pt-haltigen Wirkstoff. Allerdings basiert die Mehrzahl der WTS auf der physikalischen Einkapselung mit weniger stark gerichteten Wechselwirkungen. Auch für diese physikalisch beladenen Mizellen, sind solche Effekte, z.B. eine Verringerung der Auflösung mit steigender Beladung, bekannt.^[7] In dieser Arbeit verwenden wir Festkörper-NMR-Spektroskopie kombiniert mit komplementären Techniken, um detaillierte Einblicke in die molekulare Struktur von ultrahochbeladenen Mizellen zu erlangen mit deren Hilfe das Zusammenspiel zwischen Beladung und Materialeigenschaften, wie z.B. Auflösungsrate, für solche Formulierungen erklärt werden kann. Wir sehen in dieser Struktur-Eigenschaftsbeziehung ein Fundament für die definierte, systematische Modifikation von Formulierungen, um das Beste aus beiden Welten zu erhalten – hohe Beladung und günstige Freisetzungseigenschaften.

Um eine Brücke von den experimentellen Beobachtungen zu einem Strukturmodell zu schlagen, verwenden wir das

[*] Jun.-Prof. A.-C. Pöppler
Institut für Organische Chemie
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Am Hubland, 97074 Würzburg (Deutschland)
E-Mail: ann-christin.poeppler@uni-wuerzburg.de

M. M. Lübtow, Prof. R. Luxenhofer
Lehrstuhl für Chemische Technologie der Materialsynthese
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Röntgenring 11, 97070 Würzburg (Deutschland)

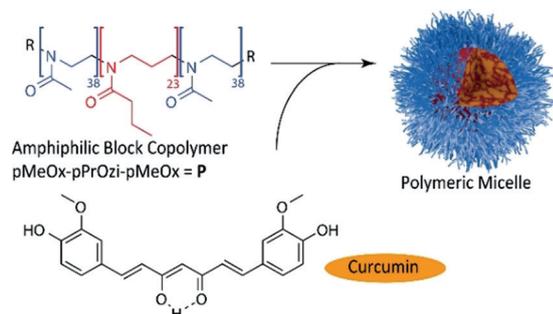
J. Schlauersbach, Dr. J. Wiest, Prof. L. Meinel
Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Am Hubland, 97074 Würzburg (Deutschland)

[**] A previous version of this manuscript has been deposited on a preprint server (<http://doi.org/10.26434/chemrxiv.8943251.v1>).

Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors sind unter <https://doi.org/10.1002/ange.201908914> zu finden.

© 2019 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.

amphiphile Triblockcopolymer Poly(2-methyl-2-oxazolin)-*block*-poly(2-*n*-propyl-2-oxazin)-*block*-poly(2-methyl-2-oxazolin) (pMeOx-*b*-pPrOzi-*b*-pMeOx = **P**) (Schema 1). Aufgrund des schwach hydrophoben Charakters von pPrOzi,



Schema 1. Strukturformeln der in dieser Studie verwendeten Komponenten: Das amphiphile Blockcopolymer **P** schließt Curcumin durch Selbstassemblierung zu Polymermizellen ein (rechte Darstellung).

lagern sich die Polymerketten nur in Gegenwart von hydrophoben Gastmolekülen zu übergeordneten Strukturen zusammen.^[8] Diese Anordnungen konnten mithilfe von SANS- und cryo-TEM-Experimenten als sphärische und wurmartige mizellare Strukturen identifiziert werden.^[8,9] Aufgrund seiner sehr geringen Löslichkeit in Wasser, dem unkomplizierten spektroskopischen Nachweis auch in kleinen Mengen und dem Nichtvorhandensein von Signalüberlagerungen im NMR-Spektrum dient der Naturstoff Curcumin (CUR) als Modellverbindung. Das 77%-ige CUR wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet. Zusätzlich kann A-pPrOzi-A (**P**) sehr große Mengen an Curcumin (> 50 Gew.-%) aufnehmen, sodass Formulierungen mit verschiedenen, wohldefinierten Beladungen hergestellt werden können.^[10] Ein Set aus drei Formulierungen, CUR-2-P, CUR-6-P and CUR-11-P, wurde hergestellt.^[10,11] Dies entspricht 2, 6 oder 11 gL⁻¹ CUR pro 10 gL⁻¹ des Polymers vor der Gefriertrocknung (Kapitel S1 der Hintergrundinformationen). Für die höchste Beladung übersteigt die Anzahl der Curcumin-Moleküle pro Polymerblock die Anzahl der vorhandenen Monomer-Wiederholheiten des hydrophoberen Polymerblocks.

In standard-Auflösungstest mit gepressten Tabletten, wurde für kristallines Curcumin während zwei Stunden keine, für amorphes CUR jedoch eine niedrige Auflösungs Menge beobachtet (Tabelle 1 und Abbildung S2). Das Formulieren von CUR mit A-pPrOzi-A verbesserte die Auflösungsrate um 6000 (CUR-2-P), wobei das Auflösungsverhalten stark von

der Beladung abhängt (Tabelle 1 und Abbildung S3). Die Presslinge für alle Formulierungen wurden aus den gefriergetrockneten Proben hergestellt.

CUR-2-P mit der geringsten CUR-Beladung begann sich direkt zu Beginn des Experimentes mit einer Rate von 6.2 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{cm}^{-2}$ aufzulösen, was für diese Untersuchungen das Maximum darstellt. Bei Erhöhung der CUR-Beladung (CUR-6-P), verringert sich die Auflösungsrate um den Faktor 2 und eine Latenzzeit von 24 min wird beobachtet. Für die höchste CUR-Beladung ist dieser Unterschied noch stärker ausgeprägt und die Auflösungsrate verringert sich um den Faktor 100. Auch wenn die Auflösungsrate dann immer noch 20-mal schneller ist als für amorphes CUR, zeigt dies, dass die höchste Beladung nicht zwangsläufig die für die (orale) Verabreichung vorteilhafteste Form darstellt. Wie ein zweiseitiger t-Test zeigt, sind die beobachtete Unterschiede zwischen CUR-2-P und CUR-6-P sowie CUR-11-P und amorphem CUR statistisch signifikant ($p \leq 0.05$). Für die verschiedenen Auflösungsrate konnten Kristallisationseffekte durch lange PXRD-Messungen der gequollenen Tabletten ausgeschlossen werden (Abbildung S16). Außerdem sollten die hohen Rührgeschwindigkeiten (4800 UpM) verhindern, dass ruhende Wasserschichten eine Diffusionsbarriere erzeugen. Die Bildung einer hoch-viskosen Gelschicht scheint jedoch möglich. Ergänzend zu den Auflösungstest wurde die Wasseraufnahme bei 80% relativer Feuchtigkeit untersucht. Die Formulierung mit der geringsten Beladung zeigte nach 24 Stunden 30% Gewichtszunahme, während geringere Zunahmen von 16% und 15% für CUR-6-P und CUR-11-P beobachtet wurden, letztere also hydrophober sind.

Um diese verschiedenen Eigenschaften zu erklären, wurden die gefriergetrockneten Formulierungen zunächst durch Pulverröntgendiffraktometrie charakterisiert (Abbildung S13). Während das kristalline CUR deutliche Diffraktionspeaks zeigt, die mit der stabilsten, monoklinen Kristallform (CSD Code: BINMEQ05^[12]) übereinstimmen, sind alle Formulierungen röntgenamorph und zeigen keine Fernordnung. Allerdings weisen Trends bezüglich Position und Breite des Halos auf Nahordnungseffekte hin. Da NMR-Spektroskopie besonders empfindlich für die lokale Umgebung der NMR-aktiven Kerne ist, stellt es eine leistungsfähige Sonde für solche Nahordnungsphänomene dar. Folglich wurden die Proben im nicht-selektiven Lösemittel CDCl₃ (keine Mizellen, einzelne Komponenten) oder in D₂O (selektiv, Mizellen mit CUR-Beladung) gelöst und anschließend analysiert (Abbildungen S4–S6). Während sich sowohl CUR und das Polymer in CDCl₃ lösen, können die CUR Signale in D₂O kaum ausgemacht werden. Nur die Polymer-Resonanzen waren eindeutig erkennbar, was darauf hindeutet, dass sich CUR im Kern der Mizelle nahezu wie ein Feststoff verhält und mit jüngsten Analysen durch Fluoreszenzspektroskopie übereinstimmt.^[13] Das erschwert die detaillierte Analyse jedoch deutlich und NMR-Spektroskopie in Lösung ist daher nicht geeignet, um intermolekulare Wechselwirkungen innerhalb der Mizellen zu untersuchen. In Diffusions(DOSY)-NMR-Messungen der drei Formulierungen konnten Diffusionskoeffizienten und

Tabelle 1: Experimentell bestimmte Auflösungsrate in $\mu\text{mol min}^{-1} \text{cm}^{-2}$ mit Latenzzeit sowie Ergebnisse der Hygroskopizitätsbestimmung.

| Probe | Latenzzeit [min] | Auflösungsrate [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{cm}^{-2}$] ^[a] | Wasseraufnahme [Gew.-%] bei 80% r.F. ^[b] |
|--------------|------------------|---|---|
| CUR-2-P | 0 | 6.2 ± 0.5 | 30 |
| CUR-6-P | 24 | 2.6 ± 0.8 | 16 |
| CUR-11-P | N/A | 0.025 ± 0.008 | 15 |
| amorphes CUR | N/A | 0.001 ± 0.0004 | – |

[a] Mittelwert ± SD ($n = 3$). [b] $n = 1$.

damit abgeschätzte Radien erhalten werden, die mit in früheren Arbeiten mit dynamischer Lichtstreuung bestimmten Werten übereinstimmen (beide in Tabelle S3).^[10] Das zeigt, dass Informationen bezüglich der Größe und zum Teil auch Morphologie der Mizellen verfügbar sind, während Informationen zur molekularen Anordnung innerhalb der Mizelle deutlich schwerer zugänglich sind.

Aus diesem Grund richteten wir unser Augenmerk auf die Festkörper-NMR-Spektroskopie, die im pharmazeutischen Kontext bereits erfolgreich für die Untersuchung von amorphen Darreichungsformen verwendet wurde^[14] und die zudem besonders sensitiv auf intermolekulare Wechselwirkungen sowie subtile Änderungen in der lokalen Anordnung reagiert. Beispielsweise konnten kürzlich Procházková et al. polymorphe Umwandlungen in Glycopolymervesikeln mit Hilfe der Kombination aus Festkörper-NMR-Spektroskopie und PXRD aufklären.^[15] ¹H- und ¹³C-CP/MAS-NMR-Experimente bei 24 kHz MAS und 14.1 T wurden für alle Formulierungen durchgeführt. Zur Stabilitätskontrolle während des MAS wurden zu verschiedenen Zeitpunkten ¹H-NMR-Spektren und im Anschluss an die NMR-Messungen PXRD-Daten aufgenommen (Abbildung S14b). Für einen ersten Machbarkeitsnachweis wurden die spektroskopischen Daten der drei Formulierungen mit den Spektren der individuellen Komponenten (CUR und reines Polymer), einer 1:1 physikalischen Mischung und amorphem CUR verglichen (Abbildung 1, Skalierung mit individueller Scananzahl). Die ¹³C-CP/MAS-NMR-Spektren des CUR-Ausgangsmaterials des Polymers für die Herstellung der Formulierungen sind in grau und blau abgebildet. Die Signalzuordnung erfolgte mithilfe der NMR-Spektren in Lösung sowie der bisher veröffentlichten Zuordnungen basierend auf Festkörper-NMR-Daten und ergänzenden Rechnungen.^[16] Bei dem Spektrum der 1:1-Mischung (grün) handelt es sich dementsprechend um die

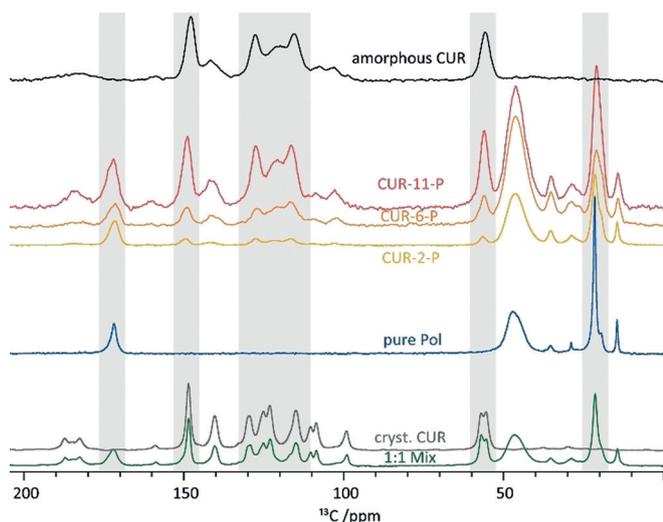


Abbildung 1. ¹³C-CP/MAS-NMR-Spektren von amorphem CUR (schwarz), den drei Formulierungen (gelb, orange, rot mit steigender CUR Beladung), dem reinen Polymer (blau), CUR (grau) und einer 1:1-Mischung der beiden Komponenten (grün). Alle Spektren wurden bei 14.1 T und 24 kHz aufgenommen und entsprechend der Scananzahl der individuellen Datensätze skaliert.

Summe der Spektren der einzelnen Komponenten. Dagegen unterscheiden sich die Spektren der drei Formulierungen (gelb-orange-rot) bezüglich der Anzahl der Signale, Signalpositionen und -breiten sowie relativer Intensitäten eindeutig von den anderen Spektren. Erhöhung der CUR-Beladung resultiert in einer Erhöhung der CUR-Signalintensitäten und steigender Ähnlichkeit zum Spektrum von amorphem CUR. Dies zeigt, dass Festkörper-NMR-Spektroskopie geeignet ist, um diese Polymer-Wirkstoffanordnungen systematisch zu untersuchen. Im Folgenden werden konkrete Spektralbereiche (Abbildung 1, grau unterlegt) im Hinblick auf spezifische, strukturelle Aspekte der Formulierungen diskutiert (Abbildung 2 und Abbildung 4). Dafür wurde die Skalierung so

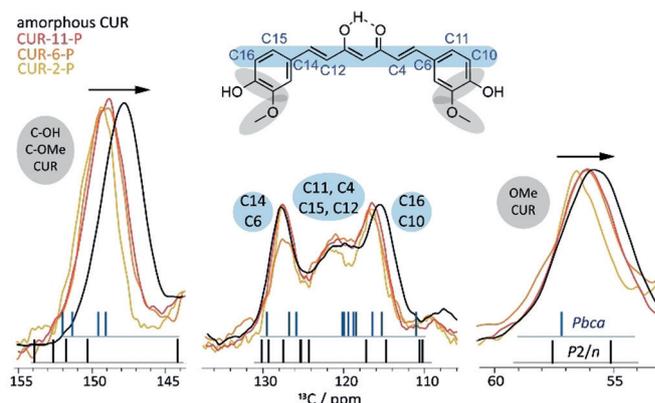


Abbildung 2. Vergrößerte Auszüge aus der Überlagerung der ¹³C-CP/MAS-NMR-Spektren von CUR-2-P (gelb), CUR-6-P (orange), CUR-11-P (rot) und amorphem CUR (schwarz) aus Abbildung 1. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Intensitäten so skaliert, dass die Signale eine ähnliche Höhe haben. Berechnete chemische Verschiebungen werden durch Striche dargestellt.

angepasst, dass die Signale nahezu identische Höhen aufweisen, was den Vergleich von chemischen Verschiebungen und Linienbreiten vereinfacht. Ein Überblick über alle extrahierten Parameter ist in Tabelle S4 zu finden. Generell sind die Polymersignale in den Formulierungen alle breiter als für das reine Polymer (keine Mizellen), während alle CUR-Signale schmäler sind als in der vollständig amorphen Probe, was mit dem Konzept eines röntgenamorphen Materials mit einem unterschiedlichen Ausmaß an Nahordnung übereinstimmt.

Zuerst werden die Signale der quaternären C-OH-/C-OME-Kohlenstoffatome bei ≈ 150 ppm und die Signale der CH₃-Gruppe von Curcumin (≈ 56 ppm) verglichen, die am stärksten durch eine höhere Beladung beeinflusst zu sein scheinen (Abbildung 2, graue Ellipsen). Dabei handelt es sich um die polaren Endgruppen, die erwartungsgemäß an intermolekularen Wasserstoffbrücken beteiligt sein sollten, während die Enol-Einheit weitgehend intramolekulare Wechselwirkungen eingeht. Dies wurde durch den Vergleich von berechneten chemischen Verschiebungen der Kristallstruktur sowie eines isolierten Moleküls bestätigt (Abbildung S19/S20). Die ¹³C chemischen Verschiebungen nehmen von niedriger (CUR-2-P) zu hoher Beladung (CUR-11-P) ab und die Linienbreiten steigen, was insgesamt einer Annäherung

an das Spektrum von amorphem CUR entspricht. Demzufolge erfahren die Curcumin-Moleküle mit steigender Beladung eine unterschiedlichere molekulare Umgebung. Interessanterweise sind die absoluten Änderungen zwischen CUR-2-P und CUR-6-P größer als zwischen den beiden höheren Beladungen (6 vs. 11). Des Weiteren sind die Signale aus dem CUR Rückgrat (hellblau unterlegt) sehr aufschlussreich. Für Curcumin in der stabilsten Form (monokline Raumgruppe $P2/n$) werden keine ^{13}C Signale im Bereich von 120 ppm beobachtet wie auch die berechneten Verschiebungen zeigen (Abbildung 2, schwarze Striche). Demgegenüber sagen Rechnungen für die zwei anderen bekannten Polymorphe, in denen CUR einen deutlich kleineren Torsionswinkel aufweist (16.1° vs. 46.0°), ^{13}C -Signale in diesem Bereich vorher (blaue Striche). Daraus können wir ableiten, dass CUR in den Mizellen eine Konformation mit einer geringen intramolekularen Verdrehung ausweist.

Als zusätzliches Indiz für die Beteiligung der Hydroxygruppen des Curcumin an Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Amid des Polymers wurden für CUR-11-P, CUR-6-P, kristallines CUR und die 1:1-Mischung ^1H -NMR-Spektren bei schnellem MAS aufgenommen (Abbildung 3). Darin wird

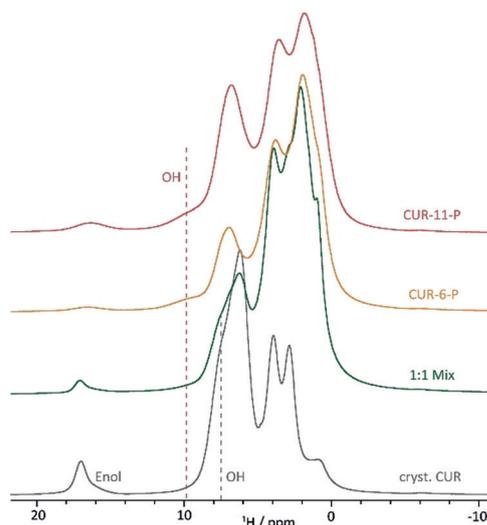


Abbildung 3. Vergleich der ^1H -Festkörper-NMR-Spektren von CUR-11-P, CUR-6-P, einer 1:1-Mischung und kristallinem CUR, die bei 14.1 T und 65 kHz MAS aufgenommen wurden. Die Enol- sowie die Hydroxy-Funktionalität in den verschiedenen Proben sind jeweils hervorgehoben.

für die Formulierungen ein breites Signal bei 9–10 ppm (gestrichelte, rote Linie) beobachtet, dessen Intensität von CUR-6-P zu CUR-11-P ansteigt und das für kristallines CUR sowie die physikalische Mischung nicht vorhanden ist. Signale mit derart hohen chemischen Verschiebungen sind typisch für H-Brücken-Wechselwirkungen, sodass dieses Signal der OH-Gruppe zugeordnet werden kann.

Für CUR und die physikalische Mischung liegt das Signal der OH-Gruppe mit 7.5 ppm bei deutlich niedrigeren ppm-Werten. Diesen Unterschied führen wir auf die stärkeren Wechselwirkungen zurück, die zwischen den OH- und Carbonyl-Funktionalitäten im Vergleich mit den Methoxy-

Gruppen des Curcumins gebildet werden können. Dies stimmt mit GIPAW(CASTEP)-Rechnungen für ein Set von Modelstrukturen, die ähnliche $\text{OH}\cdots\text{O}=\text{CN}$ -Kontakte ausbilden können, überein (Kapitel S8). Dabei wurde eine Verlagerung von ca. 5–6 ppm zu höheren Werten für Gruppen vorhergesagt, die an derartigen H-Brücken-Anordnungen beteiligt sind, was 1–2 ppm über den für CUR in Form 1 berechneten Werten liegt (Kapitel S7).

Im Hinblick auf das Polymer sollte die Amid $\text{C}=\text{O}$ -Gruppe (≈ 172 ppm), die als H-Brücken-Akzeptor fungieren kann, empfindlich auf die Anwesenheit von CUR reagieren. Für das reine Polymer wird nur ein Signal im 1D- ^{13}C -CP/MAS-NMR-Spektrum beobachtet, sodass die pMeOx- und pProZi-Blöcke nicht unterschieden werden können. Erst im ^1H - ^{13}C -HETCOR-Spektrum mit längerer Kontaktzeit (1.5 ms) können drei verschiedene Signale bei 172.8, 171.7 und 171.0 ppm beobachtet werden, die mit Hilfe der ^{13}C -NMR-Daten in Lösung zur ProZi-Carbonylgruppe und den *cis/trans*-Isomeren des pMeOx-Blocks zugeordnet werden können (Abbildung 4a). Das Auftreten von *cis/trans*-Isomeren bei tertiären Amid, wie z. B. Poly(2-oxazolin)en ist bekannt.^[17] Das Auftreten der Isomeren im Feststoff sollte daher auch beim Aufbau von detaillierten Strukturmodellen beachtet werden. Durch die Beladung mit CUR verbreitern sich die Signale und Überlagerungen werden beobachtet. Dies ist eine Folge der Verteilung von Umgebungen und des parallelen Vorhandenseins von unkoordinierten und koordinierten Amid-Gruppen. Um die Rolle der verschiedenen Polymerblöcke bei der CUR-Koordination genauer zu untersuchen, wurden Änderungen in den chemischen Verschiebungen und Linienbreiten für die CH_3 -Gruppe des pMeOx-Blocks analysiert (Abbildung 4b). Die Linienbreite steigt deutlich für den Übergang von reinem Polymer zu selbst-assembliertem CUR-2-P und weiter zu den CUR-6-P und CUR-11-P Formulierungen, die sich nicht mehr stark unterscheiden. Die chemische Verschiebung ändert sich zwischen reinem Polymer und niedriger Beladung nur sehr wenig (0.1 ppm), was mit dem vereinfachten Bild von CUR im Kern der Mizelle in der Nähe der hydrophoben ProZi Einheiten übereinstimmt. Mit steigender Beladung wird jedoch eine deutlichere Änderung der chemischen Verschiebung beobachtet, was dafür spricht, dass der hydrophile Polymerblock an der CUR-Koordination beteiligt wird. Im Gegensatz dazu bleiben die chemische Verschiebung und die Linienbreite der Propyl- CH_3 -Einheit zwischen den CUR-6- und CUR-11-P-Formulierungen weitestgehend konstant, was nahelegt, dass die Wechselwirkungen mit dem hydrophoben Kern der Mizelle größtenteils abgesättigt sind (Abbildung S9). Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden ^1H - ^{13}C -2D-HETCOR-Spektren mit einer langen Kontaktzeit von 5 ms, in denen intermolekulare Wechselwirkungen zwischen CUR und dem Polymer sichtbar sein sollten. Die entsprechenden 2D-NMR-Spektren von CUR-6-P und CUR-11-P sind in Abbildung 4c und 4d gezeigt. Da im Polymer keine aromatischen Einheiten enthalten sind, müssen Kreuzsignale für ^{13}C -chemische Verschiebungen mit ^1H -aromatischen Signalen durch CUR-Pol Kontakte hervorgerufen werden. Solche Kontakte sind durch farbige Boxen entsprechend dem Farbcode in Abbildung 1 gekennzeichnet. Das 2D-HETCOR-Spektrum von CUR-2-P

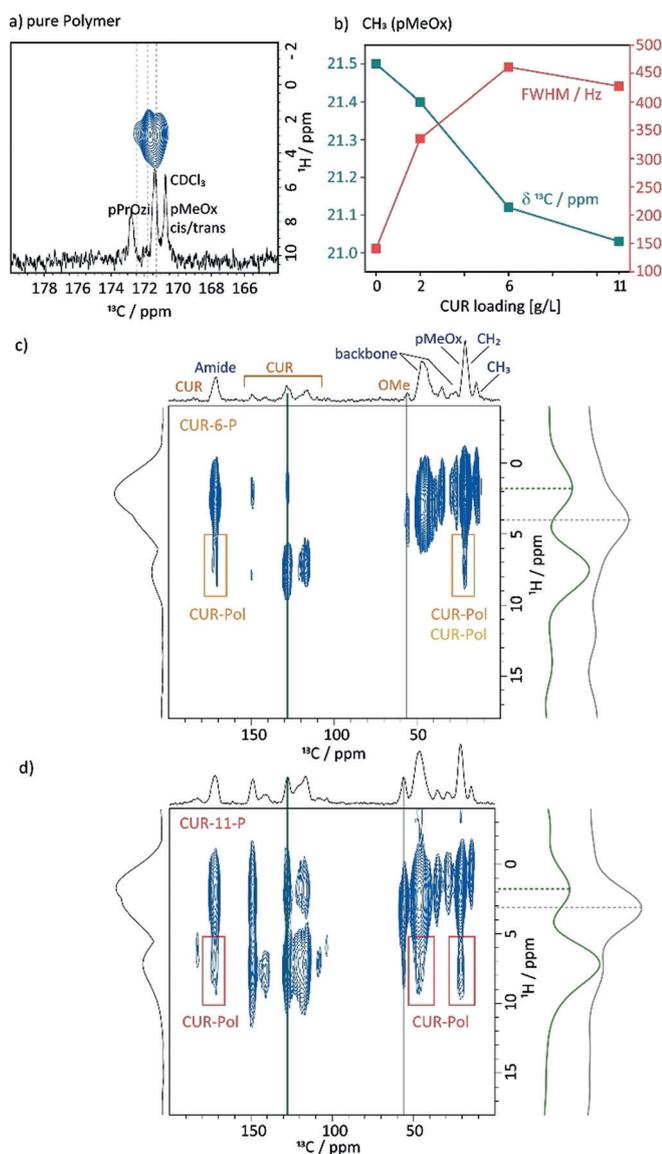


Abbildung 4. a) Amid-Region des ^1H - ^{13}C -FSLG-HETCOR-Spektrums des reinen Polymers aufgenommen mit einer 1.5 ms Kontaktzeit sowie ^{13}C -NMR-Spektrum in CDCl_3 , Gesamtspektren in den Hintergrundinformationen. b) Vergleich der chemischen Verschiebung (grün) und Linienbreite (rot) der CH_3 -Gruppe des hydrophilen pMeOx-Polymerblocks für das reine Polymer und die drei Formulierungen. c) und d) ^1H - ^{13}C -FSLG-HETCOR-Spektren von CUR-6-P und CUR-11-P aufgenommen bei 14.1 T und 20 kHz MAS mit einer Kontaktzeit von 5 ms. Vertikale 1D-Schnitte (rechts) gehören zu den im 2D-Spektrum eingezeichneten Linien. Farbigen Boxen markieren Kreuzsignale, die von CUR-Pol intermolekularen Kontakten stammen. Der 2D Datensatz für CUR-2-P befindet sich in den Hintergrundinformationen.

befindet sich in Abbildung S11 b. Für die Formulierung mit der geringsten Beladung wurden überwiegend intramolekulare Kreuzsignale beobachtet. Eine Ausnahme bildet eine schwache Wechselwirkung mit einer CH_2 -Einheit der Propylkette bei 20.5 ppm. Insgesamt ist die Intensität jedoch so niedrig, dass auch das Vorhandensein von weiteren Kontakten nicht ausgeschlossen werden kann. Für die mittlere Beladung zeigen zusätzliche Kontakte zwischen CUR und

pMeOx die Beteiligung des pMeOx-Blocks an der CUR-Koordination. Interessanterweise konnten zur Carbonylgruppe zwei Kontakte mit unterschiedlicher Intensität beobachtet werden. Ohne weitere Untersuchungen kann nicht vollständig geklärt werden, ob es sich dabei um die *cis/trans*-Isomere oder verschieden starke Wechselwirkungen mit den pMeOx und pPrOzi-Segmenten handelt. Schließlich zeigt das Spektrum von CUR-11-P eine Vielzahl von weiteren Kreuzsignalen, u. a. zu allen Carbonyl-Umgebungen sowie dem Polymerrückgrat. Kreuzsignale für ^{13}C -CUR-Einheiten mit Protonen bei niedrigen chemischen Verschiebungen könnten ebenso auf intermolekulare CUR-Pol Kontakte hindeuten, allerdings ist die Interpretation hier komplexer, da die Methoxygruppe von CUR ebenfalls bei ca. 3.5 ppm beobachtet wird. Extrahierte horizontale Schichten zeigen, dass der Mittelpunkt des Kreuzsignals bei 128 ppm (grün) bei einem niedrigeren ppm-Wert liegt, als für die OMe Gruppe (grau). Trotzdem können CUR-CUR-Kontakte oder intramolekulare Spindiffusion als Ursprung dieser Kreuzsignale nicht vollständig ausgeschlossen werden. Ein HETCOR-Spektrum mit einer zusätzlichen Spin-Diffusionszeit von 50 ms wie von Duan et al. verwendet^[18] zeigte Spindiffusion zwischen den verschiedenen Komponenten (Abbildung S12 a). Dies ist ein Anhaltspunkt dafür, dass auch bei hohen Beladung keine Phasenseparierung und Domänenbildung auftreten, was zudem in einer früheren Studie durch das Vorhandensein eines gemeinsamen Glasübergangs für die Formulierungen unterstützt wird.^[8] Als Gegenkontrolle zeigte ein HETCOR Experiment für die 1:1 physikalische Mischung keine Kreuzsignale zwischen CUR und dem Polymer (Abbildung S12 b).

Aufbauend auf diesen Beobachtungen, können wir nun die Puzzleteile aus den verschiedenen Experimenten zu einem übergeordneten, beladungsabhängigen Strukturmodell zusammensetzen (Abbildung 5): Die einzelnen Polymerstränge ordnen sich nur in Gegenwart von Curcumin zu Mizellen zusammen. Für die niedrigste CUR-Konzentration (CUR-2-P) befinden sich die schlecht wasserlöslichen CUR-Moleküle im Kern der Mizelle und nehmen dabei eine fast planare Konformation ein. Es liegt eine Verteilung von relativ definierten Umgebungen in Form von Wasserstoffbrücken zwischen den phenolischen OH-Gruppen und den Amid-Einheiten des hydrophoben Blocks vor (rote Struktur, Abbildung 5). Mit der Absättigung dieser bevorzugten Wechselwirkungspartner bei steigender Beladung (CUR-6-P), sinkt die Nahordnung um die Curcumin-Moleküle. Außerdem wird angenommen, dass CUR-Moleküle nun auch an der hydrophil-hydrophoben Grenzfläche zu finden sind (übereinstimmend mit dem Himbeer-Modell für ein ähnliches System aus SANS-Daten^[9]). Dies bedeutet, dass nun verstärkt Interaktionen mit den Wiederholungseinheiten des hydrophilen Polymerblocks stattfinden, was durch konkrete Änderungen in den chemischen Verschiebungen sowie Kreuzsignalen in den 2D-HETCOR-Spektren belegt wird. Die Amid-Funktionalitäten des hydrophilen Blocks (Abbildung 5, in blau) sorgen darüber hinaus für die Stabilisierung und Hydratisierung der Mizellen. Somit blockieren die CUR-Moleküle nun teilweise die Wasserstoffbrücken-Akzeptoreinheiten in der Schale der Mizelle, die wichtig für den Hy-

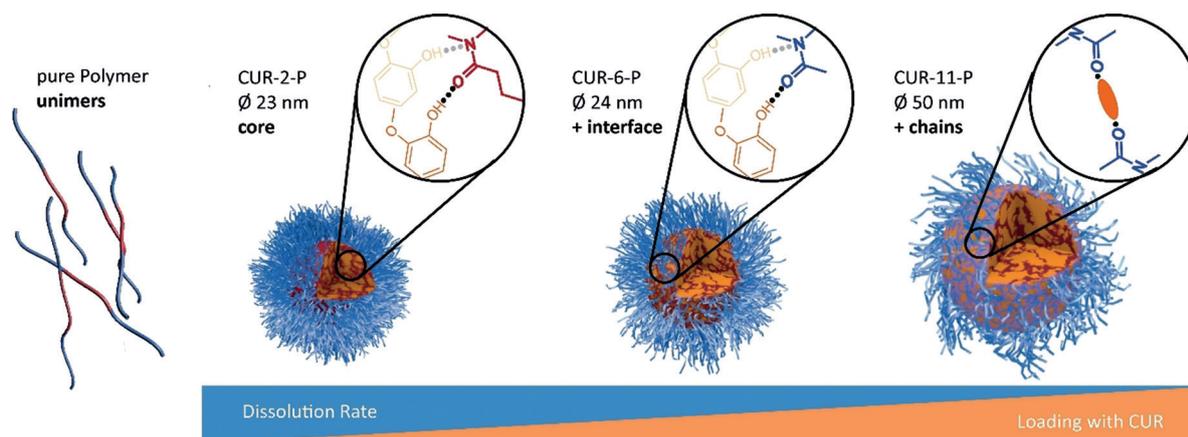


Abbildung 5. Schematisches Modell der strukturellen Änderungen, die die Polymermizellen mit steigender Curcumin-Belastung erfahren. Die strukturellen Änderungen basieren auf Festkörper-NMR-Daten und komplementären Einblicken. Für jede Belastung sind die zusätzlich auftretenden Wechselwirkungsarten dargestellt.

dratisierungs- und Auflösungsprozess sind, was mit der beobachteten Verzögerung beim Auflösen von CUR-6- und CUR-11-P korreliert. Schließlich ist im Falle der höchsten Belastung nicht nur der Kern im Wesentlichen mit CUR-Molekülen gefüllt (geringster Grad an Nahordnung in den NMR-Spektren), sondern auch die hydrophilen Amid-Einheiten werden abgesättigt, was quasi zur Vernetzung der hydrophilen Schale führt und damit die Hydratisierung stark beeinflusst. Dies ist im Einklang mit den deutlich verringerten Auflösungsraten für CUR-11-P1 und dem Anstieg der Partikelgröße, dessen Schale für solch ultrahohe Belastungen starrer ist. Aus diesem Gesamtbild würde sich eine erhöhte Hydrophobizität der Mizellen bei höherer Belastung ableiten, was die Ergebnisse in Tabelle 1 sowie verschiedene Untersuchungen an Glycopolymere mit SAXS und SANS zeigen.^[19]

Die detaillierte Einsicht in die Struktur und das Verständnis von mit Wirkstoff beladenen Polymermizellen ist schwierig zu erhalten. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass Festkörper-NMR für diesen Zweck eine vielseitige Werkzeugkiste sein kann, mit der – in Kombination mit komplementären Methoden – eine detaillierte Analyse von Polymermizellen und damit ein besseres Verständnis der Struktur möglich ist. Durch die NMR-spektroskopischen Daten konnten Veränderungen im Wechselwirkungsprofil in Abhängigkeit der Ladung sichtbar gemacht werden. Für hohe Belastungen zeigte sich, dass die hydrophilen Polymerblöcke an der Koordination von CUR beteiligt sind, was vermutlich ein kritischer Faktor ist, um solche extrem hohen Belastungen von ca. 50 Gew.-%, wie für diese Polymerplattform beobachtet, zu erzielen. Darauf aufbauend können die Polymere nun gezielt modifiziert werden, um einerseits die ultrahohen Belastungen aufrecht zu erhalten, aber andererseits das Freisetzungsverhalten nicht negativ zu beeinflussen. Weitere Untersuchungen müssen dann bestätigen ob und wie auf diesem Wege verbesserte Nanopartikel für den Wirkstofftransport erzeugt werden können. Außerdem können die hier verwendeten NMR-Experimente um weitere protonendekodierte Experimente bei schnellem MAS erweitert werden.

Damit sollte es dann möglich sein, noch genauere Strukturmodelle für diese und andere Wirkstoff-Polymeranordnungen zu erstellen. Darüber hinaus ist eine Untersuchung mit systematisch veränderten Polymer- und Gastmolekülen eventuell auch in Kombination mit Isotopenmarkierungen nötig, um zum Beispiel Wirkstoff-Spezifitäten von strukturell ähnlichen Polymeren verstehen zu können.^[10,20] Eine Analyse der Proben zu verschiedenen Lagerzeitpunkten bei definierter relativer Feuchtigkeit könnte außerdem Rückschlüsse auf den Auflösungsmechanismus liefern. Außerdem könnten Paarverteilungsfunktionen aus Röntgen-Daten sowie Einblicke aus SANS-Messungen sehr wertvoll sein, um mehr über diese interessanten Systeme zu lernen.

Danksagung

Wir danken Prof. Roland Mitric für die Möglichkeit, GIPAW (CASTEP) Rechnungen an seinem AK-Cluster durchzuführen und Matthias Wohlgemuth für die große Hilfe beim Aufsetzen des Programmpackets. Bei Dr. Matthias Grüne möchten wir uns für die anregenden Diskussionen bedanken. Außerdem danken wir Dominik Heuler für seine Unterstützung bei den PXR-D-Messungen und Malik Salman Haider für sein Protokoll zur Herstellung von amorphem CUR. Tessa Lühmann half uns beim Korrekturlesen und Thomas Lorson bei der DLS. Ein besonderes Dankeschön geht an die Pöppler Gruppe für die Unterstützung beim Korrekturlesen, durch Diskussion und Enthusiasmus. Finanzielle Unterstützung erhielt A.-C. P. durch den Verband der Chemischen Industrie (VCI) in Form einer Sachbeihilfe, während M. M. L. sein Doktorandenstipendium von der Evonik Foundation erhält. Wir möchten uns bei allen Reviewern für deren Mühe und sehr nützliche Kommentare bedanken, die es uns ermöglichten, die erste Version des Manuskripts zu verbessern. Experimentelle und berechnete Daten sind über den Online-Speicherdienst Zenodo zugänglich.

Interessenkonflikt

M.M.L. and R.L. are listed as inventors on a patent application pertinent to some of the materials discussed in this contribution. R.L. is co-founder and has a financial interest in DeLaqua Pharmaceuticals Inc. which is intent on commercializing poly(2-oxazoline) based excipients.

Stichwörter: Auflösungsraten · Festkörper-NMR · Mizellen · Nahordnung · Polymere

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 18540–18546
Angew. Chem. **2019**, *131*, 18712–18718

-
- [1] a) R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 347–360; b) Y. Huang, W.-G. Dai, *Acta Pharm. Sin. B* **2014**, *4*, 18–25; c) G. S. Kwon, K. Kataoka, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 237–245; d) H. Cabral, K. Kataoka, *J. Controlled Release* **2014**, *190*, 465–476.
- [2] a) V. Wagner, A. Dullaart, A.-K. Bock, A. Zweck, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1211–1217; b) N. Kamaly, Z. Xiao, P. M. Valencia, A. F. Radovic-Moreno, O. C. Farokhzad, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2971–3010.
- [3] J.-C. Leroux, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 15170–15171; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 15368–15369.
- [4] R. Luxenhofer, *Nanomedicine* **2015**, *10*, 3109–3119.
- [5] a) H. Chen, S. Kim, L. Li, S. Wang, K. Park, J.-X. Cheng, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 6596–6601; b) H. Cho, T. C. Lai, K. Tomoda, G. S. Kwon, *AAPS PharmSciTech* **2015**, *16*, 10–20; c) Y. T. Tam, J. Gao, G. S. Kwon, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 8674–8677; d) H. Cabral, K. Miyata, K. Osada, K. Kataoka, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 6844–6892.
- [6] M. Callari, P. L. De Souza, A. Rawal, M. H. Stenzel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 8441–8445; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 8561–8565.
- [7] a) R. Gref, Y. Minamitake, M. T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, R. Langer, *Science* **1994**, *263*, 1600; b) M. Polakovič, T. Görner, R. Gref, E. Dellacherie, *J. Controlled Release* **1999**, *60*, 169–177.
- [8] M. M. Lübtow, L. C. Nelke, J. Seifert, J. Kühnemundt, G. Sahay, G. Dandekar, S. L. Nietzer, R. Luxenhofer, *J. Controlled Release* **2019**, *303*, 162–180.
- [9] A. Schulz, S. Jaksch, R. Schubel, E. Wegener, Z. Di, Y. Han, A. Meister, J. Kressler, A. V. Kabanov, R. Luxenhofer, C. M. Papadakis, R. Jordan, *ACS Nano* **2014**, *8*, 2686–2696.
- [10] M. M. Lübtow, L. Hahn, M. S. Haider, R. Luxenhofer, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 10980–10983.
- [11] R. Luxenhofer, A. Schulz, C. Roques, S. Li, T. K. Bronich, E. V. Batrakova, R. Jordan, A. V. Kabanov, *Biomaterials* **2010**, *31*, 4972–4979.
- [12] P. Sanphui, N. R. Goud, U. B. R. Khandavilli, S. Bhanoth, A. Nangia, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5013–5015.
- [13] M. M. Lübtow, H. Marciniak, A. Schmiedel, M. Roos, C. Lambert, R. Luxenhofer, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 12601–12610.
- [14] a) R. Lefort, A. De Gusseme, J. F. Willart, F. Danède, M. Descamps, *Int. J. Pharm.* **2004**, *280*, 209–219; b) T. N. Pham, S. A. Watson, A. J. Edwards, M. Chavda, J. S. Clawson, M. Strohmeier, F. G. Vogt, *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 1667–1691; c) J. Brus, M. Urbanova, I. Sedenkova, H. Brusova, *Int. J. Pharm.* **2011**, *409*, 62–74.
- [15] E. Procházková, C. Cao, A. Rawal, M. Dračinský, S. Bhattacharyya, I. Čísařová, J. M. Hook, M. H. Stenzel, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 28278–28288.
- [16] a) X. Kong, A. Brinkmann, V. Terskikh, R. E. Wasylshen, G. M. Bernard, Z. Duan, Q. Wu, G. Wu, *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 11692–11704; b) M. A. Matlinska, R. E. Wasylshen, G. M. Bernard, V. V. Terskikh, A. Brinkmann, V. K. Michaelis, *Cryst. Growth Des.* **2018**, *18*, 5556–5563.
- [17] a) M. Sisido, Y. Imanishi, T. Higashimura, *Biopolymers* **1972**, *11*, 399–408; b) Q. Sui, D. Borchardt, D. L. Rabenstein, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12042–12048; c) B. C. Gorske, J. R. Stringer, B. L. Bastian, S. A. Fowler, H. E. Blackwell, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16555–16567.
- [18] P. Duan, J. C. Moreton, S. R. Tavares, R. Semino, G. Maurin, S. M. Cohen, K. Schmidt-Rohr, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 7589–7595.
- [19] C. Cao, J. Zhao, F. Chen, M. Lu, Y. Y. Khine, A. Macmillan, C. J. Garvey, M. H. Stenzel, *Chem. Mater.* **2018**, *30*, 5227–5236.
- [20] M. M. Lübtow, L. Keßler, A. Appelt-Menzel, T. Lorson, N. Gangloff, M. Kirsch, S. Dahms, R. Luxenhofer, *Macromol. Biosci.* **2018**, *18*, 1800155.

Manuskript erhalten: 17. Juli 2019

Veränderte Fassung erhalten: 4. September 2019

Akzeptierte Fassung online: 17. September 2019

Endgültige Fassung online: 4. November 2019