



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Funktionelle HPMA-Copolymere zur möglichen Anwendung in der Tumor-Immuntherapie

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

im Promotionsfach Chemie am Fachbereich
Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Johannes Gutenberg-
Universität Mainz

vorgelegt von

Kristof G. Tappertzhofen

geboren in Wiesbaden

Mainz im August 2014

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2014

Dekan: [REDACTED]

1. Berichterstatter: [REDACTED]

2. Berichterstatter: [REDACTED]

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2010 bis August 2014 am Institut für Organische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz unter der Betreuung von [REDACTED] angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese oder eine ähnliche Arbeit hat noch keiner anderen Stelle zur Prüfung vorgelegen und ist an den aufgeführten Stellen auszugsweise veröffentlicht worden.

Mainz, August 2014.

Kristof Tappertzhofen

Für meine Familie

Zusammenfassung

Der Fokus dieser Arbeit lag in der Synthese von funktionellen HPMA-Copolymeren, sowohl für die Darstellung definierter Polymer-Antikörper Konjugate, als auch zum effizienten Transport von p-DNA in Polymer-DNA Komplexen (Polyplexe). Nach ausführlicher physikalischer und chemischer Charakterisierung wurden gezielt ihre Wechselwirkungen mit (Immun)-Zellen untersucht und so ihr Potential für die Verwendung in der Tumor-Immuntherapie aufgezeigt.

Für das gezielte Ansprechen von bestimmten Immunzellen mit Schlüsselfunktionen besitzen monoklonale Antikörper ein großes Potential. Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Darstellung definierter Polymer-Antikörper Konjugate über das gezielte Einführen von Thiol-Gruppen an Antikörper und die Synthese eng verteilter, Maleinimid funktionalisierter HPMA-Copolymere. Diese sehr gut definierten, funktionellen HPMA-Copolymere konnten über die Kombination der RAFT-Polymerisation und Reaktivester Polymeren gewonnen werden. Unterschiedliche Polymerstrukturen ermöglichten die Synthese verschiedener Arten von Polymer-Antikörper Konjugaten. Speziell die Untersuchung der verschiedenen Konjugate aus dem für dendritische Zellen spezifischen aDEC-205 Antikörper an Immunzellen aus dem Knochenmark von Mäusen lieferten wertvolle Erkenntnisse über Struktur-Wirkungsbeziehungen und zeigten die Möglichkeit der gezielten Adressierung von Immunzellen mit Schlüsselfunktionen bei der Aktivierung einer (Tumor)-Immunabwehr am Beispiel von dendritischen Zellen. Gleichzeitig erlaubt der Syntheseweg sowohl die gleichzeitige und kontrollierte Einführung auch komplexerer Stimuli am Polymerrückgrat als auch die Verwendung verschiedener Antikörper.

Über die Kombination der RAFT-Polymerisation und polymeren Reaktivestern wurde ebenso die Synthese von neuartigen kationisch-hydrophilen Polylysin-*b*-poly(HPMA) Blockcopolymeren als effiziente Transporter für den komplexen aber wirkungsvollen Wirkstoff p-DNA in Form von Polymer-DNA Komplexen (Polyplexe) realisiert. Da diese Polyplexe gleichzeitig eine Abschirmung der sensitiven p-DNA über eine poly(HPMA)-Korona vermitteln, stellen sie allgemein ein geeignetes Transportmittel für einen therapeutischen Transport von p-DNA dar. Diese Polyplexe sind in der Lage, humane Nierenkarzinomzellen (HEK-293T Zelllinie) zu transfizieren ohne signifikante Zytotoxizität zu zeigen. Darüber hinaus gelang eine große Steigerung der Transfektionseffizienz, ohne eine gleichzeitige Erhöhung der Zytotoxizität, durch die

gezielte Einführung von Redox-stimuliresponsiven Disulfid-Gruppen zwischen den einzelnen Blöcken. Diese Polyplexe stellen einen polymeren Vektor zur transkriptionellen Regulierung von Zellen dar, zum Beispiel für die transkriptionelle Aktivierung von dendritischen Zellen, durch die Verwendung speziell dafür modifizierter p-DNA-Konstrukte.

Durch die Verknüpfung einer ortsspezifischen enzymatischen Kopplung und kupferfreien Cyclooctin-Azid Kupplung gelang die kontrollierte und kovalente Modifizierung von polymeren Mizellen mit aDEC-205 Antikörpern an der hydrophilen poly(HPMA)-Korona. Diese Methode bietet die Möglichkeit der Anbindung der effektiven aber anspruchsvollen Erkennungsstruktur Antikörper an komplexere Polymerstrukturen und andere nanopartikulären Systeme, zum Beispiel an die zuvor genannten Polyplexe, um eine zellspezifische und verbesserte Aufnahme und Prozessierung zu erreichen.

Diese Studien zeigen somit, sowohl die Möglichkeit der selektiven Addressierung von Immunzellen mit Schlüsselfunktionen wie dendritischer Zellen, als auch die Möglichkeit der transkriptionellen Regulation von Zellen durch Polyplexe. Sie stellen somit einen ersten Schritt zur Herstellung funktioneller, nanopartikulärer Systeme zur Verwendung in der Tumor-Immuntherapie dar.

Abstract

The aim of this thesis was to synthesize functional HPMA-Copolymers for the preparation of defined polymer-antibody conjugates as well as transporters for p-DNA delivery. Their potential for their use in the field of Tumor-Immunotherapy through controlled interaction with (immune)-cells after detailed chemically and physical characterization should be demonstrated.

Monoclonal antibodies offer great potential to address certain Immune Cells with key-roles in the activation of an immune response selectively. Thus this work shows the synthesis of well defined polymer-antibody-conjugates through the introduction of thiol groups to antibodies and synthesis of maleimide-functionalized HPMA-copolymers. These well-defined, maleimide functionalized HPMA-Copolymers could be obtained by the combination of RAFT-Polymerization and active ester polymers. Different polymeric structures enable thereby the synthesis of variable polymer-antibody conjugates. Especially the use of different types of conjugates with the dendritic cell specific antibody aDEC-205 on murine bone marrow derived dendritic cells reveals structure-activity relationships and illustrates the possibility of selective targeting of immune cells with key-functions such as dendritic cells. Furthermore the synthetic protocol allows for the parallel attachment of complex stimuli as well as replaceability of the used antibody for targeting of other immune cells.

Additionally the combination of RAFT-Polymerization and active ester polymers enable the synthesis of novel cationic-hydrophilic Polylysine-b-poly[HPMA] block copolymers as efficient carriers of the complex drug p-DNA by forming polymer-p-DNA complexes (Polyplexes). These polyplexes provoke a shielding of p-DNA through the HPMA-corona and thus offer a potential for a therapeutic transport of p-DNA. The polyplexes were able to transfect human cancer cells (HEK-293T cells) without showing significant toxicity. Furthermore a highly increased transfection efficiency, without increased cytotoxicity, was achieved by introduction a redox-stimuli responsive disulfide-bond between the polymer blocks. Thus these polyplexes represent a promising polymeric vector for the transcriptional regulation of cells, for example of dendritic cells by using available p-DNA especially designed for the activation of dendritic cells.

Moreover the controlled and covalent modification of polymeric micelles with monoclonal antibodies through the combination of strain-promoted, copper free azide-alkyne coupling

and “site-specific” enzymatic reactions was achieved. This method allows the attachment of antibodies as targeting moiety to more complex polymeric structures and even other nanoparticles such as the aforementioned polyplexes to achieve cell specific and improved uptake and processing.

These studies reveal the potential of selective addressing of immune cells with key roles such as dendritic cells as well as the possibility of transcriptional regulation of cells by polyplexes and thus are first steps for the development of functional nanoparticles for the use in Tumor-Immunotherapy.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Polymere Therapeutika und Tumor-Immuntherapie	1
1.2	Biokompatible synthetische Polymere	3
1.3	Polymer-Antikörper Konjugate.....	5
1.3.1	Monoklonale Antikörper	5
1.3.2	Polymer-Protein Konjugate	6
1.3.3	Synthese von Polymer-Antikörper Konjugaten.....	7
1.4	Polymer-DNA Komplexe (Polyplexe).....	12
1.4.1	Transport von plasmidischer DNA	12
1.4.2	Polymere zum Transport von p-DNA.....	13
2	Theoretischer Teil/ Methoden:.....	20
2.1	Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer-Polymerisation (RAFT-Polymerisation).....	20
2.2	Dendritische Zellen.....	22
2.3	Antikörper	24
2.4	Gelpermeationschromatographie (GPC) ^[139]	27
2.5	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie ^[141]	29
2.6	Druckflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting) ^[142]	31
2.7	Konfokale Mikroskopie ^[143]	33
3	Problemstellung und Zielsetzung.....	35
4	Ergebnisse und Diskussion	37
4.1	Polymer-Antikörper Konjugate.....	37
4.1.1	Synthese, Charakterisierung und zellbiologische Evaluierung von Polymer-Antikörper Konjugaten mit statistisch-Maleinimid modifizierten HPMA-Copolymeren	37
4.1.2	Synthese, Charakterisierung und zellbiologische Evaluierung von Polymer-Antikörper Konjugaten mit semitelechel-Maleinimid-modifizierten HPMA Copolymeren („Star-like“ Konjugate) ..	51

4.2	Kationische-hydrophile Blockcopolymere als polymere Transfektionsvektoren über Polyplexbildung mit p-DNA	70
4.2.1	Synthese und Charakterisierung von poly[Lysin]-b-poly[HPMA] als kationische-hydrophile Blockcopolymere zur Polyplexbildung	70
4.2.2	Zellbiologische Evaluierung der Polyplexe aus p-DNA und Poly[Lysin]-b-poly[HPMA] Blockcopolymeren	84
4.2.3	Synthese und Charakterisierung von Poly[Lysin]-b-poly[HPMA] Blockcopolymeren mit reduktiv spaltbarem Disulfid	96
4.2.4	Zellbiologische Evaluierung der Polyplexe aus p-DNA und Poly[Lysin]-b-poly[HPMA] Blockcopolymeren mit reduktiv spaltbarem Disulfid.....	105
4.3	Optimierung der Synthese der Polymer-Antikörper Konjugate und Anwendung auf komplexere polymere Strukturen	112
4.3.1	Gezielte enzymatische Modifizierung von Antikörpern mit Cyclooctinen für Azid-Alkin Kopplungen	112
4.3.2	Ligation von enzymatisch-Cyclooctin modifizierten Antikörpern an Azid-funktionalisierte polymere Mizellen.....	119
5	Schlussfolgerung und Ausblick	129
6	Experimenteller Teil	132
6.1	Verwendete Geräte und Materialien	132
6.2	Synthetischer Teil	137
6.2.1	Synthese der niedermolekularen Substanzen und Ketten-transferreagenzien	137
6.2.2	Synthese der Polymere	159
6.2.3	Synthese der Polymer-Antikörper Konjugate	180
6.3	Zellbiologische Evaluierungen	184
6.3.1	Zellbiologische Evaluierung der Stat.-aRAGE/huIgG Polymer-Antikörper Konjugate.	184
6.3.2	Zellbiologische Evaluierung der End-aDEC-205/IgG2a bzw. Stat.-aDEC-205/IgG2a Polymer-Antikörper Konjugate.....	186
6.3.3	Zellbiologische Evaluierung der Polymer-p-DNA Komplexe (Polyplexe).....	188
7	Anhang	200
7.1	Abbildungsverzeichnis	200
7.2	Tabellenverzeichnis	209

7.3	Abkürzungsverzeichnis	210
8	Literaturverzeichnis	214
9	Danksagung.....	224
10	Publikationen	226

1 Einleitung

1.1 Polymere Therapeutika und Tumor-Immuntherapie

Krebs ist immer noch eine der häufigsten Todesursachen in den Industrieländern. Neben operativer Entfernung oder lokaler Bestrahlung ist die Gabe von Zytostatika nach wie vor die wichtigste Therapiemethode. Die hierbei verwendeten Substanzen haben sich in den letzten Jahrzehnten kaum verändert und zeigen erhebliche Nebenwirkungen. Gerade hier ist eine Optimierung der Körperverteilung sehr wünschenswert um die unerwünschten Nebenwirkungen zu reduzieren. „Drug delivery“ ist schon seit 50 Jahren ein wachsendes Gebiet im Bereich der Polymerchemie. Es beschreibt den Ansatz, die Wirksamkeit von Medikamenten, die meist niedermolekular sind, zu erhöhen und gleichzeitig ihre unerwünschten Nebenwirkungen zu reduzieren. Denn in den meisten Fällen erreicht nur ein sehr kleiner Teil den erwünschten Zielort und der größte Teil wirkt an unerwünschten Orten und wird ausgeschieden oder metabolisiert. Gründe sind hierbei unter anderem geringe Wasserlöslichkeit und/oder schlechtes Eindringen der Wirkstoffe in das Gewebe.^[1]

„Nanomedizin“^[2, 3] und „Polymere Therapeutika“^[4-6] im engeren Sinne erforschen schon seit längerem die Verwendung von polymeren Nanopartikeln in der Tumorthherapie und Tumordiagnostik. Sie bieten die Möglichkeit, die Pharmakokinetik von niedermolekularen Wirkstoffen (Zytostatika) zu verbessern, indem sie die Verweilzeit im Körper durch verminderte renale Ausscheidung bewirken. Tumore und Entzündungen zeichnen sich unter anderem durch krankhaft verändertes Gewebe aus. Die Blutgefäße sind an diesen Stellen löchrig und undicht und der Abtransport über die Lymphgefäße ist gestört. Aufgrund der Größe von Polymeren Therapeutika führt dies zur Anreicherung im krankhaften Gewebe (engl.: *Enhanced Permeability and Retention Effect* (EPR-Effekt)).^[7] Neben dieser passiven Anreicherung besteht zudem die Möglichkeit, unter stark optimierten Bedingungen, gezielt bestimmte Zellen oder ein bestimmtes Gewebe anzusprechen. Das ursprüngliche Konzept wurde schon 1975 von H. Ringsdorf vorgestellt (Abbildung 1.1).

Dabei ist der Wirkstoff über einen spaltbaren Linker gebunden und eine polare Gruppe vermittelt Löslichkeit im biologischen (wässrigen) Milieu. Zusätzlich können Erkennungsstrukturen Nebenwirkungen durch eine gezieltere Anreicherung vermindern.

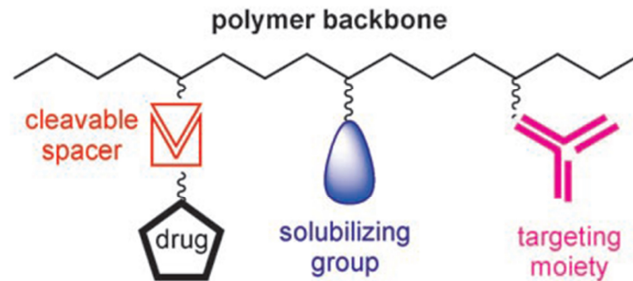


Abbildung 1.1: Konzept für Polymere Therapeutika^[6]

In den letzten 40 Jahren sind Polymere Therapeutika zu einem stark wachsenden Gebiet innerhalb der Polymerwissenschaften geworden. Abbildung 1.2 zeigt schematisch die verschiedenen Arten von Polymere Therapeutika. Dazu gehören Polymere mit intrinsischer Aktivität, Polymer-Protein Konjugate, Polymer-DNA Komplexe (Polyplexe), Polymer-Wirkstoff Konjugate und polymere Mizellen. Die Fortschritte in den verschiedenen Teilgebieten wie Molekularbiologie, Medizin, Physik und vor allem in der Polymerchemie haben zu einer stetigen Verbesserung geführt und eine Vielzahl neuer Möglichkeiten eröffnet.^[8]

Interessanter Weise wird oftmals eine Verbesserung der Körperverteilung, meistens durch den „EPR-Effekt“, erreicht. Allerdings ist es nur in sehr wenigen Fällen gelungen, eine darauf aufbauende Therapie zu entwickeln.^[9, 10] Gründe dafür sind unter anderem, dass der Tumor gut vaskularisiert sein muss.^[11] Zudem muss das Tumorendothel permeabel sein, um überhaupt eine passive oder auch aktive Anreicherung zu ermöglichen.^[12]

In jüngerer Vergangenheit hat sich ein ganz anderer Ansatz zur Tumorthherapie entwickelt, die „Immuno-Tumorthherapie“ oder „Tumor-Immuntherapie“. Ziel dabei ist es, dass körpereigene Immunsystem auszunutzen, um maligne Zellen zu bekämpfen. Dabei nutzt man die Stärke und Selektivität des Immunsystems aus, um maligne Zellen zur erkennen und zu eliminieren.^[13] Dieser Ansatz zeichnet sich dadurch aus, dass minimale Resterkrankungen (Metastasen) erreicht werden können und, im Idealfall, ein körpereigener Schutz aufgebaut werden kann.^[14]

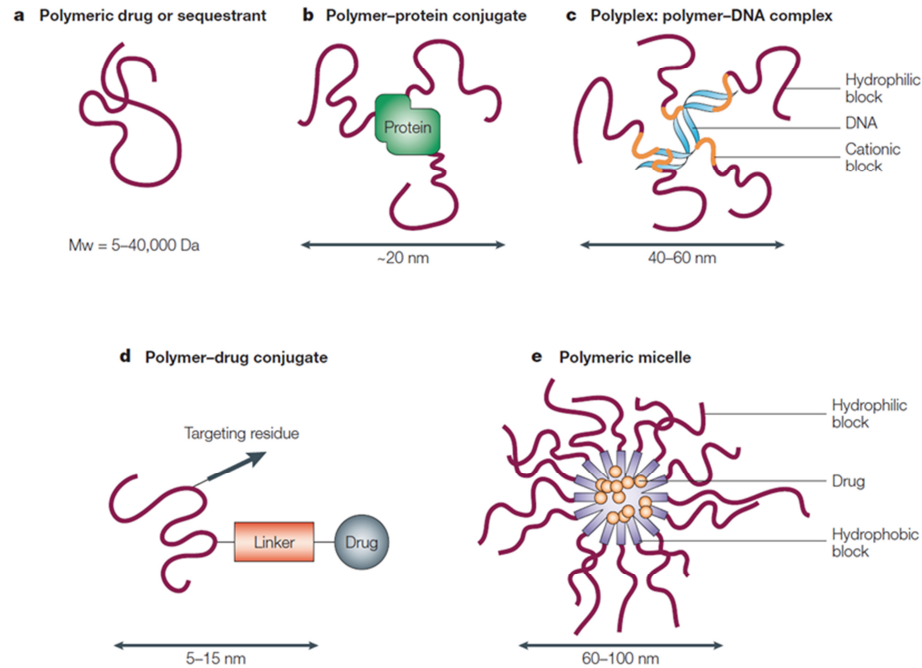


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung verschiedener Polymeren Therapeutika^[5]

In den letzten 30 Jahren konnte das Konzept verbessert und darüber hinaus gezeigt werden, dass das Immunsystem prinzipiell in der Lage ist gegen den Tumor vorzugehen.^[15] Dabei konnten viele Tumorantigene identifiziert und ihr Potenzial gezeigt werden.^[16]

Immer noch problematisch ist die geringe Effektivität dieser Methode, die sich aus folgenden Gründen ergibt: Tumorantigene sind nur schwach wirksam auf das Immunsystem, zudem gehen sie aufgrund der hohen Mutationsrate verloren (*Immunoediting*).^[17] Zusätzlich gehen vom Tumorgewebe inhibitorische Signale aus, die eine immunologische Reaktion unterbinden (*Immunosurveillance*).^[14] Nicht zuletzt fehlen entscheidende Entzündungssignale im Tumor.^[18] Für eine erfolgreiche Therapie müssten daher verschiedene Zelltypen des Immunsystems selektiv angesprochen und jeweils mit mehreren spezifischen Stimuli beladen werden.

1.2 Biokompatible synthetische Polymere

Polymere für therapeutische Anwendungen müssen unter anderem wasserlöslich, biokompatibel und nicht immunogen zu sein. Sehr wichtig ist es, eine gute Kontrolle über

Architektur, Größe, Ladung und Ladungsverteilung der Polymere zu haben, was nur mit gut definierten Polymeren möglich ist. Aus diesem Grund gewinnen synthetische Polymere immer mehr an Bedeutung, da aufgrund großer Fortschritte in der Polymersynthese die Herstellung verschiedener gut definierter Polymere, die für therapeutische Anwendungen geeignet sind, möglich ist.^[19] Das wohl prominenteste Beispiel ist Poly(Ethylenglycol) (PEG). Es wird im industriellen Maßstab hergestellt und ist klinisch zugelassen. PEGylierte Proteine sind bereits auf dem Markt^[20] und PEG-basierte Mizellen befinden sich in der klinischen Forschung. Darüber hinaus wird es immer weiter verbessert, so zum Beispiel in Form und Funktionalität.^[21, 22] Gleichwohl wurden in den letzten Jahren einige Probleme von PEG-basierten Systemen aufgedeckt. Sie können ungewollte Effekte auf das Immunsystem haben, zum Beispiel eine Aktivierung des Komplementsystems.^[23] Zudem werden PEGylierte Liposomen sehr schnell renal eliminiert.^[24] Nicht zuletzt kann PEG als Poly(Ether) im Körper peroxidiert werden und so in seiner Funktion stark beeinflusst werden.^[25, 26] Nicht nur aus diesem Grund rücken andere synthetische Polymere für biomedizinische Anwendungen, die synthetisch relativ leicht zugänglich sind, in den Fokus der Polymerchemie. Als Beispiel hierfür seien Poly(peptide), vor allem Poly(Glutaminsäure), Poly(Oxazoline) und Poly(*N*-(2-Hydroxy)methacrylamid) (Poly-[HPMA]) genannt. Gerade Poly(HPMA), welches mit PEG eines der ersten Polymere als Plattform für „Polymere Therapeutika“ schon länger in klinischer Testung ist, scheint geeignet für die Tumor-Immuntherapie zu sein, da Poly(HPMA) für seine geringe Immunogenität bekannt ist.^[27-29]

Verschiedene Formen von Polymeren Therapeutika (Abbildung 1.2) sind geeignete Träger, um die benötigten Stimuli in der Tumor-Immuntherapie zielgerichtet zu transportieren. Denn dafür müssen gleichzeitig mehrere Stimuli sicher und parallel an ganz bestimmte Zelltypen adressiert werden. Aus diesem Grund sollen nun zwei Sorten genauer betrachtet werden.

1. Polymer-Protein Konjugate, oder genauer Polymer-Antikörper Konjugate bieten dabei eine sehr gute Möglichkeit, gezielt bestimmte Zelltypen des Immunsystems zu adressieren bzw. gleichzeitig ein oder mehrere cargo (stimuli) zu transportieren.
2. Polymer-DNA Komplexe (Polyplexe) bieten die Möglichkeit, p-DNA als empfindlichen aber wirkungsvollen Wirkstoff einzukapseln und in Zellen zu

transportieren. Der erfolgreiche Transport von p-DNA in bestimmte Immunzellen würde ihre selektive Regulation ermöglichen.

1.3 Polymer-Antikörper Konjugate

1.3.1 Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper binden spezifisch an bestimmte Rezeptoren der Zelloberfläche, zum Beispiel an Tumorantigene. Durch große Fortschritte in der Molekularbiologie können heutzutage gegen Zielrezeptoren unterschiedlichster Art humanisierte Antikörper im Labor generiert werden. Das hat dazu geführt, dass Antikörper, neben zahlreichen anderen Anwendungen (unter anderem Autoimmunerkrankungen), auch für die Tumorthherapie klinisch zugelassen sind.^[30] Sie wirken größtenteils dadurch, dass sie direkt maligne Zellen abtöten oder deren Wachstum inhibieren. Als Beispiel hierfür sei Trastuzumab (Herzeptin®) genannt.^[31] Dieser monoklonale Antikörper ist von der FDA für die Behandlung von Brustkrebs zugelassen. Über Bindung an den humanen epidermalen Wachstumsfaktor (HEGF) blockiert er die Signalwege für Zellproliferation und hemmt somit das Wachstum der Tumorzellen.^[32] Als logische Konsequenz ist zudem die Verwendung von Antikörper-Konjugaten sehr vielversprechend, so zum Beispiel die direkte Anbindung von Zytostatika an zugelassene therapeutische Antikörper zum gezielten Abtöten von Tumorzellen. Aus diesem Grund sind auch Antikörper-Wirkstoff(Zytostatikum) Konjugate untersucht und teilweise zugelassen.^[32]

Sehr interessant hierbei ist, dass neuerdings auch monoklonale Antikörper erforscht sind, die zwar zur Krebstherapie dienen, allerdings direkt in Signalwege des Immunsystems eingreifen. Als Beispiel hierfür sei Ipilimumab (Yervoy®) genannt.^[33] Dieser wird zur Therapie beim Melanom verwendet, bindet an den CTLA-4 Rezeptor von cytotoxischen T-Zellen und hebt so die Inhibierung der Immunsystems durch den Tumor teilweise auf, aktiviert es also indirekt. Dies zeigt sehr eindrucksvoll, dass die Ausnutzung des Immunsystems zur Tumorthherapie sehr vielversprechend ist.^[34]

1.3.2 Polymer-Protein Konjugate

Protein-Polymer Konjugate sind im Allgemeinen sehr interessant, da sie durch die Anbindung von biokompatiblen Polymeren einige Vorteile besitzen: Sie werden zum einen *maskiert*, was zur Reduktion von unerwünschten Nebeneffekten führt. Zum anderen wird die renale Ausscheidung erniedrigt, was zu verlängerten Verweilzeiten führt. Viele *Pegylierte*, therapeutische Proteine sind daher schon zugelassen.^[35, 36] Gleiches trifft natürlich für Antikörper zu. *PEGylierung* führt zur Erhöhung der Halbwertszeit und Verringerung der Immunogenizität.^[36]

Poly(HPMA) besitzt gegenüber PEG den großen Vorteil, dass neben der α - ω -Funktionalisierung auch Funktionalitäten entlang der Polymerrückgrades eingefügt werden können. Auf diese Weise können eine Vielzahl funktioneller Einheiten über das Polymer an das Protein gebunden werden, ohne dieses zu sehr zu überladen. Daher sind HPMA-Copolymere auch ein sehr wichtiger und häufiger Vertreter von Polymeren Therapeutika. Zudem wurde es auch schon erfolgreich für die Synthese von Polymer-Antikörper Konjugaten verwendet.^[37, 38] Letztere werden zudem eingesetzt, um gezielt bestimmte Zelltypen abzutöten, durch die parallele Anbindung von Zytostatika.

Eine ganz andere Herausforderung ist das gezielte Ansprechen von Immunzellen, ein essentieller Schritt bei der Immuno-Tumortherapie. Denn hier dürfen die entsprechenden Zellen nicht getötet, sondern müssen vielmehr richtig beeinflusst werden. Ein sehr interessanter Ansatz ist die Verwendung von monoklonalen Antikörpern, die gegen Schlüsselzellen des Immunsystems gerichtet sind. Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) spielen eine zentrale Rolle bei der Inhibierung einer Immunabwehr gegen den Tumor. a-CD25 Daclizumab (Zenapax®) bindet an Oberflächenrezeptoren von regulatorischen T-Zellen (CD-25) und macht so ein gezieltes Ansprechen und damit eine Beeinflussung von diesen möglich^[39], was potentiell genutzt werden kann, um eine Inhibierung aufzuheben. Dendritische Zellen (DC`s) sind andererseits die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen und spielen die zentrale Rolle bei einer gezielten Aktivierung des Immunsystems.^[40] Der Oberflächenrezeptor DEC-205 ist fast ausschließlich auf dendritische Zellen, genauer $CD8^+$ Zellen, zu finden. Unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers aDEC-205 ist es daher möglich gezielt dendritische Zellen zu adressieren und zu beeinflussen.^[41-44]

Diese beiden Beispiele machen deutlich, dass unter Verwendung geeigneter Antikörper das Adressieren von Zellen mit Schlüsselfunktionen im Immunsystem möglich ist und ihre Verwendung als Polymer-Antikörper Konjugate, um gezielt Stimuli zu transportieren, daher sehr vielversprechend ist.

1.3.3 Synthese von Polymer-Antikörper Konjugaten

Zur allgemeinen Synthese von Protein-Polymer Konjugaten existieren verschieden Methoden (Abbildung 1.3). Das Polymer kann von dem Protein „wegpolymerisiert“ werden (engl.: *grafting from*) oder das Protein selbst kann als „Monomer“ dienen (engl.: *grafting through*). Zudem kann das Polymer nach der Polymerisation mit funktionellen Gruppen ausgestattet und als letzten Schritt an das Protein gebunden werden (engl.: *grafting to*). Letztere Methode bietet die wohl größte mögliche Kontrolle über die Polymerisation. Zusätzlich ist sie am besten für besonders große Proteine wie Antikörper geeignet.

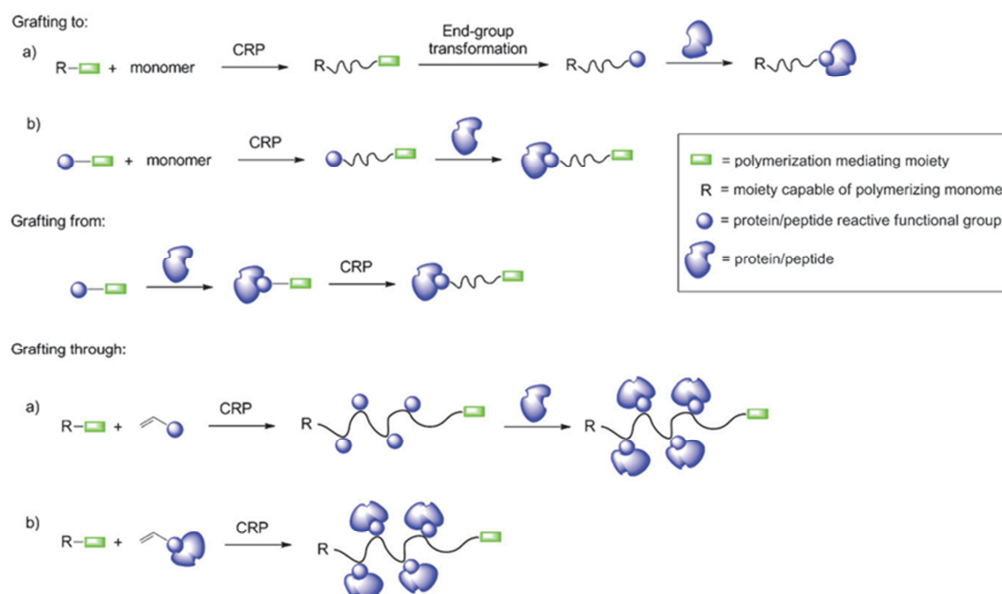


Abbildung 1.3: Allgemeine Konzepte zur Synthese von Polymer-Protein Konjugaten: „Grafting to“, „Grafting from“, „Grafting through“^[45]

Der Fokus sei im Folgenden auf die Synthese von Poly(HPMA)-Antikörper Konjugaten gelegt. Generell existieren zahlreiche Ligationsmethoden, die für die Biokonjugation geeignet sind.^[46] Der wohl direkteste Ansatz ist Anbindung von Polymeren mit

aktivierten Carbonsäuregruppen an primäre Amine von Antikörpern (Abbildung 1.4A.). Antikörper verfügen über ca. 70 Aminogruppen durch Lysin-Seitenketten, die für die Anbindung genutzt werden können. Etwas definierter ist die Anbindung von Polymeren an Zuckerreste des Antikörpers, da hier der Ort der Anbindung vorgegeben ist und somit keine Möglichkeit besteht die Bindungsstellen des Antikörpers zu blockieren. Letztere können gezielt zu Aldehyden oxidiert werden und mit Hydrazin-Gruppen am Antikörper Hydrason-Bindungen ausbilden (Abbildung 1.4B.). Des Weiteren besteht die Möglichkeit, freie Thiol-Gruppen (zum Beispiel an Fab-Fragmenten von Antikörpern) an Maleinimid-Gruppen am Polymer anzubinden (Abbildung 1.4C).^[47]

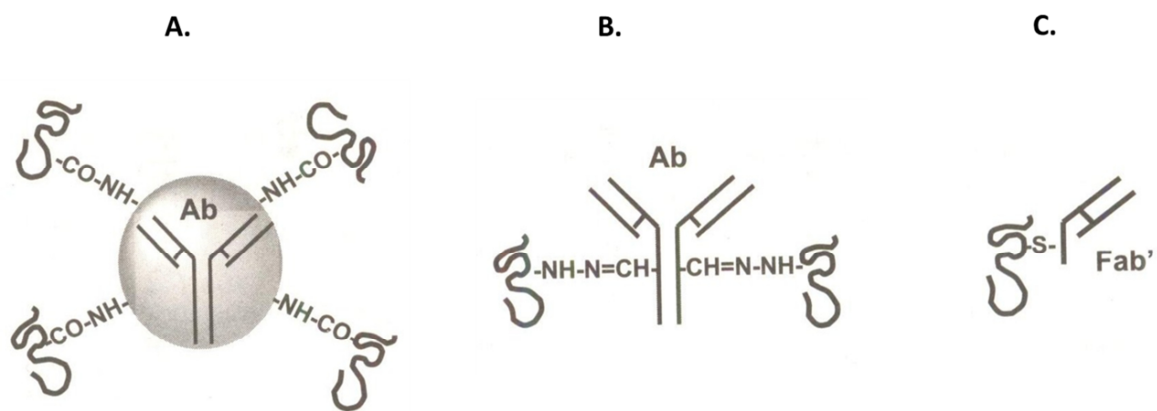


Abbildung 1.4: Verschieden Möglichkeiten zur kovalenten Anbindung von Polymere an Antikörper. A.: Aminolyse von Aktivestergruppen am Polymer mit Aminogruppen auf dem Antikörper. B.: Hydrasonbindung zwischen oxidierten Zuckerresten (Aldehyden) auf dem Antikörper und Hydrazin-Gruppen am Polymer. C.: Thioetherbindung zwischen Thiolgruppen (zum Beispiel Fab-Fragment) und Maleinimid Gruppen am Polymer.^[47]

Neben den oben genannten Vorteilen von Polymer-Antikörper Konjugaten, die Erhöhung der Halbwertszeit und Verringerung der Immunogenität, besteht natürlich die Möglichkeit, die Bindungsaffinität durch sterische Abschirmung durch die Polymerketten herabzusetzen. Zu einem gewissen Teil ist dies natürlich unumgänglich. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Affinität zwar herabgesetzt wird, sie aber immer noch sehr hoch ist, da die natürlichen Bindungskonstanten in der Regel sehr hoch sind (Abbildung 1.5).

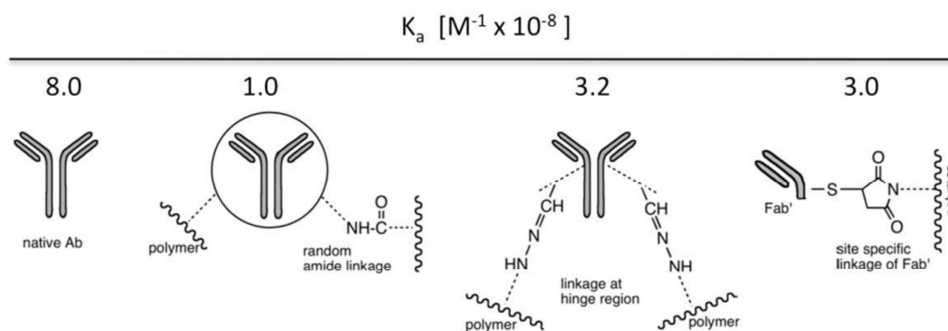


Abbildung 1.5: Änderung der Bindungskonstanten in Abhängigkeit der Konjugationsmethode^[37]

Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Beschaffenheit der Konjugate. Allgemein sehr wichtig für Polymere in biomedizinischen Anwendungen, und Polymere Therapie, ist die Kontrolle über das Molekulargewicht und vor allem über die Dispersität. Definierte Konjugate zu erhalten und darüber hinaus das Molekulargewicht und die Größe zu limitieren, ist besonders für Polymer-Antikörper Konjugate eine große Herausforderung.

Daher ist es zum einen wichtig, die Anzahl der angebunden Polymerketten zu limitieren. Im Allgemeinen ist die bioorthogonale Ligation wünschenswert. Dabei werden Reaktionstypen mit funktionellen Gruppen ausgewählt, welche in der Natur nicht vorkommen. Wie schon erwähnt ist die Anbindung von Polymeren über einen Thioether möglich. Die Reaktion von Maleinimide (am Polymer) mit Thiolen (am Antikörper) ist gut dafür geeignet, da sie relativ schnell bei physiologischen Bedingungen (37 °C, PBS Puffer, pH 7.4) durchgeführt werden kann. Thiol-Gruppen müssen am Antikörper aber erst erzeugt werden, da sie in natürlicher Form nur Disulfidbrücken enthalten. Dies kann zum einen durch Reduktion der natürlich vorkommenden Disulfidbrücken unter milden Bedingungen geschehen. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung des Traut's Reagenzes 2-Iminoethanol^[48, 49], welches ϵ -Amino-Gruppen von Lysin-Seitenketten unter schwach basischen Bedingungen (pH 8) in Thiol-Gruppen überführt. Bei beiden Methoden wird so nur eine begrenzte Anzahl an Thiol-Gruppen eingeführt und somit die Anzahl von Polymerketten, die gebunden werden können, limitiert. Auf diese Weise kann das Molekulargewicht und die Dispersität der Konjugate in gewissen Grenzen kontrolliert werden.^[50]

Ein weiterer sehr wichtiger Faktor ist die Polymersynthese. Bei der Synthese der Polymere muss das Molekulargewicht gut kontrollierbar, die Dispersität gering und die

gezielte Einführung von funktionellen Gruppen möglich sein. Denn nur mit gut definierten Polymeren können gut definierte Konjugate erhalten werden. Durch die Entwicklung neuer Methoden für kontrollierte Polymerisationen und vor allem kontrollierte radikalische Polymerisations-Techniken (NMP, ATRP, RAFT) ist in den letzten zwei Jahrzehnten die Synthese von gut definierten Poly(Acrylaten) und Poly(Methacrylaten) ermöglicht worden.^[19] Dies hat zu großen Fortschritten in der Synthese von Polymer-Protein Konjugaten geführt.^[45, 51-53] Vor allem aber hat es entschieden zur Verbesserung der Synthese biokompatibler Polymere in der Forschung beigetragen. So ist auch die Synthese von Poly(HPMA) über ATRP^[54] und RAFT^[55] beschrieben und macht auf diese Weise die Synthese eng verteilter HPMA-Polymere mit einstellbarem Molekulargewicht zugänglich. Darüber hinaus ist auch die kontrollierte Polymerisation von Aktivester-Monomeren möglich. Sie liefern gut definierte Vorläufer-Polymere mit reaktiven Wiederholungs-einheiten, die polymeranalog (engl.: Post-polymerisation Modification^[56]) unter Einhaltung der Polymerstruktur mit verschiedensten funktionellen Gruppen modifiziert werden können.^[57] So ist die Synthese von Poly-(Penta-fluorophenylmethacrylat) (Poly(PFMA)) über den RAFT-Prozess möglich.^[58] Es lässt sich polymeranalog mit 2-Hydroxypropylamin unter milden Bedingungen selektiv zu Poly-(HPMA) umsetzen.^[56, 59] Auf diese Weise können definierte HPMA-Copolymere dargestellt werden und gleichzeitig eine Vielzahl, auch komplexer, funktioneller Gruppen eingebaut werden.^[60-62]

Unter Verwendung von kontrollierten radikalischen Polymerisationstechniken lassen sich die entsprechenden Polymere auch selektiv an den Polymer-Endgruppen modifizieren. Da so nur eine Bindungsstelle pro Polymerkette existiert, lässt sich die Bildung von Aggregaten, auch wenn das Protein über vielen Anbindungsstellen verfügt, verhindern. Darüber hinaus ist eine Limitierung der Bindungsstellen auf Seite der Proteine sehr erstrebenswert, da sich so noch definiertere Konjugate darstellen lassen und die Anzahl an gebunden Polymerketten kontrollieren lässt. Für kleinere Proteine ist dies relativ einfach, da sie zum Teil in nativer Form nur eine Anbindungsstelle besitzen (zum Beispiel Thiol von Cystein-Rest) und die Anbindung von selektiven Endgruppen modifizierten Polymeren an solche ist beschrieben.^[63-66] Im Falle von Antikörpern ist, besonders aufgrund ihrer Größe (ca. 150.000 g/mol), die Limitierung der Bindungsstellen weitaus schwieriger. Eine Möglichkeit besteht darin, schon in der molekularbiologischen Herstellung des Antikörpers gezielt bioorthogonale Gruppen einzuführen, die im

Nachhinein zur gezielten Anbindung von Wirkstoffen oder (Bio)Polymeren genutzt werden können.^[67, 68] Dies setzt allerdings Zugang zu solch komplexen molekularbiologischen Methoden voraus. Eine weitere sehr interessante Möglichkeit ist die Verwendung des Enzyms Transglutaminase. Es katalysiert die Reaktion zwischen dem Glutamin-Rest am Protein/Antikörper und einem Lysinrest vom Wirkstoff/(Bio)Polymer und erzeugt eine stabile Amidbindung (Abbildung 1.6). Ganz entscheidend ist hierbei, dass das Enzym sehr selektiv gegenüber dem Glutamin-Rest am Antikörper ist (aufgrund von sterischer Hinderung) aber sehr tolerant gegenüber dem Lysin-Rest (auch einfache Penta-Amino Derivate werden akzeptiert). Diese Methoden wurden schon erfolgreich für die gezielte „PEGylierung“ von Proteinen genutzt.^[69, 70]

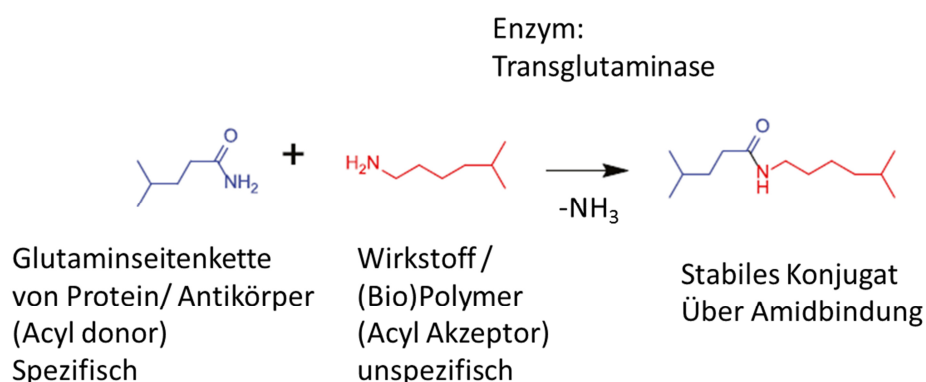


Abbildung 1.6: Ausbildung der Amidbindung zwischen Glutamin- und Lysin-Seitenkette katalysiert durch das Enzym Transglutaminase (mod. aus^[71])

Dieser Syntheseansatz eignet sich auch sehr gut für Antikörper. Denn hier wird aufgrund von sterischer Hinderung durch das Enzym nur ein ganz bestimmter Glutamin-Rest in der „loop“-Region des Antikörpers angesprochen. Es konnte gezeigt werden, dass nach vorheriger Deglykosylierung (Entfernung der Zuckerreste), verschiedene Liganden angebunden wurden und vor allem dass immer genau zwei Liganden je Antikörper gebunden werden, die Anbindung somit ortsspezifisch ist und die Anzahl sich genau steuern lässt. Zudem ist dies für verschiedene Antikörpertypen möglich und benötigt keine Modifikation am nativen Antikörper und es können kommerziell erhältliche Antikörper verwendet werden.^[72] Aus diesem Grund ist es eine sehr vielversprechende Methode für die Anbindung von Polymeren, um sehr definierte Konjugate zu erhalten.

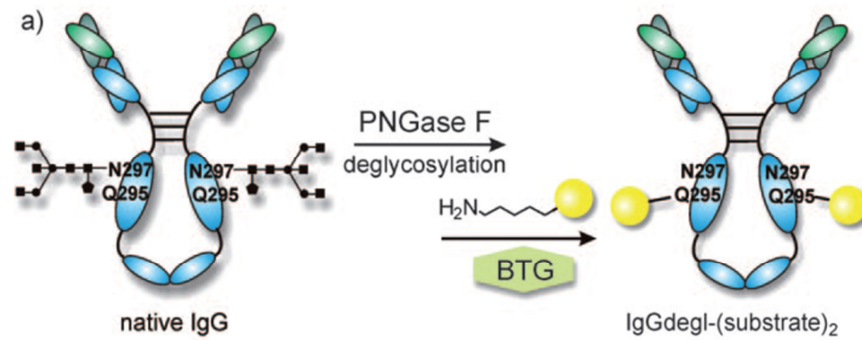


Abbildung 1.7: Selektive Anbindung von Substraten an Antikörper unter Verwendung des Enzyms Transglutaminase^[72]

1.4 Polymer-DNA Komplexe (Polyplexe)

1.4.1 Transport von plasmidischer DNA

Mit Abschluss des humanen Genom Projekts^[73] existiert die Möglichkeit, das Erbgut exakt zu entschlüsseln. Dies hat maßgeblich zum Verständnis unter anderem von Ursachen für Krankheiten beigetragen. Kleinste Veränderungen (Mutationen) im Erbgut an der falschen Stelle können dazu führen, dass essentielle Proteine nicht mehr exprimiert werden. Das Einschleusen therapeutischen Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen ist daher ein sehr vielversprechender Ansatz bei genetisch und degenerativen bedingten Krankheiten, wie zum Beispiel SCID^[74], die Parkinson Krankheit^[75] und myeloische Leukämie, sowie bei Infekten und der Tumorthherapie. Plasmid-DNA (p-DNA) ist therapeutisch wirksame doppel-strängige, ringförmige DNA, wie sie in prokaryotischen Zellen zu finden ist. Da sie unabhängig von dem chromosomalen DNA-Satz repliziert und transkribiert wird, kann sie Zellen gezielt und sequenzspezifisch zur Expressierung von ganz bestimmten, fehlenden Proteinen stimulieren.^[76, 77] Das Einbringen von p-DNA oder si-RNA, das sind kurze, lineare Nukleinsäuresequenzen, die bestimmte Proteine auf translationaler Ebene ausschalten können (engl.: „knock down“), für therapeutische Zwecke beschreibt das große und komplexe Thema der „Gen-Therapie“. Es stellt eine große Herausforderung dar, zugleich birgt es aber auch ein sehr großes Potential.

Wie schon erwähnt besitzen dendritische Zellen eine Schlüsselfunktion in der selektiven Aktivierung des Immunsystems. Es existieren zudem Promotoren, die selektiv für dendritische Zellen sind. Das bedeutet, dass p-DNA, welche diese Promotoren enthält, fast ausschließlich von Dendritischen Zellen abgelesen wird^[78], auch wenn sie von vielen anderen Zelltypen aufgenommen wird. So besteht die Möglichkeit, durch entsprechende p-DNA Konstrukte, dendritische Zellen selektiv zum exprimieren von Proteinen wie zum Beispiel Tumorantigenen zu stimulieren und so eine mögliche Immunantwort gegen den Tumor zu vermitteln. Daher bietet dieser Ansatz neue Perspektiven in der Tumor-Immuntherapie.^[79, 80] Es konnte schon erfolgreich mit einem Modellantigen gezeigt werden.^[81] Im Idealfall kann es zu einer dauerhaften Immunisierung (engl. „Genevaccination“), zum Beispiel über die Bildung von Antikörper, führen, was schon bei Infektionskrankheiten erfolgreich angewendet wird.^[82, 83] Dabei konnte gezeigt werden, dass eine erfolgreiche Transfektion von nur ca. 100 Dendritischen Zellen ausreicht, um eine Immunantwort zu stimulieren.^[84]

Ein großes Hindernis ist allerdings das Fehlen geeigneter und sicherer Transportmittel. Die Transfektion von Zellen, das Einbringen von p-DNA in eukaryotische Zellen, ist eine Standardmethode im Labor, und auch Industriell zur Herstellung verschiedenster Proteine. Als Methoden finden dabei Calcium-Phosphat-Präzipitation, Elektro- und Sonoporation, Magnetofektion und Mikroinjektion Anwendung. Diese Methoden sind allerdings auf „*in vitro*“ Anwendungen spezialisiert und sehr toxisch. Dabei reicht es, wenn wenige Zellen überleben und das gewünschte Protein, welches isoliert wird, exprimieren. Für therapeutische Ansätze allerdings, also dem systemischen Transport von p-DNA, müssen geeignete, nicht toxische, Transportmittel erst noch entwickelt werden.

Rekombinante virale Vektoren, die von Natur aus dafür spezialisiert sind, bringen allerdings erhebliche Risiken mit sich, lassen sich schlecht im großen Maßstab darstellen und sind bei der Größe der p-DNA limitiert.^[85-87]

1.4.2 Polymere zum Transport von p-DNA

P-DNA ist ein großes Biopolymer mit vielfachen negativen Ladungen. Mit kationischen Makomolekülen kann es zu Polyplexen kondensiert und transportabel gemacht werden (Abbildung 1.8A). Aus diesem Grund hat die Verwendung von polymeren, lipidischen

und liposomalen Strukturen zum Transport von p-DNA eine große Bedeutung^[88], wobei hier der Fokus auf polymere Strukturen gelegt werden soll. Insbesondere die Verwendung von Blockcopolymeren, bestehend aus einem kationischen Teil zur p-DNA-Komplexierung und einem hydrophilen biokompatiblen Teil zur Abschirmung (Korona), haben stark an Bedeutung gewonnen (Abbildung 1.8 B).^[89-91] Allgemein eignen sich viele kationische Strukturen^[92] zum Kondensieren der sehr großen (über 1000 Basenpaare, Molekulargewicht >3.000.000 Da), polyanionischen p-DNA, welche in nativer Form nur sehr schlecht von Zellen aufgenommen und prozessiert wird. Es kommt zur ladungsvermittelten Bildung von kompakten Komplexen in geeigneten Größenbereichen (< 500 nm), die einen besseren Transport und eine Zellaufnahme möglich machen (Abbildung 1.8 A). Eine Abschirmung nach Außen ist zum einen besonders wichtig, um zu verhindern, dass die p-DNA eine Immunantwort über Stimulierung der „Toll-like“ Rezeptoren vermittelt.^[93] Zum anderen verhindert die Korona, dass es extrazellulär zu Bildung sehr großer Aggregate kommt, da es leicht zur Wechselwirkung von anderen negativ geladenen Proteinen mit den Polykationen aus dem Polyplex kommt.^[94] Zusätzlich bewirkt die hydrophile Korona einen Schutz vor extra- und intrazellulärem enzymatischem Abbau^[95] und ermöglicht eine spezifische Aufnahme durch Anbringung von Erkennungsstrukturen. Der Durchmesser dieser Polymer-p-DNA-Polyplexe liegt im Bereich von 50-500 nm.^[96]

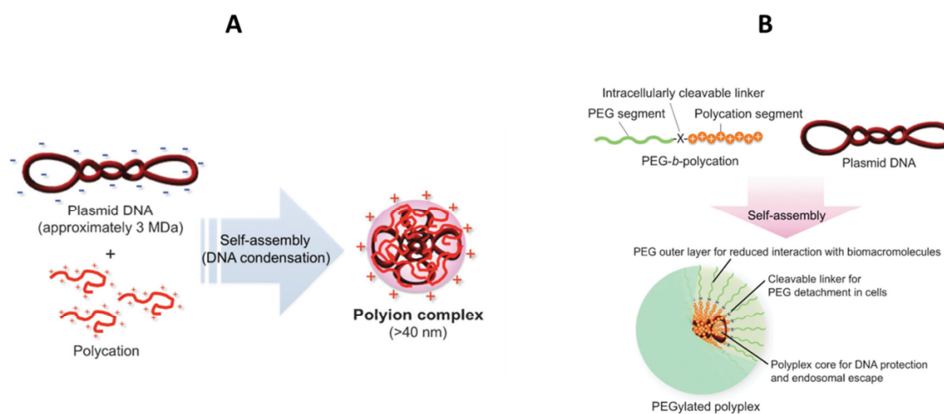


Abbildung 1.8: Kondensation von p-DNA: A.: mit kationischen Polymeren; B.: mit Blockcopolymeren bestehend aus einem kationischen Block und einem hydrophilen Block^[90]

Hierbei findet neben PEG, wie bei den meisten kolloidalen Nanopartikeln, auch Poly(HPMA), Poly(oligoethylenglycolmethacrylat) (p[OEGMA]) und Polyoxazoline als abschirmenden Teil am meisten Verwendung.^[94, 97-105]

Als kationischen Block werden hierbei meist Amine benutzt, die einen pK_s -Wert besitzen, der über dem physiologischen pH-Wert von ca. 7,2 liegt (z. Bsp. Poly(Lysin) $pK_s \sim 9,4$), so dass sie zum größten Teil protoniert, also kationisch vorliegen (Abbildung 1.9). In der Regel steigt die Polyplexstabilität mit der Länge des kationischen Blocks. Die Länge des hydrophilen, biokompatiblen Teils, der Korona, sollte ein Vielfaches des kationischen Teils aufweisen, um eine gute Stabilität der Polyplexe im extrazellulären Raum zu gewährleisten und eine zu frühe Freisetzung zu vermeiden. So werden zum Beispiel einfache Polyplexe aus reinem Polylysin und p-DNA ohne abschirmende Korona im Blut innerhalb zehn Minuten abgebaut.^[106] Der effiziente Einschluss von p-DNA durch ein geeignetes Blockcopolymeres System ist daher ein ganz zentraler Punkt. (Abbildung 1.10 links). Aufgrund der Abschirmung können die Polyplexe längere Zeit im Körper zirkulieren, was auch das Ansprechen von Immunzellen ermöglicht. Die Verwendung von Polyplexen ist daher auch in Bezug auf die Tumor-Immuntherapie sehr interessant.

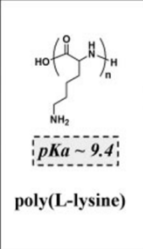
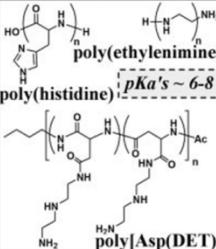
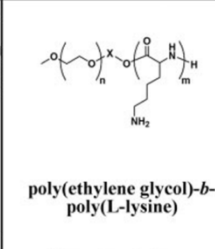
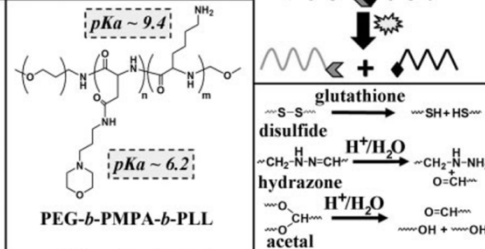

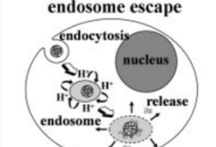
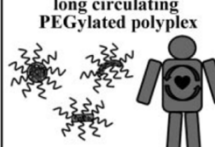
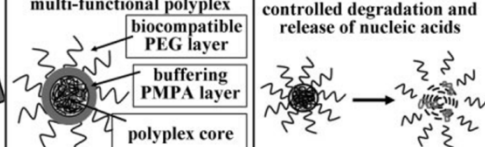

design	homopolymer	diblock polymer	triblock polymer	reversible linkages
structure	 <p>poly(L-lysine) $pKa \sim 9.4$</p>	 <p>poly(ethylene glycol)- b-poly(L-lysine) $pKa's \sim 6-8$</p>	 <p>PEG-b-PMPA-b-PLL $pKa \sim 9.4$ $pKa \sim 6.2$</p>	 <p>glutathione disulfide hydrazone acetal</p>
function	 <p>simple polyplex $\sim 50 - 500 \text{ nm}$</p>	 <p>endosome escape endocytosis nucleus release endosome</p>	 <p>long circulating PEGylated polyplex</p>	 <p>multi-functional polyplex biocompatible PEG layer buffering PMPA layer polyplex core</p>
				 <p>controlled degradation and release of nucleic acids</p>

Abbildung 1.9: Beispiele für synthetische, nicht-virale, polymere Systeme zum Einschluss/Transport von p-DNA^[89]

Allerdings sinkt die Transfektionseffizienz, also die erfolgreiche Ablesung der genetischen Information der therapeutischen p-DNA im Zellkern, teils erheblich, da durch eine effiziente Abschirmung die Zellaufnahme herabgesetzt wird. Das Herabsenken der potentiellen Toxizität der Polyplexe bewirkt sehr oft auch ein Herabsetzen ihrer Effektivität und ist somit der sogenannte „Flaschenhals“. Die Verbesserung der

Effektivität ohne die Toxizität zu erhöhen gelingt durch Variationen in der Polymerstruktur. Genau hier sind die Fortschritte bei den kontrollierten Polymerisationstechniken unentbehrlich. Denn nur durch gezielte Beeinflussung der polymeren Strukturen in Form und Funktion ist eine Erhöhung der Effektivität unter Einhaltung einer niedrigen Toxizität möglich. Abbildung 1.10 (rechts) zeigt auch die intrazellulären Barrieren. Zunächst muss der Polyplex erfolgreich über Endozytose aufgenommen werden. Die extrazelluläre Matrix ist aufgrund von Zuckerresten und Phosphatidylcholin-Gruppen negativ geladen und macht die Aufnahme von nativer p-DNA unmöglich. Durch die Bildung der Polyplexe wird eine Aufnahme erst ermöglicht und kann, im Idealfall, sogar zellspezifisch sein. Ein ganz entscheidender Schritt ist der Austritt aus endosomalen Kompartimenten (engl: endosomal escape), da sonst ein Abbau der p-DNA im Lysosom droht sowie die erfolgreiche Freisetzung der p-DNA aus dem Polyplex. Durch den zusätzlichen Einbau von sekundären und tertiären Aminogruppen, deren pK_s -Werte unterhalb des physiologischen pH-Wertes liegen, kann die Freisetzung aus dem Endosom verbessert werden. Denn sie werden erst im endosomalen Kompartimenten protoniert, da hier der pH-Wert auf ca. 5,5 sinkt. Es kommt daher zum Einstrom von Protonen und anschließend zum Einstrom von Chlorid-Ionen. Dies führt zum osmotischen bedingten Anschwellen und Aufbrechen des Zell-kompartimentes (engl: Proton Sponge Effect) und bedingt so die Freisetzung des Polyplexes.^[107] Geeignet hierfür sind unter anderem: Poly(Ethylenimin)^[108] (PEI), Poly(amidoamine) (PAMAM)^[109], Poly(Histidin)^[110], Poly(*N,N*-(2-aminoethyl)-2-amino-ethyl aspartamid Poly(Asp(DET))^[111]. Eine weitere mögliche Erklärung für die verbesserte endosomale Freisetzung dieser Gruppen ist, dass die kationischen Strukturen sich in die endosomale Membran einlagern und so destabilisieren und aufbrechen, ähnlich wie zellpenetrierende Peptide (engl.: cell penetrating peptides (CPP)).^[112]

Darüber hinaus können auch stimuli-responsive-Gruppen zwischen den komplexierenden und den abschirmenden Block eingebaut werden. So wird der abschirmende Block innerhalb der Zelle abgespalten und so die Freisetzung des cargo p-DNA erheblich verbessert. Sehr vielversprechend ist die Verwendung von Disulfidbrücken. Diese sind im extrazellulären Milieu stabil, werden aber intrazellulär über endosomale Aufnahmewege durch eine 50-bis 1000-fache erhöhte Konzentration von Glutathion reaktiv gespalten^[113] und können die Effektivität der polymeren Carrier erheblich erhöhen.^[114] Zusätzlich sind hierbei wahrscheinlich die membranassoziierten Enzyme „Protein

Disulfidisomerase“ und „NADH-Oxidase“ beteiligt, welche einen Disulfid-Thiol Austausch bewirken können. Letzere sind besonders in Krebszellen über-exprimiert.^[115, 116]

Schließlich muss die p-DNA noch in den Zellkern gelangen, um dort erfolgreich abgelesen zu werden und die entsprechende Proteinexpression zu initiieren. Der Zellekern ist jedoch von der Kernmembran umgeben, die die passive Diffusion von Makromolekülen > 10 nm verhindert. Während der Zellteilung kommt es jedoch zur temporären Auflösung der Kernmembran und ermöglicht somit den Eintritt der p-DNA in den Zellkern.^[117] Eine große Herausforderung bleibt daher die Transfektion von Zellen mit niedriger oder ohne Teilungsrate.

Eine Möglichkeit ist die Verwendung von Kernlokalisationssequenzen (NLS-Sequenzen). Diese können den direkten Import von größeren Molekülen wie p-DNA bewirken. Es hat sich gezeigt, dass eine Anbindung an den Carrier wesentlich effektiver ist als eine Modifikation der p-DNA.^[118] Das verdeutlicht auch, dass therapeutisch p-DNA sehr empfindlich gegenüber kleinsten Veränderungen sein kann und dass die vielseitigen Anforderungen zur Überwindung der intra- und extrazellulären Barrieren durch Modifikation des synthetischen Carriers erfüllt werden müssen.

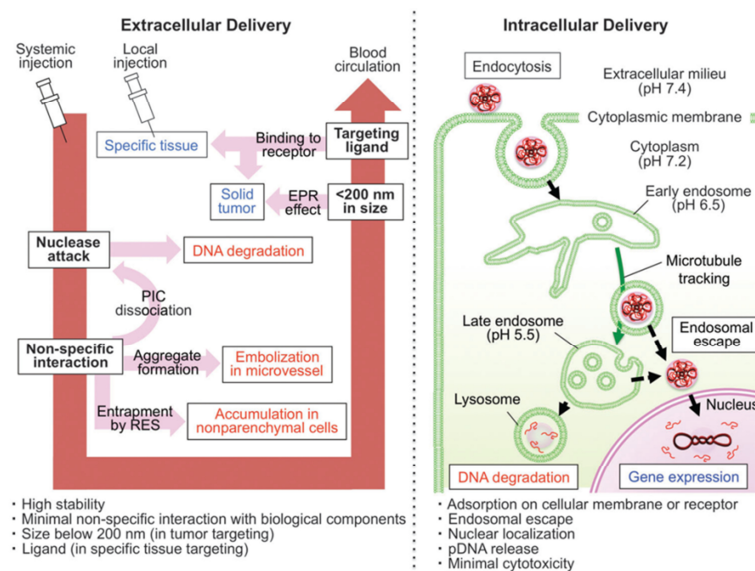


Abbildung 1.10: Intra- und extrazelluläre Barrieren für den systemischen Transport von p-DNA^[90]

Abbildung 1.11 zeigt die gängigsten Polymere, die für die Transfektion als Polyplexe Verwendung finden. PEI ist wohl das bekannteste und eines der ersten Polymere für diese Anwendung. Da es eine hohe Dichte an primäre, sekundären und tertiären Aminen besitzt, komplexiert es p-DNA effizient, besitzt zudem sehr gute Puffereigenschaften (Freisetzung aus dem Endosom) und transfiziert daher sehr effektiv. Allerdings besitzt es auch eine sehr hohe Toxizität. Gleiches trifft für dendritische Strukturen wie PAMAM zu. Polylysin und Chitosan sind bioabbaubar und viel weniger toxisch, allerdings besitzen sie eine geringe Transfektionseffektivität, welche durch den Einbau puffender Gruppen erhöht werden kann.

Die wohl wichtigsten Anforderungen für polymere Systeme für die therapeutische Anwendung, gerade im Hinblick auf die Tumor-Immuntherapie, ist die Minimierung von unerwünschten Nebeneffekten. Daher sind eine effiziente Abschirmung der p-DNA sowie die Verwendung von biokompatiblen oder bioabbaubaren polymeren Trägern sehr wichtig. Darüber hinaus muss durch gezielte Modifikation die Verbesserung der Transfektions-effektivität erreicht werden. Dies kann durch den Einbau stimuliresponsiver Gruppen, zur verbesserter Freisetzung, sowie durch das Anbringen von Erkennungsstrukturen zur Optimierung der kontrollierten Zellaufnahme gelingen.^[90]

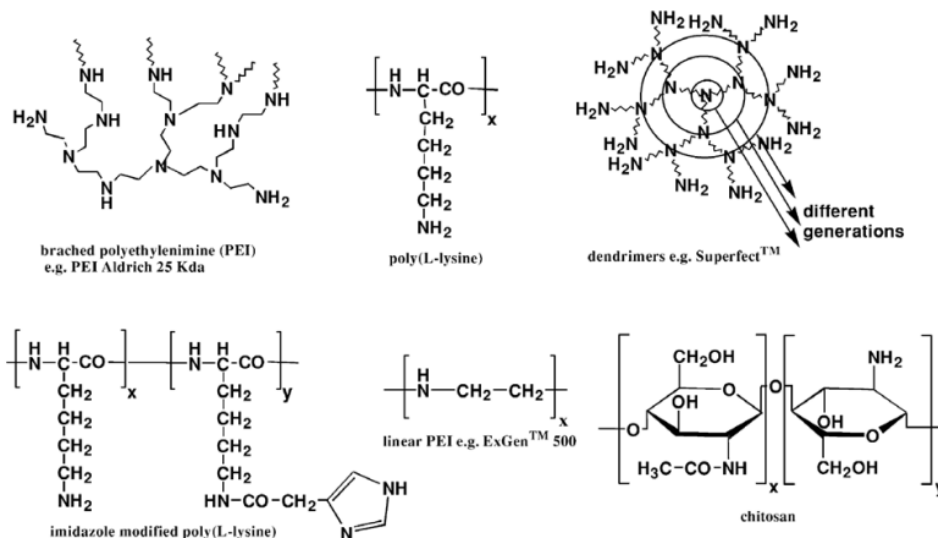


Abbildung 1.11: Häufig verwendete polymeren Strukturen für die Transfektion mit p-DNA^[119]

Wie schon in Kapitel 1.3.3 aufgeführt können gut definierte, funktionelle HPMA-Copolymere über die RAFT-Polymerisation von reaktiven Vorläuferpolymeren synthetisiert werden. Dieser Synthese-Ansatz bietet die Möglichkeit, Blockcopolymere bestehend aus einem kationischen-Block, zur p-DNA-Kondensation und einem hydrophilen p(HPMA)-Block als hydrophile Korona darzustellen. Gerade die Synthese von einem Blockcopolymer, bestehend aus einem natürlichen Polylysin als komplexierenden Teil und einem p(HPMA) als abschirmenden Teil, stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, da hier beide Blöcke biokompatibel und das natürliche Polylysin sogar bioabbaubar ist. Darüber hinaus sollte durch Ausnutzung der kontrollierten radikalischen Polymerisation die vielseitige Modifikation dieses Blockcopolymer zur Optimierung der benötigten Eigenschaften möglich sein.

2 Theoretischer Teil/ Methoden:

2.1 Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer-Polymerisation (RAFT-Polymerisation)

Die RAFT-Polymerisation^[120] ist nach der Nitroxide Mediated Polymerisation (NMP)^[121] und der Atom Transfer Radical Polymerisation (ATRP)^[122] die neuste Methode, welche die freie radikalische Polymerisation revolutioniert hat. Wie bei allen kontrollierten radikalischen Polymerisationen existiert ein Gleichgewicht zwischen der Radikalspezies und einer „schlafenden Spezies“. Dabei sollte die Konzentration an schlafender Spezies um einige Größenordnungen höher sein als die der radikalischen Spezies, um ein größt mögliches Maß an Kontrolle zu bekommen. Im Gegensatz zu NMP und ATRP beruht der RAFT-Prozess dabei auf einem degenerativen Kettentransfer anstatt auf persistenten Radikalen. Ihr großer Vorteil besteht darin, dass sie ähnliche Reaktionsgeschwindigkeiten wie die freie radikalische Polymerisation aufweisen und vor allem, dass sie eine hohe Toleranz gegenüber funktionelle Monomere und Gruppen zeigt. Zudem werden keine Schwermetalle wie zum Beispiel bei ATRP benötigt, was besonders für biologische Anwendungen wichtig ist. Als Kettentransferreagenzien (engl.: chain-transfer-agent (CTA)) werden Dithio-Benzoat- und Trithio-Carbonat-Derivate verwendet.^[123] Abbildung 2.1 zeigt den Mechanismus des RAFT-Prozesses. Als Initiatoren dienen konventionelle Radikalstarter wie DPPO oder AIBN. Die wachsende Polymerkette reagiert nun mit dem Kettentransferreagenz, welches eine aktivierte Doppelbindung für die Radikaladdition hat (C). Entscheidend ist, dass der entstandene polymere CTA (D) gleich oder reaktiver ist als der niedermolekulare Vorläufer CTA (B). So entsteht ein Gleichgewicht zwischen wachsender Polymerkette (A) und schlafender Spezies (D), welches charakteristisch für kontrollierte radikalische Polymerisationen ist und so unerwünschte Radikalreaktionen weitestgehend unterdrückt und für den „quasi“ lebenden Charakter zuständig ist.^[124]

Der CTA ist so gewählt, dass das abgespaltene Radikal (E) reaktiv genug ist um eine neue wachsende Polymerkette (F) zu erzeugen. Diese kann die CTA-Endgruppe wieder mit der schlafenden Spezies (D) austauschen. So wird die CTA-Endgruppe wie bei einem „Staffellauf“ zwischen den Ketten übertragen und vermittelt so ein kontrolliertes Wachstum.

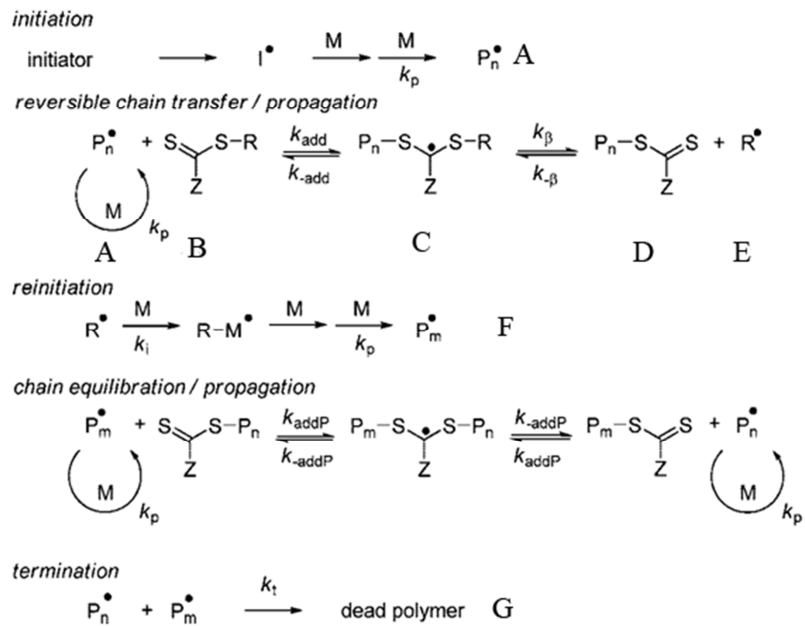


Abbildung 2.1: Mechanismus des RAFT-Prozesses^[125]

Die Menge an CTA bestimmt die Anzahl an gebildeten Polymerketten. Die Anzahl der Ketten wird genauer durch die Menge an verbrauchtem CTA und zersetztem Initiator bestimmt. Der Polymerisationsgrad X_n hängt von der Anzahl der gebildeten Polymerketten und dem Umsatz an Monomer wie folgt ab:

$$X_n = \frac{p * [M]_0}{(p' * [CTA]_0 + 2 * f * p'' * [I]_0)}$$

Hierbei sind $[M]_0$, $[CTA]_0$ und $[I]_0$ die Anfangs Konzentrationen von Monomer, CTA und Initiator sind und p , p' und p'' die jeweiligen Umsätze. Durch die Verwendung von hohen Konzentrationen an CTA im Vergleich zu Initiator wird die Anzahl an Polymerketten mit CTA im Vergleich zu bimolekularen Terminierung (G) maximiert. Da die meisten Kettentransfer hohen Kettentransferkonstanten haben (>1000) ist der CTA im Vergleich zum Monomer schnell aufgebraucht ($p'=1$). Zudem ist die Anzahl an Polymerketten, welche durch Initiatorzerfall entstanden ist, relativ klein ($p'[CTA] \gg 2fp''[I]_0$). Es folgt:

$$X_n = \frac{p * [M]_0}{[RAFT]_0}$$

Des Weiteren ergibt sich durch die Multiplikation mit dem Molekulargewicht des Monomers direkt das Molekulargewicht des Polymers:

$$M_n = X_n * M[\text{Monomer}]$$

Mit der Mengen an eingesetztem Monomer und CTA ($n[\text{Monomer}]$ und $n[\text{CTA}]$) folgt:

$$M_n = \frac{n[\text{Monomer}]}{n[\text{CTA}]} * M[\text{Monomer}] * p$$

und mit

$$m(\text{Monomer}) = n[\text{Monomer}] * M[\text{Monomer}]$$

$$n[\text{CTA}] = \frac{m[\text{CTA}]}{M[\text{CTA}]}$$

ergibt sich schließlich:

$$M_n = \frac{M[\text{CTA}]}{m[\text{CTA}]} * m[\text{Monomer}] * p$$

Hiermit lässt sich bei bekanntem Umsatz eines Monomers das gewünschte Molekulargewicht über die Menge von eingesetztem Monomer und CTA steuern.^[126]

2.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC's) besitzen eine zentrale Rolle in der adaptiven Immunantwort. Sie erkennen und prozessieren körperfremde Antigene und kontrollieren die T-Zell abhängige-Immunantwort.^[40] So kann zum Beispiel durch die Behandlung von dendritische Zellen mit Tumorantigenen (Proteine oder Peptidsequenzen) einen Antwort gegen Tumorzellen induziert werden. Essentiell hierbei ist, dass auch gleichzeitig DC aktivierende Substanzen (Adjuvantien) vorhanden sein müssen. Durch die „*ex vivo*“ Behandlung, dabei werden dendritische Zellen isoliert, stimuliert und wieder verabreicht,

konnte dieses Prinzip schon erfolgreich angewendet werden.^[127] Ein Nachteil des hieraus resultierender möglichen Therapieansatzes ist dabei allerdings der sehr große Aufwand, hohe Kosten und zudem ist die Effektivität gering, da die manipulierten DC`s nur schlecht in lymphatische Organe wandern, wo sie ihre Aktivierung ausführen müssen. Sehr vielversprechend, allerdings auch sehr anspruchsvoll und komplex, ist daher eine „*in vivo*“ Aktivierung von Dendritischen Zellen. Vorteile wären vor allem geringere Kosten und potentielle bessere Migration der stimulierten DC`s. Wie schon in Kapitel 1.1 erwähnt bietet die Verwendung von Nanopartikel viele Vorteile: empfindliche Substanzen können vor dem Abbau geschützt werden, es können verschieden Arten von Antigenen transportiert werden und gleichzeitig noch Adjuvantien, um eine mögliche Toleranzentwicklung zu unterbinden. Die Anreicherung im Zytosol kann verbessert werden und DC`s wären über längere Zeiträume der Stimulation ausgesetzt. Nicht zuletzt vermögen Erkennungsstrukturen eine gezielte Aufnahme in DC`s erreichen. Es existieren mehrere Rezeptoren auf DC`s, die ein gezieltes Ansprechen möglich machen und so unerwünschte Nebenreaktion, durch Aufnahme von anderen Immunzellen, reduzieren.^[128] Darüber hinaus bewirkt eine rezeptorvermittelte Aufnahme eine bessere Prozessierung und Präsentation der Antigene.

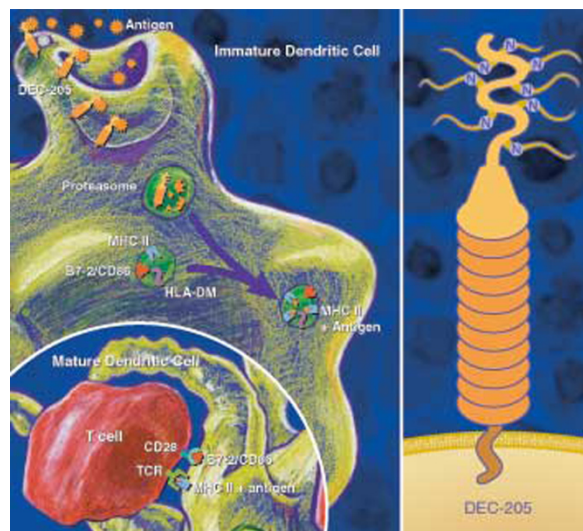


Abbildung 2.2: Der C-Typ Lektin Rezeptor DEC-205^[129]

Besonders der C-Typ Lektin Rezeptor DEC-205, der speziell auf CD8⁺ positiven Dendritischen Zellen exprimiert ist, zeigt eine besonders effektive Prozessierung und daraus resultierende T-Zell-Aktivierung, wenn das Antigen an den anti-DEC-205 Antikörper (aDEC-205) gekoppelt ist.^[41, 43] Die Verwendung des kommerziell erhältlichen

Antikörpers aDEC-205 bietet daher eine vielversprechende Möglichkeit dendritische Zellen selektiv zu adressieren und zu aktivieren.

Eine weitere Möglichkeit für die „*in vivo*“ Aktivierung von DC's ist sie mit p-DNA zu beladen, die für das Tumorantigen codiert, anstatt das Tumorantigen direkt zu transportieren (DNA-Vakzinierung). Über eine transiente Transfektion würde das entsprechende Tumorantigen exprimiert und effizient präsentiert werden, um eine Immunantwort auszulösen, ähnlich wie es virale Vektoren tun, ohne eine Beeinträchtigung der chromosomalen-DNA.

Wie schon in Abschnitt 1.4.2 gezeigt, sind die Anforderungen an Transportmittel für den effizienten Transport von p-DNA sehr komplex. Allerdings würden sich bei dieser Methode entscheidende Vorteile ergeben: Die Herstellung von p-DNA-Vakzinen ist wesentlich einfacher und kostengünstiger als die rekombinante Synthese und Aufreinigung von Protein-Antigenen. Das so exprimierte Antigen würde effektiv zur Aktivierung verschiedener T-Zell Populationen führen (zum Beispiel T-Helfer- und T-Killer-Zellen)^[130] und aufgrund einer transienten Transfektion würde das Antigen immer wieder exprimiert werden. p-DNA als großer Vektor kann auch für die Expression mehrere verschiedener Antigene codiert werden. Zudem bietet die Plattform p-DNA zudem die Möglichkeit, neben der Antigen-codierenden Sequenz noch eine Vielzahl weitere Sequenzen einzubauen. So können CpG-reiche Sequenzen als Adjuvants eine gleichzeitige effektive Stimulierung der Dendritischen Zellen bewirken. Zusätzlich existieren Promotoren, die selektiv für dendritische Zellen sind (zum Beispiel der Fascin- Promotor).^[131-133]

2.3 Antikörper

Antikörper (Immunglobuline) sind Erkennungselemente der Immunantwort bei Wirbeltieren. Ihre Aufgabe besteht darin, Pathogene spezifisch zu erkennen und das Immunsystem daraufhin zu aktivieren. Sie werden von B-Lymphozyten als Antwort auf eine Immunantwort produziert. Es existieren unterschiedliche Subtypen (IgM, IgG, IgA, IgE), wobei IgG mit Abstand den größten Anteil im Blut bilden. IgG's (150 kDa) bestehen aus zwei leichten Ketten (je 25 kDa und ca. 220 Aminosäuren) und zwei schweren Ketten (je 50 kDa und ca. 440 Aminosäuren). Das Paratop, die spezifische Bindungsstelle für das Antigen (Epitop), befindet sich dabei auf der Außenseite des F_V-Fragmentes. Die Bindungskonstanten sind aufgrund der zwei flexiblen Bindungsstellen sehr hoch ($K_D=10^{-4}$ - 10^{-10}). Die Erhöhung der Bindungsstärke durch die Anwesenheit von zwei Bindungsstellen

(Avidität) beträgt ca. 10^4 . Der F_C-Teil ist dabei zuständig für die Aktivierung des Immunsystems (Komplementaktivierung) (Abbildung 2.3).^[134]

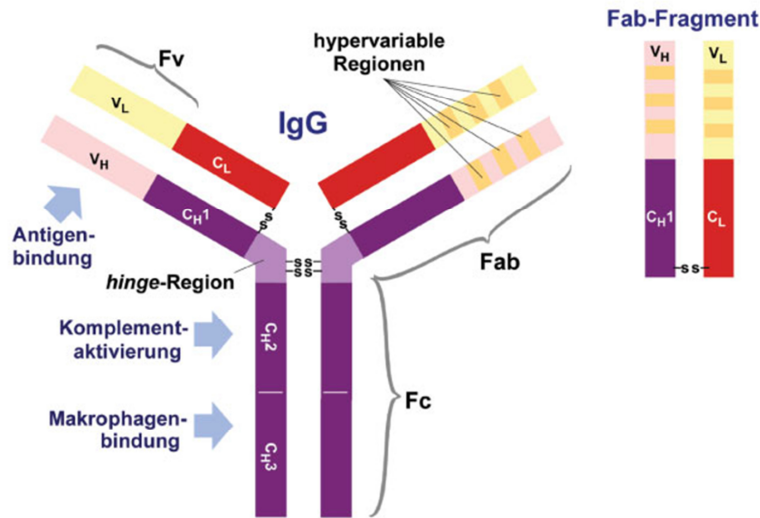


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines Immunglobulins (IgG) und dessen Fragmente. F_V: variabler Teil verantwortlich für spezifische Bindung; Fab-Fragment: „die beiden „Bindungsarme“ des Antikörpers; V_H/V_L: Variable Domänen der schweren und leichten Kette; F_C: Schwere Ketten zuständig für die Komplement Aktivierung, -S-S-: Kovalente Disulfidbrücken zur Stabilisierung. C_{H/L} 1-3: Konstante Domänen; Hinge-Region: beweglicher Teil zuständig für Flexibilität^[134]

Wie schon in Abschnitt 1.3.1 aufgeführt sind monoklonale Antikörper gerade in der Tumorthherapie sehr vielversprechend und einige sind bereits zur Behandlung zugelassen. Die Gewinnung von IgG's wurde schon 1890 beschrieben. Nach Immunisierung eines Versuchstieres können Antiseren aus dem Blut gewonnen werden. Diese enthalten jedoch eine Mischung von Antikörpern verschiedener Affinitäten (polyklonal) und zusätzlich noch viele andere Antikörper, weshalb es bei therapeutischer Anwendung zu Nebenreaktionen kommt. Durch die Hybridinom-Technologie können direkt monoklonale Antikörper gewonnen werden, da eine Aufreinigung von Polyklonalen-Mischungen sehr aufwendig ist.

Dabei wird nach der Immunisierung eines Versuchstieres die Antikörper produzierenden B-Lymphozyten aus der Milz entfernt und anschließend zu Verschmelzung mit Plasmamylomzellen immortalisiert. Diese produzieren dann den entsprechenden Antikörper. Allerdings handelt es sich hierbei um nicht humane Antikörper, deren Anwendung im Menschen zu einer Auslösung der Komplement Aktivierung führen kann (Immunogenizität).^[135] Es besteht die Möglichkeit, durch Verpflanzung der Hyper-variablen Region diesen Effekt zu reduzieren (chimäre Antikörper). Ganz entscheidend war allerdings die Entwicklung der Phage Display-Technologie.^[136] Diese ermöglicht die Herstellung von

humanisierten monoklonalen Antikörpern. Dabei wird das Repertoire aus c-DNA von Lymphozyten und zusätzlich noch synthetischer DNA amplifiziert. Durch das Zusammenfügen dieser Gen-Fragmente zu einem phagemid-Expressionsvektor werden Genbibliotheken hoher Komplexität erschaffen. Das gewünschte Protein wird dann auf der Phagen Oberfläche exprimiert und kann dort anschließend über mehrfache Affinitätschromatographie gereinigt werden. So können gewünschte Antigene mit konstanten humanen Regionen kombiniert werden, was zu humanisierten Antikörpern gegen beliebige Antigene resultiert. Auf diese Weise können Antikörper gegen alle mögliche Antigene (Oberflächenproteine) erzeugt werden. Die moderne Genetik ermöglicht hierbei die Analyse der Primärstruktur von Antikörpern und der DNA-Modifikation. Sehr wichtig ist diese Methode zur Generierung von Antikörpern zur Identifizierung einzelner Proteine bei der Entschlüsselung des menschlichen Genoms.

Neuerdings ist so auch die Herstellung von rekombinanten Antikörpern möglich (Abbildung 2.4). So zum Beispiel die Herstellung nur der beiden F_V -Fragmenten. Diese können über eine kurze Peptidketten am C-Terminus (engl.: single chain (sc)) (scF_V) oder über Disulfidbrücken (dsF_V) stabilisiert sein. Sie sind nur halb so groß wie die entsprechenden *Fab*-Fragmente, besitzen aber ähnliche Bindungsstärken. Durch Verkürzung der Peptidketten kann die Bildung von Dia-Tria- und Tetrabodies herbeigeführt werden. (vier, sechs bzw. acht F_V -Fragmente). Es können darüber hinaus auch bivalente Diabodies generiert werden, das sind jeweils zwei doppelte F_V -Fragmenten aneinander gelagert, wobei immer eines von zwei kovalent gebundenen spezifisch für ein anderes Antigen ist.

Nicht zuletzt kann jeweils ein paar kovalent verbundener F_V -Fragmente mit der konstanten Domäne einer leichten Kette (C_L) oder der einer schweren Kette (C_H) fusioniert werden. Lagern sich zwei gleiche solcher scF_V - C_L oder ein scF_V - C_L und ein scF_V - C_H zusammen, erhält man homodimere oder heterodimere Fusionsproteine, sogenannte „Minibodies“.

Ein großer Vorteil von allen rekombinanten Antikörpern besteht darin, dass sie aufgrund ihrer verringerten Größe den Zielort besser erreichen können.^[137, 138]

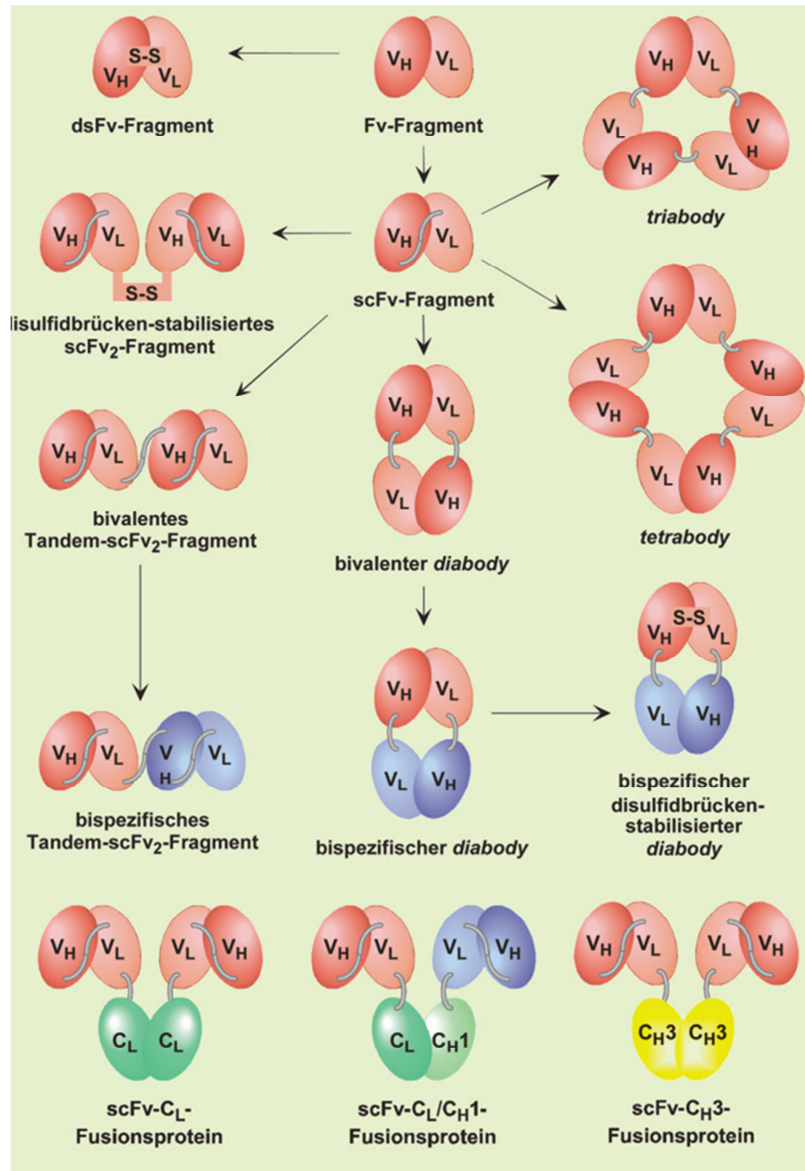


Abbildung 2.4: Unterschiedliche Formate rekombinanter Antikörper^[134]

2.4 Gelpermeationschromatographie (GPC)^[139]

Die Gelpermeationschromatographie erlaubt die Fraktionierung von Polymeren und die gleichzeitige Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung. Essentiell ist das Säulenmaterial, welches aus einem vernetzten Trägermaterial mit definierter Porengröße besteht. Dabei wird die Füllung als stationäre Phase und das entsprechende Laufmittel als mobile Phase bezeichnet.

Da kleinere Makromoleküle länger in den Poren verbleiben als größere (kleineren Molekülen steht relativ gesehen mehr Volumen zur Verfügung), kommt es zur Auftrennung der Moleküle und größere eluieren zuerst, da sie kürzer auf der Säule

verweilen. Die Detektion erfolgt über Messung in der Änderung des Brechungsindex (engl.: refractive index (RI-Detektor)), oder durch Messung der UV-Absorption des Eluats (UV-Detektoren).

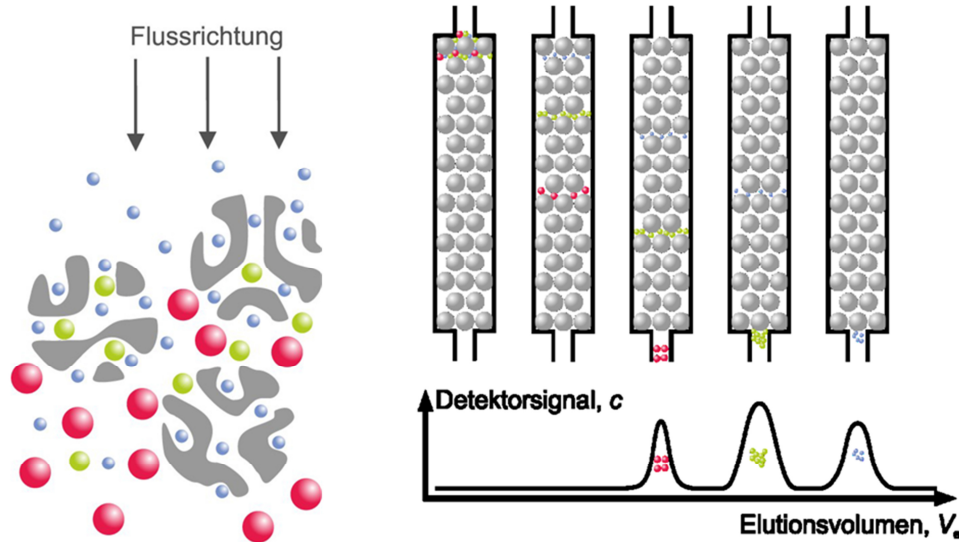


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Größenausschlusses und Trennung von Makromolekülen in der GPC (grau: Säulenmaterial, rot: größere Polymere, blau: kleinere Polymere)^[140]

Sind die Makromoleküle größere als die Poren, findet keine Auftrennung statt (obere Ausschlussgrenze). Ebenso kommt es zu keiner Auftrennung, wenn die Makromoleküle kleiner sind als die Poren (untere Ausschlussgrenzen).

Genauer betrachtet erfolgt die Trennung über das hydrodynamische Volumen der Makromoleküle, da Polymerketten in Lösung meistens Knäuel-Struktur annehmen und keine kompakten Körper darstellen. Je nach Polymer kann so bei gleichem hydrodynamischen Volumen das Molekulargewicht unterschiedlich sein. Ebenso kann auch das hydrodynamische Volumen gleich sein, obwohl das Molekulargewicht unterschiedlich ist.

Da es sich um eine relativ-Methode handelt, ist eine Kalibrierung mit einem Standard mit bekannten Molekulargewichten notwendig. Für ein gegebenes Polymer-Lösemittel System lässt sich mit Hilfe der Kalibrierung eine Beziehung zwischen Elutionsvolumen (V_E) und Molekulargewicht der Probe erstellen (a, b = Konstanten):

$$\log M = a - bV_E$$

Aus dem gemessene Elutionsvolumen lässt sich über die Eichkurve $\log M$ ermitteln. Über $\log M$ kann die Elutionskurve schließlich zu einer Molekulargewicht-Verteilungskurve umgewandelt werden.

2.5 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie^[141]

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) ist eine verbreitete Methode, um die Diffusion von fluoreszierenden Molekülen und Farbstoff markierten Proteinen und Nanopartikeln in Pufferlösungen und sogar lebenden Zellen zu bestimmen. Die Bezeichnung *Spektroskopie* wird üblicherweise für Methoden verwendet, die Frequenz/Wellenzahl-Spektren liefern. Allerdings ist die Autokorrelation eine Art Spektrum, nämlich ein Zeit-Spektrum, dass über eine inverse Fourier-Transformation die Fluktuationen in der Fluoreszenz Intensität bestimmt. Der Aufbau ist dem der konfokalen Mikroskopie ähnlich. Dabei wird das Licht auf eine Probe fokussiert und die Fluktuationen in der Fluoreszenz- Intensität werden bestimmt. Hierbei können über die Braun'sche Molekularbewegung physikalische und chemische Reaktionen und Aggregationen beobachtet werden. Daraus kann eine temporäre Autokorrelationsfunktion bestimmt werden. Da die gemessene Fluoreszenz abhängig von der Größe und der Anzahl an Fluktuationen ist, gibt es optimale Messbedingungen, bei welchen einzelne Spezies in das Beobachtungsvolumen eintreten oder es verlassen. Werden zu viele Vorgänge beobachtet, ist die gesamte Fluktuation eher klein im Vergleich zum Gesamtsignal und nicht auflösbar oder die Gesamtfluoreszenz ist zu hoch für den Detektor. Sind die einzelnen Fluktuationen dagegen zu selten, kann es ein, dass eine Messung zu lang dauert. Mit der Verwendung von Filtern, sensitiven Detektoren (avalanche Detektoren) und sehr verdünnten Lösungen ($\approx nM$) ist die Detektion von einzelnen Molekülen durchführbar. Damit kann über FCS der Diffusionskoeffizient, der hydrodynamische Radius oder die Konzentration bestimmt werden. Ein großer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass nur die Bewegung des Farbstoffes beobachtet wird. Durch die Verwendung von Farbstoffen, die auf unterschiedlichen Wellen angeregt werden können und kovalent oder elektrostatisch an Proteine/Polymere angebunden werden, wird die Beobachtung von einzelnen Partikeln möglich.

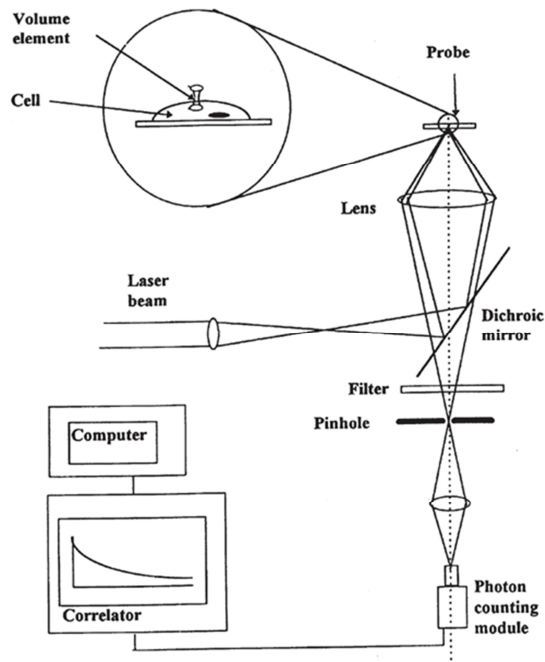


Abbildung 2.6: Experimenteller Aufbau der FCS^[141]

Der Aufbau besteht üblicherweise aus einem Laser (405-633 nm), welcher über einen dichromatischen Spiegel in den Objektträger des Mikroskops gelenkt wird. Der Laserstrahl wird auf die hochverdünnte Probe fokussiert ($V \approx 1$ Femtoliter im Brennpunkt). Betreten Teilchen nun dieses Konfokale Volumen wird Fluoreszenz detektiert. Das rotverschobene Licht wird detektiert und über den dichromatischen Spiegel zum Detektor geleitet. Das aufgezeichnete Signal wird über Fourier-Transformation in eine Autokorrelationskurve umgewandelt. Die Autokorrelationsfunktion für eine einzelne fluoreszierende Spezies stellt sich wie folgt dar:

$$G(r) = \frac{1}{\langle N \rangle} * \frac{1}{1 + \frac{r}{r_D}} * \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{w^2}{z^2} * \frac{r}{r_D}}}$$

Das konfokale Volumen kann über eine Kalibrierung mit einem Farbstoff bekannter Diffusionskonstante (Rhodamin) bestimmt werden.

$$\langle C \rangle = \frac{1}{V_{eff} * G(0)}$$

Die Konzentration des Farbstoffes kann über die Amplitude der Autokorrelationskurve bestimmt werden. Die Diffusionszeit r_D steht zur Diffusionskonstanten in folgender Beziehung:

$$D = \frac{r_0^2}{4\pi r_D}$$

Bei bekanntem Diffusionskoeffizient kann der hydrodynamische Radius über die Stokes-Einstein Gleichung berechnet werden:

$$R_H = \frac{TK_B}{6\pi\eta D}$$

Dabei ist K_B die Boltzmannkonstante, T die Temperatur und η die Viskosität der Lösung. Der so bestimmte Radius entspricht dem hydrodynamischen Radius.

2.6 Druchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting)^[142]

Fluorescence activated cell sorting (FACS) wird allgemein an einem kommerziellen *flow cytometer* durchgeführt. Über flow cyometry werden üblicherweise Zellen in Suspension über einen optischen Detektor gezählt und analysiert. Es erlaubt die gleichzeitige Bestimmung einer Vielzahl chemischer und physikalischer Parameter von mehreren hundert Zellen pro Sekunde. Es ist eine Standardmethode zur Diagnose von Krankheiten mit charakteristisch veränderten Zellen (zum Beispiel Krebs) und findet aber auch in vielen anderen wichtigen Bereichen von Forschung und Klinik Anwendung. Darüber hinaus kann es auch genutzt werden, um Zellen unterschiedlicher Beschaffenheit zu sortieren und so einzelne Populationen zu reinigen. Der typische Aufbau einen *flow cytometers* besteht aus einer Flusszelle, einem Laser zu Anregung, einem Detektor mit Umwandlung des Lichtsignals in eine elektronisches mit Verstärkung und einem Computer. Beim Fluoreszenz aktiviertem cell sorting kommt zudem eine weitere Komponente hinzu, die Zellen noch nach vorhandener Fluoreszenz, angeregt bei bestimmten Wellenlängen, sortiert.

Ein Laserstrahl wird nun auf einen Strom suspendierter Zellen gerichtet und Detektoren sind auf die Verengung gerichtet, wo der Lichtstrahl auf den Zellstrom trifft. Ein Detektor ist dabei entlang des Laserstrahls angeordnet und das zeichnet das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC), womit das Volumen der Zellen bestimmt werden kann. Andere sind senkrecht dazu und zeichnen das Seitwärtsstreulicht auf (side scatter, SSC), womit die Granularität der Zellen bestimmt werden kann. Bei letzterem wird oft parallel noch ein Fluoreszenzdetektor benutzt. Dabei kann über die FSC die Größe der Zellen (0,2-150 μm) bestimmt werden über und die SSC beispielsweise auf das Vorhandensein von Fluoreszenz überprüft werden. In Echtzeit wird so jede einzelne Zelle auf Form und Fluoreszenz untersucht und so Unterschiede zwischen den Zellen analysiert. Für das Sortieren wird der Zellfluss derart ausgerichtet, dass der Abstand zwischen den Zellen ein Vielfaches des Durchmessers beträgt. Durch Rütteln wird der Zellstrom in einzelne Tropfen aufgespalten, wobei sich durch den Aufbau eine Zelle pro Tropfen befindet. Kurz bevor der Fluss in einzelne Tropfen aufgespalten wird, wird kontrolliert ob die Zelle Fluoreszenz bei einer bestimmten Wellenlänge aufweist. Ein Ring wird nun elektrisch aufgeladen und bewirkt nun die Aufladung des Tropfens (zum Beispiel bei positiver Fluoreszenz) mit der entsprechenden entgegengesetzten Ladung. Die Tropfen passieren ein elektrisches Feld und werden entsprechend ihrer Ladung aufgetrennt. Über Fluoreszenz markierte Polymere kann so der zeitliche Verlauf von Polymer assoziierter Fluoreszenz an Zellen bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde diese Methode hauptsächlich benutzt um die durchschnittliche Anzahl an Zellen nach bestimmten Zeitpunkten zu bestimmen, die positiv für den Polymerfarbstoff sind, nachdem Zellen mit dem Polymer inkubiert, abgelöst und gewaschen wurden. Die Daten einer gesamten Zellpopulation werden als Histogramme (bei der Messung eines Parameters) oder als Punktdiagramme (bei der Messung mehrere Parameter) dargestellt.

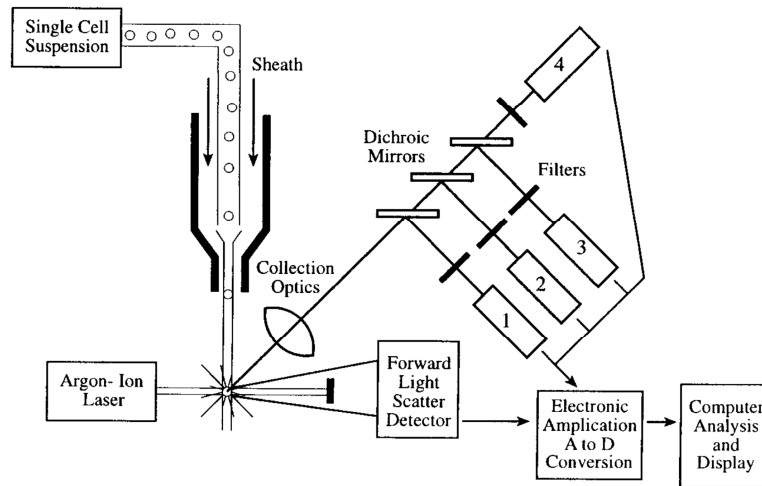


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie^[142]

2.7 Konfokale Mikroskopie^[143]

Um intrazelluläre Lokalisation von polymeren Nanopartikeln zu untersuchen, benötigt man konfokale Mikroskopie. Mit Konfokale-Mikroskopie (engl.: Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)) können hochauflösende Bilder mit Tiefenaufklärung erhalten werden. Dabei entscheidend ist, dass Bilder im Fokus von verschiedenen Tiefen aufgenommen werden. So werden einzelnen Ebenen entlang der z-Achse aufgenommen und Punkt für Punkt Bilder aufgenommen, die am Computer zu einem Bild zusammengesetzt werden. Bei einem „gewöhnlichen“ Mikroskop wird nur eine Ebene zu einem Zeitpunkt betrachtet. Dadurch ist eine genaue Lokalisierung des polymeren Nanopartikels innerhalb der Zelle möglich. In einem typischen Aufbau wird ein Laserstrahl durch eine Lichtquellen Apparatur geleitet und dann durch eine optische Linse auf ein schmales konfokales Volumen auf oder innerhalb dem Objekt fokussiert. In biologischen Anwendungen ist dies meistens ein Farbstoff in zellulären Kompartimenten. Fluoreszierendes Licht von dem beleuchtenden Spot wird von einer optischen Linse fokussiert. Ein Lichtteiler trennt ein Teil des Strahls auf den Detektor mit Filter, das nur die Wellenlängen des gewünschten angeregten Farbstoffes durchlässt. Nachdem Passieren einer Lochblende wird die Lichtintensität von einem Photomultiplier (PMT) detektiert und so das Lichtsignal in ein elektrisches umwandelt. Die Lochblende blockiert zum einen den größten Teil des Lichtstrahls und schärft somit das Bild im Vergleich zur „gewöhnlichen“ Mikroskopie und

zum anderen macht sie die Aufnahmen von Bildern in verschiedenen z-Ebenen möglich. CLSM bietet daher die Möglichkeit einer direkten, nicht invasiven Abbildung von polymeren Nanopartikeln innerhalb der Zelle ohne aufwendige Probenpräparation. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Technik genutzt, um die intrazelluläre Lokalisation von polymeren Nanopartikeln zu überprüfen wobei Zellkompartimente wie zum Beispiel Zellkern oder Zellmembran mit bestimmten Marker sichtbar gemacht werden können.

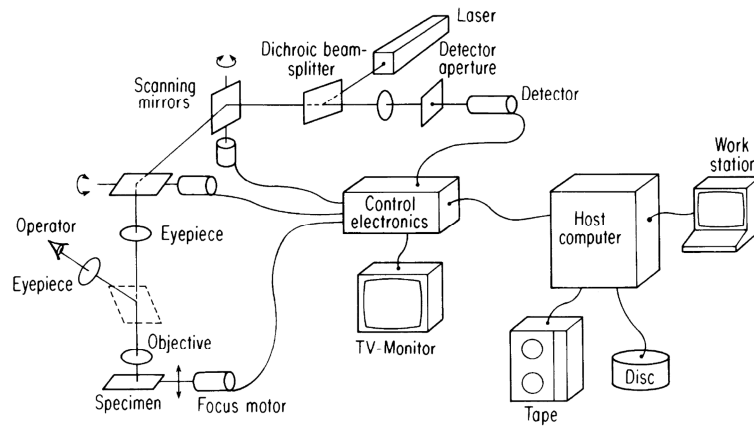


Abbildung 2.8: Schematischer Aufbau der „Confocal Laser Scanning Microscopy“^[143]

3 Problemstellung und Zielsetzung

Die Verbesserung von nieder- und hochmolekularen Wirkstoffen durch Polymere Therapeutika besonders in der Tumorthherapie hat in zahlreichen klinischen Studien schon vielversprechende Teilerfolge erzielt. Darüber hinaus gewinnt das Gebiet der Tumor-Immuntherapie immer mehr an Bedeutung. Ziel ist es, das körpereigene Immunsystem zu nutzen, um maligne Zelle zu erkennen und zu bekämpfen. Dieses Gebiet an sich ist schon sehr komplex (Gleichzeitige Immunaktivierung, Aufhebung der Immuntoleranz, und Auslösung einer Entzündung im Tumor) aber die Verwendung polymerer Nanopartikel bietet dabei ein großes Potenzial zur gezielten Beeinflussung des Immunsystems durch „multifunktionelle“ Träger. Das Polymer Poly(*N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid) (poly[HPMA]) hat sich schon in der Verwendung von Polymeren Therapeutika bewährt und ist aufgrund der geringen Immunogenität ein vielversprechender Träger für die Tumor-Immuntherapie. Zusätzlich können über die Darstellung von HPMA-Copolymeren über den Zwischenschritt von Reaktivester Polymeren und Ausnutzung der RAFT-Polymerisation sehr definierte und multifunktionelle HPMA-Copolymere erhalten werden. Dies sollte für die Synthese von funktionellen, poly[HPMA] basierten Polymerstrukturen genutzt werden und gezielte Wechselwirkungen mit (Immun)-Zellen untersucht werden.

Ein zentrales Problem ist unter anderem der zielgerichtete Transport von „Stimuli“ in Immunzellen. Daher war es zum einen zentrale Zielsetzung die kontrollierte Anbindung von Antikörper an polymere Systeme zu untersuchen. Dabei sollte zunächst eine geeignete Anbindungschemie gefunden werden, die bioorthogonal und unter physiologischen Bedingungen durchführbar ist und die Synthese von definierten HPMA-Copolymeren mit dafür benötigten selektiven funktionellen Gruppen gezeigt werden. Gleichzeitig sollten die Polymer-Antikörper Konjugate gut definiert sein und noch spezifisch an ihre Zielrezeptoren binden. Da dendritische Zellen eine zentrale Rolle in der Aktivierung einer Immunantwort besitzen, sollte dabei speziell die Verwendung des DC-spezifischen, monoklonalen Antikörpers aDEC-205 eruiert werden.

Der Transport von modifizierter p-DNA in eukaryotische Zellen (Transfektion) stellt hohe Anforderungen an polymere Träger dar. Gleichzeitig ist es aber eine wirkungsvolle Methode, um Zellen gezielt und effizient zu beeinflussen und zu regulieren. Darüber hinaus gibt es speziell für die Aktivierung von Dendritischen Zellen modifizierte p-DNA-

Konstrukte. Daher war es eine weitere Aufgabenstellung poly[HPMA] basierte Polymere zu synthetisieren, die einen effizienten Transport von p-DNA in Zellen ermöglichen. Dabei sollten genauer Blockcopolymeren bestehend aus einem kationischen Polylysin-Segment zur p-DNA Komplexierung und einem hydrophilen Poly[HPMA] Block als abschirmende Korona über den RAFT-Prozess synthetisiert werden, da auf diese Weise beide Blöcke biokompatibel sind. Dabei sollte die Fähigkeit der Polyplexbildung dieser Blockcopolymeren mit p-DNA untersucht werden. Die Polyplexe mussten weiterhin auf ihre Effizienz hin p-DNA in Zellen zu transportieren getestet werden (Transfektionseffizienz) und gleichzeitig mögliche Zytotoxizität kontrolliert werden. Darüber hinaus sollte durch chemische Modifikation die Transfektionseffizienz dieser Polyplexe ohne Steigerung der Zytotoxizität verbessert werden.

Schließlich war es noch Aufgabenstellung eine Methode zu entwickeln, um die Anbindung von monoklonalen Antikörpern als Erkennungsstrukturen auch auf komplexere Strukturen wie polymeren Mizellen und oder andere Nanopartikel (zum Beispiel zuvor gennante Polyplexe) zu realisieren. Zentral ist hierbei eine Limitierung der Bindungsstellen am Antikörper.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Polymer-Antikörper Konjugate

4.1.1 Synthese, Charakterisierung und zellbiologische Evaluierung von Polymer-Antikörper Konjugaten mit statistisch-Maleinimid modifizierten HPMA-Copolymeren

Polymer-Antikörper Konjugate sind im Allgemeinen sehr vielversprechend, weil sie die Anbindung zahlreicher „Wirkstoffe“ über das Polymer ermöglichen, ohne den Antikörper zu sehr zu beladen und gleichzeitig einen zielgerichteten Transport gewährleisten.

Für die kovalente Verknüpfung von synthetischen Polymeren und biologischen Molekülen und speziell Antikörpern existieren zahlreiche geeignete Ligationsmethoden.^[46] Sehr gut geeignet und daher sehr häufig verwendet ist die „*Michael-Addition*“ von Nucleophilen an α,β -ungesättigte Dicarbonylverbindungen, wie die Reaktion von Thiolen mit Maleinimiden. Diese Reaktion kann relativ schnell unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden und ist daher zweckmäßig für die Anbindung von Antikörpern an Polymere um möglichst milde Reaktionsbedingungen zu gewährleisten (Abbildung 4.1).

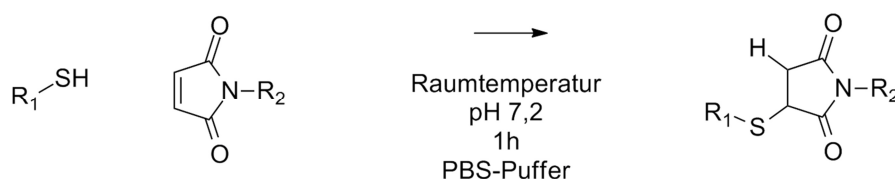


Abbildung 4.1: „*Michael Addition*“ von Thiolen an Maleinimide unter physiologischen Bedingungen

Für die gezielte Synthese von Polymer-Antikörper Konjugaten muss daher zunächst die Darstellung eng verteilter Maleinimid-funktionalisierter Polymere sowie die gezielte Einführung von Thiol-Gruppen am Antikörper erreicht werden.

Wie schon in 1.3.3. beschrieben ist die Synthese von Poly[Pentafluorophenyl Methacrylat] (p[PFMA]) über den RAFT-Prozess möglich. Die so erhaltenen engverteilten Reaktivester

Polymere lassen sich polymeranalog mit 2-Hydroxypropylamin (HPA) unter milden Bedingungen und unter Einhaltung der Polymerstruktur selektiv zu Poly(*N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid) p[HPMA] umsetzen. Ein großer Vorteil im Vergleich zur direkten Polymerisation von *N*-2-Hydroxypropyl Methacrylamid besteht darin, dass sich das Reaktivester Polymer p[PFMA] eng verteilt darstellen lässt und zudem genau charakterisieren lässt (GPC in THF). Zusätzlich lassen sich bei der polymeranalogen Umsetzung eine Vielzahl zusätzlicher funktioneller Gruppen unter Einhaltung der definierten Polymerstruktur einführen. Auf diese Weise sind gut definierte, ideal statistische und funktionelle HPMA-Copolymere zugänglich.

Diese Methode soll nun genutzt werden, um gut definierte, Maleinimid-funktionalisierte HPMA-Copolymere zu erhalten. Die RAFT-Polymerisation von Pentafluorophenyl Methacrylat (PFMA) mit 4-Cyano-4-((thiobenzoylsulfanyl)pentansäure (Säure-CTA) als Kettentransferreagenz liefert eng verteiltes p[PFMA] mit gut einstellbarem Molekulargewicht. Die Dithioester-Endgruppe wurde anschließend noch durch Reaktion mit einem Überschuss an 4,4-azobis(4-cyanovaleriansäure) (ACVA) entfernt, um Zelltoxizität und Nebenreaktionen während der polymeranalogen Umsetzung zu vermeiden (Abbildung 4.2).^[144]

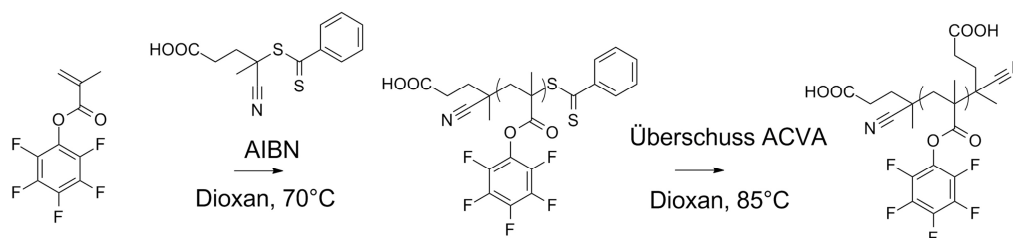


Abbildung 4.2: Synthese von p[PFMA] über den RAFT-Prozess

Die erfolgreiche Entfernung der Dithioester-Endgruppe kann mittels UV-Spektroskopie überprüft werden. Der aromatische Rest des Säure CTA's absorbiert bei 302 nm. Nach Polymerisation ist die Endgruppe noch zu erkennen und nach Reaktion mit einem Überschuss ACVA ist sie vollständig verschwunden (Abbildung 4.3).

Abbildung 4.4 zeigt die Elugramme für die Gel-Permeations-Chromatographie mit Tetrahydrofuran als mobile Phase (THF-GPC) von p[PFMA] Polymeren zwei verschiedener Ansätze.

Ergebnisse und Diskussion

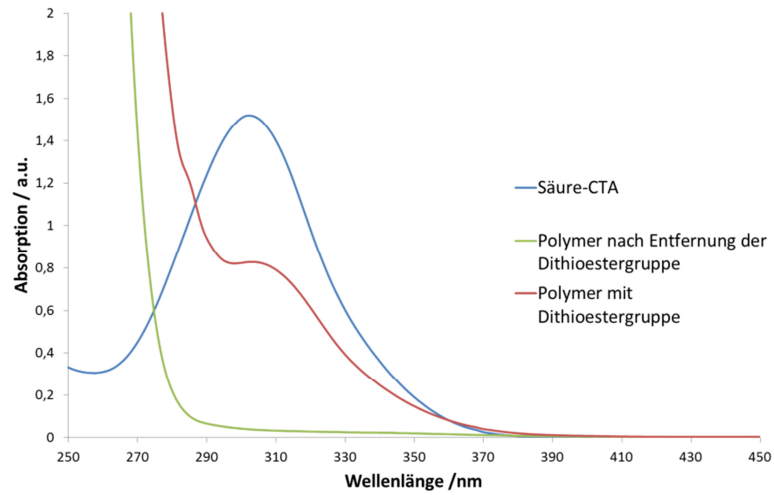


Abbildung 4.3: Beweis für Entfernung der CTA-Endgruppe nach der RAFT-Polymerisation mit Säure-CTA durch ACVA

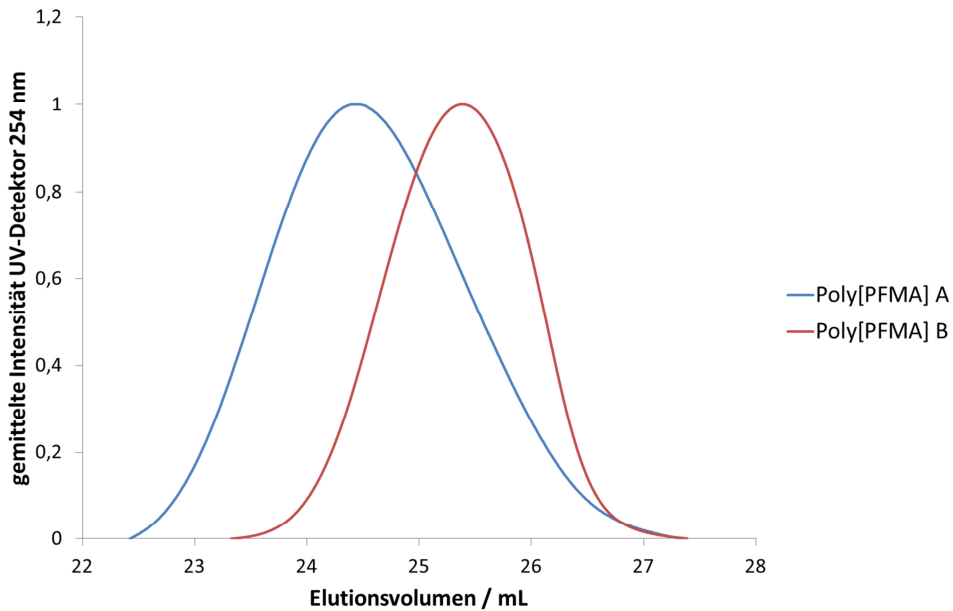


Abbildung 4.4: GPC in THF von p[PFMA] A/B

Tabelle 4.1: Charakterisierung von p[PFMA] A/B

	Mol-Verhältnis AIBN/CTA /Monomer	Mn/Mw GPC (THF)	\bar{D} GPC (THF)	Mn(soll)
p[PFMA] A	1/10/2394	29.700/ 38.300	1,29	30.000
p[PFMA] B	1/10/1574	21.300/ 25.200	1,19	20.000

Das reaktive Vorläuferpolymer **p[PFMA] A** wurde anschließend polymeranalog zum entsprechenden HPMA Polymer umgesetzt, wobei gleichzeitig ein Farbstoff und ein Linker zur gezielten Anbindung der Maleinimid-Gruppe eingeführt werden kann. Nach Deblockierung des Linkers im Säuren kann das Maleinimid über eine aktivierter Säure-Gruppe an das Polymer gebunden werden. Dieser Linker ist notwendig, da sich das Maleinimid schnell unter den polymeranalogen Bedingungen zersetzt und um eine ausreichende Flexibilität der Maleinimid-Gruppe zu gewährleisten (Abbildung 4.5).

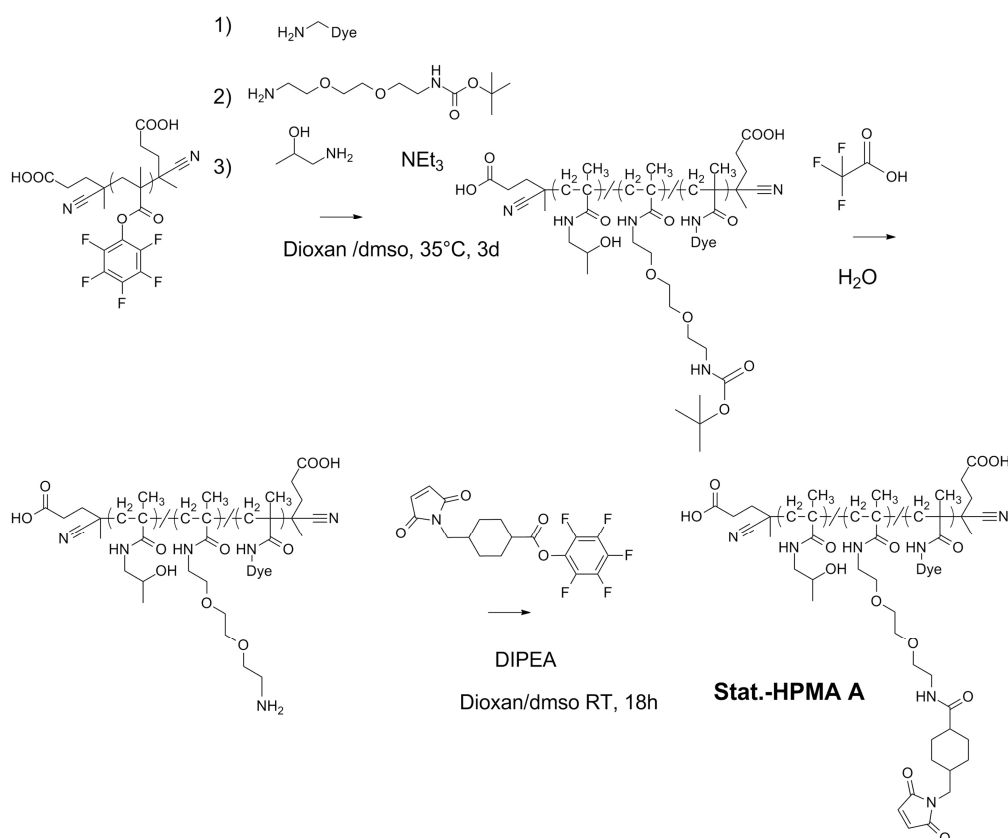


Abbildung 4.5: Synthese von statistisch Maleinimid modifiziertem, Farbstoff gekoppeltem HPMA-Copolymer **Stat.-HPMA A**

Das so erhaltene statistische-Maleinimid modifizierte Copolymer **Stat-HPMA A** kann über GPC in Hexa-fluoroisopropanol (HFIP), zu Kontrolle der definierten Polymerstruktur nach polymeranalogen Modifizierung, sowie mittels $^1\text{H-NMR}$ zur Quantifizierung der Maleinimid-Gruppen pro Polymerkette charakterisiert werden (Tabelle 4.2).

Des Weiteren kann durch die Reaktion mit Cystein die Maleinimid-Gruppe gezielt abreagieren und so ein geeignetes Referenz Polymer für spätere biologische Versuche erhalten werden (**Stat-HPMA A Referenz**) (Abbildung 4.6). Dies ist erforderlich, um

unspezifische Wechselwirkungen zwischen der Maleinimid-Gruppe des Polymers und freien Thiol-Gruppen auf der Zelloberfläche zu vermeiden.^[145, 146]

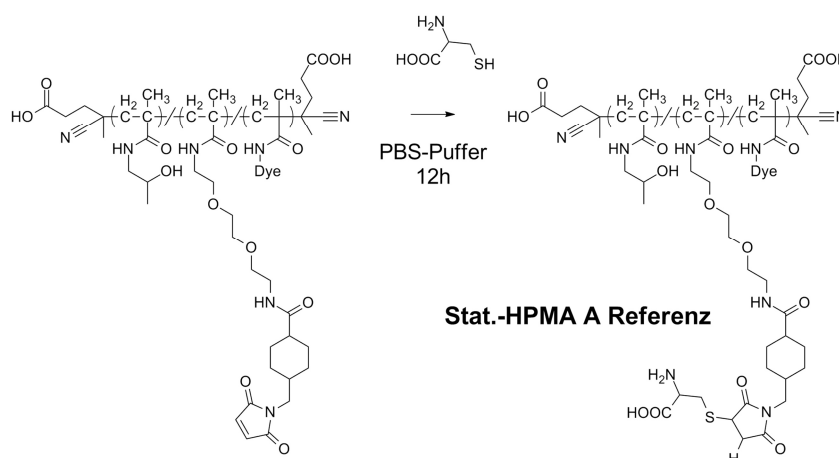


Abbildung 4.6: Gezieltes Abquenzen der Maleinimid-Gruppe mit Cystein (Stat-HPMA A Referenz)

Tabelle 4.2: Charakterisierung von Stat.-HPMA A/ Referenzpolymer

	Maleinimid/ Polymer (NMR)	Mn/Mw Berechnet aus Polymerstruktur	D GPC (HFIP)
Stat-HPMA A	10	20.200/ 26.050	1,31
Stat-HPMA A Referenz		20.200/ 26.050	1,29

Durch Reaktion dieser Maleinimid-modifizierten Polymere mit Thiol-modifizierten Antikörpern lassen sich nun Polymer-Antikörper Konjugate erhalten (Abbildung 4.7).

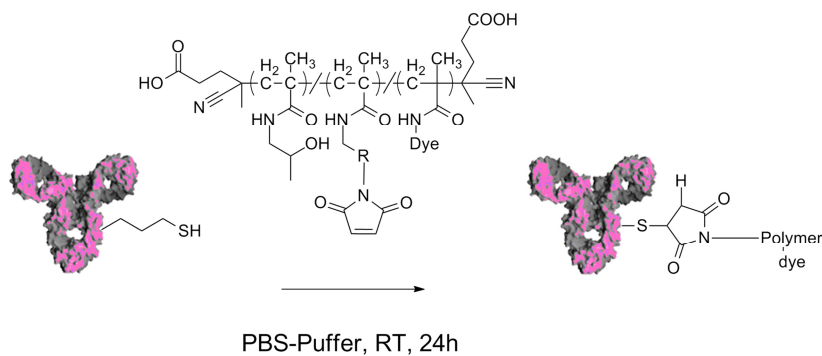


Abbildung 4.7: Synthese des Polymer-Antikörper Konjugats über die Reaktion von Maleinimid-modifiziertem HPMA-Polymer und Thiol-modifiziertem Antikörper

Native Antikörper besitzen allerdings keine freien Thiol-Gruppen, da die Cysteine zur Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den einzelnen Untereinheiten zur Stabilisierung des Antikörpers genutzt werden. Zur Erzeugung von freien Thiol-Gruppen können diese natürlich vorkommenden Disulfid-Brücken mit Dithioerithrol (DTT) reduziert werden. In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben für die Reduktion mit DTT. So ist die Verwendung von 1,7 M DTT beschrieben.^[50] Allerdings zeigt sich, dass schon bei der Verwendung von 1 M DTT der Antikörper denaturiert und in Fragmente zerlegt wird (Abbildung 4.8A). Als Nachweis wurde eine SDS-PAGE verwendet. Es konnte kontrolliert werden, ob der Antikörper (~ 150 kDa) durch die Reduktionsbedingungen fragmentiert wird (<< 150 kDa) oder ob das Polymer kovalent gebunden wurde (>> 150 kDa, da das Konjugat kaum im Gelnetzwerk wandern kann).

Die kontrollierte Reduktion mit 0,1 mM DTT wird als vorteilhaft beschrieben, da so nur Disulfid-Brücken in der Gelenk-Region des Antikörpers reduziert werden und die Bindungsstellen unbeeinflusst bleiben.^[147] Mit dieser Konzentration konnte zwar keine Fragmentierung beobachtet werden, aber nach Umsetzung mit Maleinimid-modifiziertem Polymer **Stat.-HPMA A** wurde nur sehr wenig Konjugat beobachtet (Abbildung 4.8B, mit Pfeil markiert). Dies zeigt, dass es für diese Methode viel Optimierung braucht, um geeignete Bedingungen zu finden. Darüber hinaus scheint eine vollständige Umsetzung des Antikörpers mit dieser Methode unwahrscheinlich, welche sehr erstrebenswert ist, da freies Polymer aufgrund der Größe wesentlich einfacher abgetrennt werden kann als ungebundener Antikörper. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung des Traut's Reagenzes 2-Iminoethanol (2-IT). Es wandelt ϵ -Amino-Gruppen von Lysinseitenketten über eine nukleophile Ringöffnung in Thiol-Gruppen um.^[48] Hierbei besteht die Möglichkeit über die Menge an verwendetem 2-IT die Anzahl an erzeugten Thiol-Gruppen zu steuern, um einerseits eine effiziente Anbindung des Polymers zu erreichen und andererseits die Modifikation am Antikörper so gering wie möglich zu halten (Abbildung 4.9).

Als Modell Antikörper diente hier ein monoklonaler und ein polyklonaler Antikörper. Als monoklonaler Antikörper wurde aRAGE (Abbildung 4.10 A) ausgewählt, da der „Receptor for Advanced Glycation“ end-Products (RAGE) bei vielen Krankheiten eine Rolle spielt. Als polyklonaler Antikörper diente humanes Immunglobulin (huIgG) (Abbildung 4.10 B) verwendet, um die Bindung an verschiedenen Immunzellen zu testen.

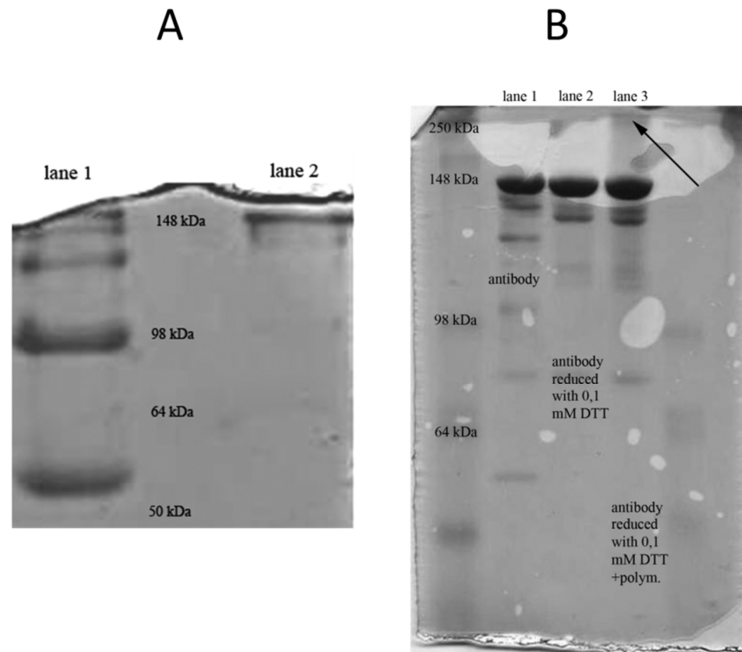


Abbildung 4.8: Reduktion eines Testantikörpers: A) Spur2: nativer Antikörper, Spur1: Antikörper reduziert mit 1 M DTT; B) Spur1: nativer Antikörper, Spur2: Antikörper reduziert mit 0,1 mM DTT, Spur3: Antikörper reduziert mit 0,1 mM DTT und direkte Umsetzung mit Stat.-HPMA A für 24 Stunden

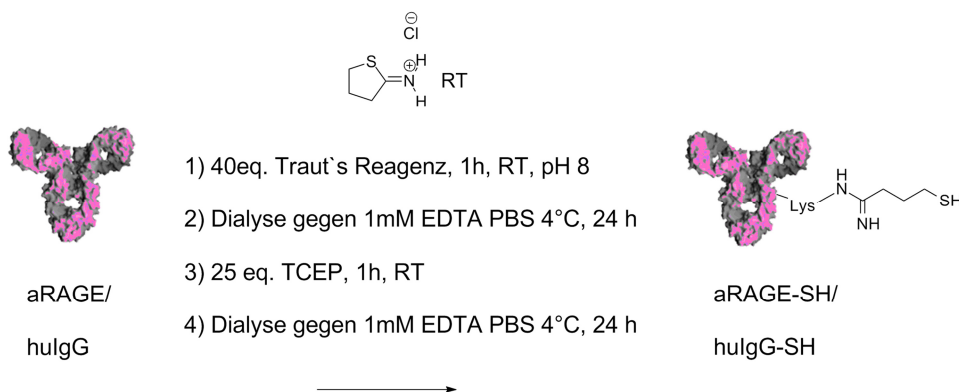


Abbildung 4.9: Gezielte Einführung von Thiol-Gruppen an Antikörper über Traut's Reagenz 2-IT

Es zeigte sich, dass mit 40eq. 2-IT, bezogen auf den Antikörper, Polymer-Antikörper Konjugate erhalten werden konnten (Abbildung 4.10 A/B, Spur 5). Dabei wurde nach Modifizierung mit 2-IT eine zusätzliche Bande beobachtet werden (Abbildung 4.10 A/B, Spur 2). Dies ist wahrscheinlich auf eine partielle Oxidation der Thiol-Gruppen zurückzuführen, was zu vernetzten Antikörpern führt. Die entsprechenden Disulfid-Gruppen konnten allerdings durch Zugabe von Tris(2-Carboxyethyl)phosphin (TCEP), ein wasserlösliches Reduktionsmittel, welches im Vergleich zu DTT irreversibel reagiert, wieder reduziert werden. Die intermediär gebildeten Aggregate konnten so vollständig

entfernt werden und gleichzeitig die Antikörper Struktur erhalten werden (Abbildung 4.10 A/B, Spur 3).

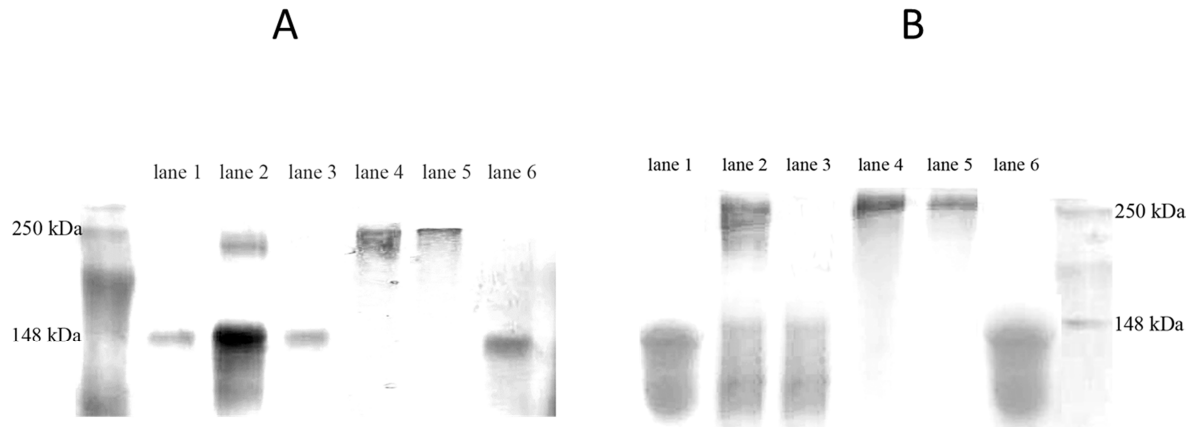


Abbildung 4.10: SDS-PAGE der verschiedenen Konjugationsschritt von A) monoklonalem aRAGE-Antikörper und B) polyklonalem huIgG: Spur 1: nativer AK, Spur 2: AK modifiziert mit 40 eq. Traut's Reagenz 2-IT, Spur 3: nach Reduktion mit 25 eq. TCEP, Spur 4: Nach Umsetzung mit Stat.-HPMA A, Spur 5: Nach Abtrennung von freiem Polymer, Spur 6: Umsetzung von Stat.-HPMA A mit nativem, unmodifiziertem AK

Die Thiol-modifizierten Antikörper wurden im Anschluss mit dem **Stat.-HPMA A** Polymer (260 eq. Polymer bezogen auf den Antikörper) konjugiert (Abbildung 4.7). Dies führte zu einer vollständigen Umsetzung der modifizierten Antikörper zu **Stat.-aRAGE-** und **Stat.-huIgG** Konjugaten (Abbildung 4.10 A/B, Spur 4), ohne Rückstände von unmodifiziertem Antikörper. Es wurde ein hoher Überschuss an Polymer **Stat.-HPMA A** verwendet, um eine vollständige Umsetzung zu gewährleisten. Der Überschuss an Polymer konnte durch mehrfache zentrifugale Filtration mit Amicon-Filtern® (MWCO 100 kDa) aufgrund der Größenunterschiede von Polymer (~20 kDa) und Konjugat (>> 150 kDa) einfach abgetrennt werden (Abbildung 4.10 A/B, Spur 5). Die Umsetzung von Polymer **Stat.-HPMA A** mit Antikörper ohne Modifizierung mit 2-IT führte nicht zu Bildung von Konjugaten. (Abbildung 4.10 A/B, Spur 6).

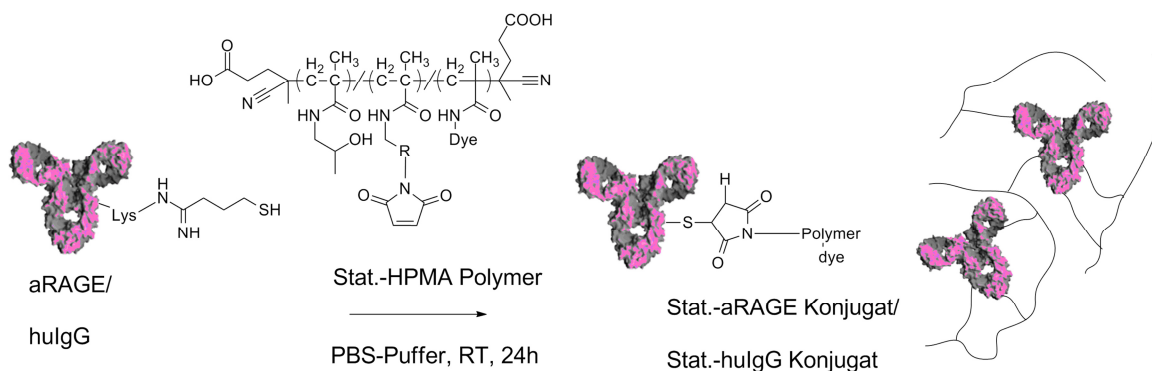


Abbildung 4.11: Konjugation von Thiol-modifiziertem aRAGE Antikörper / huIgG mit Stat.-HPMA Polymer

Für die Reaktion von Maleinimiden mit Thiolen ist bekannt, dass sie innerhalb einer Stunde abläuft. Es wurde eine wesentlich längere Reaktionszeit genutzt um sicher zu stellen, dass die Reaktion beendet ist, da es bei der Reaktion von zwei Makromolekülen zu sterischen Hinderung kommen kann. Über die SDS-PAGE kann die Bildung der Konjugate sowie die Abwesenheit von ungebundenem Antikörper nachgewiesen werden. Bei der Reaktion von multifunktionellem Antikörper (mehrere Thiol-Gruppen) mit multifunktionellen Polymer (mehrere Maleinimid-Gruppen) kann es zu Bildung von größeren Aggregaten kommen. Um die Antikörper-Polymer Konjugate genauer zu charakterisieren, wurde daher SEC in wässrigem, gepufferten Laufmittel (0,05 M Na_3PO_4 , 0,15 M NaCl, pH 7) durchgeführt (Abbildung 4.12).

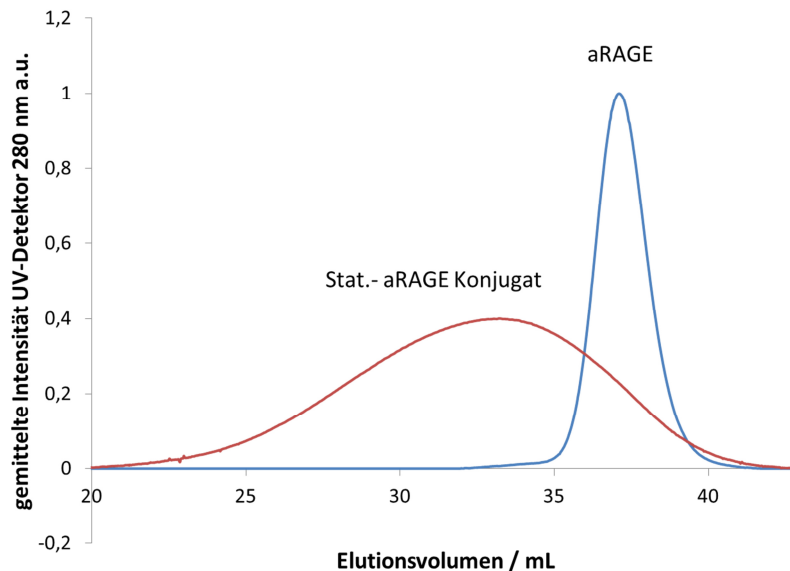


Abbildung 4.12: SEC in gepuffertem Medium (0,05 M Na_3PO_4 , 0,15 M NaCl, pH 7; Superose[®] 6 10/300 GL Säule) von aRAGE und Stat.-aRAGE Konjugat

Durch Kalibration mit Protein-Standards kann so eine Aussage sowohl über die Größe als auch über die Dispersität der Konjugate gemacht werden. Für den freien Antikörper ergab sich ein Molekulargewicht von 138.000 mit einer Dispersität von 1,08. Für das Polymer-Antikörper Konjugat wurde ein Molekulargewicht von 308.000 mit einer Dispersität von 1,6 erhalten. Aus dem Molekulargewicht des Konjugates verglichen mit freiem Antikörper, lässt sich schließen, dass es zu Bildung von nano-Aggregaten von ein bis drei Antikörpern verbunden durch mehrere Polymerketten kommt. Die geringe Dispersität zeigt, dass durch den hohen Überschuss an reaktivem Polymer die Bildung von großen Aggregaten

unterdrückt werden kann. Des Weiteren zeigt das Elugramm des Konjugates, dass ungebundenes Polymer erfolgreich abgetrennt werden konnte.

Um die Konjugate weiter zu charakterisieren, wurde Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (FCS) in PBS-Puffer gemessen (Abbildung 4.13). Über das Farbstoff-markierte Polymer kann so die Größe von freiem Polymer und Polymer-Antikörper Konjugat bestimmt werden. Für freies Polymer wurde ein hydrodynamischer Radius von 2,4 nm erhalten und für das Konjugat 14 nm. Für den nativen Antikörper kann ein hydrodynamischer Radius von 5-6 nm angenommen werden.^[148] Dies verdeutlicht nochmals die Bildung von nano-Aggregaten von ein bis drei Antikörpern verbunden durch mehrere Polymerketten.

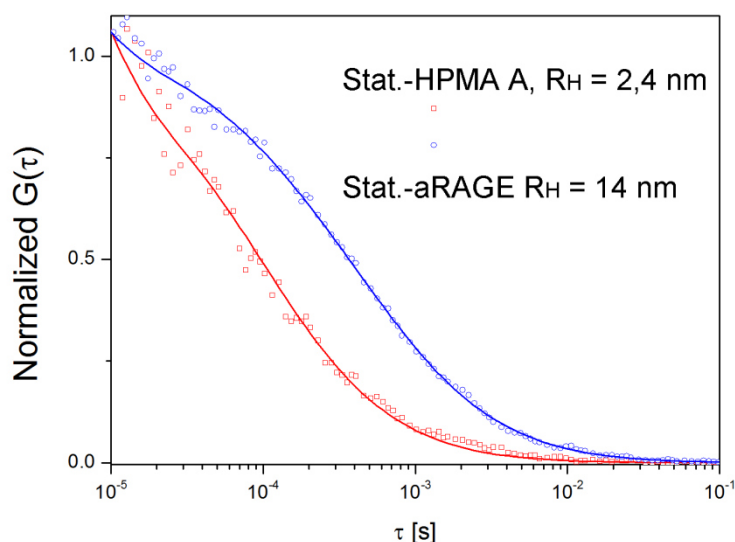


Abbildung 4.13: Autokorrelationskurven für Stat.-HPMA A (rot) und Stat.-aRAGE Konjugat (blau)

In einem nächsten Schritt musste überprüft werden, ob die Antikörper noch spezifisch an ihre Zielrezeptoren binden. Für das Stat.-aRAGE Konjugate wurden humane Endozelzellen der Niere (HEK Flp-In Zellen), welche das Transmembranprotein RAGE überexprimieren, und SK-N-MC Zellen, welche RAGE nicht exprimieren, mit nativem aRAGE und Stat.-aRAGE inkubiert und über Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Wie zu erwarten bindet nativer aRAGE Antikörper nur an Zellen mit RAGE Rezeptor (Abbildung 4.14 A) aber nicht an Zellen ohne RAGE-Rezeptor (Abbildung 4.14 B). Der aRAGE-Antikörper wird dabei über einen sekundären, Cy-3 markierten Antikörper detektiert.

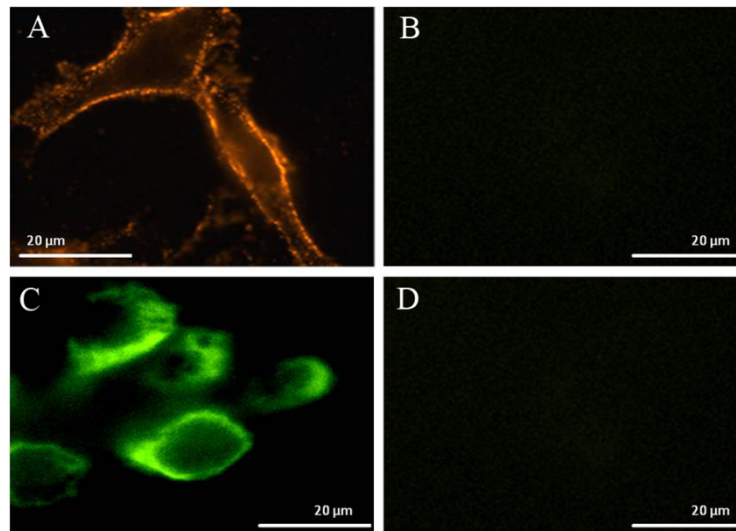


Abbildung 4.14: Fluoreszenzmikroskopie von : A) HEK Flp-In Zellen, RAGE überexprimierend, inkubiert mit aRAGE-Antikörper und versetzt mit einem Cy3-markiertem sekundären Antikörper; B) SK-N-MC cells, nicht RAGE exprimierend, inkubiert mit aRAGE-Antikörper; C) HEK Flp-In Zellen, RAGE überexprimierend, inkubiert mit Stat.-aRAGE-Konjugat and D) SK-N-MC Zellen, nicht RAGE exprimierend, inkubiert mit Stat.-aRAGE Konjugat

Das Polymer-Antikörper Konjugat kann direkt über den polymergebundenen Farbstoff detektiert werden. Es bindet ebenfalls nur an Zellen, welche den RAGE-Rezeptor tragen (Abbildung 4.14 C) und nicht an Zellen ohne den Rezeptor (Abbildung 4.14 D). Sowohl der Antikörper als auch das Konjugat sind dabei an Plasmamembran zu finden, da der Rezeptor ein Transmembranprotein ist und die Zellen immobilisiert sind. Das Polymer ohne Maleinimid-Gruppen, **Stat.-HPMA A Referenz**, bindet weder an Zellen mit noch an Zellen ohne den RAGE-Rezeptor. Um ganz sicher unspezifische Wechselwirkungen auszuschließen, wurden ein „Western-Blot“ durchgeführt.

Dazu wurde der RAGE-Rezeptor (55 kDa) aus Zelllysats über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Überführung auf eine Nitrocellulose-Membran wurde der Rezeptor mit nativem aRAGE-Antikörper inkubiert, welcher anschließend mit einem anti-Maus-Antikörper, der mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (engl.: „Horse radish peroxidase“) gekoppelt war und so mit dem entsprechenden ECL-Substrat detektiert wurde.

Es konnten zwei Banden, entsprechend der glykosylierten (oberen Bande) und der unglykosylierten Form des Rezeptors (untere Bande) erkannt werden (Abbildung 4.15, Spur 2). Auch nach der Inkubation mit Stat.-aRAGE, welcher direkt über den Polymerfarbstoff detektiert werden kann, sind nur zwei Banden, wieder für die glykosylierte und unglykosylierte Form des Rezeptors, auf der Höhe des Rezeptors zu sehen (Abbildung 4.15, Spur 4).

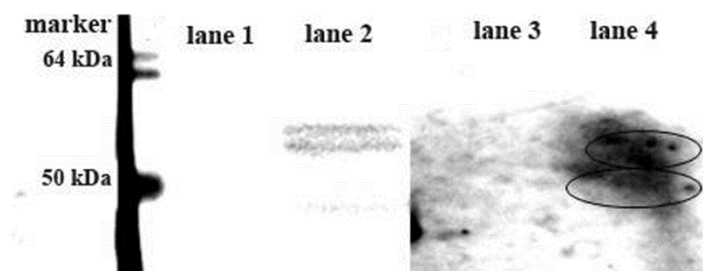


Abbildung 4.15: Western-Blot: i) SK-N-MC Zelllysate, nicht RAGE exprimierend, aufgetrennt über SDS-PAGE, auf Nitrocellulose übertragen und inkubiert mit: Spur1: aRAGE, detektiert mit einem Enzymgekoppelten, sekundären Anti-Maus-Antikörper und dem entsprechenden ECL-Substrat; Spur3: Stat.-aRAGE-Konjugat (Detektion über Polymerfarbstoff). ii) HEK Flp-In Zelllysate, RAGE überexprimierend, aufgetrennt über SDS-PAGE, auf Nitrocellulose übertragen und inkubiert mit: Spur2: aRAGE-Antikörper, detektiert mit einem Enzymgekoppelten, sekundären Anti-Maus-Antikörper und dem entsprechenden Anti-Maus-Antikörper, Spur4: Mit Stat.-aRAGE-Konjugat (detektiert über Polymerfarbstoff)

Dies zeigt, dass der Antikörper, modifiziert durch zahlreiche Polymerketten, immer noch spezifisch an den Rezeptor bindet und keine unspezifischen Wechselwirkungen zeigt.

Um zu testen, ob das huIgG Konjugat noch spezifisch an den Zielrezeptor bindet, wurden Bindungsstudien an verschiedenen Zellen des Immunsystems durchgeführt. Nativer polyklonaler huIgG bindet über den F_C-Teil des Antikörpers an F_C-Rezeptoren, welche auf mononuklearen, peripheren humanen Blutzellen zu finden ist (engl.: peripheral blood mononuclear cells PBMC's, bestehend aus Monozyten, B- und T-Zellen). Der Rezeptor wird dabei zum größten Teil von Monozyten und nur sehr wenig von B- und T-Zellen exprimiert. Über den polymergebundenen Farbstoff Oregon Green kann über FACS die Bindung von freiem Polymer ohne Maleinimid-Gruppen **Stat.-HPMA A Referenz** mit dem **Konjugat Stat.-huIgG** an Monozyten, B- und T-Zellen verglichen werden, um zwischen spezifischen und unspezifischen Wechselwirkungen zu unterscheiden. Die verschiedenen Zelltypen können dabei anhand der Expressierung bestimmter Oberflächenmoleküle vorher über FACS detektiert und getrennt werden. Es wurden FACS-Analysen nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach Inkubation durchgeführt um die Menge an Zellen zu bestimmen, welche positiv für den Polymerfarbstoff sind (Abbildung 4.16).

Betrachtet man zunächst nur die zellassoziierte Fluoreszenz des Polymers Stat.-HPMA A Referenz, findet man den höchsten Wert nach 16 Stunden bei Monozyten (mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) 65). Im Gegensatz dazu zeigt das Polymer alleine nach 16 Stunden fast gar keine Bindung, weder an B-Zellen noch an T-Zellen. Dies ändert sich deutlich nach Konjugation mit huIgG.

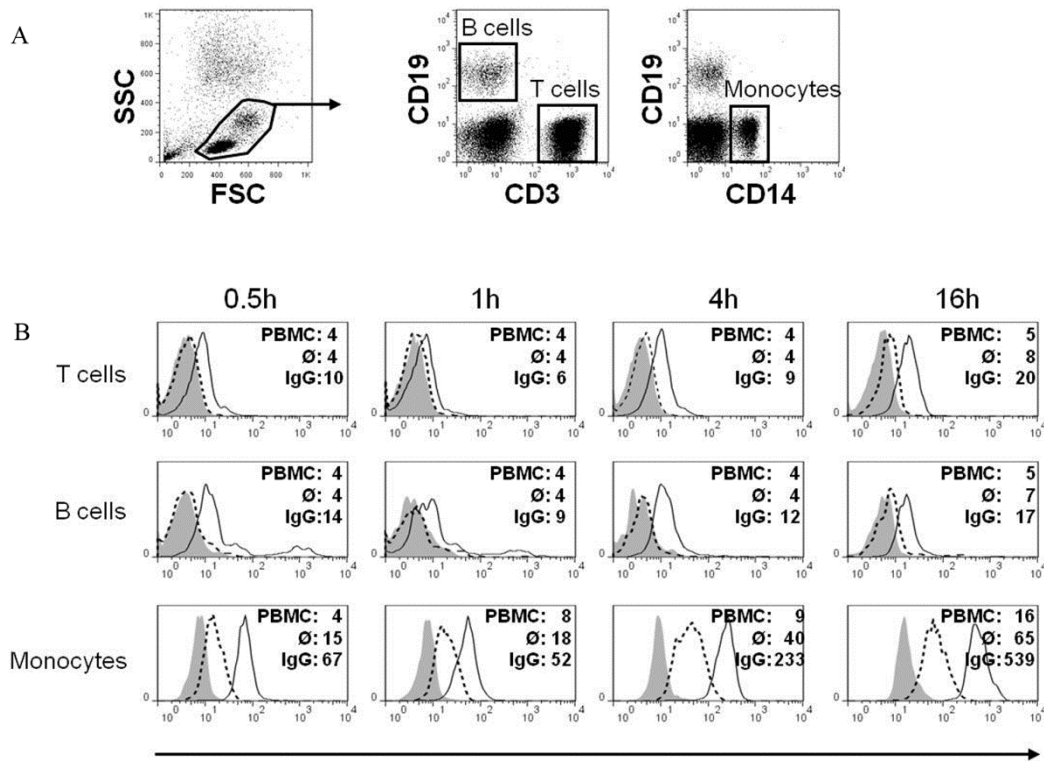


Abbildung 4.16: A) Unterschiedliche Gates zur Sortierung von PBMC's basierend auf farbstoffgekoppelten mAb: anti-CD₃ (T-Zellen), anti-CD₁₄ (Monozyten), und anti-CD₁₉ (B-Zellen). B) Intensität von zellassoziierter Fluoreszenz: gemittelte Fluoreszenz Intensitäten von PBMC's alleine (grau, neg. Kontrolle), PBMC's +Stat.-HPMA A Referenz (gepunktet) und PBMC's mit Stat.-huIgG Konjugat (liniert)

In allen Fällen steigt die zellassozierte Fluoreszenz für **Stat.-huIgG** deutlich. Im Falle von B- und T-Zellen scheint der absolute Anstieg nicht sehr groß, aber verglichen mit freiem Polymer bindet das Konjugat fast verdoppelt so gut. Zudem sind B- und T-Zellen dafür bekannt, den F_C-Rezeptor nur sehr wenig zu exprimieren. Der höchste Wert ist wieder für Monozyten zu allen Zeitpunkten zu finden. Die zellassozierte Fluoreszenz ist eine Größenordnung höher verglichen zum Polymer alleine. Der viel höhere Wert von Monozyten im Vergleich zu B- und T-Zellen ist zum einem dadurch begründet, dass Monozyten den F_C-Rezeptor viel stärker exprimieren und zum anderen wird die Bindung durch die Phagozytose der Monozyten weiter begünstigt, weshalb freies Polymer zu allen Zeitpunkten schon bindet (unspezifische Wechselwirkungen).

Dies zeigt auch wieder sehr deutlich, dass auch polyklonaler huIgG nach Konugation von mehreren Polymerketten noch spezifisch an den Zielrezeptor bindet.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das **Stat.-HPMA A** Polymer in den verwendeten Konzentrationen von 10 µg/mL nicht toxisch ist, da keine Veränderungen der PBMC's im FACS detektiert werden konnte (Abbildung 4.17, MTT Assay).

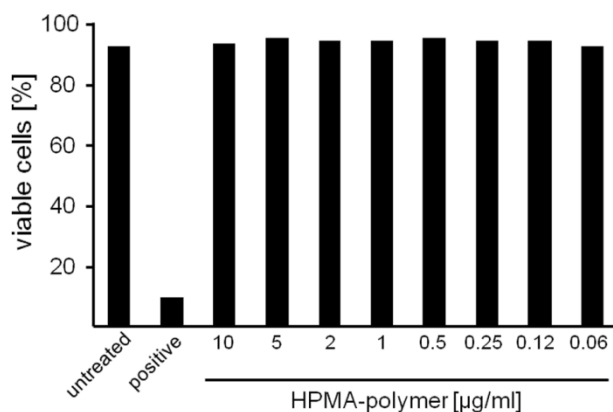


Abbildung 4.17: PBMC's inkubiert mit verschiedenen Mengen Stat.-HPMA A Referenz für 16 Stunden. Zellviabilität wurde über den prozentualen Anteil von 7-AAD negative Zellen bestimmt (MTT-Assay). (Eins von drei repräsentativen Experimenten gezeigt; pos. Kontrolle : H₂O₂)

Durch das Traut's Reagenz 2-Iminothiolan konnten Thiol-Gruppen an Antikörper in kontrollierter Art und Weise eingeführt werden. Aber vor allem durch die Verwendung von eng-verteilten, Maleinimid modifizierten HPMA-Copolymeren konnten, unter optimierten Bedingungen, gut definierte Konjugate erhalten (\bar{D} = 1,6). Im Gegensatz dazu führt die Verwendung von weniger gut definierten, Maleinimid modifizierten HPMA-Copolymeren (beispielsweise über freie radikalische Polymerisation erhaltene) zu sehr polydispersen Polymer-Antikörper Konjugaten.^[49, 149] Diese neuen Konjugate stellen somit eine vielversprechende Möglichkeit dar, um bestimmte Zellen selektiv zu adressieren und sogar gleichzeitig über das Polymerrückgrad einfache oder auch komplexere Wirkstoffe, wie sie zum Beispiel zur Aktivierung von Immunzellen benötigt werden, zu transportieren.

4.1.2 Synthese, Charakterisierung und zellbiologische Evaluierung von Polymer-Antikörper Konjugaten mit semitelechel-Maleinimid-modifizierten HPMA Copolymeren („Star-like“ Konjugate)

Als nächsten konsequenten Schritt würde die Verwendung von eng verteilten, semitelechelen HPMA-Copolymeren, welche die Maleinimid-Gruppe nur an der Polymer-Endgruppe tragen, zu noch definierteren Konjugaten führen. Denn auf diese Weise erhält man Konjugate aus einzelnen Antikörpern, die mit mehreren Polymerketten „dekoriert“ sind (engl.: „Star-like“ conjugates) (Abbildung 4.18 unten), ohne dass sich Aggregate über die Vernetzung von multifunktionellen Antikörpern und multifunktionellem Polymeren bilden (Abbildung 4.18 oben).

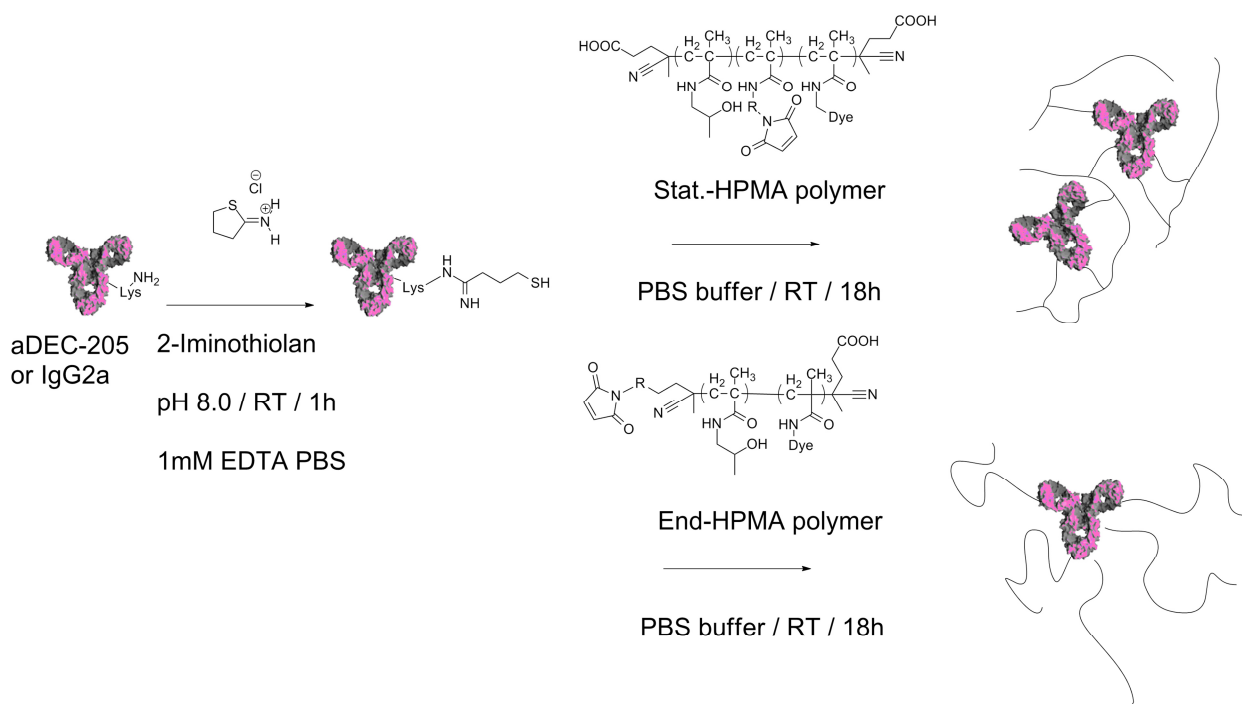


Abbildung 4.18: Synthese von „sternförmigen“ Polymer-Antikörper Konjugaten durch Verwendung von Endgruppe-Maleinimid modifizierten HPMA-Copolymeren (unten)

Diese „sternförmige“ Konjugate ermöglichen wiederum die gleichzeitige Anbindung auch mehrerer komplexerer Funktionalitäten entlang des Polymerrückgrades. Ihre Synthese gelingt über Reaktivester-Polymere ohne die definierte Polymerstruktur des Vorläuferpolymers zu beeinflussen. So sind gut definierte, „ideal statistische“ HPMA-

Copolymere zugänglich, ohne die Problematik stark variierender Copolymerisations-Parametern.

Die meisten HPMA-basierten Konjugate finden Verwendung als Polymere Therapeutika zur direkten Krebstherapie, durch die Kombination von Tumor-Zellen gerichteter Antikörper und polymergebundenen Zytostatika.^[38] Ein ganz anderer Ansatz ist die Tumor-Immuntherapie. Wie schon unter Abschnitt 2.2 einleitend erwähnt, besitzen dendritische Zellen (DC`s) eine Schlüsselrolle in der Immunaktivierung. Zusätzlich bietet der C-Typ Lektinrezeptor DEC-205, welcher zum größten Teil auf dendritische Zellen exprimiert ist, die Möglichkeit DC`s gezielt zu adressieren.

Aus diesem Grund wurde der monoklonale anti-Maus Antikörper aDEC-205 verwendet, um „Sternförmige Konjugate“ (**End-aDEC-205**) zu synthetisieren und die spezifische Aufnahme an Dendritischen Zellen zu testen. Parallel wurden auch Konjugate mit einem IgG2a Isotyp-Antikörper synthetisiert (**End-IgG2a**), da der aDEC-205 Antikörper der Unterklasse IgG2a Antikörper zugehörig ist. Der IgG2a-Isotype Antikörper hat also eine sehr ähnliche Beschaffenheit wie aDEC-205, bindet allerdings nicht an den Zielrezeptor und dient zur Kontrolle für unspezifische Wechselwirkungen. Darüber hinaus wurden zusätzlich noch **Stat.-DEC-205** bzw. **Stat.-IgG2a** Konjugate synthetisiert um die unterschiedlichen Arten von Konjugaten zu vergleichen.

Für die Synthese von HPMA-Copolymeren, welche selektiv an den Polymerendgruppen die Maleinimid-Gruppe tragen, wurde die RAFT-Polymerisation von Pentafluorophenyl Methacrylat (PFMA) mit dem modifizierten Kettentransfer Reagenz Boc-PEG-CTA durchgeführt. Anschließend wurden die CTA-Endgruppen durch Reaktion mit einem Überschuss von ACVA entfernt. Es wurden drei unterschiedliche Molekulargewichte dieses Reaktivester-Polymers mit selektiv modifizierbarer Endgruppe synthetisiert (**Boc-PEG-p[PFMA] A/B/C**) (Abbildung 4.19).

Die Entfernung der Dithioester Endgruppe konnte wieder über die UV-Absorption bei 302 nm überprüft werden (Abbildung 4.20).

Ergebnisse und Diskussion

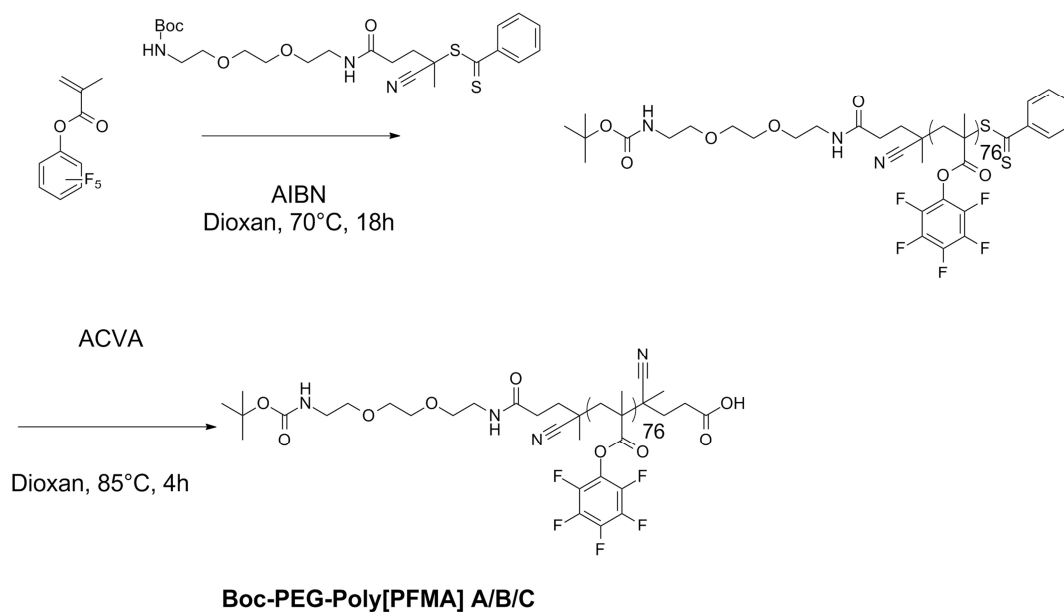


Abbildung 4.19: Synthese von selektiv Endgruppen-modifizierbaren Boc-PEG p[PFMA]

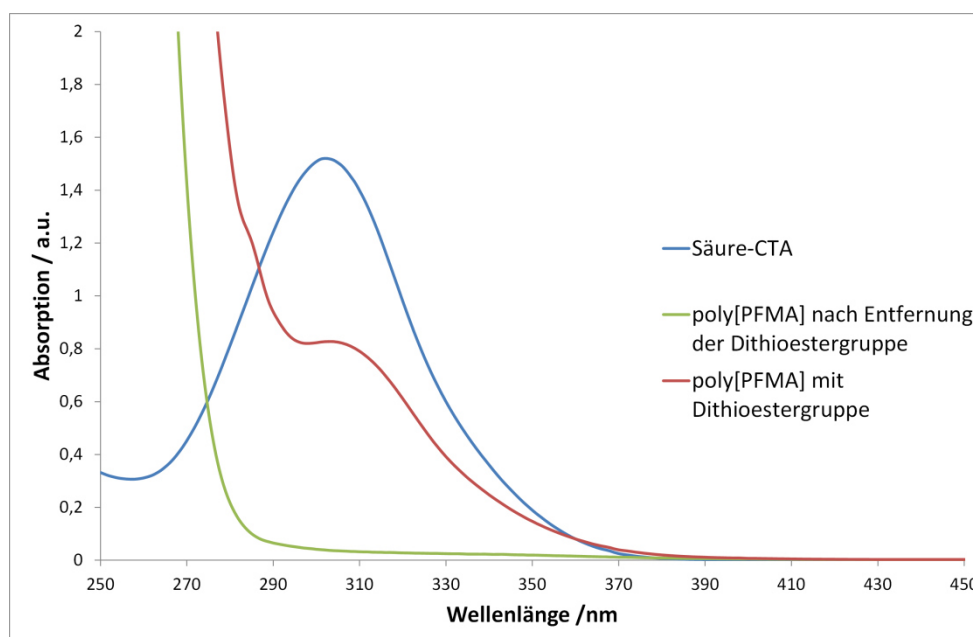


Abbildung 4.20: Beweis für Entfernung der CTA-Endgruppe nach der RAFT-Polymerisation mit Boc-PEG-CTA durch ACVA

Tabelle 4.3 zeigt die unterschiedlichen Molekulargewichte und Abbildung 4.21 die Elugramme der entsprechenden GPC's in THF dreier unterschiedlicher Molekulargewichte. Es zeigt sich, dass sich das Molekulargewicht über das Molverhältnis Monomer/CTA/AIBN steuern lässt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.3: Charakterisierung von Boc-PEG-p[PFMA] A/B/C

	Mol-Verhältnis AIBN/CTA/Monomer	Mn/Mw GPC (THF)	D GPC (THF)	Mn(soll)
Boc-PEG-p[PFMA] A	1/10/2370	34.500/42.000	1,29	30.000
Boc-PEG-p[PFMA] B	1/10/1580	27.900/34.400	1,24	20.000
Boc-PEG-p[PFMA] C	1/10/790	19.200/22.800	1,19	10.000

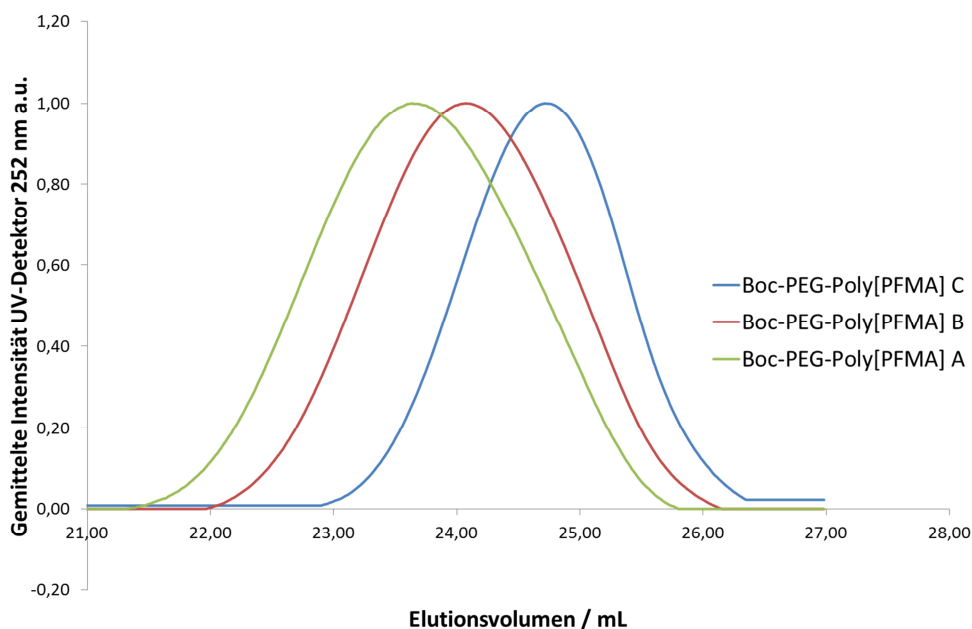
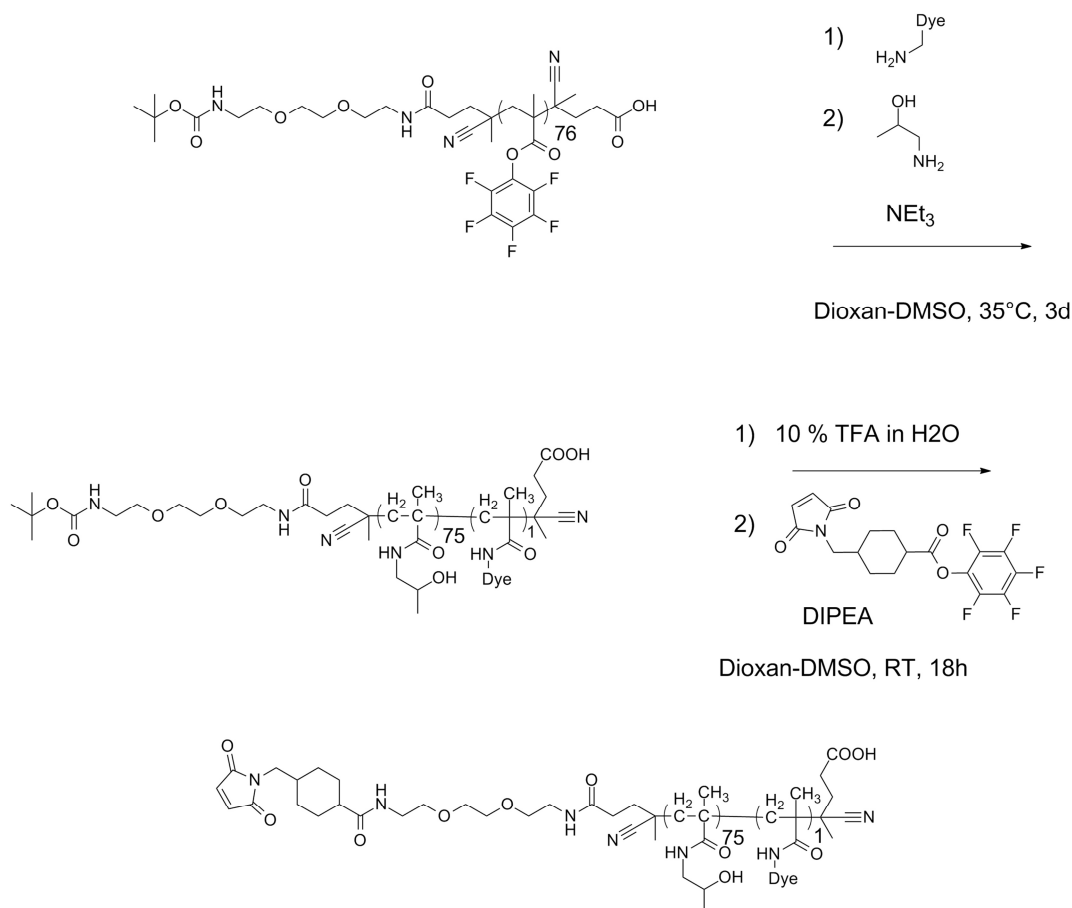


Abbildung 4.21: GPC in THF von Boc-PEG-p[PFMA] A/B/C

Die Reaktivester-Polymere wurden nun wieder polymeranalog zu HPMA-Copolymeren umgesetzt, wobei gleichzeitig wieder ein Farbstoff eingeführt wurde. Anschließend wurde die Boc-Gruppe im Säuren deblockiert und mit dem Maleinimid mit aktivierter Säure-Gruppe versetzt. Auf diese Weise wurde ein gut definiertes, HPMA-Copolymer mit einer Maleinimid-Gruppe ausschließlich an der Polymer-Endgruppe erhalten (**End-HPMA Polymer**)(Abbildung 4.22).

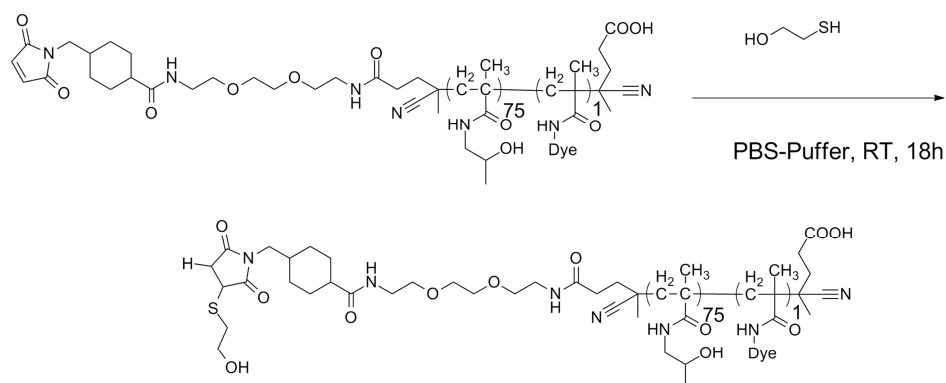


End-HPMA polymer

Abbildung 4.22: Synthese von selektiv Endgruppen-Maleinimid modifiziertem HPMA-Copolymer aus Boc-PEG-Poly[PFMA] C

Es wurde auch hier ein Linker-Molekül zwischen Maleinimid und Polymer eingebaut um eine ausreichende Flexibilität und Zugänglichkeit an der Polymerendgruppe zu gewährleisten. Durch die Reaktion mit β -Mercaptoethanol kann die Maleinimid-Gruppe gezielt abreagiert werden, um unspezifische Wechselwirkungen zwischen der Maleinimid-Gruppe des Polymers und freien Thiol-Gruppen auf der Zelloberfläche zu unterbinden^[145, 146], und so wieder ein geeignetes Referenz Polymer für späteren bio-logische Versuche erhalten werden (**End-HPMA Referenz**) (Abbildung 4.23).

Sowohl **End-HPMA Polymer** als auch das **End-HPMA Referenz Polymer** wurden darüber hinaus mit ¹H-NMR-Spektroskopie, zum Nachweis der Maleinimid-Gruppen und mit GPC in HFIP, zum Nachweis der Erhaltung der Polymerstruktur nach polymeranaloger Modifizierung, charakterisiert. Es wurde zudem wie oben beschrieben zusätzlich noch ein Stat.-HPMA Polymer synthetisiert (**Stat.-HPMA C**) (Tabelle 4.4).



End-HPMA Referenz Polymer

Abbildung 4.23: Gezieltes Abquenen der Maleimid-Gruppe von End-HPMA Polymer mit β -Mercaptoethanol zu End-HPMA Referenz

Tabelle 4.4: Charakterisierung von Stat.-HPMA C und End-HPMA Polymer

	Maleimid/ Polymer (NMR)	Mn/Mw Berechnet aus Polymerstruktur	\bar{D} GPC (HFIP)
End-HPMA	1	10.800/ 12.800	1,25
End-HPMA Referenz		10.200/ 12.800	1,25
Stat.-HPMA C	7	16.600/ 22.600	1,36
Stat.-HPMA C Referenz		16.600/ 22.600	1,36

Die gezielte Einführung von Thiol-Gruppen an aDEC-205 bzw. IgG2a erfolgte wieder über das Traut`s Reagenz 2-Iminoethanol (2-IT). Durch die Menge an 2-IT bezogen auf den Antikörper kann die Menge an erzeugte Thiol-Gruppen gesteuert werden. Diese wurde auch für „sternförmige“ End-Konjugate so gewählt, um die Modifizierung am Antikörper so gering wie möglich zu halten, gleichzeitig aber zu gewährleisten, dass jeder Antikörper mit Polymerketten modifiziert ist. Denn die Abtrennung von freiem Polymer ist aufgrund der Größe wieder wesentlich einfacher als die Abtrennung von unmodifiziertem Antikörper. Für die Synthese von Stat.-aDEC-205/ IgG2a Konjugaten wurden wie zu

erwarten wieder 40eq. 2-IT benötigt um einen vollständigen Umsatz an Antikörper zu erreichen. Für die Synthese von **End-aDEC-205/ IgG2a** wurde dagegen 100 eq. 2-IT bezogen auf den Antikörper benötigt um einen vollständigen Umsatz zu erreichen. Die Thiol-modifiziertem Antikörper mussten nicht mit TCEP reduziert werden, da eine beschleunigte Aufreinigung der Thiol-modifizierten Antikörper über Amicon®-Filter bei 4 °C nicht zur teilweise Oxidation der Thiol-Gruppen führte. Die Antikörper, modifiziert mit 40 eq. 2-IT, wurden anschließend mit 260 eq. **Stat.-HPMA C** umgesetzt und es wurden **Stat.-aDEC-205/ IgG2a** Konjugate erhalten. Die Umsetzung von 140 eq. End-HPMA mit aDEC-205/ IgG2a, modifiziert mit 100 eq. 2-IT, führte zu **End-aDEC-205/ IgG2a** Konjugaten. Der Überschuss Polymer konnte wieder leicht mittels mehrfacher zentrifugaler Filtration mit Amicon®-Filtern (MWCO 100 kDa) abgetrennt werden. Alle Konjugate wurden nochmals mit β-Mercaptoethanol umgesetzt und aufgereinigt, um eventuelle noch vorhandene Maleinimid-Gruppen der Konjugate zu entfernen (Abbildung 4.24).

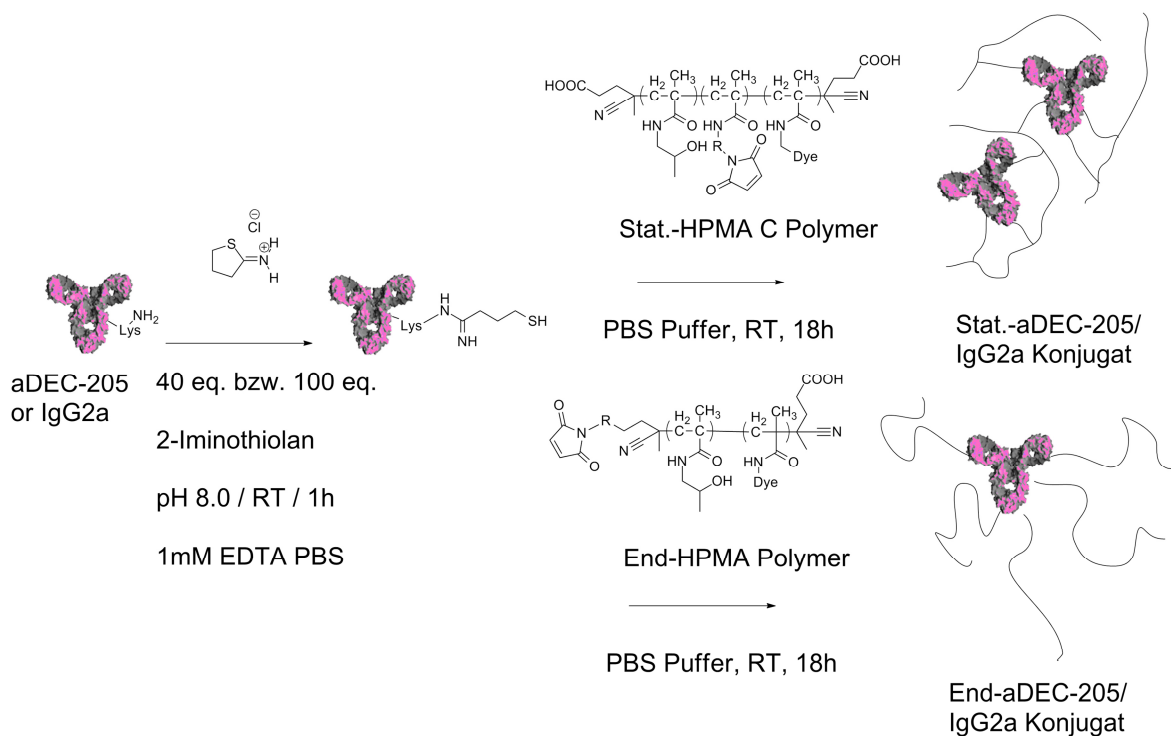


Abbildung 4.24: Synthese von Stat.-aDEC-205/IgG2a und End-aDEC-205/IgG2a Konjugaten

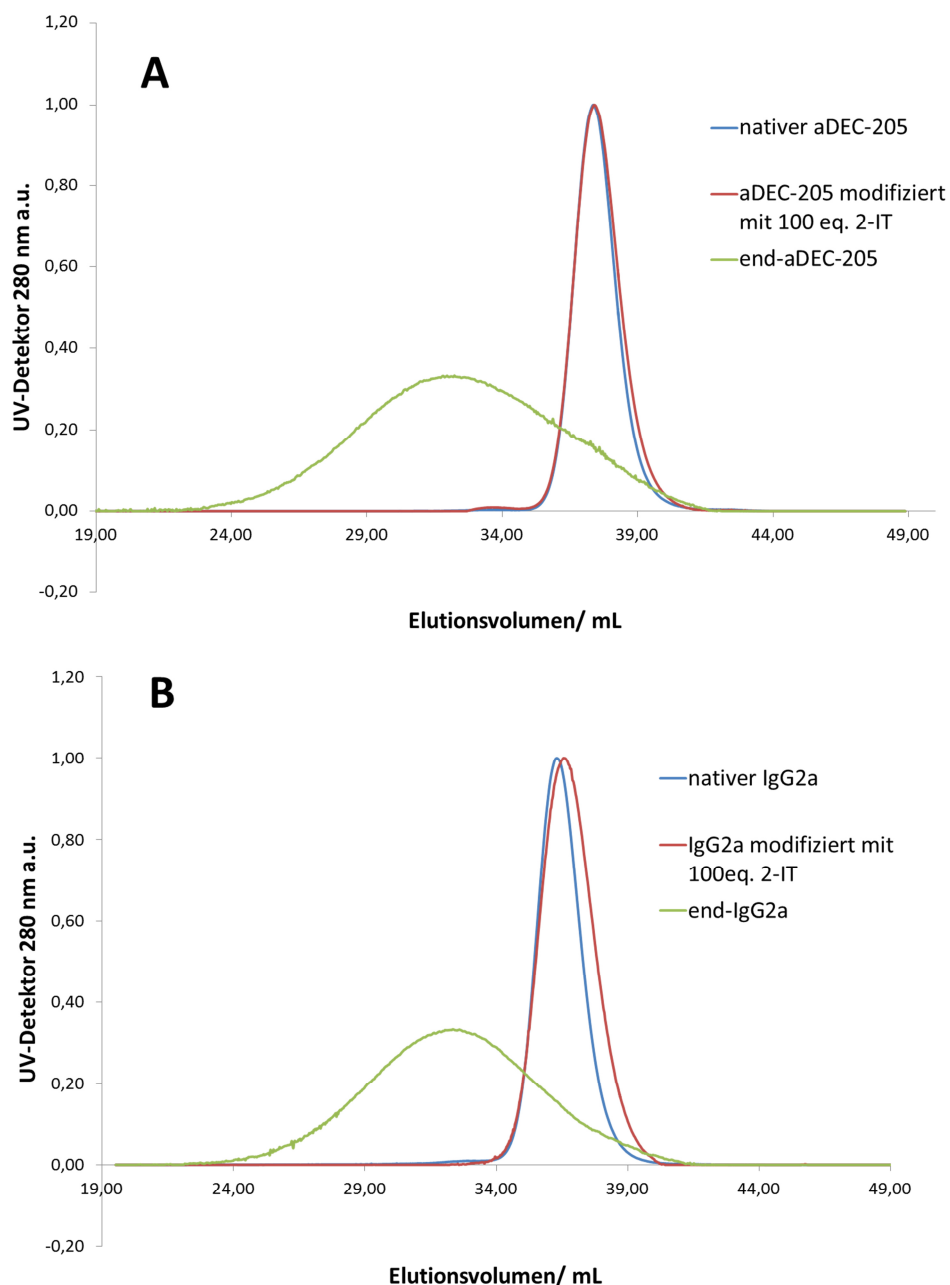


Abbildung 4.25: SEC in gepuffertem Medium (0,05 M Na_3PO_4 , 0,15 M NaCl, pH 7; Superose[®] 6 10/300 GL Säule) von A): nativem aDEC-205, aDEC-205 modifiziert mit 100 eq. 2-IT und End-aDEC-205 und B): nativem IgG2a, IgG2a modifiziert mit 100 eq. 2-IT und End-IgG2a

Um die Konjugation zu verfolgen und um die Konjugate wieder genauer zu charakterisieren wurde SEC in wässrigem, gepuffertem Laufmittel (0,05 M Na_3PO_4 , 0,15 M NaCl, pH 7) durchgeführt. Abbildung 4.25 zeigt die entsprechenden Elugramme für die „sternförmigen“ End-aDEC-205/ IgG2a Konjugate.

Zunächst zeigt sich, dass die Modifikation mit 100 eq. 2-IT nicht zur Bildung von größeren Aggregaten durch mögliche Oxidation der Thiol-Gruppen führt, da die modifizierten Antikörper ähnliche Elugramme aufweisen wie die nativen Antikörper. Erst nach Zugabe

von End-HPMA Polymer bilden sich Konjugate. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass die Konjugate keine erkennbaren Rückstände an unmodifiziertem Antikörper oder freiem Polymer aufweisen. Durch die Kalibrierung auf Protein-Standards können diese wieder genauer charakterisiert werden.

Tabelle 4.5: Charakterisierung der „sternförmigen Konjugate“ End-aDEC-205/IgG2a

	Mn/ Mw	\bar{D} (SEC)
Nativer aDEC-205	128.000/ 136.000	1,07
End-aDEC-205 Konjugat	320.000/ 473.000	1,45
Nativer IgG2a	176.000/ 187.000	1,06
End-IgG2a Konjugat	331.000/ 475.000	1,43

Beide Polymer-Antikörper Konjugate zeigen ein Molekulargewicht von ca. 325.000. Dies zeigt die Anbindung von mehreren Polymerketten an einzelne Antikörper. Darüber hinaus besitzen die Konjugate eine enge Molekulargewichtsverteilung (\bar{D} = 1,45) (Tabelle 4.5).

Im Gegensatz dazu führt wie zu erwarten die Umsetzung von den aDEC-205 bzw. IgG2a, modifiziert mit 40 eq. 2-IT, mit **Stat.- HPMA C** wieder zu kleineren quervernetzten Aggregaten aus 1-3 Antikörpern mit mehreren Polymerketten. Durch den hohen Überschuss an Polymer kann die Bildung von großen Aggregaten verhindert werden (\bar{D} = 1,66). Auch hier sind keine erkennbaren Rückstände an unmodifiziertem Antikörper oder freiem Polymer zu erkennen (Abbildung 4.26).

Ergebnisse und Diskussion

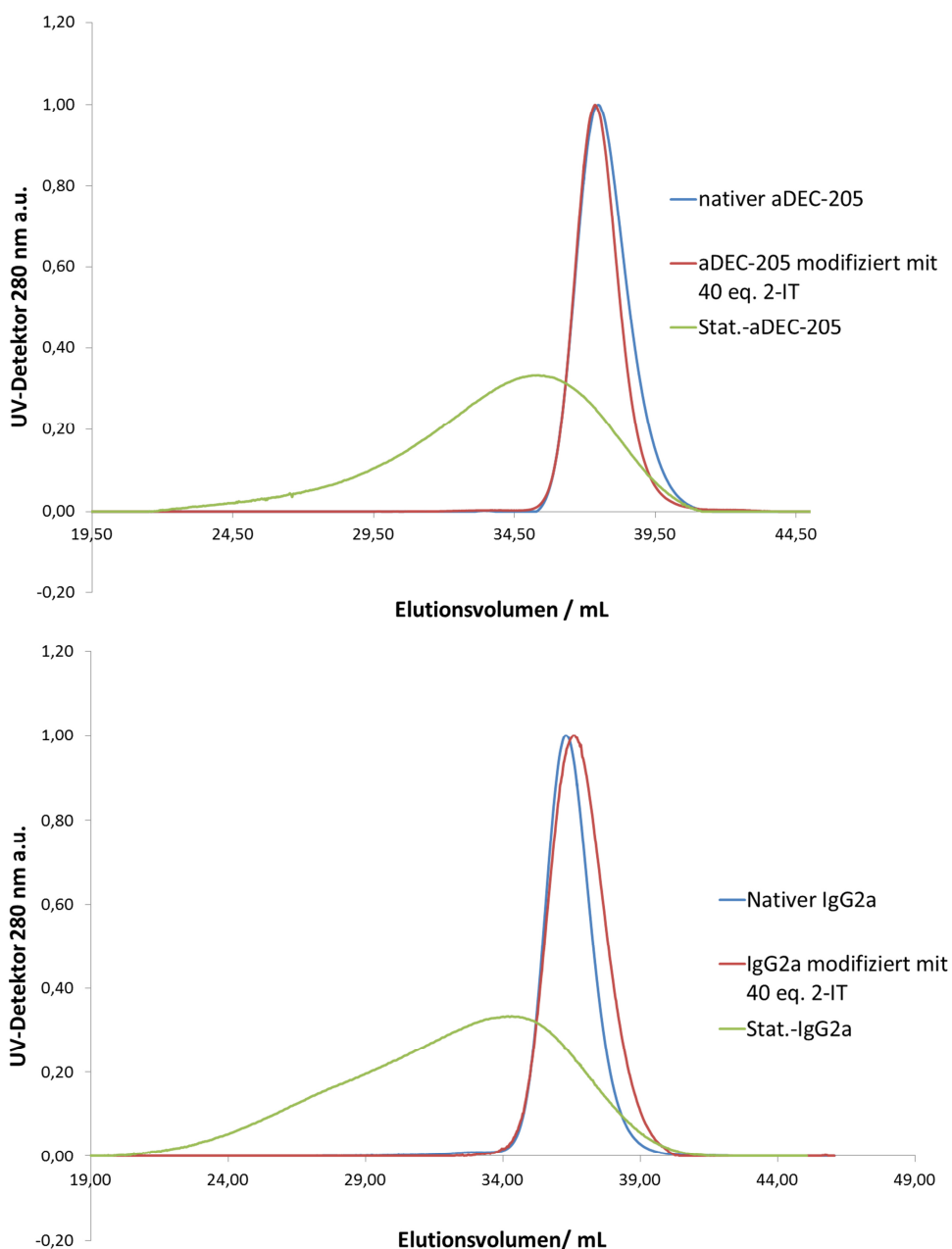


Abbildung 4.26: SEC in gepuffertem Medium ($0,05\text{ M Na}_3\text{PO}_4$, $0,15\text{ M NaCl}$, $\text{pH } 7$; Superose[®] 6 10/300 GL Säule) von A): nativem aDEC-205, aDEC-205 modifiziert mit 40 eq. 2-IT und Stat.-aDEC-205 und B): nativem IgG2a, IgG2a modifiziert mit 40 eq. 2-IT, IgG2a modifiziert mit 40eq. 2-IT und Stat.-IgG2a

Zusätzlich wurden die aDEC-205 Konjugate noch über SDS-PAGE charakterisiert. Sie zeigt ebenfalls die erfolgreiche Anbindung des Polymers sowie keine erkennbaren Rückstände am unmodifizierten Antikörper (Abbildung 4.27).

Um die Konjugate noch weiter zu charakterisieren wurden auch die Größe der End-Konjugate über FCS-Messung bestimmt, um über das Farbstoff markierte Polymer die Größe von End-HPMA Polymer und End-aDEC-205 zu bestimmen.

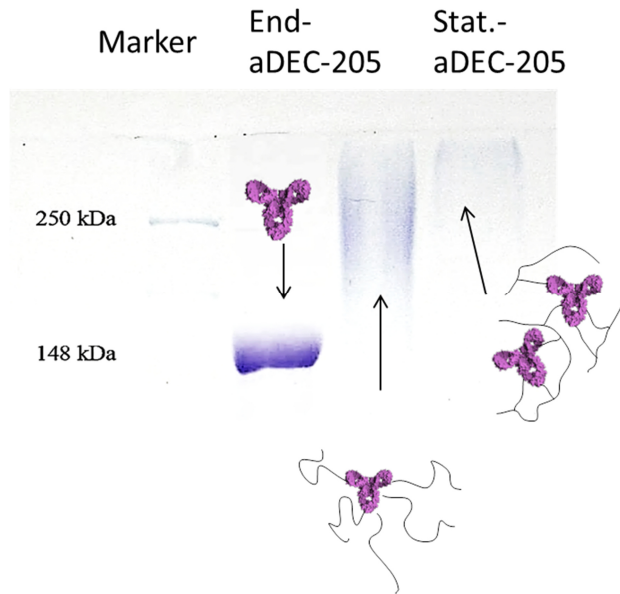


Abbildung 4.27: SDS-PAGE von aDEC-205, End-aDEC-205 und Stat.-aDEC-205 Konjugaten

Für das freie Polymer ergab sich ein hydrodynamischer Radius von 2,5 nm. Für das Konjugat konnte 7,9 nm für den hydrodynamischen Radius gemessen werden. Da für einen Antikörper ein Radius von ca. 6 nm angenommen werden kann^[148], beweist es die Bildung von „sternförmigen“ Konjugaten, also einzelne Antikörpern modifiziert mit mehreren Polymerketten. Für das Stat.-aDEC-205 Konjugat wurde 9,9 nm als hydrodynamischer gemessen und zeigt die Bildung von kleineren Aggregaten bestehend aus eins bis drei Antikörpern und mehreren Polymerketten (Abbildung 4.28-Abbildung 4.29).

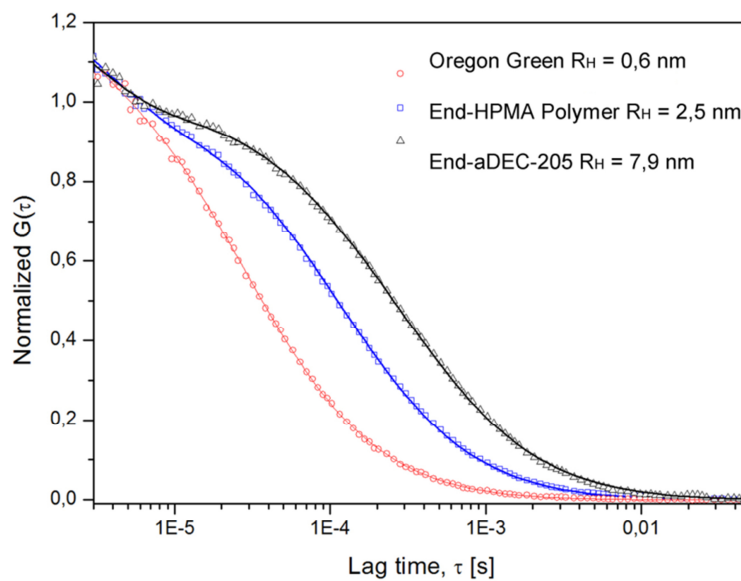


Abbildung 4.28: Autokorrelationskurven für End-HPMA Polymer (blau) bzw. End-aDEC-205 Konjugat (schwarz)

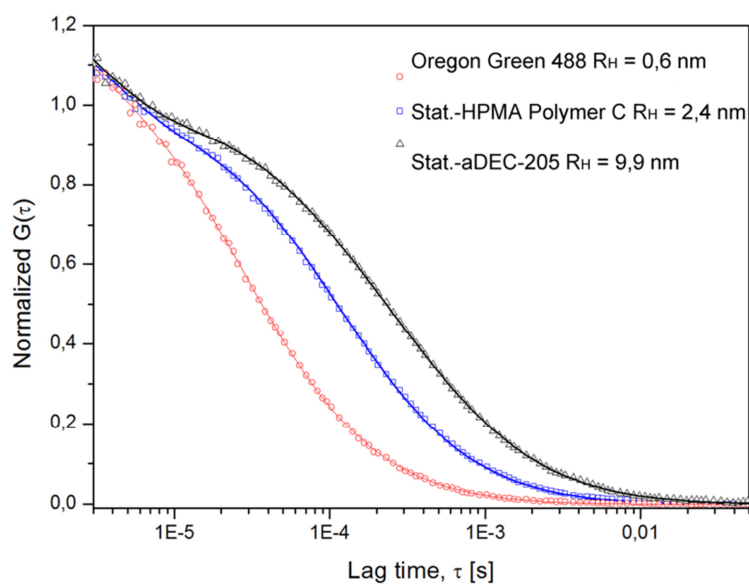


Abbildung 4.29: Autokorrelationskurven für Stat.-HPMA Polymer C (blau) bzw. Stat.-aDEC-205 Konjugat. (schwarz)

Um die spezifische Bindung der unterschiedlichen Konjugate an den DEC-205 Rezeptor zu testen, wurden *in vitro* Versuche an Dendritischen Zellen durchgeführt, welchen aus dem Knochenmark von Mäusen gewonnen wurden (engl.: bone marrow derived dendritic cells, BMDC`s).

Zunächst wurde untersucht, ob die Modifizierung des aDEC-205 Antikörpers mit 100 eq. 2-Iminithiolan die Bindungsaffinität beeinflusst. Dazu wurden die Bindung von bereits Farbstoff markierten (PE-Cy7) aDEC-205 und IgG2a Isotyp an BMDC`s vor und nach der Modifizierung mit 2-Iminithiolan über FACS-Messungen bestimmt (Abbildung 4.30).

Es zeigt sich, dass die Modifikation von aDEC-205 mit 100 eq.- 2-Iminithiolan keinen Einfluss auf die Bindungsstärke hat.

Die Detektion der Konjugate und Polymere erfolgt dabei über den polymergebundenen Farbstoff Oregon Green 488. Die Referenz-Polymere und Isotyp-Konjugate dienen dabei als Kontrolle für unspezifische Aufnahme.

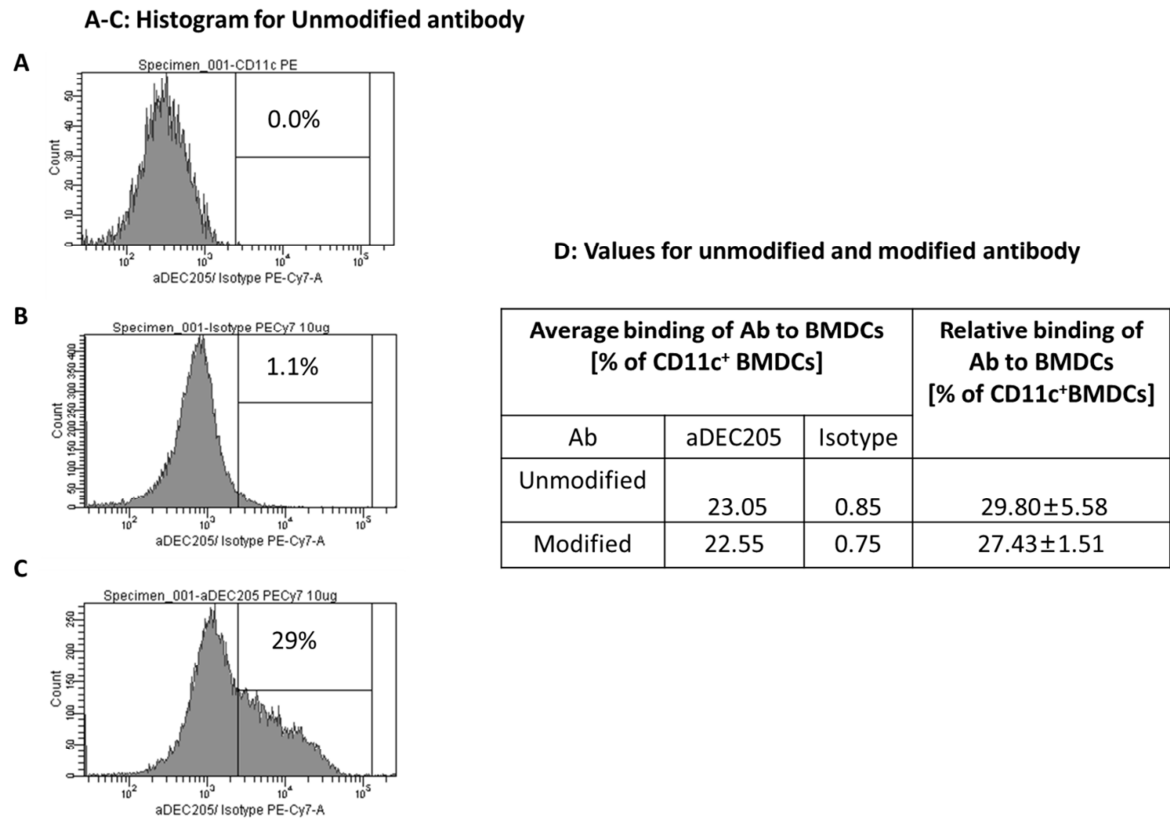


Abbildung 4.30: FACS Messung (Detektion von PE-Cy7 modifizierten Antikörpern) von Dendritischen Zellen (24 Stunden nach Inkubation) mit A): neg.Kontrolle, B): IgG2a-Isotyp, C) aDEC-205. D). Unterschiede zwischen aDEC-205 /IgG2a Isotyp Bindung vor und nach der Modifikation mit 100 eq- 2-Iminothiolan

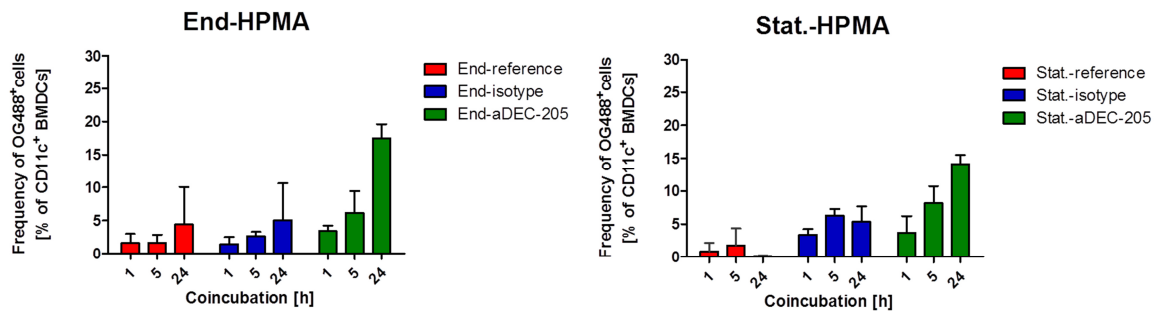


Abbildung 4.31: Zeit-abhängige Bindung von End- und Stat.-aDEC-205 Konjugaten (2µg/ mL) (Isotyp-Konjugaten und Referenz-Polymeren) an Dendritischen Zellen aus Maus-Knochenmark bestimmt über FACS-Analyse

Die Quantifizierung an Dendritischen Zellen (genauer CD11c⁺ Zellen), welche positiv für den Farbstoff Oregon Green sind, erfolgte mittels FACS-Messung (Abbildung 4.31). Generell variiert die Anzahl an CD11c⁺-Zellen, welche überhaupt den DEC-205-Rezeptor exprimieren, zwischen 12 % und 40 %. Die mit der Zeit sukzessive steigende Bindung der End- und Stat.- Konjugate (1h, 5h und 24 h) ist signifikant für einen aktiven Transport-

mechanismus. Es zeigt sich, dass der Prozentsatz an Zellen, die positiv für den Polymerfarbstoff sind, nach 24 Stunden für die End-aDEC-205 (18 %) und Stat.-aDEC Konjugate (14 %) signifikant höher ist als für die Isotyp-Konjugate End-IgG2a und Stat.-IgG2a (6 %). Dabei ist zu bedenken, dass nur ein Teil der Zellen überhaupt den DEC-205-Rezeptor besitzen, und daher eine zu hohe Anreicherung auf unspezifische Bindung hinweisen würde und unerwünscht wäre. Die Referenzpolymere zeigen wie zu erwarten kaum Bindung an dendritische Zellen im Rahmen der Fehlerbetrachtung.

Um darüber hinaus direkt zu kontrollieren, ob die Konjugate auch erfolgreich von Dendritischen Zellen internalisiert werden, wurde konfokale Mikroskopie nach 24 Stunden an Dendritischen Zellen nach Inkubation mit aDEC-205 Konjugaten sowie IgG2a-Isotyp Konjugaten und Referenzpolymeren durchgeführt (Abbildung 4.32). Dabei ist zu beobachten, dass beide aDEC-205 Konjugate von dendritischen Zellen internalisiert werden und keine polymerassoziierte Fluoreszenz an der Zellmembran zu erkennen ist. Für die sternförmigen Konjugate ist sowohl für das IgG2a-Isotyp Konjugat als auch für das Referenzpolymer keine Fluoreszenz zu erkennen (Abbildung 4.32, oben). Dies zeigt die hohe Selektivität der Konjugate. Im Gegensatz dazu zeigt das Stat.-Konjugat weniger Selektivität. Die meiste Fluoreszenz ist zwar bei dem Stat.-aDEC-205 Konjugat zu erkennen, allerdings ist auch beim Stat.-IgG2a Isotyp Konjugat und der Polymerreferenz Fluoreszenz zu erkennen (Abbildung 4.32, unten). Dies legt nahe, dass die unspezifische Wechselwirkung bei dem weniger definierten und etwas größerem Stat.-Konjugat größer ist. In Anbetracht der Größe der End-aDEC-205 Konjugate innerhalb der Zelle im Vergleich zum Größenmaßstab (Abbildung 4.32, oben rechts) ist zu vermuten, dass Oregon Green 488 positive BMDC's erhöhte Mengen an End-aDEC-205 Konjugat tragen. Die beobachtete Fluoreszenz resultiert also aus einer mehrfachen Aufnahme. In der Tat ist der DEC-205-Rezeptor dafür bekannt, nach der Internalisierung effizient recycelt zu werden. Dies kann daher eine sukzessive Aufnahme der End-aDEC-205 Konjugate bewirken.^[150]

Innerhalb der verschiedenen aus der Milz stammenden Immunzellen (Splenozyten), dazu gehören Makrophagen, dendritische Zellen, B- und T-Zellen, wird der DEC-205-Rezeptor bevorzugt von CD8⁺ Zellen (Dendritischen Zellen) exprimiert. Darüber hinaus ist er aber auch in geringen Mengen auf B-Zellen und in sehr geringen Mengen auf Makrophagen und T-Zellen zu finden.^[151]

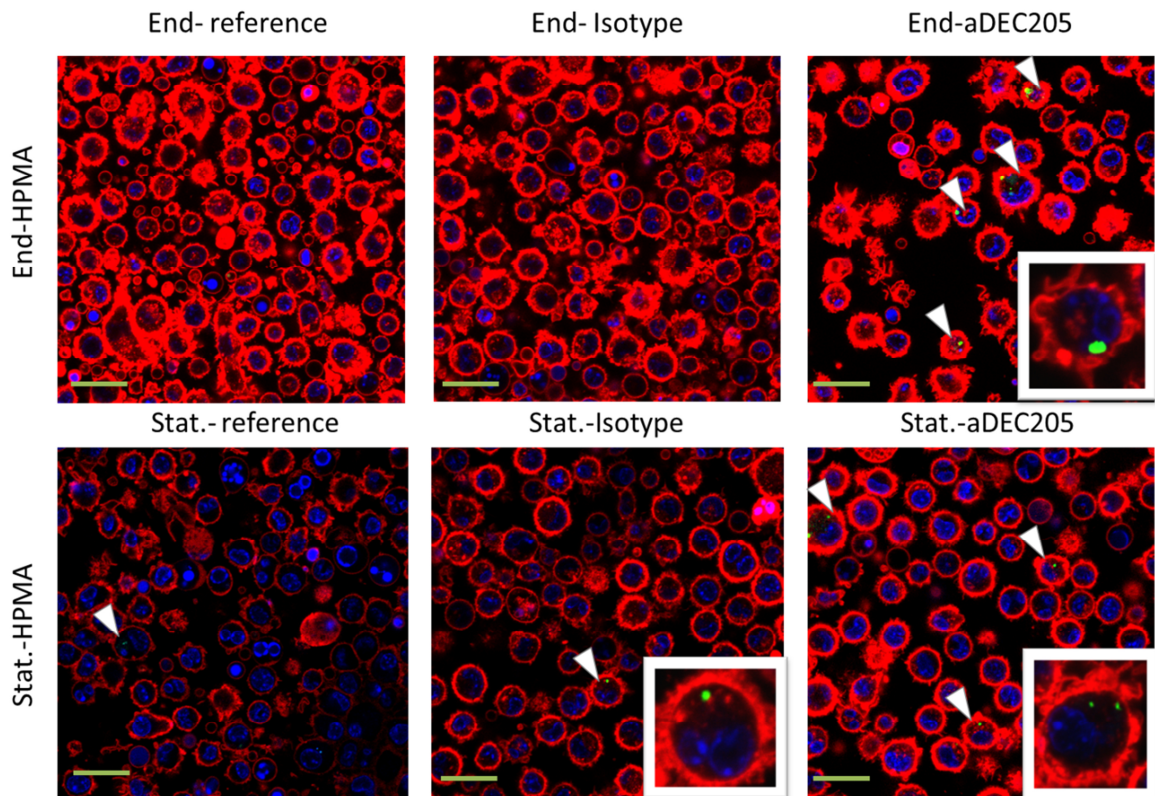


Abbildung 4.32: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie von BMDC`s 24 Stunden nach Inkubation mit End- und Stat.-Konjugaten und Referenzpolymeren (2 μ g/mL). (Blau: Zellkern angefärbt mit Hoechst, rot: Plasmamembran angefärbt mit CellMask©Orange). Zellen positiv für den Polymergebundenen Farbstoff Oregon Green 488 sind mit Pfeilen markiert. Vergrößerungen von Zellen mit Polymerfarbstoff sind am unteren Bildrand gezeigt. (Größenmaßstab: 20 μ m)

Um daher die spezifische Zellaufnahme der Konjugate in Gegenwart der verschiedenen Arten von Immunzellen des Milzgewebes zu testen wurden die Splenozyten mit den verschiedenen Konjugaten für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde wieder die polymerassoziierte Fluoreszenz für die einzelnen Zelltypen quantifiziert. Splenozyten bestehen genauer betrachtet größtenteils aus B- und T-Zellen, zu geringerem Anteil aus Makrophagen und zum kleinsten Teil aus Dendritischen Zellen (nur ca. 2 %).^[151] Abbildung 4.33 zeigt die unterschiedliche Aufnahme durch die verschiedenen Immunzellen, wobei die unterschiedliche Häufigkeit der Zellen schon mit einbezogen ist. Es ist zu sehen, dass die aDEC-205 Konjugate bevorzugt an dendritische Zellen binden. IgG2a-Isotype Konjugate und Referenzpolymere zeigen nur eine geringe und unspezifische Bindung an andere Zelltypen (Makrophagen, B- und T-Zellen). Betrachtet man die End-aDEC-205 Konjugate, zeigen sie eine hohe Selektivität gegenüber dendritische Zellen.

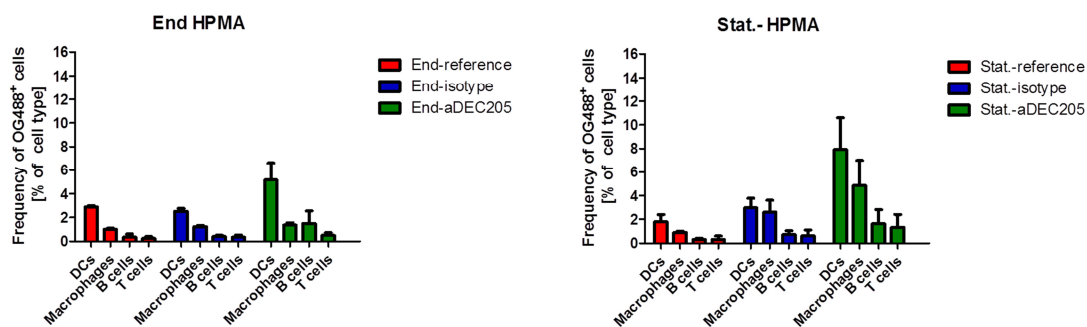


Abbildung 4.33: Zellspezifische Aufnahme von End- und Stat.-Konjugaten (Isotyp-Konjugaten und Referenzpolymeren) nach 24 Stunden ($2 \mu\text{g}/\text{mL}$) von Splenozyten bestimmt über FACS-Messungen

Im Gegensatz dazu ist für die Stat.-aDEC-205 Konjugate eine erhöhte unspezifische Bindung an Makrophagen zu sehen, auch wenn diese geringer als in Dendritischen Zellen ist. Allgemein ist das Verhältnis der Bindung an Dendritischen Zellen zu Makrophagen bei beiden Stat.-Konjugaten geringer im Vergleich zu End-Konjugaten. Die Stat.-Konjugate zeigen also eine höhere unspezifische Bindung. Dies kann zum Teil darin begründet sein, dass die zahlreichen (abgequenchten) Maleinimid-Linker pro Polymer bei den Stat.-HPMA Polymeren eine hydrophobe Domäne darstellen. Allgemein können hydrophobe Domänen zu unspezifischen Wechselwirkungen mit Membranen von Immunzellen führen.^[152] Darüber hinaus könnte die erhöhte Größe der Stat.-Konjugate im Vergleich zu den End-Konjugaten eine erhöhte unspezifische Aufnahme bewirken.

Die FACS-Messungen belegen eine aDEC-205 vermittelte erhöhte Bindung an dendritische Zellen und die Aufnahmen mittels Konfokaler Fluoreszenzmikroskopie haben bewiesen, dass die Konjugate auch wirklich von Dendritischen Zellen internalisiert werden. Um darüber hinaus zu beweisen, dass die Konjugate über einen aktiven Prozess aufgenommen werden (rezeptorvermittelte Endozytose), wurden FACS-Studien bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und bei $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Rezeptorvermittelte Endozytose ist ein temperatur-abhängiger Prozess. Bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sind die Stoffwechselprozesse der Zellen heruntergefahren und sie können keinen zielgerichteten Transport von Nanopartikel bewerkstelligen. Daher wurden BMDC`s mit End-Konjugaten und End-Referenzpolymer bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und die Anzahl der Zellen, die positiv für den polymer-gebundenen Farbstoff Oregon Green sind wieder mittels FACS-Messungen quantifiziert (Abbildung 4.34).

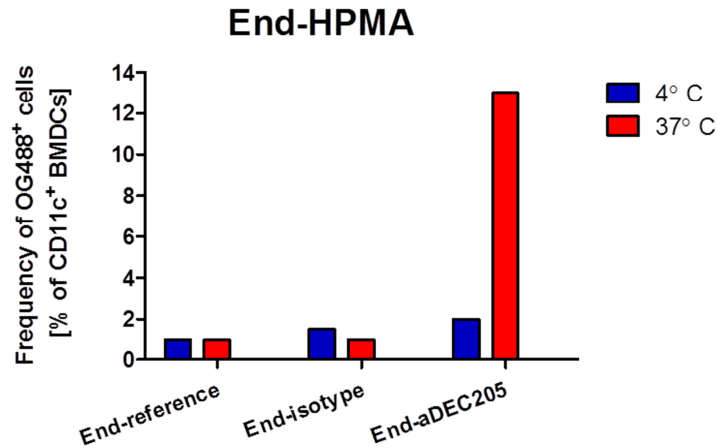


Abbildung 4.34: Temperaturabhängige Bindung nach 24 Stunden (20µg/mL) von End-Konjugaten und Referenzpolymer an BMDC's bestimmt über FACS-Messungen

Die Ergebnisse demonstrieren eindeutig die temperaturabhängige Aufnahme von End-aDEC-205 Konjugaten, da End-HPMA Referenzpolymer, End-IgG2a Isotyp Konjugat und End-aDEC-205 Konjugat keine Bindung bei 4 °C aufweisen. Bei 37 °C allerdings zeigt sich eine deutlich erhöhte Bindung von End-aDEC-205 Konjugaten. Sowohl End-IgG2a Isotyp Konjugat als auch das Referenzpolymer weisen dagegen fast keine Änderungen zur Bindung bei 4 °C auf. Dies zeigt eindeutig, dass die in Abbildung 4.31-4.33 aDEC-205 vermittelte erhöhte Bindung/Aufnahme ein Ergebnis von spezifischer, rezeptorvermittelter Endozytose ist.

Die End-Konjugate zeigten zudem wie zu erwarten keine Anzeichen von Toxizität in den verwendeten Konzentrationen (Abbildung 4.35, MTT-Assay).

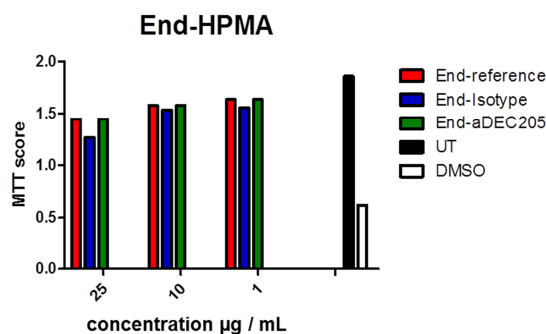


Abbildung 4.35: BMDC's inkubiert mit verschiedenen Mengen an End-aDEC-205, IgG2a Konjugaten und End-HPMA Referenz für 4 Stunden. Zellviabilität wurde über den prozentualen Anteil von 7-AAD negative Zellen bestimmt (MTT-Assay). (pos. Kontrolle : DMSO)

Zusammenfassend ist die Synthese von definierten semitelechelen HPMA-Copolymeren, welche eine Maleinimid-Gruppe ausschließlich an der Polymerendgruppe tragen, möglich. Dies gelingt über RAFT-Polymerisation von PFMA mit einem modifizierten Kettentransferreagenz und anschließender polymeranaloger Umsetzung und selektiver Einführung der Maleinimid-Gruppe an α -Position über das modifizierte Kettentransferreagenz. Diese End-HPMA Polymere bilden mit 2-IT modifizierten Antikörpern „sternförmiger“ Polymer-Antikörper Konjugate ($R_H = 7,9$ nm) von geringer Dispersität ($D = 1,45$), welche frei von unmodifiziertem Antikörper und freiem Polymer sind. Diese Konjugate sind definierter als solche, die durch Reaktion von 2-IT-modifiziertem Antikörpern mit statistisch Maleinimid-modifiziertem HPMA Polymer (Stat.-HPMA Polymer) erhalten werden. Die Konjugation von aDEC-205 führt bei beiden Konjugat-Typen zu einer erhöhten Bindung an Dendritischen Zellen. Aber bei der Betrachtung der Zellaufnahme ist zu sehen, dass bei den End-Konjugaten nur die aDEC-205 gekoppelten Konjugate aufgenommen werden, nicht aber Isotyp-Konjugat und Referenzpolymer. Bei den Stat.-Konjugaten wird allerdings auch das Isotyp-Konjugat und Referenzpolymer aufgenommen. Dies deutet auf unerwünschte, unspezifische Wechselwirkungen hin (Abbildung 4.32). Auch das Verhältnis von Bindung an dendritischen Zellen zu Makrophagen zeigt erhöhte unspezifische Wechselwirkungen der Stat.-Konjugate (Abbildung 4.33). Nicht zuletzt die temperaturabhängige Aufnahme der End-Konjugate beweist eine spezifische, Antikörper vermittelte Interaktion (Abbildung 4.34). Die „sternförmigen“ End-Konjugate zeigen also die Möglichkeit auf dendritische Zellen mit dem aDEC-205-Antikörper selektiv zu adressieren.

Diese „sternförmige“ Konjugate (end-DEC-205) zeigen also eine noch höhere Selektivität gegenüber den Konjugaten, welche aus Stat.-HPMA Polymere erhalten werden. Zudem kann am Beispiel von Dendritischen Zellen belegt werden, dass die Adressierung von speziellen Immunzellen möglich ist, was ein ganz wichtiger Punkt bei der Tumor-Immuntherapie ist. Zudem ist der Antikörper bei dieser Synthese austauschbar, was zum Beispiel über die Verwendung von aCD-25 Antikörpern zum selektiven Adressieren von regulatorischen T-Zellen ausgenutzt werden kann.

Darüber hinaus ist entscheidend, dass die Synthese über die Zwischenstufe von reaktiven Vorläuferpolymeren auch zusätzlich die parallele Einführung von komplexeren Strukturen wie kürzeren Antigenpeptidsequenzen und CpG-Motiven (Stimulus) erlaubt ohne die definierte Polymerstruktur zu beeinflussen und gleichzeitig die Bindung an Antikörper zu

gewährleisten. Denn der selektive und gleichzeitige Transport von Antigen und Stimulus ist für eine selektive Aktivierung von Dendritischen Zellen essentiell. Die bewiesenermaßen rezeptorvermittelte Endozytose würde eine effiziente Prozessierung der Signale gewährleisten.

4.2 Kationische-hydrophile Blockcopolymere als polymere Transfektionsvektoren über Polyplexbildung mit p-DNA

4.2.1 Synthese und Charakterisierung von poly[Lysin]-*b*-poly[HPMA] als kationische-hydrophile Blockcopolymere zur Polyplexbildung

Das Transfizieren von Zellen, also das Einbringen von bakterieller p-DNA in eukaryotische Zellen, ist eine vielversprechende Methode, um Zellen gezielt zu beeinflussen. Diese p-DNA wird transient und unabhängig von dem chromosomalen DNA-Satz abgelesen. Durch große Fortschritte in der molekularen Biochemie kann die p-DNA gezielt modifiziert und so die Expression verschiedenster Proteine stimuliert werden. So ist die „*in vitro*“ Transfektion von Zellen eine Standardmethode im Labor und wird auch großtechnisch genutzt. Kommerzielle Transfektionsvektoren sind meistens sehr effektiv besitzen gleichzeitig aber auch eine hohe Toxizität. Es existieren auch zahlreiche (kationische) polymere Vektoren, die p-DNA komplexieren und Zellen effizient transfizieren können.^[88, 92] Für eine potentielle therapeutische Anwendung jedoch muss die entsprechende p-DNA auch wirksam abgeschirmt werden. Dabei ist die Verwendung von Blockcopolymeren, bestehend aus einem kationischen Teil zur p-DNA Komplexierung und einer hydrophilen Korona zur Abschirmung, sehr vielversprechend. Diese bilden mit p-DNA polymere Komplexe (Polyplexe). Hierbei konnte schon mit Polymeren bestehend aus einer abschirmenden PEG-Korona und verschiedenen peptidischen oder teilpeptidischen kationischen Segmenten, wie zum Beispiel Polyethylenglycol-*b*-poly[Lysin] (PEG-*b*-p[Lys]) und Polyethylenglycol-*b*-poly[Aspartat(Diethylentriamin)] (PEG-*b*-poly-[Asp-(DET)]) effizient Polyplexe zur Transfektion gebildet werden.^[90] Darüber hinaus können auch vollpeptidische Blockcopolymer sehr definiert über NCA-Polymerisation hergestellt werden.^[153, 154] Dabei konnten mit dem Blockcopolymer poly[Lysin]-*b*-poly[Sarkosin] (p[Lys]-*b*-p[Sar]), mit Polysarkosin als hydrophile Korona, „Peptoplexe“ dargestellt werden und ihre Transfektionspotential gezeigt werden.^[155] Ähnlich diesen Systemen sollten nun Blockcopolymere des Typs poly[HPMA]-*b*-poly[Lysin] synthetisiert werden. Auch hier dient der kationische Lysin-Block zur Komplexierung der p-DNA, allerdings mit poly[HPMA] als biokompatible hydrophilen Korona (Abbildung 4.36), welches gerade im Hinblick auf die Tumor-Immuntherapie aufgrund der geringen Immunogenität

vielversprechend scheint. Die ϵ -Amino-Gruppe des Lysins besitzt einen pK_S -Wert von ca. 9,4. Bei physiologischen pH-Wert von ca. 7,2 liegt sie daher zum größten Teil protoniert vor. Zwar ist reines Polylysin verglichen mit anderen kationischen Polymeren weniger effektiv was die Transfektionseffizienz betrifft, allerdings ist es auch viel weniger zelltoxisch. Das erhaltene Blockcopolymer besitzt einen biokompatiblen hydrophilen Teil und einen biokompatiblen, bioabbaubaren kationischen Block, was für potentielle therapeutische Anwendungen sehr wichtig ist.

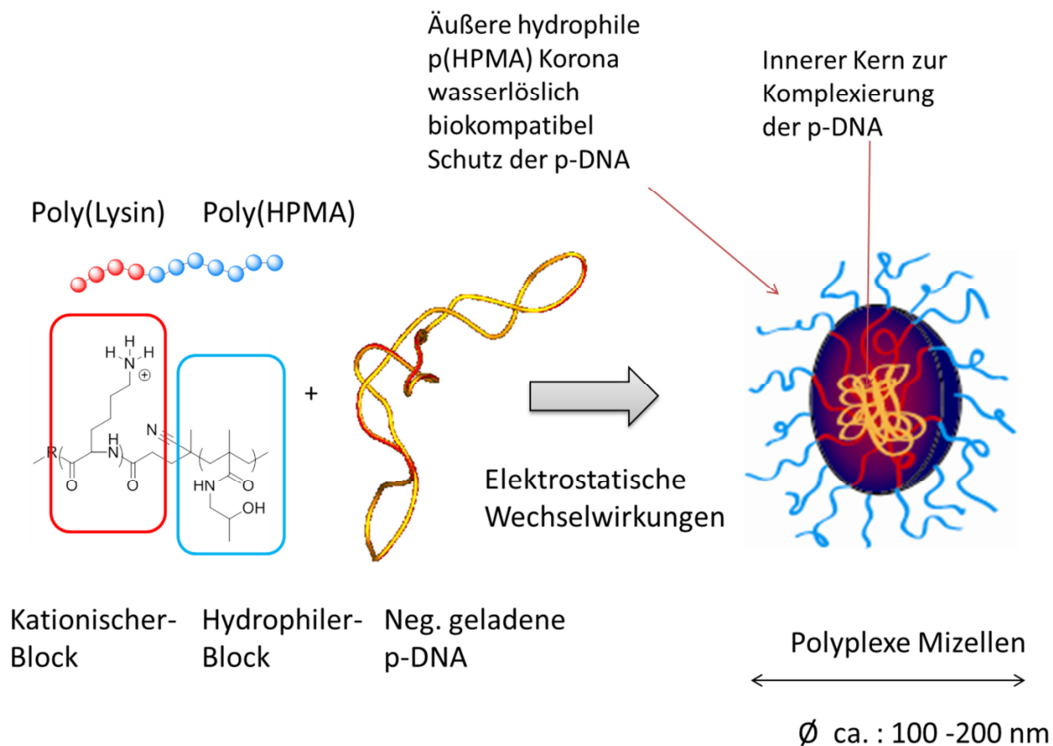


Abbildung 4.36: Bildung von polyplexen Mizellen aus kationischen p[Lysin]-b-p[HPMA] Blockcopolymeren und negativ geladener p-DNA

Die Synthese des p[Lys]-b-p[HPMA] Blockcopolymers sollte wieder mittels RAFT-Polymerisation durchgeführt werden. In der Regel können Blockcopolymeren, wie bei anderen kontrollierten radikalischen Polymerisationsmethoden, relativ einfach über die sukzessive Polymerisation der verschiedenen Monomere erfolgen. Die RAFT-Polymerisation wurde dabei schon in vielen Fällen für die Synthese kationischer, (Meth)acrylat basierter Polymere für den Gentransfer ausgenutzt.^[156] In diesem Fall allerdings muss ein alternativer Syntheseweg durchgeführt werden, da sich natürliches Polylysin nicht kontrolliert radikalisch darstellen lässt. Hierbei wird ein Polylysin-Block

selektiv am Amino-Terminus mit dem „Säure-CTA“ modifiziert. Das so erhaltene Makro-Kettentransfer-Reagenz („Makro-CTA“) kann nun über den RAFT-Prozess polymerisiert werden. Diese Vorgehensweise wurde schon genutzt um aus verschiedenen (meist über Festphasenpeptid-Synthese erhaltenen) peptidischen Makro-kettentransferreagenzien (RAFT) oder peptidischen Makroinitiatoren (ATRP) peptidische-(Meth)acrylat-Blockcopolymerer darzustellen.^[157, 158] Dazu soll hier das PFMA Reaktivestermonomer mit dem „Makro-CTA“ polymerisiert und anschließend polymeranalog zum p[HPMA] umgesetzt. Die Synthese des HPMA-Blocks über die Zwischenstufe des Reaktivesters ist hier notwendig, da die ϵ -Amino-Gruppen des Polylysins blockiert werden müssen, da sie sonst die RAFT-Polymerisation behindern können. Durch die Blockierung wird der Lysin-Block allerdings wesentlich hydrophober und eine direkte Polymerisation mit beispielsweise mit *N*-(2-Hydroxypropyl)-Methacrylamid im polaren Lösemittel wäre problematisch. Die Polymerisation mit PFMA dagegen bietet sich hier an, da sich HPMA-Blockcopolymerer mit einem hydrophoben Segment über die Zwischenstufe des Reaktivesters sehr gut definiert darstellen lassen.^[59] Darüber hinaus ist so wieder eine vielfache Funktionalisierung des HPMA-Blocks sehr leicht möglich (Abbildung 4.37).

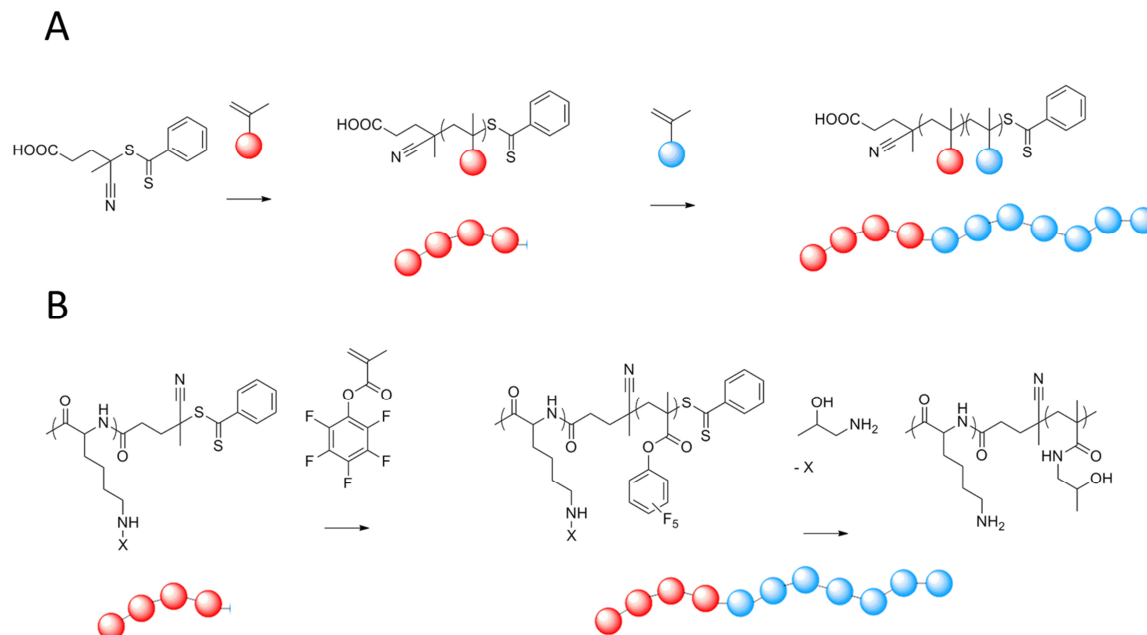


Abbildung 4.37: Synthese Schemata für Blockcopolymerer. A) Über RAFT-Polymerisation unterschiedlicher Monomere. B): Über RAFT-Polymerisation mit modifiziertem Kettentransferreagenz

Für die Polylysin-*b*-PEG Systeme ist bekannt, dass die Transfektionseffizienz am höchsten ist, wenn der Polymerisationsgrad des Lysin-Blocks zwischen ca. 30 und 50 liegt ($30 \leq X_N$

≤ 50). Ist der Lysinblock kleiner, sinkt die Transfektionseffizienz, weil die p-DNA vermutlich nicht effizient komplexiert wird. Ist dagegen der Lysinblock größer sinkt die Transfektionseffizienz ebenfalls, weil vermutlich die Freisetzung der p-DNA erschwert ist.^[101, 159, 160] Für die Synthese des Lysin-Makro-CTA's wurden verschiedene Polylysine verwendet. Auf der eine Seite Polylysine, welche über Festphasen-Peptidsynthese dargestellt wurden. Der Vorteil hierbei ist eine genau definierte Länge und es können zudem sequenzspezifische Peptide erhalten werden. Allerdings sind die Ausbeuten hierbei relativ gering (ca. 200 mg). Auf der anderen Seite wurde Polylysin über NCA-Polymerisation hergestellt. Diese besitzen eine für Polymere übliche Molekulargewichtsverteilung. Allerdings sind sie gut definiert ($\bar{D}= 1,1$) und es werden höhere Ausbeuten erzielt (ca. 1-2g).^[153]

Für die Synthese der Lysin-Makro-CTA's wurden die verschiedenen Polylysine mit blockierter ϵ -Aminogruppe und freiem Amino-Terminus mit Pentafluorophenyl-(4-phenylthiocarbonylthio-4-cyanovalerate) (Aktivester CTA) und Tetramethyl-1,8-Diaminonaphthalin (Protonenschwamm) in NMP als Lösemittel umgesetzt (Abbildung 4.38).

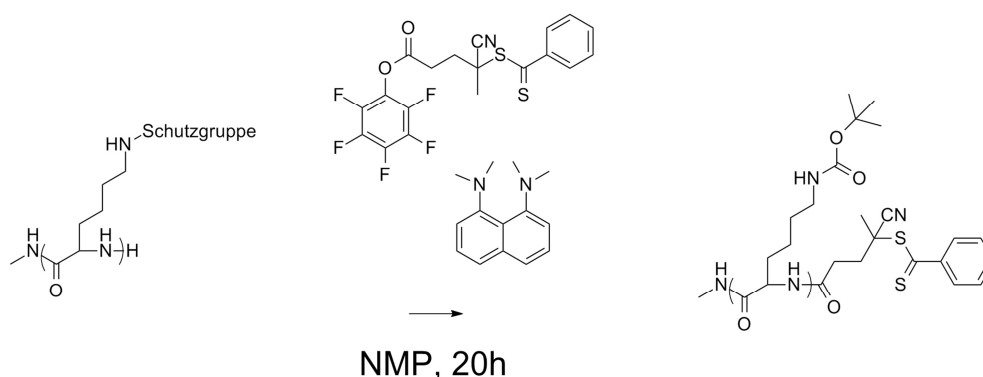


Abbildung 4.38: Syntheschema der „Makro-Lysin-CTA's“

Auf diese Weise wurden drei verschiedene Lysin-Makro-CTA's erhalten. Unter Verwendung der Festphasen Peptidsynthese^[161] wurden **p[Lys(Boc)]₁₀-CTA** und **p[Lys(Boc)]₂₀-CTA** erhalten. Also Polylysine mit genau 10 und genau 20 Wiederholungseinheiten und *tert*-Butyloxycarbonyl (*Boc*) Schutzgruppe zur Blockierung der ϵ -Amino Seitengruppen. Zusätzlich wurde noch über NCA-Polymerisation synthetisiertes Polylysin^[153, 162] verwendet um **p[Lys(Z)]₃₀-CTA** darzustellen, also Polylysin mit einem Polymerisationsgrad von 30 und einer Dispersität von 1,1, wobei die ϵ -Aminogruppe hier mit der Benzyloxycarbonyl (*Z*)-Schutzgruppe blockiert ist (Abbildung 4.39).

Ergebnisse und Diskussion

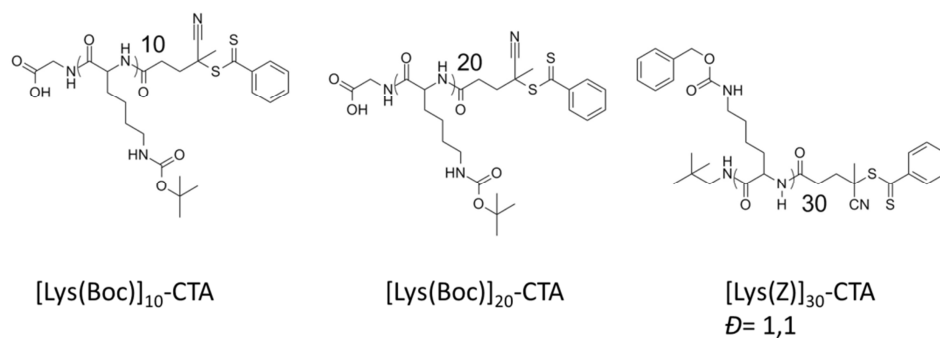


Abbildung 4.39: Strukturen der verschiedenen synthetisierten Makro-Lysin-CTA's

Tabelle 4.6: Charakterisierung der „Makro-Lysin-CTA's“

	X_N	M_n (HFIP-GPC)	\bar{D}
p[Lys(Boc)]₁₀-CTA	10	3.300	1 (ESI-MS)
p[Lys(Boc)]₂₀-CTA	20	5.100	1 (ESI-MS)
p[Lys(Z)]₃₀-CTA	30	12.600	1,11 (HFIP-GPC)

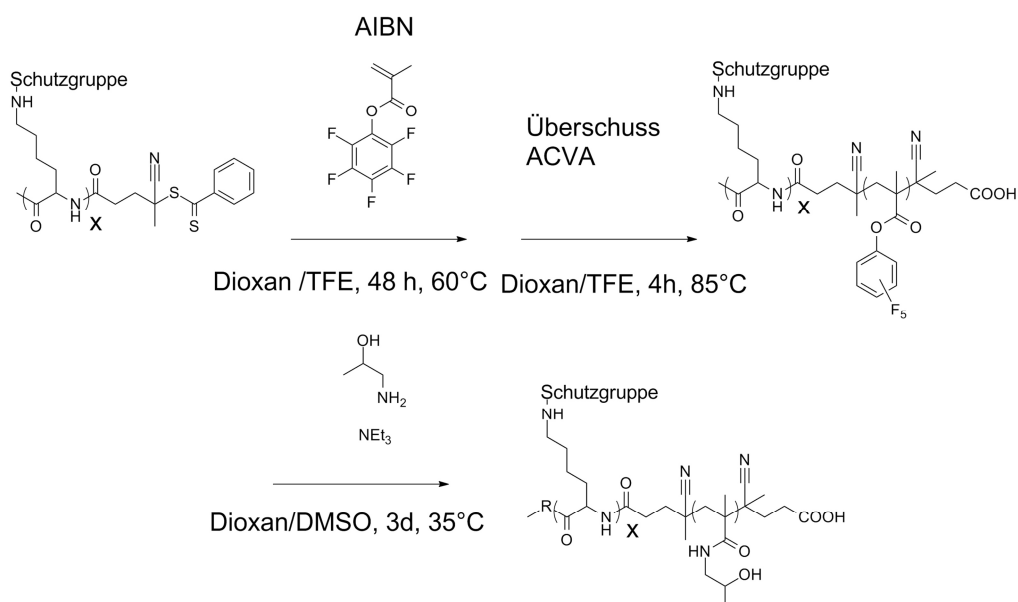


Abbildung 4.40: Synthese der p[HPMA]-b-p[Lys] Blockcopolymerere

Mit diesen Lysin-Makro-CTA's wurden nun verschiedene p[Lys]-b-p[HPMA] Blockcopolymerere synthetisiert. Dazu wurde zunächst mit PFMA als Monomer über zwei Tage in einer Trifluorethanol (TFE)/ Dioxan-Mischung bei 60 °C polymerisiert. Das

Lösemittelgemisch ist notwendig um die gleichzeitige Löslichkeit des Lysin-Makro-CTA's und dem Monomer PFMA zu gewährleisten. Anschließend wurde die Dithioester-Endgruppe wieder mit einem Überschuss ACVA entfernt. Durch polymeranaloge Umsetzung wurde der Reaktivesterblock mit 2-Hydroxypropylamin wieder zum HPMA-Block umgesetzt (Abbildung 4.40). Die so erhaltenen Blockcopolymeren sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst. Für den p[Lys(Z)]₃₀-CTA wurden drei verschiedene Blockcopolymeren synthetisiert.

Tabelle 4.7: Charakterisierung der poly[Lys(Boc/Z)]-b-poly[HPMA] Blockcopolymeren nach Umsetzung des Reaktivester und aber ohne Abspaltung der Polylysin-Schutzgruppen

Polymer	Makro-Lysin-CTA	Verhältnis AIBN/Makro-CTA/Monomer (PFMA)	Mn/Mw poly(Lys(SG))-b-poly(HPMA) (HFIP-GPC)	D poly(Lys(SG))-b-poly(HPMA) (HFIP-GPC)
p[Lys(Boc)]₁₀-b-p[HPMA]	p[Lys(Boc)] ₁₀ -CTA	1/6/702	33.600/ 48.400	1,44
p[Lys(Boc)]₂₀-b-p[HPMA]	p[Lys(Boc)] ₂₀ -CTA	1/6/1417	58.900/ 90.700	1,54
p[Lys(Z)]₃₀-b-p[HPMA] A	p[Lys(Z)] ₃₀ -CTA	1/6/2067	38.500/ 56.600	1,47
p[Lys(Z)]₃₀-b-p[HPMA] B	p[Lys(Z)] ₃₀ -CTA	1/6/708	18.700/ 28.600	1,4
([Lys(Z)]₃₀-b-p[HPMA] C	p[Lys(Z)] ₃₀ -CTA	1/6/2638	55.100/ 74.400	1,35

Abbildung 4.41-Abbildung 4.43 zeigen die GPC-Elugramme in HFIP der Lysin-Makro-CTA's und der entsprechenden p[Lysin(Boc/Z)]-b-p[HPMA] Blockcopolymeren.

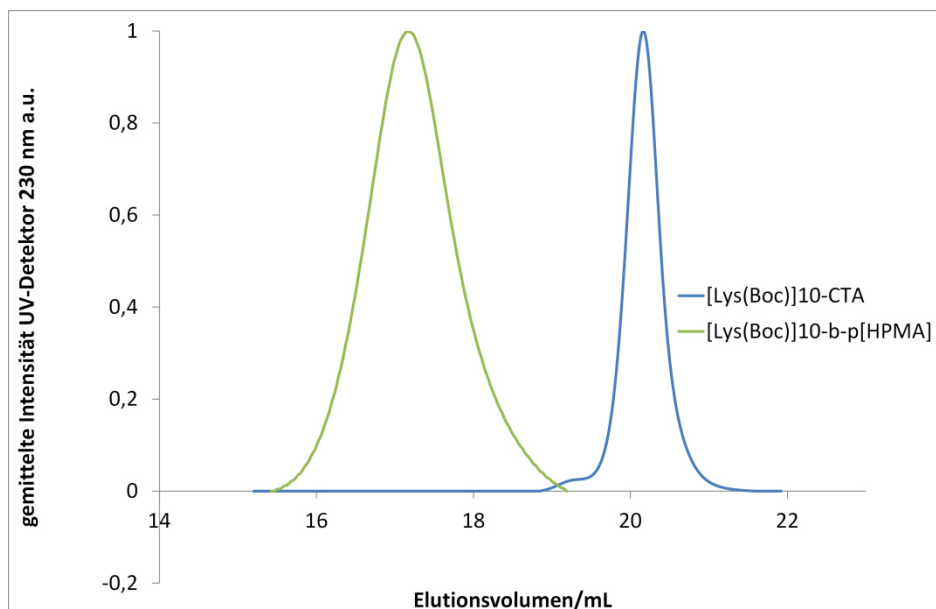


Abbildung 4.41: GPC in HFIP von poly[Lys(Boc)]₁₀-CTA und p[Lys(Boc)]₁₀-b-p[HPMA]

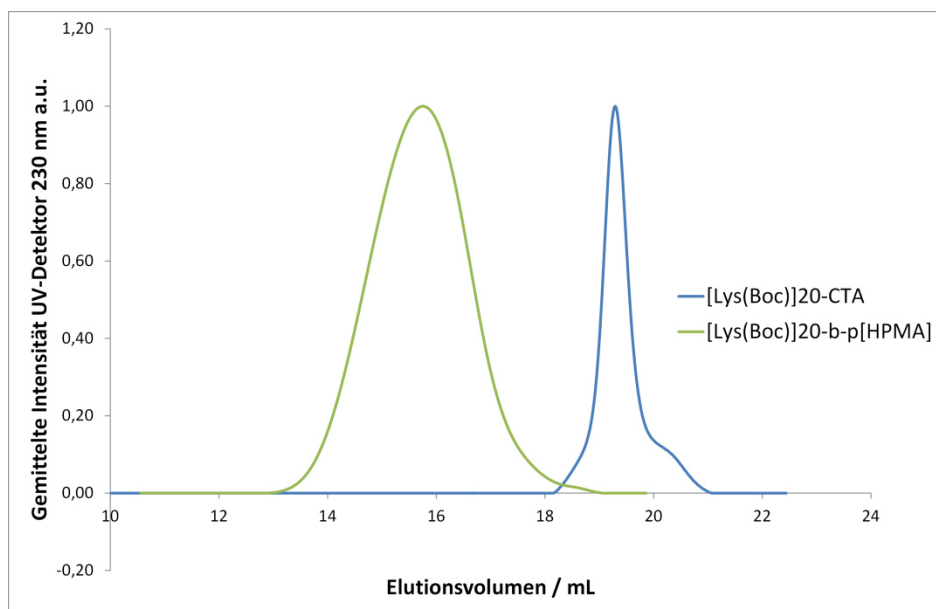


Abbildung 4.42: GPC in HFIP von p[Lys(Boc)]₂₀-CTA und p[Lys(Boc)]₂₀-b-poly[HPMA]

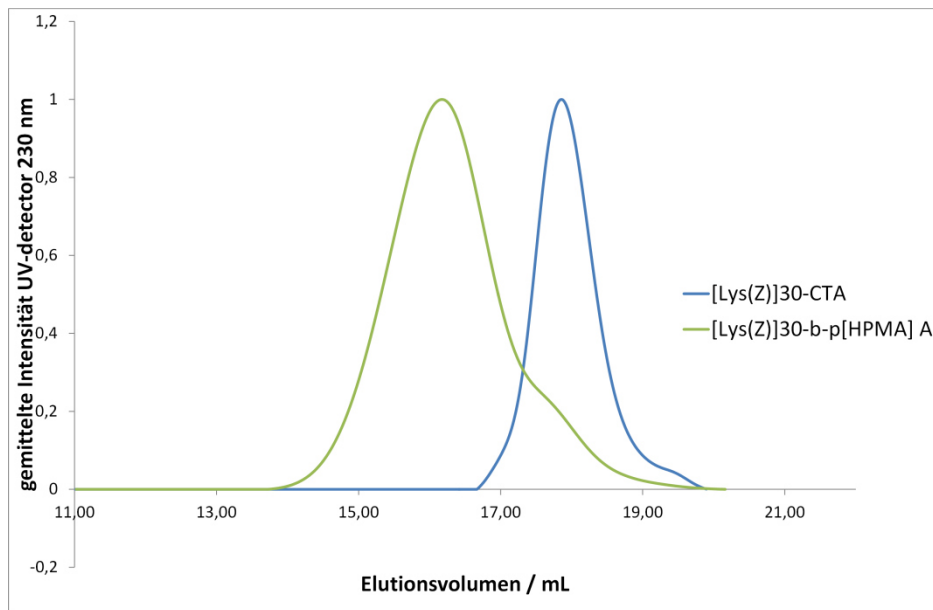


Abbildung 4.43: GPC in HFIP von $p[\text{Lys}(\text{Z})]_{30}\text{-CTA}$ und $p[\text{Lys}(\text{Z})]_{30}\text{-b-poly}[\text{HPMA}] \text{ A}$

In Abbildung 4.43 ist für das Blockcopolymer eine leichte „Schulter“ zu kleineren Molekulargewichten zu erkennen, die auf noch nicht komplett abgetrennten Lysin-Makro-CTA zurückzuführen ist. Aufgrund der Größe des Makro-Lysin-CTA's gelingt die komplette Entfernung von restlichen CTA erst nach Deblockierung des Polylysin-Blocks. Dies zeigte gleichzeitig, dass die Größe des Lysin-Makro-CTA's limitiert ist. Denn bei CTA's mit Polylysinen größer als ca. 30 Wiederholungseinheiten ließ sich restlicher Makro-CTA, auch nach Deblockierung des Polylysin, nicht mehr vollständig vom fertigen Blockcopolymer abtrennen.

Als letzter Schritt wurde der Polylysin-Block durch Entschützung in den kationischen Block umgewandelt. Im Falle der *Boc*-geschützten Festphasen Peptide gelang dies mit 1,5 molarer Salzsäure in Wasser und im Falle der *Z*-geschützten NCA-Lysine mit Bromwasserstoff in Essigsäure (Abbildung 4.44). Die so erhaltenen fertigen kationischen $p[\text{Lys}]\text{-b-p}[\text{HPMA}]$ Blockcopolymere sind in Tabelle 4.8 zusammengefasst.

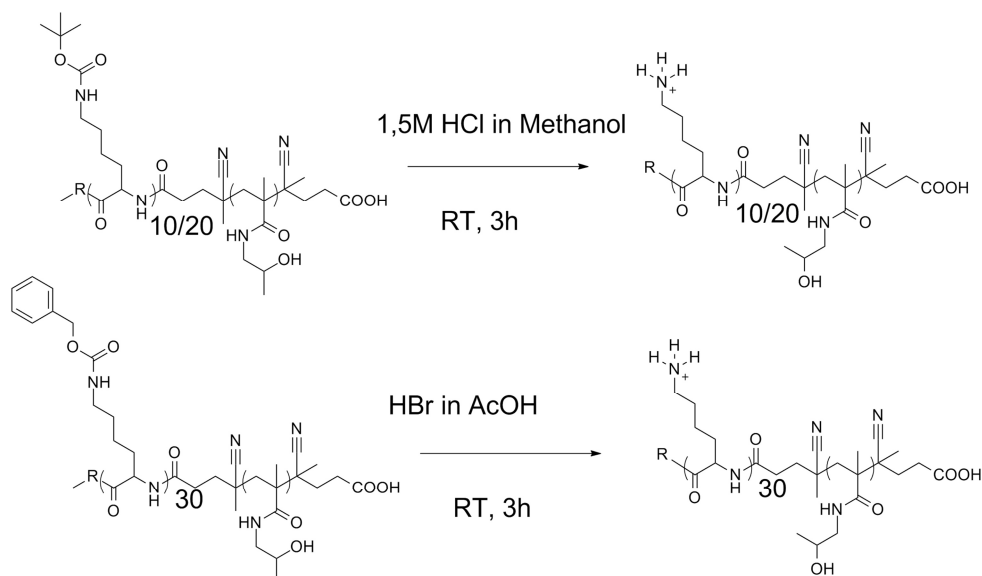


Abbildung 4.44: Reaktionsbedingungen zur Entschützung der Polylysine-Blöcke im Säuren

Tabelle 4.8: Charakterisierung der kationischen p[Lys]-b-p[HPMA] Blockcopolymere

Polymer	Mn (NMR)	D (HFIP- GPC)	Blocklängenverhältnis X _n (p[HPMA]) zu X _n (p[Lys]) (NMR)
p[Lys] ₁₀ -b- p[HPMA] T1	14.000	1,39	91:10 (9:1)
p[Lys] ₂₀ -b- p[HPMA] T3	26.700	1,33	190:20 (8:1)
p[Lys] ₃₀ -b- p[HPMA]A T4	30.500	1,46	200:30 (6:1)
p[Lys] ₃₀ -b- p[HPMA]B	9.400	1,57	61:30 (2:1)
p[Lys] ₃₀ -b- p[HPMA]C	57.100	1,32	390:30 (13:1)
p[Lys] ₂₀ -co- [Lys(His)] ₁₀ -b- p[HPMA]T5	30.500	1,48	200:30 (6:1)

Zur genaueren Bestimmung des Polymerisationsgrades des poly[HPMA] Blocks wurde $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie verwendet. Da die Blocklängen des jeweiligen Polylysins bekannt sind, konnte über NMR die Größe des p[HPMA]-Blocks und so das Molekulargewicht der einzelnen Blockcopolymeren bestimmt werden. Zusätzlich wurden nochmals GPC in HFIP von gemessen, um die Erhaltung der Blockcopolymer Struktur und die vollständige Entfernung noch eventuell vorhandenem „Makro-CTA“ zu überprüfen (Abbildung 4.45-Abbildung 4.47).

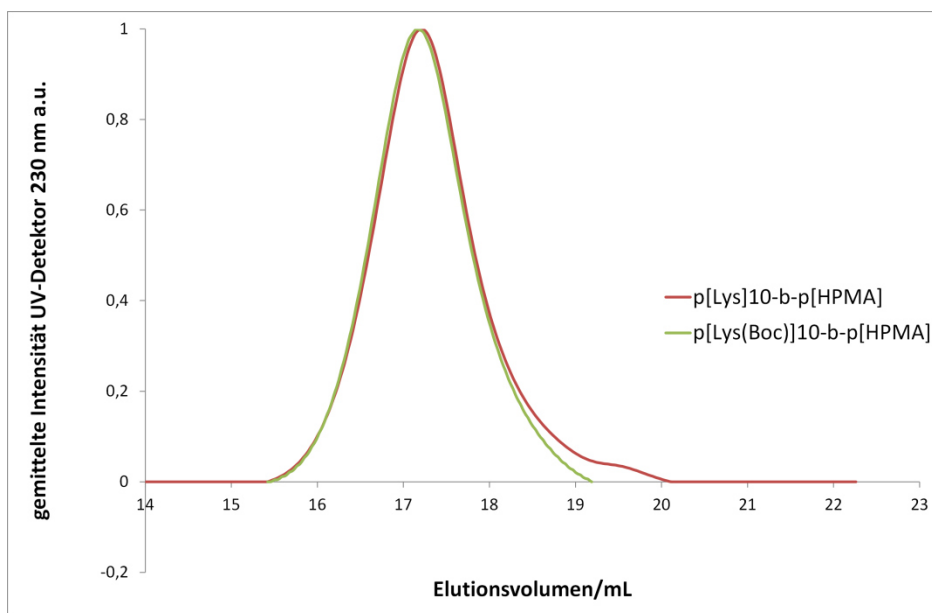


Abbildung 4.45: GPC in HFIP von $p[\text{Lys}(\text{Boc})]_{10}\text{-b-p[HPMA]}$ (grün) und $p[\text{Lys}]_{10}\text{-b-p[HPMA]}$ (rot) (nach Entschüttung)

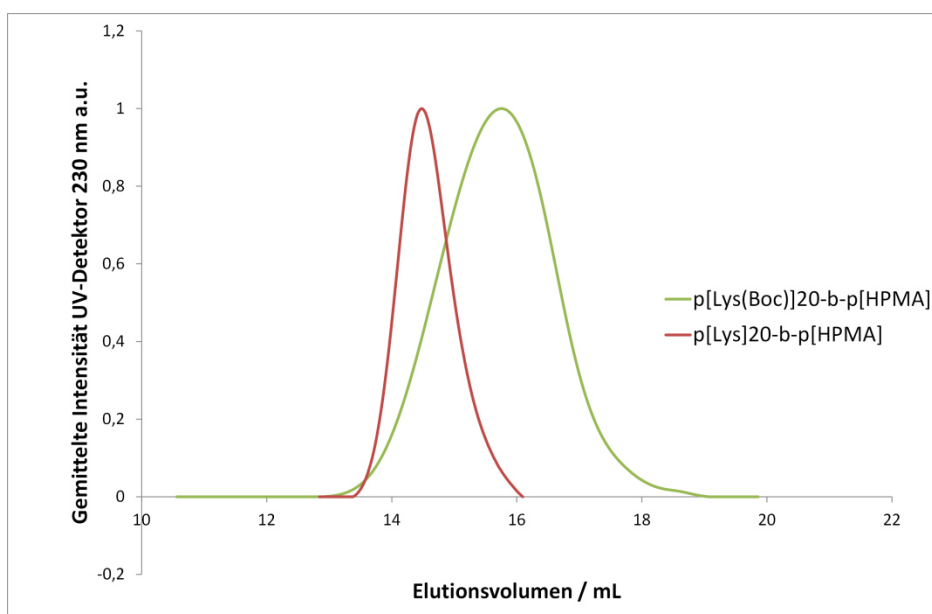


Abbildung 4.46: GPC in HFIP von $p[\text{Lys}(\text{Boc})]_{20}\text{-b-p[HPMA]}$ (grün) und $p[\text{Lys}]_{20}\text{-b-p[HPMA]}$ (rot) (nach Entschüttung)

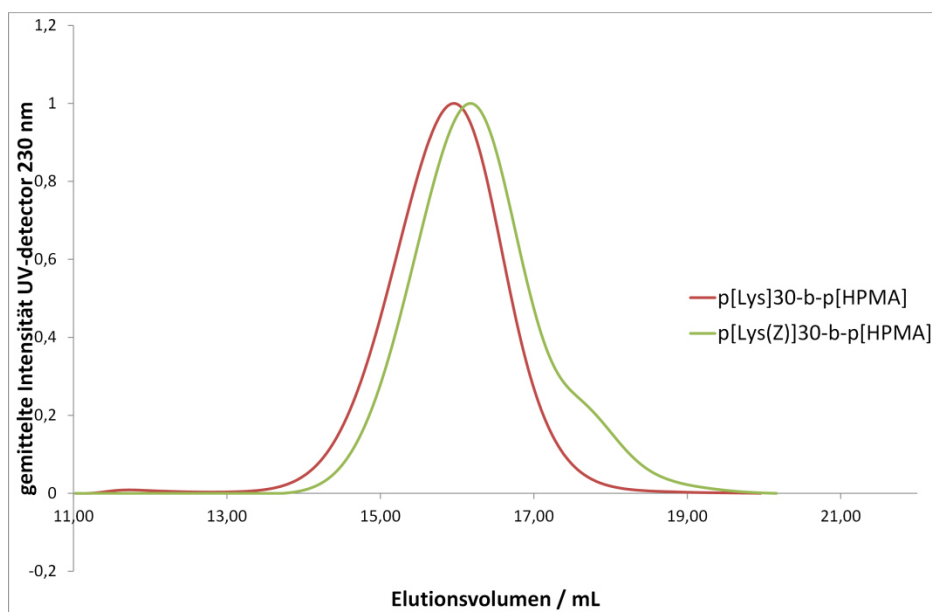


Abbildung 4.47: GPC in HFIP von $p[\text{Lys}(\text{Boc})]_{30}\text{-b-p}[\text{HPMA}]$ (grün) und $p[\text{Lys}]_{30}\text{-b-p}[\text{HPMA}]$ (rot)(nach Entschützung)

Generell nimmt das über GPC bestimmte Molekulargewicht nach Entschützung leicht zu, vermutlich weil das entschützte Polylysin als Polykation eher „stabähnlich“ und nicht als „Polymerknäuel“ vorliegt und so größer erscheint. Die Absolutwerte des Molekulargewichts der Polykationen über GPC sind daher mit einem größeren Fehler behaftet und zur Berechnung der benötigten Menge an Polymer wurde immer das über *NMR*-Spektroskopie ermittelte Molekulargewicht verwendet.

Zusätzlich wurde noch das Blockcopolymer **p[Lys]₃₀-b-p(HPMA)₂₀₀A T4** am Polylysin zum Teil mit Histidin modifiziert. Dazu wurde die doppelt blockierte Aminosäure Boc-His(*Boc*)-OH an der Carboxygruppe mit einer Mischung aus EDC/DIPEA/HOBt aktiviert und an einen Teil der ε-Aminogruppen des Polylysins gebunden. Anschließend wurden die Boc-Schutzgruppen im Säuren entfernt und der Anteil an Histidin modifizierten Lysine über ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt (Abbildung 4.48).

In Abbildung 4.49 sind die Blockcopolymeren zusammengefasst, welche für die Komplexierung der p-DNA und für die anschließenden „*in vitro*“ Versuche verwendet wurden. Es wurde die Polymere mit unterschiedlichen Polylysin-Blocklängen ausgewählt, welche ein Blocklängenverhältnis von p[HPMA] zu p[Lys] von 6:1 bis 9:1 aufweisen, da

Ergebnisse und Diskussion

sich dieses Verhältnis als optimal für Blockcopolymerer zur Polyplexbildung und Transfektion erwiesen hat.^[101, 159, 160]

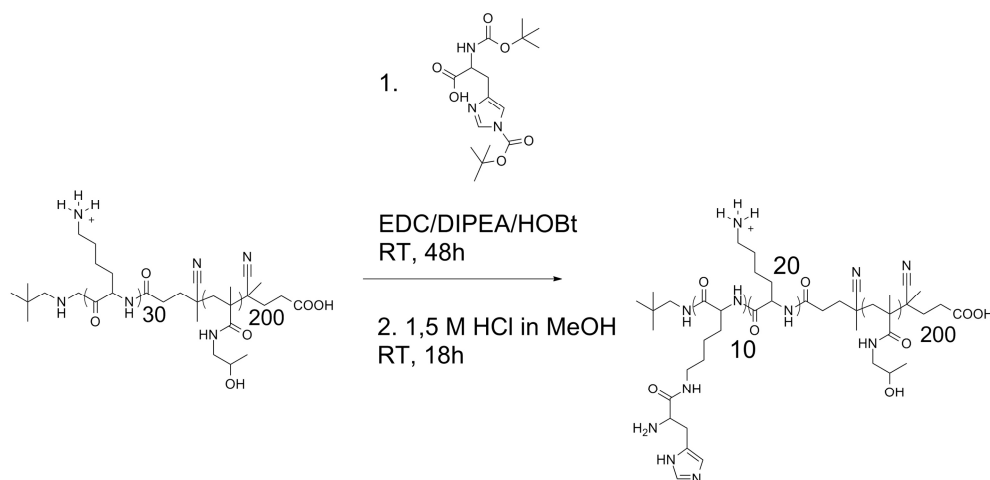


Abbildung 4.48: Modifizierung von p[Lys]₃₀-b-p[HPMA] T4 mit Histidin

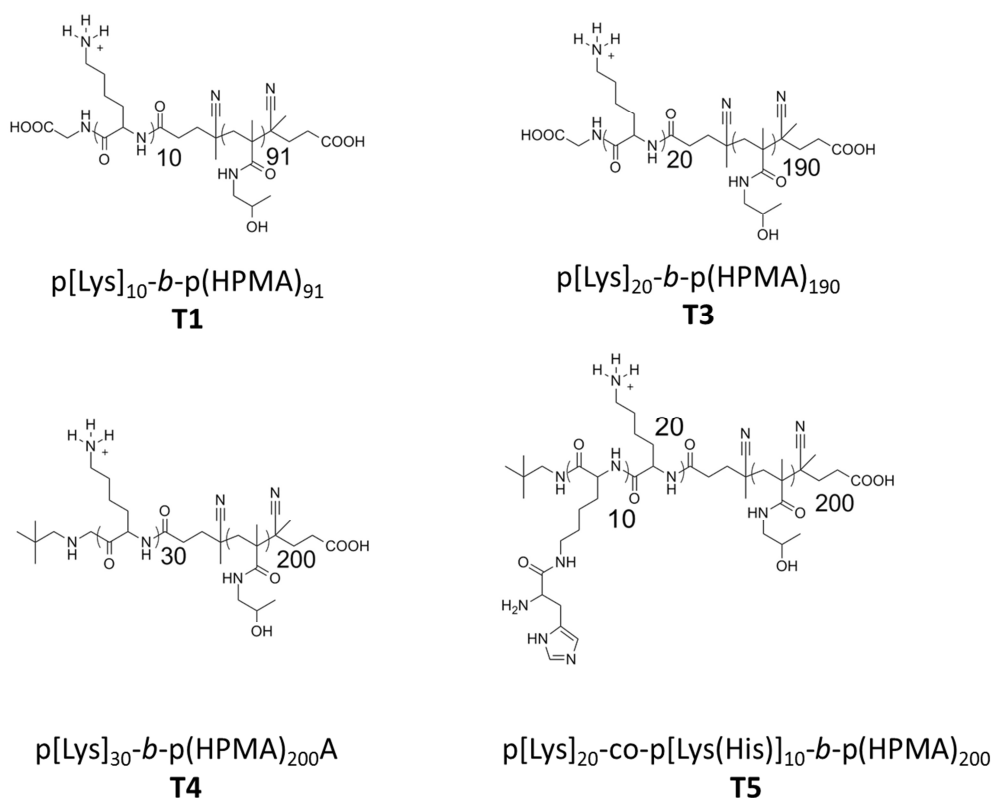


Abbildung 4.49: Strukturformeln der verwendeten kationischen Blockcopolymerer T1, T3, T4, T5

Für die Bildung der Polyplexe wurde die p-DNA, gelöst in Reinstwasser (frei von DNAasen), vorgelegt und das entsprechende Blockcopolymer, gelöst in TRIS-Puffer, langsam in verschiedenen Verhältnisse zu getropft. Um die Komplexierung der p-DNA mit

den kationischen Blockcopolymeren zu testen und darüber hinaus ein geeignetes Mischungsverhältnis zu finden wurde zunächst Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden Polyplexe aus der p-DNA *pRLEF1 α* mit steigendem Anteil an Polymer gebildet und in die Taschen aufgetragen und mit nackter p-DNA verglichen.

Aus dem mittleren Molekulargewicht der Basenpaare (650 Da) und der Größe der p-DNA (4818 bp) ergibt sich für 1 μg der p-DNA *pRLEF1 α* $3,07 \cdot 10^{-9}$ mol negative Ladungen. Teilt man dies durch Anzahl an positiven Ladungen am Polymer (entspricht der Anzahl an Lysinen) erhält man die Molmenge am benötigten Polymer. Unter Verwendung des Molgewichtes des Blockcopolymeren erhält man die benötigte Menge Polymer für das Verhältnis $N/P = 1$. Das bedeutet, es existieren genauso viele negative Ladungen an der p-DNA wie positive Ladungen am entsprechenden Blockcopolymer. Die Bezeichnung N/P kommt daher, dass meistens Stickstoffatome am Polymer für die positive Ladung und die Phosphatgruppe des p-DNA Rückgrades für die negative Ladung verantwortlich sind.

Abbildung 4.50 zeigt die Agarose-Gel-Bilder für **p[Lys]₁₀-b-p[HPMA]₉₁ (T1)**, **poly[Lys]₂₀-b-p[HPMA]₁₉₀ (T3)** und **p[Lys]₃₀-b-p[HPMA]₂₀₀ (T4)**. Auf der linken Spur ist jeweils freie p-DNA aufgetragen. Die freie p-DNA wandert bei angelegter Spannung als Polyanion in Richtung Pluspol (Bild: unten). Die untere Bande entspricht dabei der „*supercoiled*“ Konformation, welche wesentlich kompakter ist und besser durch das Gelnetzwerk wandert. Die obere Bande der p-DNA entspricht der „*open-circle*“ Konformation. Diese ist wesentlich größer und diffundiert daher langsamer durch das Gelnetzwerk. Durch sukzessive Zugabe der kationischen Blockcopolymeren sollten die negativen Ladungen der p-DNA neutralisiert werden und so eine Retardation in den Geltaschen bewirken.

Für alle Blockcopolymeren ist wie zu erwarten für steigende Menge an zugegebenem Polymer eine Retardation der p-DNA zu beobachten. Für die N/P bzw. Massenverhältnisse p-DNA zu Blockcopolymer, bei denen vollständige Retardation vermutet wurde, sind mit einem Pfeil markiert ($N/P=7$). Für die Blockcopolymeren **T3** und **T4** ist ab einem N/P Verhältnis von 1 eine gute Retardation der p-DNA zu sehen. Mit steigendem N/P Verhältnis sind immer noch Spuren von freier p-DNA zu beobachten und erst ab $N/P = 7$ ist eine vollständige Retardation zu sehen. Für das Blockcopolymer **T1** beginnt die Retardation auch mit einem N/P Verhältnis von 1. Allerdings scheint der Einschluss der p-DNA viel ineffizienter zu sein, da erst ab einem N/P Verhältnis von 5 eine gute Retardation zu beobachten ist (bei **T3** und **T4** ist dies bereits ab einem N/P Verhältnis von

Ergebnisse und Diskussion

1 der Fall). Die liegt wahrscheinlich darin begründet, dass eine Polylysinlänge von 10 zu kurz für einen effizienten Einschluss der p-DNA ist.

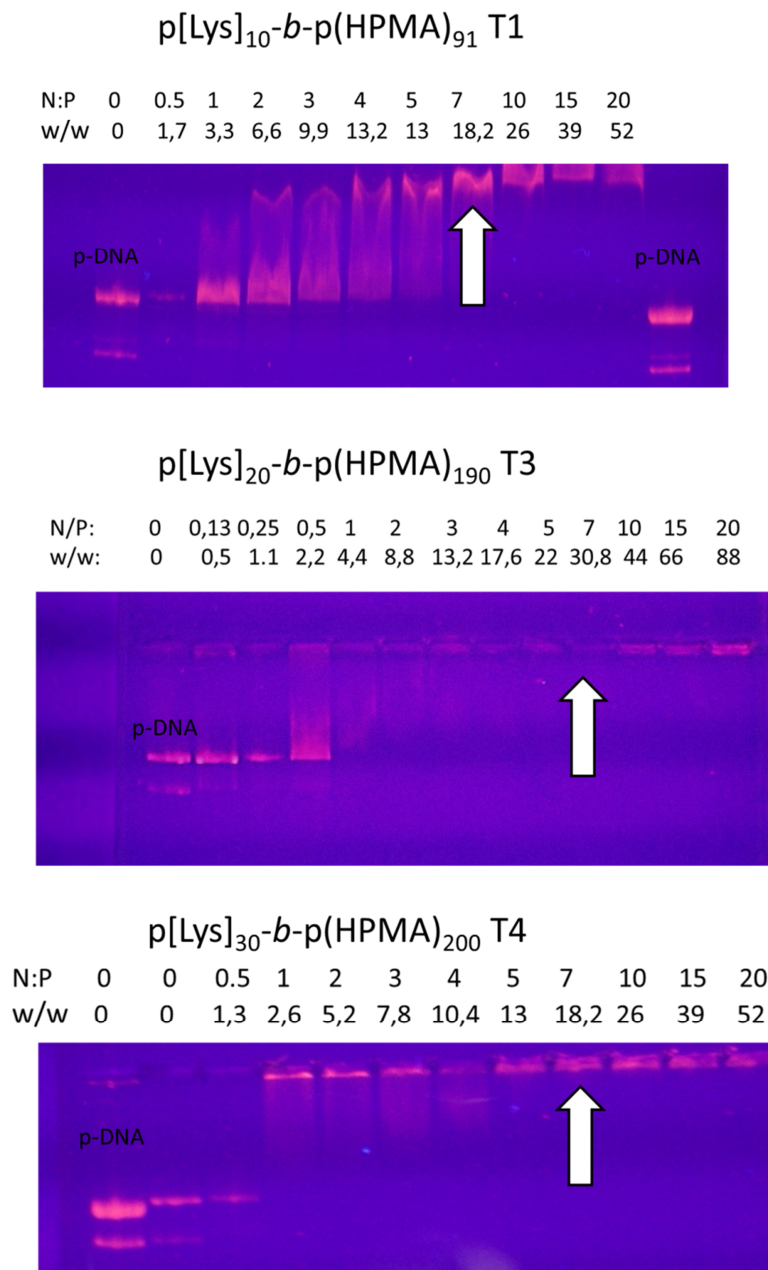


Abbildung 4.50: Agarose-Gelelektrophorese für p[Lys]₁₀-b-p[HPMA] (T1), p[Lys]₂₀-b-p[HPMA] (T3) und p[Lys]₃₀-b-p[HPMA] (T4)

Für die folgenden „*in vitro*“ Versuche wurde daher ein N/P Verhältnis von 7 für die Bildung der Polyplexe gewählt.

4.2.2 Zellbiologische Evaluierung der Polyplexe aus p-DNA und Poly[Lysin]-*b*-poly[HPMA] Blockcopolymeren

Für biologische Testungen der Polyplexe wurde die adhärente Nierenkarzinom-Zelllinie HEK-293T (**h**umane **e**mbrionale **N**ierenzellen) verwendet. Für erste biologische Versuche wurden auch parallel Ansätze mit Zugabe von Chloroquin durchgeführt. Chloroquin ist ursprünglich ein Anti-Malaria Mittel, welches aber auch in zellulären Transfektionsstudien eingesetzt wird, da es den lysosomalen Abbau der p-DNA hemmt und so die Transfektionseffizienz steigern soll.

Zunächst wurde die Bindung/Aufnahme der Polyplexe an HEK-293T-Zellen über FACS-Messungen bestimmt. Dazu wurden die entsprechenden Blockcopolymeren im hydrophilen poly[HPMA] Segment mit Oregon Green 488 modifiziert, was über die Synthese durch Reaktivester Polymere wieder sehr einfach möglich ist.

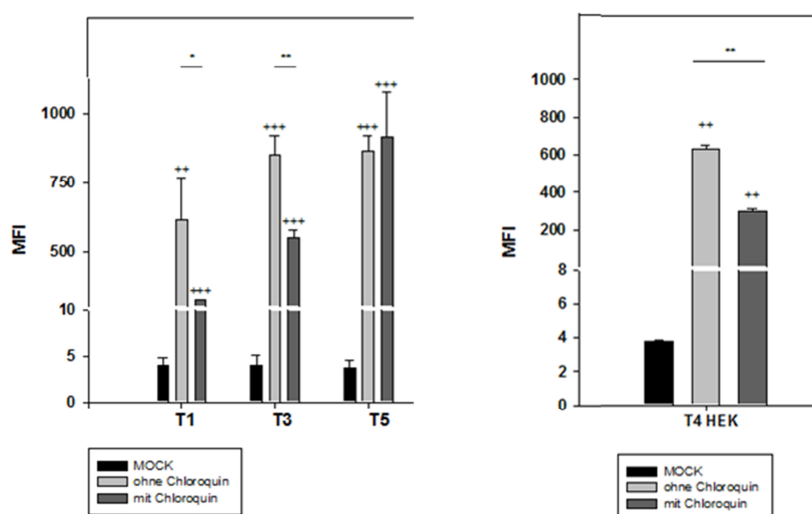


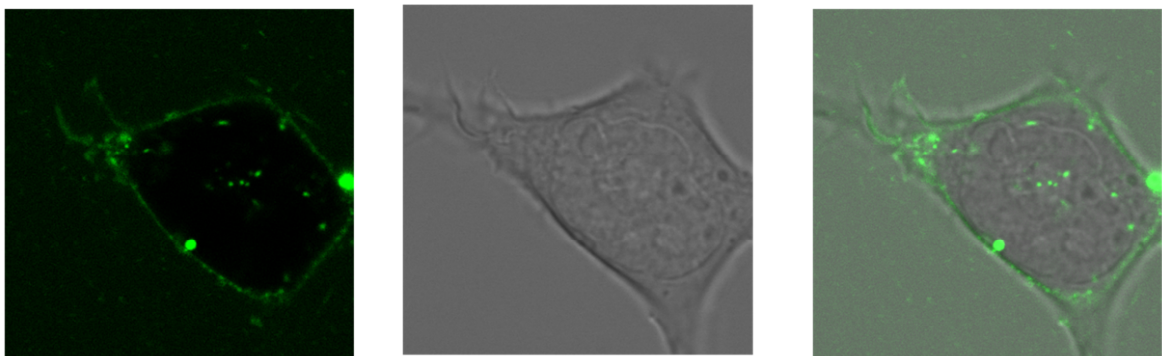
Abbildung 4.51: Bestimmung der Zellaufnahme von Polyplexen aus p-DNA und Blockcopolymeren T1, T3, T4 und T5 (N/P = 7) über FACS. (y-Achse: MFI (Mittlere Fluoreszenzintensität des Polymerfarbstoffes Oregon Green 488; MOCK: neg. Kontrolle ((nackte p-DNA, N/P = 0, +=Anzahl Durchführungen)

Abbildung 4.51 zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität des polymergebundenen Farbstoffes Oregon Green 488 für die Polyplexe gebildet aus p-DNA und den entsprechenden Blockcopolymeren T1, T3, T4 und T5 (0,1 µg p-DNA, N/P=7). Für alle Polyplexe ist eine deutlich erhöhte zellassoziierte Fluoreszenz des Polymerfarbstoffes im Vergleich zur

Negativkontrolle (nackte p-DNA) zu erkennen. Die p-DNA in den Polyplexen wird also von den Zellen erfolgreich gebunden/aufgenommen.

Um darüber hinaus zu bestimmen, ob die Polyplexe auch tatsächlich von den Zellen internalisiert werden, wurde zusätzlich für die Polyplexe von **T3** und **T4** mit p-DNA konfokale Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Dazu wurden wieder die Oregon Green 488 modifizierten Polymere verwendet (Abbildung 4.52).

Polyplex aus p-DNA und poly[Lys]₂₀-b-poly[HPMA]₁₉₀ T3



Polyplex aus p-DNA und poly[Lys]₃₀-b-poly[HPMA]₂₀₀ T4

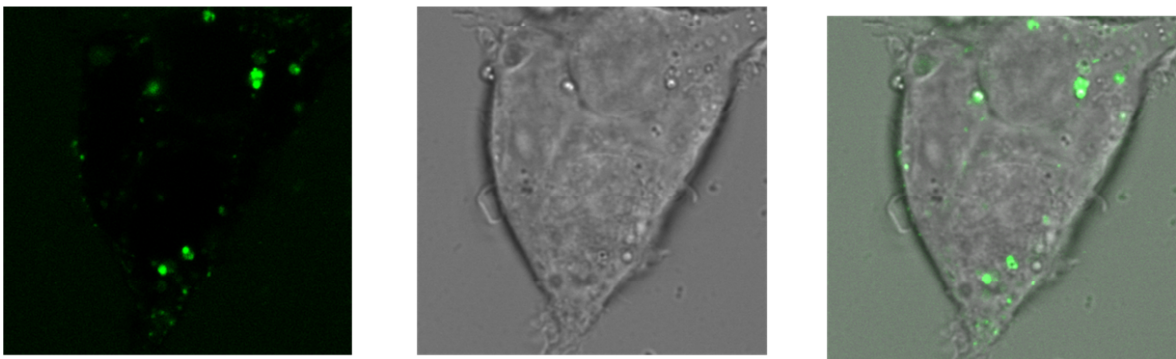


Abbildung 4.52: Konfokale Mikroskopie-Aufnahmen von HEK-293T Zellen nach Inkubation mit Polyplexen aus p-DNA und Oregon Green 488 markiertem Polymer T3 bzw. T4 (N/P=7)

Die Aufnahmen zeigen, dass die Polyplexe wirklich von den Zellen internalisiert werden.

Für eine erfolgreiche Transfektion der Zellen muss die p-DNA allerdings nicht nur internalisiert werden, sondern auch in den Zellkern gelangen und von der Transkription/Translations-Maschinerie erfolgreich abgelesen werden. Um dies für die Polyplexe zu kontrollieren, wurde die p-DNA *pRLEF1 α* verwendet. Diese enthält ein Reporter gen,

welches für das Enzym Luciferase codiert. Wird eine Zelle erfolgreich mit dieser p-DNA transfiziert, wird das das Enzym Luciferase extrachromosomal exprimiert. Das Enzym katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Luciferin zu Oxyluciferin. Oxyluciferin weist eine Biolumineszenz bei 480 nm auf. Auf diese Weise kann mit einem Luminometer die Menge an Substrat direkt quantifiziert werden und korreliert mit der Menge an exprimierter Luciferase. Dadurch lässt sich indirekt die Transfektionseffizienz bestimmen.

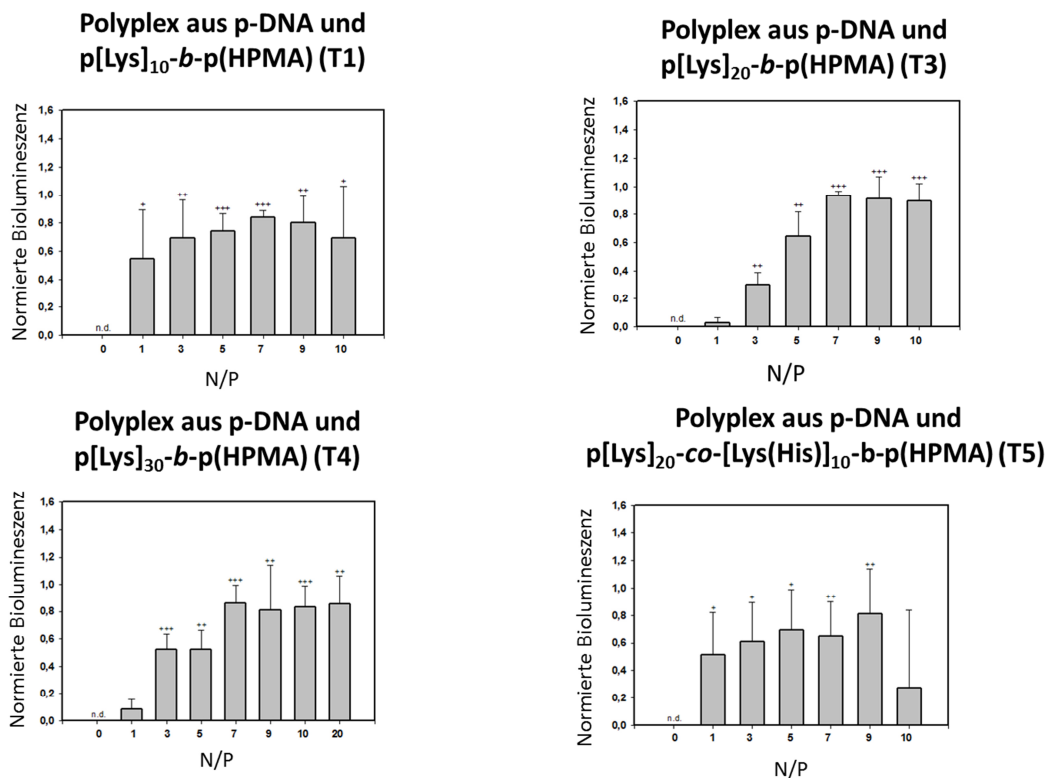


Abbildung 4.53: Transfektionseffizienz(Biolumineszenz) für die Polyplexe aus p-DNA und den entsprechenden Blockcopolymeren für verschiedene N/P Verhältnisse an HEK-293T Zellen nach 24 Stunden (normalisiert, indem die Differenz zwischen dem Transfektionsansatz ohne Polymerzugabe („N/P=0“) und der Transfektionsansätze mit Polymerzugabe gebildet wurde. Danach wurden die errechneten Werte durch den höchsten ermittelten Wert geteilt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen „ohne Polymer“ transfizierten Zellen und „mit Polymer“ transfizierten Zellen sind angegeben. (N=3)

Abbildung 4.53 zeigt die so bestimmte Transfektionseffizienz (Biolumineszenz) für die Polyplexe aus p-DNA und den entsprechenden Blockcopolymeren an HEK-293T Zellen nach 24 Stunden für verschiedene N/P Verhältnisse (0,1 µg p-DNA). Dabei ist zu beachten, dass die Werte so normiert sind, dass die Differenz zwischen Negativkontrolle (nackte p-DNA N/P =0) und gemessenem Wert gebildet wurde und anschließend nochmal auf den höchsten Wert normalisiert wurde. Die Fehlerbalken geben also den statistischen

Unterschied (N=3) in der Transfektionseffizienz zur Negativkontrolle (nackte p-DNA, N/P=0) an.

Als erstes ist festzuhalten, dass durch die Zugabe der Blockcopolymeren die Transfektionseffizienz deutlich verbessert wird. (Auch mit nackter p-DNA ist bei den verwendeten Mengen an p-DNA (0,1 µg) eine schwache Transfektion zu beobachten.) Verglichen mit nackter p-DNA steigt die Transfektionseffizienz für Polyplexe bis zu einem Mischungsverhältnis von Polymer und p-DNA von N/P =7. Hier ist die größte Transfektionseffizienz zu finden (größter Unterschied zur Negativkontrolle).

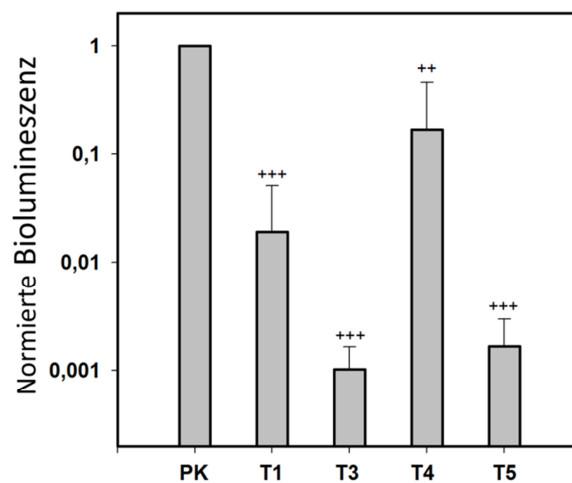


Abbildung 4.54: Transfektionseffizienz(Biolumineszenz) für die Polyplexe gebildet aus p-DNA und den entsprechenden Blockcopolymeren (0,6 µg p-DNA, N/P =7) bzw. FuGeneHD[®] (0,1 µg p-DNA) an HEK-293T Zellen nach 24 Stunden ermittelt über Luciferase-Assay (normiert auf die positiv Kontrolle (PK) FuGeneHD[®])

Um die Effektivität der Transfektion durch die unterschiedlichen Polyplexe einzuordnen und untereinander zu vergleichen, wurden sie mit dem kommerziellen Transfektionsreagenz FuGene HD[®] verglichen. FuGene HD[®] ist eine nicht-liposomale Lipidformulierung. Es wird standardmäßig für „in vitro“ Transfektionen genutzt.

Abbildung 4.54 zeigt die Transfektionseffizienz für Polyplexe gebildet aus p-DNA und den Polymere **T1**, **T3**, **T4** und **T5** für (N/P =7) sowie FuGeneHD[®]. Die Werte sind auf die positiv Kontrolle (PK) FuGeneHD[®] normiert, welches mit Abstand am effizientesten transfiziert. Auffällig ist zudem, dass Polyplexe aus **T4** um ca. eine Größenordnung besser transfiziert ist als die Polyplexe gebildet aus **T1** und sogar zwei Größenordnungen besser als Polyplexe aus **T3**. Zu erwarten wäre eher ein stetiger Anstieg in der Transfektionseffizienz (**T1**<**T3**<**T4**), da durch die steigende Länge des Polylysin auch die

Transfektionseffizienz steigt (Optimum bei ca. 30-50 Wiederholungseinheiten Lysin).^[101, 159, 160] Eine mögliche Begründung, warum Polyplexe aus **T1** nicht diesem Trend folgen, ist, dass durch das sehr kurze Polylysin der Einschluss der p-DNA ineffizient ist (keine gute Abschirmung der positiven und negativen Ladungen nach außen, ähnlich wie bei Polyplexen ohne hydrophile Korona). Dies könnte eine erhöhte Transfektionseffizienz bewirken, allerdings wäre für spätere therapeutische Anwendungen eine ineffiziente Abschirmung sehr unerwünscht. Sehr auffällig ist auch, dass Polyplexe aus **T5** (**T4** mit teilweise Histidin modifiziertem Polylysin) sehr viel schlechter transfizieren als Polyplexe aus **T4**. Durch die zusätzliche Modifikation eines Teils des Polylysin mit Histidin sollte die Transfektionseffizienz erhöht werden. Da der Imidazol-Ring der Histidin-Seitenkette einen pK_s -Wert von ca. 6 aufweist, ist er bei physiologischem pH-Wert (7,2-7,4) nicht protoniert. Sinkt der pH Wert nach Aufnahme im Endosom (pH ca 5,5), wird die Histidin-Gruppe protoniert und es kommt zum vermehrten Einstrom von Protonen. Zum Ladungsausgleich kommt es auch zu einem Einstrom von Chlorid-Ionen. Dies führt zu einem osmotischen bedingten Anschwellen der Endosomen und schließlich zum Aufbrechen der Endosom Membran (engl.: „*proton sponge effect*“). Dies sollte eine verbesserte Freisetzung der Polyplexe aus den Endosomen verursachen. Da die Freisetzung aus dem Endosom ein kritischer Schritt bei der Transfektion ist, sollte die Einführung von Histidin-Gruppen die Transfektionseffizienz verbessern. Allerdings transfizieren hier Polyplexe aus Polymeren mit Histidin modifiziertem Polylysin (**T5**) sehr viel schlechter als ohne (**T4**).

Um eine Aussage über die Größe der Polyplexe zu machen wurden für die Polyplexe gebildet aus Oregon Green 488 markierten Blockcopolymeren **T3** und **T4** mit p-DNA (für N/P =7) FCS-Messungen in TRIS-Puffer durchgeführt. Dazu wurden zuerst die kationischen Blockcopolymeren einzeln vermessen und anschließend die entsprechenden fertig gebildeten Polyplexe.

Abbildung 4.55 zeigt die Autokorrelationskurven und die resultierenden hydrodynamischen Radii. Es ist klar zu sehen, dass die Mischung der kationischen Blockcopolymeren mit p-DNA zu Bildung stabiler Polyplexe führt. Für den hydrodynamischen Radius ringförmiger p-DNA („*open linear*“) kann ungefähr ein Wert von 127 nm angenommen werden.^[163] Dies zeigt, dass es bei der Bildung der Polyplexe zur erwarteten „Verdrillung“ der p-DNA kommt und sie so effizient eingeschlossen wird.

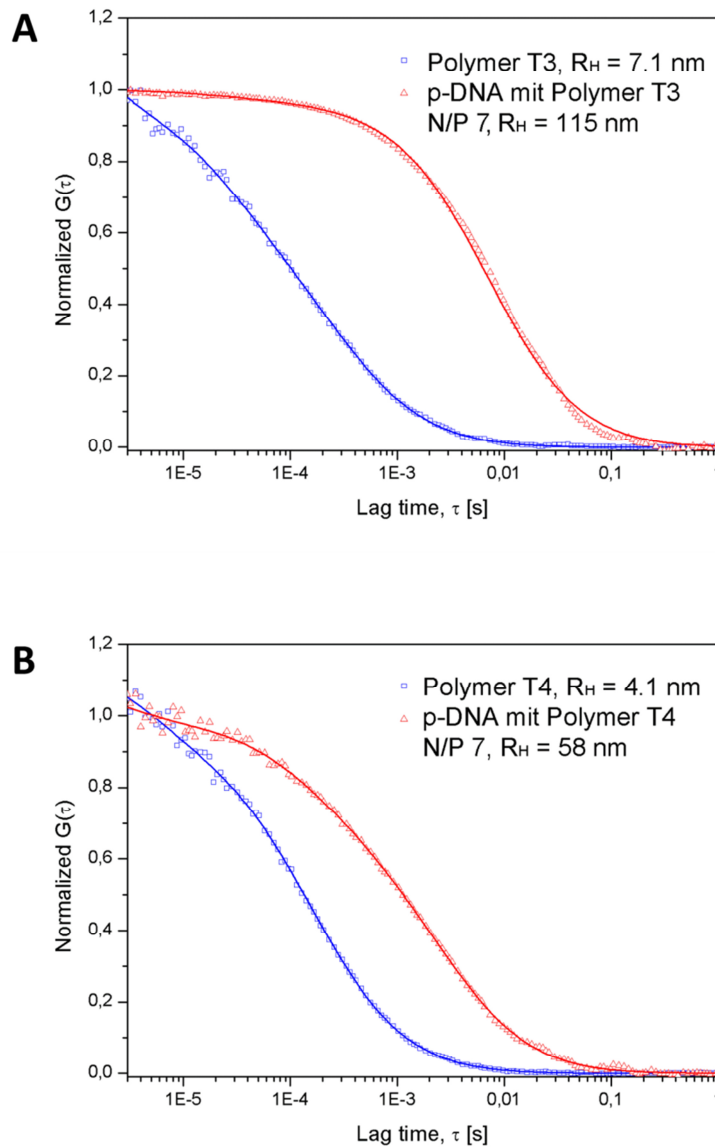


Abbildung 4.55: Autokorrelationskurven für A): Blockcopolymer T3 (blau) und Polyplex aus p-DNA und Polymer T3 (rot) für $N/P = 7$; B): Blockcopolymer T4 (blau) und Polyplex aus p-DNA und Polymer T4 (rot) für $N/P = 7$

Allerdings sind die Polyplexe gebildet aus **T3** mit einem hydrodynamischen Radius von 115 nm im Vergleich zu Polyplexen gebildet aus **T4** mit einem hydrodynamischen Radius von 58 nm doppelt so groß. Eine mögliche Begründung hierfür ist, dass bei konstanter Ladungskompensation ca. anderthalb mal so viele Polymer **T3** wie **T4** vorhanden sind. Auf diese Weise wird für **T3** der Platz des langen HPMA-Blocks an der Oberfläche knapp und es kommt zu einer Ausdehnung des Polyplexes. Dies ist eine mögliche Begründung, warum die Polyplexe aus **T3** im Vergleich zu **T4** ineffizienter transfizieren. Die doppelte Größe scheint die Aufnahme oder die Prozessierung der Polyplexe innerhalb der Zelle zu

beeinflussen. Gleiches gilt auch für die Modifizierung mit Histidin. Bei p[Lys]-*b*-p[Sar], einem p[Lys]-*b*-p[HPMA] sehr ähnlichen System, führte die teilweise Modifizierung des Polylysinblocks mit Histidin zu einer Verdopplung der Größe der Polyplexe (von ca. 100 auf 200 nm).^[164] Dies könnte erklären, warum auch Polyplexe gebildet mit Histidin modifiziertem Polymer (**T5**) viel schlechter transfizieren als Polyplexe aus Polymer ohne Histidin Modifizierung (**T4**). Denn die Histidinmodifizierung führt sehr wahrscheinlich auch hier zu einer starken Vergrößerung der Polyplexe und so auch wieder zu einer schlechteren Aufnahme bzw. Prozessierung und damit zu einer Verringerung der Transfektionseffizienz.

Zusätzlich wurde eine potentielle Toxizität der Polyplexe mit Hilfe des MTT-Assay überprüft. Dabei wird ein membrangängiges Salz verwendet um die mitochondriale Stoffwechselaktivität von Zellen zu überprüfen bzw. um zu prüfen ob diese durch die Polyplexe beeinträchtigt wird. Für diese Versuche wurde ein „blind“ p-DNA (*pGL3 basic*) verwendet, welche kein Reporter gen für Luciferase enthält, damit es zu keiner Verfälschung der Ergebnisse kommt (Detektion von Luciferase- und MTT Assay bei ähnlichen Wellenlängen). Fällt die Zellviabilität unter 80 %, spricht man im Allgemeinen von Zelltoxizität.

Abbildung 4.56 A zeigt die Viabilität von HEK-293T-Zellen nach Inkubation mit Polyplexen aus p-DNA und den entsprechenden Polymeren für verschiedene N/P Verhältnisse der Polyplexe. Die Werte sind auf die Negativkontrolle (nackte p-DNA, N/P=0) normiert. Als Positivkontrolle wurde DMSO verwendet. Es zeigt sich, dass keiner der Polyplexe in den für die Transfektion verwendeten N/P-Verhältnissen Anzeichen von Toxizität aufweist. Erst für N/P =100 zeigt sich (für **T4**) eine leichte Beeinflussung der Zellvitalität. Kommerzielle, nicht-virale Transfektionsvektoren wie zum Beispiel FuGeneHD[®] und Jet-PEI[®] wiesen dagegen eine signifikante Toxizität auf (Abbildung 4.56B). Gerade FuGeneHD[®], welches eine sehr hohe Transfektionseffizienz gezeigt hat, besitzt gleichzeitig eine hohe Zelltoxizität.

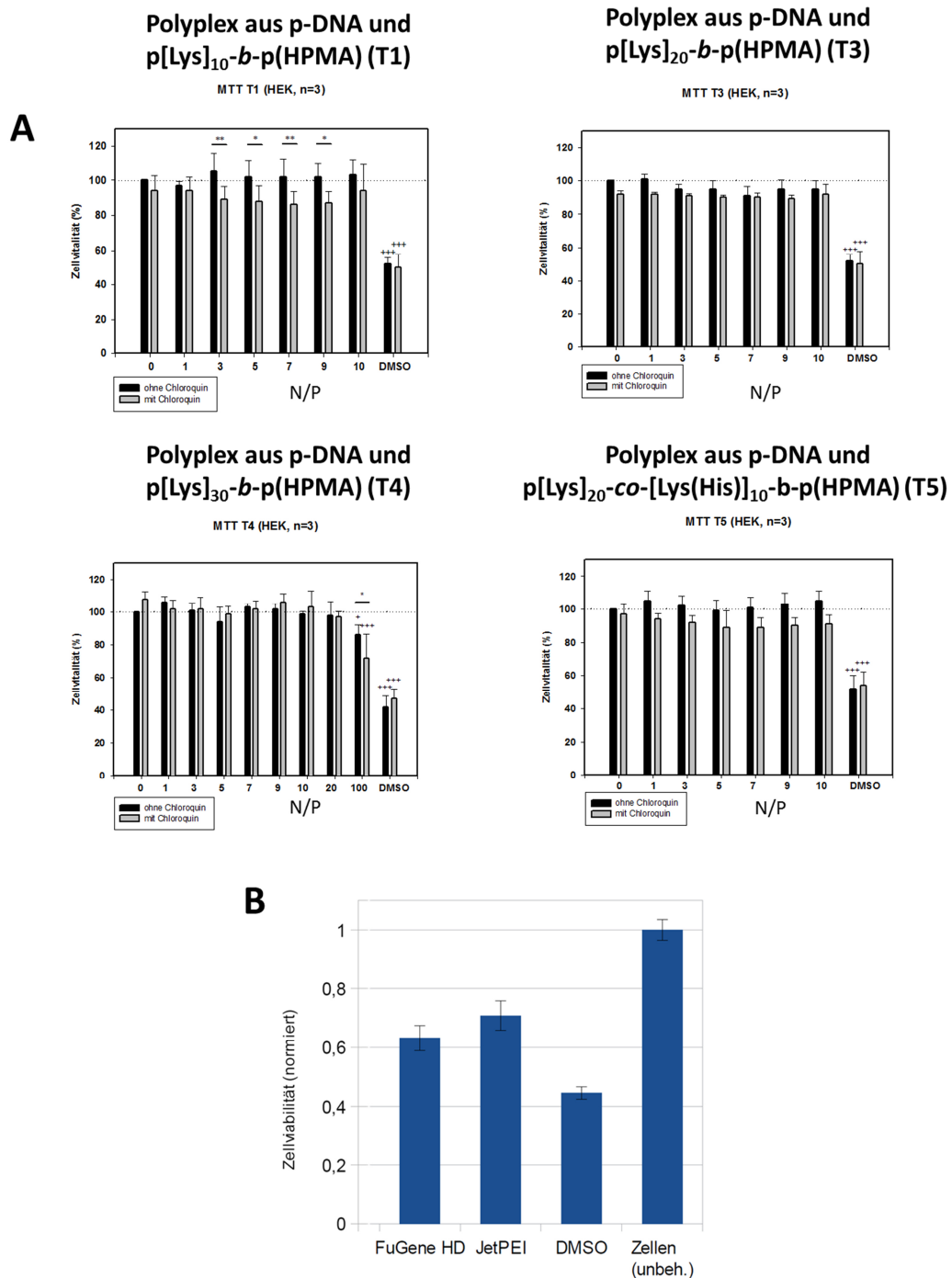


Abbildung 4.56: Viabilität von HEK-293T Zellen A) nach Inkubation mit Polyplexen aus p-DNA und den entsprechenden Blockcopolymeren für verschiedene N/P Verhältnisse bestimmt über MTT-Assay. Zellviitalität (%) normalisiert indem die Probe mit nackter p-DNA (N/P=0) auf 100 % gesetzt wurde (pos. Kontrolle DMSO).B) Nach Inkubation mit kommerziellen, nicht viralen Transfektionsreagenzien bestimmt über MTT-Assay. Zellviitalität (%) normalisiert indem die Probe mit nackter p-DNA (N/P=0) auf 100 % gesetzt wurde (pos. Kontrolle DMSO)

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die poly[Lys]-b-poly[HPMA] Blockcopolymere mit p-DNA Polyplexe bilden, die einen erfolgreichen Transport in HEK-293T-Zellen vermitteln. Darüber hinaus lassen sich die Zellen mit diesen Polyplexen erfolgreich

transfizieren. Die Transfektionseffizienzen unterscheiden sich dabei, je nachdem welches Blockcopolymer für die Bildung verwendet wurde. Besonders hervorzuheben ist allerdings, dass die Transfektionseffizienzen zwar unter den von kommerziellen, nicht-viralen Transfektionsvektoren liegen, allerdings weisen sie eine viel geringere Toxizität auf. Somit stellen sie vielversprechende polymere Transfektionsvektoren dar, da sie in der Lage sind, Zellen zu transfizieren und gleichzeitig kaum Zelltoxizität zeigen. Darüber hinaus ist festzuhalten, dass die Länge des Polylysins in den Blockcopolymeren nicht viel kürzer als 20 sein sollte, um einen vollständigen Einschluss der p-DNA zu gewährleisten. Sowohl die Verwendung von Chloroquin (Reduktion des lysosomalen Abbaus) als auch der Einbau von Histidin (puffernde Gruppen zur verbesserten endosomalen Freisetzung) führten nicht zu einer Steigerung der Transfektionseffizienz (im Fall von Histidin eher zu einer Reduktion der Transfektionseffizienz). Zusätzlich scheint die Größe der Polyplexe einen großen Einfluss auf die Transfektionseffizienz zu haben. Die Polyplexe aus Polymer **T4** und p-DNA, welche den scheinbar kleinsten Durchmesser haben ca. (110 nm), sind auch am effizientesten.

Eine zentrale Aufgabenstellung ist nun die Effizienz dieser polymeren Transfektionsvektoren zu erhöhen, ohne eine gleichzeitige Erhöhung der Toxizität zu bewirken.

Zunächst ist aber eine Verbesserung der Methode zur Kontrolle der Transfektionseffizienz erforderlich. Der Luciferase-Assay ist zwar sehr gut geeignet, um eine größere Anzahl an Transfektionsmitteln zu testen und zu vergleichen, allerdings ist es nur eine indirekte Methode zur Bestimmung der Transfektionseffizienz und darüber hinaus ist eine genaue Quantifizierung der Anzahl an positiv transfizierten Zellen nicht möglich. Denn es ist nicht klar, ob zum Beispiel wenige Zellen sehr gut transfiziert oder viele Zellen nur mäßig transfiziert werden. Die detektierte Biolumineszenz ist in beiden Fällen gleich groß. Aus diesem Grund bietet sich eine andere Methode zur Bestimmung der Transfektionseffizienz an.^[164] Dazu wurde für die Bildung der Polyplexe eine p-DNA verwendet, die für das *Green Fluorescent Protein* (GFP) codiert (pEGFP-N1). Positiv transfizierte Zellen exprimieren also dieses Protein, welches bei 509 nm direkt detektiert werden kann. Über Durchflusszytometrie (FACS-Messungen) kann so also direkt über Detektion des GFP-Proteins die Anzahl der positiv transfizierten Zellen quantifiziert werden und so die Effizienz verschiedener Transfektionsvektoren direkt verglichen werden.

Ergebnisse und Diskussion

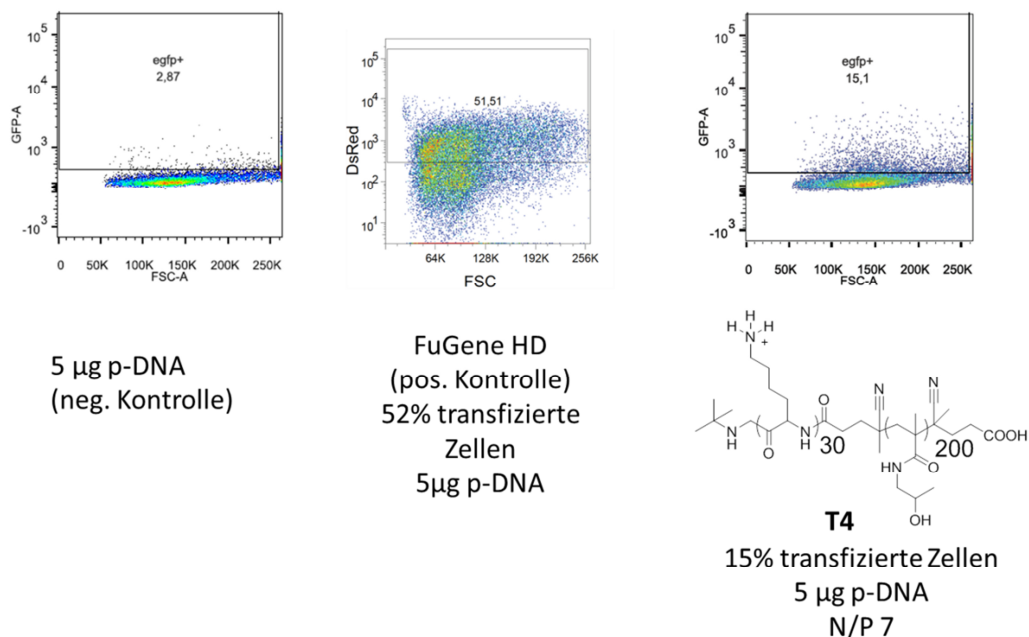


Abbildung 4.57 Durchflusszytometrie (FACS-Messungen) an HEK-293T Zellen zur Quantifizierung der GFP-(bzw. DsRed) exprimierenden Zellen nach Transfektion mit nackter p-DNA (5µg), FuGeneHD® (5µg) und Polymer T4 (5µg p-DNA, N/P=7) nach 24 Stunden.(x-Achse: FSC: Größe der Zellen; y-Achse: Fluoreszenzintensität von GFP, bzw. dsRed bei FuGene)

Abbildung 4.57 zeigt die über FACS gemessene Anzahl an Zellen die GFP exprimieren für nackte p-DNA bzw. Polyplex aus p-DNA und Polymer **T4**. Als Vergleich ist Anzahl an positiv transfizierten Zellen nach Inkubation mit FuGene (hier codierte die p-DNA für das Red Fluorescent Protein (DsRed), welches lediglich bei einer anderen Wellenlänge detektiert wird). Die Anzahl an Farbstoff positiven Zellen spiegelt die Anzahl an erfolgreich transfizierten Zellen wieder. Mit Hilfe des Polymers **T4** konnten ca. 12 % der Zellen transfiziert werden. Mit dem kommerziellen FuGeneHD® werden ca. 48 % der Zellen transfiziert, nach Abzug der Negativkontrolle (nackte p-DNA). Die Abstände sind hier wesentlich geringer als bei der Bestimmung über den Luciferase-Assay. Dies ist vermutlich darin begründet, dass hier zwar die Anzahl der positiv transfizierten Zellen bestimmt wird, allerdings nicht wie stark diese das Protein exprimieren. FuGeneHD® scheint also nicht nur mehr Zellen zu transfizieren, sondern diese auch wesentlich effektiver, weshalb die über den Luciferase-Assay ermittelte Effizienz so viel besser ist (ca. 10x).

Ein Vorteil der Bestimmung der Transfektionseffizienz über Durchflusszytometrie ist, dass gleichzeitig auch Toxizitätsmessungen durchgeführt werden können. Durch Anfärbung mit Apoptose- bzw. Nekrosesensitiven Farbstoffen AnnexinV und 7-AAD können apopto-

Ergebnisse und Diskussion

tische- und nekrotische Zellen detektiert werden. 7-AAD interkaliert dabei mit der DNA von nekrotischen Zellen. Annexin V bindet selektiv an Phosphatidylserine auf der Außenseite der Membran von apoptotischen Zellen. Bei AnnexinV-positiven Zellen spricht man also von apoptotischen Zellen und bei 7-AAD-positiven von nekrotischen Zellen. Sind Zellen sowohl positiv für AnnexinV als auch für 7-AAD spricht man von spätapoptotischen Zellen. Sind sie negativ für beide, spricht man von intakten Zellen.

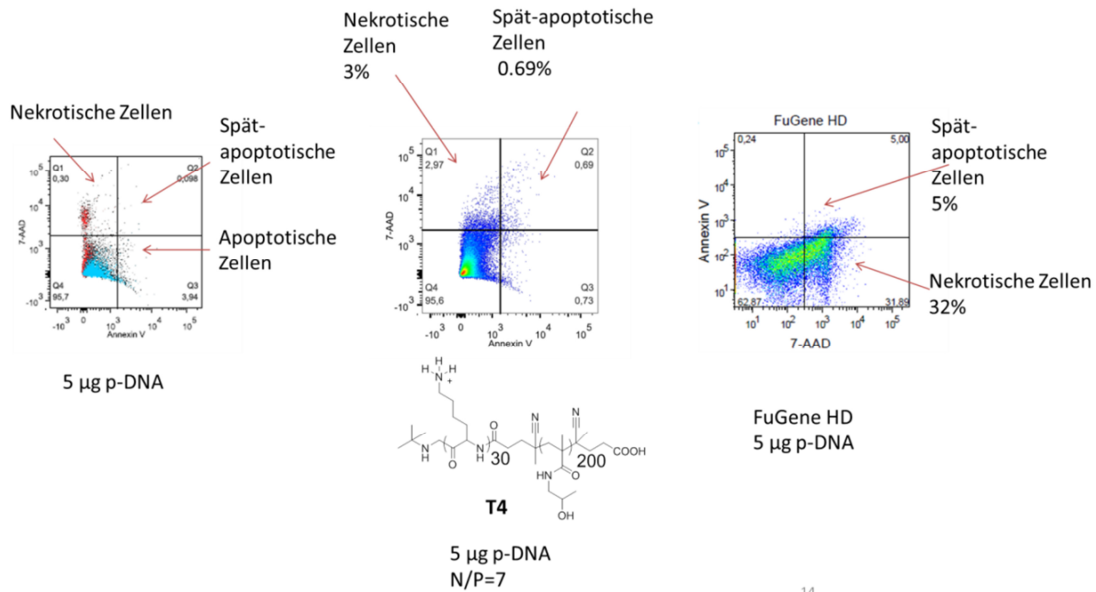


Abbildung 4.58: Durchflusszytometrische Bestimmung der Toxizität von p-DNA, Polyplexen aus p-DNA und Polymer T4 (5µg p-DNA; N/P=7) und FuGeneHD® (5µg) an HEK-293T Zellen nach 24 Stunden. (p-DNA und Polyplex mit T4: x-Achse: AnnexinV Färbung, y-Achse 7-AAD; FuGeneHD®: x-Achse 7-AAD, y-Achse AnnexinV)

Abbildung 4.58 zeigt die Toxizität für p-DNA, Polyplexe aus p-DNA und **T4** und FuGeneHD®. Sie belegt die gleichen Ergebnisse wie schon beim MTT-Assay. FuGeneHD® weist eine hohe Zytotoxizität auf und vor allem eine hohe Anzahl an nekrotischen Zellen, was ein Zeichen für eine starke Destabilisierung der Zellmembran sein kann, sowie spätapoptotische Zellen. Die Polyplexe mit Polymer **T4** dagegen zeigen keine signifikante Erhöhung der Zytotoxizität gegenüber freier p-DNA. Dies unterstreicht wiederholt die Vorteile der polyplexen Transfektionsvektoren, eine gute Transfektionseffizienz (wenn auch signifikant schlechter als zum Beispiel FuGeneHD®) ohne signifikante Zelltoxizität aufzuweisen.

Polyplexe aus p-DNA und dem Polymer **T4** zeigten dabei die größte Transfektionseffizienz. Die zuvor durchgeführten FACS-Messungen mit Farbstoff gekoppeltem Polymer zeigten eine effiziente Bindung/Aufnahme der Polyplexe bei HEK-293T Zellen. Die

schwächere Transfektionseffizienz verglichen mit FuGeneHD[®] scheint daher durch intrazellulären Barrieren verursacht zu werden. Sehr wahrscheinlich ist ein ineffizienter Austritt aus dem Endosomen, was zu einem vermehrten Transport in Lysosomen und zur Inaktivierung der p-DNA führt. Möglich ist auch eine unzureichende Freisetzung der p-DNA aus den Polyplexen. Allerdings zeigten Ansätze zur Verbesserung der Transfektionseffizienz durch verbesserte endosomale Freisetzung, zum Beispiel durch Histidin-Modifizierung oder Zugabe von Chloroquin, keinen Erfolg.

4.2.3 Synthese und Charakterisierung von Poly[Lysin]-*b*-poly[HPMA] Blockcopolymeren mit reaktiv spaltbarem Disulfid

Die Einführung von reaktiv spaltbaren Bindungen wie beispielsweise Disulfide zwischen dem kationischen Polylysin und der abschirmenden poly[HPMA] Korona ist dabei ein vielversprechender Ansatz um die gezielte Freisetzung aus dem Endosom zu erreichen. Für ein ähnliches System (poly[Asp(DET)]-*b*-PEG) konnte durch Einführung einer Disulfidbrücke (poly[Asp(DET)]-*b*-SS-PEG) eine Steigerung der Transfektionseffizienz um mehrere Größenordnungen erreicht werden^[114] und auch für andere Systeme konnte eine erhöhte Effizienz nachgewiesen werden.^[165] Je nach Zeitpunkt der Disulfid-Spaltung kann die Offenlegung des kationischen Blocks folgende Auswirkungen haben:

1. Verbesserte Zellaufnahme durch Wechselwirkung mit der äußeren Zellmembran.
2. Eine verbessertes Austreten aus endosomalen Kompartimenten durch Wechselwirkung mit der endosomalen Membran.
3. Eine verbesserte Freisetzung aus dem Polyplex durch schnelleren Austausch mit zytosolischen Anionen.

Daher sollte nun ein gezielter Einbau einer Disulfidbrücke für das Blockcopolymer **T4** erreicht werden. ((**p[Lys]-*b*-p[HPMA]**) → **p[Lys]-*b*-S-S-p[HPMA]**). Der Einbau der Disulfidbrücke sollte am Makro-Lysin-CTA erfolgen. Dazu wurde zunächst ein Reaktivester-CTA mit Disulfidbrücke synthetisiert (Disulfid-Aktivester-CTA). Dieser wurde anschließend selektiv an den *N*-Terminus eines *Z*-geschützten Polylysins gebunden und auf diese Weise ein Makro-Disulfid-Lysin-CTA (**p[Lys]-S-S-CTA**) erhalten (Abbildung 4.59).

Unter Verwendung dieses Makro-Disulfid-Lysin-CTA's konnte das PFMA Monomer kontrolliert RAFT-polymerisiert werden. Trotz möglicher Beeinflussung des kontrollierten RAFT-Prozesses durch das Disulfid konnten ähnliche Ergebnisse wie mit dem Makro-Lysin-CTA ohne Disulfid erreicht werden. Eine kontrollierte RAFT-Polymerisation in Gegenwart von Disulfiden ist also möglich, wie es auch schon in der Literatur beschrieben ist.^[166]

Ergebnisse und Diskussion

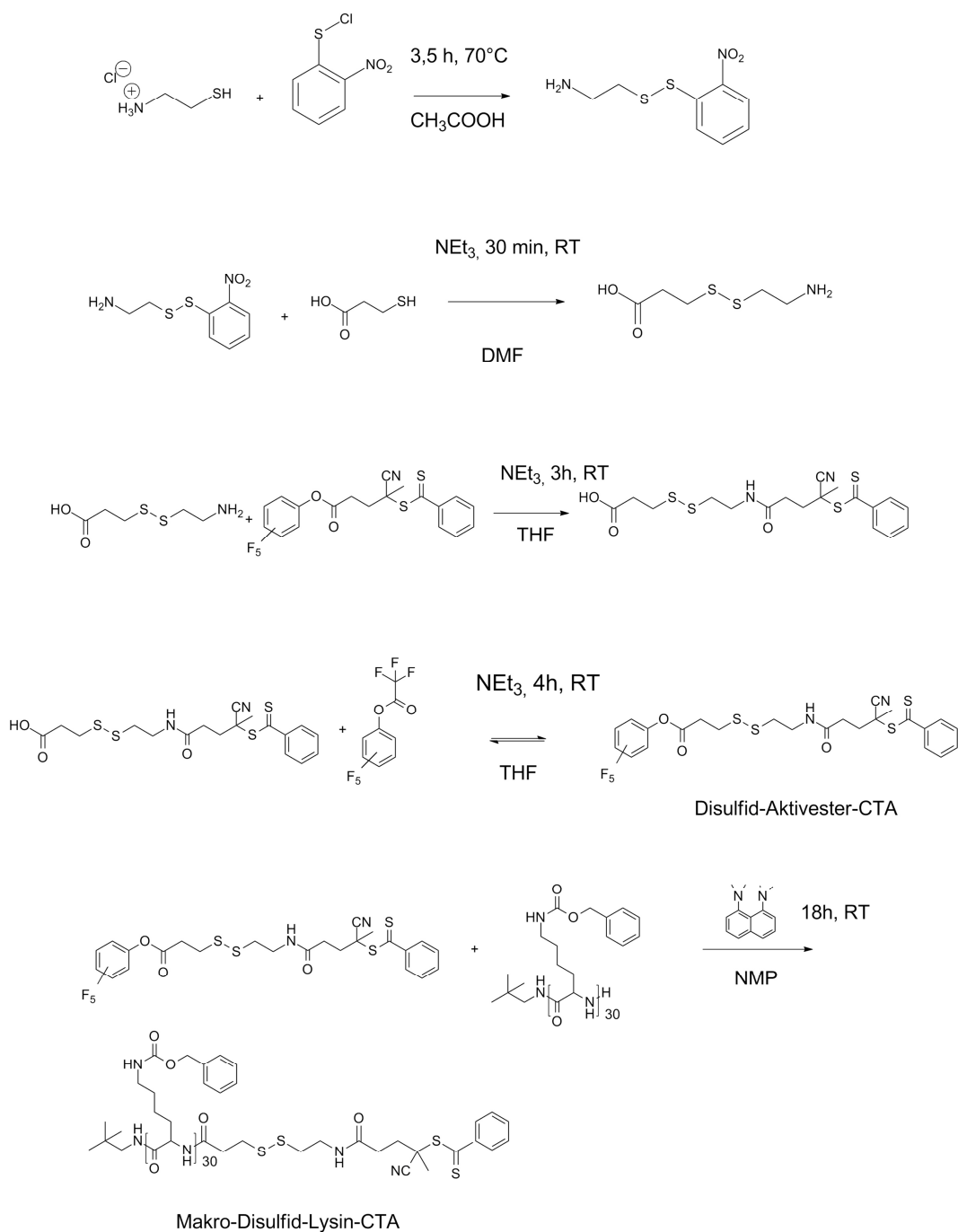


Abbildung 4.59: Synthese des Makro-Lysin-CTA's mit reaktiv spaltbarer Disulfidbrücke (Makro-Disulfid-Lysin-CTA)

Auch die anschließende Entfernung der Dithioester-Endgruppe mit einem Überschuss an ACVA (hohe Radikalkonzentration) führte nicht zu einer Spaltung des Disulfids. Die polymeranaloge Umsetzung mit 2-Hydroxypropylamin führte zu **p[Lys(Z)]-b-S-S-p[HPMA]** Blockcopolymeren (Abbildung 4.60). Es wurden dabei drei verschiedene Blockcopolymerer synthetisiert (Tabelle 4.9). Abbildung 4.61 zeigt die entsprechenden GPC Elagramme von **p[Lys(Z)]-S-S-CTA** und **p[Lys(Z)]₃₀-S-S-b-p[HPMA] A-C**.

Ergebnisse und Diskussion

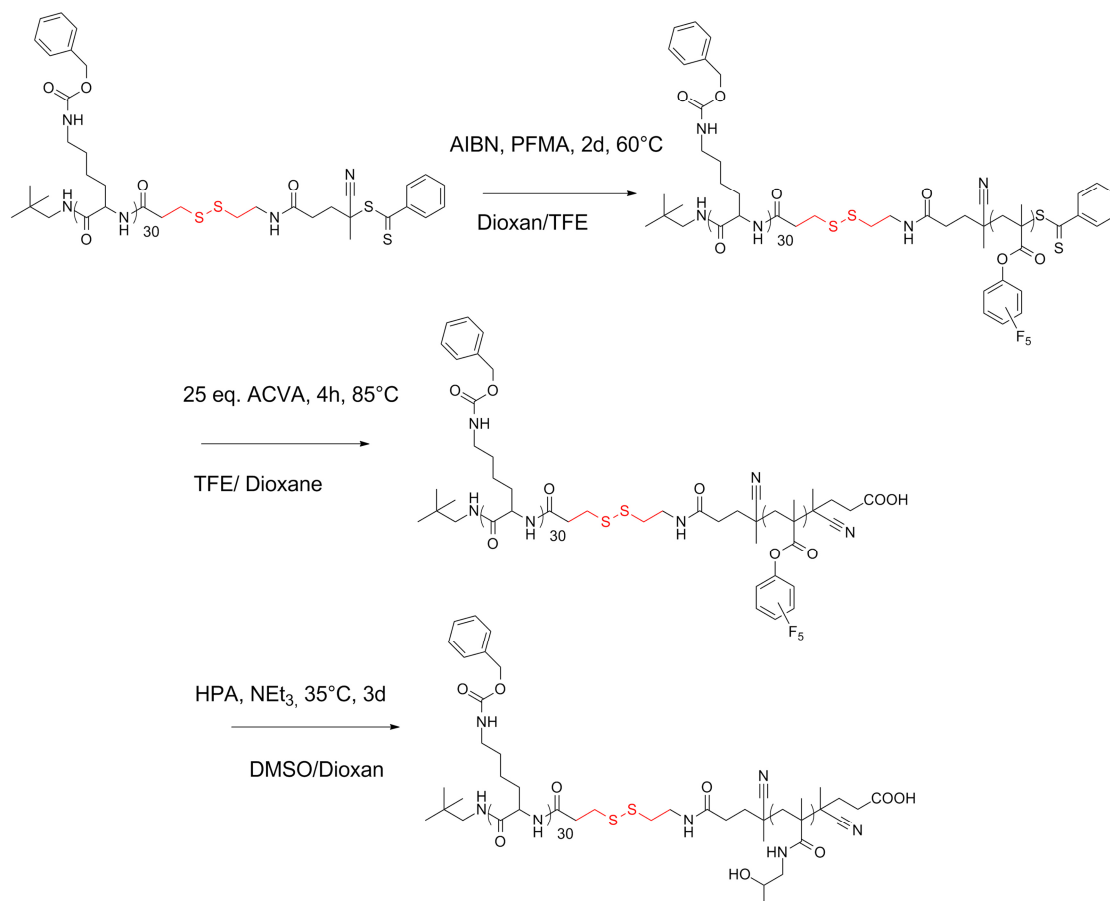


Abbildung 4.60: Syntheseschemata zur gezielten Einführung eines reaktiv spaltbaren Disulfid-Linkers am p[Lys]-b-p[HPMA] Blockcopolymer. (p[Lys]-b-S-S-p[HPMA])

Tabelle 4.9: Charakterisierung der p[Lys(Z)]-b-S-S-p[HPMA] Blockcopolymerie

	Verhältnis AIBN/Makro-Dissulfid- Lysin-CTA/ Monomer (PFMA)	Mn/Mw GPC (HFIP)	D GPC(HFIP)
p[Lys(Z)]-S-S-CTA		11.000/12.300	1,13
p[Lys(Z)]₃₀-S-S-b- p[HPMA] A	1/6/1000	32.100/ 47.500	1,48
p[Lys(Z)]₃₀-S-S-b- p[HPMA] B	1/6/1714	41.500/62.300	1,5
p[Lys(Z)]₃₀-S-S-b- p[HPMA] C	1/6/2224	47.100/72.500	1,54

Ergebnisse und Diskussion

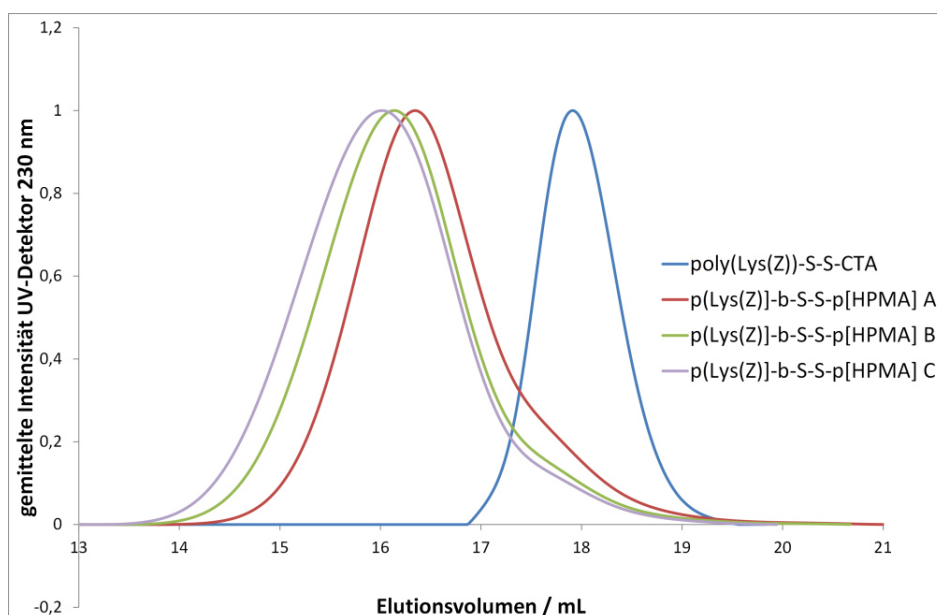


Abbildung 4.61: GPC in HFIP von $p[\text{Lys}(\text{Z})]$ -S-S-CTA und $p[\text{Lys}(\text{Z})]_{30}$ -S-S-b-p[HPMA] A-C

Als nächstes wurde kontrolliert, ob die Disulfid-Brücke nach den verschiedenen Syntheseschritten immer noch intakt ist. Dazu wurden die Blockcopolymere $p[\text{Lys}(\text{Z})]_{30}$ -S-S-b-p[HPMA] A-C in Wasser gelöst und mit dem Reduktionsmittel Tris(2-Carboxyethyl)phosphin (TCEP) versetzt (Abbildung 4.62).

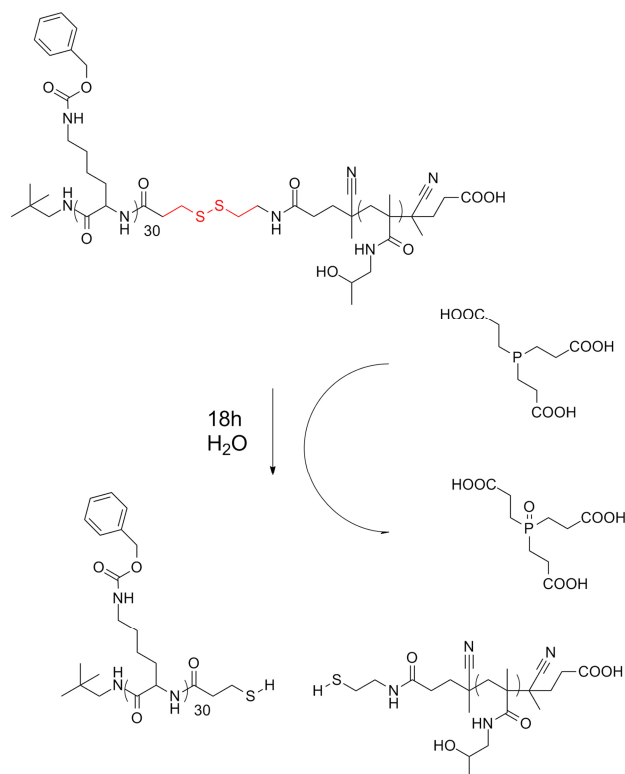


Abbildung 4.62: Kontrolle der intakten Disulfidbrücke durch gezielte Reduktion mit TCEP

Zur Kontrolle der Reduktion wurde direkt Aliquote aus der Reaktionslösung mittels GPC in HFIP vermessen (Abbildung 4.63-Abbildung 4.65). Die Elugramme belegen, dass für alle drei Blockcopolymerere die Reaktion mit TCEP zu Spaltung der Disulfidbindung führt. Die GPC Messung nach der Reduktion zeigt eine Verringerung des Molekulargewichts in allen Fällen um ca. die Größe des Lysin CTA's. Der Unterschied ist nicht sehr groß weil die Blocklängen sehr unterschiedlich sind ($p[\text{HPMA}] \gg p[\text{Lys}]$). Er erfolgt also zum Großteil eine Detektion des $p[\text{HPMA}]$ Blocks. Das abgespaltene Polylysin zeigt sich jeweils in einer „Schulter“ zu kleineren Molekulargewichten. Die gezielte Reduzierung des Disulfids zeigt also, dass sie in Blockcopolymeren immer noch intakt ist.

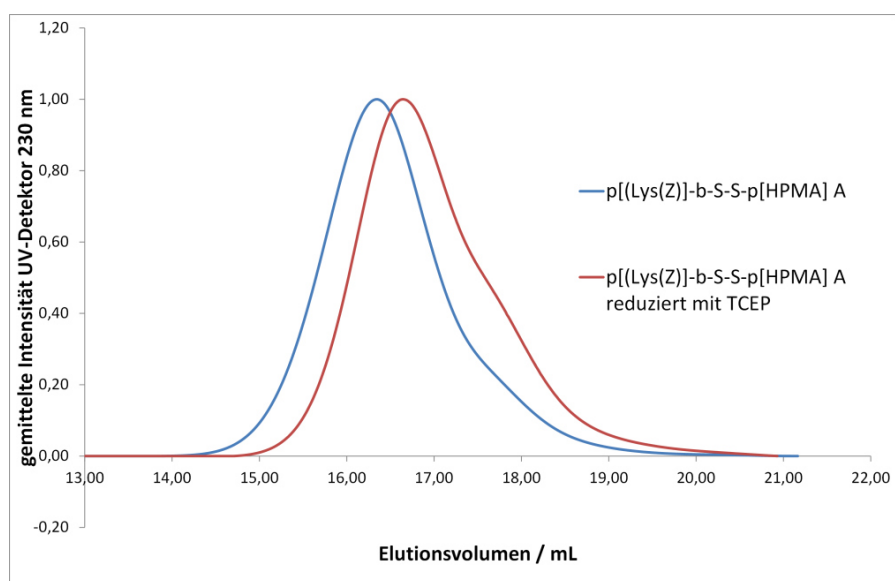


Abbildung 4.63: GPC in HFIP nach gezielter Reduktion mit TCEP für $p[\text{Lys}(\text{Z})]_{30}\text{-S-S-b-p}[\text{HPMA}] \text{ A}$ (blau: Blockcopolymer, rot: nach Reduktion).

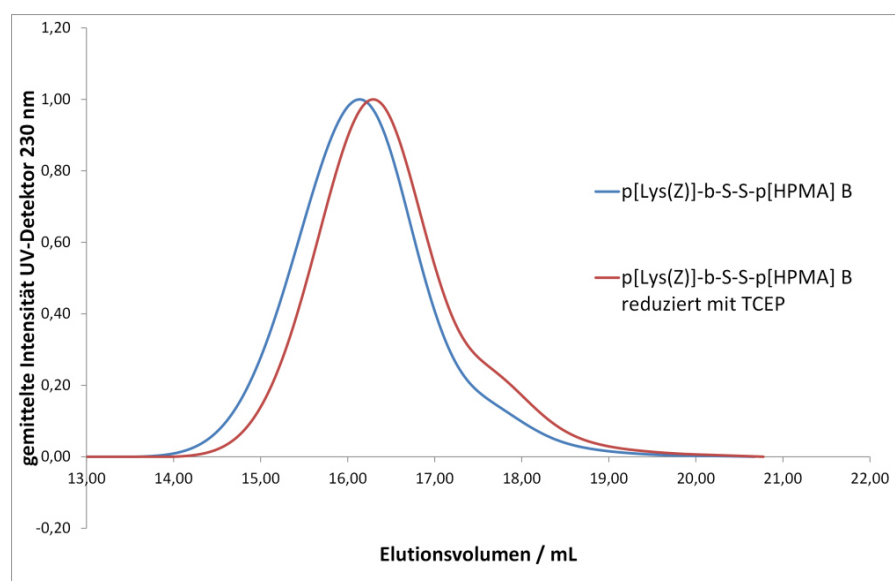


Abbildung 4.64: GPC in HFIP nach gezielter Reduktion mit TCEP für $p[\text{Lys}(\text{Z})]_{30}\text{-S-S-b-p}[\text{HPMA}] \text{ B}$ (blau: Blockcopolymer, rot: nach Reduktion)

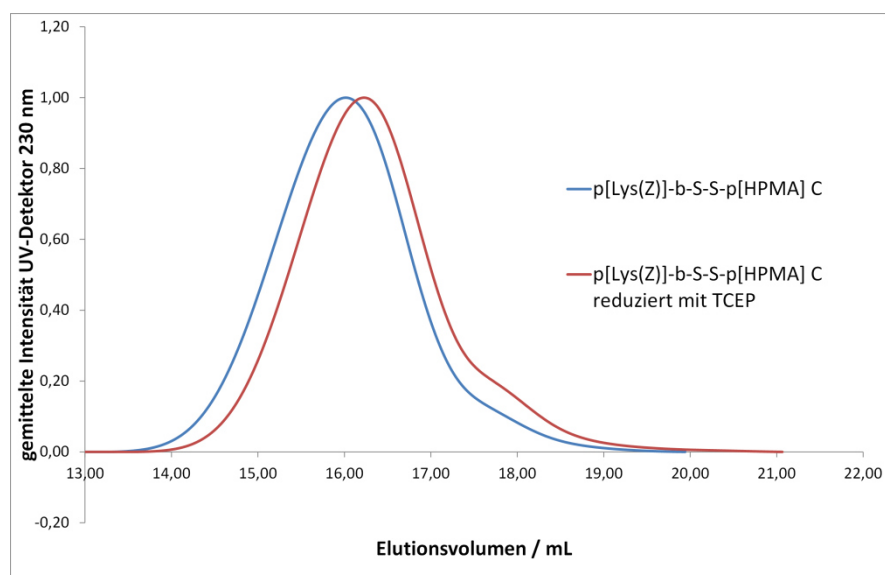


Abbildung 4.65: GPC in HFIP nach gezielter Reduktion mit TCEP für $p[\text{Lys}(\text{Z})]_{30}\text{-S-S-b-p[HPMA] C}$ (blau: Blockcopolymer, rot: nach Reduktion).

Zuletzt muss das Polylysin noch entschützt werden, um das gewünschte kationische Blockcopolymer mit Disulfid zu erhalten. Für die Blockcopolymere mit Disulfid führte die Reduktion mit Bromwasserstoffsäure allerdings zu Spaltung der Disulfide, vermutlich bedingt durch die relativ leichte Oxidierbarkeit der Bromid-Ionen. Aus diesem Grund wurde eine alternative Methode zur Entschützung der Z-Schutzgruppe des Polylysins verwendet. Dazu wurden die Blockcopolymere mit Methansulfonsäure in Trifluoressigsäure versetzt (Abbildung 4.66).

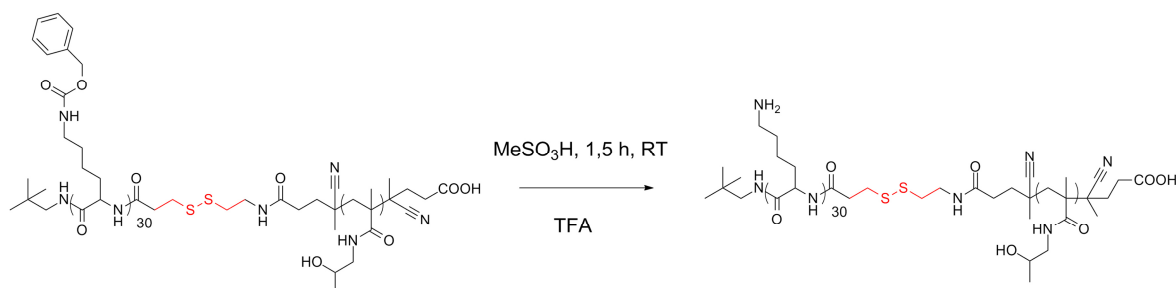


Abbildung 4.66: Entschützung von $p[\text{Lys}(\text{Z})]_{30}\text{-S-S-b-p[HPMA]}$ zu $p[\text{Lys}]_{30}\text{-S-S-b-p[HPMA]}$ mit Methansulfonsäure in TFA

Die so erhaltenen Blockcopolymere sind in Tabelle 4.10 zusammengefasst. Abbildung 4.67-Abbildung 4.69 zeigen die GPC-Elugramme in HFIP nach der Entschützung. Es ist zu sehen, dass unter diesen Bedingungen die Blockcopolymer-Struktur erhalten bleibt (keine Reduzierung des Molekulargewichts).

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.10: Charakterisierung von $p[\text{Lys}(\text{Z})]_{30}\text{-S-S-}b\text{-}p[\text{HPMA}]$ Blockcopolymeren

	\bar{D} GPC (HFIP)	M_n (NMR)	Blocklängenverhältnis X_n (p[HPMA]) zu X_n (p[Lys]) (NMR)
p[Lys(Z)]₃₀-S-S-<i>b</i>- p[HPMA]A T9	1,43	36.800	230:30 (7:1)
p[Lys(Z)]₃₀-S-S-<i>b</i>- p[HPMA]B	1,49	46.900	300:30 (10:1)
p[Lys(Z)]₃₀-S-S-<i>b</i>- p[HPMA]C	1,52	65.000	430:30 (14:1)

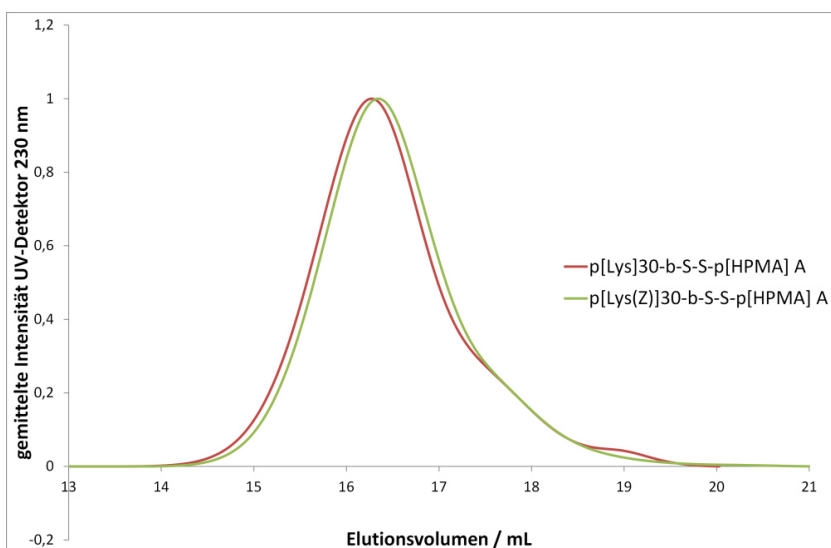


Abbildung 4.67: GPC in HFIP von $p[\text{Lys}(\text{Z})]_{30}\text{-S-S-}b\text{-}p[\text{HPMA}]$ A vor (rot) und nach Entschützung (grün) mit Methansulfonsäure in TFA

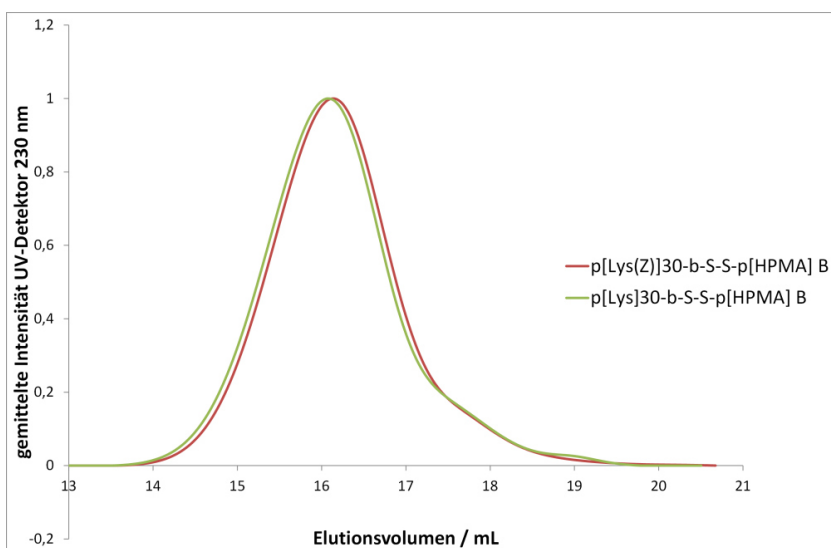


Abbildung 4.68: GPC in HFIP von $p[\text{Lys}(\text{Z})]_{30}\text{-S-S-}b\text{-}p[\text{HPMA}]$ B vor (rot) und nach Entschützung (grün) mit Methansulfonsäure in TFA

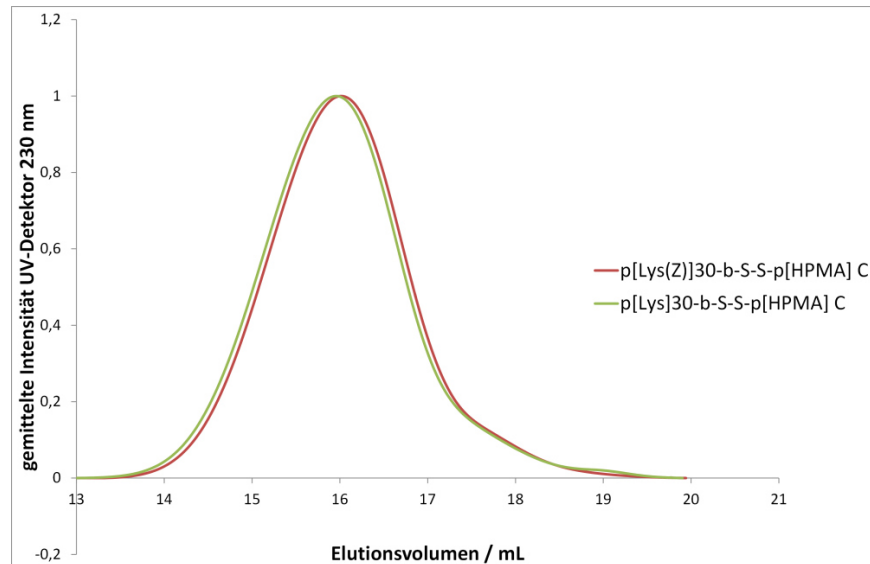


Abbildung 4.69: GPC in HFIP von $p[\text{Lys}(\text{Z})]_{30}\text{-S-S-}b\text{-p[HPMA]} \text{ C}$ vor (rot) und nach Entschützung (grün) mit Methansulfonsäure in TFA

Das Polymer $p[\text{Lys}(\text{Z})]_{30}\text{-S-S-}b\text{-p[HPMA]}_{230} \text{ A (T9)}$ wurde nun für Transfektionversuche genutzt, vor allem im Vergleich zu **T4** ($p[\text{Lys}]_{30}\text{-}b\text{-p[HPMA]}_{200}\text{A}$), also dem sehr ähnlichen Polymer nur ohne Disulfid-Verbrückung. Zuerst wurde mittels Agarose Gel-Elektrophorese der Einschluss der p-DNA kontrolliert (Abbildung 4.70). Für die freie p-DNA ist wieder eine Bande für die „*super coiled*“ Konformation (untere Bande) und die „*open circle*“ Konformation (obere Bande) zu erkennen. Mit steigender Menge an Polymer ist eine zunehmende Retardation zu beobachten. Auch hier scheint ab einem N/P Verhältnis von 7 der Einschluss der p-DNA vollständig zu sein.

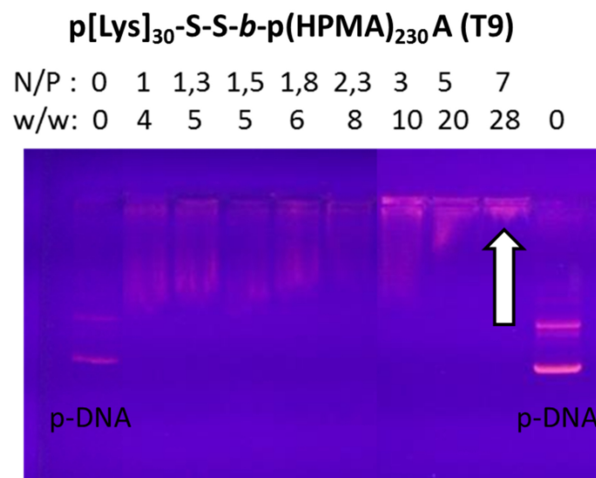


Abbildung 4.70: Agarose-Gelelektrophorese für $p[\text{Lys}(\text{Z})]_{30}\text{-S-S-}b\text{-p(HPMA)} \text{ A (T9)}$

Um wieder eine Aussage über die Größe der Polyplexe aus p-DNA und **T9** zu machen wurde eine FCS-Messung mit Orgeon Green 488 markiertem Polymer durchgeführt (Abbildung 4.71).

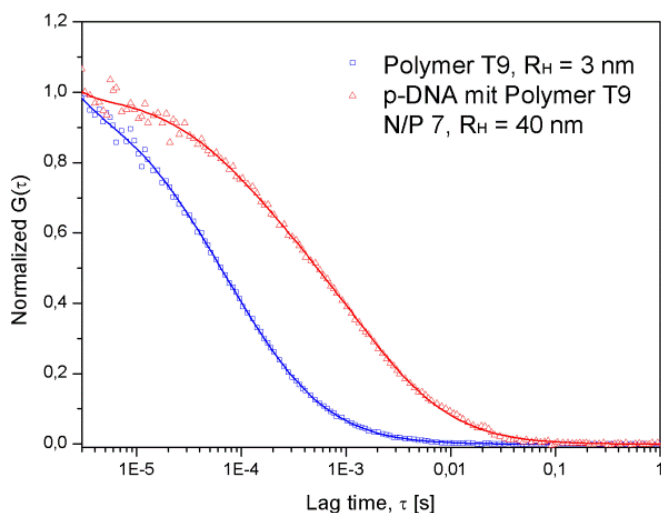


Abbildung 4.71: Autokorrelationskurven für das Blockcopolymer T9 (blau) und Polyplex aus p-DNA und Polymer T9 (rot) für $N/P = 7$

Der Vergleich der Hydrodynamischen Radii zeigt, dass es wieder zu einem effizienten Einschluss der p-DNA kommt. Mit einem hydrodynamischen Radius von 40 nm scheinen die Polyplexe aus **T9** etwas kleiner zu sein als Polyplexe aus **T4** ($R_H = 58$ nm). Allerdings ist das Blockcopolymer an sich mit einem R_H von 3 nm (**T4** $R_H = 4,1$ nm) schon relativ klein. Dies lässt vermuten, dass die sehr empfindliche Disulfidbindung schon zu einem kleinen Teil gespalten wird und so sowohl das freie Blockcopolymer als auch den entsprechenden Polyplex etwas kleiner erscheinen lässt. Zu erwarten wäre ähnliche Größen wie bei **T4**, da sie außer der Disulfidbrücke sehr ähnlich sind.

4.2.4 Zellbiologische Evaluierung der Polyplexe aus p-DNA und Poly[Lysin]-*b*-poly[HPMA] Blockcopolymeren mit reduktiv spaltbarem Disulfid

Um auch für die Polyplexe aus **T9** die Internalisierung der Polyplexe zu überprüfen wurde auch hier konfokale Mikroskopieaufnahmen mit Oregon Green 488 markierten Polymeren durchgeführt (Abbildung 4.72). Die Aufnahmen bestätigen, dass die Polyplexe aus p-DNA und Polymer **T9** von den Zellen internalisiert werden.

Polyplex aus p-DNA und poly[Lys]₃₀-*b*-S-S-poly[HPMA] T9

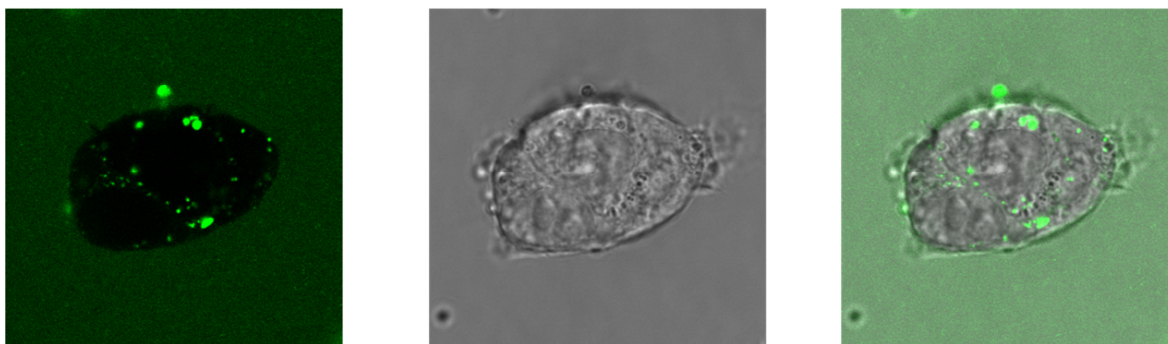


Abbildung 4.72: Konfokale Mikroskopieaufnahmen von HEK-293T Zellen nach Inkubation mit Polyplexen aus p-DNA und Oregon Green 488 markiertem Polymer T9 (N/P=7)

Die Bestimmung der Transfektionseffizienz über Durchflusszytometrie erlaubt nun einen direkten Vergleich vor allem zwischen **T4** und **T9**. Als positive Kontrolle wurde im Folgenden Jet-PEI[®] verwendet. Jet-PEI[®] ist eine kommerzielles Transfektionreagenz, welches hauptsächlich aus linearem Polyethylenimin besteht. Polyethylenimin ist ein weit verbreitetes polymeres Transfektionsreagenz, da es kostengünstig ist und eine hohe Effizienz in einer großen Bandbreite verschiedenster Zellen besitzt. Allerdings ist Jet-PEI[®] bewiesenermaßen auch sehr zytotoxisch.^[167] Als negativ Kontrolle diente wieder nackte p-DNA. Abbildung 4.73 zeigt die absoluten Zahlenwerte der über Durchflusszytometrie bestimmten Transfektionseffizienz (% an eGFP positiven Zellen) in Abhängigkeit der p-DNA Menge. Es zeigt sich, das Jet-PEI[®] (positiv Kontrolle) erwartungsgemäß sehr effizient (bis zu 50 % nach 24 Stunden und bis zu 80 % nach 48 Stunden bzw. 72 Stunden) transfiziert (negativ Kontrolle nackte p-DNA max 2 % nach 48 Stunden). Die schwächste Transfektionseffizienz weist **T3** auf, welches sowohl nach 24 Stunden (2,7 %), als auch nach 48 Stunden (4,2 %) nur knapp über der Negativkontrolle liegt). Wesentlich effizienter ist wieder das Polymer **T4** (bis zu 14,5 % nach 24 Stunden).

Ergebnisse und Diskussion

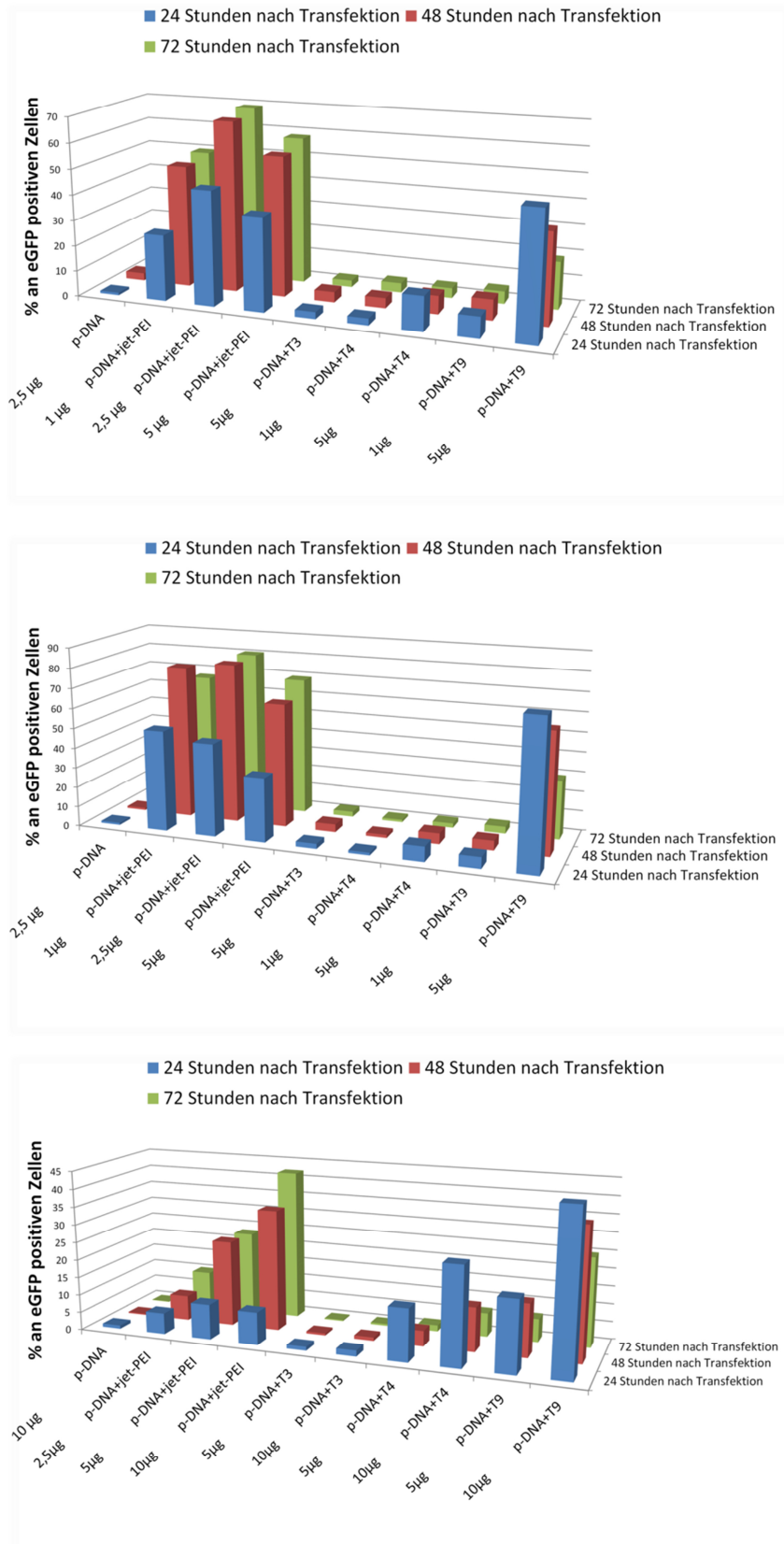


Abbildung 4.73: Über Durchflusszytometrie bestimmte Transfektionseffizienz (% an eGFP positiven HEK-293T Zellen) für steigenden Mengen an p-DNA nach 24, 48 und 72 Stunden für drei unabhängige Messungen (Polyplexe N/P=7)

Ganz entscheidend ist, dass **T9** (bis zu 73 % nach 24 Stunden und 60 % nach 48 Stunden) eine stark erhöhte Transfektions-effizienz im Vergleich zu **T4** aufweist. Dies zeigt ganz eindeutig, dass die Einführung der Disulfidbrücke die Transfektionseffizienz erheblich steigert. Die Effizienz von **T9** erreicht dabei sogar die des kommerziellen Transfektionsreagenzes Jet-PEI[®] und übertrifft es teilweise sogar. Auffällig ist auch, dass für Jet-PEI[®] die Transfektionseffizienz von 24 Stunden zu 72 Stunden stark ansteigt. Die Polyplexe dagegen zeigen ihre maximale Transfektionseffizienz nach 24 Stunden, welche nach 48 und 72 Stunden wieder abnimmt.

Abbildung 4.74 zeigt noch einmal die einzelnen Transfektionseffizienzen nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden für drei unabhängige Messungen. Es spiegelt nochmals den klaren Trend in der Transfektionseffizienz der Polyplexe wieder (**T9**>>**T4**>**T3**) sowie die Tatsache, dass **T9** ähnliche Effizienzen zeigt wie Jet-PEI[®]. Zudem zeigen die Polyplexe für 5 µg p-DNA nach 24 Stunden die besten Ergebnisse.

Die Bestimmung der Transfektionseffizienz über Durchflusszytometrie erlaubt eine parallele Messung der Zytotoxizität der einzelnen Transfektionsvektoren. Im Folgenden wurde speziell auf die Anzahl an spätapoptotischen Zellen getestet, welche sowohl positiv für AnnexinV (apoptotische Zellen) als auch 7AAD (nekrotische Zellen) sind (Abbildung 4.75).

Es beweist, dass Jet-PEI[®] (bis zu 15 % spätapoptotischer Zellen) teilweise schon nach 24 Stunden signifikant toxischer ist im Vergleich zu den Polyplexen (max. 9 % spätapoptotischer Zellen). Die Polyplexe zeigen dabei im Vergleich zu freier p-DNA (Negativkontrolle, 5 % spätapoptotischer Zellen) nur leichte Anzeichen von Zytotoxizität. Entscheidend ist, dass die Toxizität sowohl für freie p-DNA als auch für die Polyplexe im Laufe von 72 Stunden stark absinkt und nach 72 Stunden fast keine Zytotoxizität zu beobachten ist. Bei Jet-PEI[®] hingegen steigt die Anzahl an spätapoptotischen Zellen auf bis zu 18 % nach 72 Stunden weiter an.

Dies bekräftigt zum einen die vorigen Erkenntnisse aus dem Luciferase-Assay, dass die polyplexen Systeme (und **T4** besser als **T3**) nicht an die Transfektionseffizienzen vom kommerziellen Jet-PEI[®] heranreichen, gleichzeitig zeigen sie im Gegenteil zu Jet-PEI[®] kaum Anzeichen von Toxizität. Zum anderen führte die Einführung der Disulfid-Brücken zu einer stark erhöhten Effizienz ohne dass eine Steigerung der Toxizität beobachtet wurde.

Ergebnisse und Diskussion

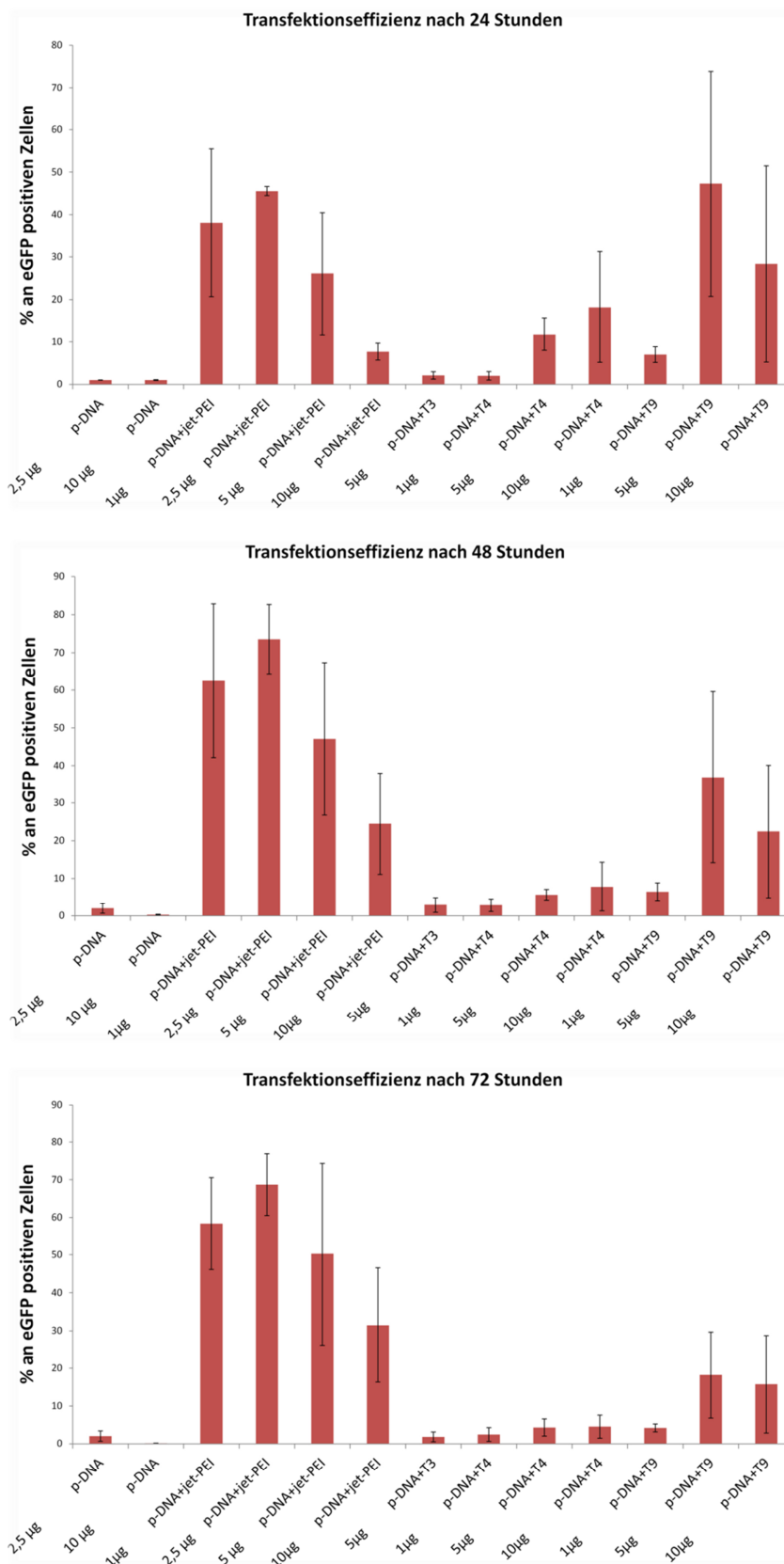


Abbildung 4.74: Transfektionseffizienzen (% an eGFP positiven Zellen) nach 24, 48 und 72 Stunden an HEK-273T Zellen. (Polyplexe N/P =7; N=3)

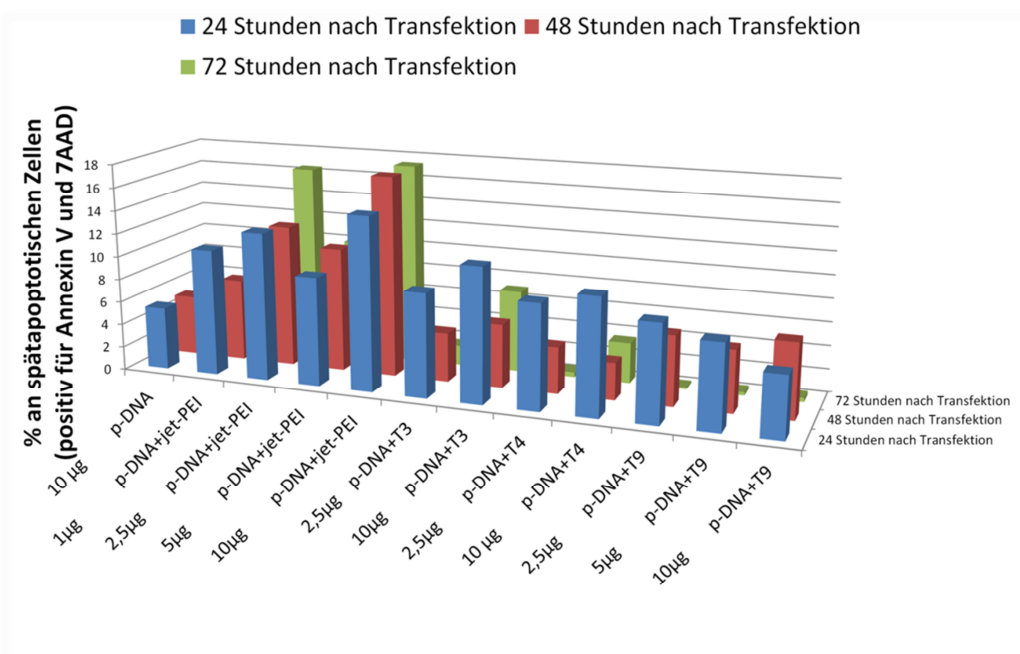


Abbildung 4.75: Anzahl an spätapoptischen HEK-293T Zellen (positiv für AnnexinV und 7AAD) 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion. (Polyplexe N/P =7) für verschiedene Mengen an p-DANN

Es konnte also gezeigt werden, dass die Synthese eines kationisch-hydrophilen Blockcopolymer mit reduktiv spaltbarer Disulfidbrücke zwischen den beiden Blöcken möglich ist (**p[Lys]-b-S-S-p[HPMA]**). Dies gelang über die kontrollierte RAFT-Polymerisation eines Makro-Disulfid-Lysin-Kettentransferreagenz und anschließender polymeranaloger Umsetzung. Die Durchführbarkeit (Stabilität der Disulfidbindung in allen Syntheseschritten) macht diesen Syntheseweg zudem sehr interessant für verschiedenste Blockcopolymer mit reduktiv spaltbaren Blöcken, da der Peptidblock frei variiert werden kann. Darüber hinaus konnte die intakte Disulfidbrücke zwischen den Blöcken durch gezielte Reduktion nachgewiesen werden. Diese Blockcopolymer sind in der Lage p-DNA effizient einzuschließen. Vor allem kann dadurch die Transfektionseffizienz stark gesteigert werden (ca. 5x so hoch wie bei vergleichbarem Blockcopolymer ohne Disulfidbrücke), ohne dass eine Steigerung der Toxizität beobachtet werden konnte. Es beweist also eindrucksvoll, dass durch Ausnutzung der Polymerchemie die Eigenschaften der Blockcopolymer gezielt und Effizient auf ihre Anwendung hin verbessert werden können.

Über kontrollierte RAFT-Polymerisation können funktionelle p[Lys]-b-p[HPMA] Blockcopolymer synthetisiert werden. Sie sind in der Lage p-DNA effizient in Polyplexen

einzuschließen (Agarose-Gelelektrophorese; FCS-Messungen) und vermitteln erfolgreich den Transport der p-DNA in menschliche Zellen (FACS-Messungen, konfokale Mikroskopie). Zudem wird die transportierte p-DNA erfolgreich von den Zielzellen abgelesen (Luciferase und eGFP-Transfektion). Gleichzeitig besitzen sie keine signifikante Zelltoxizität (MTT- und AnnexinV/7AAD Assay). Für die Synthese der Blockcopolymeren wurde sowohl Polylysin über Festphasenpeptid-Synthese also auch über NCA-Polymerisation hergestellt. Zwar können über Festphasen-Peptidsynthese genau definierte und auch potenziell sequenzspezifische Peptide hergestellt werden. Allerdings ist die Ausbeute sehr gering (mg) und die Blocklängen sind limitiert. Da das Polylysin ein Polymerisationsgrad von ≥ 30 haben sollte, bietet die NCA-Polymerisation wesentlich Vorteile. Sie liefert Polylysine mit enger Molekulargewichtsverteilung ($D= 1,1$) in hohen Ausbeuten (g) und unbegrenzten Kettenlängen. Zudem spiegelt sich der definierte Charakter der Festphasenpeptide nicht in der Dispersität der Blockcopolymeren wieder, da der polymerisierte p[HPMA]-Block wesentlich länger ist. Vielmehr scheinen Blockcopolymeren mit einem Polylysin genau definierter Kettenlänge im Vergleich zu Blockcopolymeren mit einem polydispersen Polylysin p-DNA schlechter zu komplexieren. Darüber hinaus scheint die Größe der Polyplexe wichtig für ihre Transfektionseffizienz zu sein. Polyplexe mit einem Durchmesser im Bereich von 100 nm scheinen wesentlich effizienter zu transfizieren als Polyplexe mit einem Durchmesser um die 200 nm. Durch Einführung einer reaktiv spaltbaren Disulfidbrücke zwischen komplexierendem kationischen Block und abschirmender hydrophiler Korona kann die Transfektionseffizienz um ein vielfaches erhöht werden, so dass sie mit sehr effektiven kommerziellen Vektoren mithalten kann, ohne eine gleichzeitige Erhöhung der Zelltoxizität zu bewirken. Diese Polyplexe ermöglichen einen effizienten und vor allem sicheren Transport des sehr komplexen Wirkstoffes p-DNA.

Da es speziell für die Aktivierung von Dendritischen Zellen entwickelte hochspezialisierte p-DNA gibt, stellen diese Polyplexe gerade im Hinblick auf die Tumor-Immuntherapie ein vielversprechendes Transportmittel dar. Denn gerade Immunzellen, und im speziellen dendritische Zellen, sind zum einen schwer zu transfizieren und auf der anderen Seite auch sehr empfindlich. Gerade hier ist es essentiell, Transportsysteme zu entwickeln, welche effektiv, zugleich aber nicht zu toxisch sind und vor allem durch eine hydrophile Korona die p-DNA effektiv schützen, um eine therapeutische Anwendung überhaupt erst zu ermöglichen. Zudem lassen sich die Blockcopolymeren leicht im hydrophilen Segment

modifizieren, was zum Beispiel die Modifikation mit Targetingvektoren, welche spezifisch für dendritische Zellen sind, wie Beispielsweise Mannose oder dem aDEC-205 Antikörper, ermöglicht. Das Anbringen von Erkennungsstrukturen ist nicht nur für eine therapeutische Anwendung interessant („*in vivo*“), sondern führt bewiesenermaßen zu einer verbesserten und schnelleren Aufnahme und daraus resultierende erhöhten Transfektion „*in vitro*“.^[168]

Diese Polyplexe stellen also eine mögliche Plattform dar um den hohen Anforderungen an polymere Transfektionsvektoren für therapeutische Anwendungen (zum Beispiel in der Tumor-Immuntherapie) gerecht zu werden: Sie müssen die p-DNA effizient abschirmen, „Stimuli-responsiv“ sein und einen zielgerichtet Transport ermöglichen, um hohe Transfektionseffizienzen bei niedriger Toxizität zu gewährleisten.

4.3 Optimierung der Synthese der Polymer-Antikörper Konjugate und Anwendung auf komplexere polymere Strukturen

4.3.1 Gezielte enzymatische Modifizierung von Antikörpern mit Cyclooctinen für Azid-Alkin Kopplungen

Um die Anbindung von Antikörpern noch selektiver zu gestalten und gleichzeitig auf komplexere polymere Strukturen übertragen zu können müssen alternative Ligationsmethoden gefunden werden. Zudem hat sich gezeigt, dass der durch „*Michael-Addition*“ von Thiol und Maleinimid erhaltene Thioethersuccinimid „*in vivo*“ Instabilität aufweist.^[169]

Auf der Seite des Antikörpers besteht zudem noch die Herausforderung die Anzahl der möglichen Bindungsstellen zu limitieren und im besten Fall gleichzeitig den Ort der Anbindung bestimmen zu können (engl.: „*site specific*“).

Eine sehr vielversprechende Methode ist dabei die Verwendung des Enzyms „Transglutaminase“. Es katalysiert die Reaktion zwischen einer Glutaminseitengruppe (primäres Säureamid; am Protein/Antikörper) und einer Lysinseitengruppe (ϵ -Aminogruppe; am Wirkstoff/Polymer) zu einer stabilen Amidbindung (Abbildung 4.76). Aufgrund der sterischen Beschaffenheit von Antikörpern und des Enzyms konnte gezeigt werden, dass es sehr selektiv mit nur einem bestimmten Glutamin (Q 295) in der „*loop Region*“ des Antikörpers reagiert. Diese wird überhaupt erst durch vorige gezielte Deglykosylierung (Entfernung der Zuckerreste) des Antikörpers an einer benachbarten Asparaginseitengruppe (N 297) mit dem Enzym PNGaseF (Peptid-*N*-Glycosidase-F) in PBS Puffer zugänglich. Dieses Enzym gehört zur Klasse der Amidasen und spaltet komplexe Oligosaccharidstrukturen zwischen GlcNAc (*N*-Acetylglucosamin) und Asparaginresten, welche *N*-glycosidisch verknüpft sind. Gleichzeitig ist das Enzym Transglutaminase sehr tolerant gegenüber dem Lysinrest, so dass auch einfache 5-Aminopentyl Derivate akzeptiert werden. Auf diese Weise wird eine ortsspezifische Anbindung (entfernt von der Antigenbindungsstelle) möglich und die Anzahl von angebondenen Komponenten ist gleichzeitig auf genau zwei je Antikörper limitiert.^[72]

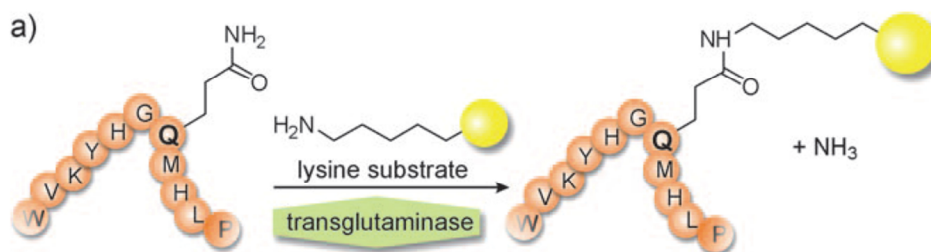


Abbildung 4.76: „Transglutaminase“ katalysierte Amidbildung zwischen einem Glutaminrest (primäres Säureamid) und einem Lysinrest (primäres Amin)^[72]

Diese Ligationsmethode wurde bereits schon für die Anbindung von niedermolekularen Komponenten verwendet.^[170] Ziel ist es nun diese auch für die Anbindung von Polymeren zu nutzen. Dazu bietet sich eine Kombination mit einer anderen bioorthogonalen Ligationsmethode an, die auch unter physiologischen Bedingungen abläuft. So wurde schon zum Beispiel eine Kombination aus dieser enzymatischen Kopplung (enzymatische Deglykosylierung und anschließende Kopplung mit Transglutaminase) mit einer kupferfreien Alkin-Azid Kopplung verwendet um niedermolekulare Wirkstoffe spezifisch anzubinden.^[171] Die Azid-Alkin Kopplung unter Kupferkatalyse (engl.: Cu-Azide Alkine Coupling, CuAAC) läuft sehr schnell, unter milden Bedingungen und ohne Nebenprodukte ab („Klick-Reaktion“). Durch die Verwendung von substituierten, ringespannten Cyclooctinen kann diese auch ohne Kupferkatalyse durchgeführt werden (engl.: ring-Strain Promoted Azide-Alkine Coupling (SPAAC)), da die Verwendung von Kupferkatalysatoren mit Proteinen problematisch ist. In diesem Fall wurde sie genutzt, um einen Antikörper selektiv mit Aziden zu funktionalisieren und anschließend ein Cyclooctin-modifizierten Wirkstoff anzubinden.

Um diese Strategie für die Anbindung von Polymeren zu nutzen soll nun das Cyclooctin selektiv an den Antikörper gebunden werden. Denn Azide lassen sich wesentlich einfacher an Polymere einführen als Cyclooctine, da letztere aufgrund ihrer Reaktivität auch sehr labil sind. Und Ziel ist es diese Anbindungschemie auf möglichst viele Arten von polymeren Systemen übertragen zu können. Abbildung 4.77 zeigt die Synthesestrategie für die gezielte Anbindung von Cyclooctinen an Antikörper über das Enzym Transglutaminase. Dafür muss ein entsprechendes Cyclooctin zuerst mit einem Lysin funktionalisiert werden.

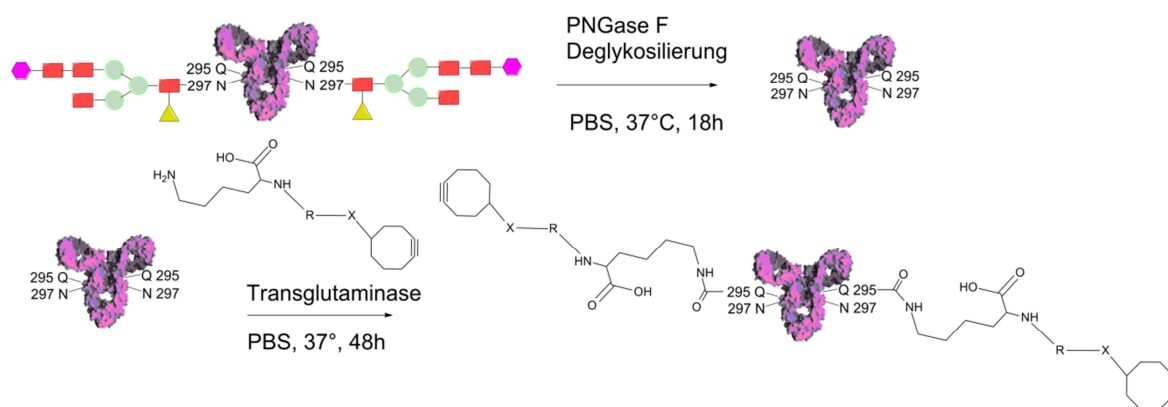


Abbildung 4.77: Gezielte Funktionalisierung eines Antikörpers mit einem Lysin-modifizierten Cyclooctin durch Kombination der Enzyme PNGase F (Deglykosilierung) und Transglutaminase (kovalente Anbindung an den Glutaminrest 295)

Die Synthese eines Lysin-substituierten Cyclooctinderivates wurde dabei an eine Literaturvorschrift angelehnt (Abbildung 4.78).^[172] Dazu wurde zunächst ausgehend von Cyclohepten über Bromoform-Addition und anschließende Ringöffnung durch Addition eines Alkohols ein Cyclooctengerüst synthetisiert. Im Anschluß wurde die substituierte Doppelbindung zum Cyclooctin eliminiert und die Estergruppe des Linkers hydrolysiert. Die freie Säure wurde durch Pentafluorphenol aktiviert und daraufhin ein Lysin mit lockierter ϵ -Aminogruppe angebunden. Durch Deblockierung der Aminogruppe im Säuren wurde das fertige Lysin-modifizierte **Cyclooctinderivat (COD 1)** erhalten. Die im letzten Schritt durchgeführte Blockierung im Säuren erwies sich jedoch als problematisch, da hier die Etherbrücke zwischen Cyclooctin und dem Linker in Anwesenheit von Wasser sehr schnell gespalten wird. Aus diesem Grund wurde von XXXXXXXXXX im Rahmen ihrer Diplomarbeit^[173] ein ähnliches Lysin-modifiziertes Cyclooctinderivat ausgehend von kommerziell erhältlichen säure-modifizierten Cyclooctin nach gleicher Vorschrift synthetisiert, welches ein stabileres und auch reaktiveres Cyclooctin-Gerüst besitzt (**COD 2**) (Abbildung 4.79).

Für die Synthese wurde bewusst natürliches Lysin verwendet (obwohl auch 5-Pentaminoderivate möglich wären), um eine spätere Löslichkeit in Wasser zu gewährleisten. Aufgrund des zwitterionischen Charakters des Cyclooctinderivats ist das Molekül trotz des relativ hydrophoben Cyclooctin-Fragments im wässrigen löslich und die spätere enzymatische Anbindung über Transglutaminase unter physiologischen Bedingungen ist möglich.

Ergebnisse und Diskussion

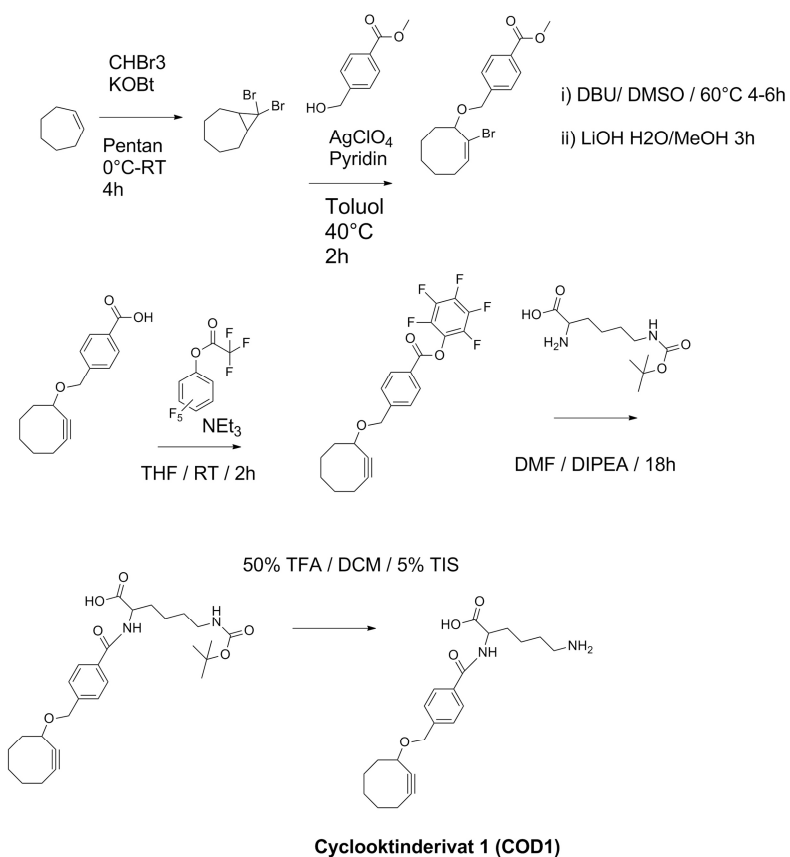


Abbildung 4.78: Mehrstufige Synthese eines Lysin-modifizierten Cyclooctins (COD 1) ausgehend von Cyclohepten

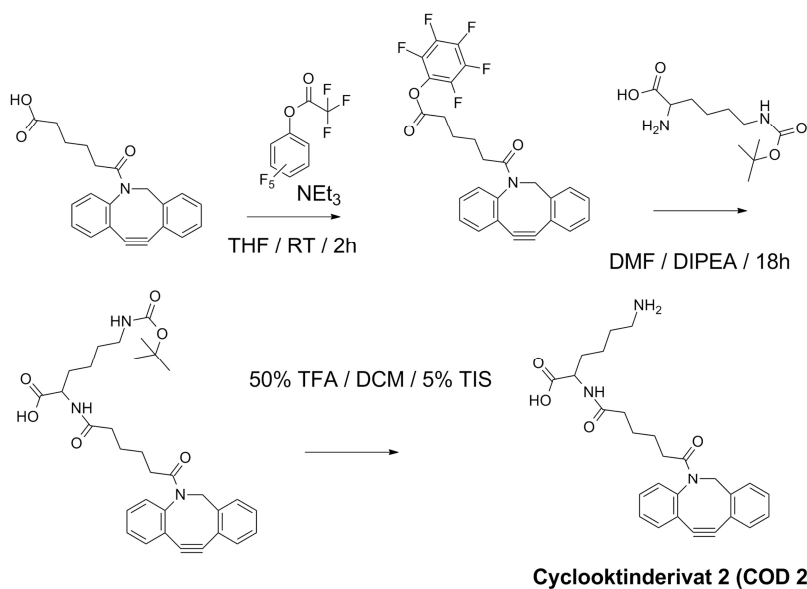


Abbildung 4.79: Synthese eines alternativen Lysin-Cyclooctinderivates (COD 2) ausgehend von kommerziellen Cyclooctinderivat

Ergebnisse und Diskussion

Zunächst wurde die kupferfreie Cyclooctin-Azid Reaktion getestet. Dazu wurde das **Cyclooctinderivat 1 (COD1)** mit blockierter ϵ -Aminogruppe mit einem PEG-Azid umgesetzt (Abbildung 4.80).

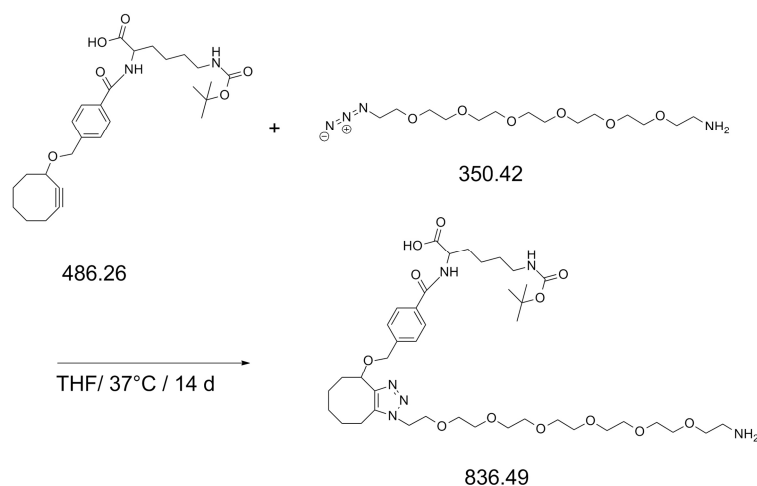


Abbildung 4.80: Test der Cyclooctin-Azid-Kupplung durch Umsetzung des Cyclooctinderivats 1 (COD 1) mit einem PEG-Azid

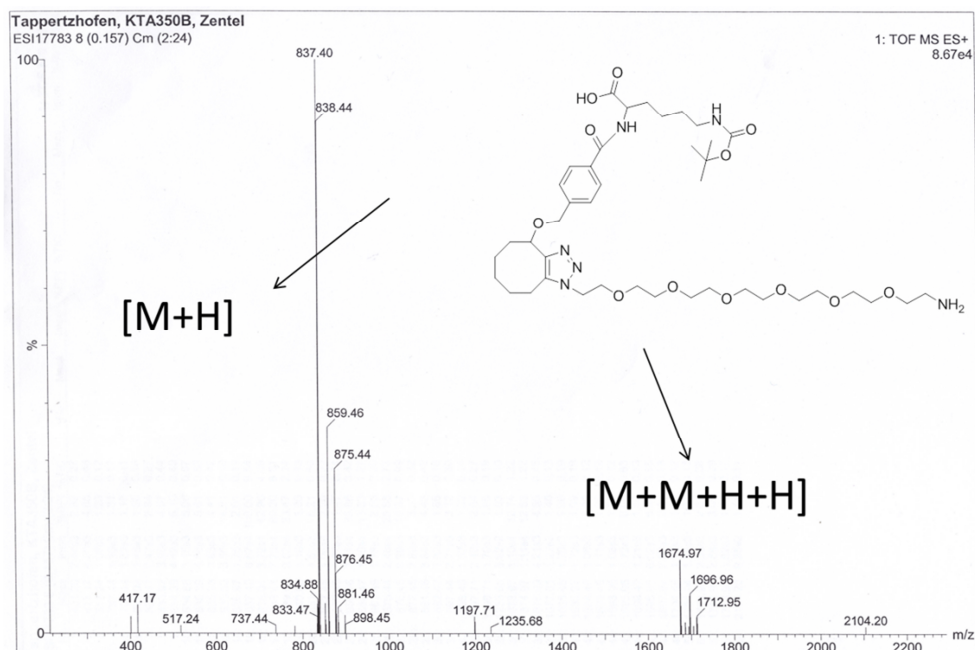


Abbildung 4.81: ESI-MS des Cyclooctin (COD 1)-Azid Kopplungsproduktes

Abbildung 4.81 zeigt die aufgenommene Masse, welche zwei Wochen nach dem Start der Reaktion gemessen wurde. Sie zeigt die Umsetzung zum entsprechenden Kopplungsprodukt.

Ergebnisse und Diskussion

Das Cyclooctinderivat sollte nun mit der Kombination der Enzyme PNGaseF und Transglutaminase an den Antikörper aDEC-205 und isotypen IgG2a kovalent gebunden werden. Zuerst wurden 200 µg des Antikörpers durch Reaktion mit 500 Einheiten PNGaseF in PBS Puffer für 18 Stunden und 37 °C die Zuckerreste am Asparagin 297 entfernt. Nach Aufreinigung über Amicon®-Filter wurde der Antikörper mit 300 eq. (bezogen auf den Antikörper) des Cyclooctinderivats 1 (**COD1**) und zwei Einheiten Transglutaminase in PBS-Puffer für 48 Stunden bei 37 °C versetzt und anschließend nochmal über Amicon®-Filter aufgereinigt.

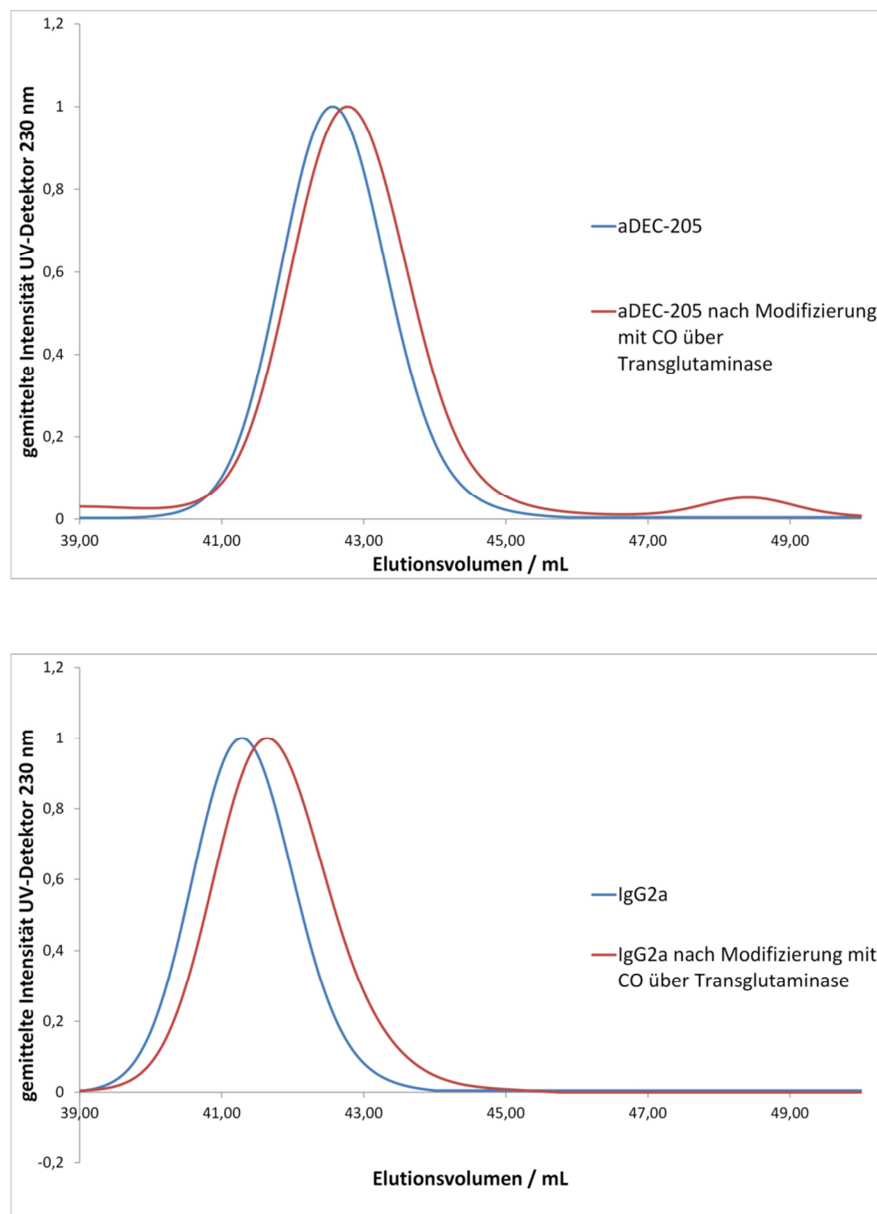


Abbildung 4.82: SEC-Elugramme von aDEC-205/IgG2a vor (blau) und nach der Modifizierung mit dem Cyclooctinderivat

Da die Transglutaminase auch theoretisch die Antikörper untereinander vernetzen könnte, wurde zunächst SEC gemessen (Abbildung 4.82). Die Elugramme zeigen, dass es unter den verwendeten Mengen Transglutaminase nicht zu intermolekularen Vernetzungen der Antikörper kommt.

4.3.2 Ligation von enzymatisch-Cyclooctin modifizierten Antikörpern an Azid-funktionalisierte polymere Mizellen

Bei den in Kapitel 4.1 beschriebenen Polymer-Antikörper Konjugaten wurde ein hoher Überschuss Polymer im Vergleich zum Antikörper eingesetzt, da hier das Polymer wesentlich kleiner war als der Antikörper. Bei der Funktionalisierung von komplexeren polymeren Strukturen wie polymeren Mizellen jedoch ist der Antikörper wesentlich kleiner. Die Betrachtungsweise dreht sich also um und für die Modifizierung von polymeren Mizellen ist eher ein Überschuss Antikörper einzusetzen und anschließend ungebundener Antikörper ist abzutrennen. Daher ist es auch so wichtig die Bindungsstellen am Antikörper zu limitieren, um Vernetzungsreaktion zu unterbinden.

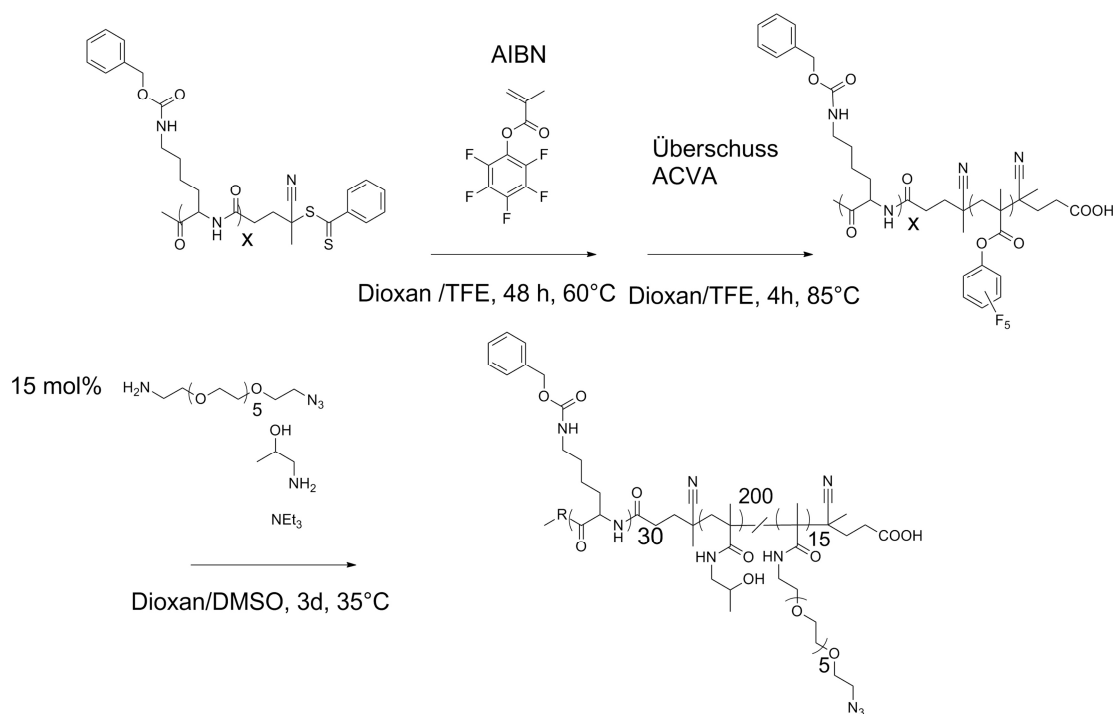


Abbildung 4.83: Synthese eines Azid-funktionalisierten $p[\text{Lys}(\text{Z})]$ - b - $p[\text{HPMA}(\text{Azid})]$ Blockcopolymer ($p[\text{Lys}(\text{Z})]$ - b - $p[\text{HPMA}(\text{Azid})]$)

Um die Anbindung an komplexere Polymerstrukturen zu zeigen, wurde eine $p[\text{Lys}(\text{Z})]$ - b - $p[\text{HPMA}(\text{Azid})]$ Blockcopolymer mit polymeranalogen, Azid-modifiziertem hydrophilen pHPMA Block synthetisiert ($p[\text{Lys}(\text{Z})]$ - b - $p[\text{HPMA}(\text{Azid})]$; $M_n(\text{NMR}) = 30.500$, D (HFIP-GPC) = 1,51, 6 % Azid im poly[HPMA] Block (NMR). Dies ist aufgrund der Synthese über Reaktivesterpolymere wieder sehr einfach möglich (Abbildung 4.83). Abbildung 4.84 zeigt das Elugramm für das Blockcopolymer in HFIP. Es verdeutlicht, dass es durch

Anbindung der PEG-Azid Linkers alleine nicht zu Bildung von Aggregaten kommt. Zudem kann die intakte Azid-Bande über IR-Spektroskopie nachgewiesen werden (Abbildung 4.85).

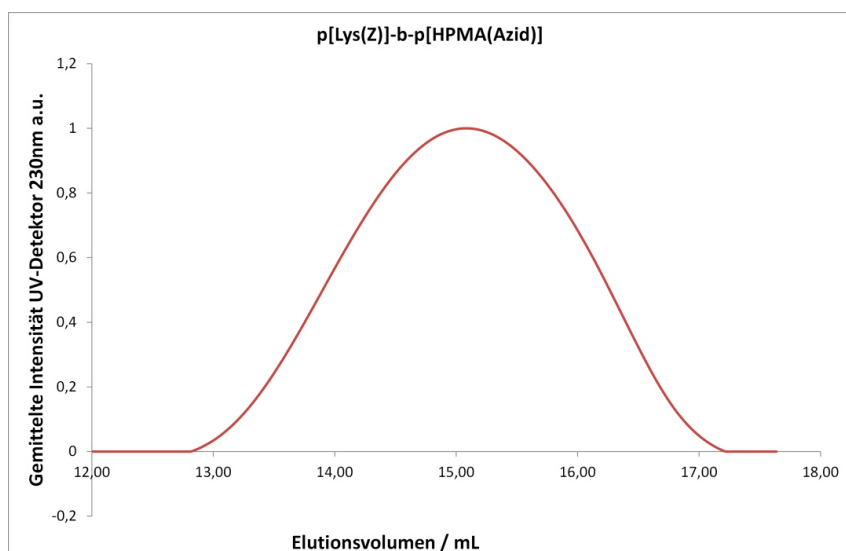


Abbildung 4.84: GPC in HFIP von p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid)]

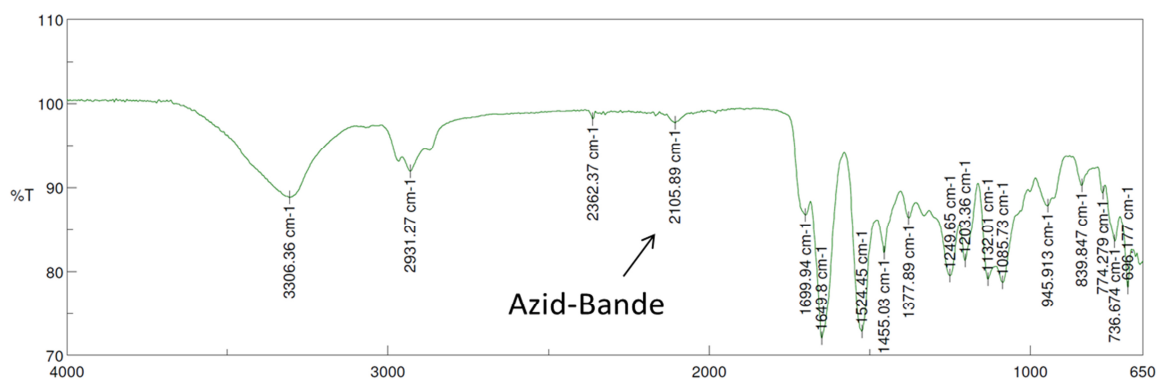


Abbildung 4.85: Nachweis der intakten Azid-Gruppe von p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid)] über IR-Spektroskopie

Durch lösen des Blockcopolymers in HFIP und vorsichtigem Eintropfen von Wasser kommt es zu einer kontrollierten Überstrukturbildung. Das Polylysine ist aufgrund der Z-Schutzgruppe hydrophob und so stellt das Polymer mit Z-blockiertem Polylysine im wässrigen Lösungsmittel ein hydrophob-hydrophiles Blockcopolymer dar. Daher bildet es hier Mizellenstrukturen mit einem hydrophoben Kern und einer Azid-modifizierten p[HPMA] Korona aus (Abbildung 4.86). Die Bildung der Überstruktur kann durch SEC in wässrigem Medium verfolgt werden. Dazu wird das Blockcopolymer einmal mit und

einmal ohne hydrophober Schutzgruppe (**p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid)]**) und (**p[Lys]-b-p[HPMA]**) verglichen (Abbildung 4.87).

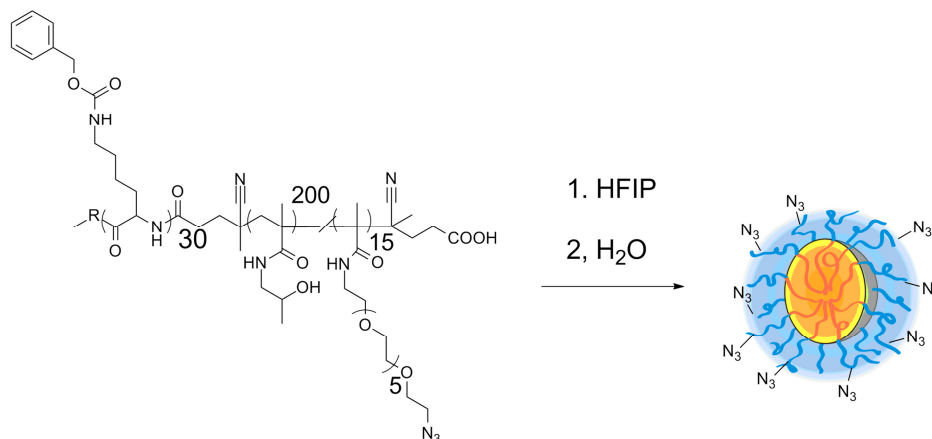


Abbildung 4.86: Kontrollierte Bildung von mizellaren Strukturen des Blockcopolymer **p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid)]** in wässrigem Milieu

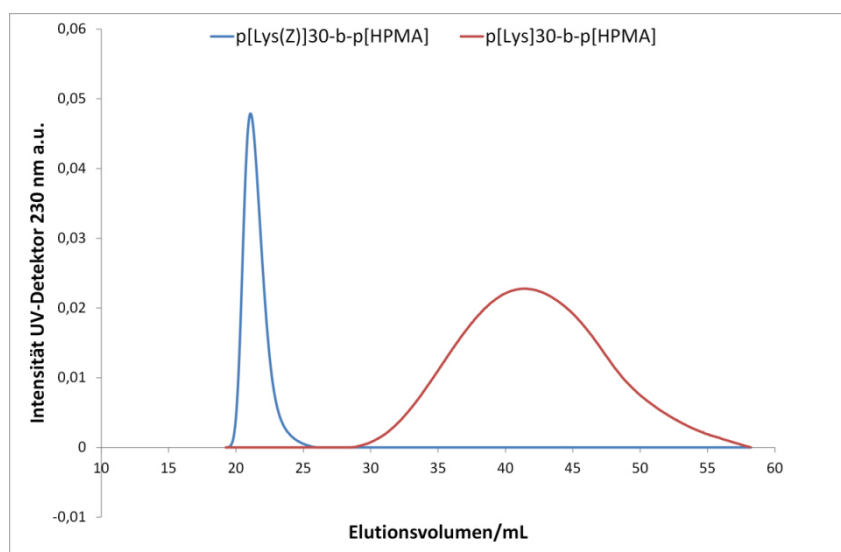


Abbildung 4.87: SEC in wässrigem Medium von Blockcopolymer ohne- (rot) und mit (blau) hydrophober Z-Schutzgruppe am Polylysin

Das Elogramm zeigt die Ausbildung von Mizellen (starke Zunahme des Molekulargewichts) von Blockcopolymeren mit Z-geschütztem Polylysin.

Diese Azid-funktionalisierten Strukturen wurden nun mit dem mit Cyclooctin (**COD 1**) modifiziertem Antikörper umgesetzt (Abbildung 4.88). Dazu wurde ein aDEC-205

Antikörper genutzt, welcher bereits mit einem Farbstoff (PE und Cy7) modifiziert ist (p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid-COD1-aDEC-205)]).

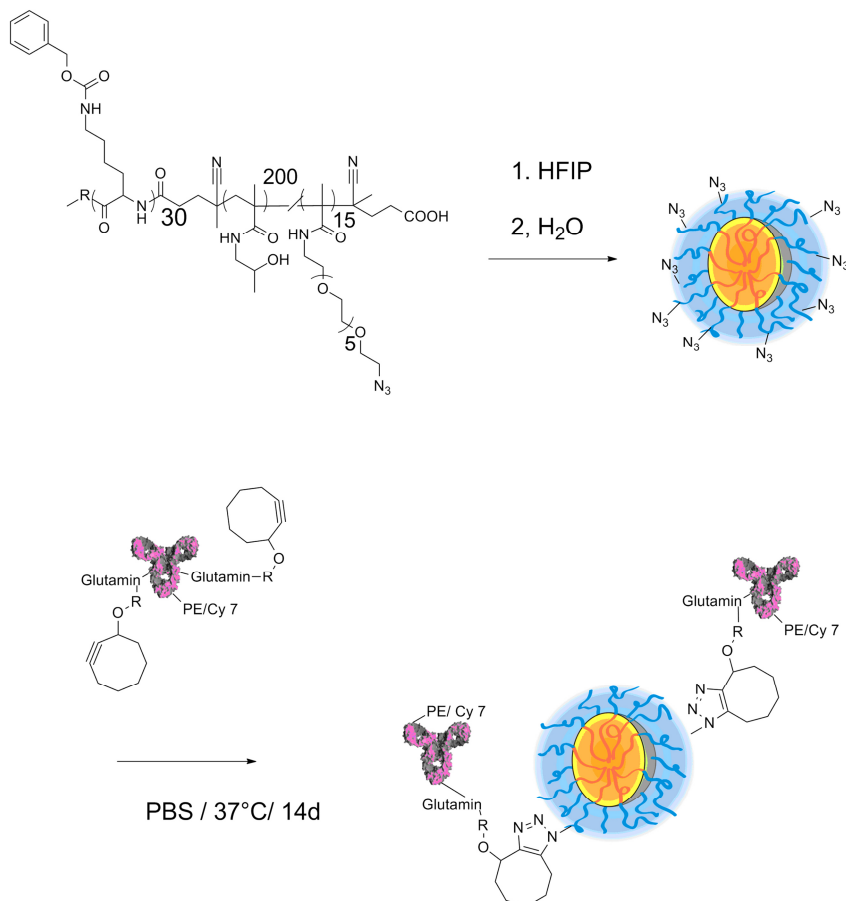


Abbildung 4.88: Schematische Darstellung der Modifizierung von Azid-funktionalisierten Mizellen aus p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid)] mit über Transglutaminase und Cyclooctin (COD 1) modifizierten Antikörpern a DEC-205(p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid-COD1-aDEC-205)])

Um die Anbindung des Antikörpers zu kontrollieren wurde FCS-Spektroskopie verwendet. Durch Bestimmung des hydrodynamischen Radius des Antikörpers vor und nach der Cyclooctin-Modifizierung und Anbindung an die Mizellen Strukturen. Durch erfolgreiche Fixierung des Antikörpers sollte der hydrodynamische Radius des Antikörpers signifikant ansteigen. Dazu wurde immer zunächst der freie Antikörper vermessen und die Größe des Konjugats mit einem drei-Komponenten-„Fit“ bestimmt (freier Farbstoff (Alexa Fluor 647); freier Antikörper aDEC-205 (PE-Cy7), Antikörper (PE-Cy7)-Konjugat).

Abbildung 4.89 zeigt die entsprechende FCS-Messung. Der Farbstoff modifizierte aDEC-205 Antikörper zeigt einen hydrodynamischen Radius von 7,9 nm. Nach Modifizierung

mit Cyclooctin (**COD 1**) über die Transglutaminase und anschließender Umsetzung mit den Azid-modifizierten Mizellen zeigt sich ein hydrodynamischer Radius von 34 nm (**p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid-COD1-aDEC-205)]**).

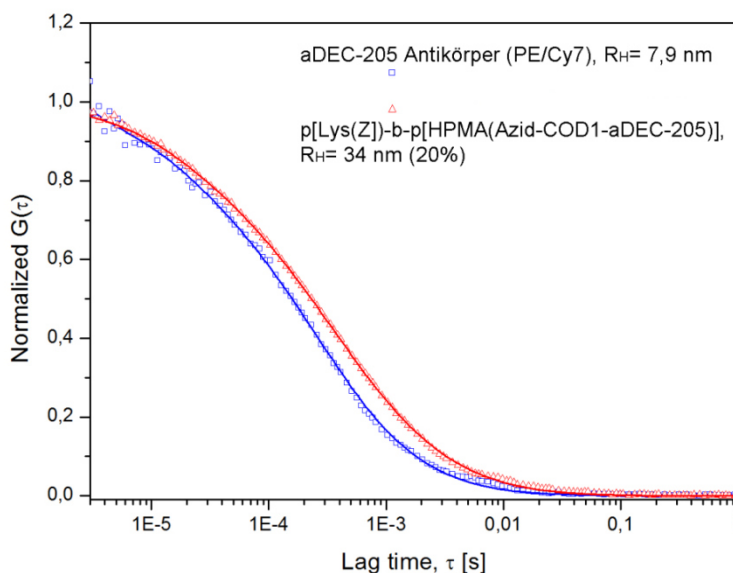


Abbildung 4.89: Autokorrelationskurven für Farbstoff modifizierten Antikörper aDEC-205 vor-(blau) und nach Cyclooctin (COD 1) Modifizierung und Anbindung an Azid-funktionalisierte Mizellen (p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid-COD1-aDEC-205)](rot)

Dies zeigt eine erfolgreiche Anbindung des Cyclooctins an den Antikörper durch eine Kombination aus Deglykosylierung über das Enzym PNGase F und Transglutaminase, da sonst keine Reaktion mit den Azid-modifizierten Mizellen möglich wäre. Die Reaktion wurde dabei mit einem molaren Antikörper Polymer-Verhältnis von 2:1 durchgeführt. Da ein Antikörper maximal zwei Cyclooctine aufweisen kann und jede Polymerkette gleichzeitig über viele Azide verfügt, folgt daraus: Menge an Azid(Polymer) > Menge an Cyclooctin (Antikörper). Gleichzeitig werden viele Polymerketten benötigt um mizellare Strukturen auszubilden und darauf folgt: Menge an Antikörper > Menge an Mizellen. Es existieren also genug Azid-Funktionalitäten und ein Antikörperüberschuss um möglichst viele Antikörper zu binden. Die FCS-Messung wurde direkt mit einem Aliquot aus der Reaktionslösung durchgeführt, so dass sich neben Mizellen-Antikörper Konjugaten (ca. 20 %) auch noch ca. 50 % freier Antikörper und ca. 30 % freier Farbstoff finden.

Ergebnisse und Diskussion

Die gleiche Reaktion wurde für das gleiche Polymer **p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid)]** mit dem **Cyclooctin-Derivat (COD 2)** durchgeführt (**p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid-COD 2-aDEC-205)]**) (Abbildung 4.90).

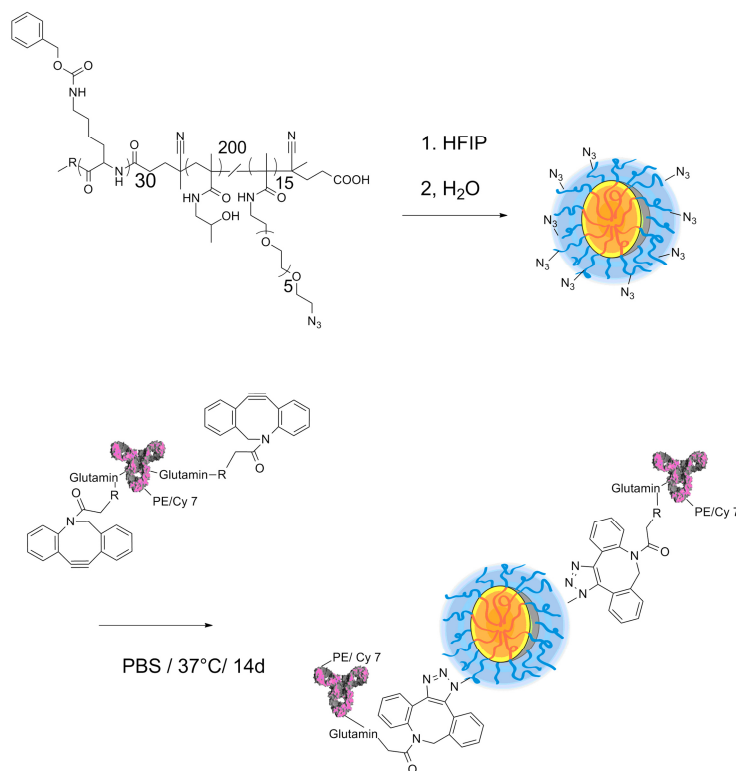


Abbildung 4.90: Schematische Darstellung der Modifizierung von Azid-funktionalisierten Mizellen aus **p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid)]** mit über Transglutaminase und Cyclooctin (COD 2) modifizierten Antikörpern **aDEC-205** (aus **p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid-COD2-aDEC-205)]**)

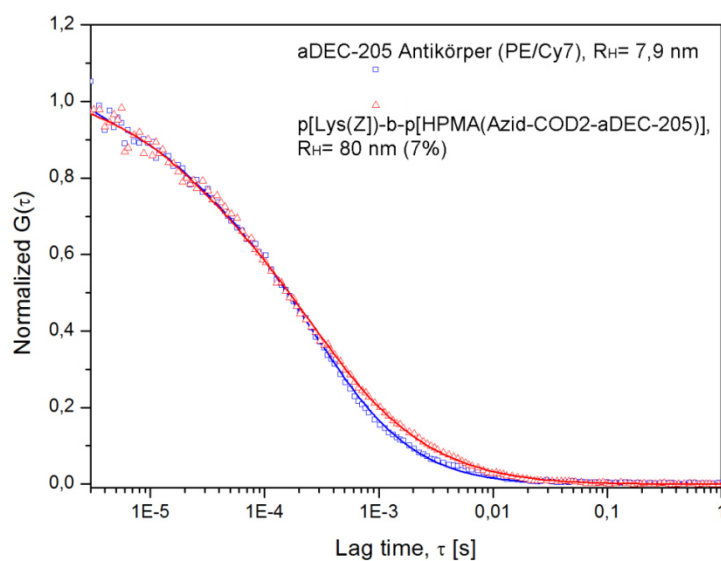


Abbildung 4.91: Autokorrelationskurven für Farbstoff modifizierte Antikörper **aDEC-205** vor- (blau) und nach Cyclooctin (COD 2) Modifizierung und Anbindung an Azid-funktionalisierte Mizellen (**p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid-COD2-aDEC-205)]**) (rot)

Anschließend wurde wieder durch FCS-Messung der hydrodynamische Radius des Farbstoff-modifizierten Antikörpers vor und nach der Anbindung an die Mizellen bestimmt (Abbildung 4.91).

Die starke Vergrößerung des hydrodynamischen Radius des Antikörpers (80 nm) im Vergleich zu freiem Antikörper (7,9 nm) zeigt wieder die erfolgreiche Anbindung des Antikörpers an die Mizellen durch die Kombination von Transglutaminase-Kopplung und kupferfreier Azid-Alkin-Kopplung. Auch hier wurde wieder ein Antikörper-Polymer-verhältnis von 2:1 verwendet und die Konjugate ohne Aufreinigung gemessen. Allerdings wurden hier nur 7 % Konjugat und 60 % freier Antikörper sowie 33 % freier Farbstoff beobachtet.

Unter gleichen Bedingungen wurde auch ein mit **Cyclooctinderivat 2 (COD 2)** modifizierter aDEC-205 noch mit einem anderen Azid-modifiziertem hydrophob-hydrophilem Blockcopolymer **p[LMA]₂₀-b-p[HPMA(Azid)]₈₀** (Mn (THF-GPC)= 22.800, *D*= 1,23), (9 % Azid im p[HPMA] Teil) umgesetzt (Abbildung 4.92). Das System poly[Laurylmethacrylat]-*b*-p[HPMA] als hydrophob-hydrophiles System ist dabei ausführlich beschrieben.^[59, 61, 174] Dieser Versuch wurde ebenfalls von [REDACTED] im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt.^[173]

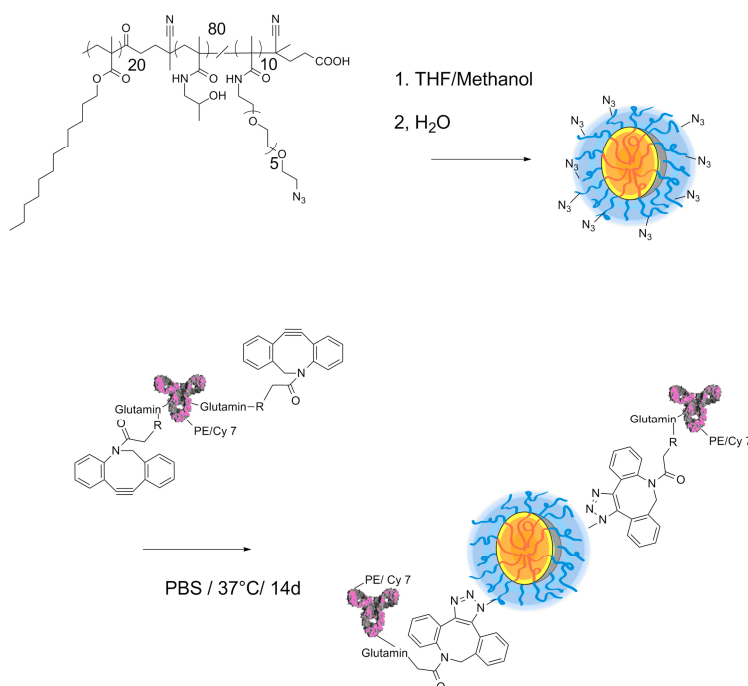


Abbildung 4.92: Schematische Darstellung der Modifizierung von Azid-funktionalisierten Mizellen Strukturen aus p[LMA]-*b*-p[HPMA(Azid)] mit über Transglutaminase und Cyclooctin (COD 2) modifizierten Antikörpern a DEC-205(p[LMA]-*b*-p[HPMA(Azid-COD2-aDEC-205)])

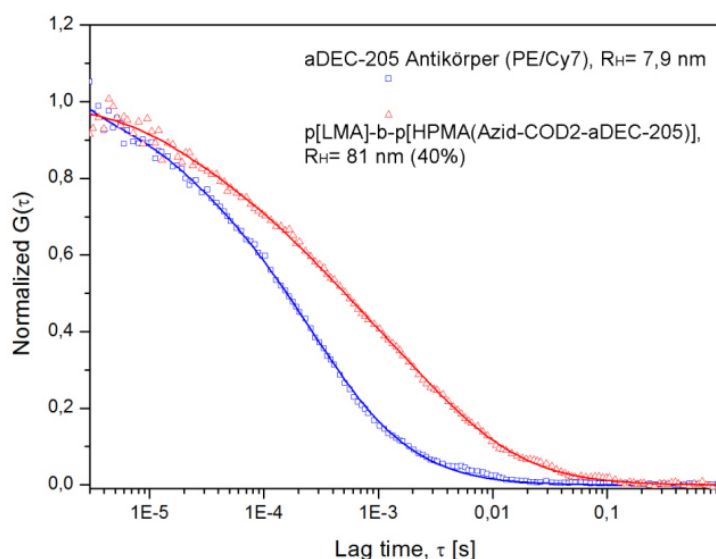


Abbildung 4.93: Autokorrelationskurven für Farbstoff modifizierte Antikörper aDEC-205 vor- (blau) und nach Cyclooctin (COD 2) Modifizierung und Anbindung an Azid-funktionalisierte Mizellen (p[LMA]-b-p[HPMA(Azid-COD2-aDEC-205)] (rot)

Auch hier wurde wieder mittels FCS-Messung der hydrodynamische Radius des Antikörpers vor und nach der Anbindung an die Mizellen untersucht. Es wurde wieder ein Antikörper-Polymerverhältnis von 2:1 zu verwendet und direkt Aliquote der Reaktionslösung vermessen (Abbildung 4.93).^[173]

Die signifikante Erhöhung des hydrodynamischen Radius des Antikörpers (81 nm) im Vergleich zu freiem Antikörper (7,9 nm) belegt, dass die Anbindung funktioniert hat. Es wurden 40 % Konjugat, sowie 40 % freier Antikörper und 20 % freier Farbstoff detektiert. In diesem Fall ist die Größe der gebildeten mizellaren Strukturen aus **p[LMA]₂₀-b-p[HPMA]₈₀** bekannt^[59] und beträgt ca. 48 nm im hydrodynamischen Radius. Mit einem hydrodynamischen Radius von 7,9 nm für den freien Antikörper würde nach der Fixierung an diese Mizellen einen hydrodynamischen Radius von ca. 60 nm zu erwarten sein. Die Größe von ca. 80 nm kann dadurch begründet sein, dass durch die Cyclooctin-Modifizierung über Transglutaminase genau zwei Cyclooctine je Antikörper gebunden werden können. Auf diese Weise kann ein Antikörper auch an zwei Mizellen gleichzeitig binden und so den hydrodynamischen Radius ungefähr verdoppeln. Der gemessene hydrodynamische Radius von ca. 80 nm legt nahe, dass es teilweise zur solch einer „Verbrückung“ kommt. Durch einen noch größeren Überschuss an Antikörper kann diese „Verbrückung“ weiter unterbunden werden und isolierte, Antikörper-modifizierte Mizellen erhalten werden.

Der Vergleich der Antikörper-modifizierten Mizellen **p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid-COD1-aDEC-205)]** ($R_H = 34$ nm) und **p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid-COD2-aDEC-205)]** ($R_H = 80$ nm) zeigt, dass die Verwendung unterschiedlicher Cyclooctin Linker **COD 1** und **COD 2** ein Einfluss auf die Größe der Mizellen hat. Da **COD 2** stabiler und vor allem reaktiver für die Alkin-Azid Addition ist^[175], scheint es hier effizienter an die Antikörper gebunden zu werden und mit den Azid-funktionalisierten Mizellen zu reagieren und so eher die Reaktion des Antikörpers mit zwei Mizellen gleichzeitig zu vermitteln.

Unabhängig davon beweisen alle drei Beispiele, dass durch eine Kombination von Deglykosylierung durch das Enzym PNGase F und kovalente Anbindung durch das Enzym „Transglutaminase“ Antikörper gezielt mit Cyclooctonen modifiziert werden können und sich darüber hinaus mit Azid-modifizierten, komplexeren polymere Strukturen erfolgreich umsetzen lassen. Allerdings steht eine Charakterisierung der einzelnen Konjugationsschritte über beispielsweise hochaufgelöste Massen noch aus.

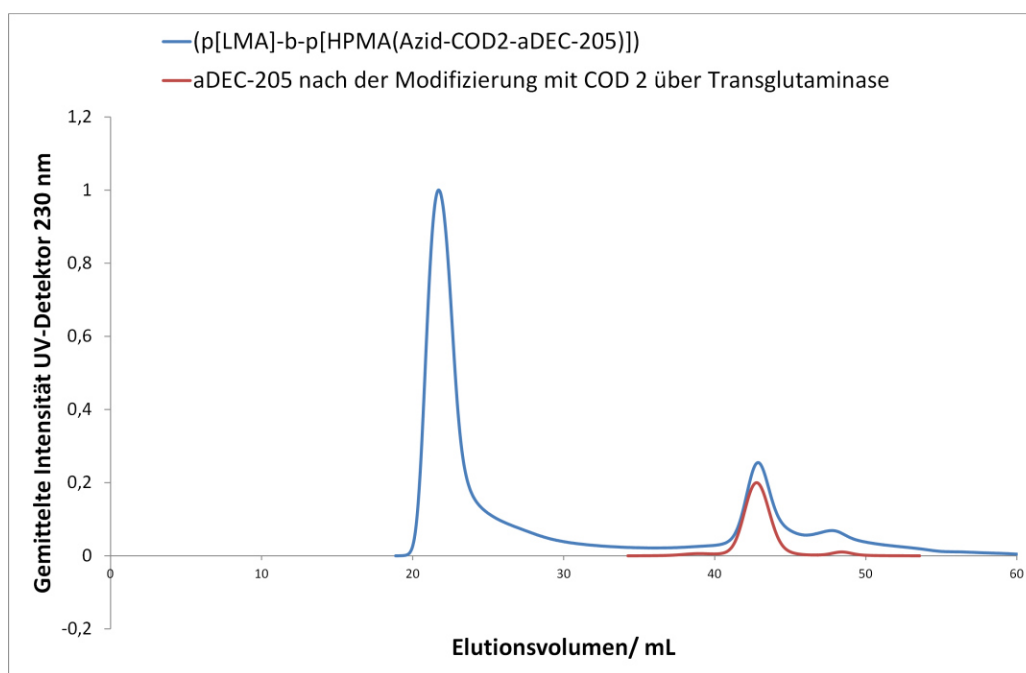


Abbildung 4.94: SEC in wässrigem gepufferten Medium von **p[LMA]-b-p[HPMA(Azid-COD2-aDEC-205)]** (blau) und **aDEC-205** nach Modifizierung mit **COD 2** über Transglutaminase (rot)

Das Konjugat **p[LMA]-b-p[HPMA(Azid-COD2-aDEC-205)]** wurde zusätzlich über SEC vermessen. Abbildung 4.94 zeigt das entsprechende Elugramm für **COD-2** modifizierten **aDEC-205** Antikörper vor und nach der Umsetzung mit Azid-funktionalisierten Mizellen. Es beweist nochmal die kovalente Anbindung an die polymeren Mizellen. Es belegt auch,

dass der überschüssige Antikörper sich präperativ sehr leicht aufgrund der unterschiedlichen Größen von den Konjugaten abtrennen lässt.

Es konnte also gezeigt werden, dass die gezielte Kombination von enzymatischer Reaktion und kupferfreier Alkin-Azid-Kopplung zum Modifizieren von komplexeren polymeren Strukturen (oder Nanopartikel im Allgemeinen) genutzt werden kann, um deren selektive Aufnahme in ganz bestimmte Zellen zu erreichen. Der große Vorteil besteht darin, dass sie auf viele polymere Systeme und auch andere nanopartikelartige Systeme anwendbar ist, da eine Azid-Funktionalisierung oft gut möglich ist. Zudem ist sie auf sehr viele Antikörper anwendbar, da der Ort für die Kopplung mit dem Enzym Transglutaminase in der konservierten Fc-Domäne liegt, und daher auf alle monoklonalen Antikörper vom Isotyp IgG1-IgG4 durchführbar ist.^[72] Durch die Limitierung der Bindungsstellen wird zudem die unkontrollierte Bildung großer Aggregate unterbunden. Der Überschuss an ungebundenem Antikörper kann sehr leicht über SEC abgetrennt werden, was für biologische Versuche essentiell ist. Die Testung auf die konservierte Bindungsaffinität nach Konjugation ist der nächste Schritt. Aufgrund der definierten Bindungsstelle am Antikörper über diese Methode^[72] ist aber eine starke Beeinträchtigung der Bindungsstärke durch diese Ligations-Methode unwahrscheinlich.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Mit der „*Michael-Addition*“ von Thiolen an Maleinimide wurde eine geeignete, bioorthogonale, biokompatible Ligationsmethode für die gezielte Synthese von Polymer-Antikörper Konjugaten gefunden. Über die Verwendung der Traut`s Reagenz 2-Iminothiolan können beliebige Antikörper kontrolliert mit Thiol-Gruppen modifiziert werden. Und über die Kombination von RAFT-Polymerisation und Reaktivester Polymeren konnten definierte, Maleinimid-modifizierte HPMA Copolymere synthetisiert werden. Diese bilden unter optimierten Bedingungen mit Thiol-modifizierten Antikörpern definierte Polymer-Antikörper Konjugate, die noch spezifisch an ihre Zielrezeptoren binden. Die Verwendung von semitelechel Maleinimid-modifizierten HPMA-Copolymeren führte dabei zu noch definierteren Konjugaten. Dabei konnte durch Verwendung des für dendritischen Zellen spezifischen Antikörpers aDEC-205 zu einem die Bedeutsamkeit von definierten Konjugaten für ein selektives Targeting gezeigt werden. Zum anderen beweist es, dass selektive Addressierung von Immunzellen mit Schlüsselfunktion wie dendritischen Zellen möglich ist. Da diese Konjugations-Methode unabhängig von dem verwendeten monoklonalen Antikörper ist, kann zum Beispiel durch die Verwendung des monoklonalen Antikörpers aCD-25, die gezielte Adressierung von regulatorischen T-Zellen erreicht werden, die eine Schlüsselfunktion bei der Inhibierung einer Immunantwort besitzen. Darüber hinaus ermöglicht der Syntheseweg die gleichzeitige Einführung verschiedener Stimuli unter Einhaltung der definierten Polymerstruktur und der Antikörperanbindung. Genauso können dabei Tumorantigene (kürzere Peptidsequenzen) einfach zusätzlich an das Polymerrückgrat angebunden werden. Es existieren bestimmte Peptidsequenzen aus dem OVA-Albumin die als Modell-Tumorantigene gezielt CD⁴⁺ (T-Helfer Zellen) (ISQAVHAAHAEINEAGR) und CD⁸⁺ (T-Killer Zellen) (SIINFKL) aktivieren. Die parallele Anbindung dieser Peptide in Kombination mit der Konjugation von aDEC-205 würde also eine gezielte Aktivierung von dendritischen Zellen und eine daraus resultierende T-Zell-Stimulation in diesem Modellsystem möglich machen.

Über die Kombination der RAFT-Polymerisation und polymeren Reaktivestern konnten Blockcopolymere, bestehend aus einem kationischen, peptidischen Polylysin-Segments und einem hydrophilen poly[HPMA] Segments kontrolliert synthetisiert werden. Diese

Blockcopolymere schließen p-DNA als komplexen Wirkstoff effizient in Polyplexen ein. Dabei wurden optimale Mischungsverhältnisse für Blockcopolymer/p-DNA gefunden. Diese Polyplexe aus verschiedenen Blockcopolymeren werden effizient von der humanen Test-Zelllinie HEK 293T gebunden und internalisiert. Darüber hinaus konnte das erfolgreiche Ablesen der transportierten p-DNA durch verschiedene Assays bewiesen werden. Da die Polyplexe über eine abschirmende Korona verfügen und gleichzeitig eine sehr gute Biokompatibilität zeigten, stellen sie vielversprechende Transportmittel für eine therapeutische Anwendung von p-DNA dar. Zusätzlich konnte die Effizienz der einzelnen Blockcopolymere in der Transfektion verglichen werden und so Informationen zur Verbesserung der Polyplexe gewonnen werden. Auch konnte über die gezielte Einführung von reduktiv spaltbaren Disulfidbindungen stimuli responsive Blockcopolymere dargestellt werden. Diese bilden in gleicher Weise Polyplexe, zeigen aber eine stark verbesserte Transfektionseffizienz, welche an kommerziell verwendete Transfektionsvektoren heranreicht, ohne eine gleichzeitige Erhöhung der Zytotoxizität aufzuweisen. Gerade letztere stellen daher eine potentiellen Vektor dar um zum Beispiel dendritischen Zellen gezielt transkriptionell zu beeinflussen. Daher wäre hier der nächste Schritt das Transfektionspotential an immortalisierten dendritischen Zellen (XS-52 Zelllinie) oder nativen dendritischen Zellen (BMDC's) zu testen und deren Aktivierung mit DC-spezifischen p-DNA Konstrukten zu untersuchen. Darüber hinaus bietet hier die multifunktionalisierbare hydrophile poly[HPMA] Korona die Möglichkeit, gezielt DC-spezifische Erkennungsstrukturen wie den schon untersuchten aDEC-205 Antikörper anzubinden und so die Transfektion von dendritischen Zellen zu optimieren und gleichzeitig ein aktives Targeting („*in vivo*“) zu bewirken.

Durch die Verwendung des Enzyms „Transglutaminase“ konnte eine Methode aufgezeigt werden, um beliebige Antikörper gezielt mit Cyclooctinen für eine biokompatible, kupferfreie Alkin-Azid-Kopplung zu ermöglichen. Über diesen Syntheseweg soll gleichzeitig der Ort der Anbindung, entfernt der Antigenbindungsstelle, definiert werden und die Bindungsstellen auf maximal zwei je Antikörper begrenzt werden. Zwar muss das Syntheseprotokoll noch ausführlicher untersucht werden, aber die Anbindung an verschiedene Azid-modifizierte, komplexe polymeren Strukturen wie polymere Mizellen konnte aber gezeigt werden. Aufgrund der relativ einfachen Einführbarkeit von Azid-Gruppen stellt diese Methode eine vielseitig anwendbare Methode dar, um verschiedene Arten von Nanopartikeln mit Antikörpern für einen zielgerichteten Transport kontrolliert

zu modifizieren. Speziell wird es dadurch möglich, dass beispielsweise die beschriebenen Polyplexe aus p-DNA und poly[Lysin]-*b*-poly[HPMA] Blockcopolymeren mit Azid-modifizierter hydrophilen poly[HPMA] Korona gezielt mit dem aDEC-205 Antikörper dekorieren lassen um einen stark optimierten polymeren Transfektionsvektor für dendritische Zellen erhalten wird.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse die Möglichkeit der selektiven Adressierung von Immunzellen mit Schlüsselfunktion wie dendritischen Zellen und ebenso die Möglichkeit der transkriptionellen Regulation von Zellen. Damit stellen sie einen ersten Schritt zur Herstellung von funktionellen Nanopartikeln zur Anwendung in der die Tumor-Immuntherapie dar.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Geräte und Materialien

Kernresonanz-Spektroskopie

Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurden mit Hilfe eines *Bruker AC 300/400* bei 300 bzw. 400 MHz, die $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren mit Hilfe eines Brukers AC 300/400 bei 75 MHz und die $^{19}\text{F-NMR}$ -Spektren mit einem *Bruker DRX-400* bei 376 MHz aufgenommen. Alle aufgeführten Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und die spektroskopischen Daten mittels der Software *MestrelNova® 8.1* ausgewertet. Chemische Verschiebungen sind in ppm angegeben.

Infrarotspektroskopie

Infrarot (IR)-Spektren wurden mit dem FT/IR-400 (*Jasco Corporation*) Spektrometer, welches eine ATR-Messeinheit besitzt, aufgenommen.

Massenspektrometrie

ESI-Massenspektren wurden mit folgendem Gerät aufgezeichnet: Navigator Instrument der Firma *ThermoElectron*, Boston (USA), bei Verwendung von einer Probenkonzentration von 0.1 mg/mL, einer Flussrate von 0.75 mL/min, einer Cone-Voltage von 70V, 45V oder 35V und einem N_2 Strom von 300L/h.

Gelpermeationschromatographie (GPC)

Elutionsdiagramme von hydrophoben Reaktivester Polymeren wurden mit einer GPC-Anlage mit THF als Laufmittel bestehend aus: *Jasco PU 1580 Pumpe*, *Jasco Autosampler AS 1555*, *Jasco RI 1530 Brechungsindexdetektor*, *Jasco UV 1575 UV-Detektor* aufgezeichnet. Säulenmaterial wurde von der Firma *MZ Analysetechnik* verwendet: 300x8.0 mm, MZ-Gel SD plus 10^6 \AA 5 μm , MZ-Gel SDplus 10^4 \AA 5 μm and MZ-Gel SDplus 10^2 \AA 5 μm . Es wurde eine Flussrate von 1 ml/min bei 25 °C verwendet. Für die Kalibration wurden Polystyrol Standards verwendet.

Elutionsdiagramme von hydrophilen HPMA-Polymeren wurden mit einer GPC-Anlage in HFIP (mit 3 g/L Kaliumtrifluoracetat) als Laufmittel bestehend aus: *Jasco PU 1580 Pumpe, Jasco Autosampler AS 1555, Jasco G1362A RID Brechungsindexdetektor, Jasco UV-2075 Detektor* aufgezeichnet. Säulenmaterial wurde von der Firma *MZ Analysetechnik* verwendet: PFG Säulen, particle size: 7 μm , porosity: 100 and 1000Å, resp. Es wurde eine Flussrate von 0,8 ml/min bei 40 °C verwendet. Für die Kalibration wurden PMMA Standards verwendet.

Elutionsdiagramme von Protein-Polymer Konjugaten wurden mit einer GPC-Anlage in gepufferten wässrigen Medium (0,15 M NaCl, 0,05 M Na₃PO₄, pH 7.0) als Laufmittel bestehend aus: *Jasco pU-2086 Plus series Pumpe, Jasco RI 2031 Plus series Brechungsindexdetektor, Jasco UV-2077 Plus Detektor* aufgezeichnet. Es wurde eine Superose[®] 6 10/300 GL von *GE-Healthcare* (Freiburg, Deutschland) Säule bei einer Flussrate von 0,4 ml/min bei 25 °C verwendet. Für die Kalibration wurden der Protein Standards Mix BEH450 (*Waters*) verwendet.

Mit der gleichen Anlage, allerdings mit Sephadex-HiTrap-desalting Columns von der Firma *GE Helthcare* (Buc, Frankreich) anstatt der Superose[®] 6 10/300 GL Säule als stationäre Phase, wurden alle hydrophilen HPMA-Copolymere und Stat.-und End-Polymer-Antikörper Konjugate vor den zellbiologischen Evaluierungen mit einer Flussrate von 1 ml/min in Reinstwasser bzw. PBS-Puffer bei RT gereinigt und von ungebundenen Farbstoff befreit.

Alle Elutionsdiagramme wurden mit einer PSS WinGPC Software von *Polymer Standard Service Mainz* ausgewertet.

Als präparative HPLC (High Performance Liquid Chromatography) wurde eine Anlage bestehend aus folgenden Teilen verwendet: *Smartline Pumpe 1000* von *Knauer*, einem *Smartline UV Detektor 1000* sowie einem *Smartline RI-Detektor 2400* von *Knauer*. Die Messung erfolgte bei einer Flussrate von 1 mL/min und der UV-Detektor wurde auf eine Wellenlänge von 254 nm eingestellt mit einer *reversed phase Phenomenex Luna 10 U C18(2) Säule* (Porengröße 100 Å) mit gebundenen unpolaren Octadecylsilylphase. Als polares Elutionsmittel wurde eine Gradientenmischung aus Acetonitril und Reinstwasser verwendet (5 % Acetonitril-100 % Acetonitril), die nach Bedarf mit 0,1 % TFA versetzt waren. Zur Steuerung und Auswertung der HPLC Anlagen wurde die Software *Chromgate V3.3.1* verwendet.

Amicon® Ultra Centrifugal Devices (MWCO 100.000 g/mol, 0,5 ml) wurden von der Firma *Millipore* (Billerica, MA, USA) erhalten.

Dialyseschläuche (MWCO: 3500, 14.000 und 25.000 g/mol) wurde von der Firma *Carl Roth* (Karlsruhe, Deutschland) erhalten.

Hinsichtlich dünnenschichtchromatographischer Analysen wurden Silica-Gel-beschichtete Aluminiumfolien 60 F₂₅₄ der Firma Merck verwendet. Säulenchromatographische Aufreinigung erfolgte unter Verwendung von Silica-Gel der Firma Macherey-Nagel (0.063-0.2 mm/20-230 mesh).

Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS)

Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) Messungen wurden am Max-Planck Institut für Polymerforschung in Mainz in Zusammenarbeit mit [REDACTED] mit einem kommerziellen Aufbau der Firma *Zeiss* (Oberkochen, Deutschland) durchgeführt bestehend aus: *Confo2 Modul*, invertiertes Mikroskop (*Axiocvert 200*), ausgestattet mit *Zeiss C-Apochromat 40x 1,2 W Wasser-Immersion Objektiv*. Für die Anregung des Polymerfarbstoffes Oregon Green wurde ein Argon Laser verwendet (488 nm) und für die PE/Cy5 markierten Antikörper aDEC205/IgG2a ein Helium-Laser (743 nm). Die aufgenommene Fluoreszenz wurde über einen *LP505 long-pass emission Filter* gefiltert und mit einer *Avalanche Photodiode Detektor* aufgezeichnet, welches eine *single photon counting* ermöglicht. Es wurden 8-Well, Polystyrol gekammerte Deckgläser (*Laboratory-Tek, Nalge Nunc International*, Penfield, NY, USA) als Probengefäße verwendet. Jede Lösung wurde mit einer Reihe von 10 Messungen in einer Zeitspanne von fünf Minuten durchgeführt. Das konfokale Observationsvolumen wurde mit dem Referenzfarbstoff (Alexa Fluor 488) mit bekanntem Diffusionskoeffizienten kalibriert.

UV-VIS Messungen

Die Messungen der optischen Absorption erfolgten mit einer 1 cm Quartz-Küvette an einem *Jasco V-630 Photo-Spektrometer* bei den entsprechenden Wellenlängen.

Verwendete Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, kommerziell von den Firmen *Sigma-Aldrich*, *Acros Organics*, *Roth*, *Fluka* und *Alpha Aesar* erworben und ohne

weitere Aufreinigung eingesetzt. Die benötigten Lösungsmittel lagen mit dem Reinheitsgrad *pro analysis* (p.a.) vor und je nach Notwendigkeit wurden Dichlormethan, Tetrahydrofuran und Dioxan nochmals vor Gebrauch nach Standardverfahren getrocknet und destilliert. AIBN wurde vor seinem Einsatz aus Diethylether umkristallisiert. 2-Hydroxypropylamin wurde im Vakuum destilliert und über Molsieb (4Å) gelagert. *N*-ε - *boc*-*L*-Lysin (H-L-Lys (*Boc*)-OH) stammt von der Firma *Orpegen Peptide Chemicals GmbH*. Der Azid Linker *O*-(2-Aminoethyl)-*O'*-(2-azidoethyl)pentaethylenglycol (NH₂-(PEG)₆-N₃) wurde von *Iris Biotech GmbH* erworben. Der für die biologischen Systeme benötigte PBS (Phosphate Buffered Saline) Puffer stammt von *FisherBioReagents*. Die deuterierten Lösungsmittel für die *NMR*-Spektroskopie wurden von *Deutero GmbH* bezogen. Der Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green 488® Cadaverin und Tetramethylrhodamin wurde von der Firma *Invitrogen* bezogen.

Monoklonaler aRAGE-Antikörper (clone mAbA11) wurde von *Millipore* (Schwalbach, Deutschland) und monoklonaler aDEC-205 (clone NLDC-145, Rat- IgG2a,κ Isotype) und IgG2a (clone RTK275, Rat IgG2a Isotype) Antikörper wurden von *Bio X Cell* (West Lebanon, NH, USA)) bezogen. Die Antikörper wurden nach Bedarf aliquotiert und im Eisfach gelagert.

Die fluoreszenzfarbstoffmarkierten, monoklonalen Antikörper PE/Cy7anti-mouse CD205 (aDEC205) und PE/Cy7Rat IgG2a wurden von *BioLegend* (London, UK) bezogen.

Das Enzym Peptide-*N*-Glycosidase F (PNGase F) wurde von *New England Biolabs* (Frankfurt, Deutschland) und rekombinante, bakterielle Transglutaminase (bTG) von *Zedira* (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Reaktionen bei Raumtemperatur und unter Rühren durchgeführt.

Alle Destillationen im Vakuum bzw. im Hochvakuum wurden - soweit nicht anders vermerkt - bei 40 °C durchgeführt.

In den *NMR*-Auswertungen der Polymere sind die Endgruppen teilweise vernachlässigt.

Alle polymeranalogen Reaktionen wurden am Polymer-Karussell durchgeführt und die vollständige Umsetzung mittels ¹⁹F-*NMR*-Spektroskopie überprüft (Abbildung 6.1).

Experimenteller Teil

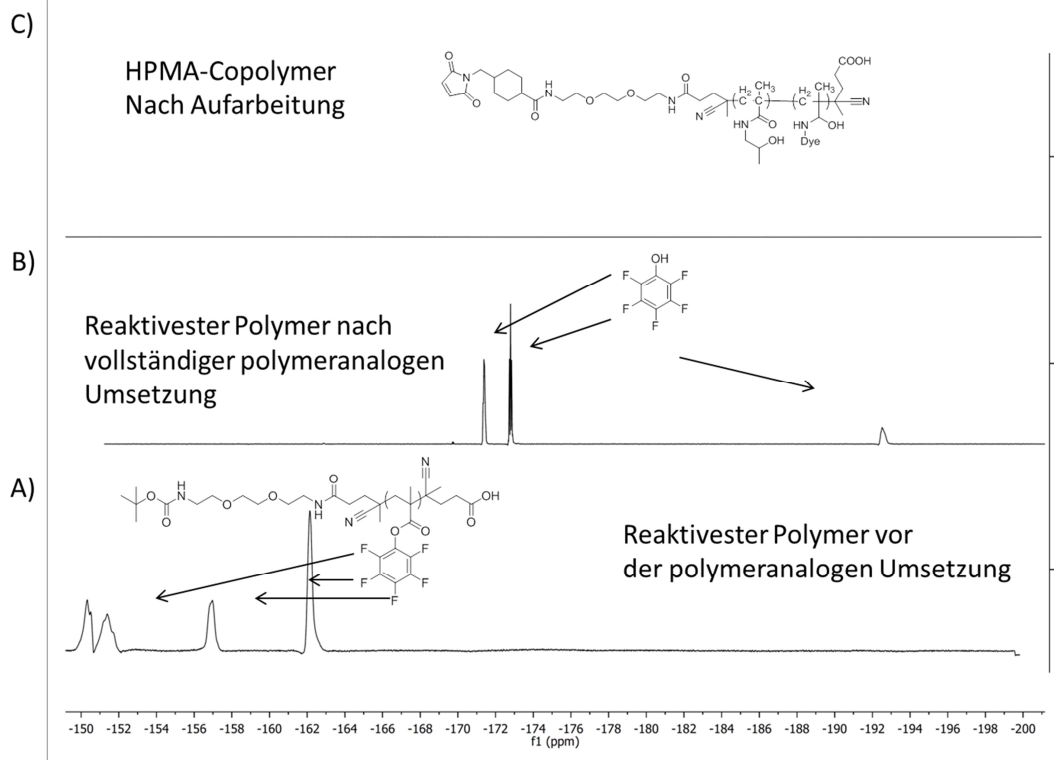


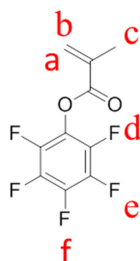
Abbildung 6.1: Kontrolle der vollständigen Umsetzung von Reaktivester Polymeren über ^{19}F -NMR-Spektroskopie. A): Reaktivester Polymer vor der Umsetzung (Signale für Pentafluorophenyl Methacrylat); B): Reaktivester Polymer nach polymeranalogen Umsetzung (Signale für freies Pentafluorphenol); C): HPMA-Copolymer nach Aufarbeitung

6.2 Synthetischer Teil

6.2.1 Synthese der niedermolekularen Substanzen und Ketten-transferreagenzien

Synthese von Pentafluorophenyl methacrylat^[176]

36.81 g (0,2 mol, 1 e.q.) Pentafluorophenol wurde in 500 mL abs. Diethylether gelöst. Unter Eiskühlung wurden 33,4 mL Triethylamin (0,24 mol, 1.2 eq.) zugegeben und anschließend 23 ml Methacryloylchlorid (0,24 mol, 1.2 eq.), gelöst in 80 mL abs Diethylether, langsam innerhalb einer Stunde zugetropft. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und der entstandene farblose Feststoff abgesaugt. Die resultierende gelbe Lösung wurde unter Vakuum eingengt, in 250 mL Dichlormethan aufgenommen, mit 1 M HCl und dreimal mit dest. Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde über Kolonne im Vakuum destilliert ($p = 1 \mu\text{bar}$, $T = 42\text{-}50 \text{ }^\circ\text{C}$) und anschließend durch Flash-chromatographie gereinigt (Laufmittel PE). Es wurden 40 g (0,16 mol, 79 % d. Th.) des Produktes als farblose Flüssigkeit erhalten.



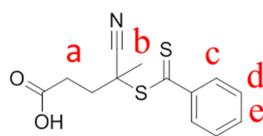
300 MHz $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): [δppm] = 6.45 (s, 1H, *a*), 5.91 (s, 1H, *b*), 2.09 (s, 3H, *c*).

376 MHz $^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3): [δppm] = -152.70 (d, 2F, *d*), -158.16 (t, 1F, *f*), -162.41 (t, 2F, *e*).

Synthese der 4-Cyano-4-((thiobenzoylsulfanyl)pentansäure (Säure-CTA)^[177]

Zu 50 mL (91,5 mmol) Phenylmagnesiumchlorid in 100 mL abs. Tetrahydrofuran (THF) wurden 6 mL Schwefelkohlenstoff (100 mmol) zugetropft und zwei Stunden bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$

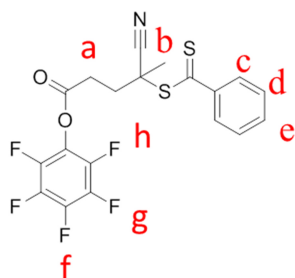
gerührt. Die dunkelbraune Lösung wurde anschließend auf 400 mL 1M HCl gegeben und nach einer Stunde wurde die lilafarbene Lsg. mit 100 mL Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde mit ges. NaCl-Lsg gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Es wurden 12,5 g Dithiobenzoessäure als rote Flüssigkeit gewonnen. Diese wurde wieder in 200 mL abs. Diethylether aufgenommen und mit einer Lösung von 9,26 g Jod und 4,98 g Kaliumjodid in 300 mL dest. Wasser im Scheidertrichter geschüttelt. Die resultierende schwarzrote organische Phase wurde mit ges NaCl-Lsg. und anschließend mit dest. Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Es wurden 11,42 g des Dibenzoylsulfids erhalten. Diese wurde in 150 mL Essigsäureethylester gelöst, mit 10,5 g (0,38 mol) 4,4-azobis(4-cyanovaleric acid) (ACVA) versetzt und 5 Stunden unter Rückfluss unter Schutzgas gerührt. Die Reaktionslösung wurde im Vakuum eingengt und das Endprodukt durch Flashchromatographie gereinigt (Laufmittel Gradient: 100 % CHCl₃ → CHCl₃/ EtOH: 12/1, R_f=0,38). Es wurden 5,28 g (0,019 mol, 25 % d.Th.) als roter Feststoff erhalten.



300 MHz ¹H-NMR (CDCl₃): [δ ppm]=7.92-7.90 (d, 2H, *c*), 7.60-7.55 (t, 1H, *e*), 7.42-7.37 (t, 2H, *d*), 2.81-2.40 (m, 4H, *a*), 1.94 (s, 3H, *b*).

Synthese von Pentafluorophenyl-(4-phenylthiocarbonylthio-4-cyano-valerate) (Aktiv-ester-CTA)^[178]

1,5 g (5,4 mmol) des Säure-CTA's wurden in 60 mL abs. THF unter Schutzgas vorgelegt und mit 1,5 mL NEt₃ (10,7 mmol) versetzt. Anschließend wurden 1,9 mL (10,7 mmol) Pentafluorophenyl-Trifluoracetat mittels einer Spritze zugeben und die resultierende rote Lsg. für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde im Vakuum eingengt, mit Dichlormethan aufgenommen und gegen Wasser, verd. NaHCO₃ Lsg und ges. NaCl Lsg. ausgeschüttelt und anschließend mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Produkt wurde mittels Flashchromatographie (Laufmittel: PE/ CH₂Cl₂ 1:1, R_f= 0,46) gereinigt und es wurden 2 g (4,5 mmol, 83 % d.Th.) des Produktes als purpurfarbener Feststoff erhalten.

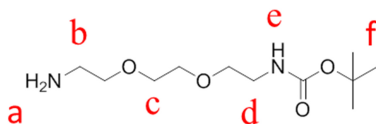


300 MHz $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): [δ/ppm]= 7.95-7.92 (d, 2H, *c*), 7.62-7.57 (t, 1H, *e*), 7.44-7.39 (t, 2H, *d*), 3.10-2.51 (m, 4H, *a*), 1.99 (s, 3H, *b*).

376 MHz $^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3): [δ/ppm]=-152.85 (d, 2F, *h*), -157.60 (t, 1F, *f*), -162.21 (d, 2F, *g*).

Synthese von *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)aminoethoxyethoxyethylamin^[179]

18,2 g (0,12 mol) Aminoethoxyethoxyethylamin wurden in 80 mL Dioxan gelöst und langsam eine Lösung von 4,37 g (0,02 mol) Di-*tert*-butyl-dicarbonat (Boc_2O) in 30 ml Dioxan zugegeben. Die resultierende Suspension wurde über Nacht gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 40 mL Wasser aufgenommen und das Produkt viermal mit 50 mL Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wurde dreimal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und 4 g (16 mmol, 81 % d.Th.) als leicht gelbliches Öl erhalten.

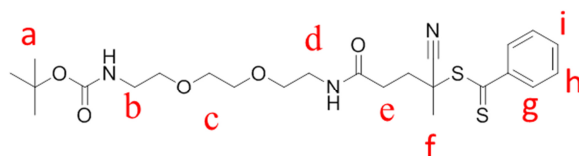


300 MHz $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): [δ/ppm]= 5.18 (br s, 1H, *e*), 3.54-3.43 (m, 8H, *c*), 3.23 (dd, 2H, *b*), 2.81 (t, 2H, *d*), 1.80 (br s, 1H, *a*), 1.36 (s, 9H, *f*).

FD-MS: [m/z]= 249. 1 ([M], ber.: 248.48); 497.2 ([M+M], ber.: 496.96).

Synthese von 4-cyano-4-((thiobenzoyl)sulfanyl)pentansäure (*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)aminoethoxyethoxyethyl)-amid (PEG- CTA)

473 mg (1.04 mmol, 1.3 eq.) Pentafluorophenyl-(4-phenylthiocarbonylthio-4-cyanovaleriate) wurden in 25 mL trockenem THF gelöst und 167 μ L (1,2 mmol, 1,5 eq.) Triethylamin unter Argonatmosphäre hinzugegeben. 200 mg (0,8 mmol, 1 eq.) (*N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)aminoethoxyethoxyethylamin wurden 25 mL trockenem THF gelöst, langsam hinzugegeben und die resultierende Lösung wurde bei Raumtemperatur für 4 Stunden gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt, 100 mL Dichlormethan hinzugegeben, die organische Phase mit Wasser und ges. NaCl Lsg. gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und anschließend im Vakuum eingeengt. Das Rohprodukt wurde mittels Flashchromatographie gereinigt (Laufmittel: CHCl₃/EtOAc 1:1, R_f= 0,18). Es wurden 337 mg (0,67 mmol, 83 % d. Th.) als violettes Öl erhalten.



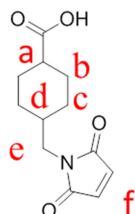
300 MHz ¹H-NMR (CDCl₃): [δ ppm]= 7.91-7.88 (d, 2H, *g*), 7.59-7.53 (t, 1H, *i*), 7.42-7.36 (t, 2H, *h*), 3.64-3.55 (m, 8H, *c*), 3.50-3.45 (m, 2H, *d*), 3.33-3.30 (t, 2H, *b*), 2.68-2.40 (m, 4H, *e*), 1.94 (s, 3H, *f*), 1.44 (s, 9H, *a*).

ESI-MS: [m/z]= 532.20 ([M+Na], ber. 532.2 [M+Na])

Synthese von 4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexan carbonsäure

Die Synthese von 4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexane carbonsäure wurde an eine Literaturvorschrift angelehnt.^[180] 10 g (64 mmol) of 4-(*N*-aminomethyl)cyclohexan carbonsäure wurde in 100 mL Eisessig gelöst, 4,3 g (64 mmol) Maleinanhidrid gelöst in 50 mL Essigsäure, wurde tropfenweise zugegeben und die resultierende Suspension wurde 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und aus Methanol umkristallisiert. Der resultierende farblose Feststoff (11 g, 43 mmol) wurde in

Toluol suspendiert, mit 73,7 mL (86 mmol) Triethylamin versetzt und unter Rückfluss am Wasserabscheider 15 Stunden gerührt. Die resultierende Lösung wurde heiß filtriert und unter Vakuum eingengt. Anschließend wurden 400 mL Wasser hinzugegeben, der pH-Wert mit 2M HCl-Lsg. auf 2 eingestellt und das Produkt mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, das Lösemittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt durch Umkristallisieren aus Toluol gereinigt. Es wurden 5 g (21 mmol, 49 % d.Th.) des Produktes als farbloser Feststoff erhalten.

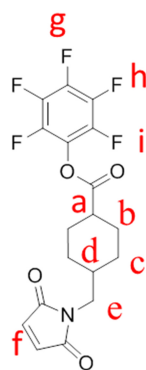


300 MHz $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): [δ/ppm]= 6.70 (s, 2H, *f*), 3.34-3.36 (d, 2H, *e*), 2.30-2.20 (tt, 1H, *a*), 2.06-2.00 (m, 2H, *b*), 1.77-1.72 (m, 2H, *b*), 1.69-1.60 (m, 1H, *d*), 1.45-1.31 (m, 2H, *c*); 1.07-0.94 (m, 2H, *c*)

FD-MS: [m/z]= 237.3 ([M+H], ber. 237.1 [M+H]).

Synthese von 1-pentafluorophenyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexancarbonsäure

Pentafluorophenyl trifluoroacetate wurde nach Literaturvorschrift synthetisiert.^[181] 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexancarbonsäure 0.9 g (3.8 mmol) wurde in 30 mL trockenem THF gelöst, 2,1 g (7.5 mmol) pentafluorophenyl trifluoroacetat und 0,77 g (7,5 mmol) Triethylamin wurden über eine Spritze unter Argon zugegeben. Die resultierende Lösung wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, das Lösemittel im Vakuum entfernt und 150 mL Wasser hinzugeben. Das Produkt wurde mit Dichlormethan extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde über Flashchromatographie gereinigt (Laufmittel: Petrolether/ Ethylacetat 10:1, $R_f=0,18$) und es wurden 1,09 g (2,7 mmol, 71 % d.Th.) als farbloser Feststoff erhalten.



300 MHz $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = 6.72$ (s, 2H, *f*), 3.42-3.40 (d, 2H, *e*), 2.66-2.57 (tt, 1H, *a*), 2.21-2.16 (m, 2H, *b*), 1.84-1.79 (m, 2H, *b*), 1.76-1.68 (m, 1H, *d*), 1.62-1.48 (m, 2H, *c*), 1.17-1.02 (m, 2H, *c*).

376 MHz $^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3): $[\delta/\text{ppm}] = -153.10$ (d, 2F, *i*), -158.18 (t, 1F, *g*); -162.39 (t, 2F, *h*).

Synthese von HOOC-Gly-poly[Lys(*Boc*)]₁₀-NH₂ und HOOC-Gly-poly[Lys(*Boc*)]₂₀-NH₂ über Festphasen Peptidsynthese

Der Reaktor des Peptidsynthesizers wurde mit 0,11 g (0,1 mmol Ankergruppen) der Festphase 2-Chlorotrityl-Glycin-NH₂ beladen. Je 468,54 mg (1 mmol, 10 eq. Bezogen auf Festphase) der Aminosäure Fmoc-Lys(*Boc*)-OH wurden in ein Vial abgewogen. Die 10 bzw. 20 Kopplungsschritte am Gerät fand unter Verwendung von 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) (2 eq. bezogen auf die Aminosäure), *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium (HBTU) (2 eq. bezogen auf die Aminosäure), Diisopropyl-ethyl-amin (DIPEA) (2.2 eq. bezogen auf die Aminosäure) und *N*-Methylpyrrolidin-2-on (NMP) als Lösungsmittel statt. Die Entfernung der Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl (*Fmoc*)-Schutzgruppe fand nach jedem Schritt mit 20 % Piperidin in NMP statt. Die Kontrolle der einzelnen Kupplungsschritte wurde mittels UV-Detektion der *Fmoc*-Abspaltung überprüft. Daraufhin wurde die Festphase mehrmals mit NMP und anschließend mit Dichlormethan gewaschen. Nach der Trocknung wurde die Festphase in einen *Merrifield-Reaktor* überführt und dreimal mit 5 ml einer 25 % Trifluorethanol (TFE) Lösung in Dichlormethan für je eine Stunde geschüttelt und schließlich zweimal mit 5 mL Dichlormethan gewaschen. Das Abspaltungsgemisch wurde im Vakuum eingengt und in eiskaltem

Experimenteller Teil

Diethylether gefällt. Das Produkt wurde in wenig TFE aufgenommen, mit viel Wasser vermischt und gefriergetrocknet.

Ausbeute HOOC-Gly-[Lys(Boc)]₁₀-NH₂: 205 mg (0,087 mmol; 87 %), farbloses Pulver.

Ausbeute HOOC-Gly-[Lys(Boc)]₂₀-NH₂: 274 mg (0,059 mmol; 59 %), farbloses Pulver.

ESI-MS HOOC-Gly-[Lys(Boc)]₁₀-NH₂: $[m/z]= 1190.75$ ($[M+H+Na]/2$, ber. 2380.51 $[M+H+Na]$).

ESI-MS HOOC-Gly-[Lys(Boc)]₂₀-NH₂: $[m/z]= 2343.53$ ($[M+Na+Na]/2$, ber. 4693.98 $[M+Na+Na]$); $[m/z]= 1577.02$ ($[M+Na+Na+K]/3$, ber. 4722.98 $[M+Na+Na+K]$).

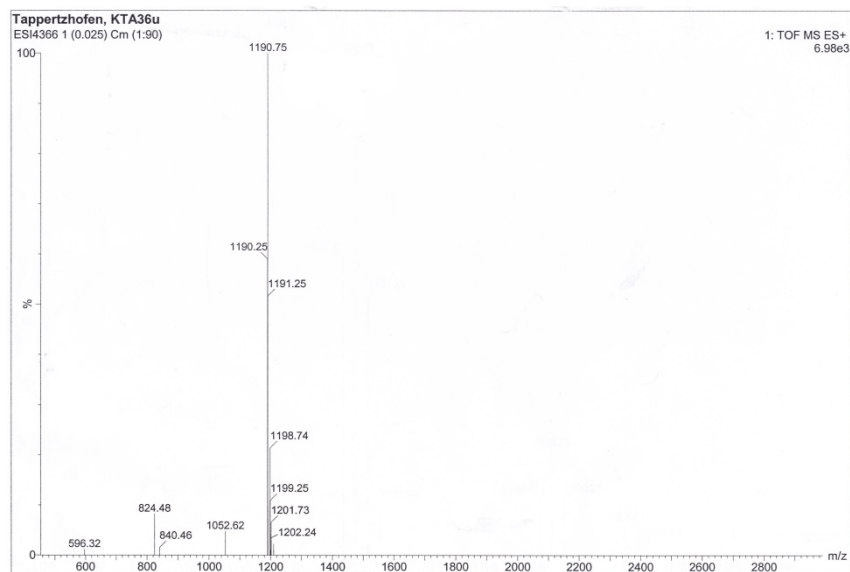


Abbildung 6.2: ESI-MS von HOOC-Gly-[Lys(Boc)]₁₀-NH₂

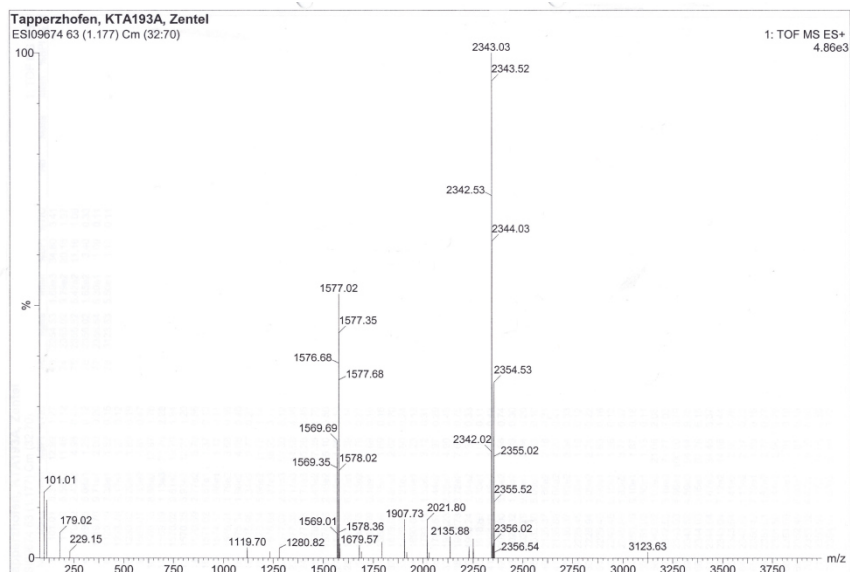


Abbildung 6.3: ESI-MS von HOOC-Gly-[Lys(Boc)]₂₀-NH₂

Die Synthese von HOOC-poly[Lys(Z)]₃₀-NH₂ über NCA Polymerisation.

HOOC-poly[Lys(Z)]₃₀-NH₂ wurde über die Polymerisation von α -Aminosäure-*N*-carboxyanhydriden (NCA-Polymerisation) mit N_ε-Benzyloxycarbonyl-L-Lysine als Monomer und Neopentylammonium Tetrafluoroborat als Initiator von [REDACTED] [REDACTED] durchgeführt.^[153] 333 mg (1,09 mmol) des Monomers (Lys(Z) NCA) wurden in einem Schlenkcolben unter Stickstoffatmosphäre in 3,3 mL abs. DMF gelöst. 5,73 mg (0,036 mmol) des Initiators neopentylammonium tetrafluoroborate wurden aus einer Stammlösung in abs. DMF mit einer Spritze hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde unter einem Stickstoffstrom bei 40 °C für 3 Tage gerührt. Das Polymer wurde in kaltem Ether gefällt, in wenig Dioxan aufgenommen, mit Wasser vermischt und gefriergetrocknet. Es wurden 241 mg des Polymers als farbloser Feststoff erhalten.

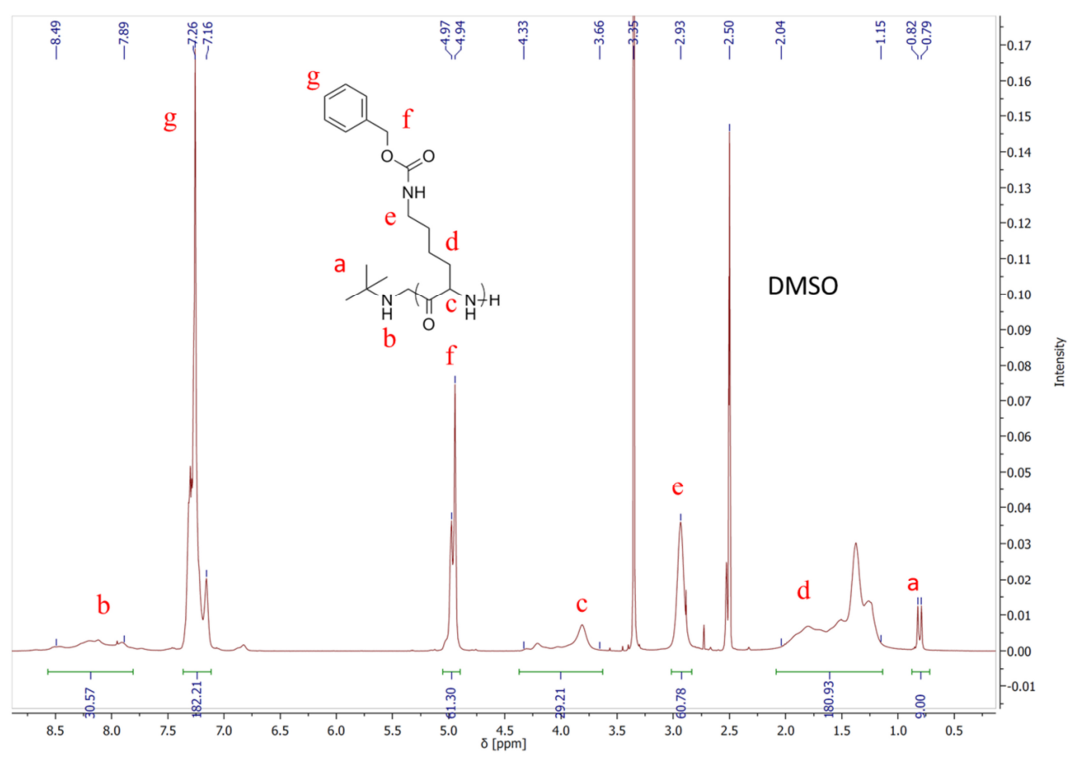


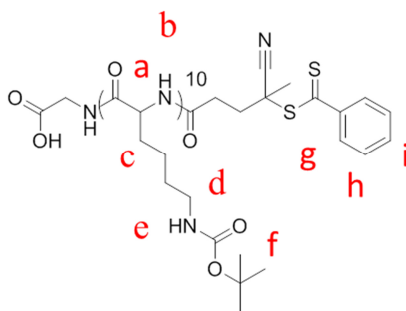
Abbildung 6.4: 400 MHz-¹H-NMR-Spektrum von HOOC-poly[Lys(Z)]₃₀-NH₂

400 MHz ¹H-NMR (dms_o-d₆): [δ/ppm]= 8.49-7.89 (m, 30H, *b*), 7.26-7.16 (m, 180H, *g*), 4.97-4.94 (m, 61 H, *f*), 4.33-3.66 (m, 30H*, *c*), 2.93 (br. s, 61H, *e*), 2.04-1.15 (m, 180H, *d*), 0.82-0.79 (d, 9H*, *a*).

*Anhand der Signale der α -Protonen (4.33-3.66 ppm, *c*) im Vergleich zu neo-Pentyl Endgruppe (0.82-0.79 ppm, *a*) kann ein Polymerisationsgrad von $X_n=30$ ermittelt werden.

Synthese des peptidischen Lysin-Kettentransferreagenz poly[Lys(Boc)]₁₀-CTA

85,5 mg (0,036 mmol, 1 eq.) HOOC-poly[L-Lys(Boc)]₁₀-NH₂ wurden in 8 mL trockenem NMP gelöst. Parallel wurden 32,5 mg (0,073 mmol, 2 eq.) (Pentafluorophenyl-(4-phenylthiocarbonylthio-4-cyanovalerate) (Aktivester-CTA) und 31,3 mg (0,146 mmol, 4 eq.) Tetramethyl-1,8-Diaminonaphthalin (Protonenschwamm) in 1,5 mL trockenem NMP gelöst und unter Argon zu dem Polylysin mit freiem Amino-Terminus hinzugegeben. Die resultierende rote Lösung wurde über Nacht unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Das NMP wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 1 mL TFE aufgenommen und in eiskaltem Diethylether gefällt. Anschließend wurde das Produkt wieder in 5 mL TFE aufgenommen und über Flashchromatographie gereinigt (Laufmittelgradient: EtOAc/ MeOH 10:1 → 1:1 → 1:2), abermals in TFE aufgenommen, in Wasser eingetropfelt und gefriergetrocknet. Es wurden 70 mg (0,025 mmol, 70 % d. Th.) als rosa Feststoff erhalten.



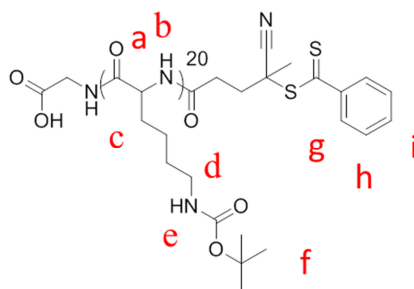
400 MHz ¹H-NMR (dms_o-d₆): [δ /ppm]= 8.09-7.82 (m, 10H, *e*), 7.93-7.91 (d, 1.55H*, *g*), 7.71-7.67 (t, 0.78H*, *i*), 7.53-7.49 (t, 1.55H*, *h*), 7.23 (br. s, 1H, *b*), 6.75-6.72 (m, 8H, *b*), 6.41 (br. S, 1H, *b*), 4.19 (br. s, 10H, *a*), 2.87-2.85 (m, 20H, *d*), 1.66-1.20 (m, 150H, *c+f*).

*Anhand der Signale der Dithioester-Endgruppe (7.92-7.49 ppm, *g, h, i*) im Vergleich zu der ϵ -Amino benachbarten Methylengruppe (2.86 ppm, *d*) kann eine Endgruppenfunktionalität von 70 % ermittelt werden.

ESI-MS HOOC-Gly-[Lys(Boc)]₁₀-CTA: $[m/z] = 1343,33$ ($[M+K+Na]/2$, ber. 2679,53 $[M+K+Na]$).

Synthese des peptidischen Lysin-Kettentransferreagenz poly[Lys(Boc)]₂₀-CTA

131 mg (0,028 mmol, 1 eq.) HOOC-poly[L-Lys(Boc)]₂₀-NH₂ wurden in 10 mL trockenem NMP gelöst. Parallel wurden 25,1 mg (0,056 mmol, 2 eq.) (Pentafluorophenyl-(4-phenylthiocarbonylthio-4-cyanovalerate) (Aktivester-CTA) und 24 mg (0,13 mmol, 4 eq.) Tetramethyl-1,8-Diaminonaphthalin (Protonenschwamm) in 1,5 mL trockenem NMP gelöst und unter Argon zu dem Polylysin mit freiem Amino-Terminus hinzugegeben. Die resultierende rote Lösung wurde über Nacht unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Das NMP wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 1 mL TFE aufgenommen und in eiskaltem Diethylether gefällt. Anschließend wurde das Produkt wieder in 5 mL TFE aufgenommen und über Flashchromatographie gereinigt (Laufmittelgradient: EtOAc/ MeOH 10:1 → 1:1 → 1:2), abermals in TFE aufgenommen, in Wasser eingetroppt und gefriergetrocknet. Es wurden 82,3 mg (0,017 mmol, 65 % d. Th.) als rosa Feststoff erhalten.



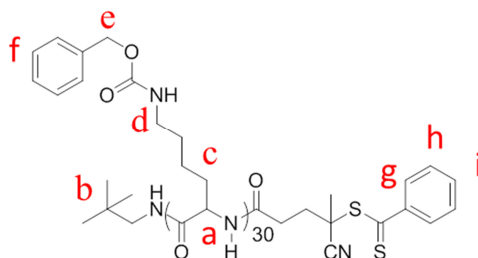
400 MHz ¹H-NMR (dms_o-d₆): $[\delta/ppm] = 7.92-7.90$ (d, 1H*, **g**), 7.71-7.67 (t, 0.5H*, **i**), 7.53-7.49 (t, 1H*, **h**), 7.25 (br. s, 1H, **b**), 6.76-6.78 (m, 17H, **b**), 6.36 (m, 2H, **b**), 4.17-3.83 (m, 20H, **a**), 2.86 (br. s, 40H, **d**), 1.70-1.23 (m, 300H, **c+f**).

*Anhand der Signale der Dithioester-Endgruppe (7.93-7.49 ppm, **g, h, i**) im Vergleich zu der ε-Amino benachbarten Methylengruppe (2.87-2.85 ppm, **d**) kann eine Endgruppenfunktionalität von 50 % ermittelt werden.

ESI-MS HOOC-[Lys(*Boc*)]₁₀-CTA: [*m/z*]= 2473.99 ([M+Na+Na]/2, ber. 4945.1 [M+K+Na]); 1662.32 ([M+Na+Na+K]/3, ber. 4984.1 [M+Na+Na+K]).

Synthese des peptidischen Lysin-Kettentransferreagenz poly[Lys(*Z*)]₃₀-CTA

500 mg (0,063 mmol, 1 eq.) HOOC-poly[Lys(*Z*)]₃₀-NH₂ wurden in 5 mL trockenem NMP gelöst. Parallel wurden 55,6 mg (0,13 mmol, 2 eq.) (Pentafluorophenyl-(4-phenylthiocarbonylthio-4-cyanovalerate) (Aktivesther-CTA) und 55,8 mg (0,25 mmol, 4 eq.) Tetramethyl-1,8-Diaminonaphthalin (Protonenschwamm) in 1,5 mL trockenem NMP gelöst und unter Argon zu dem Polylysin mit freiem Amino-Terminus hinzugegeben. Die resultierende rote Lösung wurde über Nacht unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Das NMP wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 1 mL TFE aufgenommen und in eiskaltem Diethylether gefällt. Anschließend wurde das Produkt wieder in 5 mL TFE aufgenommen und über Flashchromatographie gereinigt (Laufmittelgradient: EtOAc/ MeOH 10:1 →1:1 →1:2), abermals in TFE aufgenommen, in Wasser eingetropfelt und gefriergetrocknet. Es wurden 414 mg (0,05 mmol, 79 % d. Th.) als rosa Feststoff erhalten.



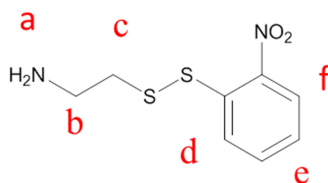
400 MHz ¹H-NMR (*dms**o*-*d*₆): [δ /ppm]= 7.89-7.87 (d, 1.63H*, *g*), 7.68-7.65 (t, 0.82H*, *i*), 7.49-7.45 (t, 1.62H*, *h*), 7.31-7.14 (m, 170H, *f*), 4.98-4.95 (m, 68H, *e*), 4.21-3.74 (m, 34H, *a*), 2.94 (s, br, 68H, *d*), 1.92-1.18 (m, 216H, *c*), 0.83-0.80 (m, 9H, *b*).

*Anhand der Signale der Dithioester-Endgruppe (7.88-7.47 ppm, *g*, *h*, *i*) im Vergleich zu der neo-pentyl-Endgruppe (0.83-0.80 ppm) kann eine Endgruppenfunktionalität von 82 % ermittelt werden.

GPC (*HFIP*): *M*_n= 11.300 g/mol. *D*= 1,11.

Synthese von 2-((2-Nitrophenyl)disulfanyl)ethylamin

4 g (35,5 mmol, 1 eq.) 2-Mercaptoethanolamin-Hydrochlorid und 10 g (53 mmol, 1,5 eq.) 2-Nitrobenzolsulfenyl-chlorid wurden in 100 mL Eisessig suspendiert und 3,5 Stunden bei 70 °C erhitzt. Das Lösemittel wurde anschließend im Vakuum entfernt und der Rückstand in 12 mL DMF aufgenommen. Durch Zugabe von 100 mL Chloroform fiel das Produkt als gelber Feststoff aus. Der abgesaugte Feststoff wurde abermals in 50 mL Chloroform gegeben und 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend filtriert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und es wurden 6,5 g (28,4 mmol, 80 % d.Th.) des Produktes als gelber Feststoff erhalten.

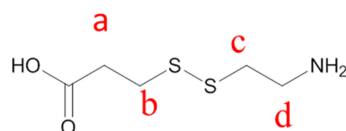


300 MHz $^1\text{H-NMR}$ ($\text{dms}\text{-}d_6$): [δ/ppm]= 8.33-8.27 (m, 2H, *e*), 8.24 (br. s, 2H, *a*), 7.95-7.89 (t, 1H, *f*), 7.59-7.54 (t, 1H, *d*), 3.05 (s, 4H, *b+c*).

FD-MS: [m/z]= 230.0 ([M+H], ber. 230.0[M+H]).

Synthese von 3-((2-aminoethyl)disulfanyl)propansäure

Die Synthese wurde an eine Literaturvorschrift angelehnt.^[182] 4 g (17,4 mmol, 1 eq.) 2-((2-Nitrophenyl)disulfanyl)ethylamin wurden in 50 mL Wasser gelöst und 1,84 g (17,4 mmol, 1 eq.) 3-mercaptopropansäure hinzugefügt. Es wurden 4,8 mL (34,8 mmol, 2 eq.) NEt_3 hinzugefügt und die resultierende rote Lösung 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert mit 1M HCl-Lsg auf 5 eingestellt (Farbänderung rot→gelb) und fünfmal mit Essigester extrahiert und die farblose wässrige Phase im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde zunächst über Flashchromatographie gereinigt (Laufmittel: EtOAc/AcOH/ H_2O 8:2:1; R_f = 0,28) und anschließend noch aus 90 % n-Pentanol/ H_2O umkristallisiert. Es wurden 580 mg (2,5 mmol, 14,5 % d. Th.) des Produktes als farbloser Feststoff erhalten.



300 MHz ¹H-NMR (D₂O): [δ /ppm]= 3.37-3.31 (t, 2H, *a*), 2.99-2.92 (q, 4H, *d*), 2.70-2.66 (t, 2H, *b+c*).

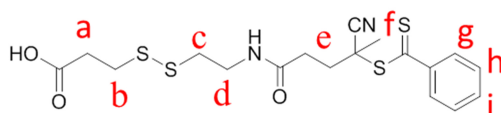
ESI-MS: [m/z]= 182.04 ([M+H], ber. 182.02 [M+H])

IR ν [cm^{-1}]: 2950 (br), 2619 (w), 2350 (w), 2031 (w), 1698 (s), 1620 (s), 1510 (s), 1407 (vs), 1247 (s), 1092 (s), 947 (w), 903 (w), 772 (w), 656 (w).

Smp: 152,8 °C (Lit.: 155-156 °C)

Synthese von (4-Cyano-4-(thiobenzoyl-sulfanyl)-pentansäureamid)-((ethyldisulfanyl-ethyl)propansäure) (Disulfid-CTA)

370 mg (0,83 mmol, 1.3 eq.) Pentafluorophenyl-(4-phenylthiocarbonylthio-4-cyanovalerate) (Aktivester-CTA) wurden in 10 mL abs. THF vorgelegt und mit 0,22 mL (1,6 mmol, 2.5 eq.) NEt₃ versetzt. Anschließend wurden 116 mg (0,64 mmol, 1 eq.) 3-((2-aminoethyl)disulfanyl)propansäure hinzugegeben und die Suspension unter Argon und Lichtausschluss 4h gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in 50 mL Dichlormethan aufgenommen, mit Wasser und ges. NaCl Lsg. gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt wurde über Flashchromatographie gereinigt (Laufmittel CHCl₃/ EtOH 40:1 mit 0,1 % AcOH; R_f= 0,3) und es wurden 70 mg (0,16 mmol, 25 % d. Th.) als roter Feststoff erhalten.

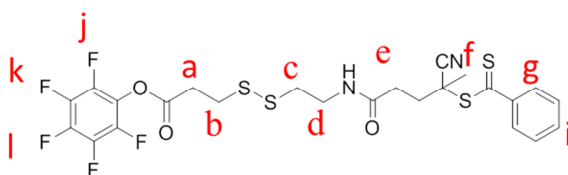


300 MHz $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): [δ/ppm] = 7.92-7.89 (d, 2H, **g**), 7.59-7.55 (t, 1H, **i**), 7.42-7.37 (t, 2H, **h**), 3.64-3.58 (q, 2H, **a**), 2.98-2.94 (t, 2H, **d**), 2.85-2.77 (m, 4H, **b+c**), 2.67-2.35 (m, 4H, **e**), 1.93 (s, 3H, **f**).

ESI-MS: [m/z] = 465.06 ([M+Na], ber. 465.05 [M+Na]); 907.14 ([M+M+Na], ber. 907.10 [M+M+Na]).

Synthese von (4-Cyano-4-(thiobenzoyl-sulfanyl)-pentansäureamid)-((ethyldisulfanyl-ethyl)pentafluorophenyl-propionat) (Disulfid-Aktivester CTA)

60 mg (0,13 mmol, 1 eq.) (4-Cyano-4-(thiobenzoyl-sulfanyl)-pentansäureamid)-((3-ethyl-disulfanyl-ethyl) propansäure) (Dissulfid-CTA) wurden in 5 mL abs. THF vorgelegt und mit 37 μL (0,27 mmol, 2 eq.) NEt_3 versetzt. 46 μL (0,27 mmol, 2 eq.) Pentafluorophenyltrifluoacetat wurden langsam unter Argon Atmosphäre zugetropft und die rote Lsg. 4 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß gerührt. Das Lösemittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in 25 mL Dichlormethan aufgenommen mit Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Produkt wurde über Flashchromatographie gereinigt (Laufmittel $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 40:1 mit 0,1 % AcOH; $R_f = 0,43$) und es wurden 74 mg (0,12 mmol, 94 % d. Th.) als roter Feststoff erhalten.

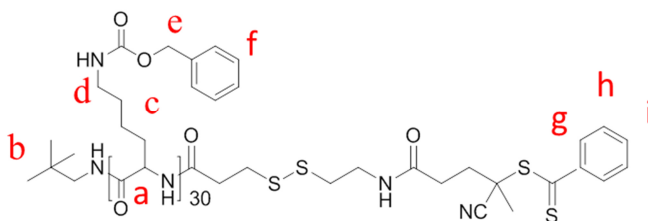


300 MHz $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): [δ/ppm] = 7.92-7.89 (d, 2H, **g**), 7.59-7.54 (t, 1H, **i**), 7.42-7.37 (t, 2H, **h**), 3.66-3.60 (q, 2H, **a**), 3.15-3.01 (m, 4H, **b+c**), 2.86-2.81 (t, 2H, **d**), 2.67-2.38 (m, 4H, **e**), 1.94 (s, 3H, **f**).

376 MHz $^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3): [δ/ppm] = -162.30 (t, 2F, **j**), -157.76 (t, 1F, **l**), -152.77 (d, 2F, **k**).

Synthese des Lysin-Kettentransferreagenz mit Disulfid-Brücke (Makro-Disulfid-Lysin-CTA; poly[Lys]₃₀-S-S-CTA)

500 mg (0,063 mmol, 1 eq.) HOOC-poly[Lys(Z)]₃₀-NH₂ wurden in 5 mL trockenem NMP gelöst. Parallel wurden 76 mg (0,13 mmol, 2 eq.) 3-((4-Cyano-4-(thiobenzoylsulfanyl)-pentansäureamid-ethyl)disulfanyl)-pentafluorophenyl propionat (Disulfid-Aktivester CTA) und 55,8 mg (0,25 mmol, 4 eq.) Tetramethyl-1,8-Diaminonaphthalin (Protonenschwamm) in 1,5 mL trockenem NMP gelöst und unter Argon zu dem Polylysin mit freiem Amino-Terminus hinzugegeben. Die resultierende rote Lösung wurde über Nacht unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Das NMP wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 1 mL TFE aufgenommen und in eiskaltem Diethylether gefällt. Anschließend wurde das Produkt wieder in 5 mL TFE aufgenommen und über Flashchromatographie gereinigt. (Laufmittelgradient: EtOAc/ MeOH 10:1 → 1:1 → 1:2), abermals in TFE aufgenommen, in Wasser eingetropt und gefriergetrocknet. Es wurden 428 mg (0,054 mmol, 80 % d. Th.) als rosa Feststoff erhalten.



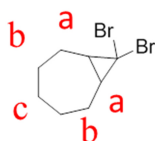
400 MHz ¹H-NMR (dms_o-d₆): [δ /ppm]= 7.90-7.88(d, 1.72H*, g), 7.69-7.65 (t, 0.86H*, i), 7.51-7.47 (t, 1.72H*, h), 7.31-7.14 (m, 150H, f), 4.97-4.94 (m, 60H, e), 4.19-3.81 (m, 30H, a), 2.93(s, br, 60H, d), 1.99-1.23 (m, 180H, c), 0.82-0.79 (m, 9H, b).

*Anhand der Signale der Dithioester-Endgruppe (7.90-7.47 ppm) im Vergleich zu der neo-pentyl-Endgruppe (0.82-0.79 ppm) kann eine Endgruppenfunktionalität von 86 % ermittelt werden.

GPC (HFIP): Mn= 11.000 g/mol, \bar{D} = 1,13.

Synthese von Dibrombicyclooctan^[183]

In einem 500 mL Dreihalskolben mit Innenthermometer, Septum und KPG-Rührer wurden 2,5 g (26 mmol) *cis*-Cyclohepten und 4,03 g (35,9 mmol, 1,38 eq.) Kalium-*tert*-butanolat unter Argon Atmosphäre in 230 mL abs. Pentan suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde im Eisbad gekühlt und eine Lösung aus 7,89 g (31,2 mmol, 1,2 eq.) Bromoform in 20 mL abs. Pentan mittels einer Spritzenpumpe langsam innerhalb 2 Stunden zugegeben. Anschließend wurde weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und die braungelbe Suspension mit 1M HCl-Lsg auf pH 3 eingestellt. Der ausgefallene Feststoff wurde mit einer Dichlormethan/Wasser Mischung aufgenommen, mit ges. NaCl Lsg. gewaschen bis pH 5-6 erreicht war, mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Die dunkelbraune Flüssigkeit wurde zunächst im Vakuum und anschließend im Hochvakuum eingengt um weitgehend restliches Bromoform zu eliminieren. Es wurden 2,48 g (9,3 mmol, 36 % d. Th.) als braune Flüssigkeit erhalten.

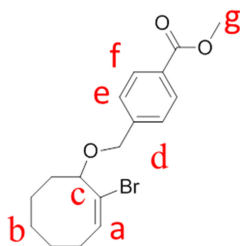


400 MHz ¹H-NMR (CDCl₃): [δ ppm]= 2.29-2.22 (m, 2H, *a*), 1.93-1.67 (m, 5H, *b*), 1.42-1.14 (m, 5H, *c*).

Synthese von Methyl-4-(((*2E*)-2-bromocyclooct-2-en-1-yl)oxy)methyl)benzoat^[172]

10 g (59 mmol) Methyl-4-(hydroxymethyl)benzoat und 1,79 g (6 mmol) Dibrombicyclooctan wurden in 20 mL abs. Toulol im Ultraschallbad gelöst und mit 0,49 mL (6,1 mmol) Pyridin versetzt. Unter Lichtausschluß und Argon Gegenstrom wurden 3,7 g (18 mmol) Silberperchlorat zugegeben und 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit einer Mischung aus Diethylether und 1 M HCl Lsg. aufgenommen, und die wässrige Phase noch dreimal mit Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit ges. NaCl Lsg. gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde

durch Flashchromatographie gereinigt (Laufmittel: PE/EtOAc 9:1; $R_f = 0,44$) und es wurden 1,9 g (5,4 mmol, 89 % d. Th.) des Produktes als gelbes Öl erhalten.



400 MHz $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): [δ_{ppm}] = 8.02-8.00 (d, 2H, *f*); 7.47-7.45 (d, 2H, *e*), 6.21-6.18 (dd, 1H, *a*), 4.73-4.70 (d, 1H, *d*), 4.39-3.36 (d, 1H, *d*), 3.97-3.91 (m, 1H, *c*), 2.82-2.72 (m, 1H, *b*), 2.34-2.28 (m, 1H, *b*), 2.07-1.24 (m, 8H, *b+g*), 0.84-0.75 (m, 1H, *b*).

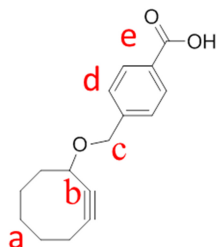
75 MHz $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): [δ_{ppm}] = 166.97, 143.25, 132.64, 132.12, 129.69, 129.38, 127.69, 84.28, 69.28, 69.96, 52.08, 39.53, 36.51, 33.36, 28.14, 26.35.

ESI-MS: [m/z] = 353.28 ([M+H], ber. 353.07[M+H]).

Synthese von 4-(((cyclooct-2-in-1-yl)oxy)methyl)benzoesäure

Die Synthese wurde an eine Literaturvorschrift angelehnt.^[184] 1,17 g (3,3 mmol) Methyl-4-(((2*E*)-2-bromocyclooct-2-en-1-yl)oxy)methyl)benzoat wurden im Ultraschallbad in 10 ml abs. DMSO gelöst und 7,6 g (7,5 mL, 50 mmol, 15 eq.) 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) zugegeben unter Stickstoff mit einer Spritze zugegeben. Die orange-braune Lösung wurde 7 Stunden bei 60 °C gerührt und anschließend mit einer Mischung aus 1M HCl-Lsg. und Essigester versetzt. Die wässrige Phase wurde nochmals mit Essigester extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Es wurden 0,96 g eines orangefarbenen Öls erhalten. Das Rohprodukt wurden direkt der Hydrolyse unterworfen. Dazu wurde es in 12 mL abs. Methanol aufgenommen (klare gelbe Lsg.) und mit 396 mg (1,7 mmol) LiOH, unter Ultraschall gelöst in 3 mL Reinstwasser, versetzt. Es bildete sich zunächst eine beige Suspension, die 4 h bei Raumtemperatur gerührt wurde, wobei nach 1 Stunde eine klare Lsg. entstand. Anschließend wurde eine Mischung aus 1M HCl-Lsg. und Essigester zugegeben, die organische Phase dreimal mit ges. NaCl-Lsg gewaschen,

über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Das Produkt wurde über Flashchromatographie gereinigt (Laufmittel: PE/EtOAc 9:1 mit 0,1 % AcOH, $R_f = 0,33$) und es wurden 0,75 g (2,9 mmol, 88 % d. Th.) des Produktes als farbloser Feststoff erhalten.



$400\text{ MHz } ^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): [δ_{ppm}] = 8.09-8.07 (d, 2H, *e*); 7.47-7.45 (d, 2H, *d*), 4.77-4.74 (d, 1H, *c*), 4.49-4.46 (d, 1H, *c*), 4.27-4.23 (m, 1H, *b*), 2.43-1.80 (m, 7H, *a*), 1.70-1.66 (m, 2H, *a*), 1.53-1.44 (m, 1H, *a*).

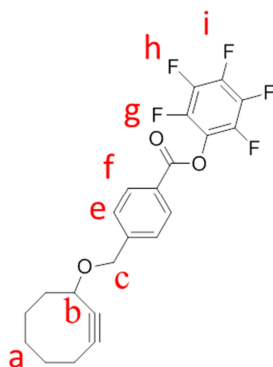
$75\text{ MHz } ^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): [δ_{ppm}] = 172.16, 144.55, 130.31, 128.46, 127.51, 100.75, 92.45, 72.17, 70.44, 42.36, 34.31, 29.74, 26.37, 20.75.

ESI-MS: [m/z] = 279.05 ($[\text{M}+\text{Na}]$, ber. 281.13 $[\text{M}+\text{H}]$).

IR ν [cm^{-1}]: 2923 (s), 2850 (w), 2663 (br), 2555 (br), 2208 (w, Alkin), 1685 (s).

Synthese von 4-(((cyclooct-2-in-1-yl)oxy)methyl)pentafluorophenylbenzoat

0,75 g (2,9 mmol) 4-(((cyclooct-2-in-1-yl)oxy)methyl)benzoesäure wurden in 20 mL abs. THF gelöst, unter Argon mit 0,8 mL (5,8 mmol) NEt_3 versetzt und anschließend langsam 1 mL (0,59 g, 5,8 mmol) Pentafluorophenyltrifluoracetat langsam zugetropft. Die resultierende Lösung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt, das Lösemittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 50 mL Dichlormethan aufgenommen, mit Wasser und ges. NaCl Lsg. gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingengt. Das braun-gelbe Rohprodukt wurde über Flashchromatographie gereinigt (Laufmittel: cHex/EtOAc 8:1, $R_f = 0,63$) und es wurden 0,89 g (2,1 mmol, 72 % d. Th.) des Produktes als farbloser Feststoff erhalten.

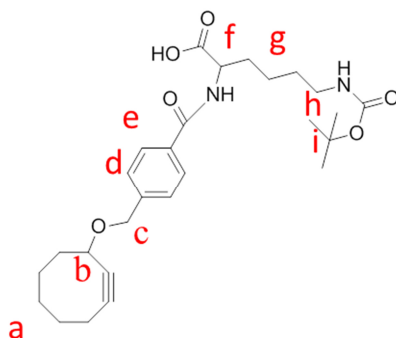


400 MHz $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): [δ_{ppm}]= 8.18-8.15 (d, 2H, *f*); 7.54-7.52 (d, 2H, *e*), 4.80-4.77 (d, 1H, *c*), 4.53-4.52 (d, 1H, *c*), 4.29-4.25 (m, 1H, *b*), 2.33-1.85 (m, 7H, *a*), 1.72-1.65 (m, 2H, *a*), 1.54-1.46 (m, 1H, *a*).

376 MHz $^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3): [δ_{ppm}]= -153.63 (d, 2F, *g*), -159.19 (t, 1F, *i*), -163.42 (t, 2F, *h*).

Synthese von 4-(((cyclooct-2-en-1-yl)oxy)methyl)benzoesäureamid-(5-carboxy-*N*-tert-butyl-oxycarbonylpentylamid)) (Lys[*boc*]-Cyclooctin)

535 g (2,2 mmol) (H-L-Lys(*Boc*)-OH) wurden in 10 mL abs. DMF suspendiert und mit 0,76 mL (4,35 mmol) Diisopropylethylamin (Hünigs Base) versetzt. Anschließend wurden 0,89 g (2,1 mmol) 4-(((cyclooct-2-en-1-yl)oxy)methyl)pentafluorophenylbenzoat hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 20 h unter Argon und Lichtausschluss bei 40 °C gerührt. Das Lösemittel wurde im Hochvakuum entfernt und der Rückstand in 20 mL Essigester aufgenommen. Es wurde einmal mit 5 % wässriger Zitronensäure extrahiert, die organische Phase dreimal mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum eingengt. Das Produkt wurde zunächst über Flashchromatographie gereinigt (Laufmittelgradient: cHEX/EtOAc 3:1 → 3:5 → reines EtOAc jeweils mit 0,1 % AcOH, R_f (EtOAc+0,1 % AcOH)= 0,15). Anschließend wurde das Produkt noch durch präp. HPLC (reversed Phase) gereinigt (Laufmittelgradient MeCN/H₂O 60:40 → 100 % MeCN ohne TFA) und es wurden 407 mg (0,84 mmol, 38 % d. Th.) als farbloser Feststoff erhalten.



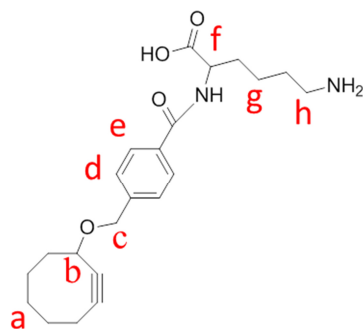
400 MHz $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): [δppm]= 7.80-7.71 (m, 2H, *e*); 7.36-7.31 (m, 2H, *d*), 4.89-4.82 (m, 1H, *c*), 4.70-4.67 (d, 1H, *c*), 4.42-4.39 (d, 1H, *b*), 4.22-4.17 (m, 1H, *f*), 3.16-3.03 (m, 2H, *h*), 2.32-1.79 (m, 9H, *a+g*), 1.70-1.62 (m, 2H, *a*), 1.55-1.39 (m, 14H, *a+i*).

ESI-MS: [m/z]= 509.26 ([M+Na], ber. 509.27 [M+Na]); 995.54 ([M+M+Na], ber. 995.54 [M+M+Na]).

IR ν [cm^{-1}]: 3329 (br), 2929 (m), 2856 (w), 2247 (w, Alkin), 1699 (s), 1645 (s).

Synthese von 4-(((cyclooct-2-en-1-yl)oxy)methyl)benzoesäureamid-(5-carboxy-pentyl-amin) (Lys-Cyclooctin, COD 1).

In einem typischen Reaktionsansatz wurden 7,5 mg (0,015 mmol) 4-(((cyclooct-2-en-1-yl)oxy)methyl)benzoesäureamid-(5-carboxy-1-*tert*-butyl-oxycarbonylpentylamid) (Lys-[*boc*]Cyclooctin) in 500 μL abs. Dichlormethan gelöst und mit 50 μL Triisopropylsilan versetzt. Anschließend wurden 500 μL TFA zugegeben und die gelbe Lösung 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde kurz im Hochvakuum eingeeengt und sofort 1 mL einer 25 % Ammoniak-Lsg. zugeben. Das Gemisch wurde direkt über präp. HPLC (reversed phase) (Laufmittelgradient: MeCN/ H_2O 95:5 \rightarrow 100 % MeCN ohne TFA) gereinigt und es wurden 2,5 mg (0,006 mmol, 43 % d. Th.) des Produktes als farbloser Feststoff erhalten.



400 MHz $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): [δppm]= 7.76-7.74 (d, 2H, *e*), 7.38-7.36 (d, 2H, *d*), 4.62-4.59 (d, 1H, *c*), 4.52-4.49 (d, 1H, *c*), 4.40-4.37 (t, 1H, *f*), 3.36-3.61 (m, 1H, *b*), 2.84-2.81 (t, 2H, *h*), 2.38-1.39 (m, 16H, *a+g*).

ESI-MS: [m/z]= 405.24 ($[\text{M}+\text{H}_2\text{O} +\text{H}]$, ber. 405.22 $[\text{M}+\text{H}_2\text{O} +\text{H}]$); 427.23 ($[\text{M}+\text{MeCN}]$, ber. 427.25 $[\text{M}+\text{MeCN}]$), 443.21 ($[\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{MeCN}]$, ber. 445.25 $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{MeCN}]$); 809.51 ($[\text{M}+\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{H}_2\text{O}]$, ber. 808.44 $[\text{M}+\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{H}_2\text{O}]$), 831.50 ($[\text{M}+\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{MeCN}]$, ber. 831.47 $[\text{M}+\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{MeCN}]$).

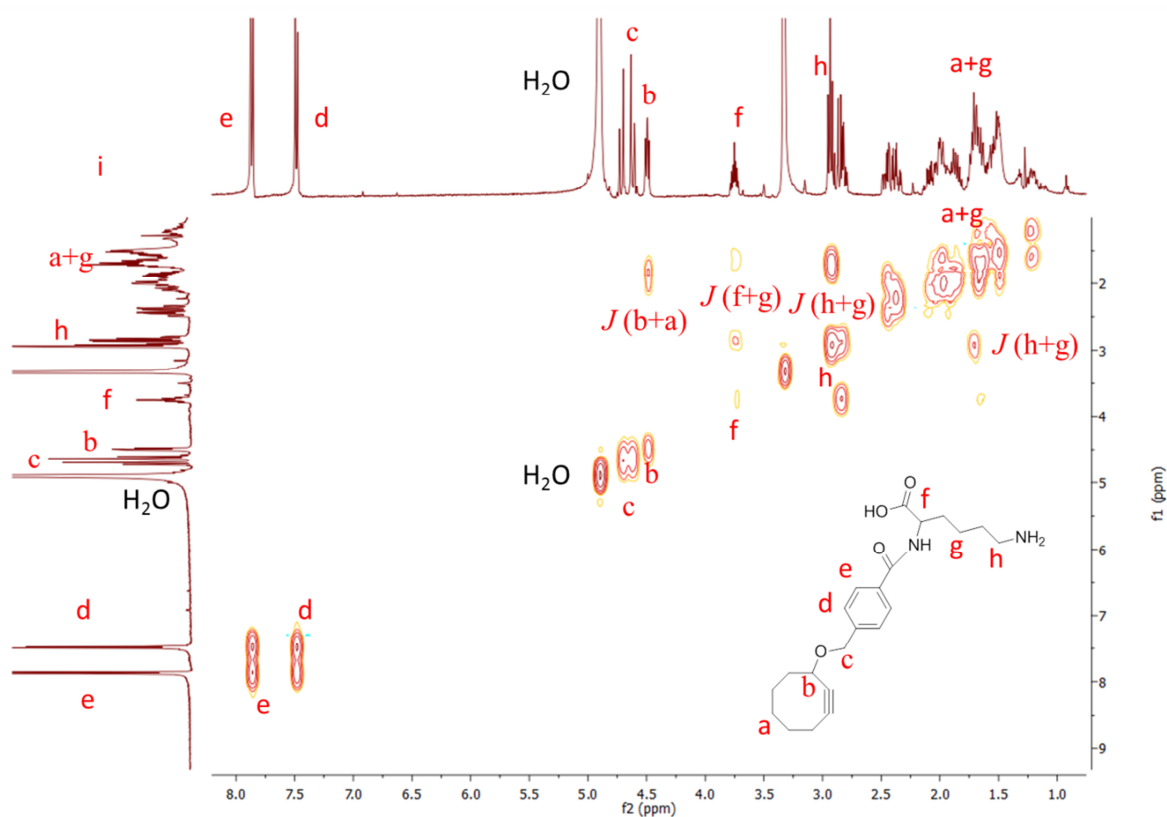
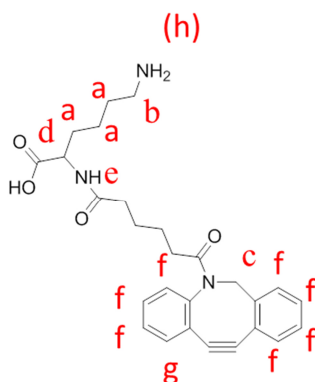


Abbildung 6.5: 400 MHz $^1\text{H-}^1\text{H-cosy-NMR}$ (D_2O) von 4-(((cyclooct-2-in-1-yl)oxy)methyl)benzoesäureamid-(5-carboxy-pentylamin) (Lys-Cyclooctin, COD 1)

Synthese des Lysin-Dibenzocyclooctinderivates (COD 2)

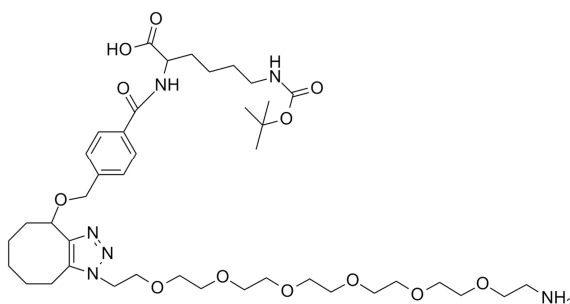
Das Cyclooctinderivat 2 (COD 2) wurde über den gleichen Syntheseweg (der Syntheseweg ist den letzten drei Synthesestufen des COD 1 Derivates identisch) ausgehend von kommerziell erhältlicher Dibenzocyclooctin-Säure von [REDACTED] im Rahmen ihrer Diplomarbeit synthetisiert.^[173]



400 MHz $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): [δppm]=8.15 (s, 1H, (h)), 7.64-7.63 (d, 1H, g), 7.48-7.29 (m, 7H, f), 7.06 (s, 1H, e), 5.06-5.03 (d, 1H, c), 4.32-4.23 (m, 1H, d), 3.77-3.74 (d, 1H, c), 2.94 (m, 2H, b), 2.40-1.17 (14H, b).

ESI-MS: [m/z]= 462.24 ([M+H], ber. 462.23 [M+H]).

Testung der kupferfreien Azid-Alkin Kopplung (SPAAC, „Klick-Reaktion“)



10 mg (0,02 mmol) des Cyclooctinderivates mit *Boc*-blockierter ϵ -Aminogruppe (Lysin-*Boc*-Cyclooctin 1) wurden in 2 mL absolutem THF gelöst und mit 7,2 mg (0,02 mmol) *O*'-(2-Aminoethyl)-*O*'-(2-azidoethyl)-pentaethylglycol (NH_2 -(PEG) $_6$ - N_3) versetzt und für 2 Wochen bei 37 °C gerührt. Anschließend wurden Aliquote für eine ESI-Masse entnommen.

6.2.2 Synthese der Polymere

Synthese von Poly-pentapfluorophenyl methacrylat (Poly-PFMA)^[58]

RAFT-Polymerisation von PFMA wurde in einem Schlenkkolben durchgeführt. In einer typischen Reaktionsvorschrift wurde das Reaktionsgefäß mit 9,3 mg (0,033 mmol) des Kettentransferreagenzes 4-Cyano-4-((thiobenzoylsulfanyl)pentansäure (Säure-CTA), 0,55 mg (0,0033 mmol) des Initiators azobis(isobutyronitril) (AIBN) (Molverhältnis CTA/AIBN 10:1) und 2 g (7,9 mmol) des Monomers Pentafluorophenyl methacrylat (PFMA) in 4 mL abs. Dioxan beladen. Das Reaktionsgemisch wurde viermal sekuriert und anschließend bei 70 °C über Nacht polymerisiert. Am nächsten Tag wurde das Polymer in n-hexan gefällt und noch zweimal aus THF in n-Hexan umgefällt, zentrifugiert und bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet. Es wurden 950 mg eines rosa Pulvers erhalten. Die Dithioester-Endgruppe wurde direkt mit einem Überschuss 4,4-azobis(4-cyanovaleriansäure) (ACVA) entfernt. Dazu wurde das Polymer 950 mg (0,017 mmol Endgruppen) wieder in 4 mL abs. Dioxan aufgenommen, mit 118 mg (0,4 mmol, 25 eq.) ACVA versetzt und 4 h bei 85° C gerührt. Das Polymer wurde in nHex/Et₂O 2:1 gefällt und anschließend noch zweimal aus THF in nHex/EtOEt 2:1 umgefällt, zentrifugiert und bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet. Es wurden 874 mg eines farblosen Pulvers erhalten.

300MHz ¹H-NMR (CDCl₃): [δ ppm]= 2.75-2.00 (br. s 2H), 1.53-1.36 (m, 3H).

376 MHz ¹⁹F-NMR (CDCl₃): [δ ppm]= -150-(-152) (m, 2F), -157 (br s, 1F), -162 (br s, 2F).

IR ν [cm⁻¹]: 3050 (br), 1778 (s).

Es wurden drei verschiedene Molekulargewichte synthetisiert.

Tabelle 6.1: Unterschiedliche Molekulargewichte von Poly(PFMA).

	Mol-Verhältnis AIBN/CTA/Monomer	Mn/Mw GPC (THF)	\bar{D} GPC (THF)	Mn(soll)
Poly(PFMA) A	1/10/2394	29.700/ 38.300	1,29	30.000
Poly(PFMA) B	1/10/1574	21.300/ 25.200	1,19	20.000
Poly(PFMA) C	1/10/1574	26.800/ 35.700	1,33	20.000

Synthese von statistisch-Maleinimid modifiziertem Poly[*N*-(2-hydroxypropyl)-methacrylamid] (Stat.-HPMA)

Die Synthese der HPMA-Copolymere wurde an eine Literaturvorschrift angelehnt.^[59] In einer typischen Reaktionsvorschrift wurden 100 mg (0,4 mmol) des Reaktivester Polymers (Mn: 29.700) in 1,5 mL abs. DMSO/ Dioxan 1:2 gelöst und mit 142 μ L (1,04 mmol) Triethylamin versetzt, 2 mg (0,008 mmol) Oregon Green cadaverine, aus einer Stammlösung in abs. DMSO (5 mg /mL), wurden hinzugegeben und 4 h bei 50 °C gerührt. Anschließend wurden 10 mg (0,04 mmol) *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)amino-ethoxyethoxy-ethylamin sowie 60 mg (0,8 mmol) 2-Hydroxypropylamin hinzugegeben und 3 Tage bei 35 °C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde das Polymer in Diethylether gefällt, zentrifugiert, in wenig DMSO aufgenommen und gegen Reinstwasser dialysiert (MWCO 3.500) und gefriergetrocknet. Das Polymer wurde daraufhin 3 Tage in einer 10 % TFA/H₂O Mischung gerührt und nach Codestillation mit Toluol und Dichlormethan wurde das deblockierte Polymer erneut dialysiert (MWCO 3.500) und gefriergetrocknet. Schließlich wurde das Polymer in 1 mL abs. DMSO gelöst und 19 mg (0,047 mmol) 1-pentafluorophenyl-4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexan carboxinsäure, gelöst in 2 mL abs. Dioxan, sowie 60 μ L (0,36 mmol) Diisopropylethylamin hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, in Ether gefällt, gegen Reinstwasser dialysiert (MWCO 3500) und gefriergetrocknet. Es wurden 52 mg eines orangenen Feststoffes erhalten.

400MHz ¹H-NMR (dms_o-d₆): [δ ppm]= 7.36 (br. s 1H, *e*), 7.01 (s, 0,1 H, *f*), 4.71, (br. s, 1H, *a*), 3.67 (br. s, 1H, *c*), 2.90 (br. s, 2H, *d*), 2.33-0.67 (m, 8H, *b*).

IR ν [cm⁻¹]: 3600-3200 (br), 2970-2930 (s), 1707 (w), 1638 (s).

Es wurde zwei verschiedene Stat.-HPMA Polymere synthetisiert:

Tabelle 6.2: Unterschiedliche Molekulargewichte von Stat.-HPMA Polymeren.

	Mn/Mw (berechnet aus vorläufer Polymer)	\bar{D} GPC (HFIP)	Maleinimid/ Polymer (NMR)
Stat.-HPMA A	20.200/ 26.500	1,31	10
Stat.-HPMA C	16.600/ 22.600	1,36	7

Es wurde gleichzeitig immer ein identisches Polymer ohne Farbstoff synthetisiert.

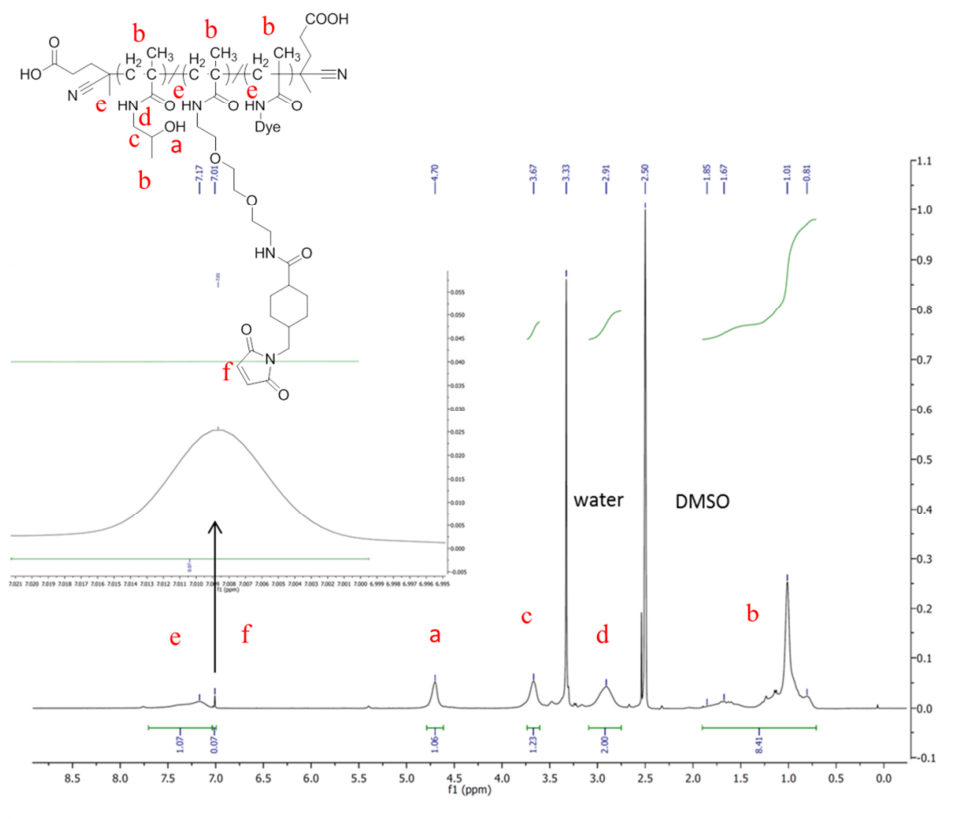


Abbildung 6.6: 400 MHz-¹H-NMR-Spektrum von Stat.-HPMA Polymer C

Synthese von Polypentapfluorophenyl methacrylat mit selektiv modifizierbarer Endgruppe (*Boc*-PEG-poly[PFMA])

Poly-(pentapfluorophenyl methacrylat) mit selektiv modifizierbarer Endgruppe wurde über RAFT-Polymerisation mit einem modifizierten Kettentransfer Reagenz synthetisiert. In einem Schlenkkolben wurden 50,92 mg (0,1 mmol) des modifizierten Kettentransfereagenzes 4-cyano-4-((thiobenzoyl)sulfanyl)pentansäure (*N*-(*tert*-butyl-oxy-carbonyl)aminoethoxyethoxyethyl)-amid (PEG- CTA), 1,65 g (0,01 mmol) des Initiators azobis(isobutyronitril) (AIBN) (Molverhältnis:CTA/AIBN 10:1) und 2 g (7,9 mmol) des Monomers PFMA in 4 ml abs. Dioxan gelöst. Es wurde viermal sekuriert und anschließend über Nacht bei 70 °C polymerisiert. Am nächsten Tag wurde das Polymer in n-Hexan gefällt und noch zweimal aus THF in n-Hexan gefällt und bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet. Es wurden 1,15 g eines rosa farbenen Pulvers erhalten. Die Dithioester-Endgruppe wurde direkt mit einem Überschuss 4,4-azobis(4-cyano- valeriansäure) (ACVA) entfernt. Dazu wurde das Polymer 1,15 g (0,06 mmol Endgruppen) wieder in 4

mL abs. Dioxan aufgenommen, mit 419 mg (1,5 mmol, 25 eq.) ACVA versetzt und 4 h bei 85 °C gerührt. Das Polymer wurde in nHex/Et₂O 2:1 gefällt und anschließend noch zweimal aus THF in nHex/Et₂O 2:1 umgefällt, zentrifugiert und bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet. Es wurden 1,06 g eines farblosen Pulvers erhalten.

300MHz ¹H-NMR (CDCl₃): [δ ppm]= 2.75-2.00 (br. s 2H), 1.53-1.36 (m, 3H).

376 MHz ¹⁹F-NMR (CDCl₃): [δ ppm]= -150-(-152) (m, 2F), -157 (br s, 1F), -162 (br s, 2F)

IR v [cm⁻¹]: 3050 (br), 1778 (s).

Es wurden drei verschiedene Molekulargewichte synthetisiert

Tabelle 6.3: Unterschiedliche Molekulargewichte von Poly(PFMA) mit selektiv modifizierbarer Endgruppe

	Mol-Verhältnis AIBN/CTA/Monomer	Mn/Mw GPC (THF)	\bar{D} GPC (THF)	Mn(soll)
Boc-PEG-poly[PFMA] A	1/10/2370	34.500/42.000	1,29	30.000
Boc-PEG-poly[PFMA] B	1/10/1580	27.900/34.400	1,24	20.000
Boc-PEG-poly[PFMA] C	1/10/790	19.200/22.800	1,19	10.000

Synthese von semitelechel-maleinimid modifiziertem Poly[N-(2-Hydroxypropyl)-methacrylamid] (End-HPMA)

In einer typischen Reaktionsvorschrift wurden 300 mg (1,19 mmol) des Reaktivester Polymers (Mn: 19.200) in 3 mL abs. DMSO/ Dioxan 1:2 gelöst und mit 426 μ L (3,12 mmol) Triethylamin versetzt, 1,9 mg (0,0038 mmol) Oregon Green Cadaverine, aus einer Stammlösung in abs. DMSO (5 mg /mL), wurden hinzugegeben und 4 h bei 50 °C gerührt. Anschließend wurden 200 mg (2,7 mmol) 2-Hydroxypropylamin hinzugegeben und 3 Tage bei 35 °C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde das Polymer in Diethylether gefällt, zentrifugiert, in wenig DMSO aufgenommen und gegen Reinstwasser dialysiert (MWCO 3.500) und gefriergetrocknet. Das Polymer wurde daraufhin 3 Tage in einer 1,5 M HCl/ Dioxan/ Methanol Mischung gerührt und nach Codestillation mit Toluol

Experimenteller Teil

und Dichlormethan wurde das deblockierte Polymer erneut dialysiert (MWCO 3.500) und gefriergetrocknet. Schließlich wurde das Polymer in 1,5 mL abs. DMSO gelöst und 15 mg (0,036 mmol) 1-pentafluorophenyl-4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexan carbon-säure, gelöst in 3 mL abs. Dioxan, sowie 9 μ L (0,048 mmol) Diisopropylethylamin wurden hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt, in Ether gefällt, gegen Reinstwasser dialysiert (MWCO 3500) und gefriergetrocknet. Es wurden 120 mg eines orangenen Feststoffes erhalten.

400MHz 1 H-NMR (dms o - d_6): [δ ppm]= 7.67-7.17 (br. s 1H, *e*), 7.01 (s, 0,02 H, *f*), 4.70, (br. s, 1H, *a*), 3.67 (br. s, 1H, *c*), 2.91 (br. s, 2H, *d*), 2.25-0.67 (m, 8H, *b*).

IR ν [cm^{-1}]: 3353 (br), 2950 (s), 1718 (w), 1635 (s).

GPC (HFIP): Mn: 33.500, $D=$ 1,25

Es wurde gleichzeitig immer ein identisches Polymer ohne Farbstoff synthetisiert.

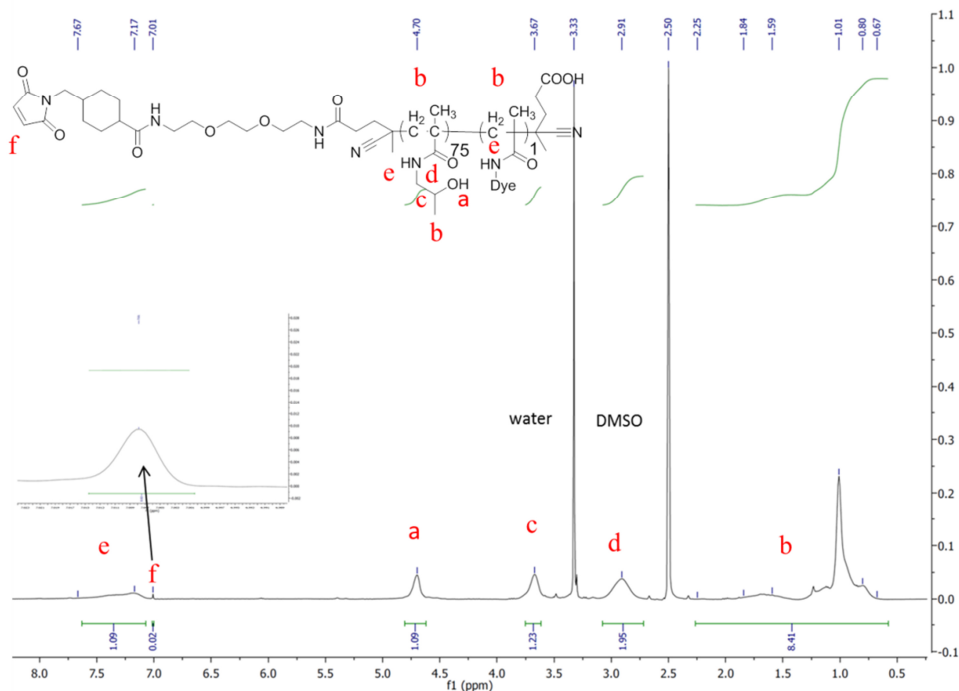


Abbildung 6.7: 400 MHz- 1 H-NMR-Spektrum von Stat.-HPMA Polymer C.

Synthese von Poly[Lysin]₁₀-block-poly[N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid] (poly-[Lys]₁₀-*b*-poly(HPMA) T1)

In einem Schlenkkolben wurden 92,8 mg (72,4 mg, 0,028 mmol mit CTA Endgruppe) poly[Lys(*Boc*)]₁₀-CTA in 600 µL TFE gelöst und noch 5 ml abs. Dioxan hinzugegeben. Anschließend wurden 830 mg (3,3 mmol) des Monomers PFMA zugefügt und zweimal sekuriert. 0,78 mg (0,0047 mmol) des Initiators azobis(isobutyronitril (AIBN) wurden über eine Stammlösung (5 mg AIBN in 1 mL abs. Dioxan) hinzugegeben (Molverhältnis AIBN/CTA/Monomer 1/6/702) und noch zweimal sekuriert. Es wurde 2 Tage bei 60 °C polymerisiert. Das Polymer wurde in n-Hexan gefällt und noch zweimal aus TFE/Dioxan in n-Hexan umgefällt. Es wurden 522 mg eines rosa-farbenen Pulvers erhalten. Die Dithioester-Endgruppe wurde direkt mit einem Überschuss 4,4-azobis(4-cyanovaleriansäure) (ACVA) entfernt. Dazu wurden 261 mg des Polymers (0,009 mmol) wieder in 4 mL abs. Dioxan mit 600 µL TFE aufgenommen, mit 65 mg (0,23 mmol, 25 eq.) ACVA versetzt und 4 h bei 85 °C gerührt. Das Polymer wurde in nHex/Et₂O 2:1 gefällt und anschließend noch zweimal aus Dioxan/ TFE in nHex/Et₂O 2:1 umgefällt, zentrifugiert und bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet. Es wurden 260 mg eines farblosen Pulvers erhalten. Davon wurden 65 mg (0,26 mmol) in einer Mischung aus 1,5 mL abs. Dioxan und 0,5 mL abs. DMSO gelöst, 1,3 mg (0,0026 mmol) Oregon Green Cadaverine und 93 µL (0,68 mmol) NEt₃ hinzugegeben und 4 h bei 50 °C gerührt. Anschließend wurden noch 40 mg (0,52 mmol) 2-Hydroxypropylamin zugegeben und 3 Tage bei 35 °C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde das Polymer in kaltem Diethylether gefällt, zentrifugiert, in wenig DMSO aufgenommen, gegen Reinstwasser dialysiert (MWCO 14.000) und gefriergetrocknet. Es wurden 34 mg eines orangenen Feststoffes erhalten.

GPC (HFIP): Mn= 33.600, *D*= 1,44

Zur Deblockierung des Polylysins wurde das Polymer 18 h in 2,5 Methanol gelöst und mit einer 1 mL einer 4 M HCl/Dioxan Mischung gerührt. Nach Codestillation mit Toluol und Dichlormethan wurde nochmals dialysiert (MWCO 14.000) und gefriergetrocknet. Es wurden 28 mg des Blockcopolymers erhalten.

Experimenteller Teil

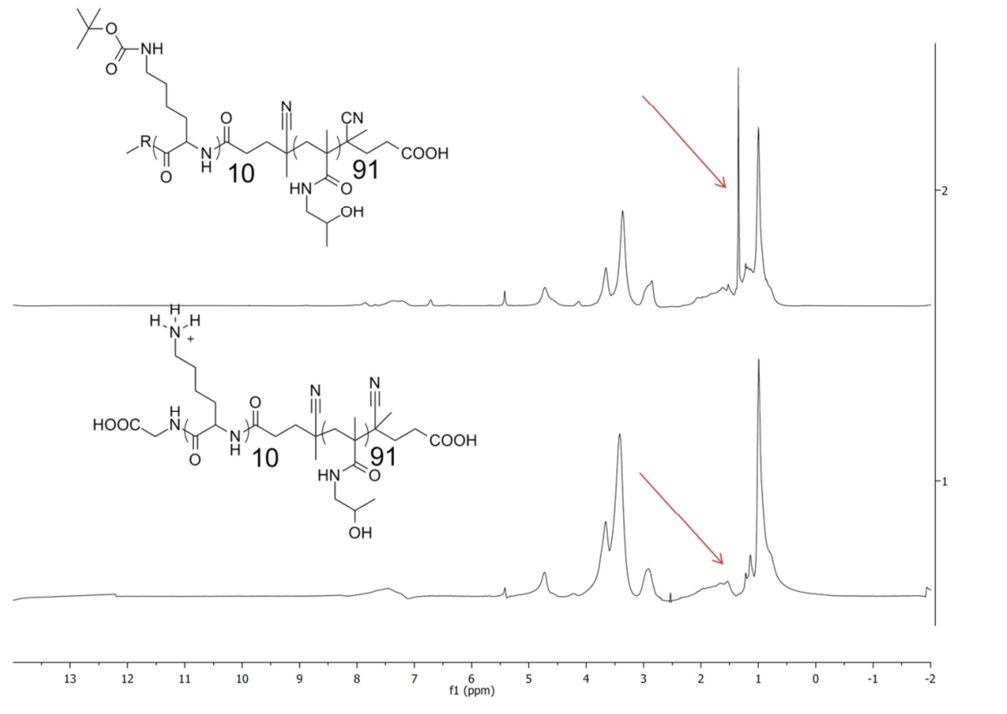


Abbildung 6.8: Kontrolle der Deblockierung des Polylysins. (oben: mit Boc-Gruppe; unten: ohne Boc-Gruppe.)

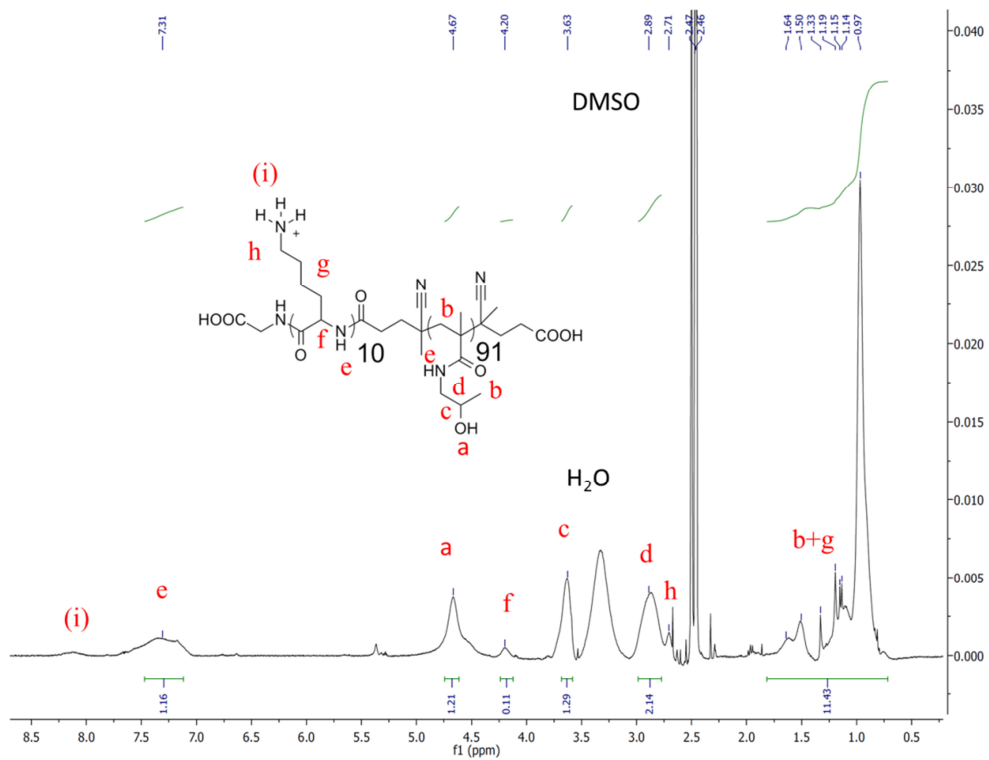


Abbildung 6.9: $400\text{ MHz } ^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von poly[lys]₁₀-b-poly[HPMA] (T1)

400MHz $^1\text{H-NMR}$ ($\text{dms}\text{-}d_6$): [δ/ppm] = 7.31 (br. s 1H, *e*), 4.67 (br. s, 1H, *a*), 4.20, (br. s, 0.11H*, *f*), 3.63 (br. s, 1H, *c*), 2.89 (br. s, 2H*, *d*), 1.64-0.97 (m, 11H, *b+g*).

GPC (HFIP): M_n = 32.600, D = 1,39.

M_n (NMR): 14.000. (Blocklängen-Verhältnis X_n (p[HPMA]) zu X_n (p[Lys]): 90:10 (9:1))

*Anmerkung: Durch das Verhältnis der α -Protonen des Peptid Blocks (4.20 ppm, *f*) mit den Protonen der HPMA-Wiederholungseinheit (2.89 ppm, *d*) kann man die Länge des HPMA Blocks bestimmen, da die Lysin-Blocklänge bekannt ist, und somit auch das Molekulargewicht bestimmt werden.

Es wurde gleichzeitig immer ein identisches Polymer ohne Farbstoff synthetisiert.

Synthese von Poly[Lysin]₂₀-block-poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamid] (poly-[Lys]₂₀-*b*-poly(HPMA) T3).

In einem Schlenkkolben wurden 71,2 mg (35,6 mg, 0,007 mmol mit CTA Endgruppe) poly[Lys(Boc)]₂₀-CTA in 300 μL TFE gelöst und noch 2,5 ml abs. Dioxan hinzugegeben. Anschließend wurden 436 mg (1,7 mmol) des Monomers PFMA zugefügt und zweimal sekuriert. 0,19 mg (0,0012 mmol) des Initiators azobis(isobutyronitril (AIBN) wurden über eine Stammlösung (5 mg AIBN in 1 mL abs. Dioxan) hinzugegeben (Molverhältnis AIBN/CTA/Monomer 1/6/1417) und noch zweimal sekuriert. Es wurde 2 Tage bei 60 °C polymerisiert. Das Polymer wurde in n-Hexan gefällt und noch zweimal aus TFE/Dioxan in n-Hexan umgefällt. Es wurden 181 mg eines rosa-farbenen Pulvers erhalten. Die Dithioester-Endgruppe wurde direkt mit einem Überschuss 4,4-azobis(4-cyanovaleriansäure) (ACVA) entfernt. Dazu wurden 181 mg des Polymers (0,006 mmol) wieder in 4 mL abs. Dioxan mit 600 μL TFE aufgenommen, mit 43,7 mg (0,16 mmol, 25 eq.) ACVA versetzt und 4 h bei 85 °C gerührt. Das Polymer wurde in nHex/Et₂O 2:1 gefällt und anschließend noch zweimal aus Dioxan/ TFE in nHex/Et₂O 2:1 umgefällt, zentrifugiert und bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet. Es wurden 166 mg eines farblosen Pulvers erhalten. Davon wurden 55 mg (0,22 mmol) in einer Mischung aus 1,5 mL abs. Dioxan und 0,5 mL abs. DMSO gelöst, 1,1 mg (0,0022 mmol) Oregon Green Cadaverine und 78 μL (0,57 mmol) NEt₃ hinzugegeben und 4 h bei 50 °C gerührt. Anschließend wurden noch 34 mg 2-Hydroxypropylamin (0,44 mmol) zugegeben und 3 Tage bei 35 °C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde das Polymer in kaltem Diethylether gefällt,

Experimenteller Teil

zentrifugiert, in wenig DMSO aufgenommen, gegen Reinstwasser dialysiert (MWCO 14.000) und gefriergetrocknet. Es wurden 28 mg eines orangenen Feststoffes erhalten.

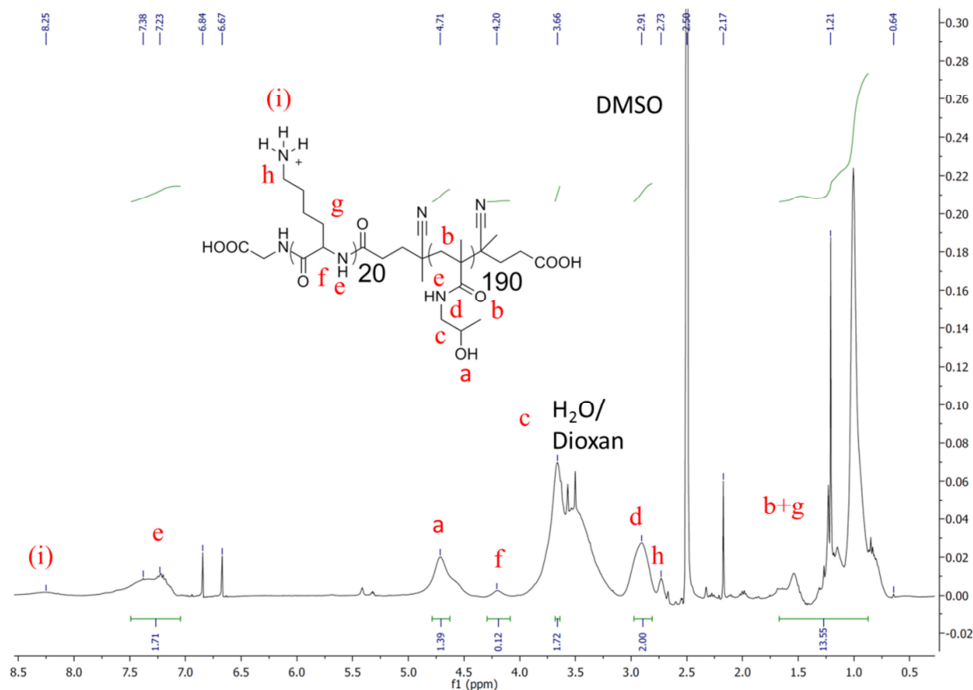


Abbildung 6.10: 400 MHz- $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von poly[Lys]₂₀-b-poly[HPMA] (T3)

GPC (HFIP): $M_n = 58.900$, $D = 1,54$.

Zur Deblockierung des Lysin-Blocks wurde das Polymer 36 h in einer 1,5 M HCl/ 1 mL Dioxan /2,5 mL Methanol Mischung gerührt. Nach Codestillation mit Toluol und Dichlormethan wurde nochmals dialysiert (MWCO 14.000) und gefriergetrocknet. Es wurden 25,2 mg des Blockcopolymeres erhalten.

GPC (HFIP): $M_n = 74.000$, $D = 1,33$.

400MHz $^1\text{H-NMR}$ (*dms*₆): [δ ppm]= 7.31 (br. s 1H, e), 4.67 (br. s, 1H, a), 4.20, (br. s, 0.12H*, f), 3.66 (br. s, 1H, c), 2.91 (br. s, 2H*, d), 1.69-0.90 (m, 14H, b+g).

M_n (NMR): 26.700. (Blocklängen-Verhältnis X_n (p[HPMA]) zu X_n (p[Lys]): 190:20 (8:1))

*Anmerkung: Durch das Verhältnis der α -Protonen des Peptid Blocks (4.20 ppm, f) mit den Protonen der HPMA-Wiederholungseinheit (2.91 ppm, d) kann man die Länge des HPMA Blocks bestimmen, da die Lysin-Blocklänge bekannt ist, und somit auch das Molekulargewicht bestimmt werden.

Es wurde gleichzeitig immer ein identisches Polymer ohne Farbstoff synthetisiert.

Synthese von Poly[Lysin]₃₀-block-poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamid] (poly-[Lys]₃₀-b-poly(HPMA) T4)

In einer typischen Reaktionsvorschrift wurden 52 mg (43 mg, 0,0052 mmol mit CTA Endgruppe) poly[Lys(Z)]₃₀-CTA in einem Schlenkkolben in 600 µL TFE gelöst und noch 5 ml abs. Dioxan hinzugegeben. Anschließend wurden 444 mg (1,8 mmol) des Monomers PFMA zugefügt und zweimal sekuriert. 0,14 mg (0,0009 mmol) des Initiators azobis(isobutyronitril (AIBN) wurden über eine Stammlösung (5 mg AIBN in 1 mL abs. Dioxan) hinzugegeben (Molverhältnis AIBN/CTA/Monomer 1/6/2076) und noch zweimal sekuriert. Es wurde 2 Tage bei 60 °C polymerisiert. Das Polymer wurde in n-Hexan gefällt und noch zweimal aus TFE/Dioxan in n-Hexan umgefällt. Es wurden 250 mg eines rosa-farbenen Pulvers erhalten. Die Dithioester-Endgruppe wurde direkt mit einem Überschuss 4,4-azobis(4-cyanovaleriansäure) (ACVA) entfernt. Dazu wurden 250 mg des Polymers (0,007 mmol) wieder in 4 mL abs. Dioxan mit 600 µL TFE aufgenommen, mit 51,4 mg (0,18 mmol, 25 eq.) ACVA versetzt und 4 h bei 85 °C gerührt. Das Polymer wurde in nHex/Et₂O 2:1 gefällt und anschließend noch zweimal aus Dioxan/ TFE in nHex/Et₂O 2:1 umgefällt, zentrifugiert und bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet. Es wurden 245 mg eines farblosen Pulvers erhalten.

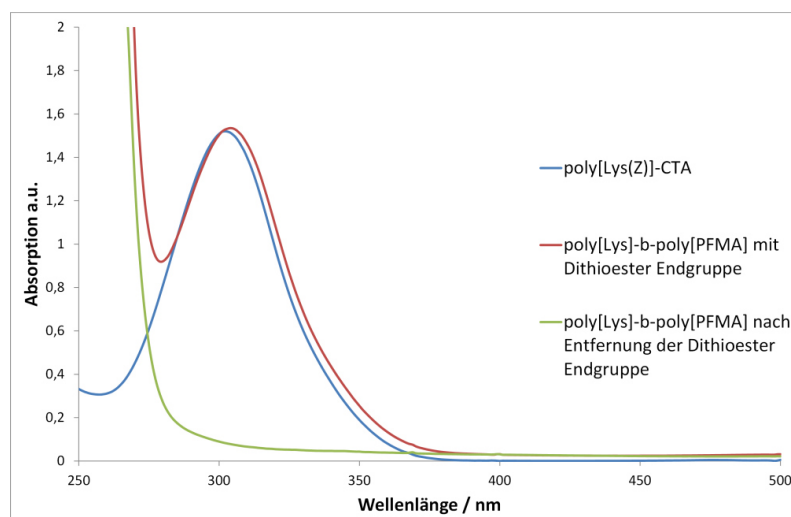


Abbildung 6.11: Kontrolle der Entfernung der Dithioesterendgruppe von p[Lys]-b-p[HPMA] über UV-Absorption bei 302 nm am Beispiel von poly[Lys(Z)]₃₀-b-poly[HPMA] A (T4)

Davon wurden 122 mg (0,48 mmol) in einer Mischung aus 3 mL abs. Dioxan und 1 mL abs. DMSO gelöst, 2,4 mg (0,0048 mmol) Oregon Green cadaverine und 143 μ L (1,05 mmol) NEt_3 hinzugegeben und 4 Stunden bei 50 °C gerührt. Anschließend wurden noch 72 mg (0,96 mmol) 2-Hydroxypropylamin zugegeben und 3 Tage bei 35 °C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde das Polymer in kaltem Diethylether gefällt, zentrifugiert, in wenig DMSO aufgenommen, gegen Reinstwasser dialysiert (MWCO 14.000/25.000) und gefriergetrocknet. Es wurden 55 mg eines orangenen Feststoffes erhalten.

Es wurden noch zwei weitere Molekulargewichte synthetisiert.

Tabelle 6.4: Unterschiedliche Ansätze für $\text{poly}[\text{Lys}(\text{Z})]_{30}\text{-}b\text{-poly}(\text{HPMA})$

	Mol- Verhältnis AIBN/CTA/ Monomer	Mn/Mw poly(Lys(Z))-b- poly(HPMA) GPC (HFIP)	\bar{D} poly(Lys(Z))- b-p(HPMA) GPC(HFIP)
poly[Lys(Z)]₃₀-b- poly[HPMA] A	1/6/2076	38.500/ 56.600	1,47
poly[Lys(Z)]₃₀-b- poly[HPMA]B	1/6/708	26.180/34.400	1,4
poly[Lys(Z)]₃₀-b- poly[HPMA] C	1/6/2638	55.100/74.400	1,35

Zur Deblockierung des Lysin-Blocks wurde das Polymer in 1,5 mL Eisessig gelöst und 100 μ L einer 33 w % HBr in Eisessig hinzugegeben. Nach 1,5 h wurden noch 1,5 mL Wasser hinzugeben und für weitere 1,5 gerührt. Nach Codestillation mit Toluol und Dichlormethan wurden gegen Reinstwasser dialysiert (MWCO 14.000/ 25.000). Es wurden 35 mg des Blockcopolymer als orangener Feststoff erhalten.

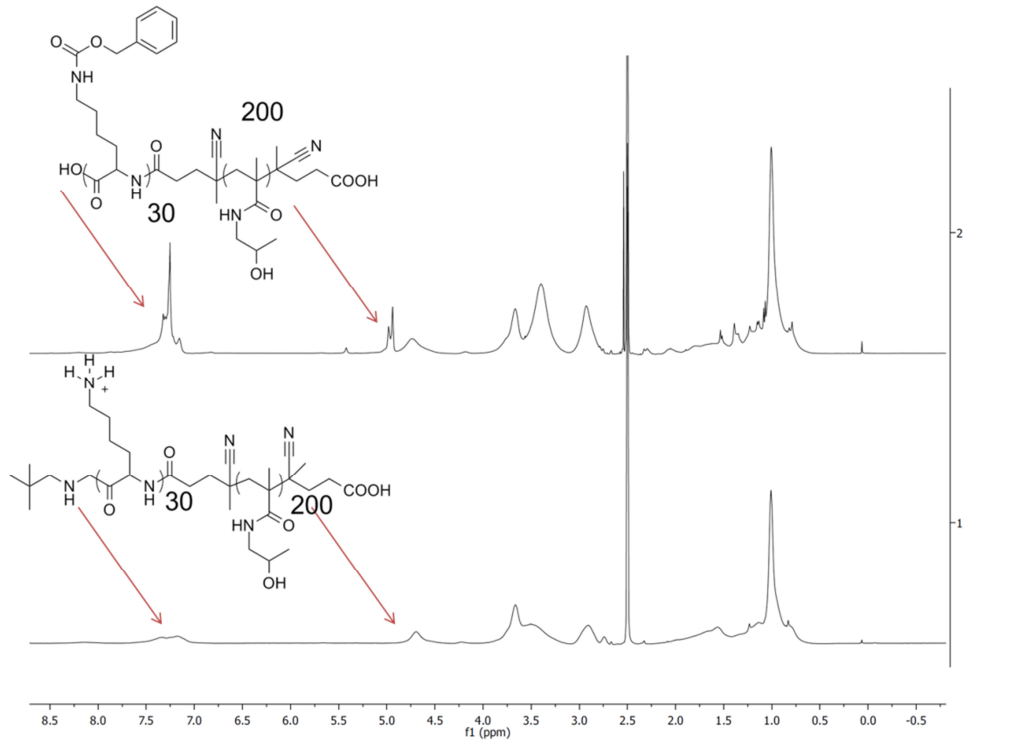


Abbildung 6.12: Kontrolle der Deblockierung des Polylysins-Blocks. (oben: mit Z-Gruppe; unten: ohne Z-Gruppe.)

Tabelle 6.5 Charakterisierung der unterschiedlichen Blocklängen von poly[Lys]₃₀-b-poly[HPMA] nach der Entschützung mit HBr

	Mn/Mw poly(Lys)-b- poly(HPMA) GPC (HFIP)	\bar{D} poly(Lys)-b- poly(HPMA) GPC(HFIP)	Mn(NMR)	Blocklängen- Verhältnis X _n (p[HPMA]) zu X _n (p[Lys])
poly[Lys]₃₀-b- poly(HPMA)A T4	51.400/ 75.000	1,46	30.500	200:30 (6:1)
poly([Lys]₃₀-b- poly(HPMA)B	19.200/ 30.144	1,57	12.500	61:30 (2:1)
Poly[Lys]₃₀-b- poly(HPMA)C	71.500/94.400	1,32	57.100	390:30 (13:1)

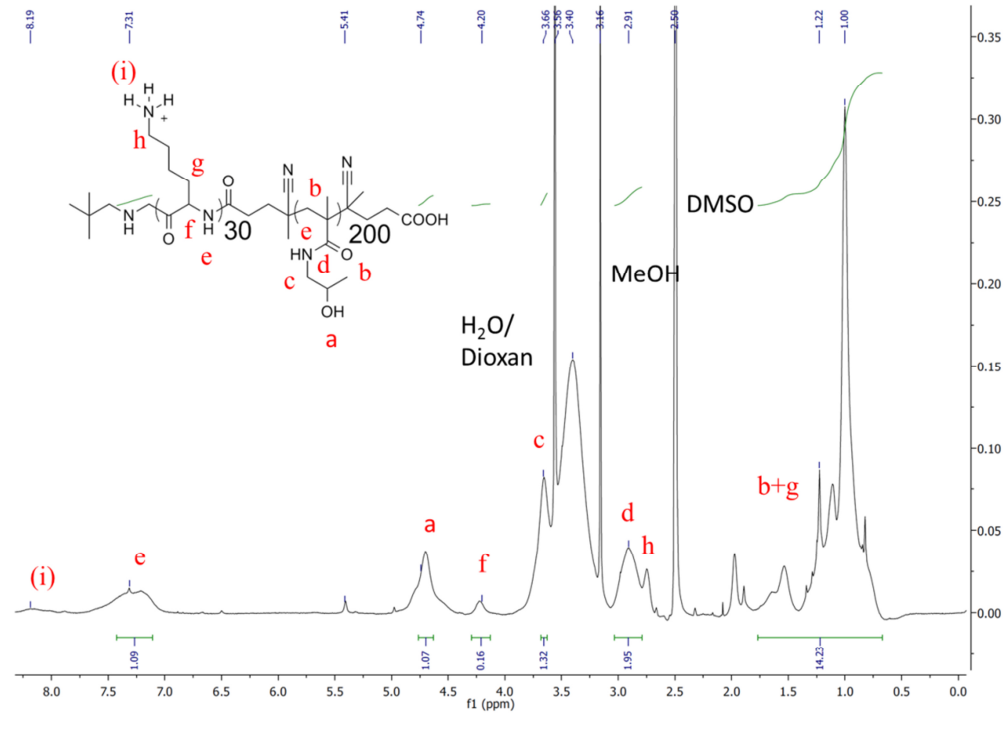


Abbildung 6.13: 400 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von poly[Lys] $_{30}$ -b-poly[HPMA] (T4)

400MHz ^1H -NMR ($\text{dms}\text{-}d_6$): [δ/ppm]= 7.31 (br. s 1H, *e*), 4.74 (br. s, 1H, *a*), 4.20, (br. s, 0.16H*, *f*), 3.66 (br. s, 1H, *c*), 2.91 (br. s, 2H*, *d*), 1.68-0.86 (m, 14H, *b+g*).

*Anmerkung: Durch das Verhältnis der α -Protonen des Peptid Blocks (4.20 ppm, *f*) mit den Protonen der HPMA-Wiederholungseinheit (2.91 ppm, *d*) kann man die Länge des HPMA Blocks bestimmen, da die Lysin-Blocklänge bekannt ist, und somit auch das Molekulargewicht bestimmt werden.

Es wurde gleichzeitig immer ein identisches Polymer ohne Farbstoff synthetisiert.

Synthese von Poly[Lysin] $_{30}$ -block-poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamid] mit zum Teil Histidin modifiziertem Block (poly[Lys] $_{20}$ -co-poly[Lys(His)] $_{10}$ -b-poly[HPMA] T5)

5,4 mg (124 μmol , 1 eq.) von *Boc*-His(*Boc*)-OH wurden in 500 μL abs. NMP vorgelegt und mit 7,1 mg (372 μmol , 3 eq.) EDC sowie 8,4 μL (496 μmol , 4 eq.) Hünigsbase (DIPEA) versetzt. Es wurde 30 min bei RT gerührt und anschließend 5 mg (372 μmol , 3 eq.) HOBt zugegeben und weitere 30 min gerührt. Danach wurden 22,6 mg (ca. 207 μmol Lysineinheiten, 1,6 eq.) des Polymers T4 ([Lys(Z)] $_{30}$ -b-p[HPMA] A), gelöst in

500 μL abs. hinzugegeben. Die resultierende Lösung wurde über Nacht gerührt und am nächsten Tag in Diethylether gefällt, gegen Reinstwasser dialysiert (MWCO 14.000) und gefrier-getrocknet. Zur Enschützung der *Boc*-Schutzgruppen der Histidin Einheiten wurde das Polymer in 2,5 mL Methanol gelöst und mit 1 mL 4M HCl/Dioxan Lösung versetzt und 24 Stunden gerührt. Es wurde mit Toluol und DCM codestiliert, gegen Reinstwasser dialysiert, gefriergetrocknet und 11,3 mg des Produktes als orangener Feststoff erhalten.

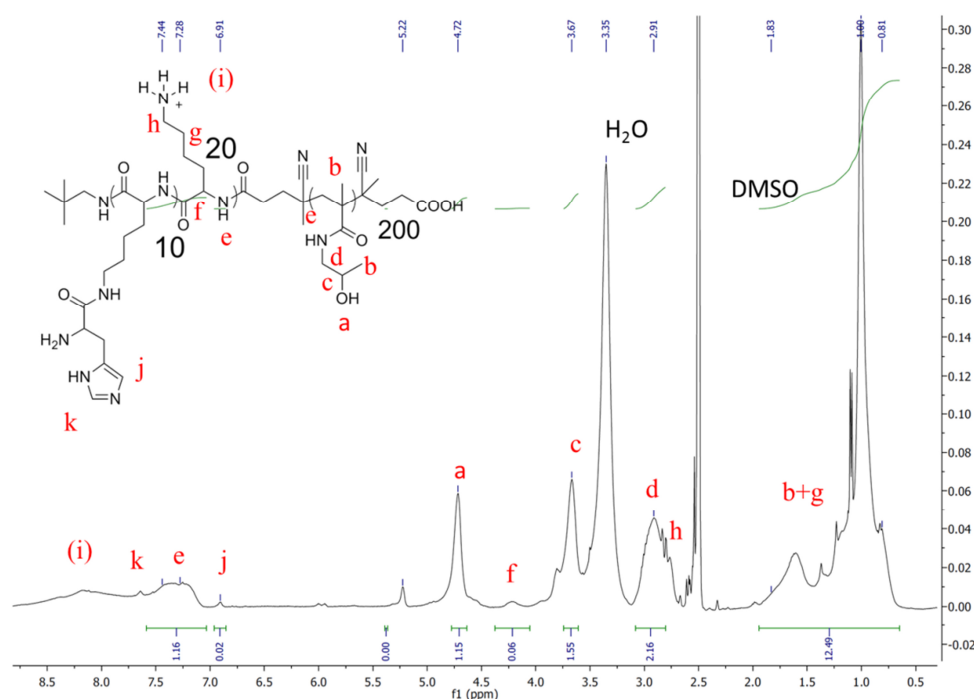


Abbildung 6.14: 400 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von poly[Lys] $_{20}$ -co-p[Lys(His)] $_{10}$ -b-poly[HPMA] (T5)

400MHz ^1H -NMR (*dms*-*d* $_6$): [δ ppm]= 7.44-7.29 (br. s 1H, *k+e*), 6,91 (s, 0,02H*, *j*), 4.72 (br. s, 1H, *a*), 4.22, (br. s, 0,06H*, *f*), 3.67 (br. s, 1H, *c*), 2.90 (br. s, 2H*, *d*), 1.78-0.83 (m, 13H, *b+g*).

*Anmerkung: Durch das Verhältnis des His-Protons (6,90 ppm, *j*) zu dem Signal des α -Protons (4.20 ppm, *f*) des gesamtem Peptidblocks ergibt sich, dass ca 33 % der Lysineinheiten mit Histidin substituier sind.

Es wurde gleichzeitig immer ein identisches Polymer ohne Farbstoff synthetisiert.

Synthese von Poly[Lysin]₃₀-S-S-block-poly[N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid] (poly-[Lys]₃₀-S-S-*b*-poly[HPMA])

In einer typischen Reaktionsvorschrift wurden 125 mg (107 mg, 0,012 mmol mit CTA Endgruppe) poly[Lys(Z)]₃₀-S-S-CTA in einem Schlenkkolben in 600 µL TFE gelöst und noch 5 ml abs. Dioxan hinzugegeben. Anschließend wurden 500 mg (2 mmol) des Monomers PFMA zugefügt und zweimal sekuriert. 0,342 mg (0,002 mmol) des Initiators azobis(isobutyronitril (AIBN) wurden über eine Stammlösung (5 mg AIBN in 1 mL abs. Dioxan) hinzugegeben (Molverhältnis AIBN/CTA/Monomer 1/6/1000) und noch zweimal sekuriert. Es wurde 2 Tage bei 60 °C polymerisiert. Das Polymer wurde in n-Hexan gefällt und noch zweimal aus TFE/Dioxan in n-Hexan umgefällt. Es wurden 394 mg eines rosa-farbenen Pulvers erhalten. Die Dithioester-Endgruppe wurde direkt mit einem Überschuss 4,4-azobis(4-cyanovaleriansäure) (ACVA) entfernt. Dazu wurden 394 mg des Polymers (0,017 mmol) wieder in 4 mL abs. Dioxan mit 600 µL TFE aufgenommen, mit 122 mg (0,44 mmol, 25 eq.) ACVA versetzt und 4 h bei 85 °C gerührt. Das Polymer wurde in nHex/Et₂O 2:1 gefällt und anschließend noch zweimal aus Dioxan/ TFE in nHex/Et₂O 2:1 umgefällt, zentrifugiert und bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet. Es wurden 366 mg eines farblosen Pulvers erhalten. Davon wurden 50 mg (0,2 mmol) in einer Mischung aus 1 mL abs. Dioxan und 0,5 mL abs. DMSO gelöst, 1 mg (0,002 mmol) Oregon Green Cadaverine und 71 µL (0,52 mmol) NEt₃ hinzugegeben und 4 h bei 50 °C gerührt. Anschließend wurden noch 30 mg (0,4 mmol) 2-Hydroxypropylamin zugegeben und 3 Tage bei 35 °C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde das Polymer in kaltem Diethylether gefällt, zentrifugiert, in wenig DMSO aufgenommen, gegen Reinstwasser dialysiert (MWCO 14.000) und gefriergetrocknet. Es wurden 27 mg eines orangenen Feststoffes erhalten.

Tabelle 6.6: Unterschiedliche Ansätze für poly[Lys(Z)]₃₀-S-S-*b*-poly[HPMA]

	Mol-Verhältnis AIBN/CTA/ Monomer	Mn/Mw poly(Lys(Z))-b- poly(HPMA) GPC (HFIP)	<i>D</i> poly(Lys(Z))-b- poly(HPMA) GPC(HFIP)
poly[Lys(Z)]₃₀-S-S-<i>b</i>-poly[HPMA] A	1/6/1000	32.100/ 47.500	1,48
poly[Lys(Z)]₃₀-S-S-<i>b</i>-poly[HPMA] B	1/6/1714	41.500/62.300	1,5
poly[Lys(Z)]₃₀-S-S-<i>b</i>-poly[HPMA] C	1/6/2224	47.100/72.500	1,54

Zur Deblockierung des Lysin-Blocks wurde das Polymer in 1,5 mL TFA gelöst und 200 µL Methansulfonsäure hinzugegeben. Nach 3 Stunden wurden noch 1,5 mL Wasser hinzugegeben und für weitere 3 h gerührt. Nach Codestillation mit Toluol und Dichlormethan wurden gegen 10 mM NaCl-Lsg und anschließend gegen Reinstwasser dialysiert (MWCO 25.000). Es wurden 15 mg des Blockcopolymers als orangener Feststoff erhalten.

Tabelle 6.7: Charakterisierung der unterschiedlichen Blocklängen von poly[Lys]₃₀-S-S-*b*-poly[HPMA] nach der Entschützung mit Methansulfonsäure

	Mn/Mw poly(Lys)-b- poly(HPMA) GPC (HFIP)	<i>D</i> poly(Lys)-b- poly(HPMA) GPC(HFIP)	Mn (NMR)	Blocklängen- Verhältnis X_n (p[HPMA]) zu X_n (p[Lys])
poly[Lys(Z)]₃₀-S-S-<i>b</i>-poly(HPMA) A T9	35.900/ 51.300	1,43	36.800	230:30 (7:1)
poly[Lys(Z)]₃₀-S-S-<i>b</i>-poly(HPMA) B	43.600/ 64.900	1,49	46.900	300:30 (10:1)
poly[Lys(Z)]₃₀-S-S-<i>b</i>-poly(HPMA) C	50.200/ 76.500	1,52	65.000	430:30 (14:1)

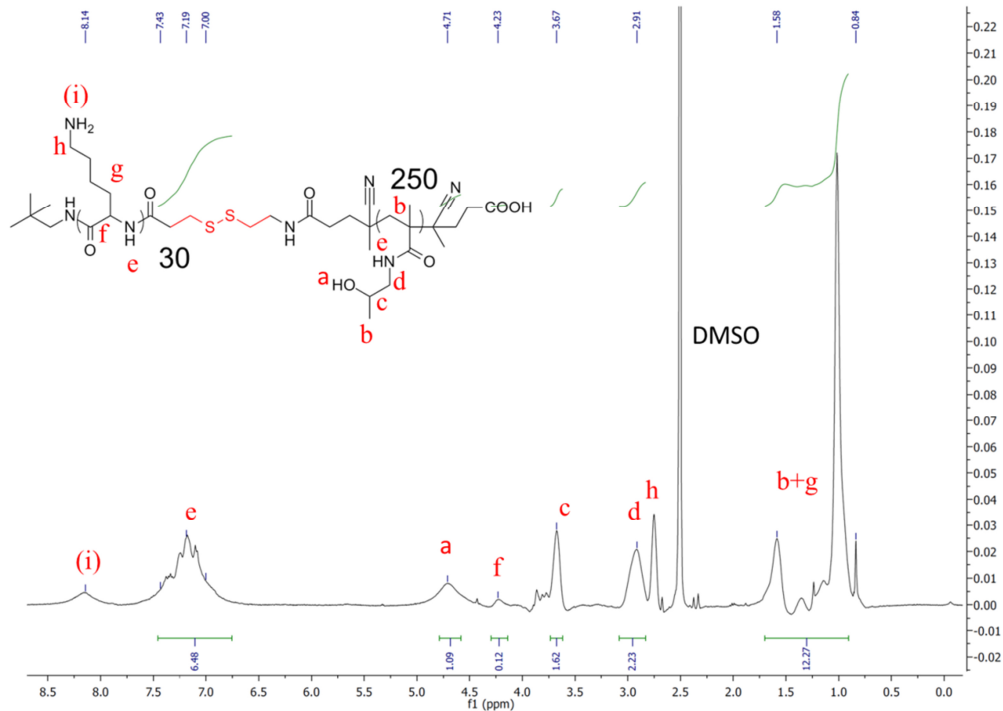


Abbildung 6.15: 400 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von $\text{poly}[\text{Lys}]_{30}\text{-}b\text{-}S\text{-}S\text{-poly}[\text{HPMA}]$ (T9)

400MHz ^1H -NMR ($\text{dms}\text{-}d_6$): [δ/ppm]= 7.40 (br. s, 1H, *e*), 4.71 (br. s, 1H, *a*), 4.23, (br. s, 0.12H*, *f*), 3.67 (br. s, 1H, *c*), 2.91 (br. s, 2H*, *d*), 1.69-0.84 (m, 12H, *b+g*).

*Anmerkung: Durch das Verhältnis der α -Protonen des Peptid Blocks (4.23 ppm, *f*) mit den Protonen der HPMA-Wiederholungseinheit (2.91 ppm, *d*) kann man die Länge des HPMA Blocks bestimmen, da die Lysin-Blocklänge bekannt ist, und somit auch das Molekulargewicht bestimmt werden.

Es wurde gleichzeitig immer ein identisches Polymer ohne Farbstoff synthetisiert.

Synthese von Poly[Lysin(Z)]₃₀-block-poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamid] mit Azid funktionalisiertem HPMA-Block (poly[Lys(Z)]₃₀-b-poly[HPMA(Azid)])

In einer typischen Reaktionsvorschrift wurden 52 mg (43 mg, 0,0052 mmol mit CTA Endgruppe) poly[Lys(Z)]₃₀-CTA in einem Schlenkkolben in 600 μL TFE gelöst und noch 5 ml abs. Dioxan hinzugegeben. Anschließend wurden 444 mg (1,8 mmol) des Monomers PFMA zugefügt und zweimal sekuriert. 0,14 mg (0,0009 mmol) des Initiators azo-bis(isobutyronitril (AIBN) wurden über eine Stammlösung (5 mg AIBN in 1 mL abs.

Dioxan) hinzugegeben (Molverhältnis AIBN/CTA/Monomer 1/6/2076) und noch zweimal sekuriert. Es wurde 2 Tage bei 60 °C polymerisiert. Das Polymer wurde in n-Hexan gefällt und noch zweimal aus TFE/Dioxan in n-Hexan umgefällt. Es wurden 250 mg eines rosa-farbenen Pulvers erhalten. Die Dithioester-Endgruppe wurde direkt mit einem Überschuss 4,4-azobis(4-cyanovaleriansäure) (ACVA) entfernt. Dazu wurden 250 mg des Polymers (0,007 mmol) wieder in 4 mL abs. Dioxan mit 600 µL TFE aufgenommen, mit 51,4 mg (0,18 mmol, 25 eq.) ACVA versetzt und 4 h bei 85 °C gerührt. Das Polymer wurde in nHex/Et₂O 2:1 gefällt und anschließend noch zweimal aus Dioxan/ TFE in nHex/Et₂O 2:1 umgefällt, zentrifugiert und bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet. Es wurden 245 mg eines farblosen Pulvers erhalten. Davon wurden 100 mg (0,40 mmol) in einer Mischung aus 3 mL abs. Dioxan und 1 mL abs. DMSO gelöst, 21 mg (0,06 mmol) *O*-(2-Aminoethyl)-*O'*-(2-azidoethyl)-pentaethylenglycol (NH₂-(PEG)₆-N₃) und 142 µL (1 mmol) NEt₃ hinzugegeben und 4 h bei 35 °C gerührt. Anschließend wurden noch 60 mg (0,8 mmol) 2-Hydroxypropylamin zugegeben und 3 Tage bei 35 °C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde das Polymer in kaltem Diethylether gefällt, zentrifugiert, in wenig DMSO aufgenommen, gegen Reinstwasser dialysiert (MWCO 25.000) und gefriergetrocknet. Es wurden 45 mg eines farblosen Feststoffes erhalten.

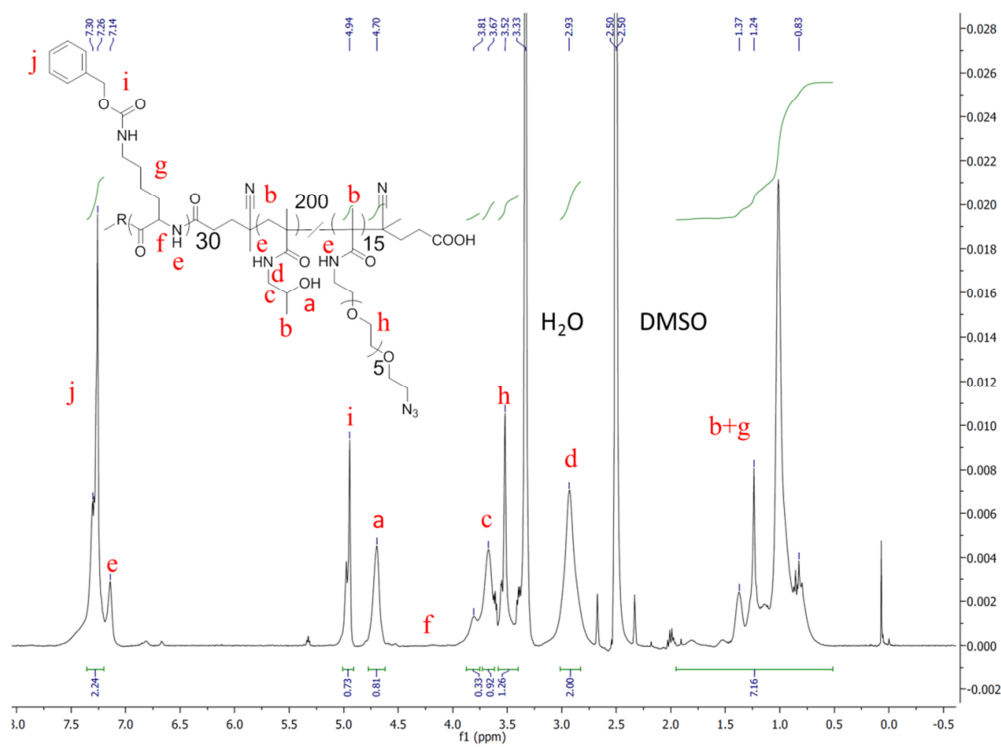


Abbildung 6.16: 400 MHz-¹H-NMR-Spektrum von *p*[Lys(Z)]₃₀-*p*[HPMA(Azid)]

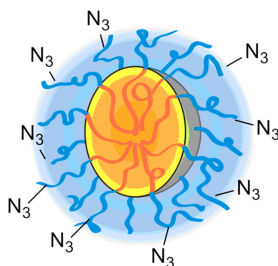
400MHz $^1\text{H-NMR}$ ($\text{dms}\text{-}d_6$): [δ/ppm]= 7.26 (m, $j+e$), 4.94 (m, i), 4.70 (br. s, 1H, a), 3.67 (br. s, 1H, c), 5.52 (m, 1,26 H*, h), 2.93 (br. s, 2H*, d), 1.68-0.86 (m, 8H, $b+g$).

Anmerkung: *Durch das Verhältnis der Protonen des PEG-Spacers (3.52 ppm, h) mit den Protonen der HPMA-Wiederholungseinheit (2.93 ppm, d) kann der prozentuale Anteil von Azid-Gruppen im poly[HPMA] Block bestimmt werden (ca. 6 %).

$\text{IR } \nu$ [cm^{-1}]: 3306 (br), 2931 (m), 2362(w), 2105 (w, Azid-Bande), 1700 (s), 1649 (s).

GPC(HFIP): $M_w/M_n = 1,51$.

Überstrukturbildung von (poly[Lys(Z)]₃₀-*b*-poly[HPMA(Azid)]) in wässrigem Medium



1 mg des hydrophob-hydrophilen Blockcopolymers poly[Lys(Z)]₃₀-*b*-poly[HPMA(Azid)] wurden in 250 μL TFE in Lsg. gebracht und anschließend unter schütteln 750 μL Reinstwasser und 1 mL PBS-Puffer langsam zu getropft.

Synthese des Azid funktionalisierten hydrophob-hydrophilen poly[LMA]₂₀-*b*-poly[HPMA(Azid)]₈₀ Blockcopolymers

Die Synthese des poly[LMA]-*b*-poly[HPMA(Azid)] Blockcopolymers wurde von [REDACTED] im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt.^[173]

In einem Schlenkkolben wurden 51 mg des Boc-PEG-CTA's, 1,64 mg AIBN sowie 2 g PFMA Monomer in 4 mL 1,4- Dioxan vorgelegt. Das molare Verhältnis von CTA/AIBN entspricht 10:1. Das Reaktionsgemisch wurde vier Mal sekuriert und anschließend für 12 Stunden im Ölbad bei 70° C zur Polymerisation gebracht. Das Polymer wurde drei Mal

in *n*-Hexan (p. a.) gefällt und über Nacht im Vakuumtrockenschrank bei 40° C getrocknet. Polypentafluorphenylmethacrylat (Poly[PFMA]) wurde als rosafarbener Feststoff in Ausbeuten von 51 % erhalten.

400MHz ¹H-NMR (*dms**o*-*d*₆): [δ /ppm]= 3.71-3.32 (m, 12H), 2.62-2.09 (m, 2H), 1.54-1.26 (m, 3H).

376 MHz ¹⁹F-NMR (*CDCl*₃): [δ /ppm]= -153-(-152) (m, 2F), -159 (t, 1F), -163 (m, 2F).

In einem Schlenkkolben wurden 300 mg des oben genannten Makro-PFMA-CTA`s mit Dithioesterendgruppe (1,19 mmol, bezogen auf Reaktivesterwiederholungseinheiten; 1,5 eq.), mit 201,5 mg Laurylmethacrylat (0,79 mmol; 1 eq.) in 4 mL 1,4-Dioxan gelöst. Danach wurden 361,2 µg AIBN (2,23 µmol; entspricht 1/10 der Stoffmenge an Makro-CTA, bezogen auf die Endgruppe) über eine Stammlösung in 1,4-Dioxan zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde drei Mal sekuriert und anschließend für drei Tage im Ölbad bei 70 °C polymerisiert. Die Reaktionslösung wurde in kaltem Ethanol (p. a.) gefällt und wieder in 1 mL 1,4-Dioxan aufgenommen. Dieser Vorgang wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurde das Blockcopolymer im Vakuumtrockenschrank bei 40 °C getrocknet und in Ausbeuten von 60 % (324,3 mg) erhalten.

In einen Schlenk Kolben wurden 324,3 mg des oben dargestellten Blockcopolymers (13,5 µmol; 1 eq.) und 55,47 mg AIBN (338 µmol; 25 eq.) in 2 mL 1,4-Dioxan gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 4 Stunden bei 85° C im Ölbad zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde die Polymerlösung in kaltem Ethanol (p. a.) gefällt und das Präzipitat in wenig 1,4-Dioxan aufgenommen. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurde das Blockcopolymer im Vakuumtrockenschrank bei 40° C getrocknet und in Ausbeuten von 86 % (279,5 mg) erhalten.

400MHz ¹H-NMR (*dms**o*-*d*₆): [δ /ppm]= 3.91 (s, 2H), 2.75-0.75 (44,7 H*).

Anmerkung: *Von den 44,7 Protonen im Bereich 2.75-0.75 ppm entsprechen 28 Protonen dem LMA-Block und 17,7 Protonen dem PFMA-Block. Mit der Anzahl der Protonen im LMA-Block (28) und im PFMA-Block (5) ergibt sich ein Blocklängenverhältnis von p[LMA] zu poly[PFMA] von ca. 20:80.

GPC (THF): Mn= 22.800, Đ=1,23.

134,1 mg Poly(PFMA)-*b*-P(LMA) mit entfernter Dithioesterendegruppe (532 μmol , bezogen auf Reaktivesterwiederholungseinheiten; 1 eq) wurden in einem Gemisch aus 2,7 mL 1,4 Dioxan und 0,7 mL DMSO gelöst. In den folgenden Schritten wurde stets unter Argonatmosphäre gearbeitet. Es wurden 139,7 mg Triethylamin (1,38 mmol; 2,6 eq.) sowie 27,9 mg *O*-(2-Aminoethyl)-*O'*-(2-azidoethyl)-pentaethylenglycol auch bezeichnet als (NH₂-(PEG)₆-N₃) hinzugefügt (79,8 μmol ; 15 mol % bezogen auf Reaktivester-wiederholungseinheiten). Das Reaktionsgemisch wurde für 4 h bei 35° C gerührt. Danach wurden 79,9 mg 2-Hydroxypropylamin (1,06 mmol, 2 eq.) zugegeben und die Reaktion erfolgte für 3 Tage bei 35 °C. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde jeweils nach einem Tag und nach zwei Tagen mit der gleichen Menge an 2-Hydroxypropylamin (s.o.) gequenchet. Nach vollständigem Umsatz (¹⁹F NMR Analyse) wurde die Polymerlösung in Diethylether (p. a.) gefällt, das Präzipitat in wenig DMSO (p. a.) aufgenommen, gegen MP-H₂O dialysiert (MWCO 3.500) und gefriergetrocknet. Das azidfunktionalisierte poly[LMA]-*b*-poly[HPMA(Azid)] wurde in Ausbeuten von 86 % (72,8 mg) erhalten.

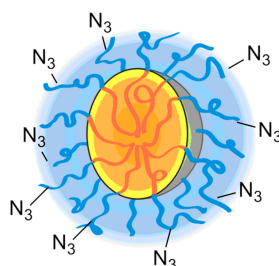
400MHz ¹H-NMR (dms_o-d₆): [δppm]= 7.23 (s, 1H), 4.69 (s, 1H), 3.68 (s, 1H), 3.52 (m, 2.03H*), 2.90 (s, 2H), 1.66 (s, 2H), 1.00 (s, 6H).

Anmerkung: *Durch das Verhältnis der Protonen des PEG-Spacers (3.52 ppm, g) mit den Protonen der HPMA-Wiederholungseinheit (2.90 ppm, d) kann der prozentuale Anteil von Azid-Gruppen im poly[HPMA] Block bestimmt werden (ca. 9 %).

IR ν [cm^{-1}]: 3364 (br), 2923-2853 (m), 2109 (w, Azid-Bande), 1728 (s), 1638 (s).

GPC (HFIP): Mn= 34.500, \bar{D} = 1,19.

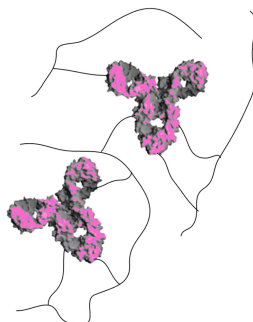
Überstrukturbildung von poly[LMA]-*b*-poly[HPMA(Azid)] in wässrigem Medium



1 mg des hydrophob-hydrophilen Blockcopolymers poly[LMA]-*b*-poly[HPMA(Azid)] wurden in einer Mischung aus 480 μL THF und 20 μL MeOH suspendiert und anschließend unter schütteln 1500 μL PBS-Puffer langsam zugetropft.

6.2.3 Synthese der Polymer-Antikörper Konjugate

Synthese von Polymer-Antikörper Konjugaten mit statistisch-maleinimid modifizierten HPMA-Copolymer (Stat.-Konjugate)



Der pH-Wert einer Lösung von 200 µg des Antikörpers (1,3 nmol) in 300 µL PBS-Puffer mit 1mM EDTA wurde mit 0,1 M NaOH Lsg. auf 8 eingestellt und entgast. Anschließend wurden 0,0073 mg (53 nmol, 40 eq.) 2-Iminothiolan über eine Stammlösung hinzugegeben und die Mischung 1 Stunde bei Raumtemperatur in einem Eppendorfgefäß gerührt. Währenddessen wurde ein Amicon[®]-Filter (MWCO 100.000) einmal mit Reinstwasser und einmal mit PBS-Puffer vorbehandelt. Das Reaktionsgemisch wurde auf den Filter gegeben und bei 13.300 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurden 300 µL PBS-Puffer mit 0,1 mM EDTA auf den Filter gegeben und ebenfalls bei 13.300 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde siebenmal wiederholt und der Thiol-modifizierte Antikörper durch zentrifugieren bei 4 °C bei 2000 rpm in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. 6 mg des statistisch maleinimid-modifizierten Stat.-HPMA Polymer A (Mn: 20.200, 297 nmol bezogen auf Polymerketten) wurde in 100 µL DMSO/PBS-Puffer (1:1) gelöst und zu dem Thiol-modifiziertem Antikörper gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges Polymer wurde durch mehrfache zentrifugale Filtration mit Amicon[®]-Filtern (MWCO 100.000) und PBS-Puffer wie oben beschrieben abgetrennt. Anschließend wurde das Konjugat in einen neuen Amicon[®]-Filtern (MWCO 100.000) überführt und abermals siebenmal zentrifugiert. Das zurückgewonnenen Konjugat wurde über Nacht in 0,1 M 2-Mercaptoethanol Lsg. gerührt und noch siebenmal über einen Amicon[®]-Filtern (MWCO 100.000) gereinigt und in PBS-Puffer aufgenommen.

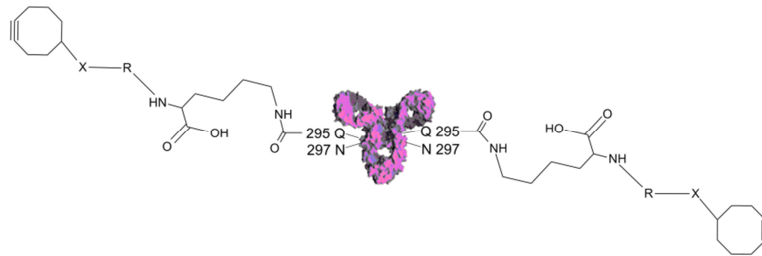
Synthese von Polymer-Antikörper Konjugaten mit Endgruppen-maleinimid modifizierten HPMA-Polymeren (End-Konjugate)



Der pH-Wert einer Lösung von 200 µg des entsprechenden Antikörpers (1,3 nmol) in 300 µL PBS-Puffer mit 1mM EDTA wurde mit 0,1 M NaOH Lsg. auf 8 eingestellt und entgast. Anschließend wurden 0,0183 mg (133 nmmol, 100 eq.) 2-Iminothiolan über eine Stammlösung hinzugegeben und die Mischung 1 h bei Raumtemperatur in einem Eppendorfgefäß gerührt. Währenddessen wurde ein Amicon[®]-Filter (MWCO 100.000) einmal mit Reinstwasser und einmal mit PBS-Puffer vorbehandelt. Das Reaktionsgemisch wurde auf den Filter gegeben und bei 13.300 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurden 300 µL PBS-Puffer mit 0,1 mM EDTA auf den Filter gegeben und ebenfalls bei 13.300 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde siebenmal wiederholt und der Thiol-modifizierte Antikörper durch zentrifugieren bei 4 °C bei 2000 rpm in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. 2 mg des semitelechel- maleinimid-modifizierten HPMA Copolymer End-HPMA (Mn: 10.800, 185 nmol bezogen auf Polymerketten) wurde in 100 µL DMSO/Wasser 1:1 gelöst und zu dem Thiol-modifiziertem Antikörper gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges Polymer wurde durch mehrfache zentrifugale Filtration mit Amicon[®]-Filtern (MWCO 100.000) und PBS-Puffer siebenmal mal wie oben beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde das Konjugat in einen neuen Amicon[®]-Filtern (MWCO 100.000) überführt und abermals siebenmal mal zentrifugiert. Das zurückgewonnenen Konjugat wurde über Nacht in 0,1 M 2-Mercaptoethanol Lsg. gerührt und noch siebenmal über einen Amicon[®]-Filtern (MWCO 100.000) gereinigt und in PBS-Puffer aufgenommen.

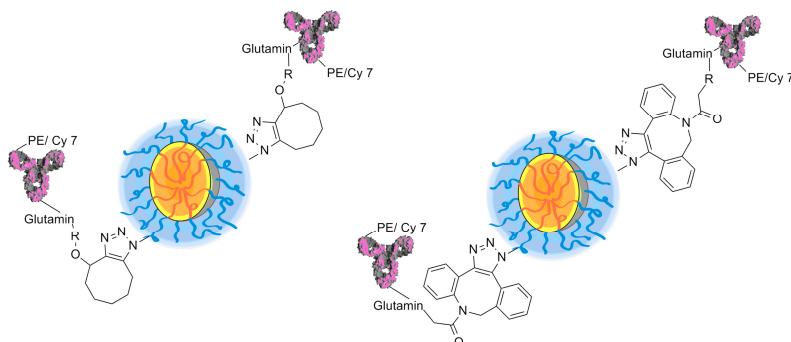
Die Stat.- bzw. End-Konjugate mit den entsprechenden Antikörpern wurden anschließend über SDS-PAGE, SEC in PBS-Puffer und FCS-Messung charakterisiert.

Anbindung des Cyclooctin-Lysin Derivats COD 1 bzw. COD 2 an aDEC-205 unter Verwendung von bakterieller Transglutaminase (bTG) unter vorheriger Deglykosilierung mit PNGaseF



Die Vorschrift wurde an eine Literaturvorschrift angelehnt.^[72] 200 µg (1,3 nmol) des Antikörpers aDEC-205 (bereits modifiziert mit PE/Cy7) wurden in 300 µL PBS-Puffer vorgelegt. Parallel werden 1 µL (500 Units (U)/µL) des Enzyms PNGase F (Peptide-N-Glycosidase-F) mit 2 µL den vom Hersteller empfohlenen Pufferlösungen 10xG7 und 10 %NP-40 Puffer sowie 15 µL Reinstwasser auf 20 µL verdünnt und zu dem Antikörper gegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei 37 °C gerührt und am nächsten Tag über Amicon Filter® (MWCO 100 kDa) überschüssige PNGaseF abgetrennt. Anschließend wurde der Antikörper in 300 µL Kalium-freiem PBS-Puffer aufgenommen und mit 0,15 mg (0,39 µmol, ca. 1,17 mM Lösung, 300 eq. bezogen auf den Antikörper) des Cyclooctinderivats COD 1 bzw. COD 2 sowie 2 Units (U) (30 U/ mg, c= 5,1 mg/ mL) bakterieller Trans-glutaminase (bTG) bei 37 °C für 48 Stunden gerührt. Es wurde anschließend wieder über Amicon Filter® (MWCO 100 kDa) überschüssiges Enzym bTG und Cyclooctinderivat COD 1 bzw. COD 2 abgetrennt und der modifizierte Antikörper in 300 µL PBS aufgenommen.

Umsetzung des enzymatisch, Cyclooctin modifiziertem aDEC-205 Antikörper mit Azid-funktionalisierten Mizellen in einer kupferfreien Azid Alkin Kopplung (SPAAC)



200 μg des mit COD 1 bzw. COD 2 modifizierten Antikörper (1,33 nmol; 2,1 eq.) wurden in 200 μL PBS Puffer vorgelegt. Anschließend wurden 10 μg (ca. 0,63 nmol; 1 eq.) des voraggregierten Blockcopolymers poly[Lys(Z)]₃₀-*b*-poly[HPMA(Azid)]₂₀₀ bzw. poly-[LMA]₂₀-*b*-poly-[HPMA(Azid)]₈₀ hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde für zwei Wochen bei 37 °C gerührt. Es wurden direkt Aliquote aus den Reaktionsmischungen für FCS-Messungen entnommen.

6.3 Zellbiologische Evaluierungen

6.3.1 Zellbiologische Evaluierung der Stat.-aRAGE/hulgG Polymer-Antikörper Konjugate.

Die zellbiologische Evaluierung der Stat.-aRAGE Konjugate wurde von [REDACTED] im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt.^[185]

Bradford Assay

Die Menge von Antikörpern in den Konjugaten wurde über den Bradford-Assay bestimmt. Die Kalibrierung erfolgte über Serum Albumin (BSA). (7,3 µg/µL für Stat.aRAGE und 8,1 µg/µL für Stat.-HuIgG.).

Zellkultur

SK-N-MC und RAGE exprimierende HEKFlp-In Zellen wurden in DMEM mit *fetal calf serum* (10 %), Glutamin (0,002M), Natriumpyrovat (0.001M), Penicillin und Streptomycin (100U/mL) gehalten. Medium und Zellkultur von *PAA/Austria* und *PromoCell-Deutschland*. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C und in einer feuchten Atmosphäre von 5 % CO₂ gehalten und zweimal die Woche geteilt.

Western Blot

Zelllysate wurden über eine 10 % SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrocellulosemembran (GE Healthcare) transferiert. Die Membran wurde mit dem aRAGE-Antikörper, Detektion über eine sekundären mit "horse radish peroxidase" gekoppelten Antikörper und ECL-Substrat, und Stat.-RAGE Konjugat (2,5 µg/mL), Detektion über Tetramethylrhodamin Farbstoff am Polymer und Stella 8300 System (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) und YFP Filter (ex: 500 nm +- 10nm), inkubiert.

Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden SK-N-MC oder HEK/RAGE Zellen in einem 35 mm Well mit Deckglas (18 mm Durchmesser) ausgesät und bis zur Konfluenz gewachsen. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal gewaschen und mit 3,7 % Paraformaldehyd in PBS-Puffer für 10 min fixiert. Nach wiederholtem Waschen wurden

die Zellen mit aRAGE-Antikörper oder Stat.-aRAGE (25µg/mL) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Zellen zweimal gewaschen und in einen Mowiol 4-88 fixiert. Bilder wurden mit einem *Zeiss Axiovert 100* Mikroskop mit 100/1.30 *Fluar Objektiv*, einer *MicroMax CCD Kamera* (Princeton Instruments, Trenton, NJ) und einem *MetaView Imaging System* (Universal Imaging Corporation) aufgenommen.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Native Antikörper, modifizierte Antikörper und Polymer Antikörper Konjugate wurden mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) der Größe nach aufgetrennt. Das im Probenpuffer enthaltene Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) zerstört die hydrophoben Wechselwirkungen der Proteine und sorgt dafür, dass diese eine „stäbchenförmige“ Struktur annehmen. Außerdem bindet SDS an die Proteine und überträgt seine hohe negative Ladung auf diese. Zur Auftrennung der Proben wurden 5 %ige Sammelgele und 7,5 %ige Trenngele (mit 10 oder 15 Probenaschen) verwendet. Die Proben (ca. 10-20 µg) wurde mit 2-fachen Lämli-Puffer (0,125 M Tris, 40 % Glycerin, 4 mL 6 % SDS und 0,02 %) aufgetragen und die Durchführung fand in 1x SDS-Elektrophorese-Puffer (25mM Tris, 192 mM Glycin, 1 % SDS, pH 8,8) bei 150 V für 1-1,5 Stunden statt.

Färbung von Proteinen mit Coomassie

Zur Färbung von Proteinen nach einer SDS-PAGE wurden diese für zwei Stunden in einer Glasschale mit Coomassie-Färbelösung (0,1 % Coomassie Blue®, 10 % Essigsäure, 30 % Methanol, 60 % Reinstwasser) auf einem Schüttler inkubiert. Danach erfolgte die Entfärbung des Gels mit Coomassie-Entfärbelösung (10 % Essigsäure, 30 % Methanol, 60 % Reinstwasser) für weitere zwei bis drei Stunden.

Silberfärbung

Geringe Mengen an Antikörper wurden über eine 7,5 % SDS-PAGE getrennt und über eine Silberfärbung angefärbt.^[186]

Ellmans-Assay

Die Bestimmung der Anzahl an freien Thiol-Gruppen am Antikörper wurde mit Ellman's Reagenz und Messung der Absorption nach Herstellerangaben durchgeführt (Thermo Scientific, USA).

Die zellbiologische Evaluierung von Stat.-huIgG Konjugaten an PBMC's wurden von [REDACTED] im Rahmen seiner Doktorarbeit durchgeführt.^[187]

Isolation von PBMC's

Humane PBMC's wurden aus einem Leukozytenfilm von gesunden, freiwilligen Spendern über einen „Ficol“-Dichte Gradienten gewonnen.

Durchflusszytometrie

T-Zellen, Monozyten und B-Zellen (PBMC's) wurde über die entsprechenden Antikörper detektiert und isoliert: anti-CD3(HUCT1,PE-Cy5 conjugated, BD), anti-CD14 (M5E2, APC-conjugated, BD), und anti-CD19 (HIB19, PE conjugated, BD)). Markierte PBMC's wurde dann mit Stat.-HPMA Referenz A und Stat.-huIgG (10 µg/ mL) für verschiedene Zeiträume (0,5, 1,4 und 16 Stunden) bei 37 °C inkubiert. Geerntete PBMC's wurde zweimal gewaschen und über Durchflusszytometrie (LSR II, BD) analysiert. Die Daten wurde über ein *FlowJo software* (Celeza) mit einem blauen Laser (488 nm) und einem Filter von 530 nm aufgenommen und ausgewertet. Zellviabilität wurde über Behandlung mit 7-AAD (e-Bioscience) nach Herstellerangaben durchgeführt.

6.3.2 Zellbiologische Evaluierung der End-aDEC-205/IgG2a bzw. Stat.-aDEC-205/IgG2a Polymer-Antikörper Konjugate

Die zellbiologische Evaluierung der aDEC-205/IgG2a Konjugate wurde von [REDACTED] im Rahmen ihrer (noch nicht beendeten) Dissertation durchgeführt.^[188]

Bradford Assay

Die Menge an Antikörper in den aDEC-205/IgG2a Konjugaten wurden über den Bradford-Assay bestimmt unter Verwendung des Roti-Quant Universal Kit® (Carl Roth). Zur Kalibrierung wurde der aDEC-205 Antikörper verwendet. 194 µg/mL für Stat.-aDEC-205/IgG2a Konjugate und 264 µg/mL für End-aDEC-205/IgG2a Konjugate.

Erzeugung von murinen, aus dem Knochenmark Isolierten Dendritischen Zellen (engl.: Bone Marrow Derived Dendritic Cells (BM-DC`s))

BM-DC`s wurden wie zuvor beschrieben erzeugt^[189], mit einigen Veränderungen. Das Knochenmark wurde aus dem Hüftgelenk und dem Schienbein der Maus (C57BL/6 mouse) gewonnen. Die Zellen wurde gefiltert (40mm EASY strainer), zentrifugiert (300 g, 10 min, 4-8 °C) und ausgesät (6-well Platten (bio-one, Kremsmuenster, Austria)) mit 3×10^6 Zellen/Well in 4 mL of RPMI medium (PAA Laboratories, Pasing Austria), und mit 5 %FCS, 2mM L-Glutamin, 0,1 mM nicht-essentiellen Aminosäuren, 50 µg/mL Gentamycin (alles von PAA), 50 mM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) und 4 ng/mL rekombinantes, murines GM-CSF (R&D, Wiesbaden, Deutschland). Am dritten Tag, wurden 4 mL vom kompletten Serum hinzugefügt. Am 7 Tag wurden nicht-adhärente und losgelöste BM-DC`s geerntet, gewaschen und für Experimente verwendet.

Zytotoxizitäts Assays

BMDC`s (3×10^5) wurden in 96-Well Kulturplatten (BD, Franklin Lakes, NJ) in einem Volumen von 100 µL ausgesät und Referenzpolymere und Konjugate wurde in bestimmten Konzentrationen hinzugefügt. Nach einem Tag wurde die Zellviabilität von BM-DC`s über den ZellTiter 96, nicht radioaktiven Zell-Proliferations-Assay (Promega, Madison, WI) nach Herstellervorgaben bestimmt.

Bindung und Aufnahme von aDEC-205 und IgG2a Konjugaten

BMDC`s (2×10^6) oder Splenozyten (3×10^6), gewonnen aus C57BL/6 Mäusen und von Erythrozyten befreit, wurden mit Referenzpolymeren und Konjugaten (2 oder 20 µg/mL) in 100 µL bei 37 °C in 96-Well Zellkulturplatten für bestimmte Zeiträume inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen mit Oberflächenmarkern behandelt und über Durchflusszytometrie (FACS) oder konfokaler Mikroskopie (CLSM) analysiert.

Durchflusszytometrie

BM-DC`s wurden mit FACS-Puffer (PBS, 1 %FCS, 0,5mM EDTA) gewaschen und mit dem murinen α CD11c Antikörper (markiert mit PE-Cy7 oder APC, clone N418, *eBiosciences* San Diego, CA), APC-markiertem α CD19 (1D3, *BD Biosciences*), PE markiertem α CD3 (145-2C11), antiCD11b (M1/70) (beide von *eBioscience*) und APC markiertem α CD68 (FA-11, *BioLegend*, SanDiego, CA) angefärbt. Expressionsintensitäten wurden über Durchflusszytometrie (LSR II) bestimmt und mit *FACSDiva* (beide von *BD Biosciences*) analysiert.

Konfokale Mikroskopie (CLSM)

BM-DC`s ($5 \times 10^5/200 \mu\text{L}$) wurde mit den Referenzpolymeren und Konjugaten inkubiert und auf „*Chamber-slides*“ (OBIDI, Martinsried, Deutschland) transferriert. Der Zellkern wurde über Reaktion mit Hoechst 33342® für 1 Stunde im dunklen und unter Schütteln angefärbt. Anschließend wurde zweimal gewaschen und die Zellmembran mit CellMaskOrange® (Life technologies, Carlsbad, CA) nach Herstellervorgaben angefärbt und direkt über CLSM (LSM510-UV Zeiss) mit einem Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27 Objektiv analysiert. Der Hoechst-Farbstoff wurde bei 405 nm, der Polymerfarbstoff Oregon Green bei 488 nm und CellMaskOrange bei 543 nm angeregt.

6.3.3 Zellbiologische Evaluierung der Polymer-p-DNA Komplexe (Polyplexe)

Verwendete Zelllinie

HEK 293T-Zellen:

Die adhärenente Nierenkarzinom-Zelllinie HEK 293T (**h**umane **e**mbrionale **N**ierenzellen) ist ein Transformationsprodukt aus humanen embryonalen Nierenzellen, infiziert mit dem TYP 5-Adenovirus. Außerdem wurden die Zellen mit dem T-Antigen aus SV40 stabil

transfiziert. Dadurch ist es möglich, Plasmide mit dem SV40-Replikationsursprung nach einer Transfektion in die Zellen zu amplifizieren.

Verwendete Plasmide

Die Herstellung der zur Komplexierung verwendeter p-DNA wurde von [REDACTED] im Rahmen Ihrer Masterarbeit durchgeführt. Dazu wurde folgendermaßen vorgegangen.^[190]

Herstellung elektrokompetenter *E.coli* TOP10 Zellen

Für die Generierung elektrokompetenter Bakterien wurde zunächst eine Übernachtskultur mit 50 µl *E.coli* TOP10 Zellen (auf Eis aufgetaut) in 50 ml LB Medium angelegt, welche bei 37 °C im Brutschrank bei 150 rpm über Nacht inkubierte. Mit 5 ml der Übernachtskultur wurde am Folgetag 1 L LB-Medium angeimpft und diese Kultur bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Beim Erreichen der mittleren logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,4-0,6$) nach ungefähr 2-3 Stunden wurden die Zellen in eisgekühlte Zentrifugenbecher überführt, 30 min auf Eis inkubiert und schließlich abzentrifugiert (20 min, 4000 x g, 4 °C). Die Zellsedimente wurden zweimal mit je 300 ml eisgekühltem Aqua dest. gewaschen (20 min, 4000 x g, 4 °C). Anschließend wurden die Zellsedimente vereinigt, in 6 ml eisgekühlter 10 %iger (v/v) Glycerollösung resuspendiert und auf Eis in je 100 µl Einheiten aliquotiert. Die Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei minus 80 °C gelagert.

Transformation elektrokompetenter Bakterienzellen

Die Transformation dient der Vervielfältigung von Plasmid DNA. Bei der Elektroporation wird durch ein elektrisches Feld die Zellmembran der Bakterien permeabilisiert, wodurch der Vektor aufgenommen werden kann.

Zur Vorbereitung der Elektroporation wurden jeweils 50 µl elektrokompetente *E.coli* TOP10 Zellen auf Eis aufgetaut, mit 100 ng Plasmid DNA (pRLEF1α , pGL3basic) versetzt und 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension in eine eisgekühlte 0,1 cm- Elektroporationsküvette überführt und bei 2,1 kV, 125 µF und 200 Ω transformiert. Im unmittelbaren Anschluss an die Elektroporation wurden die Zellen in ein 15



ml Plastikröhrchen überführt, mit je 200 µl LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Anschließend wurde je 500 ml Ampicillin-haltiges (100 µg/ml) LB-Medium mit den Transformanden versetzt und die Kulturen über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert.

Plasmid-Isolierung in präparativen Mengen

Die angefertigten Übernachtskulturen wurden am nächsten Tag für 20 min bei 4 °C und 5000 xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Aus den Sedimenten wurden mit Hilfe des „Plasmid Maxi Prep Kits“ von *QIAGEN* nach der Anleitung des Herstellers die Plasmide (pRLEF1 α , pGL3basic) isoliert. Die Elution der erhaltenen DNA-Sedimente erfolgte in jeweils 500 µl doppelt destilliertem Wasser. Anschließend erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentrationen durch den *NanoDrop*®.

Es wurden folgenden p-DNA Konstrukte verwendet:

Tabelle 6.8: Verwendete p-DNA Konstrukte

plasmid	Hersteller	Resistents	Anzahl Basenpaare (Wenn bekannt)	Verwendet für:
pRLEF1 α		Amp.	4280	Agarose Gele/ Transfektionseffizienz (via Luciferas- Assay)
pGL3 basic		Amp.	4818	MTT-Assay
pEGFP-N1 bzw. pDsRed-N1	Clontech®	Kan.	k.a.	Transfektionseffizienz Zytotoxizität (via FACS)

Herstellung von Polymer-DNA Polyplexen

Die p-DNA wurden in sterilem Wasser (frei von DNAase) vorgelegt. Das Polymer wurde 10 mM TRIS-Puffer (1,576 g TRIS HCl in 1 L Aqua dest. Lösen und mit 10 M NaOH auf pH 7,2 eingestellt) gelöst und langsam in verschiedenen Mengen in die p-DNA Lösung eingetroppt. Die Darstellung der Polyplexe erfolgte stets einen Tag vor den entsprechenden Versuchen. Die zugegebenen Mengen an Polymer wurden dabei wie folgt ermittelt:

1 µg der verwendeten p-DNA entspricht $3,07 \times 10^{-9}$ mol an negativen Ladungen. (Ermittelt über mittleres Molekulargewicht eines Basenpaares (650 kDa) und der Plasmidgröße (4818 Basenpaare). Teilt man dies durch die Anzahl an positiven Ladungen pro Blockcopolymer (entspricht der jeweiligen Anzahl an Lysin) erhält man die benötigte Molmenge an Polymer. Über das Molekulargewicht der Blockcopolymer (Mn (NMR)) erhält man so die benötigte Masse an Polymer. Dieser Wert entspricht N/P =1, das bedeutet es sind theoretisch genauso viele negative Ladungen (p-DNA) wie positive Ladungen (Blockcopolymer) vorhanden. Tabelle 6.9 zeigt die erforderlichen Mengen der Blockcopolymer für N/P=1. Für N/P=2 wird die doppelte Menge Blockcopolymer benötigt usw.

Tabelle 6.9: Benötigte Mengen der Blockcopolymer T1, T3, T4, T5 und T9 für N/P=1

Blockcopolymer	m (p-DNA)	n (neg. Ladungen)	Mn (NMR)	m (Polymer für N/P=1)
T1 (10xLysin) Je Polymer	1 µg	$3,07 \times 10^{-9}$ mol	14.000	4,3 µg
T3 (20xLysin) Je Polymer	1 µg	$3,07 \times 10^{-9}$ mol	26.700	4,1 µg
T4 (30xLysin) Je Polymer	1 µg	$3,07 \times 10^{-9}$ mol	30.500	3,1 µg
T5 (30xLysin) Je Polymer	1 µg	$3,07 \times 10^{-9}$ mol	30.500	3,1 µg
T9 (30xLysin) Je Polymer	1 µg	$3,07 \times 10^{-9}$ mol	36.800	3,8 µg

Das Mengenverhältnis Blockcopolymer zu p-DNA, die zur Herstellung der Polyplexe verwendet wurden, ist für alle Versuche in N/P dargestellt.

Agarose Gelelektrophorese

Über die Agarose-Gelelektrophorese können Nucleinsäuren anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Dabei bilden große Agarosemoleküle eine Matrix mit größeren und kleineren Poren. Wird nun eine elektrische Spannung angelegt wandern die, aufgrund des Phosphatrückgrades negativ geladenen Nucleinsäuren in Richtung Pluspol. Kleinere Nucleinsäuren wandern dabei weiter durch die Gelmatrix als Größere. Polymer-DNA Polyplexe mit Überschuss an positiv geladenem Polymer bleiben dagegen aufgrund der Ladungskompensation hängen. Es wurden 0,5 w % Agarose Gele hergestellt und die Proben (Polyplexe gebildet aus 160 ng p-DNA und Blockcopolymeren bei N/P=7 und 1 Stunde inkubiert) mit 6-fachen Ladepuffer (30 % Glycerin, 0,25 % Bromophenol Blau und 0,25 % Xylene Cyanol) aufgetragen. Die Durchführung erfolgte in TBE-Puffer (89 mM tris-(Hydroxymethyl-(hydroxymethyl)-amino-Methan, 89 mM Borsäure und 2 mM EDTA, pH 8) bei 120 V für 20 min. Visualisierung erfolgte mittels anfärben mit GelRed® (*Biotium*), welches in die p-DNA interkaliert, und anschließender Anregung bei 365 nm.

Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen (sterilisierte Arbeitsgeräte, sterile Verbrauchsmaterialien, autoklavierte Lösungen) und unter einer sterilen Werkbank.

Die zellbiologischen Methoden (Kultivierung und Ernten der HEK.293 T Zelllinie) wurde ebenfalls von [REDACTED] im Rahmen Ihrer Masterarbeit durchgeführt. Dabei wurde wie folgt verfahren.^[190]

Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte über eine Trypanblaufärbung der darin verdünnten Zellsuspension (üblicherweise 1:10) und anschließender Zählung der Zellen innerhalb von 4x4 Feldern innerhalb der Großquadrate im Hämozytometer. Trypanblau dringt in tote Zellen aufgrund der permeabilisierten Zellmembran ein und färbt deren Zytoplasma blau an. Durch diese Färbung ist es möglich während des Zählens lebende von toten Zellen zu unterscheiden, wobei bei der Bestimmung der Zellzahl die blau gefärbten

Zellen nicht berücksichtigt werden. Mit folgender Formel wurde die Zellzahl ermittelt:
Zellzahl = Anzahl der gezählten Zellen in 16 Feldern x Verdünnungsfaktor (10) x
Kammerfaktor (10^4) x Endvolumen.

Kultivierung von HEK 293T-Zellen

Die Kultivierung der adhärenenten HEK 293T-Zellen erfolgte in 175 cm² Kulturflaschen in 30 ml Kulturmedium bei 37 °C, 10 % CO₂ und einer gesättigten Wasserdampfatmosphäre.

Die Zellen wurden alle 4 bis 6 Tage 1:100 bis 1:200 verdünnt. Hierzu wurde bei den HEK 293T-Zellen bei einer Konfluenz von ca. 80 %, das Kulturmedium abgenommen, 10 ml frisches Kulturmedium zugegeben und die Zellen mittels auf- und abpipettieren vom Boden der Kulturflasche abgespült.

Ein Teil der Zellen wurde in eine neue 175 cm²-Kulturflasche mit 30 ml vorgewärmtem Kulturmedium überführt. Die Zellen wurden jeweils bis Passage 15 für Versuche verwendet.

Ernten der HEK 293T-Zellen

Zum Ernten der HEK 293T-Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen, 10 ml frisches Medium hinzugegeben, die Zellen mittels Auf-/Abpipettieren vom Boden der Kulturflasche abgespült und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die Zellsuspensionen wurden daraufhin bei Raumtemperatur, bei 1.200 rpm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert.

Es folgte das Zählen der Zellen sowie das für den Versuchsansatz erforderliche Einstellen der Zellzahl (Zellzahl/ml).

Zur Testung der Polyplexe bezüglich Zellaufnahme wurden Mikroskopieaufnahmen gemacht und zur Bestimmung der Transfektionseffizienz und Zytotoxizität wurden der Luciferase Assay bzw. MTT Assay angewendet. Sie wurden ebenfalls in Rahmen der Masterarbeit von [REDACTED] durchgeführt und sollen im folgendem kurz erklärt werden.^[190]

Luciferase Assay

Eine relative schnelle Aussage über die Transfektionseffizienz lässt mittels des Luciferase Assays treffen. Dieser beruht auf einem Reportergen, welches für Luciferase codiert. Wird eine Zelle mit einer p-DNA, welches dieses Konstrukt enthält, erfolgreich transfiziert wird das Enzym Luciferase extrachromosomal exprimiert. Es katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Luciferin zu Oxyluciferin, welches Biolumineszenz bei 480 nm aufweist. Mit einem Luminometer lässt sich die Menge an Substrat direkt quantifizieren und korreliert direkt zur Menge an exprimierter Luciferase und somit zur Transfektionseffizienz.

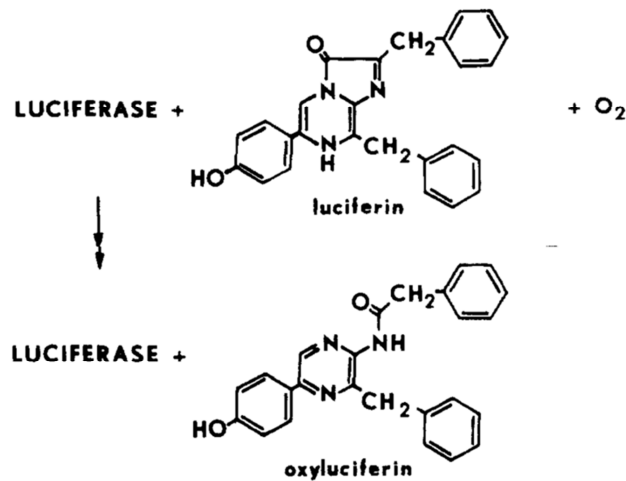


Abbildung 6.17: Reaktion von Luciferin (Coelenterazin) zu Oxyluciferin durch Luciferase in Gegenwart von Sauerstoff, Licht und Ca²⁺

Es wurden HEK-293 T Zellen 24 h vor Versuchsbeginn geerntet, die erforderliche Zellzahl eingestellt 2×10^4 Zellen/200 μ L und auf Loch-Gewebe Kulturplatten ausgesät (96 Well format, je 200 μ L). Am Tag der Transfektion wurde nochmals das Kulturmedium gewechselt.

Tabelle 6.10: Ansätze für Luciferase Transfektion Assay

N/P Verhältnis	pPRLEF1α (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Polymer (1$\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	10 mM Tris
0	100 ng (6 μL)	-	ad 90 μL
1	100 ng (6 μL)	x (ng) x (μL)	ad 90 μL
3	100 ng (6 μL)	x (ng) x (μL)	ad 90 μL
5	100 ng (6 μL)	x (ng) x (μL)	ad 90 μL
7	100 ng (6 μL)	x (ng) x (μL)	ad 90 μL
9	100 ng (6 μL)	x (ng) x (μL)	ad 90 μL
10	100 ng (6 μL)	x (ng) x (μL)	ad 90 μL
Positiv Kontrolle (PK) FuGENE[®]HD	100 ng (6 μL)	1,5 μL *	ad 90 μL IMDM

* Verwendung nach Herstellerangaben.

Die p-DNA wurde in Reinstwasser vorgelegt, dann das Polymer, gelöst in Tris-Puffer hinzupipettiert. Im Anschluss daran wurde der Reaktionsansatz durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gemischt und über Nacht inkubiert.

Tabelle 6.10 zeigt verschiedene Ansätze (steigende Menge Polymer) die hinzupipettiert wurden. Bei den Ansätzen handelt es sich um Hexaplikate. Je N:P-Verhältnis wurde jeweils ein Triplikat für die Versuche ohne bzw. mit Chloroquin angesetzt. Es wurden je Well einer 96-Loch-Platte 15 μl eines Transfektionsansatzes zu den Zellen tropfenweise hinzugegeben.

Nach Zugabe der Transfektionsansätze zu den Zellen wurden die Zellkulturplatten für 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Kulturmedium bei den Ansätzen der HEK 293T-Zellen abgenommen. Die Zellsedimente wurden in den Gewebe-Kulturplatten mit Hilfe einer Mehrkanalpipette mit je 100 μl 1 x *Renilla* Luciferase Assay Lysepuffer (der 5 x Lysepuffer wurde mit Aqua dest. vorverdünnt) versetzt. Nach 20-minütiger Lyse der Zellen wurden die Lysate bis zur Messung bei -20 °C gelagert.

Zur Messung der Lysate wurde eine Stunde vor Messbeginn die Substratlösung der *Renilla*-Luziferase in braunen lichtundurchlässigen 50 ml Reaktionsgefäßen angesetzt. Die Lysate wurden aufgetaut und jeweils 30 µl mittels einer Mehrkanalpipette in weiße 96 Loch Platten (Microplatte, Lumitrac 200) nach mehrmaligen auf- und abpipettieren überführt und bis zur Messung bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Vor dem Messen wurde das Luminometer mit der *Renilla*-Luziferase-Substratlösung befüllt. Mit Hilfe der Mikro Win 2000-Software wurden die Proben analysiert, wobei folgende Voreinstellungen getroffen wurden: Zugabe von 100 µl Substratlösung, 3 Sekunden Äquilibrierungsphase und 10 Sekunden Meßdauer.

MTT-Assay

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid (MTT) ist ein membran-gängiges Salz. In Zellen mit aktivem Stoffwechsel (NADPH im Mitochondrium) wird es zum wasserunlöslichen blauvioletem Formazan reduziert. Nach Lyse der Zellen können die Kristalle solubilisiert und über ein Spektrometer kann die optische Dichte bei 570 nm kolorimetrisch bestimmt werden. Somit kann die Stoffwechselaktivität bestimmt und ein Rückschluss auf die Zellviabilität gezogen werden.

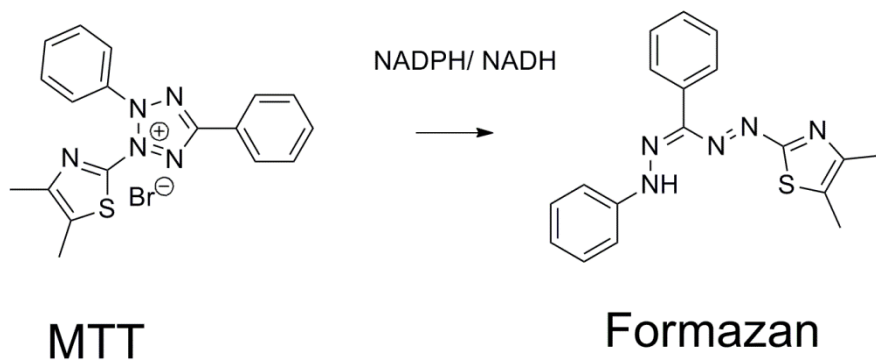


Abbildung 6.18: Reduktion von MTT zur Formazan

Die Versuche wurden mit dem CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit der Firma Promega nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Zunächst wurden die Zellen, wie beim Luciferase-Assay Abschnitt beschrieben, im 96-Loch Format transfiziert und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Für das Polymer T4 wurden zusätzlich noch die N:P-Verhältnisse 20 und 100 austitriert.

Daraufhin wurden je Well 30 μl Substratlösung mit Hilfe einer Mehrkanalpipette hinzugegeben und die Ansätze für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden mittels einer Mehrkanalpipette je Well 100 μl Solubilisierungslösung hinzugefügt und die Ansätze für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurde die optische Dichte (oD) der Ansätze mittels eines Absorptions-Lesegeräts bei 570 nm ermittelt.

Konfokale Mikroskopie der Polyplexe in HEK293 Zellen

Die Zelle wurden auf einer μ -Slide (Deckglas mit Kammern) im 8-Well Format (Ibidi) mit 2×10^5 Zellen /mL ausgesät. 24 Stunden nach der Inkubation bei 37 °C wurde das Medium mit OptiMEM ersetzt und die Zellen mit den Polyplexen (N/P=7) inkubiert. Anschließend wurde das 8-Well Format mit einem konfokalen Mikroskop, welches mit einer „*live cell Unit*“ ausgestattet war, analysiert. Die Bilder wurden mit einem *Leica-Mikroskop* und der *Leica Application suite freeware* Software analysiert.

Durchflusszytometrische Messungen (FACS-Analysen)

Über die am Anfang beschriebene FACS-Messungen wurde im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Werte ermittelt. Die Methodik wurde von [REDACTED] unter anderem im Rahmen seiner Diplomarbeit optimiert.^[155, 164]

-Es kann die Anzahl der Zellen bestimmt werden, die positiv für den verwendeten Polymerfarbstoff Oregon Green sind. Es kann also bestimmt werden, wie gut Zellen das Polymer aufnehmen.

-Unter Verwendung von fluoreszierenden Reportergenen (z. Bsp. In EGFP und dsRED Konstrukten) kann die Transfektionseffizienz ermittelt werden. Ein großer Vorteil hierbei ist die Möglichkeit, den prozentualen Anteil an erfolgreich transfizierten Zellen direkt bestimmen zu können, was einen direkten Vergleich verschiedener Transfektionsvektoren ermöglicht.

-Durch die zusätzliche Verwendung von zelltypspezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern können bestimmte Zelltypen markiert werden. Auf diese Weise können verschiedene Zellpopulationen detektiert werden, z. Bsp. früh-und

spätapoptotische Zelle sowie nekrotische Zellen und eine genauere Aussage über die Zytotoxizität gemacht werden.

Es wurden HEK-293 T-Zellen 24 Stunden vor Versuchsbeginn geerntet die erforderliche Zellzahl eingestellt ($1,5 \times 10^5$ Zellen/4 mL für Transfektion und 5×10^4 / 4 mL für Cytotoxizitätsmessungen) und auf Loch-Gewebe Kulturplatten ausgesät (6 Well format, je 4 mL). Für alle Versuche mit Polymeren mit reduktiv spaltbarer Disulfidgruppe (T9) wurde ein Medium ohne β -Mercaptoethanol verwendet, da es sonst zu einer vorzeitigen Spaltung des Disulfids kommen könnte. Am Tag der Transfektion wurde nochmals das Kulturmedium gewechselt.

Tabelle 6.11: Durchgeführte Ansätze für FACS-Transfektion Assay

Verwendetes Polymer	N/P Verhältnis	(p-DNA) 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Menge Polymer 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Tris-Puffer
T3	7	1 μg	28,7 μg	ad 200 μL
T3	7	5 μg	143,5 μg	ad 200 μL
T3	7	10 μg	287 μg	ad 200 μL
T4	7	1 μg	21,7 μg	ad 200 μL
T4	7	5 μg	108,5 μg	ad 200 μL
T4	7	10 μg	217 μg	ad 200 μL
T9	7	1 μg	26,6 μg	ad 200 μL
T9	7	5 μg	133 μg	ad 200 μL
T9	7	10 μg	266 μg	ad 200 μL
jetPEI®*		1 μg	2 μL	ad 200 μL
jetPEI®*		2,5 μg	5 μL	ad 200 μL
jetPEI®*		5 μg	10 μL	ad 200 μL
jetPEI®*		10 μg	20 μL	ad 200 μL
Freie p-DNA	0	2,5 μg		ad 200 μL
Freie p-DNA	0	5 μg		ad 200 μL

*Verwendung nach Herstellerangaben

Die p-DNA wurde in Reinstwasser vorgelegt, dann das Polymer, gelöst in Tris-Puffer, hinzupipettiert. Im Anschluss daran wurde der Reaktionsansatz durch vorsichtiges auf- und abpipettieren gemischt und über Nacht inkubiert.

Tabelle 6.11 zeigt verschiedene Ansätze (steigende Menge Polymer) die hinzupipettiert wurden. Für alle Transfektion / Zytotoxizitätsmessungen über FACS wurde Polyplex mit N/P =7 benutzt, wobei die Menge an p-DNA variiert wurde. Da bei der Zytotoxizitätsmessung nur ein Drittel der Zellen benutzt wurde, wurde auch die Menge an Polyplex um den Faktor 3 reduziert. Nach Inkubation wurden je Well einer 6-Loch-Platte 200 µl eines Transfektionsansatzes zu den Zellen tropfenweise hinzugegeben.

Nach Zugabe der Transfektionsansätze zu den Zellen wurden die Zellkulturplatten für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert, wobei nach 6 Stunden frisches Zellmedium hinzugegeben wurde. Die Durchführung der Transfektion geschah ohne Licht an der Sterilbank. Bei den Transfektions-Ansätzen der HEK 293T-Zellen wurde das Kulturmedium vorsichtig abgenommen, die Zellen mit 1 ml 1xPBS (pH 7,2) von der Gewebe-Kulturplatte gespült, in FACS-Röhrchen überführt und bei 4 °C und 1.200 rpm für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellsedimente mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstands wurden freie Fc-Rezeptoren der Zellen durch Zugabe des Antikörpers 2.4G2 abgesättigt und einige der Ansätze unter Lichtausschluss bei 4 °C mit Annexin V und 7-AAD inkubiert. Annexin V bindet selektiv an Phosphatidylserin auf der Außenseite der Membran apoptotischer Zellen. 7-AAD interkaliert in die DNA nekrotischer Zellen. Nach der Inkubation wurden die Ansätze erneut mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (10 Minuten bei 4 °C und 1.200 rpm) und anschließend in 400 µl 1x PBS aufgenommen. Dem schloss sich die eigentliche durchflusszytometrische Messung an, bei der pro Ansatz jeweils 50.000 Zellen mit Hilfe der *CellQuestTM-Software* (BD Biosciences) analysiert wurden. Die Ergebnisanalyse und -auswertung erfolgte mit Hilfe des Programmes *FlowJo* (FlowJo, Ashland, USA).

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Konzept für Polymere Therapeutika ^[6]	2
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung verschiedener Polymeren Therapeutika ^[5]	3
Abbildung 1.3: Allgemeine Konzepte zur Synthese von Polymer-Protein Konjugaten: „Grafting to“, „Grafting from“, „Grafting through“ ^[45]	7
Abbildung 1.4: Verschieden Möglichkeiten zur kovalenten Anbindung von Polymere an Antikörper. A.: Aminolyse von Aktivestergruppen am Polymer mit Aminogruppen auf dem Antikörper. B.: Hydrazonbindung zwischen oxidierten Zuckerresten (Aldehyden) auf dem Antikörper und Hydrazin-Gruppen am Polymer. C.: Thioetherbindung zwischen Thiolgruppen (zum Beispiel Fab- Fragment) und Maleinimid Gruppen am Polymer. ^[47]	8
Abbildung 1.5: Änderung der Bindungskonstanten in Abhängigkeit der Konjugationsmethode ^[37]	9
Abbildung 1.6: Ausbildung der Amidbindung zwischen Glutamin- und Lysin-Seitenkette katalysiert durch das Enzym Transglutaminase (mod. aus ^[71]).....	11
Abbildung 1.7: Selektive Anbindung von Substraten an Antikörper unter Verwendung des Enzyms Transglutaminase ^[72]	12
Abbildung 1.8: Kondensation von p-DNA: A.: mit kationischen Polymeren; B.: mit Blockcopolymeren bestehend aus einem kationischen Block und einem hydrophilen Block ^[90]	14
Abbildung 1.9: Beispiele für synthetische, nicht-virale, polymere Systeme zum Einschluss/Transport von p-DNA ^[89]	15
Abbildung 1.10: Intra- und extrazelluläre Barrieren für den systemischen Transport von p- DNA ^[90]	17
Abbildung 1.11: Häufig verwendete polymeren Strukturen für die Transfektion mit p- DNA ^[119]	18
Abbildung 2.1: Mechanismus des RAFT-Prozesses ^[125]	21
Abbildung 2.2: Der C-Typ Lektin Rezeptor DEC-205 ^[129]	23
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines Immunglobulins (IgG) und dessen Fragmente. F _V : variabler Teil verantwortlich für spezifische Bindung; Fab- Fragment: „die beiden „Bindungsarme“ des Antikörpers; V _H /V _L : Variable Domänen der schweren und leichten Kette; F _C : Schwere Ketten zuständig für die Komplement Aktivierung, -S-S-: Kovalente Disulfidbrücken zur	

Stabilisierung.C _{H/L} 1-3: Konstante Domänen; Hinge-Region: beweglicher Teil zuständig für Flexibilität ^[134]	25
Abbildung 2.4: Unterschiedliche Formate rekombinanter Antikörper ^[134]	27
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Größenausschlusses und Trennung von Makromolekülen in der GPC (grau: Säulenmaterial, rot: größere Polymere, blau: kleinere Polymere) ^[140]	28
Abbildung 2.6: Experimenteller Aufbau der FCS ^[141]	30
Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie ^[142]	33
Abbildung 2.8: Schematischer Aufbau der „Confocal Laser Scanning Microscopy“ ^[143] ...	34
Abbildung 4.1: „Michael Addition“ von Thiolen an Maleinimide unter physiologischen Bedingungen	37
Abbildung 4.2: Synthese von p[PFMA] über den RAFT-Prozess	38
Abbildung 4.3: Beweis für Entfernung der CTA-Endgruppe nach der RAFT- Polymerisation mit Säure-CTA durch ACVA	39
Abbildung 4.4: GPC in THF von p[PFMA] A/B	39
Abbildung 4.5: Synthese von statistisch Maleinimid modifiziertem, Farbstoff gekoppeltem HPMA-Copolymer Stat.-HPMA A	40
Abbildung 4.6: Gezieltes Abquenchen der Maleinimid-Gruppe mit Cystein (Stat-HPMA A Referenz).....	41
Abbildung 4.7: Synthese des Polymer-Antikörper Konjugats über die Reaktion von Maleinimid-modifiziertem HPMA-Polymer und Thiol-modifiziertem Antikörper	41
Abbildung 4.8: Reduktion eines Testantikörpers: A) Spur2: nativer Antikörper, Spur1: Antikörper reduziert mit 1 M DTT; B) Spur1: nativer Antikörper, Spur2: Antikörper reduziert mit 0,1 mM DTT, Spur3: Antikörper reduziert mit 0,1 mM DTT und direkte Umsetzung mit Stat.-HPMA A für 24 Stunden	43
Abbildung 4.9: Gezielte Einführung von Thiol-Gruppen an Antikörper über Traut`s Reagenz 2-IT	43
Abbildung 4.10: SDS-PAGE der verschiedenen Konjugationsschritt von A) monoklonalem aRAGE-Antikörper und B) polyklonalem huIgG: Spur 1: nativer AK, Spur 2: AK modifiziert mit 40 eq. Traut`s Reagenz 2-IT, Spur 3: nach Reduktion mit 25 eq. TCEP, Spur 4: Nach Umsetzung mit Stat.-HPMA A, Spur 5: Nach Abtrennung von freiem Polymer, Spur 6: Umsetzung von Stat.-HPMA A mit nativem, unmodifiziertem AK	44
Abbildung 4.11: Konjugation von Thiol-modifiziertem aRAGE Antikörper / huIgG mit Stat.-HPMA Polymer.....	44
Abbildung 4.12: SEC in gepuffertem Medium (0,05 M Na ₃ PO ₄ , 0,15 M NaCl, pH 7; Superose [®] 6 10/300 GL Säule) von aRAGE und Stat.-aRAGE Konjugat	45

Abbildung 4.13: Autokorrelationskurven für Stat.-HPMA A (rot) und Stat.-aRAGE Konjugat (blau).....	46
Abbildung 4.14: Fluoreszenzmikroskopie von : A) HEK Flp-In Zellen, RAGE überexprimierend, inkubiert mit aRAGE-Antikörper und versetzt mit einem Cy3-markiertem sekundären Antikörper; B) SK-N-MC cells, nicht RAGE exprimierend, inkubiert mit aRAGE-Antikörper; C) HEK Flp-In Zellen, RAGE überexprimierend, inkubiert mit Stat.-aRAGE-Konjugat and D) SK-N-MC Zellen, nicht RAGE exprimierend, inkubiert mit Stat.-aRAGE Konjugat.....	47
Abbildung 4.15: Western-Blot: i) SK-N-MC Zelllysate, nicht RAGE exprimierend, aufgetrennt über SDS-PAGE, auf Nitrocellulose übertragen und inkubiert mit: Spur1: aRAGE, detektiert mit einem Enzymgekoppelten, sekundären Anti-Maus-Antikörper und dem entsprechenden ECL-Substrat; Spur3: Stat.-aRAGE-Konjugat (Detektion über Polymerfarbstoff). ii) HEK Flp-In Zelllysate, RAGE überexprimierend, auf getrennt über SDS-PAGE, auf Nitrocellulose übertragen und inkubiert mit: Spur2: aRAGE-Antikörper, detektiert mit einem Enzymgekoppelten, sekundären Anti-Maus-Antikörper und dem entsprechendem Anti-Maus-Antikörper, Spur4: Mit Stat.-aRAGE-Konjugat (detektiert über Polymerfarbstoff).....	48
Abbildung 4.16: A) Unterschiedliche Gates zur Sortierung von PBMC`s basierend auf farbstoffgekoppelten mAb: anti-CD ₃ (T-Zellen), anti-CD ₁₄ (Monozyten), und anti-CD ₁₉ (B-Zellen). B) Intensität von zellassoziierter Fluoreszenz: gemittelte Fluoreszenz Intensitäten von PBMC`s alleine (grau, neg. Kontrolle), PBMC`s +Stat.-HPMA A Referenz (gepunktet) und PBMC`s mit Stat.-huIgG Konjugat (liniert).....	49
Abbildung 4.17: PBMC`s inkubiert mit verschiedenen Mengen Stat.-HPMA A Referenz für 16 Stunden. Zellviabilität wurde über den prozentualen Anteil von 7-AAD negative Zellen bestimmt (MTT-Assay). (Eins von drei repräsentativen Experimenten gezeigt; pos. Kontrolle : H ₂ O ₂)	50
Abbildung 4.18: Synthese von „sternförmigen“ Polymer-Antikörper Konjugaten durch Verwendung von Endgruppe-Maleinimid modifizierten HPMA-Copolymeren (unten)	51
Abbildung 4.19: Synthese von selektiv Endgruppen-modifizierbaren Boc-PEG p[PFMA]	53
Abbildung 4.20: Beweis für Entfernung der CTA-Endgruppe nach der RAFT-Polymerisation mit Boc-PEG-CTA durch ACVA	53
Abbildung 4.21: GPC in THF von Boc-PEG-p[PFMA] A/B/C.....	54
Abbildung 4.22: Synthese von selektiv Endgruppen-Maleinimid modifiziertem HPMA-Copolymer aus Boc-PEG-Poly[PFMA] C	55
Abbildung 4.23: Gezieltes Abquenzen der Maleinimid-Gruppe von End-HPMA Polymer mit β-Mercaptoethanol zu End-HPMA Referenz.....	56

Abbildung 4.24: Synthese von Stat.-aDEC-205/IgG2a und End-aDEC-205/ IgG2a Konjugaten.....	57
Abbildung 4.25: SEC in gepuffertem Medium (0,05 M Na ₃ PO ₄ , 0,15 M NaCl, pH 7; Superose [®] 6 10/300 GL Säule) von A): nativem aDEC-205, aDEC-205 modifiziert mit 100 eq. 2-IT und End-aDEC-205 und B):nativem IgG2a, IgG2a modifiziert mit 100 eq. 2-IT und End-IgG2a.....	58
Abbildung 4.26: SEC in gepuffertem Medium (0,05 M Na ₃ PO ₄ , 0,15 M NaCl, pH 7; Superose [®] 6 10/300 GL Säule) von A): nativem aDEC-205, aDEC-205 modifiziert mit 40 eq. 2-IT und Stat-aDEC-205 und B):nativem IgG2a, IgG2a modifiziert mit 40 eq. 2-IT , IgG2a modifiziert mit 40eq. 2-IT und Stat.-IgG2a	60
Abbildung 4.27: SDS-PAGE von aDEC-205, End-aDEC-205 und Stat.-aDEC-205 Konjugaten.....	61
Abbildung 4.28: Autokorrelationskurven für End-HPMA Polymer (blau) bzw. End-aDEC-205 Konjugat (schwarz))	61
Abbildung 4.29: Autokorrelationskurven für Stat.-HPMA Polymer C (blau) bzw. Stat.-aDEC-205 Konjugat.(schwarz)	62
Abbildung 4.30: FACS Messung (Detektion von PE-Cy7 modifizierten Antikörpern) von Dendritischen Zellen (24 Stunden nach Inkubation) mit A): neg.Kontrolle, B): IgG2a-Isotyp, C) aDEC-205. D). Unterschiede zwischen aDEC-205 /IgG2a Isotyp Bindung vor und nach der Modifikation mit 100 eq- 2-Iminothiolan...	63
Abbildung 4.31: Zeit-abhängige Bindung von End-und Stat.-aDEC-205 Konjugaten (2µg/mL) (Isotyp-Konjugaten und Referenz-Polymeren) an Dendritischen Zellen aus Maus-Knochenmark bestimmt über FACS-Analyse	63
Abbildung 4.32: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie von BMDC`s 24 Stunden nach Inkubation mit End-und Stat.-Konjugaten und Referenzpolymeren (2µg/mL). (Blau: Zellkern angefärbt mit Hoechst, rot: Plasmamembran angefärbt mit CellMask©Orange). Zellen positiv für den Polymergebundenen Farbstoff Oregon Green 488 sind mit Pfeilen markiert. Vergrößerungen von Zellen mit Polymerfarbstoff sind am unteren Bildrand gezeigt. (Größenmaßstab: 20 µm)	65
Abbildung 4.33: Zellspezifische Aufnahme von End-und Stat.- Konjugaten (Isotyp-Konjugaten und Referenzpolymeren) nach 24 Stunden (2 µg/mL) von Splenozyten bestimmt über FACS-Messungen	66
Abbildung 4.34: Temperaturabhängige Bindung nach 24 Stunden (20µg/mL) von End-Konjugaten und Referenzpolymer an BMDC`s bestimmt über FACS-Messungen	67
Abbildung 4.35: BMDC`s inkubiert mit verschiedenen Mengen an End-aDEC-205, IgG2a Konjugaten und End-HPMA Referenz für 4 Stunden. Zellviabilität wurde über	

den prozentualen Anteil von 7-AAD negative Zellen bestimmt (MTT-Assay). (pos. Kontrolle : DMSO).....	67
Abbildung 4.36: Bildung von polyplexen Mizellen aus kationischen p[Lysin]-b-p[HPMA] Blockcopolymeren und negativ geladener p-DNA	71
Abbildung 4.37: Synthese Schemata für Blockcopolymeren. A)Über RAFT-Polymerisation unterschiedlicher Monomere. B): Über RAFT-Polymerisation mit modifiziertem Kettentransferreagenz	72
Abbildung 4.38: Syntheschema der „Makro-Lysin-CTA`s“	73
Abbildung 4.39: Strukturen der verschiedenen synthetisierten Makro-Lysin-CTA`s	74
Abbildung 4.40: Synthese der p[HPMA]-b-p[Lys] Blockcopolymeren	74
Abbildung 4.41: GPC in HFIP von poly[Lys(Boc)] ₁₀ -CTA und p[Lys(Boc)] ₁₀ -b-p[HPMA]	76
Abbildung 4.42: GPC in HFIP von p[Lys(Boc)] ₂₀ -CTA und p[Lys(Boc)] ₂₀ -b-poly[HPMA]	76
Abbildung 4.43: GPC in HFIP von p[Lys(Z)] ₃₀ -CTA und p[Lys(Z)] ₃₀ -b-poly[HPMA] A	77
Abbildung 4.44: Reaktionsbedingungen zur Entschützung der Polylysin-Blöcke im Säuren	78
Abbildung 4.45: GPC in HFIP von p[Lys(Boc)] ₁₀ -b-p[HPMA](grün) und p[Lys] ₁₀ -b- p[HPMA] (rot) (nach Entschützung).....	79
Abbildung 4.46: GPC in HFIP von p[Lys(Boc)] ₂₀ -b-p[HPMA] (grün) und p[Lys] ₂₀ -b- p[HPMA] (rot)(nach Entschützung).....	79
Abbildung 4.47: GPC in HFIP von p[Lys(Boc)] ₃₀ -b-p[HPMA] (grün) und p[Lys] ₃₀ -b- p[HPMA] (rot)(nach Entschützung).....	80
Abbildung 4.48: Modifizierung von p[Lys] ₃₀ -b-p[HPMA] T4 mit Histidin.....	81
Abbildung 4.49: Strukturformeln der verwendeten kationischen Blockcopolymeren T1, T3, T4, T5	81
Abbildung 4.50: Agarose-Gelelektrophorese für p[Lys] ₁₀ -b-p[HPMA] (T1), p[Lys] ₂₀ -b- p[HPMA] (T3) und p[Lys] ₃₀ -b-p[HPMA] (T4)	83
Abbildung 4.51: Bestimmung der Zellaufnahme von Polyplexen aus p-DNA und Blockcopolymeren T1, T3, T4 und T5 (N/P =7) über FACS. (y-Achse:MFI (Mittelere Fluoreszenzintensität des Polymerfarbstoffes Oregon Green 488; MOCK: neg. Kontrolle ((nackte p-DNA, N/P =0, +=Anzahl Durchführungen)	84
Abbildung 4.52: Konfokale Mikroskopie-Aufnahmen von HEK-293T Zellen nach Inkubation mit Polyplexen aus p-DNA und Oregon Green 488 markiertem Polymer T3 bzw. T4 (N/P=7).....	85
Abbildung 4.53: Transfektionseffizienz(Biolumineszenz) für die Polyplexe aus p-DNA und den entsprechenden Blockcopolymeren für verschiedene N/P Verhältnisse an HEK-293T Zellen nach 24 Stunden (normalisiert, indem die Differenz	

	zwischen dem Transfektionsansatz ohne Polymerzugabe („N/P=0“) und der Transfektionsansätze mit Polymerzugabe gebildet wurde. Danach wurden die errechneten Werte durch den höchsten ermittelten Wert geteilt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen „ohne Polymer“ transfizierten Zellen und „mit Polymer“ transfizierten Zellen sind angegeben. (N=3).....	86
Abbildung 4.54:	Transfektionseffizienz(Biolumineszenz) für die Polyplexe gebildet aus p-DNA und den entsprechenden Blockcopolymeren (0,6 µg p-DNA, N/P =7) bzw. FuGeneHD [®] (0,1 µg p-DNA) an HEK-293T Zellen nach 24 Stunden ermittelt über Luciferase-Assay (normiert auf die positiv Kontrolle (PK) FuGeneHD [®])	87
Abbildung 4.55:	Autokorrelationskurven für A): Blockcopolymer T3 (blau) und Polyplex aus p-DNA und Polymer T3 (rot) für N/P =7; B): Blockcopolymer T4 (blau) und Polyplex aus p-DNA und Polymer T4 (rot) für N/P =7	89
Abbildung 4.56:	Viabilität von HEK-293T Zellen A) nach Inkubation mit Polyplexen aus p-DNA und den entsprechenden Blockcopolymeren für verschiedene N/P Verhältnisse bestimmt über MTT-Assay. Zellvitalität (%) normalisiert indem die Probe mit nackter p-DNA (N/P=0) auf 100 % gesetzt wurde (pos. Kontrolle DMSO).B) Nach Inkubation mit kommerziellen, nicht viralen Transfektionsreagenzien bestimmt über MTT-Assay. Zellvitalität (%) normalisiert indem die Probe mit nackter p-DNA (N/P=0) auf 100 % gesetzt wurde (pos. Kontrolle DMSO)	91
Abbildung 4.57	Durchflusszytometrie (FACS-Messungen) an HEK-293T Zellen zur Quantifizierung der GFP-(bzw. DsRed) exprimierenden Zellen nach Transfektion mit nackter p-DNA (5µg), FuGeneHD [®] (5µg) und Polymer T4 (5µg p-DNA, N/P=7) nach 24 Stunden.(x-Achse: FSC: Größe der Zellen; y-Achse: Fluoreszenzintensität von GFP, bzw. dsRed bei FuGene)	93
Abbildung 4.58:	Durchflusszytometrische Bestimmung der Toxizität von p-DNA, Polyplexen aus p-DNA und Polymer T4 (5µg p-DNA; N/P=7) und FuGeneHD [®] (5µg) an HEK-293T Zellen nach 24 Stunden. (p-DNA und Polyplex mit T4: x-Achse: AnnexinV Färbung, y-Achse 7-AAD; FuGeneHD [®] : x-Achse 7-AAD, y-Achse AnnexinV).....	94
Abbildung 4.59:	Synthese des Makro-Lysin-CTA`s mit reduktiv spaltbarer Disulfidbrücke (Makro-Disulfid-Lysin-CTA).....	97
Abbildung 4.60:	Syntheschemata zur gezielten Einführung eines reduktiv spaltbaren Disulfid-Linkers am p[Lys]-b-p[HPMA] Blockcopolymer. (p[Lys]-b-S-S-p[HPMA]).....	98
Abbildung 4.61:	GPC in HFIP von p[Lys(Z)]-S-S-CTA und p[Lys(Z)] ₃₀ -S-S-b-p[HPMA] A-C	99

Abbildung 4.62: Kontrolle der intakten Disulfidbrücke durch gezielte Reduktion mit TCEP	99
Abbildung 4.63: GPC in HFIP nach gezielter Reduktion mit TCEP für p[Lys(Z)] ₃₀ -S-S-b-p[HPMA] A (blau: Blockcopolymer, rot: nach Reduktion).....	100
Abbildung 4.64: GPC in HFIP nach gezielter Reduktion mit TCEP für p[Lys(Z)] ₃₀ -S-S-b-p[HPMA] B (blau: Blockcopolymer, rot: nach Reduktion)	100
Abbildung 4.65: GPC in HFIP nach gezielter Reduktion mit TCEP für p[Lys(Z)] ₃₀ -S-S-b-p[HPMA] C (blau: Blockcopolymer, rot: nach Reduktion).....	101
Abbildung 4.66: Entschützung von p[Lys(Z)] ₃₀ -S-S-b-p[HPMA] zu p[Lys] ₃₀ -S-S-b-p[HPMA] mit Methansulfonsäure in TFA	101
Abbildung 4.67: GPC in HFIP von p[Lys(Z)] ₃₀ -S-S-b-p[HPMA] A vor (rot) und nach Entschützung (grün) mit Methansulfonsäure in TFA.....	102
Abbildung 4.68: GPC in HFIP von p[Lys(Z)] ₃₀ -S-S-b-p[HPMA]B vor (rot) und nach Entschützung (grün) mit Methansulfonsäure in TFA.....	102
Abbildung 4.69: GPC in HFIP von p[Lys(Z)] ₃₀ -S-S-b-p[HPMA] C vor(rot) und nach Entschützung (grün) mit Methansulfonsäure in TFA.....	103
Abbildung 4.70: Agarose-Gelelektrophorese für p[Lys(Z)] ₃₀ -S-S-b-p(HPMA) A (T9)...	103
Abbildung 4.71: Autokorrelationskurven für das Blockcopolymer T9 (blau) und Polyplex aus p-DNA und Polymer T9 (rot) für N/P =7	104
Abbildung 4.72: Konfokale Mikroskopieaufnahmen von HEK-293T Zellen nach Inkubation mit Polyplexen aus p-DNA und Oregon Green 488 markiertem Polymer T9 (N/P=7).....	105
Abbildung 4.73: Über Durchflusszytometrie bestimmte Transfektionseffizienz (% an eGFP positiven HEK-293T Zellen) für steigenden Mengen an p-DNA nach 24, 48 und 72 Stunden für drei unabhängige Messungen (Polyplexe N/P=7)	106
Abbildung 4.74: Transfektionseffizienzen (% an eGFP positiven Zellen) nach 24, 48 und 72 Stunden an HEK-273T Zellen. (Polyplexe N/P =7; N=3).....	108
Abbildung 4.75: Anzahl an spätapoptotischen HEK-293T Zellen (positiv für AnnexinV und 7AAD) 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion. (Polyplexe N/P =7) für verschiedene Mengen an p-DANN.....	109
Abbildung 4.76: „Transglutaminase“ katalysierte Amidbildung zwischen einem Glutaminrest (primäres Säureamid) und einem Lysinrest (primäres Amin) ^[72]	113
Abbildung 4.77:Gezielte Funktionalisierung eines Antikörpers mit einem Lysin-modifizierten Cyclooctin durch Kombination der Enzyme PNGase F (Deglkosilierung) und Transglutaminase (kovalente Anbindung an den Glutaminrest 295).....	114
Abbildung 4.78: Mehrstufige Synthese eines Lysin-modifizierten Cyclooctins (COD 1) ausgehend von Cyclohepten	115

Abbildung 4.79: Synthese eines alternativen Lysin-Cyclooctinderivates (COD 2) ausgehend von kommerziellen Cyclooctinderivat	115
Abbildung 4.80: Test der Cyclooctin-Azid-Kupplung durch Umsetzung des Cyclooctinderivats 1 (COD 1) mit einem PEG-Azid	116
Abbildung 4.81: ESI-MS des Cyclooctin (COD 1)-Azid Kopplungsproduktes	116
Abbildung 4.82: SEC-Elugramme von aDEC-205/IgG2a vor (blau) und nach der Modifizierung mit dem Cyclooctinderivat	117
Abbildung 4.83: Synthese eines Azid-funktionalisierten p[Lys(Z)]-b-p[HPMA] Blockcopolymers (p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid)])	119
Abbildung 4.84: GPC in HFIP von p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid)]	120
Abbildung 4.85: Nachweis der intakten Azid-Gruppe von p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid)] über IR-Spektroskopie	120
Abbildung 4.86: Kontrollierte Bildung von mizellaren Strukturen des Blockcopolymers p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid)] in wässrigem Milieu	121
Abbildung 4.87: SEC in wässrigem Medium von Blockcopolymer ohne- (rot) und mit (blau) hydrophober Z-Schutzgruppe am Polylysin	121
Abbildung 4.88: Schematische Darstellung der Modifizierung von Azid-funktionalisierten mizellaren Strukturen aus p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid)] mit über Transglutaminase und Cyclooctin (COD 1) modifizierten Antikörpern aDEC-205(p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid-COD1-aDEC-205)])	122
Abbildung 4.89: Autokorrelationskurven für Farbstoff modifizierten Antikörper aDEC-205 vor-(blau) und nach Cyclooctin (COD 1) Modifizierung und Anbindung an Azid-funktionalisierte Mizellen (p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid-COD1-aDEC-205)])(rot)	123
Abbildung 4.90: Schematische Darstellung der Modifizierung von Azid-funktionalisierten mizellaren Strukturen aus p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid)] mit über Transglutaminase und Cyclooctin (COD 2) modifizierten Antikörpern aDEC-205(aus p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid-COD2-aDEC-205)])	124
Abbildung 4.91: Autokorrelationskurven für Farbstoff modifizierten Antikörper aDEC-205 vor-(blau) und nach Cyclooctin (COD 2) Modifizierung und Anbindung an Azid-funktionalisierte Mizellen (p[Lys(Z)]-b-p[HPMA(Azid-COD2-aDEC-205)])(rot)	124
Abbildung 4.92: Schematische Darstellung der Modifizierung von Azid-funktionalisierten mizellaren Strukturen aus p[LMA]-b-p[HPMA(Azid)] mit über Transglutaminase und Cyclooctin (COD 2) modifizierten Antikörpern aDEC-205(p[LMA]-b-p[HPMA(Azid-COD2-aDEC-205)])	125
Abbildung 4.93: Autokorrelationskurven für Farbstoff modifizierten Antikörper aDEC-205 vor-(blau) und nach Cyclooctin (COD 2) Modifizierung und Anbindung an	

Azid-funktionalisierte Mizellen (p[LMA]-b-p[HPMA(Azid-COD2-aDEC-205)](rot).....	126
Abbildung 4.94: SEC in wässrigem gepufferten Medium von p[LMA]-b-p[HPMA(Azid-COD2-aDEC-205)] (blau) und aDEC-205 nach Modifizierung mit COD 2 über Transglutaminase (rot)	127
Abbildung 6.1: Kontrolle der vollständigen Umsetzung von Reaktivester Polymeren über ¹⁹ F-NMR-Spektroskopie. A): Reaktivester Polymer vor der Umsetzung(Signale für Pentafluorophenyl Methacrylat); B): Reaktivester Polymer nach polymeranalogen Umsetzung (Signale für freies Pentafluorphenol); C): HPMA-Copolymer nach Aufarbeitung	136
Abbildung 6.2: ESI-MS von HOOC-Gly-[Lys(Boc)] ₁₀ -NH ₂	143
Abbildung 6.3: ESI-MS von HOOC-Gly-[Lys(Boc)] ₂₀ -NH ₂	143
Abbildung 6.4: 400 MHz- ¹ H-NMR-Spektrum von HOOC-poly[Lys(Z)] ₃₀ -NH ₂	144
Abbildung 6.5: 400 MHz ¹ H- ¹ H-cosy-NMR (D ₂ O) von 4-(((cyclooct-2-in-1-yl)oxy)methyl)benzoesäureamid-(5-carboxy-pentylamin) (Lys-Cyclooctin, COD 1)	157
Abbildung 6.6: 400 MHz- ¹ H-NMR-Spektrum von Stat.-HPMA Polymer C	161
Abbildung 6.7: 400 MHz- ¹ H-NMR-Spektrum von Stat.-HPMA Polymer C.	163
Abbildung 6.8: Kontrolle der Deblockierung des Polylysins. (oben: mit Boc-Gruppe; unten: ohne Boc-Gruppe.)	165
Abbildung 6.9: 400 MHz- ¹ H-NMR-Spektrum von poly[Lys] ₁₀ -b-poly[HPMA] (T1).....	165
Abbildung 6.10: 400 MHz- ¹ H-NMR-Spektrum von poly[Lys] ₂₀ -b-poly[HPMA] (T3)...	167
Abbildung 6.11: Kontrolle der Entfernung der Dithioesterendgruppe von p[Lys]-b-p[HPMA] über UV-Absorption bei 302 nm am Beispiel von poly[Lys(Z)] ₃₀ -b-poly[HPMA] A (T4)	168
Abbildung 6.12: Kontrolle der Deblockierung des Polylysin-Blocks. (oben: mit Z-Gruppe; unten: ohne Z-Gruppe.)	170
Abbildung 6.13: 400 MHz- ¹ H-NMR-Spektrum von poly[Lys] ₃₀ -b-poly[HPMA] (T4)...	171
Abbildung 6.14: 400 MHz- ¹ H-NMR-Spektrum von poly[Lys] ₂₀ -co-p[Lys(His)] ₁₀ -b-poly[HPMA] (T5).....	172
Abbildung 6.15: 400 MHz- ¹ H-NMR-Spektrum von poly[Lys] ₃₀ -b-S-S-poly[HPMA] (T9)	175
Abbildung 6.16: 400 MHz- ¹ H-NMR-Spektrum von p[Lys(Z)] ₃₀ -p[HPMA(Azid)]	176
Abbildung 6.17: Reaktion von Luciferin (Coelenterazin) zu Oxyluciferin durch Luciferase in Gegenwart von Sauerstoff, Licht und Ca ²	194
Abbildung 6.18: Reduktion von MTT zur Formazan	196

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Charakterisierung von p[PFMA] A/B	39
Tabelle 4.2: Charakterisierung von Stat.-HPMA A/ Referenzpolymer.....	41
Tabelle 4.3: Charakterisierung von Boc-PEG-p[PFMA] A/B/C.....	54
Tabelle 4.4: Charakterisierung von Stat.-HPMA C und End-HPMA Polymer.....	56
Tabelle 4.5: Charakterisierung der „sternförmigen Konjugate“ End-aDEC-205/IgG2a.....	59
Tabelle 4.6: Charakterisierung der „Makro-Lysin-CTA`s“	74
Tabelle 4.7: Charakterisierung der poly[Lys(Boc/Z)]-b-poly[HPMA] Blockcopolymer nach Umsetzung des Reaktivester und vor der Deblockierung des Polylysins	75
Tabelle 4.8: Charakterisierung der kationischen p[Lys]-b-p[HPMA] Blockcopolymer	78
Tabelle 4.9: Charakterisierung der p[Lys(Z)]-b-S-S-p[HPMA] Blockcopolymer	98
Tabelle 4.10: Charakterisierung von p[Lys(Z)] ₃₀ -S-S-b-p[HPMA] Blockcopolymeren ...	102
Tabelle 6.1: Unterschiedliche Molekulargewichte von Poly(PFMA).	159
Tabelle 6.2: Unterschiedliche Molekulargewichte von Stat.-HPMA Polymeren.	160
Tabelle 6.3: Unterschiedliche Molekulargewichte von Poly(PFMA) mit selektiv modifizierbarer Endgruppe	162
Tabelle 6.4: Unterschiedliche Ansätze für poly[Lys(Z)] ₃₀ -b-poly(HPMA).....	169
Tabelle 6.5 Charakterisierung der unterschiedlichen Blocklängen von poly[Lys] ₃₀ -b- poly[HPMA] nach der Entschützung mit HBr	170
Tabelle 6.6: Unterschiedliche Ansätze für poly[Lys(Z)] ₃₀ -S-S-b-poly[HPMA].....	174
Tabelle 6.7: Charakterisierung der unterschiedlichen Blocklängen von poly[Lys] ₃₀ -S-S-b- poly[HPMA] nach der Entschützung mit Methansulfonsäure.....	174
Tabelle 6.8: Verwendete p-DNA Konstrukte	190
Tabelle 6.9: Benötigte Mengen der Blockcopolymer T1, T3, T4, T5 und T9 für N/P=1	191
Tabelle 6.10: Ansätze für Luciferase Transfektion Assay	195
Tabelle 6.11: Durchgeführte Ansätze für FACS-Transfektion Assay.....	198

7.3 Abkürzungsverzeichnis

Abs.	absolut
AcOH	Essigsäure
ACVA	4,4-azobis(4-cyanovaleriansäure)
AIBN	Azo-bis-(isobutyronitril)
Amp	Ampicilin
ATR	Attenuated Total Reflection
ATRP	Atom Transfer Radical Polymerization
Avidität	Stärke einer multivalenten Bindung
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BMDC's	bone marrow derived dendritic cells
Bp	base pairs
CD ⁴⁺	Oberflächenrezeptor spezifisch für regulatorische T-Zellen
CD ⁸⁺	Oberflächenrezeptor spezifisch für zytotoxische T-Zellen
c-DNA	klonierte DNA
COD	Cyclooctin-Derivat
CTA	Chain-Transfer Agent
CuAAC	Copper Catalyzed Azide-Alkyne Coupling
d	Tage
d. Th.	der Theorie
DBU	Diazabicycloundecen
DC's	dendritische Zellen
DEC-205	Oberflächenrezeptor spezifisch für dendritische Zellen
aDec-205	Antikörper gegen DEC-205
Dest	desilliert
DIPEA	Diisopropylethylamin

Anhang

Dioxan:	1,4 Dioxan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (=DNS)
p-DNA	Doppelsträngige prokaryotische DNA
DPPO	Dibenzoylperoxid
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eq.	Äquivalente
EtOAc	Essigsäureethylester
EtoEt	Diethylether
Fab-Fragment	Fragment Antigen Binding
Fc Teil	zuständig für Komplement Aktivierung
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl-Schutzgruppe
GPC	Gelpermeations Chromatographie
Ges.	Gesättigt
HBTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)uranium hexafluorophosphate
n-Hex	n-Hexan
HPA	2-Hydroxylpropylamin
HPMA	<i>N</i> -(2-Hydroxypropyl)-Methacrylamid
p[HPMA]	poly[<i>N</i> -(2-Hydroxypropyl)-Methacrylamid
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
h	Stunden
huIgG	humanes Immunglobulin G
<i>IgG</i>	Immunglobulin G
IgG2a	Immunglobulin G Subtyp 2a, Isotyp
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium

Anhang

<i>In vivo</i>	Im lebenden Organismus
<i>In vitro</i>	In Zellkultur
2-IT	2-Iminothiolan
Kan.	Kanamycin
<i>kDa</i>	kilo Dalton (1 kDa = 1000 g)
LMA	Laurylmethacrylat
P[LMA]	Poly-Laurylmethacrylat
MeOH	Methanol
MeSO ₃ H	Methansulfonsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MWCO	Molecular weight cut off
Neg.	negative
NEt ₃	Triethylamin
nm	Nanometer
µm	Mikrometer
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon oder Nitroxide mediated polymerization
N/P	Verhältnis von positiven zu negativen Ladungen
PBMC's	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphor buffered saline
PEG	Polyethylenglycol
PFMA	Pentfluorophenylmethacrylat
p[PFMA]	Poly[Pentafluorophenylmethacrylat]
ppm	parts per million
pKa	Säurekonstante
p[Lys]	Polylysin
Polylysin:	Poly-L-Lysin
Pos.	positive

Anhang

RAFT	Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
aRAGE	monoklonaler Antikörper gegen RAGE
RNA	Ribonukleinsäure
si-RNA	silencing RNA
RT	Raumtemperatur
SEC	Size Exclusion Chromatographie
SPAAC	Strain-Promoted Azide-Alkine Coupling
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TCEP	Tris(2-Carboxyethyl)phosphin
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
TFA	2,2,2-Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
Transkription	Umschreiben chromosomaler DNA in RNA
Translation	Proteinbiosynthese aus m-RNA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
w/w	Gewichtsverhältnis
Z	Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe

8 Literaturverzeichnis

- [1]. Schätzlein, A. G., *Polymers in Drug Delivery*. Taylor & Francis Group: 2006; p 1-7.
- [2]. Ferrari, M., Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer* **2005**, 5 (3), 161-171.
- [3]. Cabral, H.; Nishiyama, N.; Kataoka, K., Supramolecular Nanodevices: From Design Validation to Theranostic Nanomedicine. *Accounts of Chemical Research* **2011**, 44 (10), 999-1008.
- [4]. Ringsdorf, H., Structure and Properties of Pharmacologically Active Polymers. *Journal of Polymer Science Part C-Polymer Symposium* **1975**, (51), 135-153.
- [5]. Duncan, R., The dawning era of polymer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, 2 (5), 347-360.
- [6]. Haag, R.; Kratz, F., Polymer therapeutics: Concepts and applications. *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, 45 (8), 1198-1215.
- [7]. Maeda, H.; Wu, J.; Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K., Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release* **2000**, 65 (1-2), 271-284.
- [8]. Duncan, R.; Vicent, M. J., Polymer therapeutics-prospects for 21st century: The end of the beginning. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, 65 (1), 60-70.
- [9]. Barenholz, Y., Doxil (R) - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release* **2012**, 160 (2), 117-134.
- [10]. Miele, E.; Spinelli, G. P.; Miele, E.; Tomao, F.; Tomao, S., Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane (R) ABI-007) in the treatment of breast cancer. *International Journal of Nanomedicine* **2009**, 4 (1), 99-105.
- [11]. Jain, R. K.; Stylianopoulos, T., Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature Reviews Clinical Oncology* **2010**, 7 (11), 653-664.
- [12]. Fang, J.; Nakamura, H.; Maeda, H., The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2011**, 63 (3), 136-151.
- [13]. Blattman, J. N.; Greenberg, P. D., Cancer immunotherapy: A treatment for the masses. *Science* **2004**, 305 (5681), 200-205.
- [14]. Steinman, R. M.; Mellman, I., Immunotherapy: Bewitched, bothered, and bewildered no more. *Science* **2004**, 305 (5681), 197-200.
- [15]. Steinman, R. M.; Dhodapkar, M., Active immunization against cancer with dendritic cells: The near future. *International Journal of Cancer* **2001**, 94 (4), 459-473.
- [16]. Beckhove, P.; Warta, R.; Lemke, B.; Stoycheva, D.; Momburg, F.; Schnolzer, M.; Warnken, U.; Schmitz-Winnenthal, H.; Ahmadi, R.; Dyckhoff, G.; Bucur, M.; Junger, S.; Schueler, T.; Lennerz, V.; Woelfel, T.; Unterberg, A.; Herold-Mende, C., Rapid T cell-based identification of human tumor tissue antigens by automated two-dimensional protein fractionation. *Journal of Clinical Investigation* **2010**, 120 (6), 2230-2242.
- [17]. Rosenberg, S. A., Shedding light on immunotherapy for cancer. *New England Journal of Medicine* **2004**, 350 (14), 1461-1463.
- [18]. Shanker, A.; Marincola, F., Cooperativity of adaptive and innate immunity: implications for cancer therapy. *Cancer Immunology Immunotherapy* **2011**, 60 (8), 1061-1074.
- [19]. Barz, M.; Luxenhofer, R.; Zentel, R.; Vicent, M. J., Overcoming the PEG-addiction: well-defined alternatives to PEG, from structure-property relationships to better defined therapeutics. *Polymer Chemistry* **2011**, 2 (9), 1900-1918.
- [20]. Alconcel, S. N. S.; Baas, A. S.; Maynard, H. D., FDA-approved poly(ethylene glycol)-protein conjugate drugs. *Polymer Chemistry* **2011**, 2 (7), 1442-1448.
- [21]. Calderon, M.; Quadir, M. A.; Sharma, S. K.; Haag, R., Dendritic Polyglycerols for Biomedical Applications. *Advanced Materials* **2010**, 22 (2), 190-218.

- [22]. Obermeier, B.; Wurm, F.; Mangold, C.; Frey, H., Multifunctional Poly(ethylene glycol)s. *Angewandte Chemie-International Edition* **2011**, *50* (35), 7988-7997.
- [23]. Hamada, I.; Hunter, A. C.; Szebeni, J.; Moghimi, S. M., Poly(ethylene glycol)s generate complement activation products in human serum through increased alternative pathway turnover and a MASP-2-dependent process. *Molecular Immunology* **2008**, *46* (2), 225-232.
- [24]. Ishida, T.; Kiwada, H., Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, *354* (1-2), 56-62.
- [25]. Sung, H. J.; Chandra, P.; Treiser, M. D.; Liu, E.; Iovine, C. P.; Moghe, P. V.; Kohn, J., Synthetic Polymeric Substrates as Potent Pro-Oxidant Versus Anti-Oxidant Regulators of Cytoskeletal Remodeling and Cell Apoptosis. *Journal of Cellular Physiology* **2009**, *218* (3), 549-557.
- [26]. Sung, H. J.; Luk, A.; Murthy, N. S.; Liu, E.; Jois, M.; Joy, A.; Bushman, J.; Moghe, P. V.; Kohn, J., Poly(ethylene glycol) as a sensitive regulator of cell survival fate on polymeric biomaterials: the interplay of cell adhesion and pro-oxidant signaling mechanisms. *Soft Matter* **2010**, *6* (20), 5196-5205.
- [27]. B. Ríhová, J. K., K. Ulbrich, V. Chytrý, Immunogenicity of N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers. *Makromol. Chem.* **1985**, *9*, 13-24.
- [28]. Rihova, B.; Bilej, M.; Vetvicka, V.; Ulbrich, K.; Strohalm, J.; Kopecek, J.; Duncan, R., Biocompatibility of N-(2-Hydroxypropyl) Methacrylamide Copolymers Containing Adriamycin - Immunogenicity, and Effect on Hematopoietic Stem-Cells in Bone-Marrow In vivo and Mouse Splenocytes and Human Peripheral-Blood Lymphocytes In vitro. *Biomaterials* **1989**, *10* (5), 335-342.
- [29]. Rihova, B.; Kovar, M., Immunogenicity and immunomodulatory properties of HEMA-based polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, *62* (2), 184-191.
- [30]. Scott, A. M.; Wolchok, J. D.; Old, L. J., Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* **2012**, *12* (4), 278-287.
- [31]. Dawood, S.; Broglio, K.; Esteva, F. J.; Ibrahim, N. K.; Kau, S. W.; Islam, R.; Aldape, K. D.; Yu, T. K.; Hortobagyi, G. N.; Gonzalez-Angulo, A. M., Defining prognosis for women with breast cancer and CNS metastases by HER2 status. *Annals of Oncology* **2008**, *19* (7), 1242-1248.
- [32]. Widdison, W. C., Antibody-Drug Conjugates: An Emerging Concept in Cancer Therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3796-3827.
- [33]. Menzel, P. L.; Minor, D. R.; Abendroth, R. E., Combined Ipilimumab and Radiation Therapy for Metastatic Melanoma. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **2013**, *87* (2), S613-S613.
- [34]. Holak, A. D. T. A., Programmed Death-1: therapeutischer Erfolg nach über 100 Jahren Krebsimmuntherapie. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *126*, 2318-2320.
- [35]. Duncan, R., Polymer therapeutics as nanomedicines: new perspectives. *Current Opinion in Biotechnology* **2011**, *22* (4), 492-501.
- [36]. Chapman, A. P., PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54* (4), 531-545.
- [37]. Kopecek, J.; Kopeckova, P., HEMA copolymers: Origins, early developments, present, and future. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, *62* (2), 122-149.
- [38]. Ulbrich, K.; Subr, V., Structural and chemical aspects of HEMA copolymers as drug carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, *62* (2), 150-166.
- [39]. Rech, A. J.; Vonderheide, R. H., Clinical Use of Anti-CD25 Antibody Daclizumab to Enhance Immune Responses to Tumor Antigen Vaccination by Targeting Regulatory T cells. *Cancer Vaccines* **2009**, *1174*, 99-106.
- [40]. Joffre, O.; Nolte, M. A.; Sporri, R.; Sousa, C. R. E., Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunological Reviews* **2009**, *227*, 234-247.
- [41]. Bonifaz, L.; Bonnyay, D.; Mahnke, K.; Rivera, M.; Nussenzweig, M. C.; Steinman, R. M., Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8(+) T cell tolerance. *Journal of Experimental Medicine* **2002**, *196* (12), 1627-1638.

- [42]. Joshi, M. D.; Unger, W. J.; Storm, G.; van Kooyk, Y.; Mastrobattista, E., Targeting tumor antigens to dendritic cells using particulate carriers. *Journal of Controlled Release* **2012**, *161* (1), 25-37.
- [43]. Kronin, V.; Suss, G.; Winkel, K.; Shortman, K., The regulation of T cell responses by a subpopulation of CD8(+)DEC205(+) murine dendritic cells. *Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology, Vol 3* **1997**, *417*, 239-248.
- [44]. Guo, M.; Gong, S. C.; Maric, S.; Misulovin, Z.; Pack, M.; Mahnke, K.; Nussenzweig, M. C.; Steinman, R. M., A monoclonal antibody to the DEC-205 endocytosis receptor on human dendritic cells. *Human Immunology* **2000**, *61* (8), 729-738.
- [45]. Broyer, R. M.; Grover, G. N.; Maynard, H. D., Emerging synthetic approaches for protein-polymer conjugations. *Chemical Communications* **2011**, *47* (8), 2212-2226.
- [46]. Gauthier, M. A.; Klok, H. A., Peptide/protein-polymer conjugates: synthetic strategies and design concepts. *Chemical Communications* **2008**, (23), 2591-2611.
- [47]. Omelyanenko, V.; Kopeckova, P.; Gentry, C.; Shiah, J. G.; Kopecek, J., HPMA copolymer-anticancer drug-OV-TL16 antibody conjugates .1. Influence of the method of synthesis on the binding affinity to OVCAR-3 ovarian carcinoma cells in vitro. *Journal of Drug Targeting* **1996**, *3* (5), 357-373.
- [48]. Jue, R.; Lambert, J. M.; Pierce, L. R.; Traut, R. R., Addition of Sulfhydryl-Groups to Escherichia-Coli Ribosomes by Protein Modification with 2-Iminothiolane (Methyl 4-Mercaptobutyrimidate). *Biochemistry* **1978**, *17* (25), 5399-5406.
- [49]. Etrych, T.; Mrkvan, T.; Rihova, B.; Ulbrich, K., Star-shaped immunoglobulin-containing HPMA-based conjugates with doxorubicin for cancer therapy. *Journal of Controlled Release* **2007**, *122* (1), 31-38.
- [50]. Etrych, T.; Strohalm, J.; Kovar, L.; Kabesova, M.; Rihova, B.; Ulbrich, K., HPMA copolymer conjugates with reduced anti-CD20 antibody for cell-specific drug targeting. I. Synthesis and in vitro evaluation of binding efficacy and cytostatic activity. *Journal of Controlled Release* **2009**, *140* (1), 18-26.
- [51]. Nicolas, J.; Mantovani, G.; Haddleton, D. M., Living radical polymerization as a tool for the synthesis of polymer-protein/peptide bioconjugates. *Macromolecular Rapid Communications* **2007**, *28* (10), 1083-1111.
- [52]. Sumerlin, B. S., Proteins as Initiators of Controlled Radical Polymerization: Grafting-from via ATRP and RAFT. *Acs Macro Letters* **2012**, *1* (1), 141-145.
- [53]. Le Droumaguet, B.; Nicolas, J., Recent advances in the design of bioconjugates from controlled/living radical polymerization. *Polymer Chemistry* **2010**, *1* (5), 563-598.
- [54]. Godwin, A.; Hartenstein, M.; Muller, A. H. E.; Brocchini, S., Narrow molecular weight distribution precursors for polymer-drug conjugates. *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, *40* (3), 594-597.
- [55]. Scales, C. W.; Vasilieva, Y. A.; Convertine, A. J.; Lowe, A. B.; McCormick, C. L., Direct, controlled synthesis of the nonimmunogenic, hydrophilic polymer, poly(N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide) via RAFT in aqueous media. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (4), 1846-1850.
- [56]. Gauthier, M. A.; Gibson, M. I.; Klok, H. A., Synthesis of Functional Polymers by Post-Polymerization Modification. *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, *48* (1), 48-58.
- [57]. Theato, P., Synthesis of Well-Defined Polymeric Activated Esters. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **2008**, *46* (20), 6677-6687.
- [58]. Eberhardt, M.; Theato, P., RAFT polymerization of pentafluorophenyl methacrylate: Preparation of reactive linear diblock copolymer. *Macromolecular Rapid Communications* **2005**, *26* (18), 1488-1493.
- [59]. Barz, M.; Tarantola, M.; Fischer, K.; Schmidt, M.; Luxenhofer, R.; Janshoff, A.; Theato, P.; Zentel, R., From Defined Reactive Diblock Copolymers to Functional HPMA-Based Self-Assembled Nanoaggregates. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (11), 3114-3118.
- [60]. Barz, M.; Canal, F.; Koynov, K.; Zentel, R.; Vicent, M. J., Synthesis and In Vitro Evaluation of Defined HPMA Folate Conjugates: Influence of Aggregation on Folate Receptor (FR) Mediated Cellular Uptake. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (9), 2274-2282.
- [61]. Herth, M. M.; Barz, M.; Moderegger, D.; Allmeroth, M.; Jahn, M.; Thews, O.; Zentel, R.; Rosch, F., Radioactive Labeling of Defined HPMA-Based Polymeric Structures

- Using [F-18]FETos for In Vivo Imaging by Positron Emission Tomography. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (7), 1697-1703.
- [62]. Nuhn, L.; Hartmann, S.; Palitzsch, B.; Gerlitzki, B.; Schmitt, E.; Zentel, R.; Kunz, H., Water-Soluble Polymers Coupled with Glycopeptide Antigens and T-Cell Epitopes as Potential Antitumor Vaccines. *Angewandte Chemie-International Edition* **2013**, *52* (40), 10652-10656.
- [63]. Bays, E.; Tao, L.; Chang, C. W.; Maynard, H. D., Synthesis of Semitelechelic Maleimide Poly(PEGA) for Protein Conjugation By RAFT Polymerization. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (7), 1777-1781.
- [64]. Heredia, K. L.; Grover, G. N.; Tao, L.; Maynard, H. D., Synthesis of Heterotelechelic Polymers for Conjugation of Two Different Proteins. *Macromolecules* **2009**, *42* (7), 2360-2367.
- [65]. Tao, L.; Kaddis, C. S.; Loo, R. R. O.; Grover, G. N.; Loo, J. A.; Maynard, H. D., Synthesis of Maleimide-End-Functionalized Star Polymers and Multimeric Protein-Polymer Conjugates. *Macromolecules* **2009**, *42* (21), 8028-8033.
- [66]. Heredia, K. L.; Tao, L.; Grover, G. N.; Maynard, H. D., Heterotelechelic polymers for capture and release of protein-polymer conjugates. *Polymer Chemistry* **2010**, *1* (2), 168-170.
- [67]. Junutula, J. R.; Raab, H.; Clark, S.; Bhakta, S.; Leipold, D. D.; Weir, S.; Chen, Y.; Simpson, M.; Tsai, S. P.; Dennis, M. S.; Lu, Y. M.; Meng, Y. G.; Ng, C.; Yang, J. H.; Lee, C. C.; Duenas, E.; Gorrell, J.; Katta, V.; Kim, A.; McDorman, K.; Flagella, K.; Venook, R.; Ross, S.; Spencer, S. D.; Wong, W. L.; Lowman, H. B.; Vandlen, R.; Sliwkowski, M. X.; Scheller, R. H.; Polakis, P.; Mallet, W., Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nature Biotechnology* **2008**, *26* (8), 925-932.
- [68]. Lu, H.; Wang, D. L.; Kazane, S.; Javahishvili, T.; Tian, F.; Song, F.; Sellers, A.; Barnett, B.; Schultz, P. G., Site-Specific Antibody-Polymer Conjugates for siRNA Delivery. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (37), 13885-13891.
- [69]. Freitas, D. D.; Mero, A.; Pasut, G., Chemical and Enzymatic Site Specific PEGylation of hGH. *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24* (3), 456-463.
- [70]. Fontana, A.; Spolaore, B.; Mero, A.; Veronese, F. M., Site-specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60* (1), 13-28.
- [71]. Strop, P.; Liu, S. H.; Dorywalska, M.; Delaria, K.; Dushin, R. G.; Tran, T. T.; Ho, W. H.; Farias, S.; Casas, M. G.; Abdiche, Y.; Zhou, D. H.; Chandrasekaran, R.; Samain, C.; Loo, C.; Rossi, A.; Rickert, M.; Krimm, S.; Wong, T.; Chin, S. M.; Yu, J.; Dilley, J.; Chaparro-Riggers, J.; Filzen, G. F.; O'Donnell, C. J.; Wang, F.; Myers, J. S.; Pons, J.; Shelton, D. L.; Rajpal, A., Location Matters: Site of Conjugation Modulates Stability and Pharmacokinetics of Antibody Drug Conjugates. *Chemistry & Biology* **2013**, *20* (2), 161-167.
- [72]. Jeger, S.; Zimmermann, K.; Blanc, A.; Grunberg, J.; Honer, M.; Hunziker, P.; Struthers, H.; Schibli, R., Site-Specific and Stoichiometric Modification of Antibodies by Bacterial Transglutaminase. *Angewandte Chemie-International Edition* **2010**, *49* (51), 9995-9997.
- [73]. Macilwain, C., World leaders heap praise on human genome landmark. *Nature* **2000**, *405* (6790), 983-984.
- [74]. Fischer, A.; Hacein-Bey-Abina, S.; Cavazzana-Calvo, M., 20 years of gene therapy for SCID. *Nature Immunology* **2010**, *11* (6), 457-460.
- [75]. LeWitt, P. A.; Rezai, A. R.; Leehey, M. A.; Ojemann, S. G.; Flaherty, A. W.; Eskandar, E. N.; Kostyk, S. K.; Thomas, K.; Sarkar, A.; Siddiqui, M. S.; Tatter, S. B.; Schwalb, J. M.; Poston, K. L.; Henderson, J. M.; Kurlan, R. M.; Richard, I. H.; Van Meter, L.; Sapan, C. V.; Durr, M. J.; Kaplitt, M. G.; Feigin, A., AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurology* **2011**, *10* (4), 309-319.
- [76]. Huang, Y. C.; Riddle, K.; Rice, K. G.; Mooney, D. J., Long-term in vivo gene expression via delivery of PEI-DNA condensates from porous polymer scaffolds. *Human Gene Therapy* **2005**, *16* (5), 609-617.

- [77]. Stern, M.; Ulrich, K.; Geddes, D. M.; Alton, E. W. F. W., Poly (D, L-lactide-co-glycolide)/DNA microspheres to facilitate prolonged transgene expression in airway epithelium in vitro, ex vivo and in vivo. *Gene Therapy* **2003**, *10* (16), 1282-1288.
- [78]. Bros, M.; Ross, X. L.; Pautz, A.; Reske-Kunz, A. B.; Ross, R., The human fascin gene promoter is highly active in mature dendritic cells due to a stage-specific enhancer. *Journal of Immunology* **2003**, *171* (4), 1825-1834.
- [79]. Ji, W. H.; Panus, D.; Palumbo, R. N.; Tang, R. P.; Wang, C., Poly(2-aminoethyl methacrylate) with Well-Defined Chain Length for DNA Vaccine Delivery to Dendritic Cells. *Biomacromolecules* **2011**, *12* (12), 4373-4385.
- [80]. Moulin, V.; Morgan, M. E.; Eleveld-Trancikova, D.; Haanen, J. B. A. G.; Wielders, E.; Looman, M. W. G.; Janssen, R. A. J.; Figdor, C. G.; Jansen, B. J. H.; Adema, G. J., Targeting dendritic cells with antigen via dendritic cell-associated promoters. *Cancer Gene Therapy* **2012**, *19* (5), 303-311.
- [81]. Ross, R.; Sudowe, S.; Beisner, J.; Ross, X. L.; Ludwig-Portugall, I.; Steitz, J.; Tuting, T.; Knop, J.; Reske-Kunz, A. B., Transcriptional targeting of dendritic cells for gene therapy using the promoter of the cytoskeletal protein fascin. *Gene Therapy* **2003**, *10* (12), 1035-1040.
- [82]. Pandha, H. S.; Martin, L. A.; Rigg, A. S.; Ross, P.; Dalglish, A. G., Gene therapy: Recent progress in the clinical oncology arena. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* **2000**, *2* (4), 362-375.
- [83]. Roy, K.; Mao, H. Q.; Huang, S. K.; Leong, K. W., Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nature Medicine* **1999**, *5* (4), 387-391.
- [84]. Irvine, A. S.; Trinder, P. K. E.; Laughton, D. L.; Ketteringham, H.; McDermott, R. H.; Reid, S. C. H.; Haines, A. M. R.; Amir, A.; Husain, R.; Doshi, R.; Young, L. S.; Mountain, A., Efficient nonviral transfection of dendritic cells and their use for in vivo immunization. *Nature Biotechnology* **2000**, *18* (12), 1273-1278.
- [85]. Tian, J.; Xu, Z. L.; Smith, J. S.; Hofherr, S. E.; Barry, M. A.; Byrnes, A. P., Adenovirus Activates Complement by Distinctly Different Mechanisms In Vitro and In Vivo: Indirect Complement Activation by Virions In Vivo. *Journal of Virology* **2009**, *83* (11), 5648-5658.
- [86]. Huang, X. P.; Yang, Y. P., Innate Immune Recognition of Viruses and Viral Vectors. *Human Gene Therapy* **2009**, *20* (4), 293-301.
- [87]. Marshall, E., Clinical trials - Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* **1999**, *286* (5448), 2244-2245.
- [88]. Kundu, P. P.; Sharma, V., Synthetic polymeric vectors in gene therapy. *Current Opinion in Solid State & Materials Science* **2008**, *12* (5-6), 89-102.
- [89]. Christie, R. J.; Nishiyama, N.; Kataoka, K., Minireview: Delivering the Code: Polyplex Carriers for Deoxyribonucleic Acid and Ribonucleic Acid Interference Therapies. *Endocrinology* **2010**, *151* (2), 466-473.
- [90]. Miyata, K.; Nishiyama, N.; Kataoka, K., Rational design of smart supramolecular assemblies for gene delivery: chemical challenges in the creation of artificial viruses. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41* (7), 2562-2574.
- [91]. Martin, I.; Dohmen, C.; Mas-Moruno, C.; Troiber, C.; Kos, P.; Schaffert, D.; Lachelt, U.; Teixido, M.; Gunther, M.; Kessler, H.; Giralt, E.; Wagner, E., Solid-phase-assisted synthesis of targeting peptide-PEG-oligo(ethane amino)amides for receptor-mediated gene delivery. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2012**, *10* (16), 3258-3268.
- [92]. Samal, S. K.; Dash, M.; Van Vlierberghe, S.; Kaplan, D. L.; Chiellini, E.; van Blitterswijk, C.; Moroni, L.; Dubruel, P., Cationic polymers and their therapeutic potential. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41* (21), 7147-7194.
- [93]. Krieg, A. M.; Yi, A. K.; Matson, S.; Waldschmidt, T. J.; Bishop, G. A.; Teasdale, R.; Koretzky, G. A.; Klinman, D. M., CpG Motifs in Bacterial-DNA Trigger Direct B-Cell Activation. *Nature* **1995**, *374* (6522), 546-549.
- [94]. Ogris, M.; Brunner, S.; Schuller, S.; Kircheis, R.; Wagner, E., PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Therapy* **1999**, *6* (4), 595-605.

- [95]. Chiou, H. C.; Tangco, M. V.; Levine, S. M.; Robertson, D.; Kormis, K.; Wu, C. H.; Wu, G. Y., Enhanced Resistance to Nuclease Degradation of Nucleic-Acids Complexed to Asialoglycoprotein-Polylysine Carriers. *Nucleic Acids Research* **1994**, *22* (24), 5439-5446.
- [96]. Katayose, S.; Kataoka, K., Water-soluble polyion complex associates of DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8* (5), 702-707.
- [97]. Oupicky, D.; Konak, C.; Ulbrich, K.; Wolfert, M. A.; Seymour, L. W., DNA delivery systems based on complexes of DNA with synthetic polycations and their copolymers. *Journal of Controlled Release* **2000**, *65* (1-2), 149-171.
- [98]. Kwoh, D. Y.; Coffin, C. C.; Lollo, C. P.; Jovenal, J.; Banaszczyk, M. G.; Mullen, P.; Phillips, A.; Amini, A.; Fabrycki, J.; Bartholomew, R. M.; Brostoff, S. W.; Carlo, D. J., Stabilization of poly-L-lysine/DNA polyplexes for in vivo gene delivery to the liver. *Biochimica Et Biophysica Acta-Genes Structure and Expression* **1999**, *1444* (2), 171-190.
- [99]. Kircheis, R.; Schuller, S.; Brunner, S.; Ogris, M.; Heider, K. H.; Zauner, W.; Wagner, E., Polycation-based DNA complexes for tumor-targeted gene delivery in vivo. *Journal of Gene Medicine* **1999**, *1* (2), 111-120.
- [100]. Oupicky, D.; Konak, C.; Dash, P. R.; Seymour, L. W.; Ulbrich, K., Effect of albumin and polyanion on the structure of DNA complexes with polycation containing hydrophilic nonionic block. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10* (5), 764-772.
- [101]. Katayose, S.; Kataoka, K., Remarkable increase in nuclease resistance of plasmid DNA through supramolecular assembly with poly(ethylene glycol) poly(L-lysine) block copolymer. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1998**, *87* (2), 160-163.
- [102]. Glodde, M.; Sirsi, S. R.; Lutz, G. J., Physicochemical properties of low and high molecular weight poly(ethylene glycol)-grafted poly(ethylene imine) copolymers and their complexes with oligonucleotides. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (1), 347-356.
- [103]. Laga, R.; Carlisle, R.; Tangney, M.; Ulbrich, K.; Seymour, L. W., Polymer coatings for delivery of nucleic acid therapeutics. *Journal of Controlled Release* **2012**, *161* (2), 537-553.
- [104]. Lutz, J. F.; Hoth, A., Preparation of ideal PEG analogues with a tunable thermosensitivity by controlled radical copolymerization of 2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate and oligo(ethylene glycol) methacrylate. *Macromolecules* **2006**, *39* (2), 893-896.
- [105]. Hoogenboom, R., Poly(2-oxazoline)s: A Polymer Class with Numerous Potential Applications. *Angewandte Chemie-International Edition* **2009**, *48* (43), 7978-7994.
- [106]. Mullen, P. M.; Lollo, C. P.; Phan, Q. C.; Amini, A.; Banaszczyk, M. G.; Fabrycki, J. M.; Wu, D. P.; Carlo, A. T.; Pezzoli, P.; Coffin, C. C.; Carlo, D. J., Strength of conjugate binding to plasmid DNA affects degradation rate and expression level in vivo. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **2000**, *1523* (1), 103-110.
- [107]. Behr, J. P., The proton sponge: A trick to enter cells the viruses did not exploit. *Chimia* **1997**, *51* (1-2), 34-36.
- [108]. Godbey, W. T.; Wu, K. K.; Mikos, A. G., Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96* (9), 5177-5181.
- [109]. Richardson, S.; Ferruti, P.; Duncan, R., Poly(amidoamine)s as potential endosomolytic polymers: Evaluation in vitro and body distribution in normal and tumour-bearing animals. *Journal of Drug Targeting* **1999**, *6* (6), 391-404.
- [110]. Pack, D. W.; Putnam, D.; Langer, R., Design of imidazole-containing endosomolytic biopolymers for gene delivery. *Biotechnology and Bioengineering* **2000**, *67* (2), 217-223.
- [111]. Miyata, K.; Oba, M.; Nakanishi, M.; Fukushima, S.; Yamasaki, Y.; Koyama, H.; Nishiyama, N.; Kataoka, K., Polyplexes from Poly(aspartamide) Bearing 1,2-Diaminoethane Side Chains Induce pH-Selective, Endosomal Membrane Destabilization with Amplified Transfection and Negligible Cytotoxicity. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130* (48), 16287-16294.
- [112]. Wagner, E.; Plank, C.; Zatloukal, K.; Cotten, M.; Birnstiel, M. L., Influenza-Virus Hemagglutinin-Ha-2 N-Terminal Fusogenic Peptides Augment Gene-Transfer by Transferrin Polylysine DNA Complexes - toward a Synthetic Virus-Like Gene-Transfer

- Vehicle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, 89 (17), 7934-7938.
- [113]. Meister, A.; Anderson, M. E., Glutathione. *Annual Review of Biochemistry* **1983**, 52, 711-760.
- [114]. Takae, S.; Miyata, K.; Oba, M.; Ishii, T.; Nishiyama, N.; Itaka, K.; Yamasaki, Y.; Koyama, H.; Kataoka, K., PEG-detachable polyplex micelles based on disulfide-linked block cationomers as bioresponsive nonviral gene vectors. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130 (18), 6001-6009.
- [115]. Mandel, R.; Ryser, H. J. P.; Ghani, F.; Wu, M.; Peak, D., Inhibition of a Reductive Function of the Plasma-Membrane by Bacitracin and Antibodies against Protein Disulfide-Isomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, 90 (9), 4112-4116.
- [116]. Morre, D. J.; Morre, D. M., Cell surface NADH oxidases (ECTO-NOX proteins) with roles in cancer, cellular time-keeping, growth, aging and neurodegenerative diseases. *Free Radical Research* **2003**, 37 (8), 795-808.
- [117]. Brunner, S.; Sauer, T.; Carotta, S.; Cotten, M.; Saltik, M.; Wagner, E., Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Therapy* **2000**, 7 (5), 401-407.
- [118]. Aronsohn, A. I.; Hughes, J. A., Nuclear localization signal peptides enhance cationic liposome-mediated gene therapy. *Journal of Drug Targeting* **1998**, 5 (3), 163-169.
- [119]. Merdan, T.; Kopecek, J.; Kissel, T., Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54 (5), 715-758.
- [120]. Chiefari, J.; Chong, Y. K.; Ercole, F.; Krstina, J.; Jeffery, J.; Le, T. P. T.; Mayadunne, R. T. A.; Meijs, G. F.; Moad, C. L.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H., Living free-radical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfer: The RAFT process. *Macromolecules* **1998**, 31 (16), 5559-5562.
- [121]. Kazmaier, P. M.; Daimon, K.; Georges, M. K.; Hamer, G. K.; Veregin, R. P. N., Nitroxide-mediated "living" free radical polymerization: A rapid polymerization of (chloromethyl)styrene for the preparation of random, block, and segmental arborescent polymers. *Macromolecules* **1997**, 30 (8), 2228-2231.
- [122]. Wang, J. S.; Matyjaszewski, K., Controlled Living Radical Polymerization - Halogen Atom-Transfer Radical Polymerization Promoted by a Cu(I)Cu(II) Redox Process. *Macromolecules* **1995**, 28 (23), 7901-7910.
- [123]. Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H., Living Radical Polymerization by the RAFT Process - A Second Update. *Australian Journal of Chemistry* **2009**, 62 (11), 1402-1472.
- [124]. Barner-Kowollik, C., *Handbook of RAFT Polymerization*. Wiley-VCH: 2008.
- [125]. Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H., Toward living radical polymerization. *Accounts of Chemical Research* **2008**, 41 (9), 1133-1142.
- [126]. Odian, G., *Principles of Polymerization* Wiley Interscience: 2004; Vol. 4, p 328.
- [127]. Palucka, A. K.; Ueno, H.; Fay, J.; Banchereau, J., Dendritic Cells: A Critical Player in Cancer Therapy? *Journal of Immunotherapy* **2008**, 31 (9), 793-805.
- [128]. Robinson, M. J.; Sancho, D.; Slack, E. C.; LeibundGut-Landmann, S.; Sousa, C. R. E., Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nature Immunology* **2006**, 7 (12), 1258-1265.
- [129]. DEC-205 and Antigen Presentation. *Cytokine Bulletin* **2002**.
- [130]. Sudowe, S.; Dominitzki, S.; Montermann, E.; Bros, M.; Grabbe, S.; Reske-Kunz, A. B., Uptake and presentation of exogenous antigen and presentation of endogenously produced antigen by skin dendritic cells represent equivalent pathways for the priming of cellular immune responses following biolistic DNA immunization. *Immunology* **2009**, 128 (1), e193-e205.
- [131]. Robinson, H. L.; Pertmer, T. M., DNA vaccines for viral infections: Basic studies and applications. *Advances in Virus Research, Vol 55* **2000**, 55, 1-74.
- [132]. Alarcon, J. B.; Waite, G. W.; McManus, D. P., DNA vaccines: Technology and application as anti-parasite and anti-microbial agents. *Advances in Parasitology, Vol 42* **1999**, 42, 343-410.
- [133]. Krieg, A. M., CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annual Review of Immunology* **2002**, 20, 709-760.

- [134]. Dübel, S., Rekombinante Antikörper. *Biol. Unserer Zeit* **2004**, *6*, 372.
- [135]. Kohler, G.; Milstein, C., Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* **1975**, *256* (5517), 495-497.
- [136]. Hoogenboom, H. R.; Chames, P., Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunology Today* **2000**, *21* (8), 371-378.
- [137]. Pluckthun, A.; Pack, P., New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. *Immunotechnology* **1997**, *3* (2), 83-105.
- [138]. Todorovska, A.; Roovers, R. C.; Dolezal, O.; Kortt, A. A.; Hoogenboom, H. R.; Hudson, P. J., Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *Journal of Immunological Methods* **2001**, *248* (1-2), 47-66.
- [139]. Tieke, B., *Makromolekulare Chemie*. WILEY-VCH: 2005.
- [140]. Simon, P. F. W., Gelpermeationschromatographie (GPC) in der Polymeranalytik: Eine kurze Einführung *Analytik News* **2013**.
- [141]. Riegler, R., Elson, E.S., *Fluorescence correlation spectroscopy. Theory and applications*. Springer, Berlin: 2001.
- [142]. Brown, M.; Wittwer, C., Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry* **2000**, *46* (8B), 1221-1229.
- [143]. Pawley, J. B., *Handook of biological confocal Microscopy*. Springer-Berlin: 2006.
- [144]. Pissuwan, D.; Boyer, C.; Gunasekaran, K.; Davis, T. P.; Bulmus, V., In Vitro Cytotoxicity of RAFT Polymers. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (2), 412-420.
- [145]. Donoghue, N.; Yam, P. T. W.; Jiang, X. M.; Hogg, P. J., Presence of closely spaced protein thiols on the surface of mammalian cells. *Protein Science* **2000**, *9* (12), 2436-2445.
- [146]. Sahaf, B.; Heydari, K.; Herzenberg, L. A.; Herzenberg, L. A., Lymphocyte surface thiol levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100* (7), 4001-4005.
- [147]. Kafi, K.; Betting, D. J.; Yamada, R. E.; Bacica, M.; Steward, K. K.; Timmerman, J. M., Maleimide conjugation markedly enhances the immunogenicity of both human and murine idiotype-KLH vaccines. *Molecular Immunology* **2009**, *46* (3), 448-456.
- [148]. San Paulo, A.; Garcia, R., High-resolution imaging of antibodies by tapping-mode atomic force microscopy: attractive and repulsive tip-sample interaction regimes. *Biophys J* **2000**, *78* (3), 1599-605.
- [149]. Kovar, M.; Strohalm, J.; Etrych, T.; Ulbrich, K.; Rihova, B., Star structure of antibody-targeted HPMA copolymer-bound doxorubicin: A novel type of polymeric conjugate for targeted drug delivery with potent antitumor effect. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13* (2), 206-215.
- [150]. Mahnke, K.; Guo, M.; Lee, S.; Sepulveda, H.; Swain, S. L.; Nussenzweig, M.; Steinman, R. M., The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *Journal of Cell Biology* **2000**, *151* (3), 673-683.
- [151]. Inaba, K.; Swiggard, W. J.; Inaba, M.; Meltzer, J.; Mirza, A.; Sasagawa, T.; Nussenzweig, M. C.; Steinman, R. M., Tissue Distribution of the Dec-205 Protein That Is Detected by the Monoclonal-Antibody Nldc-145 .1. Expression on Dendritic Cells and Other Subsets of Mouse Leukocytes. *Cellular Immunology* **1995**, *163* (1), 148-156.
- [152]. Weilbacher, M.; Allmeroth, M.; Hemmelmann, M.; Ritz, S.; Mailander, V.; Bopp, T.; Barz, M.; Zentel, R.; Becker, C., Interaction of N-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide Based Homo, Random and Block Copolymers with Primary Immune Cells. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2014**, *10* (1), 81-91.
- [153]. Huesmann, D.; Birke, A.; Klinker, K.; Turk, S.; Rader, H. J.; Barz, M., Revisiting Secondary Structures in NCA Polymerization: Influences on the Analysis of Protected Polylysines. *Macromolecules* **2014**, *47* (3), 928-936.
- [154]. Birke, A.; Huesmann, D.; Kelsch, A.; Weilbacher, M.; Xie, J.; Bros, M.; Bopp, T.; Becker, C.; Landfester, K.; Barz, M., Polypeptoid-block-polypeptide Copolymers: Synthesis, Characterization, and Application of Amphiphilic Block Copolypept(o)ides in Drug Formulations and Miniemulsion Techniques. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (2), 548-557.
- [155]. Heller, P. B., A.; Huesmann, D.; Weber, B.; Fischer, K.; Reske-Kunz, A.; Bros, M.; Barz, M., Introducing PeptoPlexes: Polylysine-block-Polysarcosine Based Polyplexes for

Transfection of HEK 293T Cells. *Macromol. Biosci.* 2014, DOI: 10.1002/mabi.201400167 **2014**.

[156]. Ahmed, M.; Narain, R., Progress of RAFT based polymers in gene delivery. *Progress in Polymer Science* **2013**, 38 (5), 767-790.

[157]. ten Cate, M. G. J.; Rettig, H.; Bernhardt, K.; Borner, H. G., Sequence-defined polypeptide-polymer conjugates utilizing reversible addition fragmentation transfer radical polymerization. *Macromolecules* **2005**, 38 (26), 10643-10649.

[158]. Rettig, H.; Krause, E.; Borner, H. G., Atom transfer radical polymerization with polypeptide initiators: A general approach to block copolymers of sequence-defined polypeptides and synthetic polymers. *Macromolecular Rapid Communications* **2004**, 25 (13), 1251-1256.

[159]. Itaka, K.; Yamauchi, K.; Harada, A.; Nakamura, K.; Kawaguchi, H.; Kataoka, K., Polyion complex micelles from plasmid DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer as serum-tolerable polyplex system: physicochemical properties of micelles relevant to gene transfection efficiency. *Biomaterials* **2003**, 24 (24), 4495-4506.

[160]. Itaka, K.; Osada, K.; Morii, K.; Kim, P.; Yun, S. H.; Kataoka, K., Polyplex nanomicelle promotes hydrodynamic gene introduction to skeletal muscle. *Journal of Controlled Release* **2010**, 143 (1), 112-119.

[161]. Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis .1. Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85 (14), 2149-&.

[162]. Deming, T. J., Polypeptide materials: New synthetic methods and applications. *Advanced Materials* **1997**, 9 (4), 299-&.

[163]. Weber, B., Diplomarbeit. **2014**.

[164]. Heller, P., Diplomarbeit: Synthese, Charakterisierung und zellbiologische Evaluierung Polypeptidischer Transfektionssysteme. **2013**.

[165]. Cai, X. J.; Dong, C. Y.; Dong, H. Q.; Wang, G. M.; Pauletti, G. M.; Pan, X. J.; Wen, H. Y.; Mehl, I.; Li, Y. Y.; Shi, D. L., Effective Gene Delivery Using Stimulus-Responsive Cationic Polymer Designed with Redox-Sensitive Disulfide and Acid-Labile Imine Linkers. *Biomacromolecules* **2012**, 13 (4), 1024-1034.

[166]. Zhu, C. H.; Zheng, M.; Meng, F. H.; Mickler, F. M.; Ruthardt, N.; Zhu, X. L.; Zhong, Z. Y., Reversibly Shielded DNA Polyplexes Based on Bioreducible PDMAEMA-SS-PEG-SS-PDMAEMA Triblock Copolymers Mediate Markedly Enhanced Nonviral Gene Transfection. *Biomacromolecules* **2012**, 13 (3), 769-778.

[167]. Moghimi, S. M.; Symonds, P.; Murray, J. C.; Hunter, A. C.; Debska, G.; Szewczyk, A., A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: Implications for gene transfer/therapy. *Molecular Therapy* **2005**, 11 (6), 990-995.

[168]. Yao, X. L.; Yoshioka, Y.; Ruan, G. X.; Chen, Y. Z.; Mizuguchi, H.; Mukai, Y.; Okada, N.; Gao, J. Q.; Nakagawa, S., Optimization and Internalization Mechanisms of PEGylated Adenovirus Vector with Targeting Peptide for Cancer Gene Therapy. *Biomacromolecules* **2012**, 13 (8), 2402-2409.

[169]. Pedro M. S. D. Cal; Goncalo J. L.; Bernardes* und Pedro Gois, M. P., Cysteine-selektive Reaktionen zur Konjugation von Antikörpern. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014** DOI: 10.1002/ange.201405702.

[170]. Farias, S. E.; Strop, P.; Delaria, K.; Casas, M. G.; Dorywalska, M.; Shelton, D. L.; Pons, J.; Rajpal, A., Mass Spectrometric Characterization of Transglutaminase Based Site-Specific Antibody-Drug Conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2014**, 25 (2), 240-250.

[171]. Dennler, P.; Chiotellis, A.; Fischer, E.; Bregeon, D.; Belmant, C.; Gauthier, L.; Lhospice, F.; Romagne, F.; Schibli, R., Transglutaminase-Based Chemo-Enzymatic Conjugation Approach Yields Homogeneous Antibody-Drug Conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2014**, 25 (3), 569-578.

[172]. Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R., A strain-promoted [3+2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems (vol 126, pg 15046, 2004). *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127 (31), 11196-11196.

[173]. Beck, S., Diplomarbeit: Funktionalisierte Polymer-Antikörper Konjugate für die Krebsimmuntherapie. **2014**.

[174]. Kelsch, A.; Tomcin, S.; Rausch, K.; Barz, M.; Mailander, V.; Schmidt, M.; Landfester, K.; Zentel, R., HEMA Copolymers as Surfactants in the Preparation of

- Biocompatible Nanoparticles for Biomedical Application. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (12), 4179-4187.
- [175]. Gordon, C. G.; Mackey, J. L.; Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Houk, K. N.; Bertozzi, C. R., Reactivity of Biarylazacyclooctynones in Copper-Free Click Chemistry. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (22), 9199-9208.
- [176]. Eberhardt, M.; Mruk, R.; Zentel, R.; Theato, P., Synthesis of pentafluorophenyl(meth)acrylate polymers: New precursor polymers for the synthesis of multifunctional materials. *European Polymer Journal* **2005**, *41* (7), 1569-1575.
- [177]. Thang, S. H.; Chong, Y. K.; Mayadunne, R. T. A.; Moad, G.; Rizzardo, E., A novel synthesis of functional dithioesters, dithiocarbamates, xanthates and trithiocarbonates. *Tetrahedron Letters* **1999**, *40* (12), 2435-2438.
- [178]. Jochum, F. D.; zur Borg, L.; Roth, P. J.; Theato, P., Thermo- and Light-Responsive Polymers Containing Photoswitchable Azobenzene End Groups. *Macromolecules* **2009**, *42* (20), 7854-7862.
- [179]. Zuckermann, R. N.; Martin, E. J.; Spellmeyer, D. C.; Stauber, G. B.; Shoemaker, K. R.; Kerr, J. M.; Figliozzi, G. M.; Goff, D. A.; Siani, M. A.; Simon, R. J.; Banville, S. C.; Brown, E. G.; Wang, L.; Richter, L. S.; Moos, W. H., Discovery of Nanomolar Ligands for 7-Transmembrane G-Protein-Coupled Receptors from a Diverse N-(Substituted)Glycine Peptoid Library. *Journal of Medicinal Chemistry* **1994**, *37* (17), 2678-2685.
- [180]. Oishi, T.; Kamori, A.; Fujimoto, M., Synthesis and Polymerization of N-(L-Menthylcarboxylatomethyl)Maleimide. *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry* **1992**, *29* (3), 231-247.
- [181]. Green, M.; Berman, J., Preparation of Pentafluorophenyl Esters of Fmoc Protected Amino-Acids with Pentafluorophenyl Trifluoroacetate. *Tetrahedron Letters* **1990**, *31* (41), 5851-5852.
- [182]. MarchandBrynaert, J.; Bouchet, M.; Touillaux, R.; Beauve, C.; Fastrez, J., Design and synthesis of a bifunctional label for selection of beta-lactamase displayed on filamentous bacteriophage by catalytic activity. *Tetrahedron* **1996**, *52* (15), 5591-5606.
- [183]. Evans, H. L.; Slade, R. L.; Carroll, L.; Smith, G.; Nguyen, Q. D.; Iddon, L.; Kamaly, N.; Stockmann, H.; Leeper, F. J.; Aboagye, E. O.; Spivey, A. C., Copper-free click-a promising tool for pre-targeted PET imaging. *Chemical Communications* **2012**, *48* (7), 991-993.
- [184]. Thomas, J. D.; Cui, H. T.; North, P. J.; Hofer, T.; Rader, C.; Burke, T. R., Application of Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition and Tetrazine Ligation to Targeted Fc-Drug Conjugates. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23* (10), 2007-2013.
- [185]. Metz, V. V. Dissertation: Untersuchungen zum Ectodomain shedding des Receptor for advanced glycation endproducts. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, 2011.
- [186]. Wray, W.; Boulikas, T.; Wray, V. P.; Hancock, R., Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry* **1981**, *118* (1), 197-203.
- [187]. Hubo, M. Dissertation: Vergleichende Untersuchungen zur funktionellen Wechselwirkung von T-Helferzellen, regulatorischen T-Zellen und dendritischen Zellen Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, 2012.
- [188]. Bednarczyk, M. Dissertation. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, 2012-.
- [189]. Balkow, S.; Krux, F.; Loser, K.; Becker, J. U.; Grabbe, S.; Dittmer, U., Friend retrovirus infection of myeloid dendritic cells impairs maturation, prolongs contact to naive T cells, and favors expansion of regulatory T cells. *Blood* **2007**, *110* (12), 3949-3958.
- [190]. Weiser, F. Masterarbeit: Evaluierung funktionalisierter Makromoleküle zur Adressierung dendritischer Zellen für DNA Vakzinierungen Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2012.

9 Danksagung

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

10 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

*Kristof Tappertzhofen, Verena V. Metz, Mario Hubo, Matthias Barz, Rolf Postina, Helmut Jonuleit and Rudolf Zentel**

Controlled attachment of antibodies to defined HPMA-copolymers (Posterbeitrag)

9th International Symposium on Polymer Therapeutics: From Lab to Clinic, 28th-30th May 2012.

*Kristof Tappertzhofen, Verena V. Metz, Mario Hubo, Matthias Barz, Rolf Postina, Helmut Jonuleit, Rudolf Zentel**

Synthesis of Maleimide-Functionalized HPMA Copolymers and in vitro Characterization of the aRAGE- and Human Immunoglobulin (huIgG)-Polymer Conjugates

Macromol. Biosci. **2012**, *13*, 203-214.

Kristof Tappertzhofen, Monika Bednarczyk, Simone Beck, Kaloian Koynov, Matthias Bros, Stephan Grabbe and Rudolf Zentel.

Synthesis of semitelechelic maleimide modified HPMA polymers and in vitro characterization of “star-like” anti-DEC-205 antibody-polymer conjugates with bone marrow derived dendritic cells (Posterbeitrag).

10th International Symposium on Polymer Therapeutics: From Lab to Clinic, 19th-21th May 2014.

Kristof Tappertzhofen, Monika Bednarczyk, Kaloian Koynov, Matthias Bros, Stephan Grabbe, Rudolf Zentel

Toward Anticancer Immunotherapeutics: Well-Defined Polymer–Antibody Conjugates for Selective Dendritic Cell Targeting

Macromol. Biosci. **2014**, DOI: 10.1002/mabi.201400190.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]