

**Glykopolymere für Biomedizinische  
Anwendungen:  
Synthese von mannosylierten  
N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid Polymersystemen für die  
Adressierung von Zellen des Immunsystems**

Dissertation zur Erlangung des Grades  
“Doktor der Naturwissenschaften”  
am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von  
Nicole Mohr geb. Zgodzaj  
geboren am 16. Januar 1984 in Soltau

Mainz, Januar 2015

JOHANNES GUTENBERG  
UNIVERSITÄT MAINZ





Dekan:

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 16. März 2015



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von  
Oktober 2011 bis Januar 2015  
am Institut für Organische Chemie der  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
unter der Betreuung von \_\_\_\_\_  
angefertigt.

*„Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation „Glykopolymere für Biomedizinische Anwendungen“ selbständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Alles, was ich aus fremden Quellen übernommen habe, habe ich eindeutig kenntlich gemacht.*

*Diese Dissertation wurde weder zu sonstigen Prüfungszwecken eingesetzt noch in einer abgewandelten Form bei einer anderen Hochschule eingereicht.“*



*Für meine Familie*





## Abstract

The aim of this thesis is the synthesis of mannosylated HPMA (hydroxypropyl-methacrylate)-based polymers for targeting cells of the immune system. Therefore, pentafluorophenylmethacrylate (PFPMA) precursor polymers were synthesized by RAFT (reversible addition-fragmentation chain-transfer) polymerisation to achieve narrowly distributed polymers with different ratios of LMA (laurylmethacrylate).

To ascertain the exact structure of the random PFPMA-LMA copolymers, copolymerisations of both monomers was investigated by real-time  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy. From this the copolymerisation parameters were calculated.

These reactive ester precursor polymers were subsequently converted into the desired HPMA polymers while preserving the degree of polymerisation. To prove the absence of possible side reactions during the post-polymerisation functionalization, different reaction conditions were applied and various analytical methods were used. The results clearly demonstrated that the use of reactive ester chemistry leads to high quality HPMA polymers, and no other side reactions could be detected during the post-polymerisation process. In combination with LMA as the hydrophobic component, amphiphilic HPMA-LMA structures could be easily synthesized and characterized.

Another advantage is the simultaneous introduction of different markers for *in vitro* and *in vivo* visualisation as well as the modification with ligands for specific cell targeting. Mannose is a well-known simple carbohydrate structure that can be used as a target ligand to address cells of the immune system. Therefore, mannosylated HPMA-based polymers using the reactive ester approach were synthesized for their targeting capabilities. The amphiphilic HPMA-LMA copolymers could also be loaded successfully with a hydrophobic drug to form mannosylated loaded micelles. The stability of these systems was investigated by kinetic stability tests of the micelles loaded with a hydrophobic radioactive complex.

Subsequent *in vitro* experiments of the mannosylated systems showed an enhanced, mannose-specific uptake of dendritic cells. For possible *in vivo* PET (positron emission tomography) measurements, HPMA polymers were successfully labelled with radioactive tracers and first attempts for introducing a long-life radionucleotide for long-time biodistribution experiments were performed.



## Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit lag darin mannosylierte Polymersysteme hauptsächlich auf der Basis von *N*-(Hydroxy)propylmethacrylat zu synthetisieren, um gezielt Zellen des Immunsystems zu adressieren. Dazu wurden zunächst verschiedene Reaktivesterpolymere auf der Basis von Pentafluorphenylmethacrylat (PFPMA) unter Verwendung der RAFT-Polymerisation mit enger Molekulargewichtsverteilung und unterschiedlichen Anteilen an LMA (Laurylmethacrylat) hergestellt.

Um eine genaue Aussage über den Aufbau eines statistischen PFPMA-LMA Copolymers treffen zu können, wurde die Copolymerisation von PFPMA und LMA mittels Echtzeit <sup>1</sup>H-NMR Kinetikmessungen untersucht. Dies ermöglichte es, die Copolymerisationsparameter zu berechnen und genaue Aussagen über den Aufbau eines statistischen PFPMA-LMA Copolymers zu treffen. Die so erhaltenen Reaktivesterpolymere wurden dann in einer polymeranalogen Reaktion unter Erhalt des Polymerisationsgrades in die gewünschten HPMA-Polymere umgewandelt. Um die quantitative Umsetzung ohne auftretende Nebenreaktionen zu untersuchen, wurden verschiedene Reaktionsbedingungen gewählt und unterschiedliche Analysemethoden verwendet. Damit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, über den Reaktivesteransatz qualitativ hochwertige amphiphile Polymersysteme herzustellen, die auf anderen Wegen schwer zu synthetisieren und charakterisieren sind. Ein weiterer Vorteil dieser Syntheseroute ist, dass gleichzeitig sowohl Marker für die Visualisierung der Polymere *in vitro* und *in vivo*, als auch Targetliganden für die Adressierung bestimmter Zellen eingeführt werden können. Dafür wurde hauptsächlich Mannose als einfache Zuckerstruktur angebunden, da bekannt ist, dass mannosylierte Polymersysteme von Zellen des Immunsystems aufgenommen werden. Zusätzlich konnten die mannosylierten Polymere mit hydrophobem Wirkstoff beladen werden, wobei die Stabilität von beladenen Mizellen anhand der Einlagerung eines hydrophoben radioaktiven Komplexes genauer untersucht werden konnte.

Anschließend *in vitro* Experimente der mannosylierten Polymermizellen an dendritischen Zellen zeigten wie erwartet eine mannosespezifische und verstärkte Aufnahme. Für eine mögliche Untersuchung dieser Systeme *in vivo* mittels PET konnte gezeigt werden, dass es möglich ist HPMA Polymere radioaktiv zu markieren, wobei auch erste Markierungsversuche mit einem langlebigen Radionuklid für Langzeitbiodistributionsstudien durchgeführt werden konnte.



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Polymere Therapeutika .....	3
1.1.1 Passives Targeting (EPR-Effekt) .....	5
1.1.2 Aktives Targeting .....	6
1.2 Glykomimetika .....	8
1.2.1 Rezeptor vermittelte Endocytose von Nanopartikeln .....	10
1.2.2 Der Mannoserezeptor .....	11
1.3 HPMA basierte Copolymere als Wirkstoff-Carrier .....	13
1.3.1 Polymermizellen und deren Anwendung im Wirkstofftransport .....	14
1.4 Bioabbaubare Polymere auf Polypeptidbasis .....	16
1.5 Synthese polymerer Systeme mittels RAFT-Polymerisation .....	17
1.6 Reaktivesterpolymere und ihre Anwendung in polymeranalogen Reaktionen	19
1.7 Copolymerisationsparameter .....	21
1.8 Radionuklide und ihre Bedeutung für polymere Therapeutika .....	27
1.8.1 Markierungsstrategien für Glykopolymere .....	28
<b>2. Zielsetzung .....</b>	<b>31</b>
<b>3. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>33</b>
3.1 Die RAFT Polymerisation .....	33
3.2 Untersuchung der Copolymerisation von PFPMA und LMA mittels Echtzeit <sup>1</sup> H-NMR .....	45
3.3 Untersuchung der Polymeranaloge Umsetzung von P(PFPMA) zu P(HPMA)	61
3.4 Säurelabiler PEG-Linker .....	73
3.4.1 Permanente Oberflächenfunktionalisierung mit PEG .....	74
3.4.2 Synthese des säurelabilen PEG-Linkers .....	78
3.4.3 pH-Studie des säurelabilen PEG-Linkers .....	80
3.5 Funktionalisierung von Polymeren .....	85
3.5.1 Bombesinanbindung .....	85
3.6 Mannose als Targetligand: Mögliche Synthesestrategien .....	89
3.6.1 Thiolmannose .....	89
3.6.2 Alkinmannose .....	90
3.6.3 Aminfunktionalisierter Mannoselinker .....	91

3.7	Anbindung von Mannosestrukturen an Polymersysteme.....	99
3.7.1	Mannose als Starter für die Polymerisation von Aminosäuren (N-Carboxyanhydriden).....	103
3.7.2	Polysarcosin- <i>block</i> -Polymannose.....	109
3.7.3	Aminfunktionalisierter Mannoselinker für die polymeranaloge Reaktion der Reaktivester.....	113
3.8	Radioaktive Markierung.....	121
3.8.1	Radioaktive Mizellen.....	122
3.8.2	Radioaktive Anbindung über die polymeranaloge Reaktion von aminfunktionalisierten Chelatoren.....	127
<b>4.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>137</b>
<b>5.</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>141</b>
5.1	Allgemeines und Messgeräte.....	141
5.2	Synthesen der aminfunktionalisierten Ethylenglykol Linker.....	150
5.2.1	Geschützter aminfunktionalisierter Tetraethylenglykol Spacer.....	150
5.2.2	Aminfunktionalisierter Diethylenglykol-azid Spacer.....	153
5.2.3	PEG <sub>2kDa</sub> Linker mit Aminfunktionalität.....	155
5.2.4	Säurelabiler PEG <sub>2kDa</sub> Linker mit Esterfunktionalität.....	156
5.3	Die Mannose Linker.....	158
5.3.1	Aminfunktionalisierter Mannose Linker.....	158
5.3.2	Thiofunktionalisierte Mannose.....	164
5.3.3	Alkinfunktionalisierte Mannose.....	167
5.4	Monomersynthesen.....	169
5.4.1	Reaktivester Monomer.....	169
5.4.2	Wasserlösliches HPMA Monomer.....	170
5.4.3	Mannose Monomer.....	171
5.5	Kettentransferreagenzien für die RAFT Polymerisation.....	172
5.5.1	Säure-CTA.....	172
5.5.2	Polysarcosin Makro CTA.....	174
5.6	Raft Polymerisationen.....	176
5.6.1	HPMA Homopolymere.....	176
5.6.2	Säure CTA medierte PFPMA Homopolymere <sup>[196],[21]</sup> .....	177
5.6.3	P(PFPMA)- <i>random</i> -P(LMA).....	179
5.6.4	Untersuchung der Copolymerisation von PFPMA und LMA mittels Echtzeit <sup>1</sup> H-NMR Kinetik Messung.....	181
5.6.5	P(PFPMA)- <i>block</i> -P(LMA).....	184
5.7	Polymere mit Sarcosineinheiten.....	186
5.7.1	Mannose initiierte Block Copolypept(o)ide.....	186
5.7.2	P(Sar)- <i>block</i> -P(HPMA).....	190
5.7.3	P(Sar)- <i>block</i> -P(Man).....	191

---

5.8	Polymeranaloge Funktionalisierung .....	192
5.8.1	P(HPMA) aus PFPMA Reaktivester Polymeren .....	192
5.8.2	PEGylierung.....	194
5.8.3	Bombesinanbindung .....	195
5.8.4	Mannoseanbindung.....	196
5.8.5	Chelator Anbindung für radioaktive Markierung .....	202
5.9	Polymer Formulierungen.....	207
5.9.1	Einlagerung von Ga <sup>68</sup> -Komplex in HPMA-LMA Copolymere zur radioaktiven Beladung .....	207
5.9.2	Einlagerung von XAV939 als Wirkstoff für CDs in HPMA-LMA Copolymermizellen.....	209
5.10	Zellexperimente .....	210
5.10.1	Zellexperimente von Block Copolypept(o)iden .....	210
5.10.2	Zellexperimente von HPMA-LMA Copolymeren.....	210
<b>6.</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>211</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>216</b>
<b>8.</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>225</b>
8.1	Publikationen .....	225
8.2	Konferenzen und Präsentationen .....	226
<b>9.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>227</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>229</b>





---

# 1. Einleitung

In den letzten Jahrzehnten hat die Forschung im Bereich der Nanotechnologie ein immer größeres Potential für medizinische Anwendungen gezeigt.<sup>[1]</sup> Die interdisziplinäre Zusammenarbeit der Bereiche Biologie, Physik, Chemie und Medizin hat dem Bereich der Nanomedizin zu stetigem Wachstum verholfen und somit neue Wege für zielgerichtete Pharmakotherapien und diagnostische Verfahren geschaffen. Ziel dabei ist es, eine selektive Anreicherung des Wirkstoffes im betroffenen Gewebe, sowie dessen dortige Freisetzung zu erreichen.<sup>[2]</sup>

Bei herkömmlichen niedermolekularen Therapeutika kommt es, aufgrund ihres niedrigen Molekulargewichtes, zu einer Verteilung im gesamten Organismus, was zu schweren Nebenwirkungen führen kann.<sup>[3]</sup> Alleine aufgrund ihrer Größe (1-1000 nm) bieten daher nanoskalierte Trägermaterialien neue Möglichkeiten und Applikationswege, um solch starke Begleiterscheinungen zu vermindern.

Durch ihre längere Zirkulationszeit im Blut und den Effekt der erhöhten Permeabilität und Retention (*engl. enhanced permeability and retention*, EPR) können sie sich passiv im tumorösen oder entzündeten Gewebe aufgrund der Hypervaskulierung und defekter, permeabler Kapilargefäße, sowie dem verlangsamten Abtransport über das lymphatische System, anreichern.<sup>[4]</sup> Aber auch das aktive Targeting bestimmter Zellen ist mittlerweile möglich, werden die nanopartikulären Wirkstoffsysteme zusätzlich mit Liganden, wie Peptiden<sup>[5]</sup>, Antikörpern<sup>[6]</sup> oder Kohlenhydratstrukturen<sup>[7]</sup> funktionalisiert.

Eine große Klasse solcher funktionalisierter Drug-Deliverysysteme bilden beispielsweise die Glykopolymere. Durch ihre Möglichkeit mit speziellen Kohlenhydratbindenden Proteinen, den sogenannten Lektinen, zu interagieren, können sie in eine Vielfalt von zellulären Erkennungsprozessen eingreifen. So wechselwirken insbesondere mannosylierte Polymersysteme mit dem Mannoserezeptor, der stark von Zellen des Immunsystems exprimiert wird, und können folglich durch die rezeptorvermittelte Endocytose von diesen Zellen spezifisch aufgenommen werden.<sup>[8]</sup>

In der vorliegenden Arbeit wird verstärkt auf die Synthese und Analyse neuartiger mannosylierter Polymere auf Basis von *N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid (HPMA) eingegangen. HPMA Polymere zeigen, vor allem durch die herausragenden

Forschungsarbeiten von Duncan,<sup>[9]</sup> Kopecek und Kopeckova,<sup>[10]</sup> eine immer größere Bedeutung in der Verwendung als makromolekulare Trägermaterialien im Bereich der Nanomedizin und haben es bereits bis in klinische Studien geschafft.<sup>[11][12]</sup>

Während HPMA Copolymere zunächst mittels freier radikalischer Polymerisation mit anschließender Fraktionierung synthetisiert wurden,<sup>[13]</sup> bietet heute die kontrollierte radikalische Polymerisationstechnik wie ATRP (*engl. atom transfer radical polymerisation*)<sup>[14]</sup> oder RAFT (*engl. reversible addition-fragmentation chain transfer*)<sup>[15][16]</sup> eine echte Alternative zur Synthese engverteilter, multifunktionaler Polymere.<sup>[17][18][19]</sup> Die direkte Polymerisation des entsprechenden Monomers bietet dabei zwar eine sehr komfortable Möglichkeit solche Polymere zu synthetisieren, stößt jedoch an ihre Grenzen, gilt es Polymere mit gleicher Kettenlänge und Dispersität aber unterschiedlicher Funktionalitäten herzustellen.

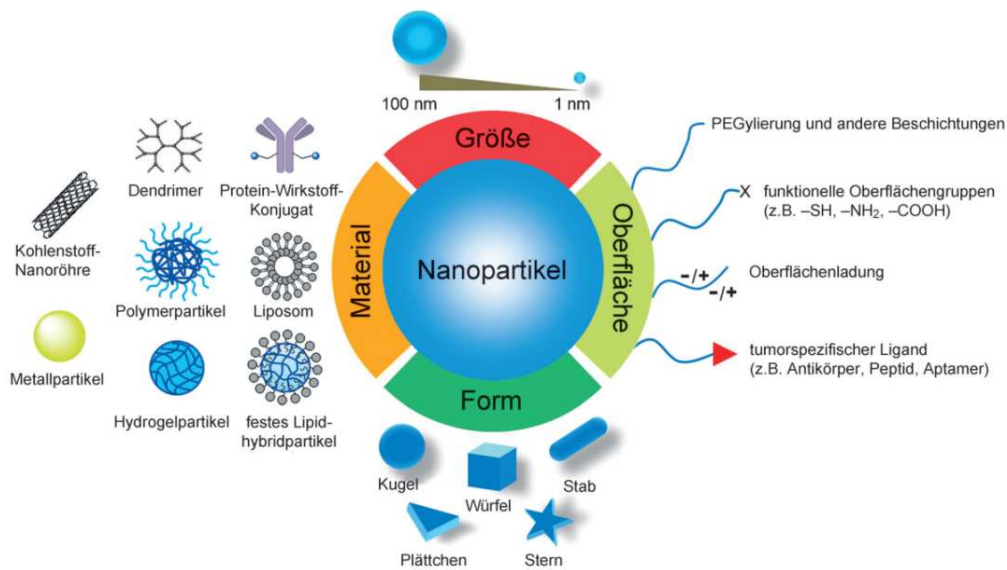
In den letzten Jahren konnte durch Arbeiten in unserer und anderen Forschungsgruppen dieses Problem durch die RAFT Polymerisation von Pentafluorphenolmethacrylat als Reaktivester umgangen werden.<sup>[20][21]</sup> Durch die Synthese von Reaktivesterpolymeren und deren anschließende polymeranaloge Umsetzung zu HPMA Polymeren können gleichzeitig verschiedenste Funktionalitäten wie Farbstoffe, Chelatoren zur radioaktiven Markierung, sowie Targetstrukturen, wie zum Beispiel Mannose, eingeführt werden. Diese Arbeit beschreibt dabei nicht nur die polymeranaloge Reaktion dieser Reaktivester zu mannosylierten HPMA Polymeren, sondern auch das Polymerisationsverhalten von Pentafluorphenolmethacrylat mit Laurylmethacrylat, um auf diesem Wege amphiphile HPMA-LMA Copolymere zu synthetisieren. Diese Copolymere sind dann in der Lage, mizellarer Strukturen auszubilden und hydrophobe Moleküle, wie Antitumorwirkstoffe oder Immunstimulanzen, einzulagern. Sie können sich somit zum einen allein durch ihre Größe passiv im erkrankten Gewebe anreichern und zum anderen durch ihre Mannosefunktionalität speziell Zellen des Immunsystems (Makrophagen, Dendritische Zellen) adressieren und zeichnen sich daher als ein sehr vielversprechendes Drug-Deliverysysteme, sowohl für die Tumorthherapie als auch für die Behandlung anderer Krankheitsbilder, aus.

## 1.1 Polymere Therapeutika

Die Idee, makromolekulare Strukturen als Wirkstoffträger zu verwenden, hat sich schon innerhalb der letzten hundert Jahre entwickelt, als P. Ehrlich, Nobelpreisträger für Physiologie und Medizin 1908 und Begründer der Immunologie und Chemotherapie, die Vision eines perfekt zielgerichteten Pharmakons beschrieb.<sup>[22]</sup> Dieses Prinzip wurde durch DeDuve<sup>[23]</sup> und Ringsdorf<sup>[24][25]</sup> weiterentwickelt, die in den 70er Jahren den Grundstock für polymere Therapeutika legten, wobei hauptsächlich Ringsdorf und später auch Duncan<sup>[9]</sup> diesen Begriff geprägt haben um polymere Wirkstoffe, Polymer-Wirkstoff Konjugate, Polymer-Protein Konjugate, Polymermizellen, sowie Polyplexe zu beschreiben.

Der Transport von Wirkstoffen über eine solche partikelbasierte Plattform bietet im Vergleich zu herkömmlichen Arzneimitteln viele Vorteile. So kann beispielsweise durch die Konjugation eines hydrophilen Polymers mit einem hydrophoben niedermolekularen Wirkstoff die Wasserlöslichkeit und somit der Transport zu dem betroffenen Gewebe enorm verbessert werden. Zudem wird durch den so erzeugten größeren hydrodynamischen Radius des Polymer-Wirkstoff Konjugats die Ausscheidung über die Nieren reduziert. Dies führt somit zu einer längeren Verweildauer im Blut.<sup>[26]</sup> Jedoch müssen diese Polymere Trägermaterialien auch hohen Anforderungen gerecht werden, da sie neben ihrer Wasserlöslichkeit nicht toxisch, nicht-immunogen, biokompatibel und am besten bioabbaubar sein müssen.<sup>[27]</sup>

Nach Jahrzehnten nanotechnologischer Entwicklungen kann man nun auf eine Fülle maßgeschneiderter Nanopartikel blicken, die sowohl aus organischen als auch anorganischen Materialien synthetisiert werden können und deren physikochemische Eigenschaften passgenau einstellbar sind (Abbildung 1).<sup>[27]</sup>

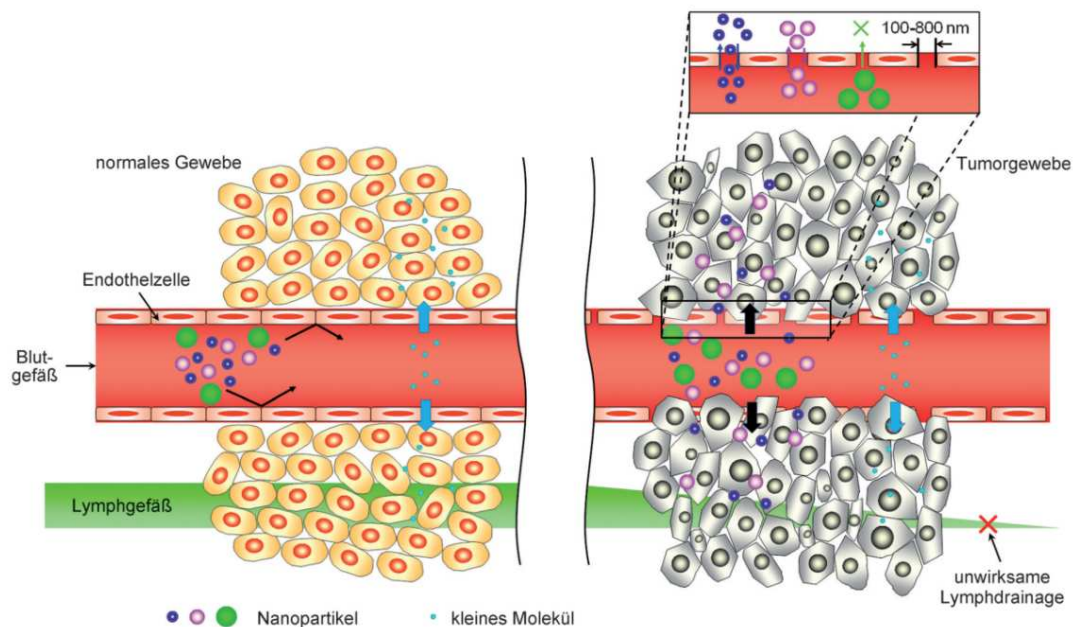


**Abbildung 1:** Schematische Darstellung von Nanopartikeln für den Wirkstofftransport.<sup>[27]</sup>

Die Erfolge des Konzepts der Polymeren Therapeutika werden deutlich, wenn die, in den frühen 90-er Jahren erstmals zugelassenen Polymer-Proteinkonjugate für die Krebstherapie, wie z.B. SMANCS (Zinostatin, Stimalamer), näher betrachtet werden. Dieses Copolymer aus Styrol und Maleinsäure trägt das Antitumorprotein Neocarzinostatin (NCS) und wird für die Behandlung von Heptazellulärem Karzinom verwendet.<sup>[28]</sup> Marktführende nanobasierte Antitumor Medikamente sind allerdings immer noch Polyethylenglykol basierte Konjugate, wie z.B. PEGylierte Asparaginase (Oncaspar®) zur Behandlung von akuter lymphoblastischer Leukämie,<sup>[29]</sup> da PEG als wasserlösliches Polymer nicht-toxisch und als pharmazeutischer Hilfsstoff zugelassen ist. Trotzdem gibt es viele weitere synthetische (z.B. HPMA, PEI, PVP), natürliche (Dextran, Dextrin, Chitosan) und pseudosynthetische Polymere (PGA, PLL, PAsp), an denen intensiv geforscht wird und deren Potential als makromolekulare Trägersysteme *in vivo* sehr vielversprechend sind.<sup>[26]</sup> Durch eine längere Zirkulationszeit im Blut können sie einen Krankheitsherd mehrfach passieren, was zur einer Anreicherung am Zielort führt. Entdeckt wurde dieses Prinzip des passiven Targetings, auch EPR-Effekt genannt (siehe Abschnitt 1.1.1), erstmals von Maeda *et al.* und stellt zweifelsfrei einen Meilenstein im Bereich der Forschung über Polymere Therapeutika dar.<sup>[4]</sup>

### 1.1.1 Passives Targeting (EPR-Effekt)

Der EPR-Effekt (*engl. enhanced permeability and retention effect*) beschreibt zum einen die Anreicherung von Makromolekülen im Tumorgewebe durch eine erhöhte Durchlässigkeit der defekten Gewebestruktur (*enhanced permeability*) und zum anderen die Einbehaltung der Nanopartikel im Tumorgewebe durch einen verringerten lymphatischen Abfluss (*retention*).<sup>[30]</sup> Dieses Phänomen ist die Grundlage des sogenannten passiven Targetings für Polymere Therapeutika. Gesundes Gewebe zeigt diesen Effekt nicht, da die Nanopartikel die intakte Endothelzellschicht auf Grund ihrer Größe nicht passieren können (Abbildung 2) und dieses somit im Idealfall weitgehend von unerwünschten Nebenwirkungen verschont bleibt.



**Abbildung 2:** Der EPR-Effekt bewirkt eine Anreicherung von Nanopartikeln im Tumorgewebe (rechts). Gesundes Gewebe (links) nimmt dagegen nur kleine Moleküle auf.<sup>[27]</sup>

Entdeckt wurde der EPR-Effekt erstmals 1986 von Maeda und seinen Mitarbeitern<sup>[28]</sup> während der mechanistischen Untersuchung bakterieller Entzündungsvorgänge die zur Entstehung von vaskulären Leckagen durch Bildung bakterieller Proteasen führten. Weitere experimentelle Belege lieferte Maeda z.B. durch seine Entwicklung des Albumin gebundenen SMANCS, welches das Konzept des passiven Tumortargetings erstmals nachwies.<sup>[4]</sup> Seine Untersuchungen zeigten, dass Gewebe mit abnormaler Neovaskularisation (entzündetes oder tumoröses Gewebe), in Folge einer starken Angiogenese, um eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff zu gewährleisten, eine verringerte Dichte der Endothelzellen aufweist und stark permeabel

für größere kolloidale Substanzen ist. Dadurch können Makromoleküle, die mit einer Größe von über 40 kDa über der renalen Ausscheidungsgrenze liegen, den EPR-Effekt ausnutzen und in diesem Gewebe akkumulieren.<sup>[31]</sup> Eine Vielzahl von vorklinischen Studien hat zudem gezeigt, dass nicht nur die Größe des Polymers eine entscheidende Rolle bei der Anreicherung in nekrotischem Gewebe spielt, sondern auch andere physiochemische Eigenschaften einen großen Einfluss auf die Pharmakokinetik haben.<sup>[32]</sup> So führt z.B. eine neutrale Oberflächenladung zu höheren Zirkulationszeiten und Plasmahalbwertszeiten, was wiederum zu einer erhöhten Aufnahme im gewünschten Zielort führt.<sup>[3]</sup> Jedoch hat die mittlerweile weitverbreitete Anwendung des passiven Targetings in der klinischen Praxis auch ihre Einschränkungen, da durch die starke Angiogenese die Gefäße sehr ungleichmäßig verteilt sind und somit die Diffusion der Polymer-Wirkstoff Konjugate nicht immer gleichmäßig ist. Zusätzlich ist bei kleineren Tumoren, die aufgrund geringer Angiogenese weniger große Fehlstrukturen aufweisen, das passive Targeting auf Basis des EPR-Effekts eher ineffizient.<sup>[27]</sup> Um in solchen Fällen eine effektivere Aufnahme des Polymer-Wirkstoff Konjugats zu erreichen, können die polymeren Trägersysteme zusätzlich an ihrer Oberfläche mit Liganden, wie etwa kleinen Molekülen, Peptiden, Antikörpern oder Zuckerstrukturen modifiziert werden. Diese Art des Targetings wird auch als aktives Targeting bezeichnet und hat sich teilweise bereits *in vivo* etabliert.<sup>[33]</sup>

### 1.1.2 Aktives Targeting

Die Eigenschaften von nekrotischem Gewebe sind, neben einer fehlerhaften Hypervaskularisation und mangelhafter Ausbildung des Lymphsystems, ein veränderter pH-Wert, eine zunehmende Aktivität spezieller Enzyme und eine (Über-)Expression von bestimmten Oberflächenrezeptoren auf den Zellen.<sup>[34]</sup> Diese Charakteristika werden bei der Einführung von bestimmten Targetstrukturen an der Oberfläche nanopartikulärer Wirkstoffkonjugate ausgenutzt und führen zu einer verstärkten Interaktion zwischen dem Liganden des Carriers und den spezifischen Zielstrukturen im Zielgewebe. Dadurch wird eine Bindungsaffinität des Nanopartikels im Zielgewebe hervorgerufen und dies induziert zusätzlich eine rezeptorvermittelte Endocytose.<sup>[35]</sup> Da die Akkumulation solcher Nanomaterialien im nekrotischen Gewebe immer noch durch das passive Targeting dominiert wird, kann durch die Gegenwart eines zielgerichteten Liganden die Anreicherung nur tendenziell verbessert werden. Dafür kann jedoch die

Retention und die Aufnahme von Nanopartikeln auf Grund der rezeptorvermittelten Endocytose nachweislich erhöht werden, was zu einer Steigerung der intrazellulären Wirkstoffkonzentration führt und die therapeutische Wirksamkeit von Wirkstoffen im pathologischen Gewebe somit steigert.<sup>[36][27]</sup> In den 70er Jahren entwickelte Helmut Ringsdorf erstmals ein polymeres Therapeutikum basierend auf dem EPR-Effekt und dem Prinzip des aktiven Targetings.<sup>[24]</sup> Das sogenannte Ringsdorf-Modell beschreibt ein polymeres System, bestehend aus einem biokompatiblen Polymerrückgrat, welches als Lösungsvermittler für hydrophobe Substanzen dient, einem Wirkstoff, der mittels eines spaltbaren Linkers kovalent an das Polymer gebunden ist und einer Targetstruktur, die für den zielgerichteten Transport sorgt (Abbildung 3).

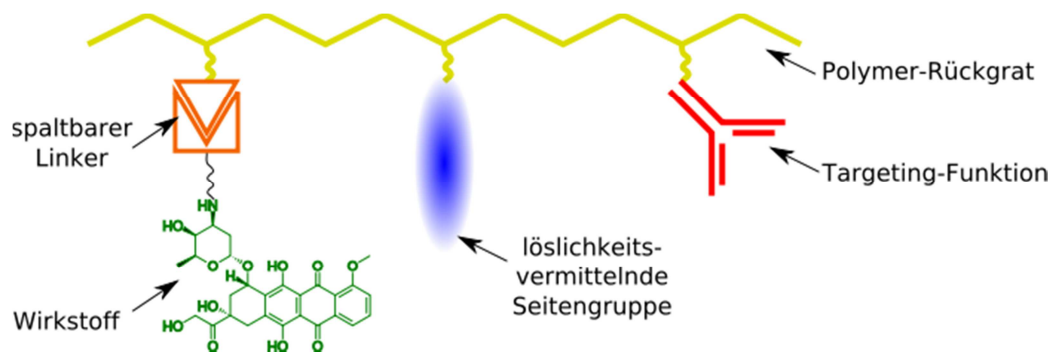


Abbildung 3: Ringsdorf Model.<sup>[37]</sup>

Als Targetstrukturen können Zucker, Hormone, Wachstumsfaktoren, Antikörper, Antikörperfragmente, Peptide oder andere kleine Moleküle verwendet werden,<sup>[38][39]</sup> deren jeweilige Vor- und Nachteile bei der Wahl des geeigneten Liganden berücksichtigt werden müssen. So zeichnen sich zum Beispiel Antikörper durch ihre hohe Bindungsselektivität sowie Bindungsaffinität zu bestimmten Rezeptoren der Zielzellen aus, können jedoch durch ihre Größe von ungefähr 20 nm die Eigenschaften des Nanopartikels sehr stark beeinflussen. Im Gegensatz dazu sind kleine Moleküle wie z.B. Peptide oder Zuckerstrukturen einfach zu synthetisieren, stabiler und weniger immunogenisierend, binden dafür aber weniger stark und spezifisch.<sup>[36]</sup> Dieses Problem kann dabei jedoch durch eine Erhöhung der Dichte dieser kleinen Moleküle auf der Oberfläche des Nanopartikels kompensiert werden.

Das erste zu klinischen Studien zugelassene zielgerichtete polymere Wirkstoffkonjugat, welches auf dem Ringsdorf Model basiert und Zuckerstrukturen als aktive Targetliganden trägt, war das sogenannte PK2. Es besteht aus einem wasserlöslichen

HPMA-(*N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid) Polymer-Rückgrat, welches über einen spaltbaren Peptidlinker (Gly-Phe-Leu-Gly; GFLG) den Antitumorwirkstoff Doxorubicin gebunden hat und Galactosamineinheiten als aktive Targetstrukturen trägt.<sup>[12]</sup> Dieses Polymer Konjugat wurde entwickelt, um primäres heptazelluläres Karzinom zu therapieren, in dem Galactosamineinheiten als multivalente Bindungseinheiten für den heptazellulären asiaglykoprotein Rezeptor (ASGPR) dienen. Dieses zielgerichtete Wirkstoff-Polymerkonjugat konnte somit in einer 12-50-fachen Dosis im Vergleich zum freien Wirkstoff Doxorubicin eingesetzt werden. Dies verdeutlicht wiederum wie groß die Bedeutung von, vor allem glykosylierten, polymeren Trägermaterialien in der Krebstherapie ist.<sup>[40]</sup>

## 1.2 Glykomimetika

In der Natur spielen Kohlenhydrate eine große Rolle, da sie in einer ganzen Reihe von essentiellen biologischen Vorgängen involviert sind. So sind sie nicht nur bedeutend als Energiespeicher oder für die Stabilisierung von Zellwänden, sondern vor allem auch für Zell-Zell Interaktionen und Entzündungsvorgänge von größter Wichtigkeit.<sup>[41]</sup> Aus diesen Gründen weisen Polysaccharide, Glykoproteine, Glykopolymere oder allgemein synthetisch hergestellte Polymere mit Zuckerstrukturen auf der Oberfläche ein großes Potential als Trägersysteme für den zielgerichteten Wirkstofftransport im Bereich der Polymeren Therapeutika auf.<sup>[42]</sup>

Durch die Eigenschaften von Kohlenhydraten an bestimmten Rezeptoren (Lektine) zu binden, können sie bei Konjugation an ein makromolekulares Trägersystem für eine zellspezifische Adressierung genutzt werden. Die rezeptorvermittelte Endocytose derartiger Konjugate führt gegenüber dem nicht funktionalisierten Polymer zu einer verstärkten Aufnahme in der Zielzelle.<sup>[43]</sup> Im Allgemeinen ist die Interaktion zwischen einer Kohlenhydratstruktur und dem entsprechenden Lektin verhältnismäßig schwach ausgeprägt ( $K_d \sim 10^{-3} - 10^{-6}$  mol/l).<sup>[44]</sup> Diese Bindungsstärke kann jedoch durch den sogenannten Glykokluster Effekt enorm gesteigert werden, so dass es zu einer multivalenten Bindung zwischen Ligand und Rezeptor kommen kann und ein Chelat Effekt möglich ist.<sup>[45][46]</sup> Diese Fragestellung der Multivalenz und den daraus resultierenden Effekten wurde von Kiessling *et al.*<sup>[47]</sup> eingehend untersucht. Er konnte zeigen, dass allein auf Grund einer lokal höheren Konzentration an Liganden es rein



statistisch gesehen wahrscheinlicher ist, dass nach dem Lösen einer Bindung sich wieder eine erneute Bindung ausbilden kann.<sup>[48]</sup> Da Polymere durch ihren strukturellen Aufbau typischerweise per Definition als multivalent gelten, bieten sie eine gute Möglichkeit diesen Effekt umzusetzen,<sup>[44]</sup> was anhand von glykosylierten Polymeren, Polymermizellen, Polymersomen und anorganischen Nanopartikeln mit cytosolischen, extrazellulären oder Transmembranproteinen von vielen Wissenschaftlern bereits eingehend untersucht wurde.<sup>[49][50][51][52][53]</sup>

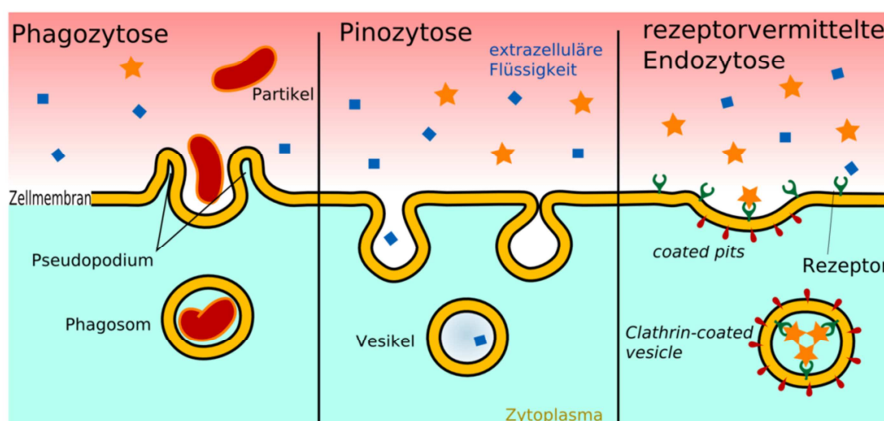
Neben der Bindung an Modellproteine, wie beispielsweise Concavalin A<sup>[53]</sup> oder der Inhibierung von Hämagglutinationsreaktionen (HAI),<sup>[49][50]</sup> können glykosylierte Nanopartikel auch durch die direkte Bindung an Transmembranproteine von spezifischen Zellen über den Mechanismus der Clathrin-vermittelten Endocytose aufgenommen werden. Dadurch kommt es zu einer verstärkten und spezifischeren Zellaufnahme, was in zeitkinetischen Zellaufnahmestudien und in Untersuchungen der intrazellulären Verteilung und spezifischen Aufnahme von Viruspartikeln demonstriert werden konnte.<sup>[54][55]</sup> Als bedeutende Beispiele sind hierfür die Bindung an den Transferrin Rezeptor<sup>[56][57]</sup> und Mannose bindende Rezeptoren (z.B. MMR Familie, DC-SIGN)<sup>[8]</sup> zu nennen, wobei vor allem DC-SIGN vermehrt von dendritischen Zellen exprimiert wird.

Um glykosylierte Polymersysteme zu erhalten, gibt es verschiedene Synthesestrategien. So publizierten Whitesides und Mitarbeiter in den 90er Jahren die Polymerisation von sialylierten Monomeren, sowie die polymeranaloge Modifizierung von Reaktivesterpolymeren zur Synthese des Influenza Hämagglutinin Inhibitors (HAI).<sup>[58]</sup> Auch über das Konzept der kupferkatalysierten Azid-alkin Cycloaddition (CuAAC; „Click-Reaktion“), eingeführt 2001 von Sharpless<sup>[59]</sup> zeigt eine vielseitige und effective Synthesestrategie zur Darstellung von Glykopolymeren, wobei die Entfernung des Kupferkatalysators für den Bereich der biomedizinischen Anwendung immer noch eine große Herausforderung darstellt.<sup>[60]</sup> Eine Alternative dazu könnten thiol-funktionalisierte Zucker bieten, da sich Thiolgruppen durch eine hohe Reaktivität gegenüber verschiedenen Komponenten (z.B. Maleimidgruppen) auszeichnen, ohne dass die Verwendung eines Metallkatalysators notwendig wäre.<sup>[60]</sup>

Es ist allgemein bekannt, dass mannosylierte Polymersysteme von Dendritischen Zellen (DCs) oder Makrophagen aufgenommen werden, die beide eine wichtige Rolle in der Immunabwehr spielen und somit ein interessantes Ziel darstellen, um Immunantworten auszulösen oder zu verändern. DCs werden vor allem bei der Impfung von mannosemodifizierten Trägersystemen gegen verschiedene Modelantigene aktiviert,<sup>[52][53]</sup> wohingegen Makrophagen gezielt adressiert werden um Krankheiten, wie Tuberkulose<sup>[57]</sup> oder Leishmaniose<sup>[56][8]</sup> zu behandeln. Intravenös verabreicht reichern sich mannosylierte Polymere vermehrt in Makrophagen an, wohingegen sie bei subkutaner Injektion fast ausschließlich von kutanen DCs aufgenommen werden.<sup>[61]</sup>

### 1.2.1 Rezeptor vermittelte Endocytose von Nanopartikeln

Für die Aufnahme funktionalisierter Wirkstoffträgersysteme in die Zelle oder an den Wirkort ist das Verständnis über die Aufnahmemechanismen der Zelle sehr wichtig. So gibt es im Wesentlichen drei verschiedene Formen der Zellaufnahme,<sup>[62]</sup> die in Abbildung 4 schematisch dargestellt sind. Die Phagozytose beschreibt dabei die Aufnahme von größeren Partikeln. Sie dient hauptsächlich zur Eliminierung von zugrunde gegangene Zellen, Zelltrümmern oder Pathogenen und kann nur von wenigen spezialisierten Zellen, wie beispielsweise den Makrophagen, bewerkstelligt werden.<sup>[63]</sup> Über den Vorgang der Pinozytose nehmen fast alle Zellen permanent Moleküle aus ihrer Umgebung auf.<sup>[64]</sup>



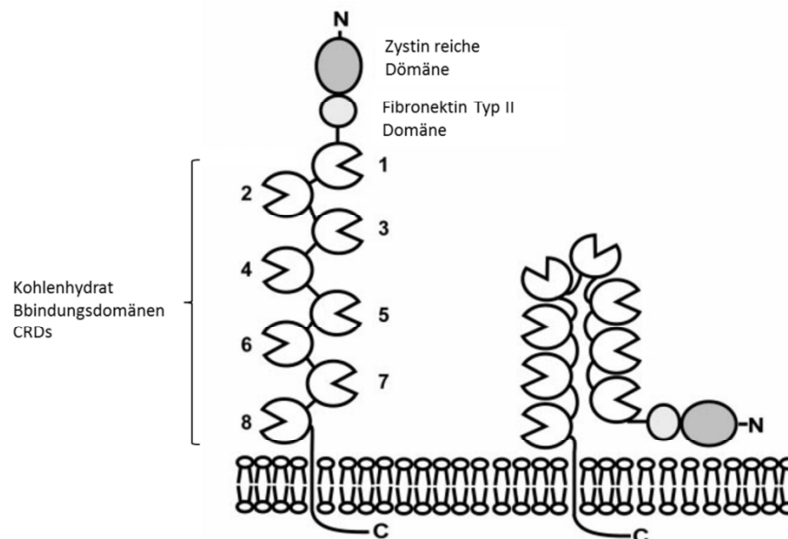
**Abbildung 4:** Aufnahmemechanismen der Zelle: Links: Phagozytose, mitte: Pinozytose, rechts: rezeptorvermittelte Endozytose.<sup>[65]</sup>

Die Rezeptor-vermittelte Endocytose<sup>[66]</sup> bietet im Gegensatz dazu der Zelle die Möglichkeit, gezielt Partikel über eine spezifische Bindung eines Rezeptors an der

Oberfläche aufzunehmen. Die wichtigste Form dabei stellt die Clathrin-vermittelte Endocytose dar. Diese entsteht durch kugelförmige Einstülpungen der Plasmamembran (mit Größen bis zu ungefähr 150 nm), indem sich sogenannte Clathrinproteine an der Membranninnenseite ausbilden. Die entstehenden Clathrinvesikel bilden dann über die Stadien des frühen Endosoms (pH 6) und des späten Endosoms (pH 5) Lysosomen aus, die über saure Hydrolasen die internalisierten Partikel abbauen.<sup>[67]</sup> Einer der vielen Rezeptoren, die eine solche Endozytose vermitteln ist beispielsweise der Mannoserezeptor, der 1978 von Stahl *et al.*<sup>[68]</sup> auf Alveolamakrophagen und 1995 von Sallusto<sup>[69]</sup> auch erstmals auf unreifen dendritischen Zellen nachgewiesen werden konnte. Durch diese rezeptorvermittelte Bindung können beispielsweise mannosylierte Partikel in wesentlich größeren Mengen in eine Zelle aufgenommen werden, als es durch Pinozytose alleine möglich wäre.

### 1.2.2 Der Mannoserezeptor

Der Mannoserezeptor (Abbildung 5) gehört, zusammen mit DC-SIGN, einer Klasse von kohlenhydrat-erkennenden Proteinstrukturen an, den sogenannten C-Typ Lektinen, und wird im Immunsystem als Mustererkennungsrezeptor (*engl. pattern recognition receptor*; PRP) beschrieben. Dabei steht die Bezeichnung C-Typ für eine calciumabhängige Ligandenbindung.<sup>[70]</sup> Alle C-Typ Lektine weisen mindestens eine Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne (*engl. carbohydrate recognition domain*; CRD) auf, wobei der Mannoserezeptor mit acht und DC-SIGN mit einer CRD ausgestattet ist.<sup>[71][72]</sup> Beide Rezeptoren können dadurch sehr spezifisch vor allem mannosylierte Kohlenhydratstrukturen binden und daher eine Reihe von Molekülen über rezeptorvermittelte Endocytose aufnehmen.<sup>[73]</sup> Exprimiert werden diese Mannosebindenden Rezeptoren dabei vermehrt auf DCs, wobei die Expression des Mannoserezeptor mit zunehmender Reifung der DCs abnimmt.<sup>[69][74]</sup>



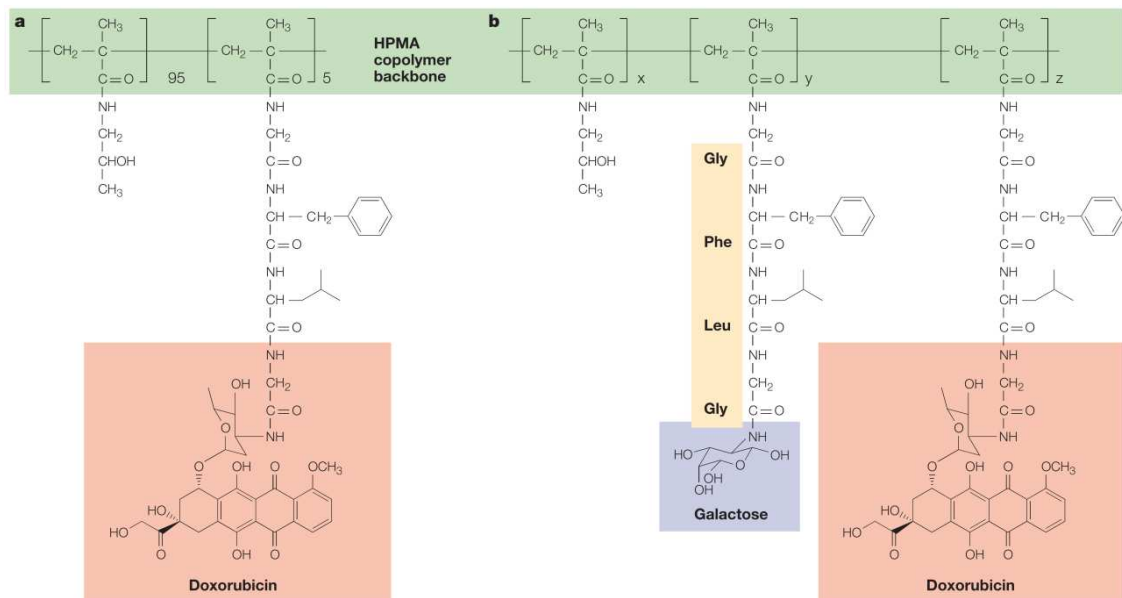
**Abbildung 5:** Mannoserezeptor in der gestreckten Konformation (links) und in der abgewinkelten Form (rechts)<sup>[71]</sup>

Der Mannoserezeptor ist ein Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 175 kDa<sup>[75]</sup> und wird in fünf verschiedene Abschnitte (cytoplasmatische carboxyterminale Region, Transmembrandomäne, CRDs,<sup>[76]</sup> Fibronektin-Typ-II Einheit, cysteinreiche aminoterminal Domäne<sup>[77]</sup>) unterteilt. Von den acht Kohlenhydrat-Bindungsdomänen (1-8 in Abbildung 5) sind dabei nur die CRDs 4 und 5 für eine Erkennung von Kohlenhydratstrukturen verantwortlich und sorgen damit für eine spezifische Bindung dieser Strukturen an die Zellmembran.<sup>[78]</sup> Gebunden werden dabei am stärksten Hexosen mit äquatorialen OH-Gruppen an C3 und C4 Position, die über eine  $\alpha$ -glykosydische Bindung miteinander verknüpft oder darüber an ein Trägersystem angebunden sind.<sup>[79][80]</sup> Deswegen werden bevorzugt mit  $\alpha$ -D-Mannose, L-Fucose und N-Acetylglukosamin funktionalisierte Strukturen gebunden. Eine einzelne CRD kann dabei nur mit einem Zuckermolekül interagieren und liefert somit die Erklärung für die Clusterbildung solcher CRDs und die daraus resultierende verstärkte Bindung verzweigter und multivalenter Kohlenhydrate.<sup>[81]</sup>

Dadurch können mannosylierte Makromoleküle verstärkt von Zellen, die einen Mannoserezeptor tragen, wie beispielsweise die bereits erwähnten DCs oder Makrophagen, aufgenommen werden, wodurch sie durch deren Stimulierung ein vielversprechendes Potential bezüglich der Verbesserung von Chemotherapeutika zeigen.<sup>[8]</sup> Darauf basierend wurde in den letzten Jahren die Synthese von geeigneten Transportsystemen fortwährend weiterentwickelt und liefert bereits jetzt eine Fülle unterschiedlichster Trägermaterialien für den zielzell-gerichteten Wirkstofftransport.

### 1.3 HPMA basierte Copolymere als Wirkstoff-Carrier

Poly(*N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid) gehört zu der Klasse der synthetisch hergestellten Polymere und ist bezüglich der Anwendung als therapeutisches Wirkstoffträgersystem aufgrund der Wasserlöslichkeit und Biokompatibilität, sowie der nicht toxischen und nicht immunogenisierend Eigenschaften sehr vielversprechend. Ursprünglich wurden HPMA-Copolymere als Plasmaexpander verwendet,<sup>[82]</sup> bis es, durch intensive Forschungsarbeiten zwischen Kopecek und Duncan, Ende der 70er Jahre als makromolekulares Trägermaterial für Wirkstoffmoleküle eingesetzt wurde. In Konjugation mit dem Antitumorwirkstoff Doxorubicin wurde unter dem Akronym PK1,<sup>[83]</sup> erstmals 1994 ein HPMA basiertes polymeres Wirkstoffkonjugat zu klinischen Studien zugelassen. Auf das nur auf dem EPR-Effekt basierende Wirkstoffkonjugat folgte dann, wie bereits im vorherigen Abschnitt beschriebenen, das mit Galactosamin modifizierte HPMA Analogon (PK2) für ein zielgerichtetes Lebertargeting. Beide Wirkstoffkonjugate PK1 und PK2 sind in Abbildung 6 dargestellt.<sup>[9]</sup> Weitere zu klinischen Studien zugelassene HPMA Polymerkonjugate sind HPMA-Copolymer-Camptothecin,<sup>[84]</sup> HPMA-Copolymer-Paclitaxel<sup>[85]</sup> und HPMA Copolymer-Platinates.<sup>[86]</sup>



**Abbildung 6:** Die ersten beiden Poly(HPMA) Wirkstoff Konjugate, die zu klinischen Studien zugelassen wurden. a) HPMA-Copolymer-Doxorubicin (PK1; FCE20868) und b) HPMA-Copolymer-Doxorubicin mit Galactosamin angebunden über einen Peptidlinker. Grün = HPMA-Copolymer Rückgrat, gelb = Peptidlinker (Gly-Phe-Leu-Gly), blau = Galactosamin, rot = Doxorubicin.<sup>[9]</sup>

HPMA Copolymer-Wirkstoffkonjugate finden neben ihrer Anwendung in der Krebstherapie zunehmend Einsatz bei der Behandlung anderer Krankheitsgebiete. So kann beispielsweise ein HPMA Polymer, konjugiert mit einem knochenbauenden Wirkstoff (Prostaglandin E<sub>1</sub>; PGE<sub>1</sub>) für die Behandlung von Osteoporose oder anderen muskuloskeletalen Erkrankungen eingesetzt werden.<sup>[87][88]</sup>

Auch finden HPMA Polymer-Wirkstoffkonjugate vermehrt Anwendung bei der Behandlung von Infektions- und Entzündungskrankheiten.<sup>[89]</sup> So konnten Wang *et al.*, mit dem durch ihn postulierten „ELVIS“ (*engl. extravasation through leaky vasculature and the subsequent inflammatory cell-mediated sequestration*) Mechanismus zeigen, dass makromolekulare Therapeutika vermehrt im entzündeten Gewebe akkumulieren und somit nicht ausschließlich für die Behandlung von malignen Erkrankungen geeignet sind.<sup>[90]</sup> Basierend auf dieser Erkenntnis konnten Ghandehari und Mitarbeiter erfolgreich ein rezeptorvermitteltes Anti-Leishmaniose HPMA Copolymer Konjugat synthetisieren mit NPC1161 (8-[(4-amino-1-methylbutyl)amino]-5-[3,4-dichlorophenoxy]-6-methoxy-4-methylquinoline) oder Amphotericin B als Wirkstoff und N-Acetylmannosamin als Target Struktur.<sup>[91][92]</sup>

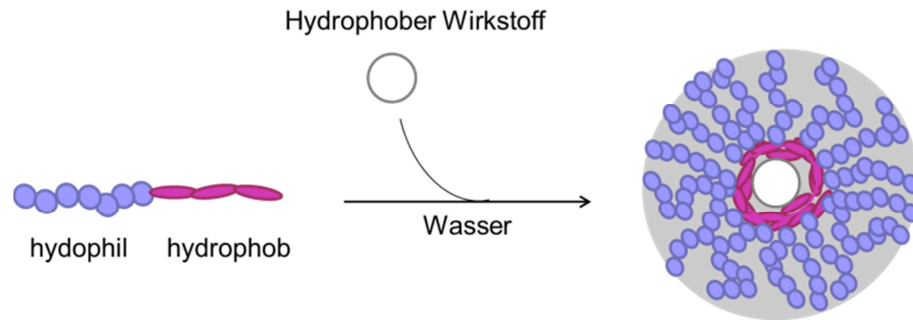
Generell sind jedoch die Anforderungen bezüglich ihrer Pharmakokinetik für alle HPMA Copolymere gleich. So konnten Seymour und Mitarbeiter zeigen, dass das Molekulargewicht einen entscheidenden Einfluss auf die Biodistribution hat. Weiterhin fanden sie heraus, dass die renale Ausscheidungsgrenze solcher HPMA Copolymere bei einer Größe von ungefähr 45 kDa liegt.<sup>[93]</sup>

Neben den bereits erwähnten HPMA Copolymer-Wirkstoffkonjugaten wird immer noch eine Vielzahl anderer polymerer Systeme hinsichtlich ihres therapeutischen Potentials untersucht. Jedoch zeigen die bisher aufgezeigten Beispiele bereits deutlich, dass die Strategie der sehr vielseitigen Polymer-Wirkstoffkonjugation ein richtiger Schritt in Richtung einer verbesserten wirkstoffbezogenen Pharmakokinetik darstellt.<sup>[84][85]</sup>

### **1.3.1 Polymermizellen und deren Anwendung im Wirkstofftransport**

Über die letzten Jahre hat sich ein immer größeres Interesse an der Verwendung von polymeren Mizellen zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung entwickelt.<sup>[94][95]</sup> So können beispielsweise Blockcopolymere, bestehend aus einem hydrophilen und einem hydrophoben Block in wässriger Lösung spontan zu mizellaren Strukturen

selbstassemblieren. Die Ausbildung einer solchen Polymermizelle unter gleichzeitiger Beladung mit einem hydrophoben Wirkstoff, ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.



**Abbildung 7:** Zusammenlagerung eines Blockcopolymeren zu einer Polymermizelle unter gleichzeitiger Wirkstoffbeladung in wässriger Lösung.

Schon frühe Arbeiten von Kataoka,<sup>[96]</sup> Kabanov<sup>[97]</sup> und Mitarbeitern zeigten das hohe Potential solcher amphiphiler Blockcopolymeren pharmakologisch aktive Wirkstoffe entweder durch chemische, physikalische oder elektrostatische Wechselwirkungen, einzulagern. Dabei können durch die chemische Zusammensetzung und das Molekulargewicht des hydrophoben Blocks wichtige Eigenschaften der Polymermizelle, wie zum Beispiel ihre Stabilität, Beladungskapazität oder den Prozess der Wirkstofffreisetzung, beeinflusst werden.<sup>[95]</sup> Die hydrophile Hülle spielt dagegen eher eine Rolle bei den pharmakokinetischen Eigenschaften einer Polymermizelle. So wurden bereits intensive Untersuchungen bezüglich der Plasmahalbwertszeit von PEG-basierten Blockcopolymer Mizellen<sup>[94][98][99]</sup> durchgeführt, die zeigten, dass diese Hülle sowohl vor der Absorption von Serumproteinen schützt, als auch eine Opsonierung während der Zirkulationszeit unterbindet. Zusätzlich verhindert die Größe von Blockcopolymermizellen (10-200 nm)<sup>[95]</sup> deren Aufnahme durch das retikuloendotheliale System (RES) und eine passive Akkumulierung im Gewebe mit abnormaler Neovaskularisation durch den EPR-Effekt (siehe Kapitel 1.1.1) ist somit möglich.

Im Vergleich zu anderen Drug-Delivery Systemen, wie zum Beispiel traditionelle amphiphile Tenside, sind Blockcopolymermizellen, durch ihre niedrigen CMC (kritische Mizellenkonzentration; *engl. critical micell concentration*) Werte im mikromolaren Bereich, sehr viel stabiler. Zusätzlich können sie sowohl in ihrem hydrophoben Kern, als auch in ihrer hydrophilen Hülle mit stimuli-responsiven

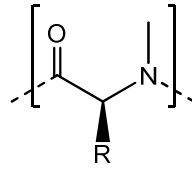
Funktionalitäten oder Vernetzern modifiziert werden, was sie zu einem universellen und einzigartigen nanopartikulären Trägersystem macht.<sup>[98][36]</sup>

In der vorliegenden Arbeit werden Polymermizellen aus HPMA-LMA Blockcopolymeren synthetisiert. Wie in Abschnitt 1.3 bereits aufgezeigt wurde, ist Poly(HPMA) eine attraktive Alternative zu PEG-basierten Systemen, da es zu seiner Biokompatibilität und Nicht-Immunogenität zusätzlich den Vorteil der Multifunktionalität aufweist. So erhielten Konak *et al.* bei der Verwendung von P(HPMA)-*b*-BA Copolymeren<sup>[100]</sup> in Wasser sehr kleine und dichte mizellare Strukturen mit einer Größe von weniger als 50 nm. Ähnliche Resultate erzielten Barz *et al.*<sup>[101]</sup> bei der Synthese von HPMA-LMA Blockcopolymeren mit verschiedenen Blocklängen, die zudem keinerlei Zelltoxizität bis zu einer Konzentration von 2 mg/ml aufwiesen. Fortgeführte Arbeiten von Allmeroth *et al.*<sup>[102]</sup> zeigten, dass mit <sup>131</sup>Iod-markierte hochmolekulare HPMA-LMA Copolymere in einer *in vivo* Langzeit Biodistributionsstudie, eine vermehrte Akkumulation in bestimmten Tumorgeweben aufgrund des EPR-Effekts aufweisen. Durch zusätzliche Einführung von PEG Seitenketten, konnten die Mizellen verdichtet und der Abbau im Blut vermindert werden. Darüber hinaus wurden HPMA-basierte Polymermizellen aus Triblockcopolymeren und stimuli-responsiven Blockcopolymeren hergestellt, was zeigt, dass Poly(HPMA) ein großes Potential für die Anwendung im Wirkstofftransport aufweist.

### **1.4 Bioabbaubare Polymere auf Polypeptidbasis**

Obwohl die erwähnten HPMA-basierten Polymere sehr vielversprechende Trägermaterialien für den Wirkstofftransport darstellen, haben sie, wie auch die PEGylierten Systeme, den entscheidenden Nachteil, dass sie im Körper nicht abgebaut werden können. Eine Alternative dazu stellt die Verwendung von Polysarcosin dar. Polysarcosin ist ein Peptoid und besteht aus Sarcosin, einer endogenen Aminosäure. Somit kann dieses Polypeptoid, welches eine analoge Rückgratstruktur zu Polypeptiden aufweist (siehe Abbildung 8), zu nicht-toxischen Metaboliten im Körper abgebaut werden. Darüber hinaus ist es resistent gegenüber der Anlagerung von Serumproteinen, sowie nicht-immunogen und erfüllt somit alle Eigenschaften der Biokompatibilität.<sup>[103][104]</sup>





**Abbildung 8:** Polypeptidstruktur. Polysarcosin R = H; Polypeptid R= Aminosäurerest

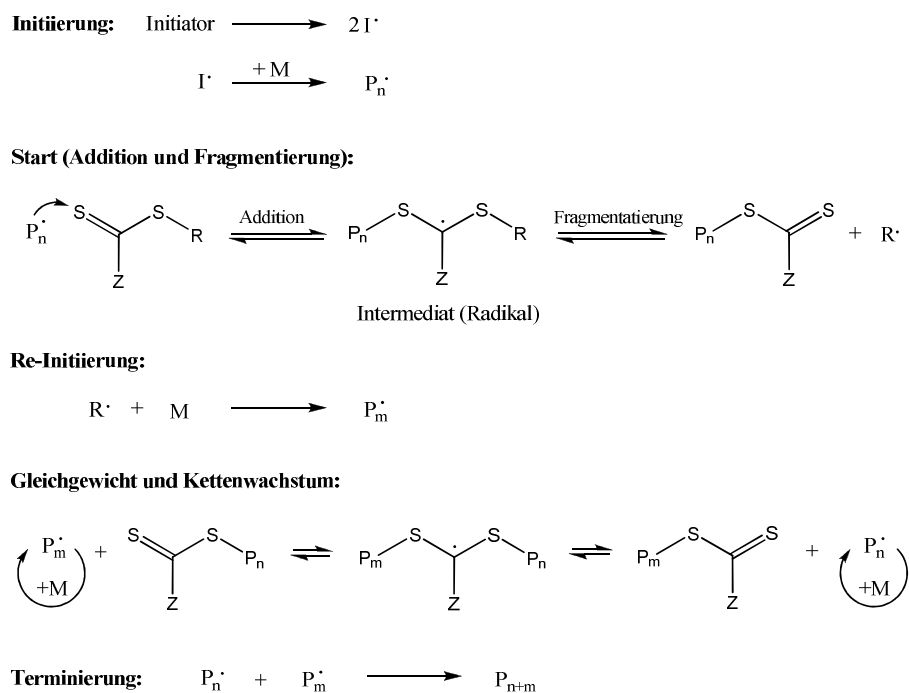
Bereits 1977 publizierten Higashimura und Mitarbeiter erstmals die lebende Polymerisation von P(Sar),<sup>[105]</sup> wobei es erst 40 Jahre später als potentielle Alternative zu PEG in der biomedizinischen Anwendung wiederentdeckt wurde. Durch die Copolymerisation von Sarcosin mit Aminosäuren ist es zudem möglich Polypeptidblock-Polypeptid Strukturen zu synthetisieren, die nicht nur *Stealth* Eigenschaften aufweisen (Polysarcosin), sondern auch mit verschiedenen Funktionalitäten ausgestattet werden können (Aminosäureseitenkette). Während Guo<sup>[106]</sup> aus P(Sar) cyclische Copolypept(o)ide herstellte, verwendete die Gruppe von Luxenhofer<sup>[107]</sup> P(Sar) zur Synthese von Block Copolypept(o)iden. Erstaunlicherweise hat bis jetzt nur die Gruppe von Kimura und Barz P(Sar) als PEG Ersatz in der Synthese von Block Copolymeren für medizinische Anwendungen verwendet, wie z.B. bei Lactosomen,<sup>[108]</sup> Mikrosphären,<sup>[109]</sup> Peptomizellen<sup>[110]</sup> und PeptoPlexen<sup>[111]</sup>. In dieser Arbeit werden P(Sar)systeme verwendet, die von Huesmann und Heller aus der Gruppe von Barz über die ringöffnende Polymerisation von N-substituierten  $\alpha$ -Aminosäure N-Carboxyanhydriden (Sarcosin NCA) synthetisiert und zur Verfügung gestellt wurden<sup>[111]</sup>. Diese Polypept(o)ide bzw. Peptomizellen wurden dann beispielsweise mit Mannose als Initiator an einer Endgruppe funktionalisiert oder unter Verwendung eines Mannosemonomers mittels RAFT Polymerisation zu P(Sarc)P(Mannose) Systemen erweitert.

## 1.5 Synthese polymerer Systeme mittels RAFT-Polymerisation

Um ein so breites Feld von möglichen Anwendungsgebieten von polymeren Therapeutika abzudecken, ist ein vielfältiges Angebot von sehr definierten und engverteilten makromolekularen Trägermaterialien nötig. Dies ist durch die Polymerisationstechnik der kontrollierten Radikalik, wie z.B. der ATRP<sup>[112]</sup> (*engl. atom transfer radical polymerisation*) oder der RAFT<sup>[113]</sup> (*engl. reversible addition-fragmentation chain transfer*) möglich. Für die Anwendung der Polymere im

medizinischen Bereich ist die RAFT Polymerisation zu favorisieren, da sie sehr tolerant gegenüber vielen Lösemitteln und Monomeren ist und keine Metallkomponenten benötigt, die mögliche Zytotoxizitäten hervorrufen könnten.<sup>[15][14][114]</sup>

Der RAFT Prozess, erstmals 1998 von Rizzardo<sup>[113]</sup> und seinen Mitarbeitern beschrieben, wurde über die letzten Jahrzehnte vor allem zur Synthese von Polymeren für biomedizinische Anwendungen genutzt. Der Mechanismus, so wie er vom Team der Commonwealth Science & Industrial Research Organisation (CSIRO) in Australien postuliert wurde, ist in Abbildung 9 dargestellt.



**Abbildung 9:** Mechanismus der RAFT Polymerisation (von der CSIRO-Gruppe postuliert).<sup>[113]</sup>

In dieser Art der lebenden radikalischen Polymerisation wird die Konzentration der freien Radikale durch ein sogenanntes Kettentransferreagenz (CTA, engl. *chain transfer agent*), wie z.B. einem Dithioester, niedrig gehalten, in dem es gleichzeitig eine wachsende Polymerkette terminieren und eine andere starten kann (siehe Abbildung 9, Start).<sup>[115]</sup> Deswegen ist im RAFT-Prozess sowohl der Prozess des Wachstums, als auch die daraus resultierende Architektur des Polymers von diesen Kettentransferreagenzien abhängig.

Die Initiierung erfolgt bei der RAFT-Polymerisation über einen konventionellen Initiator wie z.B. AIBN (Azo-bis-isobutylnitril) oder BPO (Benzoylperoxid), die dann als Radikal eine wachsende Kette starten. Die wachsende Kette ( $P_n^\cdot$ ) kann dann mit dem Kettentransferreagenz reagieren und führt über ein Intermediat-Radikal („schlafende

Spezies“) zu einer polymeren Thiocarbonylthiokomponente und einem Radikal R $\cdot$ , welches mit einem neuen Monomer wiederum eine weitere wachsende Kette starten kann (Reinitiierung). Das Kettenwachstum beruht also auf einem schnellen Gleichgewicht zwischen der dominierenden „schlafenden Spezies“ und einer wachsenden Radikalkette (P $_n\cdot$  und P $_m\cdot$ ). Deswegen ist die Wahrscheinlichkeit für alle Ketten gleichgroß mit einem Monomer zu reagieren. Auch wird durch die niedrige vorherrschende Radikalkonzentration die Abbruchreaktion (Reaktion 2. Ordnung) gegenüber der Wachstumsreaktion (Reaktion 1. Ordnung) zurückgedrängt. Beides führt somit zu engverteilten Polymersystemen mit Dispersitäten unter 1,2 ( $\mathcal{D} < 1,2$ ). Nach Beendigung einer RAFT Polymerisation besitzen nahezu alle Kettenenden eine Thiocarbonylendgruppe, die wiederum reaktiviert werden kann um beispielsweise Blockcopolymere herzustellen oder unterschiedliche Funktionalitäten an die  $\alpha$  oder  $\omega$  Position eines Polymers einzufügen.<sup>[115]</sup> Dafür ist es wichtig eine gute Abgangsgruppe (R-Gruppe in Abbildung 9) zu wählen, damit diese dann wiederum effiziente reinitiierende Radikale (R $\cdot$ ) bilden können. Die Z-Gruppe in Abbildung 9 muss eine aktivierende Wirkung auf die C=S Bindung ausüben und zusätzlich das Intermediat-Radikal stabilisieren, weswegen typischerweise entweder Schwefel oder Sauerstoff gewählt wird.

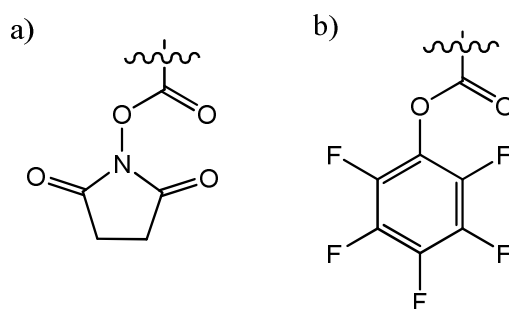
Wegen der oben genannten Eigenschaften zeigt der RAFT-Prozess ein immer größeres Potential in dem stetig wachsenden Gebiet der Polymere für biomedizinische Anwendungen. Vor allem in Kombination mit Reaktivestern können so mannigfaltige Polymerarchitekturen gebildet und verschiedenste Funktionalitäten eingeführt werden.

## 1.6 Reaktivesterpolymere und ihre Anwendung in polymeranalogen Reaktionen

Der Einsatz von aktivierten Estern hat die Synthese makromolekularer Trägersysteme für die biomedizinische Anwendung, sowie auch die Peptidsynthese, in großem Maße bereichert. So wurden bereits in den 50er Jahren viele verschiedene Arten von Reaktivestern, wie z.B. Thiophenylester von Wieland<sup>[116]</sup> oder aktivierte Methylester von Schwyzer,<sup>[117]</sup> publiziert. Die Polymerisation von Reaktivestern wie den *O*-Acetylderivat von Hydroxylaminen (*N*-Methacryloxysuccinimid (NMAS), *N*-Arcyloxysuccinimid (NAS)) zu den sogenannten NHS (*N*-Hydroxysuccinimid)-

Polymerestern,<sup>[118]</sup> wurde erstmals von Ringsdorf<sup>[24]</sup> und Mitarbeitern beschrieben, die damit diese pharmakologisch aktiven Polymere in das Feld der polymeren Therapeutika einföhrten.

Ein großer Nachteil dieser NHS-Esterpolymere ist jedoch ihre schlechte Löslichkeit, da sie nur in Dimethylsulfoxid (DMSO) oder *N,N*-Dimethylformamid (DMF) löslich sind. Im Gegensatz dazu zeigen die Polymersysteme des Reaktivesters Pentafluorophenylmethacrylate (PFPMa) und Pentafluorophenylacrylat (PFPA) nicht nur eine verbesserte Löslichkeit in verschiedensten organischen Lösemitteln und eine gesteigerte Reaktivität gegenüber den klassischen NHS-basierten Polymeren, sondern können zusätzlich über <sup>19</sup>F-NMR sehr leicht auf eine vollständige Umsetzung überprüft werden.<sup>[119]</sup> Alle genannten polymeren Reaktivester (siehe auch Abbildung 10) werden über nukleophile Substitution polymeranalog umgesetzt.<sup>[120]</sup>



**Abbildung 10:** Funktionelle Gruppen der Reaktivesterpolymere für die polymeranaloge Umsetzung. a) NAS, NMSA; b) PFPA, PFPMa.

Da Amine eine bessere Nukleophilie aufweisen als andere funktionelle Gruppen (z.B. Hydroxylgruppen von Alkoholen), reagieren sie sehr selektiv mit den Reaktivestern, was den Einsatz von Schutzgruppen überflüssig macht. Ein weiterer Vorteil ist die Zugänglichkeit von Polymeren über die polymeranaloge Reaktion, die anders nicht zu synthetisieren sind, sowie der gleichzeitige Einbau vieler verschiedener Funktionalitäten, wie z.B. Fluoreszenzmarker oder aktive Targetstrukturen.<sup>[120]</sup> Der Weg über den Reaktivesteransatz ermöglicht es somit, den Einfluss verschiedener Seitenkettenmodifizierungen in Copolymeren, unter Erhalt des Polymerisationsgrad zu untersuchen und damit Struktur-Eigenschaftsbeziehungen besser miteinander vergleichen zu können. Dies gilt sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

So wurde beispielsweise 2008 von Barz<sup>[101]</sup> und 2009 von Klok und Mitarbeitern<sup>[121]</sup> Poly(PFMA) erfolgreich eingesetzt, um multifunktionelle HPMA-basierte Polymersysteme darzustellen. Doch obwohl der Weg über den Reaktivesteransatz viele Vorteile bietet, können Nebenreaktionen, wie zum Beispiel die Hydrolyse des

Polymerrückgrats auftreten. Die resultierenden Carboxylsäuregruppen können zu negativen Ladungen an der Polymerkette führen, welche, wie in Abschnitt 1.1.1 bereits beschrieben wurde, die Körperverteilungen beeinflussen kann.<sup>[122]</sup> In der vorliegenden Arbeit wird unter anderem gezeigt, unter welchen Bedingungen PFMA Polymere polymeranalog zu HPMA basierten Polymeren umgesetzt werden müssen, damit solche Nebenreaktionen, wie z.B. die Hydrolyse, nicht auftreten können und wie die Reaktivesterchemie ausgenutzt wird, um gleichzeitig aminfunktionalisierte Mannosestrukturen und weitere Funktionalitäten (z.B. Fluoreszenzmarker, Infrarotfarbstoffe, Chelatoren für radioaktive Markierung) in diese Polymersysteme einzuführen.

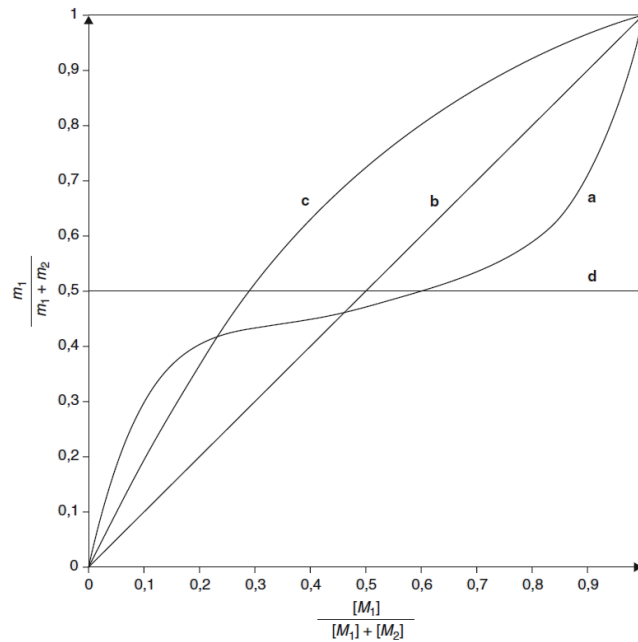
## 1.7 Copolymerisationsparameter

Neben der Synthese von Blockcopolymeren oder Pfropfpolymeren über spezielle Polymerisationstechniken, wie zum Beispiel RAFT oder lebende anionische Polymerisation, ist eine Vielzahl von anderen Copolymeren durch die Polymerisation mehrerer Monomere nebeneinander möglich. Es ist somit auch möglich, mit statistischen Copolymeren Mizellen zu bilden und Wirkstoffe einzulagern, was bereits erfolgreich durch die Einlagerung von Domperidon in statistische HPMA-LMA Copolymere in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte.<sup>[123]</sup> Gleichzeitig sind die Eigenschaften von Polymeren durch die Copolymerisation eines weiteren Monomers beliebig variierbar. Ein Problem bei der Verwendung von „statistischen“ Copolymeren ist jedoch Information über die Sequenzverteilung der Monomere in der Polymerkette. Im Gegensatz zu einem Blockcopolymer ist diese in einem „statistischen“ Copolymer durch die unterschiedlichen Reaktivitäten der Monomere zueinander oft nicht genau bestimmbar.

Daher ist die Untersuchung der Polymerisationskinetik und der Monomerreaktivitäten zueinander wichtig um Informationen über die Copolymerisationszusammensetzung und die Monomersequenzen im Polymer zu erhalten. Theoretisch ist es somit möglich über die Copolymerisationsparameter eines Monomerpaares den Copolymerisationsverlauf vorherzusagen und somit die Eigenschaften eines Polymers gezielt zu verändern.<sup>[124]</sup>

Eine erste Abschätzung der Größenordnungen von den Copolymerisationsparametern  $r_1$  und  $r_2$  liefert ein sogenanntes Copolymerisationsdiagramm. In diesem wird der Molenbruch des momentanen Einbaus in das Polymer gegen den Molenbruch der

Monomere in Lösung aufgetragen und ist für unterschiedliche Copolymerisationsparameter in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11:** Copolymerisationskurven. a)  $r_1 < 1, r_2 < 1$ , statistisches Copolymer; b)  $r_1 = 1, r_2 = 1$ , ideales Copolymer (Einbauverhältnis entspricht Monomerenzusammensetzung); c)  $r_1 < 1, r_2 > 1$  oder  $r_1 > 1, r_2 < 1$ ; d)  $r_1 = 0, r_2 = 0$ ; alternierenden Copolymer.<sup>[125]</sup>

Bei der Berechnung der Copolymerisationsparameter geht man davon aus, dass nur die letzte Monomereinheit einer Kette deren Reaktivität bestimmt. Es ergeben sich somit vier unterschiedliche Wachstumsreaktionen:



Für die Geschwindigkeiten des Verbrauchs der beiden Monomere ergeben sich folgende Beziehungen:

$$-\frac{d[M_1]}{dt} = k_{11}[P - M_1^*][M_1] + k_{12}[P - M_2^*][M_1] \quad (5)$$

$$-\frac{d[M_2]}{dt} = k_{21}[P - M_1^*][M_2] + k_{22}[P - M_2^*][M_2] \quad (6)$$

Durch Division der beiden Gleichungen und Einführung der

Copolymerisationsparameter

$$r_1 = \frac{k_{11}}{k_{12}}, \quad r_2 = \frac{k_{22}}{k_{21}} \quad (7)$$

ergibt sich, unter Anwendung des Stationaritätsprinzips, die Copolymerisationsgleichung:

$$\frac{m_1}{m_2} = \frac{d[M_1]}{d[M_2]} = \frac{[M_1]}{[M_2]} \cdot \frac{r_1[M_1]+[M_2]}{r_2[M_2]+[M_1]} \quad (8)$$

Diese beschreibt das Verhältnis des momentanen Einbauverhältnisses der Monomere des Copolymers als Funktion der momentan vorliegenden Monomerkonzentrationen in der Lösung. Die Copolymerisationsparameter  $r_1$  und  $r_2$  in dieser Gleichung geben dabei die relativen Reaktivitäten der Polymerradikale mit den beiden möglichen Monomeren an. Somit bietet die Copolymerisationsgleichung die Möglichkeit die Zusammensetzung eines Copolymers bei einer gegebenen Monomermischung im Voraus zu berechnen und sie enthält zudem Informationen über die mittlere Sequenzlänge und die Sequenzlängenverteilung des erhaltenen Copolymers.

Damit die Copolymerisationsgleichung angewendet werden kann, müssen folgende Bedingungen erfüllt sein:

- Die Wachstumsschritte müssen irreversibel sein
- Die Kettenlänge muss groß genug sein, damit die Start-, Übertragungs- und Abbruchreaktionen gegenüber der Wachstumsreaktion vernachlässigt werden können
- Nur die letzte Monomereinheit einer Kette bestimmt deren Reaktivität
- Der Umsatz muss gering sein, damit die Monomerkonzentration zu jedem Zeitpunkt als konstant angesehen werden kann.<sup>[125]</sup>

Es gibt nun eine Vielzahl von Möglichkeiten die Copolymerisationsparameter zu berechnen. In den letzten 40 Jahren wurden viele Copolymerisationsparameter publiziert, jedoch ist bis heute keine einheitliche Methode zu deren Berechnung entwickelt worden. Die Verfahren nach **Mayo/Lewis**, **Fineman/Ross** und **Kelen/Tüdös** verwenden beispielsweise die Copolymerisationsgleichung in ihrer differentiellen

Form. Wenn es also nicht möglich ist, die Konzentration der Monomere permanent „online“ zu verfolgen,<sup>[126]</sup> können somit die Copolymerisationsparameter bei kleinen Umsätzen berechnet werden, mit der Annahme, dass die Monomerkonzentration konstant bleibt. Aber auch bei höheren Umsätzen (>40%) können die Copolymerisationsparameter nach dem erweiterten Verfahren von **Kelen/Tüdös** ermittelt werden. Im Folgenden wird ein chronologischer Überblick über die verschiedenen Methoden der Copolymerisationsparameterberechnungen gegeben.

So formten beispielsweise **Mayo und Lewis 1944** die Copolymerisationsgleichung folgendermaßen um:

$$r_2 = r_1 \cdot \frac{([M_1]/[M_2])^2}{m_1/m_2} + \frac{[M_1]/[M_2]}{m_1/m_2} - \frac{[M_1]}{[M_2]} \quad (9)$$

Dabei werden Versuche mit verschiedenen Monomierzusammensetzungen durchgeführt und man erhält für jedes Monomergemisch Werte für  $r_2$  in dem man willkürliche Werte von 0-1 für  $r_1$  einsetzt. In einem Diagramm wird nun  $r_1$  gegen  $r_2$  aufgetragen und jedes Monomergemisch ergibt eine Gerade, deren Schnittpunkt die wahren Copolymerisationsparameter angibt. Die Geraden schneiden sich dabei meistens nicht in genau einem Punkt, sondern in einem mehr oder weniger großen Bereich. Durch diese Ungenauigkeit und durch das willkürliche Einsetzen der  $r_1$  Werte ist diese Methode sehr ungenau und wird deswegen kaum noch verwendet.<sup>[127]</sup>

Durch die Einführung einer linearisierten Form der Copolymerisationsgleichung von **Fineman und Ross 1950** konnte dieses Problem umgangen werden. Diese Form der Gleichung gibt für infinitesimal kleine Monomerumsätze die relative Änderung der Monomerenkonzentrationen  $[M_1]$  und  $[M_2]$ , sowie das Verhältnis der Monomeranteile  $m_1$  und  $m_2$  im momentan entstandenen Copolymer an.

Somit folgt über

$$\lim_{X_p \rightarrow 0} \frac{m_1}{m_2} = \frac{[M_1] r_1 [M_1] + [M_2]}{[M_2] r_2 [M_2] + [M_1]} \quad (10)$$

die Fineman-Ross-Gleichung:

$$\frac{[M_1]}{[M_2]} \cdot \frac{m_2 - m_1}{m_1} = - \frac{m_2 [M_1]^2}{m_1 [M_2]^2} \cdot r_1 + r_2 \quad (11)$$



Durch die Umformung der Gleichung

$$\frac{[M_1]/[M_2] \cdot (m_1/m_2 - 1)}{m_1/m_2} = \frac{([M_1]/[M_2])^2}{m_1/m_2} \cdot r_1 + r_2 \quad (12)$$

und mit

$$f = \frac{[M_1]}{[M_2]} \quad (13)$$

$$F = \frac{d[M_1]}{d[M_2]} = \frac{[M_1] - [M_1]_0}{[M_2] - [M_2]_0} = \frac{m_1}{m_2} \quad (14)$$

erhält man:

$$\frac{f \cdot (F-1)}{F} = r_1 \cdot \frac{f^2}{F} - r_2 \quad (15)$$

Wird nun  $f \cdot (F-1)/F$  (y-Achse) gegen  $f^2/F$  (x-Achse) aufgetragen erhält man eine Geradengleichung aus der  $r_1$  als Steigung und  $r_2$  als Ordinatenabschnitt bestimmt werden kann. Dabei haben experimentell bestimmten Grenzwerte (geringe  $M_1$  oder  $M_2$  Konzentrationen im Monomeransatz) einen großen Einfluss auf die r-Parameter, da sie den größten Einfluss auf die Steigung der Geraden besitzen. Außerdem ergibt die Umbenennung der beiden Monomere unterschiedliche Werte für die Copolymerisationsparameter.<sup>[128]</sup>

**Kelen und Tüdös** entwickelten **1975** ein linearisiertes Verfahren in Anlehnung an die Methode von **Fineman/Ross** (Gleichungen 12-14). Sie führten sogenannte Symmetrisierungsparameter ein, damit die Wertepaare gleichmäßig über das Intervall 0-1 verteilt sind und die ungleiche Gewichtung, wie bei **Fineman/Ross** umgangen wird.

Dazu wird Gleichung (15) mit den Abkürzungen

$$G = \frac{[M_1]/[M_2] \cdot (m_1/m_2 - 1)}{m_1/m_2} = \frac{f \cdot (F-1)}{F} \quad \text{und} \quad H = \frac{([M_1]/[M_2])^2}{m_1/m_2} = \frac{f^2}{F} \quad (16)$$

vereinfacht zu

$$G = r_1 \cdot H + r_2 \quad (17)$$

und der Symmetrisierungsparameter  $\alpha = \sqrt{H_{min} \cdot H_{max}}$  eingeführt:

$$\frac{G}{\alpha + H} = \left( r_1 + \frac{r_2}{\alpha} \right) \cdot \frac{H}{\alpha + H} - \frac{r_2}{\alpha} \quad (18)$$

mit

$$\eta = \frac{G}{\alpha+H} \quad \text{und} \quad \xi = \frac{H}{\alpha+H} \quad (19)$$

folgt die lineare Gleichung, die durch die Auftragung von  $\eta$  gegen  $\xi$  die Copolymerisationsparameter liefert.

$$\eta = \left( r_1 + \frac{r_2}{\alpha} \right) \cdot \xi - \frac{r_2}{\alpha} \quad (20)$$

Die besten Werte für den Hilfsparameter  $\alpha$  erhält man dabei über das geometrische Mittel von  $H_{\min}$  und  $H_{\max}$ . Um die Copolymerisationsparameter zu erhalten werden wieder verschiedene Versuche mit unterschiedlichen Monomerzusammensetzungen durchgeführt, die einen Wert für  $\alpha$  und verschiedene Werte für  $\eta$  und  $\xi$  liefern. Die erhaltende Gerade wird auf  $\xi = 0$  und  $\xi = 1$  extrapoliert und liefert als Achsenabschnitt die Werte  $\eta(0) = -r_2/\alpha$  und  $\eta(1) = r_1$ . Diese Methode kann dabei lediglich angewendet werden, wenn davon ausgegangen wird, dass es nur vier verschiedene Wachstumsschritte gibt.

Ein Vorteil von dem Verfahren nach Kelen und Tüdös ist, dass zusätzlich die Gültigkeit der Copolymerisationsgleichung für das Polymerisationssystem aufgezeigt werden kann. Bilden die erhaltenen Punkte eine Gerade, so ist die Copolymerisationsgleichung anwendbar. Beschreiben die Messpunkte eine Kurve oder sind weit gestreut, so ist eine Berechnung der Copolymerisationsparameter auf diesem Wege nicht möglich.<sup>[129][130]</sup>

Mittlerweile ist es jedoch möglich über verschiedene Programme die Copolymerisationsparameter numerisch berechnen zu lassen. In dieser Arbeit wird dafür ein speziell entwickeltes Programm von van Herk *et al.* verwendet. In dieses Programm Contour werden dann die Werte der Monomerausgangskonzentrationen und die der eingebauten Monomeranteile eingegeben. Dabei wird die Methode der nicht-linearen kleinsten Fehlerquadrate angewendet und somit angenommen, dass die Fehler unabhängig voneinander sind und innerhalb einer gemeinsamen Varianz normalverteilt sind. Das Contour-Programm sucht dabei über iterative Prozesse nach dem Minimum der Quadratsumme der einzelnen Residuen und visualisiert diese in einer benutzerdefinierten Region und findet so die optimalen Werte für die r-Parameter.<sup>[131][132]</sup> Zusätzlich wird mit diesem Programm der Konfidenzbereich der r-

Parameter bestimmt. Der Konfidenzbereich (auch Konfidenzintervall, Vertrauensbereich oder Erwartungsbereich genannt) liegt dabei elliptisch um den optimalen Wert der r-Parameter und gibt statistisch die Präzision der Lageschätzung dieses Wertes an. Der Bereich ist dabei streng genommen nur gültig, wenn die Fehler symmetrisch um den optimalen Wert verteilt sind.

## 1.8 Radionuklide und ihre Bedeutung für polymere Therapeutika

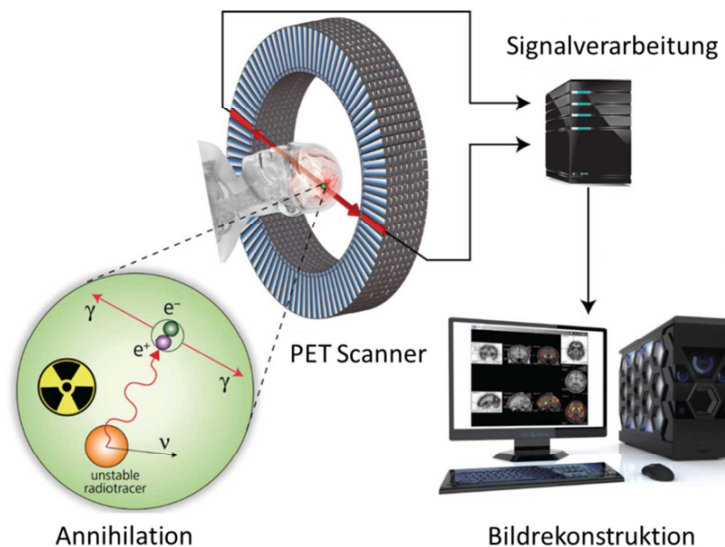
Die molekulare Bildgebung erlangt durch die damit einhergehende nicht-invasive Diagnostik verschiedener Krankheiten, eine immer größere Bedeutung im Bereich der Nuklearmedizin. So ist es möglich, durch die Funktionalisierung von polymeren Therapeutika mit Radionukliden, deren Zirkulationszeit im Blut, sowie die Biodistribution auf nicht-invasivem Wege zu bestimmen und somit die pharmakokinetischen Eigenschaften genauestens untersuchen zu können. Ein weiterer Vorteil gegenüber der Verwendung von Fluoreszenz- oder Infrarotfarbstoffen, liegt in der Durchführung von Längsschnittstudien in ein und demselben Versuchstier, in denen zunächst eine Echtzeitmessung durchgeführt wird und anschließend die Ergebnisse quantitativ ausgewertet werden können (z.B. ID/g Gewebe in %).<sup>[133]</sup> Damit prägten Lammers *et al.* das Konzept der bildgestützten Wirkstofffreisetzung. Dies ist eine Kombination aus Diagnostik und Therapie mit der es möglich ist, über die erhaltene Biodistribution eines chemisch angebondenen oder physikalisch eingeschlossenen therapeutischen Wirkstoffs, sowie dessen akkumulationsverhalten im Tumor, eine Aussage über die medizinische Wirksamkeit zu treffen.

Eines der modernsten und präzisesten bildgebenden Verfahren ist die sogenannte Positronenemissions-Tomographie (PET), die es ermöglicht, die Verteilung einer radioaktiven Substanz in einem Organismus sichtbar zu machen und biochemische Prozesse quantitativ zu erfassen.<sup>[134]</sup> Das Prinzip beruht dabei auf dem Einsatz von protonenreichen Radionukliden, die sich während der Verweildauer im Organismus unter Bildung eines Positrons ( $e^+$ ) in ein Neutron ( $n$ ) umwandeln:



Das zusätzlich entstehende Neutrino ( $\nu_e$ ) sorgt dabei für den Spinnerhalt. Abhängig von seiner Energie wandert das emittierte Positron eine bestimmte Strecke durch das

Gewebe, wobei es an kinetischer Energie verliert (Thermalisierung). Durch anschließende Wechselwirkung mit einem Elektron aus der Umgebung (Annihilation) entstehen hochenergetische Photonen ( $E = 511 \text{ keV}$ ), die sogenannten Gammastrahlen, die in einem  $180^\circ$  Winkel auseinander laufen und gleichzeitig von sich gegenüberliegenden Detektoren registriert werden. Aus den Detektorsignalen wird dann durch spezielle Computerprogramme ein Bild rekonstruiert.<sup>[134][135]</sup> Das allgemeine Prinzip ist in Abbildung 12 dargestellt.



**Abbildung 12:** Prinzip der Positron-Emissions-Tomographie (PET)

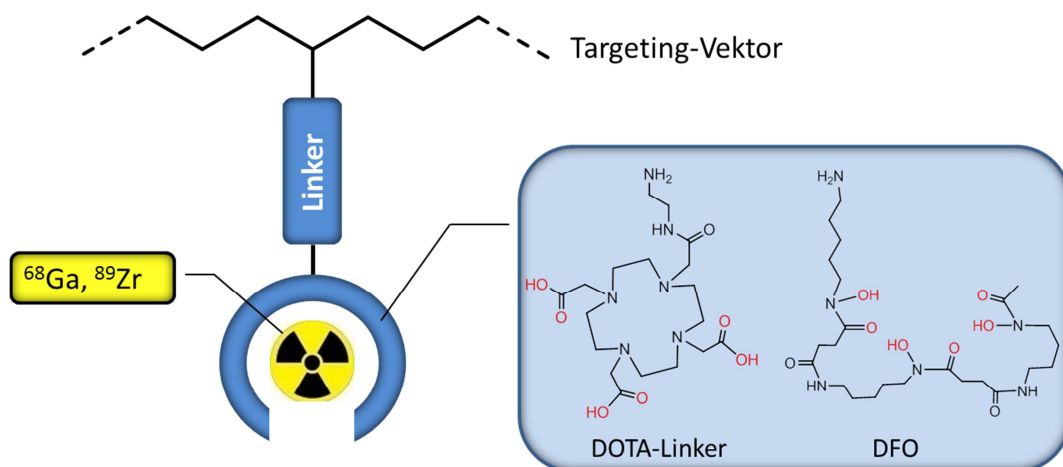
Da bei der PET-Messung der Ort der Annihilation detektiert wird, ist die Ortsauflösung nicht nur von der räumlichen Anordnung der Detektoren abhängig, sondern vor allem von der maximalen  $e^+$ -Energie des Radionukleotids. Somit sollte neben den Auswahlkriterien Halbwertszeit, Isotopenreinheit, eventuelle Zerfallscharakteristik des Tochternukleotids und schneller Verfügbarkeit, auch die maximale Positronenenergie berücksichtigt werden.

### 1.8.1 Markierungsstrategien für Glykopolymere

Die verwendeten Isotope für PET Messungen sind sehr vielfältig und müssen passend zu dem zu markierenden System, sowie des zu visualisierenden Prozesses und der Verfügbarkeit, ausgewählt werden. In der vorliegenden Arbeit werden die Radionuklide

$^{68}\text{Ga}$  und  $^{89}\text{Zr}$  verwendet.  $^{68}\text{Ga}$  konnte dabei jederzeit nach Bedarf kostengünstig am  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator durch den Zerfall des langlebigen Mutternuklids  $^{68}\text{Ge}$  produziert werden und zerfällt mit einer Halbwertszeit von 67,71 Minuten unter Aussendung eines Positrons (mittlere  $e^+$  Energie von 0,836 MeV) in das stabile  $^{68}\text{Zn}$ .<sup>[136]</sup>  $^{89}\text{Zr}$  zerfällt mit einer mittleren Energie von 0,389 MeV und wurde aufgrund seiner langen Halbwertszeit von 3,27 Tagen ausgewählt.<sup>[137]</sup> Dadurch ist es ein attraktives Radionuklid für die Detektion beispielsweise von durch den EPR-Effekt akkumulierenden Nanopartikeln im Tumorgewebe.

Um diese Radionuklide in ein Radiopharmakon fest einzubinden werden sie unter Verwendung geeigneter bifunktioneller Chelatoren komplexiert, die dann über einen Linker an den Targeting Vektor (z.B. Biomolekül, Peptid, Protein oder Polymere für Biomedizinische Anwendungen) gebunden werden (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Schematischer Aufbau eines Radiopharmakons: Das Radionuklid wird von einem bifunktionellen Chelator (DOTA-Linker für  $^{68}\text{Ga}$  und DFO für  $^{89}\text{Zr}$ ) komplexiert und ist über einen Linker an den Target Vektor gebunden. DOTA = 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-Tetraessigsäure; DFO = Deferoxamin B.

Durch die polymeranaloge Reaktion von Reaktivesterpolymeren (siehe auch Kapitel 1.6) können so beispielsweise aminfunktionalisierte Chelatliganden problemlos in ein polymeres System eingeführt werden. Dies zeigte bereits Fukukawa - allerdings unter Verwendung von NHS-Estern - an der Synthese von Sternpolymer-DOTA Konjugaten.<sup>[138]</sup> Die so mit Chelatoren ausgestatteten polymeren Trägersysteme können anschließend unter relativ milden Bedingungen das gewünschte Radionuklid komplexieren. Da Glykopolymere durch die Zuckerstrukturen gegenüber hohen Temperaturen und stark abweichenden pH-Werten sehr empfindlich sind, eignet sich

besonders  $^{89}\text{Zr}$  für die Markierung dieser Polymersysteme, da es bereits bei Raumtemperatur und pH-Werten von ungefähr 7 von DFO chelatisiert werden kann.<sup>[137]</sup> Durch die Möglichkeit aus den vielfältigen Markierungsstrategien und aus einer Fülle verschiedener radioaktiver Isotope die passende Variante für das jeweilige Trägersystem zu wählen, macht den Einsatz dieses bildgebenden Verfahrens mittlerweile nicht nur im Bereich der Forschung unentbehrlich, sondern ist auch in der Diagnostik, sowie bei der Therapiebehandlung und der Therapiekontrolle zu einem der wichtigsten Verfahren im Bereich der Nuklearmedizin geworden.

---

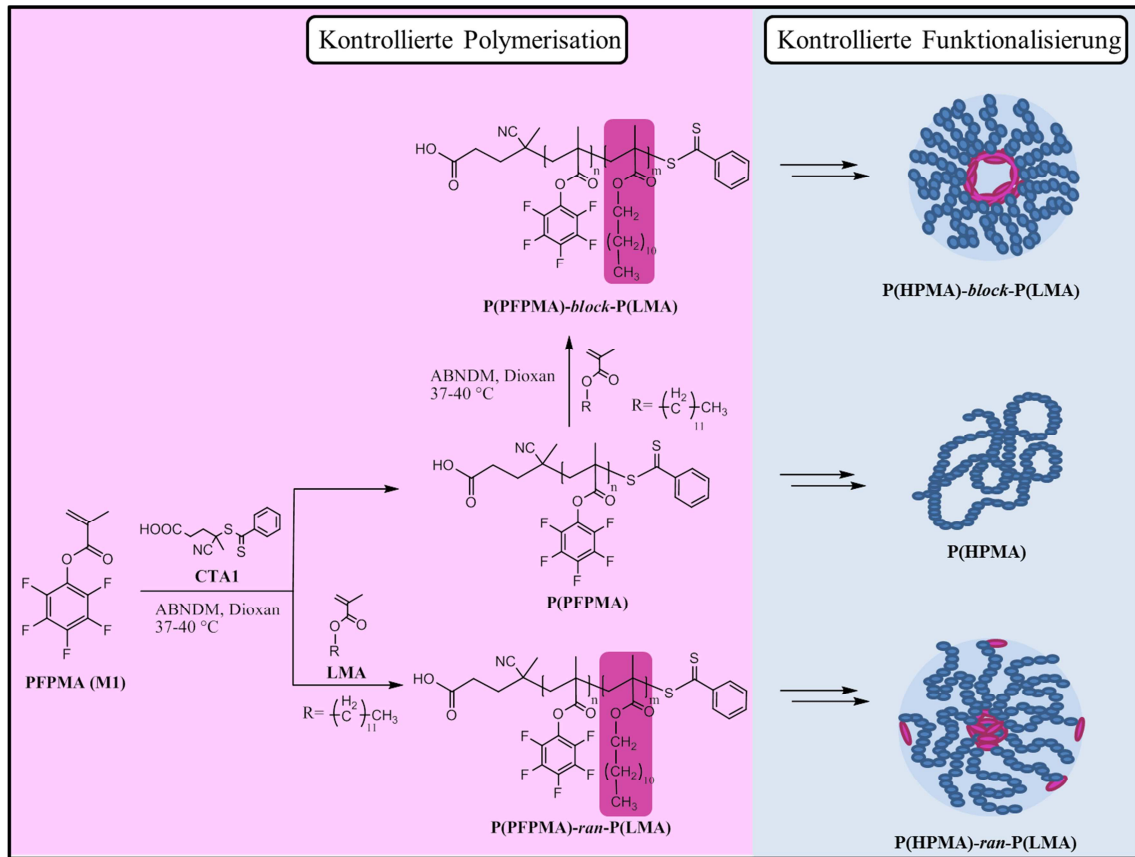
## 2. Zielsetzung

Die Applikation makromolekularer Wirkstofftransporter stellt, wie in der Einleitung ausführlich beschrieben wurde, einen erfolgversprechenden Ansatz zur Therapie inflammatorischer sowie metastasierender Prozesse im menschlichen Organismus dar. So können die Nebenwirkungen niedermolekularer Wirkstoffe durch die Verwendung polymerer Wirkstoffkonjugate verringert werden, da diese sich rein passiv durch den EPR-Effekt im nekrotischen Gewebe anreichern. Um die Selektivität zu erhöhen und somit eine effektivere Wirkstoffaufnahme zu erreichen, besteht die Möglichkeit, solche polymeren Trägermaterialien mit Liganden zu modifizieren. Das Ziel dieser Arbeit bestand dementsprechend darin, polymere Trägersysteme auf der Basis von 2-(N-Hydroxypropylmethacrylat) (HPMA) für den Wirkstofftransport zu entwickeln, um gezielt Zellen des Immunsystems zu adressieren.

Für die Synthese der Polymersysteme sollen zunächst Pentafluorphenylmethacrylat (PFPPMA) Polymere, statistische PFPPMA-LMA (Laurylmethacrylat) Copolymere und PFPPMA-LMA Blockcopolymere mittels RAFT Polymerisation synthetisiert und anschließend in einer polymeranalogen Umsetzung zu HPMA Polymeren bzw. stat. HPMA-LMA Copolymeren und HPMA-LMA Blockcopolymeren umgesetzt werden (siehe Abbildung 14). Obwohl dieser Syntheseweg über den Reaktivesteransatz prinzipiell keine Neuheit darstellt, ist der Aufbau der statistischen Copolymere bisher nicht genau bekannt. Deswegen soll zum einen in dieser Arbeit durch die „online“ Verfolgung der Copolymerisation von PFPPMA und LMA der Aufbau dieser statistischen Copolymers genauer untersucht und zum anderen die Frage nach möglichen Nebenreaktionen während der polymeranalogen Umsetzung zu den gewünschten HPMA Polymeren geklärt werden.

Für die Funktionalisierung der Polymere soll hauptsächlich Mannose als einfache Zuckerstruktur angebunden werden. Durch die Eigenschaft der Mannosezucker an bestimmte mannosebindende Rezeptoren der Immunzellen wie beispielsweise dendritische Zellen zu binden, können sie als Ligand makromolekulare Trägersysteme zellspezifisch adressieren und somit zu einer verstärkten Zellaufnahme führen. In dieser Arbeit wird dabei sowohl die Synthese verschiedener Mannoseliganden beschrieben, als auch unterschiedliche Anbindungsstrategien aufgezeigt. Anschließend soll in *in vitro*

Experimenten an dendritischen Zellen untersucht werden, ob die mannosylierten Systeme durch die Funktionalisierung stärker aufgenommen werden.



**Abbildung 14:** Überblick der Synthese von funktionalisierten HPMA basierten Polymeren über den Reaktivesteransatz.

In Hinblick auf spätere *in vivo* Studien mittels Positron Emissions Tomographie (PET) sollen außerdem die HPMA-Polymere mit bifunktionellen Chelatoren für eine radioaktive Markierung mit <sup>68</sup>Ga funktionalisiert werden, wobei vor allem die Stabilität des radioaktiven Komplexes der Polymer-<sup>68</sup>Ga-Konjugate untersucht werden soll.



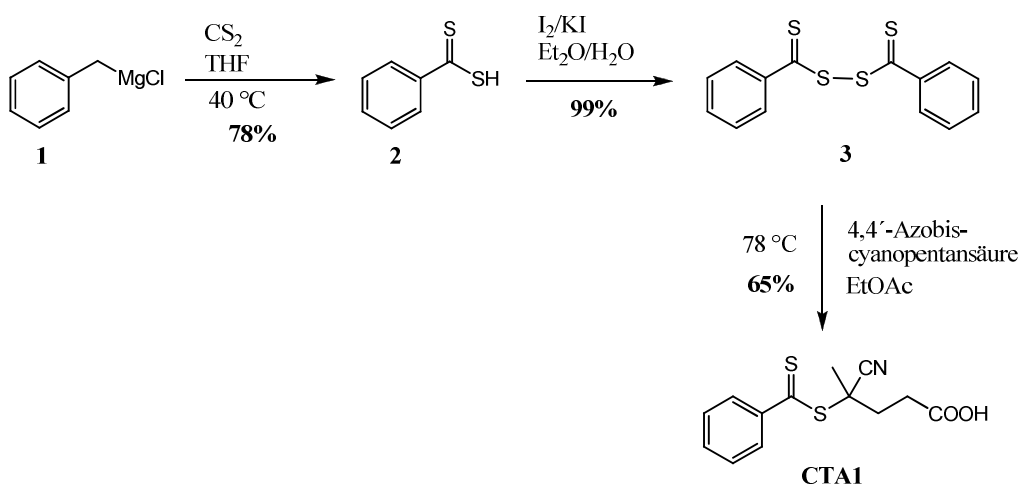
### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Die RAFT Polymerisation

Um engverteilte, monodisperse Polymersysteme, wie sie für die Anwendung als polymere Therapeutika nötig sind zu erhalten, kann als eine mögliche Methode die kontrollierte radikalische Polymerisation angewendet werden. In dieser Arbeit wird dabei das Reaktivstermonomer Pentafluorophenolmethacrylat mittels der RAFT (engl. *reversible addition-fragmentation chain transfer*)-Methode, die bereits in Kapitel 1.5 ausführlich beschrieben wurde, polymerisiert und anschließend zu den gewünschten HPMA-basierten Polymeren umgesetzt. Die Synthese der für die RAFT Polymerisation benötigten Reagenzien, wie des Kettentransferreagenzes (engl. *chain transfer agent*, CTA) und des Pentafluorophenylmethacrylats werden im folgenden Abschnitt beschrieben. Anschließend wird auf die Synthesen von PFPMA Homopolymeren, PFPMA-LMA Blockcopolymeren und statistischen PFPMA-LMA Copolymeren eingegangen.

##### Das Kettentransferreagenz

Für die Synthese von PFPMA-Reaktivesterpolymeren mittels der RAFT Polymerisation, hat sich 4-Cyano-4(thiobenzoyl)sulfanyl)pentansäure (**CTA1**) in unserer Arbeitsgruppe etabliert. Dieser wird in einer dreistufigen Synthese nach bekannter Literatur<sup>[139-141]</sup> aus Phenylmagnesiumchlorid (**1**) und Schwefelkohlenstoff synthetisiert (Schema 1).

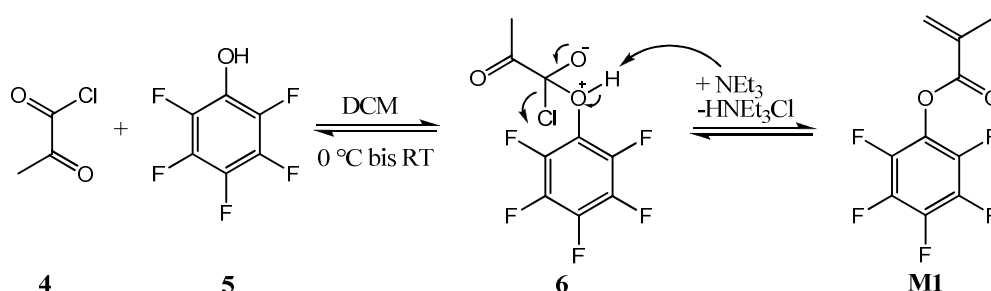


**Schema 1:** Synthese des Kettentransferreagenzes.

In der ersten Stufe wird Phenylmagnesiumchlorid (**1**) unter inerten Bedingungen langsam mit Schwefelkohlenstoff bei 40 °C versetzt. Nach einer Stunde wird die erhaltene dunkelrote Lösung auf kalte verdünnte Salzsäure gegossen und wässrig aufgearbeitet. Man erhält Dithiobenzoessäure (**2**) mit 78% Ausbeute als violettes, viskoses, luft- und lichtempfindliches Öl. Dieses wird direkt in der nächsten Reaktion eingesetzt, in dem die oxidierende Komponente zugetropft wird. Erneute wässrige Aufarbeitung liefert nahezu quantitativ Dithiobenzoyldisulfit (**3**) als violetten Feststoff. In einer nachfolgenden radikalischen Reaktion unter Verwendung von 4,4'-Azobiscyanopentansäure wird diese Verbindung bei 90 °C zum gewünschten Kettentranferreagenz (4-Cyano-4-(thiobenzoyl)sulfanyl)pentansäure, **CTA1**) umgesetzt. Die Aufreinigung erfolgt mittels mehrmaliger Säulenchromatographie und anschließender Gefriertrocknung mit Benzol. Der so erhaltene violett-rote amorphe Feststoff ist sehr empfindlich und vor allem gegenüber starken Säuren und Basen instabil. Deswegen wird der CTA unter Argonatmosphäre bei -20 °C lichtgeschützt aufbewahrt. Identifiziert wurde diese Verbindung mittels <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie.

### Das Monomer

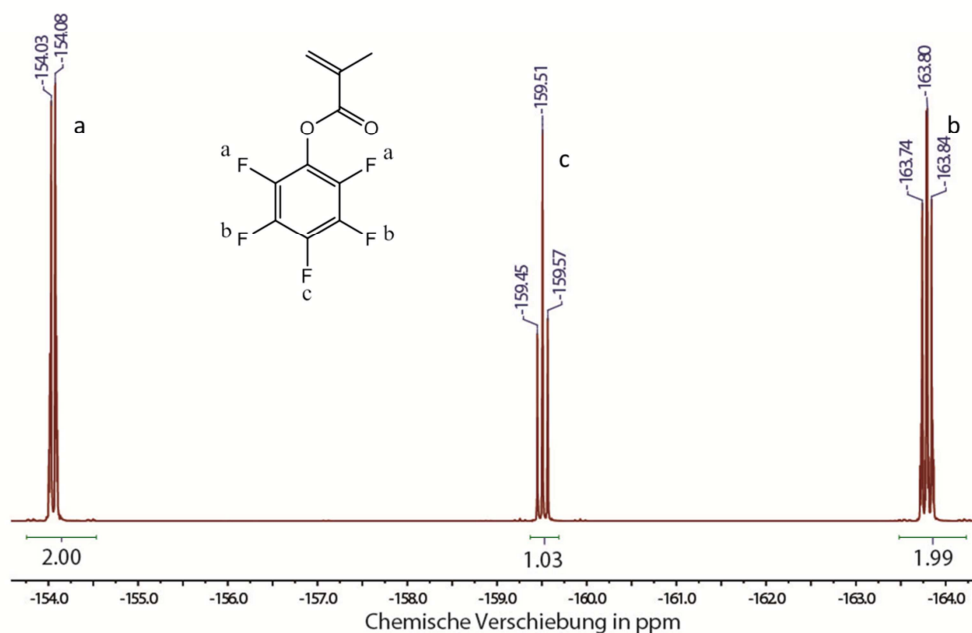
Zur Darstellung des für die späteren polymeranalogen Umsetzungen benötigten Reaktivstermonomers wird Methacrylsäurechlorid (**4**) in einer Veresterung nach der Schotten-Baumann Variante<sup>[142]</sup> mit Pentafluorphenol (**5**) unter Anwesenheit von Triethylamin zu Pentafluorphenylmethacrylat (**M1**) umgesetzt (Schema 2).<sup>[119][143][144]</sup>



**Schema 2:** Synthese von Pentafluorphenylmethacrylat (**M1**) nach der Schotten-Baumann Variante.

Dazu wird Pentafluorphenol (**5**) mit Triethylamin in wasserfreiem Dichlormethan gelöst und bei 0 °C langsam mit Methacrylsäurechlorid (**4**) versetzt. Triethylamin dient hierbei als Säurefänger, in dem es freiwerdende Salzsäure neutralisiert und somit das Gleichgewicht auf die Seite des Produkts (**M1**) verschiebt. Nach Abfiltrieren des

entstandenen Triethylaminsalzes und wässriger Aufarbeitung, wird das Monomer (**M1**) zunächst säulenchromatographisch aufgereinigt und anschließend im Hochvakuum bei 70 °C destilliert. Das so aufgereinigte Pentafluorophenylmethacrylat (**M1**) wird unter Argonatmosphäre bei -20 °C lichtgeschützt gelagert, um eine spontane Selbstpolymerisation zu vermeiden. Analysiert wurde das Monomer unter Verwendung der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie. Als Besonderheit wurde zusätzlich ein  $^{19}\text{F}$ -NMR gemessen (Abbildung 15), mit welcher die aromatischen Fluoratome zugeordnet werden können.



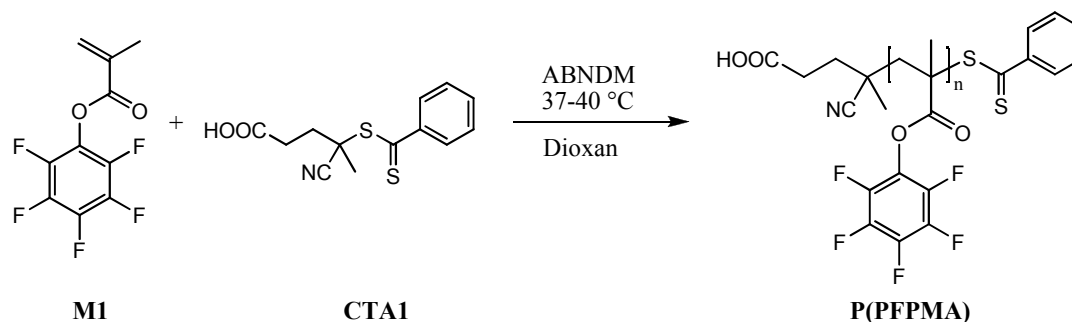
**Abbildung 15:**  $^{19}\text{F}$ -NMR Spektrum von Pentafluorophenylmethacrylat (**M1**) in  $\text{CDCl}_3$ .

Die *ortho*-ständigen Fluoratome (a) spalten zu einem Dublett bei -154,05 ppm auf, da sie zu einem einzelnen Fluoratom in direkter Nachbarschaft stehen. Das *para*-ständige Fluoratom spaltet bei -159,51 ppm aufgrund der Kopplung zu den beiden benachbarten chemisch äquivalenten Fluoratomen zu einem Triplett auf (c). Die beiden *meta*-ständigen Fluoratome spalten unter Vernachlässigung von Fernkopplungen bei -163,80 ppm zu einem Dublett vom Dublett auf, da sie von zwei nicht äquivalenten Fluoratomen umgeben sind (b). Das Integrationsverhältnis liegt bei ungefähr 2:1:2.

### PFPMA Homopolymere

Mit Hilfe des so synthetisierten PFPMA Monomers (**M1**), sowie unter Verwendung des Kettentransferreagenzes (**CTA1**), können mittels der RAFT Polymerisation PFPMA-

Reaktivesterpolymere (**P(PFPMA)**) mit einer engen Molekulargewichtsverteilung und unterschiedlichen Kettenlängen synthetisiert werden (Schema 1).<sup>[119]</sup>



**Schema 3:** Synthese des Reaktivesterpolymers P(PFPMA) mittels RAFT Polymerisation von PFPMA (**M1**) unter Verwendung von Kettentransferreagenz CTA1 und ABNDM als Initiator.

Das gewünschte Molekulargewicht lässt sich durch die eingesetzte Menge an CTA einstellen und kann mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$m(\text{CTA}) = \frac{m(\text{Monomer}) \cdot \text{Umsatz} \cdot M(\text{Monomer})}{M(\text{Zielmolekulargewicht Polymer})}$$

Allerdings liefert diese Formel nur einen ungefähren Richtwert, da sich zum einen der Umsatz von Polymerisation zu Polymerisation leicht unterscheidet und zum anderen der CTA durch seine Empfindlichkeit gegenüber Licht, Wärme und Feuchtigkeit nicht mit 100%iger Reinheit eingesetzt werden kann. Als Initiator wurde 2,2'-Azobis-(4-methoxy-2,4-dimethylvalronitril) (ABNDM) verwendet, der bereits bei einer Temperatur von 37 °C mit einer Halbwertszeit von 6,1 Stunden zerfällt. Dieser wird mit 1/5 Moläquivalenten im Verhältnis zum Kettentransferreagenz eingesetzt, um eine freie radikalische Polymerisation so weit wie möglich zurück zu drängen.

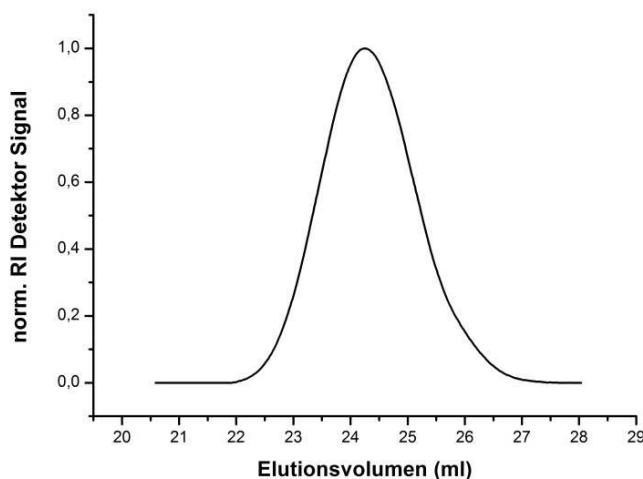
Für die RAFT Polymerisation werden PFPMA (**M1**) mit dem Kettentransferreagenz (**CTA1**) und ABNDM als Initiator in Dioxan gelöst und drei „Freeze-Pump“ Zyklen, zur Entfernung von gelöstem Sauerstoff, unterzogen. Dazu wird der Reaktionsansatz im Schlenkrohr durch flüssigen Stickstoff eingefroren und im Hochvakuum evakuiert. Anschließend wird unter geschlossenem Hahn des Schlenkrohrs das Polymerisat aufgetaut und erneut eingefroren. Dieser Zyklus wird dreimal wiederholt, um sicher zu gehen, dass kein Restsauerstoff in der Reaktion vorhanden ist. Die Polymerisation wird dann unter Vakuum bei 37-40 °C unter kräftigem Rühren durchgeführt und nach 12-16 h durch Luftzufuhr und schnelles Abkühlen in flüssigem Stickstoff beendet. Das Polymer wird zur Aufreinigung dreimal in Hexan gefällt und im Hochvakuum

getrocknet. Das so erhaltene PFPMA Polymer (**P(PFPMA)**) erscheint durch die Dithioesterendgruppen rosa und kann als sogenannter Makro(PFPMA)-CTA für die Synthese von Blockcopolymeren weiter verwendet werden. Die so synthetisierten PFPMA-Polymere sind in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1:** Ansätze und Ergebnisse für P(PFPMA)1-10. <sup>a</sup>mittels THF GPC gemessen.

Polymer	PFPMA	Säure-CTA	Ausbeute	$M_n$ in g/mol <sup>a</sup>	$\bar{D}$ <sup>a</sup>
<b>(PFPMA)1</b>	4 g	47 mg	1,9 g	23.300	1,3
<b>P(PFPMA)2</b>	4 g	40 mg	1,7 g	22.000	1,3
<b>P(PFPMA)3</b>	4 g	40.3 mg	1,5 g	21.700	1,3
<b>P(PFPMA)4</b>	4 g	60 mg	2,4 g	16.500	1,4
<b>P(PFPMA)5</b>	3 g	7 mg	1,0 g	44.000	1,4
<b>P(PFPMA)6</b>	4 g	50 mg	2,5 g	21.300	1,2

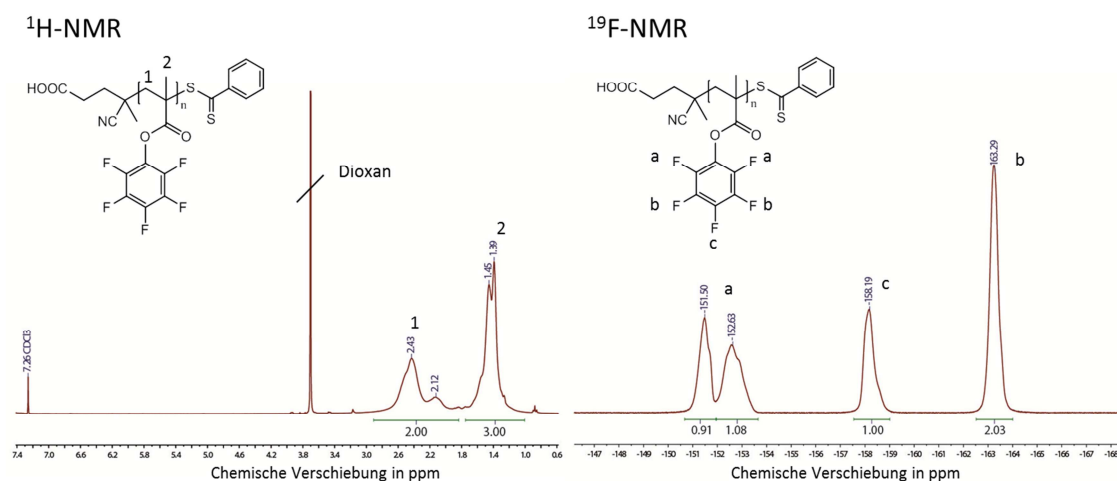
Die anschließenden analytischen GPC (*engl. gel permeation chromatographie*) Messungen in Tetrahydrofuran (THF) mit Polystyrol als Standard, zeigen für alle Polymere eine enge Molekulargewichtsverteilung ( $\bar{D} = 1,2 - 1,4$ ) und deutet somit auf sehr gut definierte Polymere hin. Exemplarisch ist eine GPC-Kurve in Abbildung 16 von **P(PFPMA)1** gezeigt.



**Abbildung 16:** GPC-Elugramm von P(PFPMA)1 in THF

Neben der Messung von Molekulargewichtsverteilungen mittels THF-GPC wurden alle hergestellten P(PFPMA) Polymere mit Hilfe der <sup>1</sup>H- und <sup>19</sup>F-Spektroskopie

charakterisiert. Auch in Abbildung 17 ist wieder das  $^1\text{H}$ - und  $^{19}\text{F}$ -NMR Spektrum exemplarisch von P(PFPMA)1 gezeigt.



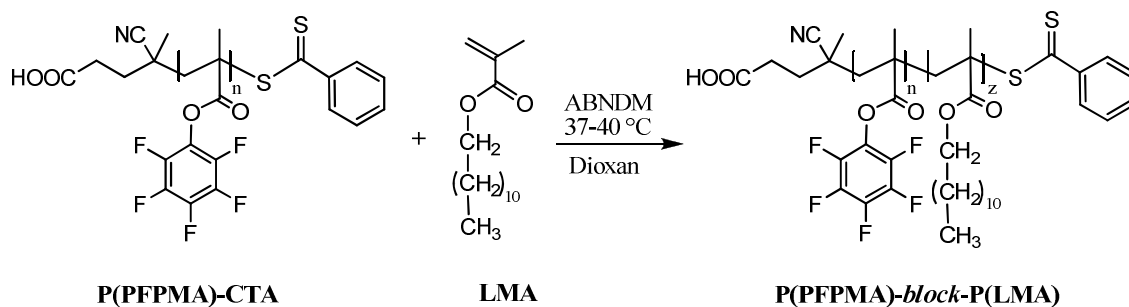
**Abbildung 17:**  $^1\text{H}$ -NMR (links) und  $^{19}\text{F}$ -NMR (rechts) von P(PFPMA)1 in  $\text{CDCl}_3$ .

Im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum (Abbildung 17 links) sind neben den Lösungsmittelsignalen von deuteriertem Chloroform bei 7,26 ppm, in dem gemessen wurde und 1,4-Dioxan bei 3,71 ppm, in dem die Reaktion durchgeführt wurde, im Bereich von 2,85 – 1,00 ppm die Signale des Polymerrückgrats zu erkennen. Das weiter tieffeld-verschobene Signal im Bereich von 2,85 – 1,84 ppm ist der Methylengruppe und das weiter hochfeld-verschobene Signal im Bereich von 1 – 1,5 ppm der Methylgruppe zu zuordnen. Das Integrationsverhältnis von 2:3 entspricht in diesem Fall der genauen Anzahl der Protonen des Polymerrückgrates, welches aufgrund seiner der Starrheit auch davon abweichen kann. Aufgrund der Größe des Polymeren ist es nicht mehr möglich, Protonensignale der Endgruppe zuzuordnen, da die Intensitäten im Vergleich zum Polymerrückgrat zu gering ausfallen.

Abbildung 17 rechts zeigt das  $^{19}\text{F}$ -NMR Spektrum von P(PFPMA)1. Die Peakzuordnung ist analog zum  $^{19}\text{F}$ -NMR Spektrum vom PFPMA Monomer (**M1**) in Abbildung 15, wobei die typische Peakverbreiterung vom Polymer zu sehen ist.

### PFPMA-LMA Blockcopolymere

Die PFPMA-Makro CTAs können nun in einer weiteren RAFT Polymerisation als Kettentransferreagenz eingesetzt werden, um ein anderes Monomer, in diesem Fall Laurylmethacrylat (LMA), an zu polymerisieren. Es entsteht ein P(PFPMA)-*block*-P(LMA) Copolymer (Schema 7).



**Schema 4:** Synthese des P(PFPMA)-*block*-P(LMA) Copolymers mittels RAFT Polymerisation von LMA unter Verwendung von P(PFPMA)-CTA als Kettentransferreagenz und ABNDM als Initiator.

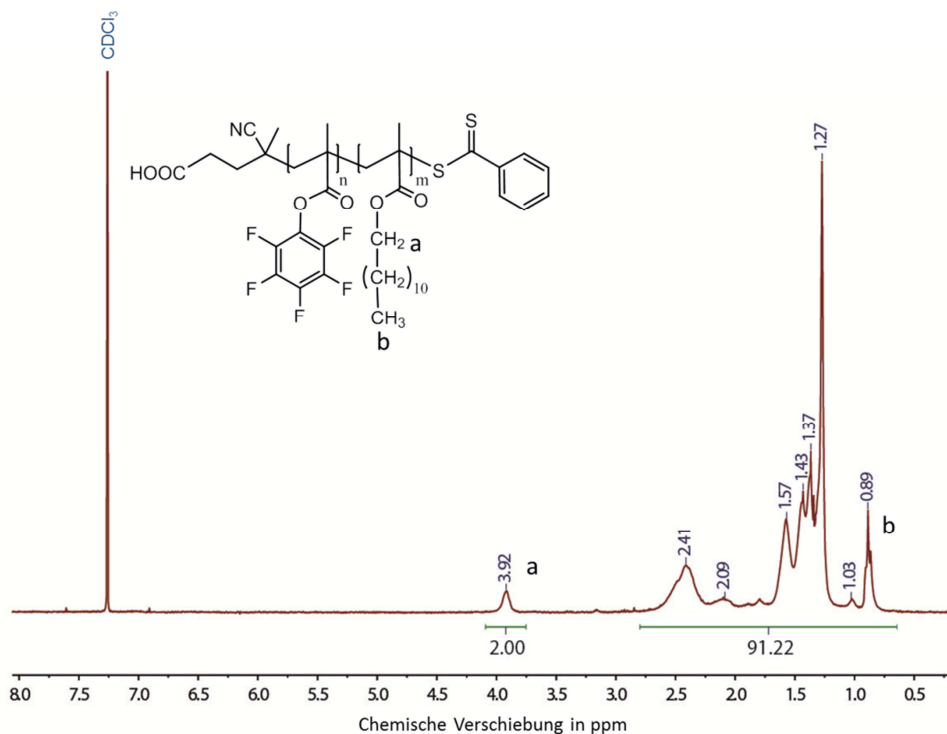
Die RAFT Polymerisation zum PFPMA-LMA Blockcopolymer erfolgt analog zu der PFPMA Homopolymerisation. Die so hergestellten P(PFPMA)-*block*-P(LMA) Copolymere sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2:** Ansätze und Ergebnisse für P(PFPMA)-*block*-P(LMA)1-3 Copolymere. <sup>a</sup> mittels THF GPC gemessen. <sup>b</sup> mittels <sup>1</sup>H-NMR berechnet.

Polymer	P(PFPMA)-CTA	LMA	Ausbeute	M <sub>n</sub> in g/mol <sup>a</sup>	Đ <sup>a</sup>	Anteil LMA <sup>b</sup>
P(PFPMA)- <i>block</i> -P(LMA)1	500 mg (P(PFPMA) <sub>2</sub> ) 1,98 mmol 0,023 mmol <sup>a</sup>	336 mg 1,32 mmol	348 mg	26.800	1,3	7,4%
P(PFPMA)- <i>block</i> -P(LMA)2	500 mg (P(PFPMA) <sub>3</sub> ) 1,98 mmol 0,023 mmol <sup>a</sup>	336 mg 1,32 mmol	460,7 mg	26.740	1,3	23%
P(PFPMA)- <i>block</i> -P(LMA)3	500 mg (P(PFPMA) <sub>4</sub> ) 1,98 mmol 0,023 mmol <sup>a</sup>	337 mg 1,32 mmol	500 mg	21.000	1,2	18%

Auch hier zeigt die THF GPC bei allen Polymeren eine monomodale Kurve und enge Dispersitäten ( $\text{Đ} = 1,2 - 1,3$ ). Außerdem erkennt man durch die Zunahme des Molekulargewichtes die erfolgreiche Anbindung des LMA Blocks. Auf diesem Wege sind also sehr gut definierte PFPMA-LMA Blockcopolymere über die RAFT Polymerisation zugänglich. Da mit der GPC Methode jedoch nur die hydrodynamischen Radien eines Polymers gemessen werden können, ist eine genaue Angabe des LMA Anteils so nicht möglich.

Der Anteil des LMA Block kann nun mit Hilfe der  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie ermittelt werden. Exemplarisch soll dies am **P(PFPMA)-*block*-P(LMA)1** Polymer erläutert werden.



**Abbildung 18:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von P(PFPMA)-*block*-P(LMA)1 in  $\text{CDCl}_3$

Die Methylengruppe in der LMA Einheit ist dabei aufgrund der elektronenziehenden Eigenschaften des benachbarten Sauerstoff-Atoms mit einem Signal bei 3,92 ppm im Vergleich zu den restlichen Protonen des Polymerrückgrats deutlich tieffeldverschoben ist und tritt somit diskret auf. Dieses Signal wird entsprechend der Anzahl an Protonen in der LMA-Einheit auf 2 normiert. Die restlichen Protonen im Bereich von ungefähr 2,75 – 0,6 ppm bestehen somit aus den 28 verbleibenden LMA-Protonen und den Protonen der PFPMA-Einheiten. Nun ist es möglich, das Verhältnis der beiden Blöcke zu bestimmen. So werden zunächst die verbleibenden 28 LMA-Protonen von der Gesamtintensität subtrahiert, um den Anteil zu erhalten, der ausschließlich den Protonen des PFPMA-Blocks zugesprochen werden kann:

$$91 - 28 = 63$$

Da eine PFPMA Einheit 5 Protonen besitzt, wird anschließend durch diese Zahl dividiert:

$$63 : 5 = 12,6$$



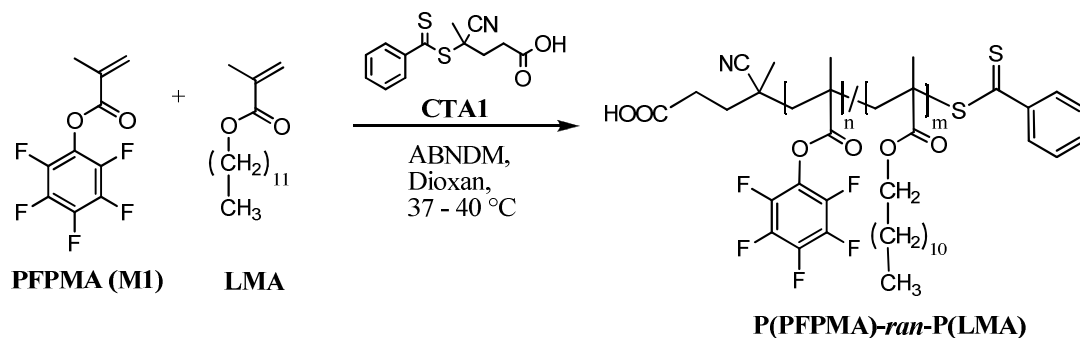
So ergibt sich für den Anteil des PFPMA-Blocks

$$\text{Anteil(PFPMA)} = \frac{12,6}{(12,6 + 1)} = 92,6\%$$

Das bedeutet, es liegen in dem Blockcopolymer P(PFPMA)-*block*-P(LMA)1 LMA:PFPMA im Verhältnis 7,4:92,6 vor. Dieses Verhältnis ist im Rahmen der Messgenauigkeit der <sup>1</sup>H-NMR Messmethode von 3-5%, sowie der Starrheit des Polymerrückgrats, als relativ genau anzunehmen, da sowohl der PFPMA Block als auch der LMA Block gut in Chloroform löslich ist.

### Statistische PFPMA-LMA Copolymere

Die statistischen PFPMA-LMA Copolymer werden, wie in Schema 5 gezeigt, aus der gleichzeitigen Polymerisation von PFPMA (**M1**) und **LMA** erhalten. Die Synthese erfolgt dabei wieder unter Verwendung von ABNDM als Initiator und **CTA1** als Kettentransferreagenz analog zu der bereits beschriebenen PFPMA Homopolymerisation.



**Schema 5:** Synthese des P(PFPMA)-*ran*-P(LMA) Copolymers mittels RAFT Polymerisation von PFPMA (M1) und LMA unter Verwendung von CTA1 als Kettentransferreagenz und ABNDM als Initiator.

Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse der hergestellten statistischen PFPMA-LMA Copolymere.

**Tabelle 3:** Ansätze und Ergebnisse für statistische P(PFPMA)-*ran*-P(LMA)1-2 Copolymere. <sup>a</sup> mittels THF GPC gemessen. <sup>b</sup> mittels <sup>1</sup>H-NMR berechnet.

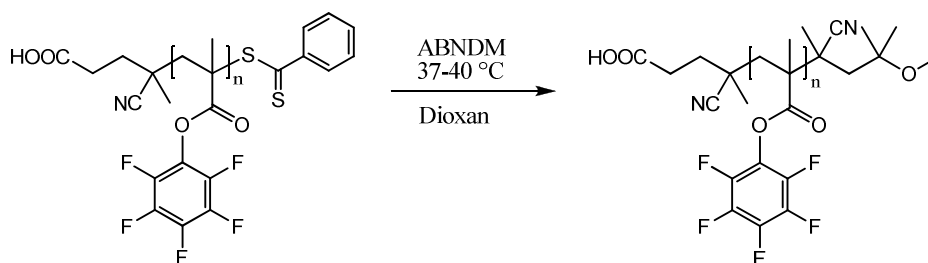
Polymer	PFPMA	LMA	Säure-CTA	Ausbeute	M <sub>n</sub> in g/mol <sup>a</sup>	Đ <sup>a</sup>	Anteil LMA <sup>b</sup>
P(PFPMA)- <i>ran</i> -P(LMA)1	4 g	0,4 g	8,5 mg	820 mg	47.000	1,3	7,6%
P(PFPMA)- <i>ran</i> -P(LMA)2	4 g	1,2 g	8,5 mg	1,2 g	68.400	1,2	20%

Auch diese wurden mittels THF GPC analysiert und der LMA-Anteil analog zu dem Verfahren der Blockcopolymeren mit Hilfe der  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie berechnet. Dabei kann man so nur auf den Gesamtanteil von LMA im Polymer schließen, nicht jedoch auf die genaue Sequenz der Polymerkette. Dieses Problem wird in Kapitel 3.2 näher behandelt.

### Abkochen der Schwefelendgruppe

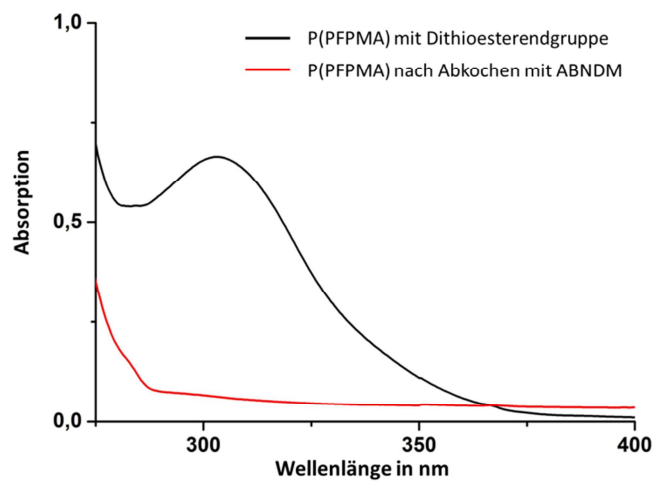
Die so synthetisierten Polymere sind jedoch noch nicht vollständig optimiert. So tragen sie alle durch das verwendete Kettentransferreagenz eine Schwefelendgruppe. Diese könnte in biologischen Systemen aufgrund der Geruchs- und toxischen Effekte eine Rolle spielen. Durch Entfernen dieser Endgruppe mit einem Überschuss an ABNDM können diese Nachteile jedoch leicht behoben werden.

Dazu wird das reaktivere Polymer in Dioxan gelöst und mit 40 Moläquivalenten ABNDM versetzt und bis zur vollständigen Entfärbung auf  $40\text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt. In Schema 6 ist die Reaktion exemplarisch an **P(PFPMA)1** gezeigt. Um die schwefelhaltigen Rückstände, sowie restlichen Initiator zu entfernen, wird das farblose Polymer dreimal in Hexan gefällt und im Hochvakuum getrocknet.<sup>[145]</sup>



**Schema 6:** Abkochen der Endgruppe von P(PFPMA) mit ABNDM in Dioxan bei 37-40 °C.

Die vollständige Umsetzung der Dithioesterendgruppe konnte mittels UV/Vis Spektroskopie, durch die Abwesenheit der charakteristischen Bande bei einer Wellenlänge von 302 nm, nachgewiesen werden (Abbildung 19).



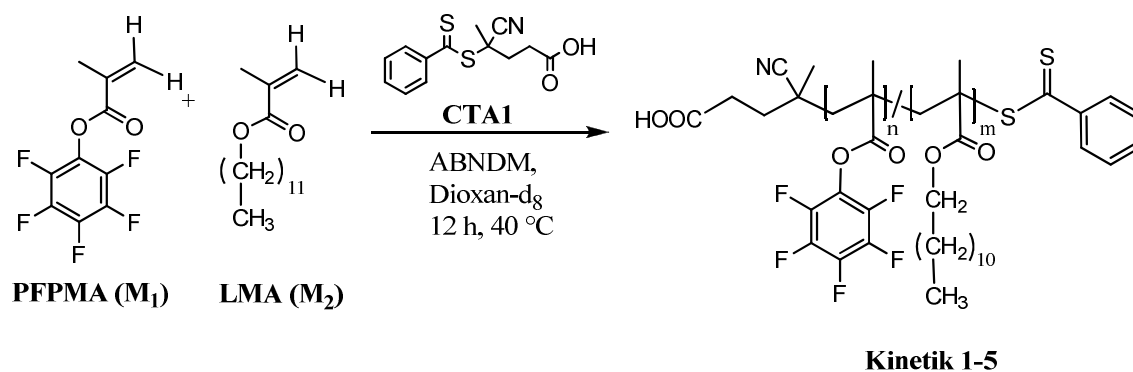
**Abbildung 19:** UV/Vis Spektrum von P(PFPMA) (schwarz) und nach Entfernung der Dithioestergruppe (rot).

Die auf diese Weise synthetisierten PFPMA Reaktivester Polymere können nun mit einer Vielzahl von verschiedenen primären Aminen mittels der Polymeranalogen Reaktion umgesetzt werden.



### 3.2 Untersuchung der Copolymerisation von PFPMA und LMA mittels Echtzeit <sup>1</sup>H-NMR

Im vorangegangenen Kapitel 3.1 wurde bereits ausführlich auf die Synthese von verschiedenen Reaktivesterpolymeren unter Verwendung der RAFT Polymerisation eingegangen. So können PFPMA Homopolymere, PFPMA-LMA Blockcopolymer sowie statistische PFPMA-LMA Copolymer mit enger Molekulargewichtsverteilung und unterschiedlichen Anteilen an LMA synthetisiert werden. Der Aufbau eines Blockcopolymer ist demnach sehr gut nachvollziehbar. Dieses Kapitel beschäftigt sich nun mit der genaueren Untersuchung der statistischen Copolymerisation von LMA und PFPMA, um so eine Aussage über den Aufbau eines solchen Copolymer treffen zu können (Schema 7).



**Schema 7:** Copolymerisation von Pentafluorophenylmethacrylat (PFPMA, M1) und Laurylmethacrylat (LMA) mit 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)sulfanyl)pentansäure (CTA1) und 2,2-Azobis(2,4-dimethyl)valeronitril (ABNDM) in Dioxan-d<sub>8</sub> bei 40 °C für 12 h.

Dabei gibt es verschiedene Methoden, wie beispielsweise Elementaranalyse oder die Spektroskopie, um die Copolymer zu analysieren. Von diesen Verfahren ist die <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie durch ihre hohe Messgenauigkeit eine der sinnvollsten und präzisen Methoden, um die Restmonomer-Zusammensetzung während einer Copolymerisation bestimmen und somit auf die Copolymerzusammensetzung zu schließen.<sup>[126][146]</sup>

Da die Bestimmung der Copolymerisationsparameter in den meisten Fällen nur bei geringen Umsätzen möglich ist, wurde die Polymerisation mittels Echtzeit <sup>1</sup>H-NMR Kinetikmessungen untersucht. Dies ermöglicht es, den gesamten Verlauf der Copolymerisation auch bei geringen Umsätzen zu Beginn einer Polymerisation über

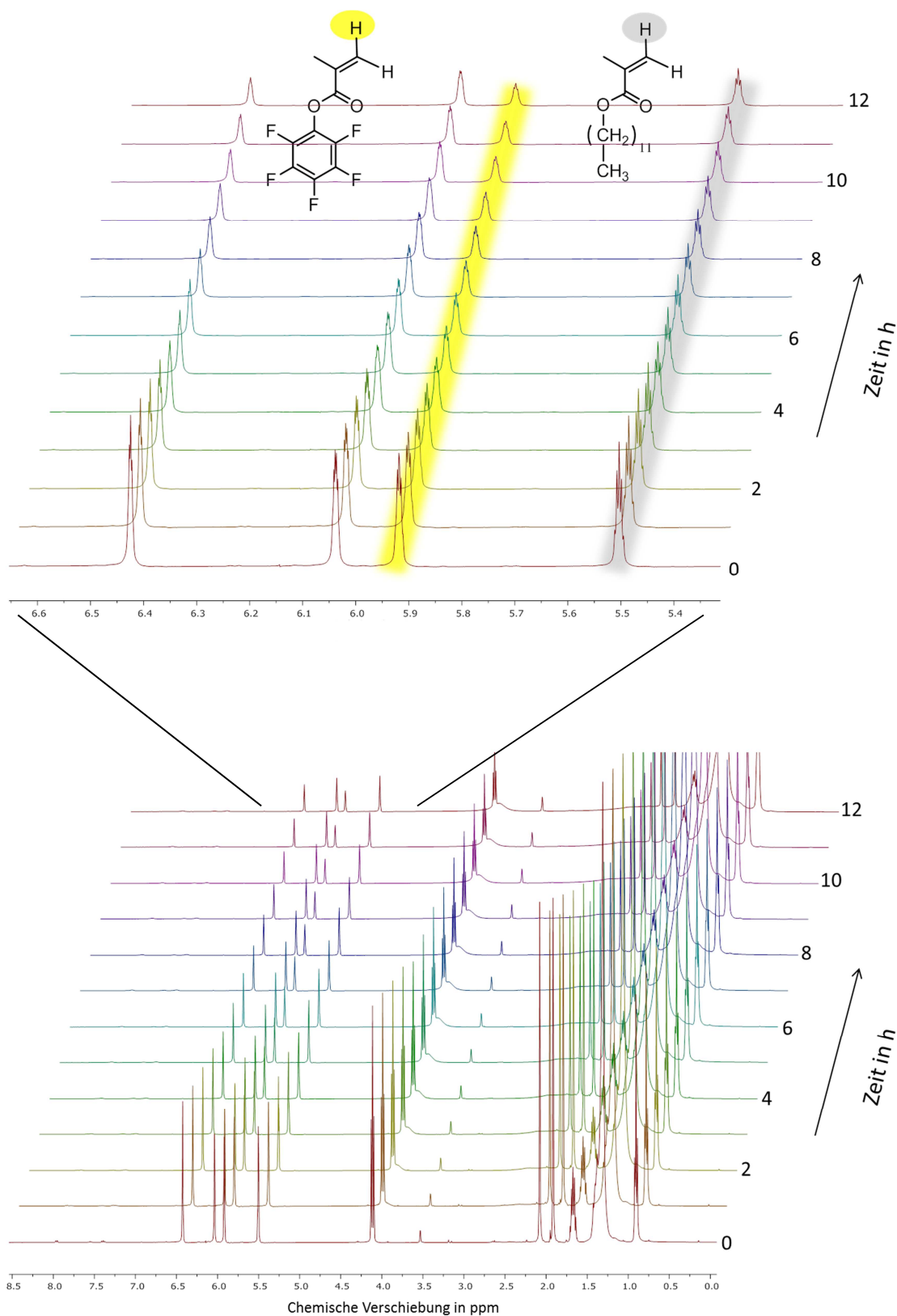
12 h genauestens zu verfolgen.<sup>[147]</sup> Die Copolymerisation für ein definiertes Monomerverhältnis wurde also in einem kleinen Maßstab im NMR-Röhrchen bei 40 °C durchgeführt und in einem Abstand von 5 min <sup>1</sup>H-Spektren aufgenommen.

In Tabelle 4 sind die verschiedenen Ansätze, die daraus resultierenden Monomerverhältnisse, sowie das spektroskopisch ermittelte Ausgangsverhältnis angegeben.

**Tabelle 4:** Ansätze der Copolymerisationen von PFPMA und LMA für Echtzeit <sup>1</sup>H-Kinetik Messung

	<b>PFPMA</b>	<b>LMA</b>	<b>Molare Zusammensetzung in %</b>	<b>Molare Zusammensetzung in % über <sup>1</sup>H-NMR</b>
<b>Kinetik1</b>	512,7 mg 2,034 mmol	50,03 mg 0,197 mmol	0,912 : 0,088	0,908 : 0,092
<b>Kinetik2</b>	386,52 mg 1,533 mmol	165,93 mg 0,652 mmol	0,702 : 0,298	0,702 : 0,298
<b>Kinetik3</b>	277,71 mg 1,099 mmol	279,44 mg 1,098 mmol	0,500: 0,500	0,498 : 0,502
<b>Kinetik4</b>	176,25 mg 0,699 mmol	391,90 mg 1,540 mmol	0,299: 0,701	0,307 : 0,693
<b>Kinetik5</b>	57,2 mg 0,227 mmol	504,7 mg 1,984 mmol	0,103 : 0,897	0,092 : 0,908

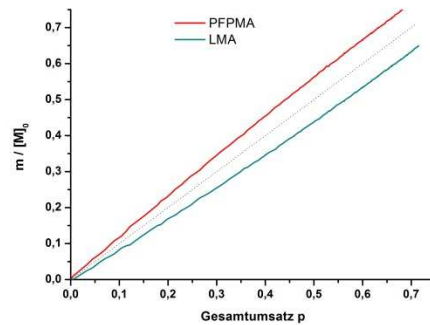
Es wurden also fünf verschiedene Ansätze gewählt, in denen die Verhältnisse von PFPMA zu LMA variiert wurden. Die Menge des eingesetzten Kettentransferreagenz (CTA1), des Initiators (ABNDM) und des Lösemittels (Dioxan-d<sub>8</sub>) blieben dabei immer konstant. In Abbildung 20 ist exemplarisch eine Echtzeit <sup>1</sup>H-NMR-Kinetik Messung (Kinetik3) dargestellt. Der Übersicht halber sind nur 12 der insgesamt 144 Einzelspektren im 1h Takt in einem sogenannten Pseudo-2D-Spektrum gezeigt. Der Verlauf der Copolymerisation ist ersichtlich durch den Abbau der olefinischen Signale der Monomere im Bereich von 5,5 – 6,5 ppm, sowie durch den gleichzeitigen Aufbau der Signale des Polymerrückgrats im Bereich von 1 - 2 ppm.



**Abbildung 20:** Echtzeit- $^1\text{H-NMR}$  Spektrum (Pseudo-2D-Spektrum) in Dioxan- $d_8$  der Copolymerisation Kinetik3.

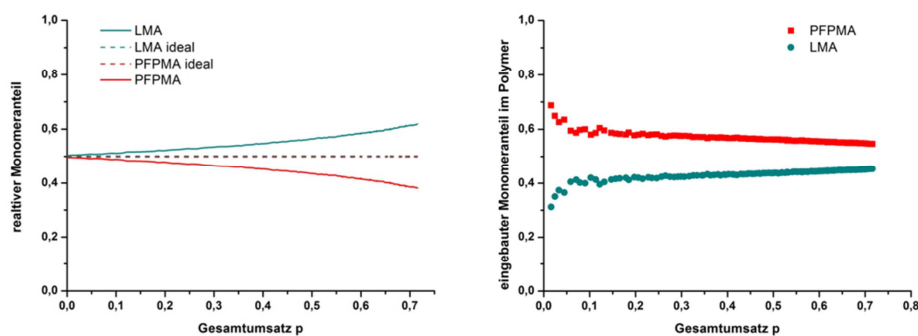
Damit die Fehlerbelastung in der Auswertung möglichst gering bleibt und nur der Fehler der quantitativen NMR Spektroskopie von 3-5% anzunehmen ist, wurden die

absoluten Integrale der olefinischen Protonen bei 5,93 ppm (PFPMA) und bei 5,51 ppm (LMA) verwendet. Abbildung 21 zeigt die mit dem Umsatz ansteigende Konzentration beider Monomere im Polymer von der Copolymerisation von PFPMA und LMA mit gleichem Anteil (**Kinetik3**).



**Abbildung 21:** Verhältnis der eingebauten Monomerkonzentration ( $m$ ) zur Monomerausgangskonzentration  $[M_0]$  in Lösung gegen den Gesamtumsatz  $p$ .

In Abbildung 21 erkennt man den Einbau der beiden Monomere in die Polymerkette. Zusätzlich zeigt die gestrichelte Linie in Abbildung 21 rechts den idealen Einbau der Monomere. Man kann deutlich erkennen, dass über den gesamten Verlauf der Polymerisation PFPMA stärker in die Polymerkette eingebaut wird. So ist der Anteil von PFPMA nach 10% Umsatz bereits auf 11,8% gestiegen und der von LMA nur auf 8,6%. Generell wird im Laufe der Reaktion PFPMA leicht bevorzugt eingebaut (rote Kurve in Abbildung 21). Dies wird auch deutlich, trägt man die relativen Monomeranteile in Lösung (Abbildung 22 links) und die relativen Monomeranteile im Polymer (Abbildung 22 rechts) gegen den Gesamtumsatz  $p$  auf. Die gestrichelten Linien in Abbildung 22 links zeigen darin wieder den idealen Verlauf der Copolymerisation von PFPMA und LMA an.

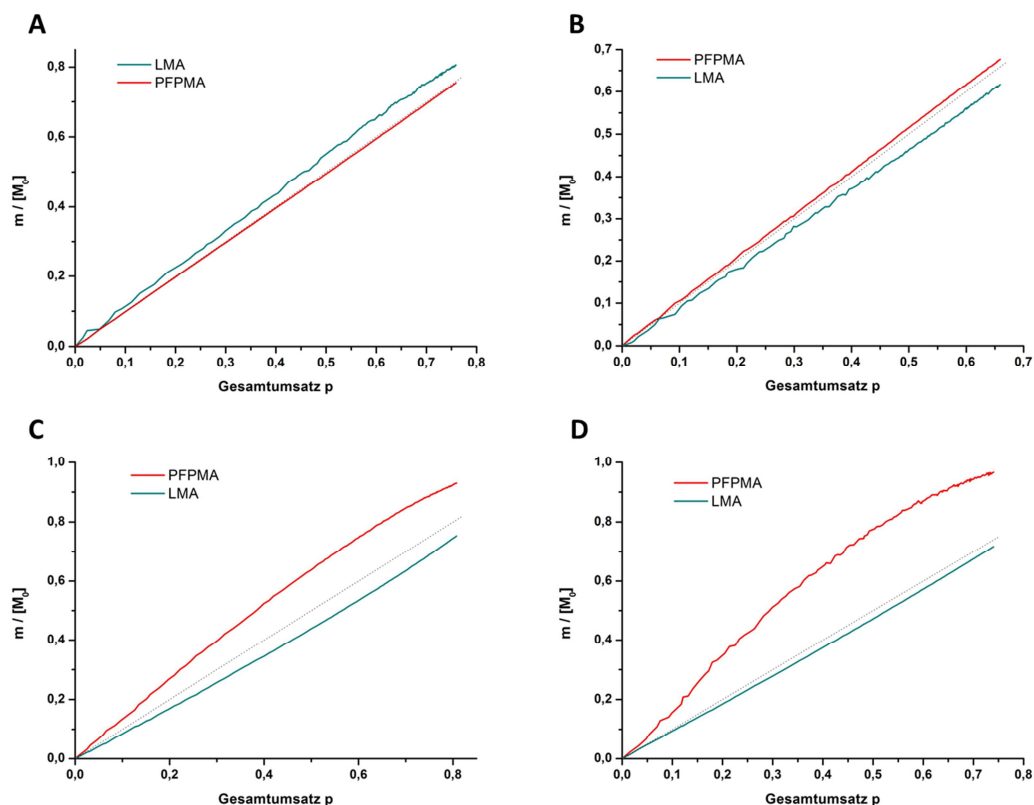


**Abbildung 22:** Links: relativer Monomeranteil in Lösung gegen den Gesamtumsatz  $p$ . Rechts: relativer Monomeranteil im Polymer gegen den Gesamtumsatz  $p$ .



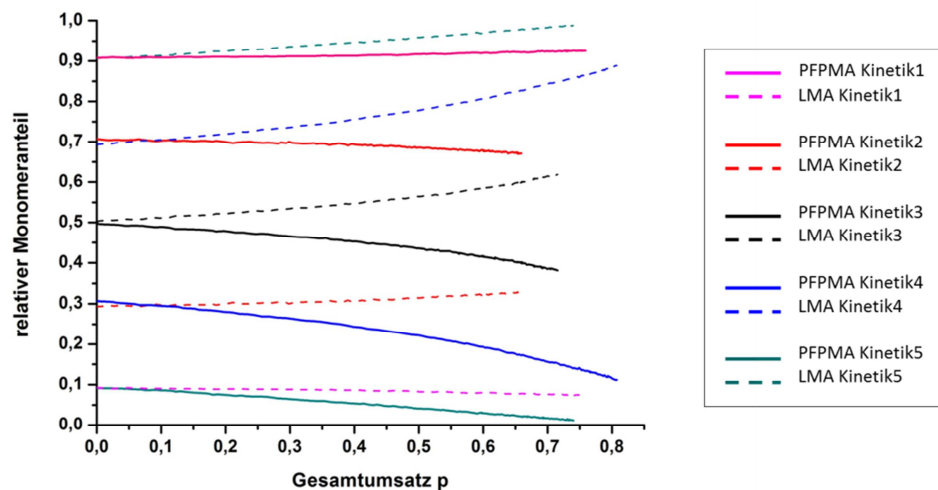
Somit kann man auf die Zusammensetzung der resultierenden Polymerkette schließen. So liegen zu Beginn 50,2% LMA und 49,8% PFPMA in der Reaktionslösung gelöst vor. Da PFPMA zunächst verstärkt in die Polymerkette eingebaut wird ist der Anteil an PFPMA in der Polymerkette am Anfang (nach ungefähr 1,5% Umsatz) sehr hoch (68,8% PFPMA und 31,2% LMA). D.h. PFPMA wird zu einem höheren Anteil verbraucht als LMA. Nach 40% Umsatz liegen noch ungefähr 45,3% freies PFPMA und 54,7% freies LMA in der Reaktionsmischung vor. Während der gesamten Reaktion wird also PFPMA stärker eingebaut als LMA, dabei nimmt die Stärke des Einbaus von PFPMA während der Reaktion ab und die von LMA nimmt zu. Am Ende der Reaktion nach einem Umsatz von 70% ist der Anteil von freiem PFPMA in der Reaktionslösung insgesamt auf 38,5% gesunken und der Gesamtanteil in der Polymerkette von PFPMA beträgt 61,1%. Der Anteil von LMA in der Lösung ist umgekehrt auf 61,5% gestiegen und in der Polymerkette auf 38,9% gesunken. Man erhält somit ein Gradientenpolymer das zu Beginn zum Großteil aus PFPMA Einheiten aufgebaut ist und gegen Ende aus einem Einbauverhältnis von 54,6% PFPMA und 45,4% LMA besteht.

Abbildung 23 zeigt die eingebauten Monomeranteile gegen den Gesamtumsatz der Kinetiken 1-5 im Überblick.



**Abbildung 23:** Eingebaute Monomeranteile der Kinetiken 1-5 gegen den jeweiligen Gesamtumsatz  $p$ . A) Kinetik1, B) Kinetik2, C) Kinetik4, D) Kinetik5.

In den Reaktionen von **Kinetik1** und **Kinetik2** (siehe Abbildung 23 A und B) bleiben dabei die eingesetzten Verhältnisse der Monomeranteile innerhalb der Fehlertoleranz konstant. **Kinetik1** zeigt dabei sogar eher einen bevorzugten Einbau von LMA. Dies ändert sich ab dem Versuch von **Kinetik2**. Dort zeigt sich ein bevorzugter Einbau von PFPMA, was darauf hindeutet, dass sich zwischen diesen Messungen der Azeotrope Punkt befindet. Generell muss man jedoch sagen, dass bei geringen Umsätzen die Änderungen der Monomeranteile so gering sind, dass es schwierig ist einen direkten Trend zu erkennen. Bei den weiteren Versuchen (**Kinetik3-5**) wird weiterhin insgesamt bevorzugt PFPMA eingebaut. Dies erkennt man auch trägt man erneut den relativen Monomeranteil in Lösung gegen den Gesamtumsatz  $p$  auf (Abbildung 24).



**Abbildung 24:** Relative Monomeranteile in der Reaktionslösung der Kinetiken 1-5 gegen den jeweiligen Gesamtumsatz  $p$ .

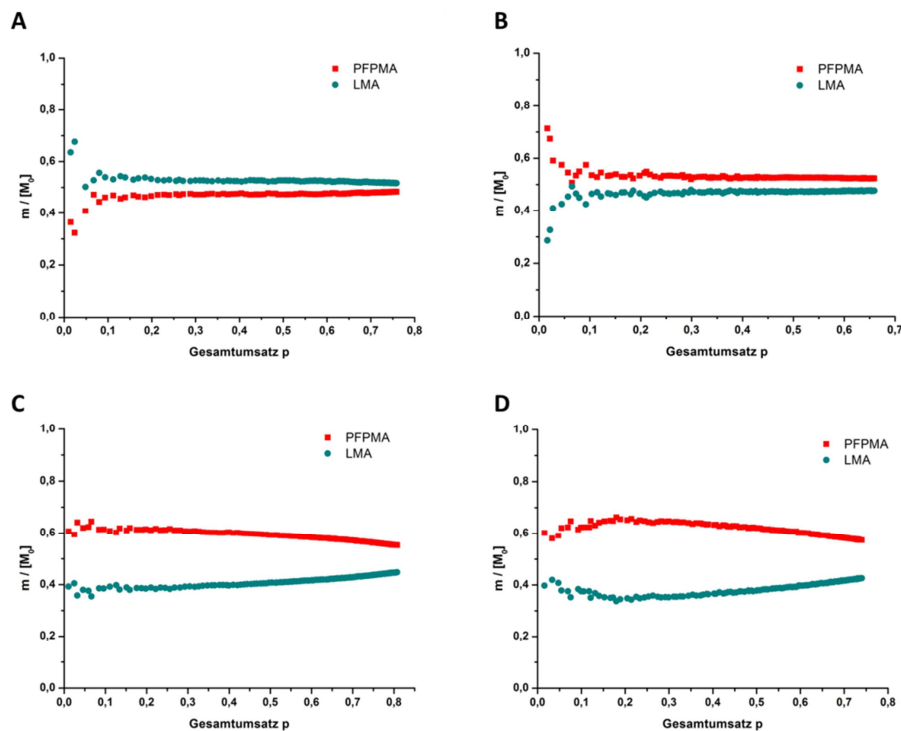
Darin sieht man, dass generell der Monomeranteil von LMA in der Reaktionslösung während der Polymerisation ansteigt und der von PFPMA sinkt, d.h. PFPMA wird stärker in die Polymerkette eingebaut als LMA. Wobei man auch hier sehen kann, dass **Kinetik1** und **Kinetik2** nahezu keine Steigung in ihren Kurvenverläufen aufweisen und dem Verlauf einer idealen Copolymerisation innerhalb der Fehlertoleranz folgen.

Tabelle 5 zeigt die freien Monomeranteile der jeweiligen Kinetik Messungen zu Beginn der Reaktion, nach 40% Umsatz, sowie am Ende der Polymerisation und die zu erwartenden eingebauten Monomeranteile im Polymer.

**Tabelle 5:** Freie Monomeranteile in der Reaktionslösung bei 0% und 40% Umsatz sowie am Ende der Polymerisation und die zu erwartenden eingebauten Monomeranteile im Polymer.

	Umsatz	PFPMA-Anteil in Lösung	LMA-Anteil in Lösung	Gesamt PFPMA-Anteil im Polymer	Gesamt LMA-Anteil im Polymer	Einbauverhältnis PFPMA/LMA
<b>Kinetik1</b>	5%	90,76%	9,23	90,7%	9,3%	9,75
	40%	91,3%	8,7%	90,3%	9,7%	9,31
	75%	92,6%	7,4%	89%	11%	8,09
<b>Kinetik2</b>	5%	70,5%	29,5%	70,9%	29,1%	2,44
	40%	69,3%	30,7%	72,1%	27,9%	2,58
	65%	67,2%	32,8%	74,2%	25,8%	2,88
<b>Kinetik3</b>	5%	49,2%	50,8%	50,4%	49,6%	1,02
	40%	45,3%	54,7%	54,3%	45,7%	1,19
	70%	38,5%	61,5%	61,1%	38,9%	1,57
<b>Kinetik4</b>	5%	29,9%	70,1%	31,4%	68,6%	0,46
	40%	24,3%	75,7%	37,1%	62,9%	0,59
	80%	11,4%	88,6%	50%	50%	1
<b>Kinetik5</b>	5%	8,9%	9,1%	9,5%	90,5%	0,10
	40%	5,3%	94,7%	13,1%	86,9%	0,15
	70%	1,2%	98,8%	17,2%	82,8%	0,21

Betrachtet man sich nun die eingebauten Monomeranteile gegen den Gesamtumsatz  $p$  (Abbildung 25) sieht man sehr deutlich, dass bei **Kinetik1** (Abbildung 25 A) zu Beginn der Polymerisation verstärkt LMA eingebaut wird und der LMA Anteil am Anfang der Polymerkette bei über 65% liegt. Insgesamt bleibt also der eingebaute Anteil von PFPMA bei dem eingesetzten Monomerverhältnis von PFPMA zu LMA mit 90:10, geringer als der Anteil von LMA. Aber auch hier erkennt man, dass **Kinetik1** die einzige Ausnahme bildet. Bei den Messungen **Kinetik2-5** überwiegt insgesamt der Einbau von PFPMA während der Polymerisation (Abbildung 25 B bis D), wobei bei **Kinetik2** (Abbildung 25 B) zu Beginn verstärkt PFPMA eingebaut wird (über 70%). Ab einem Umsatz von 10% bleibt das Verhältnis von eingebautem Monomer zur Monomerausgangskonzentration dann nahezu konstant. In der Reaktion von **Kinetik4** mit einem Anteil an PFPMA zu LMA von 30:70 sieht man auch hier einen stärkeren Einbau von PFPMA (Abbildung 25 C). Bei **Kinetik4** und **Kinetik5** wird also bei einem geringer eingesetzten Anteil von PFPMA dieses verstärkt über die gesamte Polymerisation eingebaut (Abbildung 25 C und D) was auf eine höhere Reaktivität von PFPMA hindeutet.

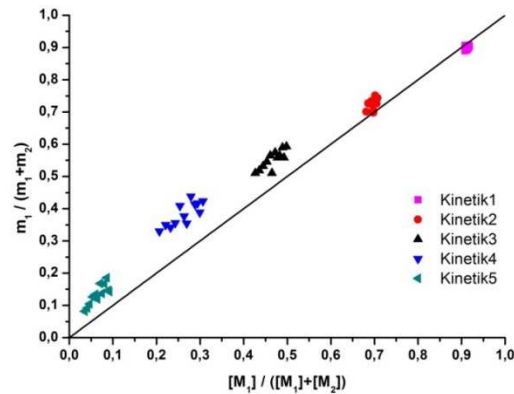


**Abbildung 25:** Relativer Monomeranteil im Polymer gegen den Gesamtumsatz  $p$  von den Kinetiken 1-5. A) Kinetik1, B) Kinetik2, C) Kinetik4, D) Kinetik5.

Durch die Echtzeit  $^1\text{H-NMR}$  Kinetik Untersuchungen der Copolymerisation von PFPMA und LMA bei verschiedenen Monomeranteilen konnte also gezeigt werden, dass sich die Polymerzusammensetzung während der Reaktion ändert und das Verhältnis von PFPMA zu LMA bei ungefähr 80:20 liegen muss, um eine azeotrope Copolymerisation durchzuführen.

Trägt man nun den Anteil von eingebautem PFPMA zum Zeitpunkt  $t$  (y-Achse) gegen den Anteil von PFPMA in der Ausgangskonzentration in Lösung (x-Achse) auf, erhält man ein Copolymerisationsdiagramm (Abbildung 26). Ein Vorteil der hier verwendeten Echtzeit-Kinetik Messung ist, dass während der Copolymerisation alle 5 min. ein Spektrum aufgenommen wurde. Deswegen kann jeweils nach 5 min. die gemessene Monomerkonzentration wieder als Ausgangskonzentration gesetzt werden und man erhält für eine Messung 144 Werte. Damit wäre es möglich mit nur einer Messung ein Copolymerisationsdiagramm zu erhalten und daraus die Copolymerisationsparameter zu bestimmen. Dies ist allerdings nur möglich, wenn sich die Verhältnisse der Monomerkonzentration während der Polymerisation stark verändern, da sonst der Fehler der NMR Spektroskopie die Werte extrem verfälschen würde. Da sich im Falle der Copolymerisation von PFPMA und LMA die Monomerkonzentrationen während der Reaktion nur relativ leicht verändern, wurde, um den Fehler geringer zu halten, erst

nach jeweils 5% Umsatz (bis zu einem Gesamtumsatz von 60%) die momentane Monomerkonzentration wieder als Ausgangskonzentration für den nächsten Einbau verwendet und alle Messungen (**Kinetik1-5**) berücksichtigt. Damit erhält man für jede Messung 12 Werte. Das erhaltene Copolymerisationsdiagramm ist in Abbildung 26 zu sehen.



**Abbildung 26:** Copolymerisationsdiagramm der Reaktionen Kinetik1-5 nach je 5% Umsatz bis zu einem Gesamtumsatz von 60%.

Dieses Copolymerisationsdiagramm zeigt, dass bei einem Anteil von 0 bis 80-85% von PFPMA in der Reaktionsmischung, dieses stärker in die Polymerkette eingebaut wird. Ab einem Anteil von ungefähr 80-85% ändert sich dies und LMA wird stärker eingebaut. D.h., wie erwartet, kommt es bei einem Verhältnis von ungefähr 80-85% PFPMA und 20-15% LMA in der Reaktionsmischung zu einer azeotropen Copolymerisation und es entsteht ein Polymer mit der Zusammensetzung der eingesetzten Anteile der Monomere. Anhand des so erhaltenen Copolymerisationsdiagramms erwartet man für den Copolymerisationsparameter von PFPMA einen höheren Wert, als für den von LMA. Gleichzeitig müssten beide Werte wegen des Vorhandenseins des azeotropen Punktes kleiner als 1 sein.

### Auswertung

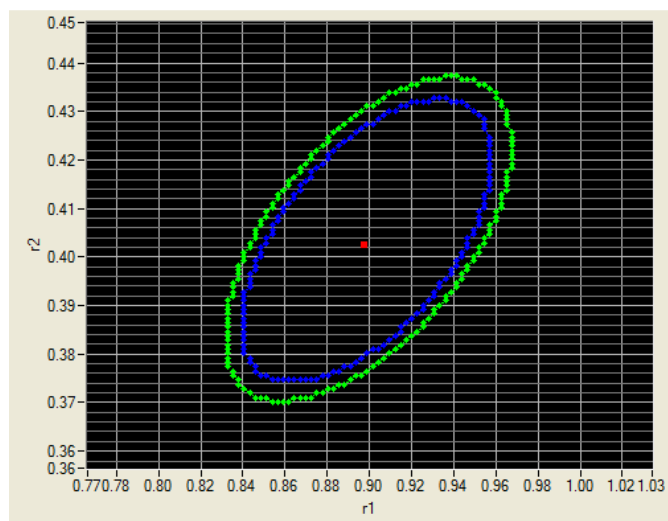
Mit diesem Copolymerisationsdiagramm bzw. den dafür verwendeten Werten ist es nun möglich, die Copolymerisationsparameter zu bestimmen. Dafür erfolgt zunächst die numerische Berechnung der r-Parameter mit Hilfe des Programms Contour. Anschließend werden diese Werte alternativ nach Fineman/Ross und Kelen/Tüdös ermittelt und mit den numerisch erhaltenen Werten verglichen.

In das Programm Contour werden also die Werte der Monomerausgangskonzentrationen und der eingebauten Monomeranteile eingegeben

(siehe Experimenteller Teil 5.6.4, Tabelle 24) und ein absoluter Fehler von 3% angenommen. PFPMA wird dabei als  $M_1$  und LMA als  $M_2$  definiert.

Auf diesem Wege erhält man für  $r_1 = 0,898 \pm 0,037$  und für  $r_2 = 0,402 \pm 0,018$ . Der Parameter  $r_1$  ist dabei definiert als die Reaktivität eines PFPMA-Kettenendes für die Homopolymerisation geteilt durch die Polymerisation mit LMA. Dieser Wert liegt sehr nahe an 1 was bedeutet, dass PFPMA eine nahezu gleiche Reaktivität gegenüber sich selbst und gegenüber LMA aufweist. Da der Wert mit 0,898 etwas unter 1 liegt, ist die Reaktivität gegenüber einem LMA-Kettenende jedoch leicht erhöht. Der Copolymerisationsparameter  $r_2$  zeigt mit einem Wert von 0,402 eine schnellere Reaktion des LMA-Kettenendes mit PFPMA an. Beide Werte zeigen also an, dass bevorzugt PFPMA in die Polymerkette eingebunden wird, was mit den erhaltenen Ergebnissen aus den Echtzeit  $^1\text{H-NMR}$  Kinetik Messungen übereinstimmt.

Die erhaltenen Konfidenzbereiche der r-Parameter sind in Abbildung 27 gezeigt.



**Abbildung 27:** Rot: Optimale Werte für  $r_1$  und  $r_2$ . Blau: 90% Konfidenzintervall. Grün: 95% Konfidenzbereich.

Die blauen Punkte in Abbildung 27 geben dabei die Region für eine 90%ige Häufigkeit und die grünen Punkte in Abbildung 27 die Region für eine 95%ige Häufigkeit an, welche die wahre Lage des Punktes bei einer unendlichen Wiederholung der Experimente zur Bestimmung der r-Parameter einschließt. Da  $r_1$  und  $r_2$  abhängig voneinander sind ist es sinnvoll den größeren gemeinsamen Konfidenzbereich anzunehmen und man erhält so für  $r_1$  einen Wertebereich von 0,833 – 0,968 und für  $r_2$  eine Bereich von 0,370 – 0,437. Durch die Untersuchung der Copolymerisation mittels

der Echtzeitkinetik Messungen konnte nun zusätzlich zu der Bestimmung der Reaktivitäten der beiden Monomere zueinander (r-Parameter) genaue Aussagen über den Aufbau der statistischen PFPMA-LMA Copolymere bei verschiedenen Monomerzusammensetzungen getroffen werden. Somit kann man später auf die Struktur von, durch polymeranaloge Umsetzungen der statistischen Reaktivesterpolymere hergestellten, statistischen HEMA-LMA Copolymere schließen. Alternativ wurden die Copolymerisationsparameter zusätzlich nach Fineman/Ross und Kelen/Tüdös ermittelt und mit den numerisch erhaltenen Werten verglichen.

In Tabelle 6 sind die Werte für die Berechnung der Copolymerisationsparameter der Reaktionen **Kinetik1-5** nach einem Umsatz von 5% aufgelistet.

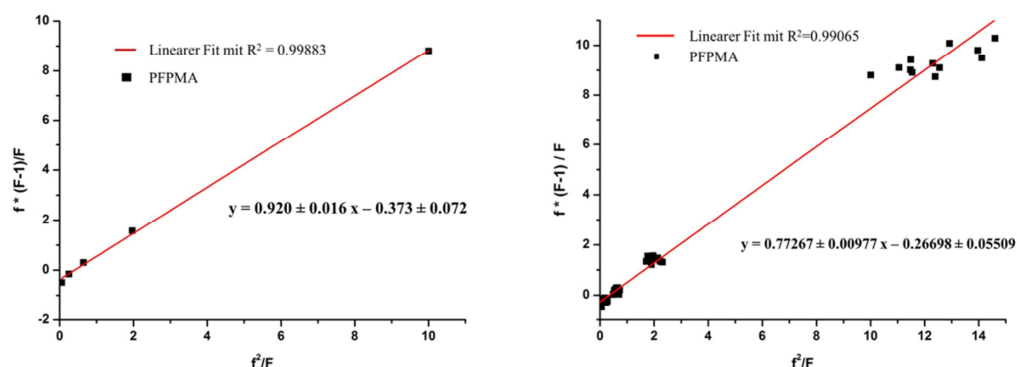
**Tabelle 6:** Werte für die Berechnung der Copolymerisationsparameter nach Fineman und Ross.

	<b>f</b>	<b>F</b>	<b>f<sup>2</sup>/F</b>	<b>f*(F-1)/F</b>
<b>Kinetik1</b>	9,825	9,648	10,006	8,807
<b>Kinetik2</b>	2,388	2,900	1,967	1,565
<b>Kinetik3</b>	0,970	1,457	0,645	0,304
<b>Kinetik4</b>	0,427	0,734	0,249	-0,155
<b>Kinetik5</b>	0,098	0,167	0,058	-0,490

Um die Copolymerisationsparameter zu berechnen, wird nun  $f^*(F-1)/F$  gegen  $f^2/F$  aufgetragen. Durch die Punkte wird ein linearer Fit gelegt. Die Steigung der erhaltenen Geraden entspricht  $r_1$  und der Achsenabschnitt  $r_2$  (Abbildung 28 links). Man erhält somit die Werte  $r_1=0,920$  und  $r_2=0,373$ . Der Parameter  $r_1$  ergibt sich aus der Steigung der erhaltenden Geraden und  $r_2$  wurde aus dem Y-Achsenabschnitt erhalten. Hierbei kann man nun die Echtzeitkinetik Messungen ausnutzen, um mehr Werte zu verwenden und genauere Ergebnisse zu erzielen. Da alle 5 min. ein neues <sup>1</sup>H-NMR Spektrum während der gesamten Polymerisation aufgenommen wurde, kann man zu jedem Zeitpunkt die genaue Monomerkonzentration bestimmen. Da der Fehler bei einer geringen Veränderung der Monomerkonzentration jedoch sehr groß wird, wurde zunächst der Umsatz über die Verhältnisse der absoluten Integrale bestimmt.

$$p = 1 - \frac{[I]_{PFPMA_t} + [I]_{LMA_t}}{[I]_{PFPMA_0} + [I]_{LMA_0}}$$

wobei mit  $[I]_0$  die jeweiligen Ausgangsintegrale und mit  $[I]_t$  die Integrale nach jeweils einer Messung eingesetzt wurden. Nun wurde nach jeweils ungefähr 5% inkrementeller Umsatz (bis 60% Gesamtumsatz) die Monomerkonzentration wieder als Ausgangskonzentration gesetzt. Somit war es möglich anstelle von nur jeweils einem Wert pro Kinetik Messung insgesamt 12 Werte zu verwenden (siehe Experimenteller Teil 5.6.4, Tabelle 25). Trägt man nun wieder  $f^*(F-1)/F$  gegen  $f^2/F$  auf und legt einen linearen Fit durch die erhaltenen Punkte erhält man für  $r_1 = 0,773 \pm 0,010$  und für  $r_2 = 0,267 \pm 0,056$  als Steigung und Achsenabschnitt (Abbildung 28 rechts).



**Abbildung 28:** Links: Auftragung von  $f^*(F-1)/F$  gegen  $f^2/F$  nach 5% Umsatz der Copolymerisationen Kinetik1-5. Rechts: Auftragung von  $f^*(F-1)/F$  gegen  $f^2/F$  nach jeweils 5% inkrementeller Umsatz der Copolymerisationen Kinetik1-5 bis zu einem Gesamtumsatz von 60%.

Diese erhaltenen Werte sind jedoch nach Tidwell und Mortimer<sup>[148]</sup> fehlerbehaftet, da die experimentellen Grenzwerte einen sehr großen Einfluss auf die Steigung der Geraden haben (geringe  $M_1$ - oder  $M_2$ -Konzentration). Deswegen wird im Folgenden, das Verfahren von Kelen und Tüdös angewendet, die mit dem sogenannten Symmetrisierungsparameter  $\alpha$  diese ungleiche Gewichtung aufheben.

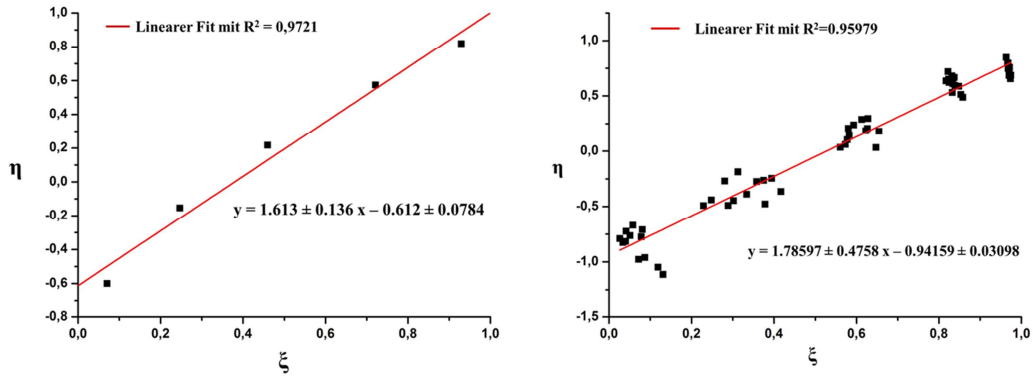
In Tabelle 7 sind die benötigten Werte für die Berechnung der r-Parameter nach der Methode Kelen/Tüdös für die jeweiligen Kinetik Messungen Kinetik1-5 nach 5% inkrementeller Umsatz angegeben.

**Tabelle 7:** Werte für die Berechnung nach Kelen und Tüdös bei  $\alpha = 0,762$ .

	G	H	$\eta$	$\xi$
<b>Kinetik1</b>	8,807	10,006	0,818	0,929
<b>Kinetik2</b>	1,565	1,967	0,574	0,721
<b>Kinetik3</b>	0,304	0,645	0,216	0,459
<b>Kinetik4</b>	-0,155	0,249	-0,154	0,247
<b>Kinetik5</b>	-0,490	0,058	-0,600	0,071



In einem Diagramm werden dann die Werte von  $\eta$  (y-Achse) gegen  $\xi$  (x-Achse) aufgetragen und die Gerade mit  $\xi = 0$  und  $\xi = 1$  extrapoliert. Die erhaltene Geradengleichung liefert die Werte  $\eta(0) = -r_2/\alpha$  und  $\eta(1) = r_1$  als Achsenabschnitte (Abbildung 29 links).



**Abbildung 29:** Links: Auftragung von  $\eta$  gegen  $\xi$  mit  $\alpha = 0,762$  nach 5% Umsatz. Rechts: Auftragung von  $\eta$  gegen  $\xi$  mit  $\alpha = 0,383$  für alle Kinetik Messungen Kinetik1-5 mit Messpunkt nach jeweils 5% inkrementeller Umsatz.

Somit erhält man für  $r_1 = 0,998$  und für  $r_2 = 0,466$ . Fügt man nun zusätzlich wieder die erhaltenen Werte der Echtzeit Kinetik Messung mit hinzu (siehe Experimenteller Teil 5.6.4, Tabelle 25) und trägt erneut  $\eta$  (y-Achse) gegen  $\xi$  (x-Achse) auf erhält man, nach Erstellen eines linearen Fits, eine Geradengleichung die für  $r_1 = 0,844 \pm 0,079$  und für  $r_2 = 0,360 \pm 0,012$  liefert (Abbildung 29 rechts). Alle Werte der Kinetikmessungen nach je 5% inkrementeller Umsatz (über einen Gesamtumsatz von 60%) für die Auftragung nach Fineman/Ross und Kelen/Tüdös sind in Tabelle 25 (Experimenteller Teil 5.6.4) aufgelistet.

Im Folgenden werden nun die erhaltenen Copolymerisationsparameter der einzelnen Methoden miteinander verglichen (Tabelle 8).

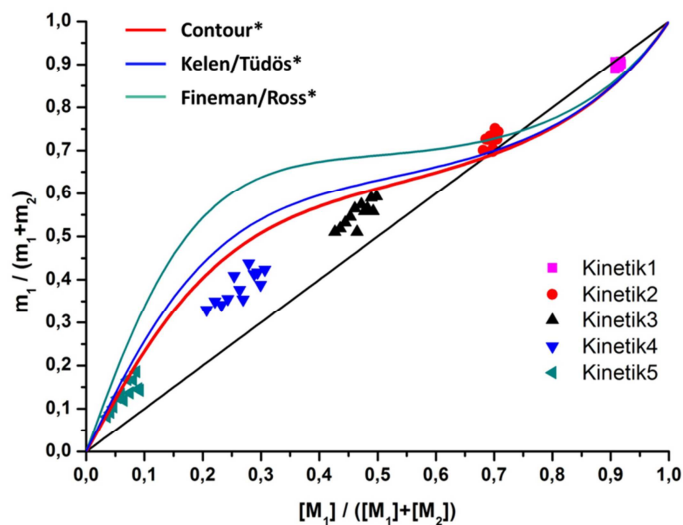
**Tabelle 8:** Copolymerisationsparameter der einzelnen Methoden im Überblick. \* Unter Verwendung der Werte nach je 5% inkrementeller Umsatz bis zu einem Gesamtumsatz von 60% von den Messungen Kinetik1-5.

	$r_1$	$r_2$	$r_1 * r_2$
<b>Contour</b>	1,092	0,491	0,536
<b>Fineman/Ross</b>	0,920	0,373	0,343
<b>Kelen/Tüdös</b>	0,998	0,466	0,465
<b>Contour*</b>	$0,898 \pm 0,070$	$0,402 \pm 0,032$	0,361
<b>Fineman/Ross*</b>	$0,773 \pm 0,010$	$0,267 \pm 0,056$	0,206
<b>Kelen/Tüdös*</b>	$0,844 \pm 0,079$	$0,360 \pm 0,012$	0,304

Sieht man sich zunächst die Copolymerisationsparameter an, die mit nur jeweils einem Wert pro Reaktion (nach den ersten 5% inkrementeller Umsatz) ermittelt wurden (siehe Tabelle 8 ohne \*) erkennt man, dass der berechnete Wert für  $r_1$  des Programms Contour mit  $r_1 = 1,092$  deutlich höher als erwartet ist. Ein Wert von  $r_1 > 1$  würde demnach bedeuten, dass kein azeotroper Punkt vorliegen würde, was sich mit den Beobachtungen aus den Echtzeitkinetik Messungen widerspricht. Vergleicht man diese Copolymerisationsparameter mit denen nach Fineman/Ross und Kelen/Tüdös (siehe Tabelle 8 ohne \*) erhaltenen Werten, so erscheinen diese auf den ersten Blick die Erwartungen besser zu erfüllen. Jedoch ist bekannt, dass die Auftragung nach Fineman/Ross deutlich fehlerbehaftet ist und die so erhaltenen Werte sehr stark vom wahren Wert abweichen. Im Gegensatz dazu sind die erhaltenen Werte von Kelen/Tüdös genauer, da sie durch die Einführung des Symmetrisierungsparameters  $\alpha$  die Werte gleichmäßig gewichten. Betrachtet man nun die Werte der Copolymerisationsparameter die man unter Ausnutzung der Echtzeitkinetikmessung erhalten hat (siehe Tabelle 8 mit \* gekennzeichnet), in dem die Werte über den gesamten Umsatz (bis 60%) verwendet wurden und nach je 5% inkrementellen Umsatzschritten die Monomerkonzentration wieder als Ausgangskonzentration gesetzt wurde, zeigen diese eine bessere Übereinstimmung mit den erwarteten Werten. Man kann davon ausgehen, dass diese Werte aufgrund der insgesamt 60 verwendeten Werte zu viel genaueren Ergebnissen führen. So erhält man nach Contour für  $r_1 = 0,898 \pm 0,070$  und für  $r_2 = 0,402 \pm 0,032$ . Die analog bestimmten Werten nach den Methoden Fineman/Ross und Kelen/Tüdös zeigen auch hier Abweichungen von diesen Werten, wobei Fineman/Ross sogar mit beiden Copolymerisationsparametern außerhalb des Konfidenzbereiches liegt, was noch einmal zeigt, wie stark fehlerbehaftet diese Methode ist. Die Werte nach Kelen/Tüdös liegen hingegen innerhalb der Fehlergrenzen im Konfidenzbereich der numerisch berechneten Parameter. Somit konnte gezeigt werden, dass unter Verwendung der Echtzeitkinetik  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie eine erhöhte Anzahl von Werten für die Berechnung der Copolymerisationsparameter zu einem genaueren Ergebnis führt. Dank des Contour-Programms war es nicht nur möglich die Copolymerisationsparameter genau zu berechnen, sondern auch den Konfidenzbereich dieser Werte anzugeben. Verglichen mit den ebenfalls angewendeten Methoden von Fineman/Ross und Kelen/Tüdös kann man so sehr genau auf die Reaktivitätsverhältnisse der beiden Monomere während einer Copolymerisation schließen. Denn auch wenn die Werte von Fineman/Ross stark abweichen, sind doch

alle  $r_1$  Werte wie erwartet größer als die Werte von  $r_2$  und das Produkt aus beiden Werten kleiner als 1. Somit kommt es ab einem bestimmten Monomerverhältnis zu einer azeotropen Polymerisation, d.h. das sich bildende Copolymer weist die gleiche Zusammensetzung auf, wie die eingesetzten Monomerverhältnisse.

Erstellt man nun ein Copolymerisationsdiagramm aus den erhaltenen Copolymerisationsparametern (es werden nur die aus Tabelle 8 mit \* gekennzeichneten Werte verwendet) so ergibt sich für die angewendeten Methoden folgenden Funktionsverläufe die in Abbildung 30 gezeigt sind.



**Abbildung 30:** Copolymerisationsdiagramm aus den ermittelten Copolymerisationsparametern der unterschiedlichen Methoden.

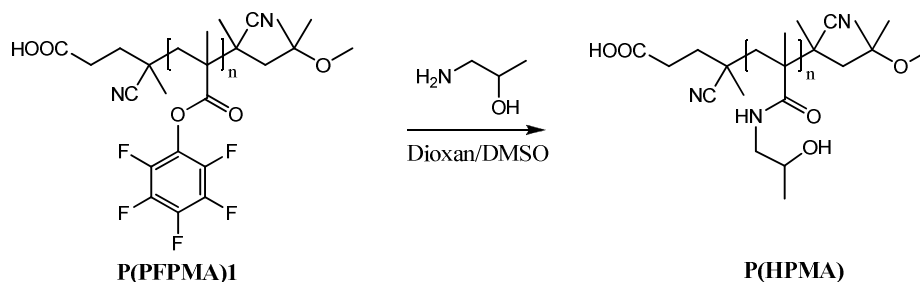
In diesem Diagramm kann man nun die Methoden zur Berechnung der Copolymerisationsparameter miteinander vergleichen und man erkennt, dass die Berechnung der Werte mit Hilfe des Programms Contour die Copolymerisation am besten wiedergeben und dem hier untersuchten System der Copolymerisation von PFPMA mit LMA am nächsten kommen (siehe Abbildung 30 rote Funktion). Der azeotrope Punkt liegt bei 69% PFPMA-Anteil. Setzt man also beispielsweise LMA zu ungefähr 31% ein und PFPMA zu 69% erhält man ein Copolymer welches genau dieser Monomerzusammensetzung entspricht. Ist der Anteil an LMA weniger als 31% wird es verstärkt in die Polymerkette eingebaut, ist der Anteil größer als 31% wird stärker PFPMA eingebaut. Diese Berechnung stimmt also innerhalb der Fehlertoleranz sowohl mit dem zu Beginn erstellten Copolymerisationsdiagramm der Messungen **Kinetik1-5** überein, als auch mit dem erstellten Copolymerisationsdiagramm unter Verwendung der berechneten Copolymerisationsparameter. Somit konnte gezeigt werden, dass die

ermittelten Copolymerisationsparameter die Reaktivitäten der Monomere sehr gut beschreiben und es somit möglich ist, bei verschiedenen Monomerkonzentrationen den Polymerisationsverlauf vorherzusagen. Zusätzlich erhält man durch die Echtzeitkinetik eine Bestätigung der erhaltenen Werte und kann auf die Sequenz eines PFPMA-LMA Copolymers schließen.

### 3.3 Untersuchung der Polymeranaloge Umsetzung von P(PFPMA) zu P(HPMA)

In diesem Kapitel wird die Synthese von *N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid (HPMA) Polymere über den Reaktivesteransatz genauer untersucht. Dafür werden Polypentafluorphenylmethacrylat Reaktivesterpolymere mittels der RAFT Polymerisation (*engl. reversible addition-fragmentationchain transfer*) analog zu Eberhardt *et al.*<sup>[118]</sup> synthetisiert (siehe Kapitel 3.1 Synthese der PFPMA Homopolymere) und anschließend mit 2-Hydroxypropylamin zu HPMA-Polymeren umgesetzt. Wie in Kapitel 1.6 bereits ausführlich beschrieben wurde, bietet die Syntheseroute von P(HPMA) über den PFPMA Reaktivesteransatz viele Vorteile, wie beispielsweise die bessere Löslichkeit in unterschiedlichen organischen Lösemitteln und die Einführung verschiedener Funktionalitäten in einem Schritt. Damit ist das PFPMA Reaktivesterpolymer zum einen für verschiedene Analysemethoden zugänglich und zum anderen ist es so möglich, Copolymere mit anderen hydrophoben Monomeren (z.B. Laurylmethacrylat, LMA) herzustellen. Unter dem Erhalt des Polymerisationsgrades werden dann die Reaktivester Gruppen am Polymerrückgrat mit 2-Hydroxypropylamin substituiert. Somit ist es möglich, amphiphile Polymersysteme, die normalerweise schwer zu charakterisieren sind, vielen Analysemethoden zugänglich zu machen. Um die quantitative Umsetzung ohne auftretende Nebenreaktionen zu untersuchen, werden verschiedene Reaktionsbedingungen gewählt und unterschiedliche Analysemethoden (<sup>1</sup>H, <sup>19</sup>F, inverse gated <sup>13</sup>C-NMR, Zeta Potential) verwendet.

Um den Einfluss von Verunreinigungen während der polymeranalogen Reaktion zu untersuchen, wurde dasselbe PFPMA Reaktivester Polymer (P(PFPMA)1) unter drei verschiedenen Reaktionsbedingungen umgesetzt. Dabei wurde in einer nukleophilen Substitution mit 2-Hydroxypropylamin aus dem PFPMA-Reaktivester Homopolymer (P(PFPMA)1) das gewünschte P(HPMA) synthetisiert (Schema 8).



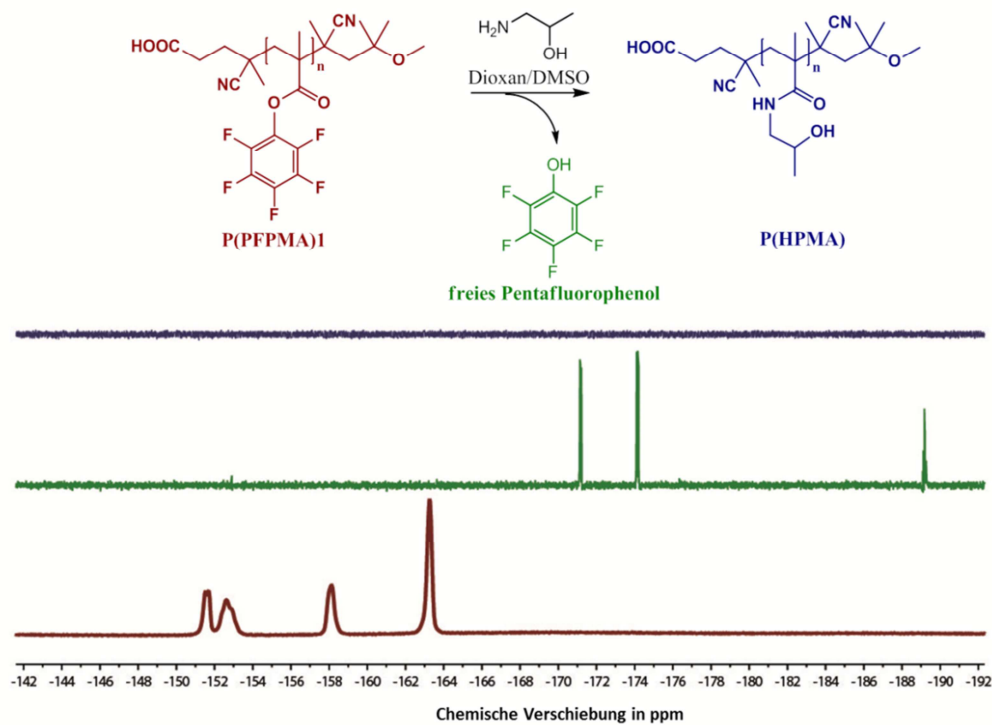
**Schema 8:** Synthese von P(HPMA) über den Reaktivesteransatz.

Die unter den verschiedenen Reaktionsbedingungen synthetisierten HPMA-Polymere wurden alle mittels Hexafluorphenolisopropanol (HFIP) GPC und verschiedenen NMR-Methoden untersucht und sind in Tabelle 9 aufgelistet.

**Tabelle 9:** Reaktionsbedingungen und Eigenschaften der Polymere P(PFPMA)1, P(HPMA)1-3 und P(HPMA) Kontrolle.

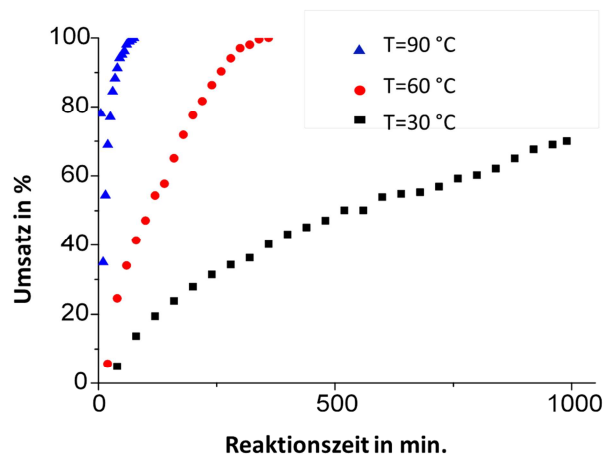
Polymer	Rkt.-Bedingung	$M_n$ in g/mol	$M_w$ in g/mol	$\bar{D}$
<b>P(PFPMA)1</b>	Dioxan/CTA1	23.300	30.000	1,3
<b>P(HPMA)1</b>	P(PFPMA)1/DMSO/ Dioxan/CTA1	25.000	32.300	1,3
<b>P(HPMA)2</b>	P(PFPMA)1/DMSO/ Dioxan/CTA1	24.000	33.600	1,4
<b>P(HPMA)3</b>	P(PFPMA)1/DMSO/ Dioxan/CTA1	21.100	32.300	1,5
<b>P(HPMA) Kontrolle</b>	DMSO/H <sub>2</sub> O (8:3)/ CTA1	26.900	32.200	1,2

Zunächst wurde die polymeranaloge Reaktion in einer Mischung aus absolutiertem DMSO und wasserfreiem Dioxan unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Das so erhaltene Polymer ist mit P(HPMA)1 bezeichnet und wurde mittels Dialyse gegen Milli-Q Wasser aufgereinigt. Unter diesen Reaktionsbedingungen wurde die polymeranaloge Umsetzung von M. Barz bei drei verschiedenen Temperaturen durchgeführt (30, 60 und 90°C). Die Umsetzung des Reaktivesters wurde mittels <sup>19</sup>F-NMR Spektroskopie verfolgt, da die Signale des am Polymer gebundenen Pentafluorphenols (rotes Spektrum in Abbildung 31) unterschiedliche chemische Verschiebungen zum freien Pentafluorphenol aufweisen (grünes Spektrum in Abbildung 31). Die Umsetzung kann somit über das Verhältnis der Integrale von gebundenem zu freiem Pentafluorphenol berechnet werden. Dies ist auch möglich, da kein Kern-Overhauser Effekt auftritt und somit die Intensitäten der Signale quantitativ ausgewertet werden können. Zusätzlich kann durch diese Methode die erfolgreiche Aufreinigung des Polymers nach der polymeranalogen Umsetzung nachgewiesen werden (blaues Spektrum in Abbildung 31, keine Signale).



**Abbildung 31:** Umsetzung von P(PFPMA) zu P(HPMA) gemessen mittels  $^{19}\text{F}$ -NMR bei 25 °C. Das Spektrum unten (rot) zeigt das  $^{19}\text{F}$ -NMR von P(PFPMA), das mittlere Spektrum (grün) zeigt das  $^{19}\text{F}$ -NMR von freiem Pentafluorophenol nach der Umsetzung von P(PFPMA) mit 2-HPA ohne Aufreinigung, das oberste Spektrum (blau) zeigt P(HPMA) nach Aufreinigung.

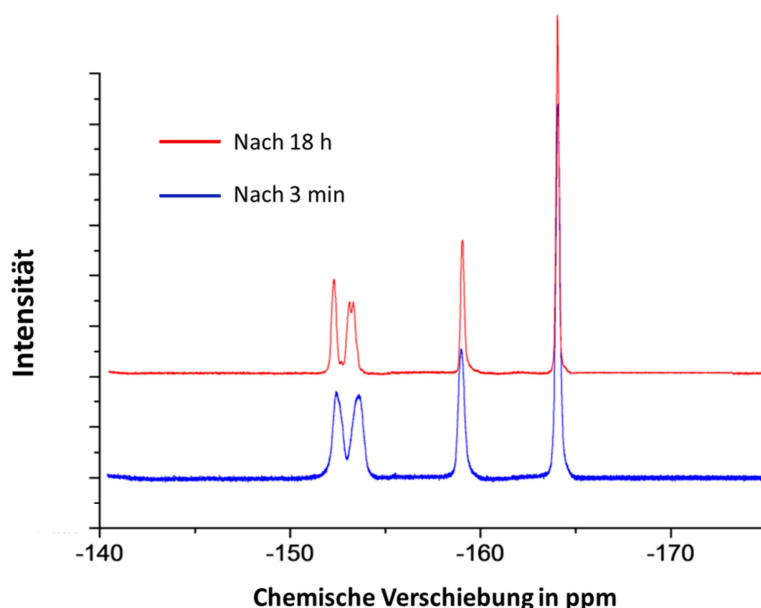
Die temperaturabhängigen polymeranalogen Umsetzungen wurden in einem abgedichteten NMR-Röhrchen bei den gewünschten Temperaturen im NMR-Spektrometer durchgeführt. Die Ergebnisse dieser temperaturabhängigen Umsetzung sind in Abbildung 32 gezeigt.



**Abbildung 32:** Temperaturabhängige polymeranaloge Umsetzung von P(PFPMA) zu P(HPMA) bei einem molaren Verhältnis von PFPMA zu 2-HPA von 1:3. Blau: T=90 °C, rot: T=60 °C, schwarz: T=30°C.

Wie erwartet ist die Umsetzung des Reaktivesters stark temperaturabhängig. Bei 30 °C findet die Umsetzung zu P(HPMA) sehr langsam statt und nach ungefähr 16 Stunden sind erst 60-70% der Reaktivestergruppe umgesetzt. Jedoch kann man auch eine vollständige Umsetzung bei dieser Temperatur nach 48 Stunden beobachten. Bei 60 °C sind bereits nach 8 Stunden und bei 90 °C nach 90 min alle PFPMA-Reaktivestergruppen zu HPMA-Gruppen umgesetzt.

Nach dem die vollständige Umsetzung des Reaktivesters nachgewiesen werden konnte, soll untersucht werden, ob mögliche Nebenreaktionen, beispielsweise mit der Hydroxylgruppe des 2-HPA, bei dieser Reaktion auftreten können. Dazu wurde wieder die  $^{19}\text{F}$ -NMR Spektroskopie als Analysemethode herangezogen. Zwar konnte durch Eberhardt *et al.*<sup>[119]</sup> nachgewiesen werden, dass eine Mischung aus Hexanol und Triethylamin keine Hydrolyse des Reaktivesters bewirken, jedoch fehlt der Nachweis dieser Hydrolysestabilität bei höheren Temperaturen. Um dies zu beweisen, wird die freie Aminogruppe des 2-HPAs mit einer Di-*tert.*-butyl-dicarbonat-(BOC) Gruppe geschützt und dieses *N-t-Boc-2-hydroxyl-propylamin* unter den oben genannten Reaktionsbedingungen für die polymeranaloge Umsetzung von P(PFPMA) eingesetzt (durchgeführt von ). Die Umsetzung wurde dann bis Temperaturen von 60 °C über 18 Stunden untersucht, da diese Temperatur bereits nach 8 Stunden einen vollständigen Umsatz zeigte. Abbildung 33 zeigt die aufgenommenen  $^{19}\text{F}$ -NMR Spektren nach 3 min (blau) und nach 18 Stunden (rot).



**Abbildung 33:**  $^{19}\text{F}$ -NMR nach 3 min (blau) und 18 h (rot) nach Umsetzung von P(PFPMA) mit *t*-Boc-2-hydroxypropylamin.

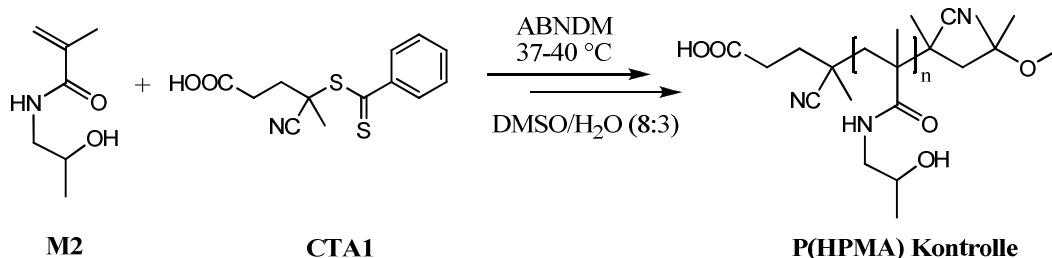


Man kann deutlich erkennen, dass keine Umsetzung des Reaktivesters erfolgte. Dies bestätigt, dass ausschließlich primäre Amine mit dem Pentafluorophenylmethacrylat umgesetzt werden. So konnte mittels  $^{19}\text{F}$ -NMR Spektroskopie gezeigt werden, dass bei der polymeranalogen Umsetzung von PFPMA weder Verunreinigungen auftreten noch, dass unter den angegebenen Bedingungen, wie absolutiertes Lösemittel und Stickstoffatmosphäre, die Reaktivestergruppen hydrolysiert werden.

Als nächstes wurde die gleiche polymeranaloge Reaktion erneut mit zusätzlich 3 vol% Wasser im Lösungsmittel durchgeführt. DMSO ist sehr hygroskopisch und nimmt innerhalb von einer Stunde bis zu 10 vol% Wasser aus der Luft auf.<sup>[149]</sup> Deswegen erschien eine Menge von 3 vol% Wasser realistisch, um ein kurzzeitiges Aussetzen von DMSO an Luft zu imitieren und somit nicht aufgereinigte Lösemittelbedingungen zu simulieren. Das so synthetisierte Polymer ist mit P(HPMA)2 gekennzeichnet und die weiteren Eigenschaften werden später ausführlich diskutiert.

Um ein partiell hydrolysiertes P(HPMA) herzustellen, wurde P(PFPMA) mit Kaliumhydroxid-Lösung versetzt, bis 70% der Reaktivestergruppen (ermittelt durch  $^{19}\text{F}$ -NMR) umgesetzt waren. Dieses teilweise hydrolysierte P(PFPMA) wurde dann in die polymeranaloge Reaktion mit 2-HPA unter denselben Reaktionsbedingungen wie oben beschrieben, eingesetzt und wird als P(HPMA)3 bezeichnet.

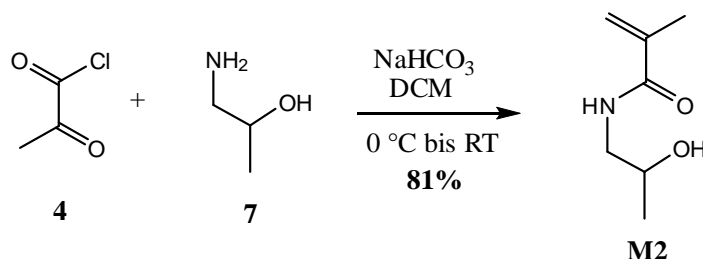
Für den direkten Vergleich in den analytischen Methoden wurde zusätzlich N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid (**M2**) direkt mittels RAFT in einer Mischung aus DMSO und Wasser (v/v = 8:3) unter Verwendung des gleichen Kettentransferreagenz (**CTA1**) und ABNDM als Initiator polymerisiert (Schema 9). Der Polymerisationsgrad wurde dabei ähnlich zu den anderen P(HPMA) Systemen eingestellt (siehe Tabelle 9).



**Schema 9:** Direkte RAFT Polymerisation von N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid unter Verwendung von CTA 1 und ABNDM.

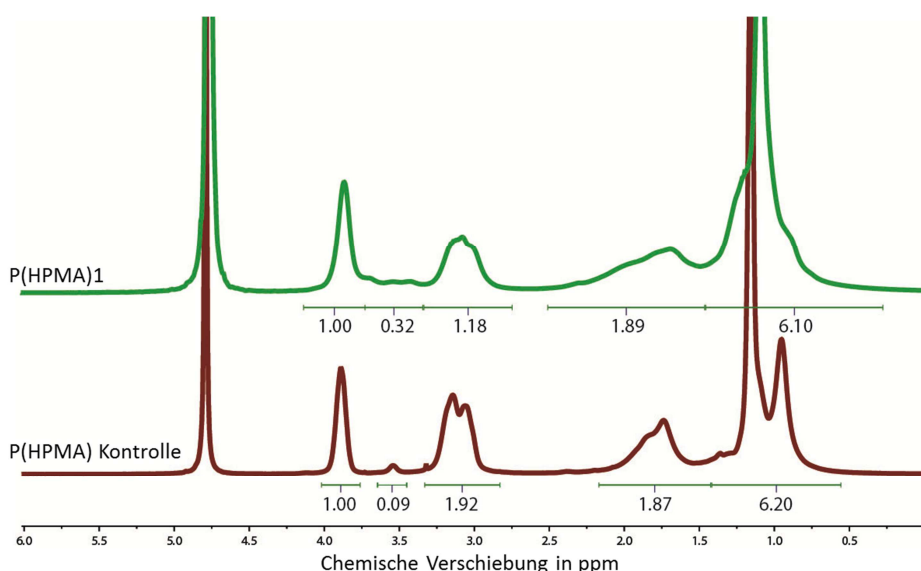
Das Monomer (**M2**) wurde dafür aus der Reaktion von 1-Amino-2-propanol (**7**) mit Methacryloylchlorid (**4**) erhalten (Schema 10). Bevor es in die Polymerisation

eingesetzt werden konnte, wurde es säulenchromatographisch aufgereinigt und im Hochvakuum getrocknet.



**Schema 10:** Synthese von N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid (M2).

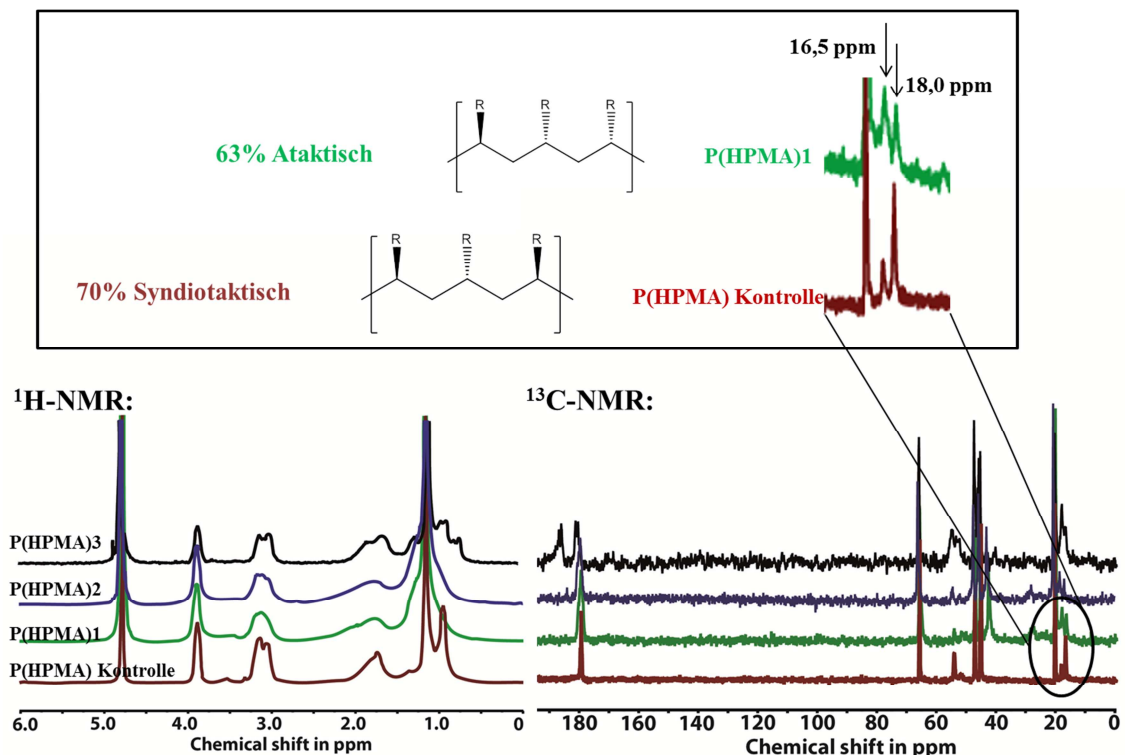
Während man die Methode der  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie also anwenden kann, um die vollständige Umsetzung des Reaktivesters zu verfolgen, ist sie jedoch nicht geeignet, um zwischen ungewollter Hydrolyse und geplanter Aminolyse zu unterscheiden. Deswegen müssen andere NMR Methoden angewendet werden. So haben beispielsweise Klok und seine Mitarbeiter  $^1\text{H}$ -NMR Spektroskopie angewendet, um die polymeranaloge Umsetzung von P(PFPMA) mit 2-HPA zu untersuchen.<sup>[120]</sup> Werden die Integrale der Signale bei 2,9 – 3,4 ppm die der  $\text{CH}_2$ -Gruppe in der P(HPMA) Seitenkette zugeordnet werden können, mit den Signalen der  $\text{CH}_2$ -Gruppe des Polymerrückgrats bei 1,5 – 2,1 ppm ins Verhältnis gesetzt, kann lediglich eine 86%ige Umsetzung zur Amidbindung gezeigt werden. Diese wird anhand der  $^1\text{H}$ -NMR Spektren in Abbildung 34 und Abbildung 35 links deutlich.



**Abbildung 34:**  $^1\text{H}$ -NMR Spektren von P(HPMA) Kontrolle (rot) und P(HPMA)1 (grün) mit den angegebenen Integrationsverhältnissen.

Dieser Verlust der Signalintensität kann jedoch auch aufgrund verschiedener Taktizitäten von Methacrylamid (H-Brücken) und Methacrylestern auftreten. Diese unterschiedlichen Taktizitäten führen zu einer Signalaufspaltung im  $^1\text{H}$ -NMR und vermutlich zu einer Signalüberlagerung. Um genauere Informationen über die Polymerstrukturen zu erhalten, wurden deswegen zusätzlich *inverse gated*  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren aufgenommen. Diese spezielle Methode ermöglicht eine quantitative  $^1\text{H}$ -entkoppelte  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie. Zusätzlich ist die polymerassoziierte Signalverbreiterung im  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum deutlich reduziert und ermöglicht somit eine genauere Integration und Vergleichbarkeit der Signalintensitäten.

Die unterschiedlichen Polymertaktizitäten sind in den ig  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren in Abbildung 35 rechts und deutlicher oben in der Vergrößerung zu erkennen.

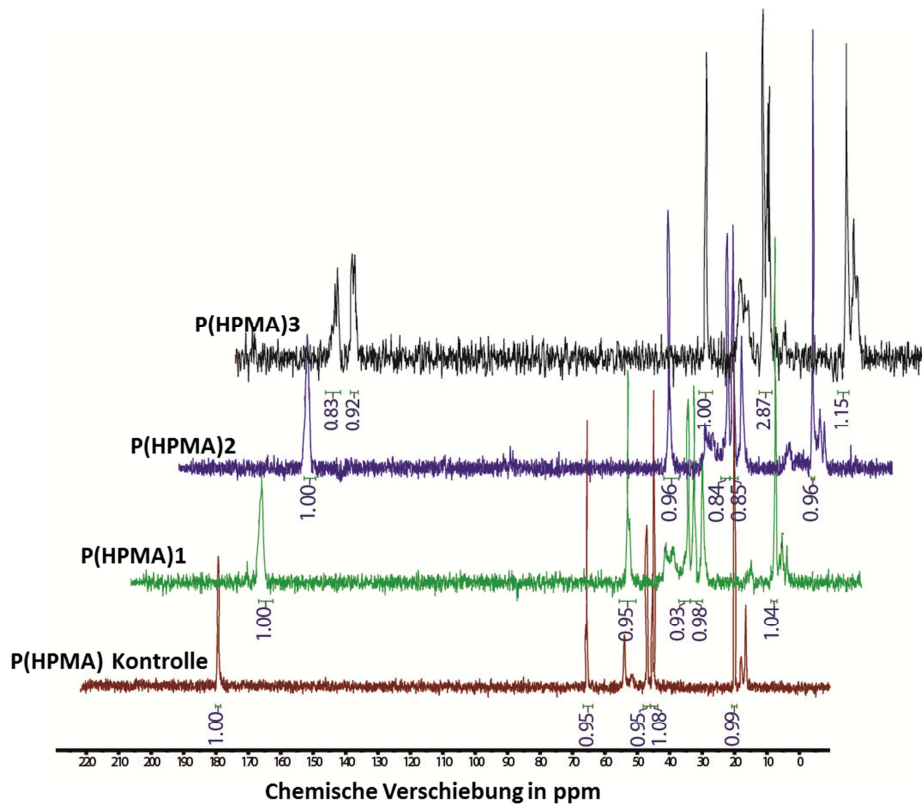


**Abbildung 35:**  $^1\text{H}$ -NMR (links) und  $^{13}\text{C}$ -NMR (rechts) von den Polymeren P(HPMA) Kontrolle (rot), P(HPMA)1 (grün), P(HPMA)2 (blau) und P(HPMA)3 (schwarz). Polymertaktizitäten von P(HPMA) Kontrolle und P(HPMA)1 in der Vergrößerung.

Das auf direktem Wege polymerisierte HPMA (**P(HPMA) Kontrolle**) zeigt einen höheren Anteil an syndiotaktischen Triaden (rr, 70%,  $\delta/\text{ppm}$ : 16,55 ppm ( $\alpha\text{-CH}_3$ )) und einen geringeren Anteil an heterotaktischen Triaden (mr, 30%,  $\delta/\text{ppm}$ : 17,92 ppm ( $\alpha\text{-CH}_3$ )). Isotaktische Triaden können durch eine mögliche Überlagerung der  $\text{CH}_3$ -Gruppe der HPMA Seitenkette bei 20,14 ppm dabei nicht detektiert werden. Diese Resultate

werden auch durch die Aufspaltung der quartären Kohlenstoffatome des Polymerrückgrats bestätigt.<sup>[150]</sup> Im Gegensatz dazu findet man bei **P(HPMA)1**, welches über den Reaktivesteransatz synthetisiert wurde, einen höheren Anteil an heterotaktischen Triaden (mr, 63%,  $\delta/\text{ppm}$ : 18,14 ppm ( $\alpha\text{-CH}_3$ )) und einen signifikant geringeren Anteil an syndiotaktischen Triaden (rr, 37%,  $\delta/\text{ppm}$ : 16,46 ppm ( $\alpha\text{-CH}_3$ )). Die gleichen Anteile von Triaden werden erhalten, setzt man die quartären C-Atome im Polymerrückgrat wieder miteinander ins Verhältnis. Wie Lutz *et al.*<sup>[146]</sup> bereits zeigten, haben diese unterschiedlichen Taktizitäten auch einen Einfluss auf die  $\text{CH}_2$ -Gruppe in der HPMA-Seitenkette, was letztendlich zu verbreiterten Signalen im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum führt. Durch diese Überlagerung der  $\text{CH}_2$ -Gruppe mit dem tertiären Kohlenstoffatom der HPMA-Seitenkette ist eine genaue Integration der beiden Signale mit der  $^1\text{H}$ -NMR Spektroskopie nicht möglich. Im Gegensatz dazu ermöglicht es die *ig*  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie die Signale zu quantifizieren und zeigt die genauen Verhältnisse der Signale der  $\text{-CH}$ -Gruppe ( $\delta/\text{ppm}$ : 65,56 ppm) in der HPMA-Seitenkette und der Amid-Gruppe ( $\delta/\text{ppm}$ : 178,96 ppm) zueinander an. Diese Signale wurden gewählt, da sie nicht überlagert werden, sondern diskret auftreten und somit genau integriert werden können. Die Integrationsverhältnisse dieser Gruppen zueinander sind 0,95 für **P(HPMA) Kontrolle**, 0,95 für **P(HPMA)1** und 0,96 für **P(HPMA)2** (Abbildung 36). Somit konnte gezeigt werden, dass, unter Berücksichtigung des Messfehlers, alle Reaktivesterguppen erfolgreich in das entsprechende Amid umgewandelt werden konnten. Zusätzlich zeigen die *ig*  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren einen deutlichen Unterschied zwischen den verschiedenen Polymeren **P(HPMA)1**, **P(HPMA)2** und **P(HPMA)3**. So sind die Signale der Carboxyl-Kohlenstoffatome des teilweise hydrolysierten **P(HPMA)3** bei einer chemischen Verschiebung von 185,80 ppm deutlich erkennbar. Dagegen weisen die Spektren von **P(HPMA)1**, **P(HPMA)2** und **P(HPMA) Kontrolle** nur Taktizitätsunterschiede auf. Mit diesen verwendeten NMR-Methoden konnte also gezeigt werden, dass alle Pentafluorophenylester in der polymeranaolgen Reaktion mit 2-HPA umgesetzt wurden und dass zwar jedes charakteristische Signal im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum auftritt, jedoch durch Taktizitätsunterschiede und Signalverbreiterung ein anderes Signalmuster entsteht und damit eine genaue Integration nicht möglich ist. Die quantitative Umsetzung von **P(HPMA)1** und **P(HPMA)2** konnte mit Hilfe der *ig*  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie nachgewiesen werden, die für die Signale der Amid-Kohlenstoffatome und der Signale der  $\text{CH}$ -Gruppe der HPMA-Seitenkette ein Verhältnis von ungefähr 1 zeigt (siehe

Abbildung 36). Zusätzlich konnte diese NMR-Methode die Anwesenheit von Carboxylgruppen in P(HPMA)3 nachweisen.



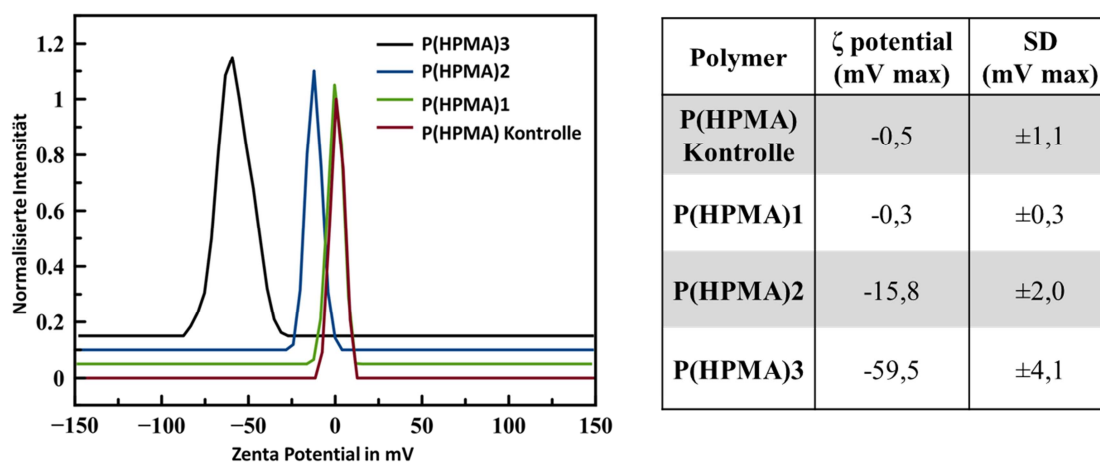
**Abbildung 36:**  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren mit den dazugehörigen Integralen für P(HPMA) Kontrolle (rot), P(HPMA)1 (grün), P(HPMA)2 (blau) und P(HPMA)3 (schwarz).

Trotzdem sind kleine Unterschiede in der Zusammensetzung, wie sie zwischen **P(HPMA)1** und **P(HPMA)2** auftreten, mit dieser Methode nicht detektierbar. Aus diesem Grund wurden das Zeta Potential ( $\zeta$ ) für alle Polymere bestimmt (Abbildung 37).

Das Zeta-Potential beschreibt dabei das elektrische Potential der Abscherschicht eines sich bewegenden Partikels in einer Suspension. Werden geladene Partikel suspendiert, so gleichen sich die Ladungen durch die Anlagerung von Ionen des Suspensionsmediums wieder aus. An der Partikeloberfläche werden dabei in der sogenannten Helmholtz-Doppelschicht die Ionen fest angelagert. Alle weiteren Ionen lagern sich locker in einer diffusen Schicht an, bis der Partikel neutral erscheint. Bewegt sich der Partikel nun durch das Suspensionsmedium wird ein Teil dieser lockeren Ionenschicht abgelöst und der Partikel besitzt wieder ein Potential, das sogenannte Zeta-Potential. Wird immer das gleiche Messmedium verwendet, kann es als relative Messgröße für das Oberflächenpotential bzw. für die Ladung eines Partikels dienen. Durch das Anlegen

eines elektrischen Feldes kann nun die Geschwindigkeit gemessen werden, mit der sich ein geladener Partikel durch das Suspensionsmedium bewegt. Diese gemessene Geschwindigkeit ist ein Maß für das Zeta-Potential.

Die Hydrolyse von Reaktivestern in Anwesenheit von Wasser führt zur Ausbildung von Methacrylsäure-Gruppen am Polymerrückgrat. Diese haben einen Einfluss auf die polymerassoziierte Ladung in Gegenwart eines angelegten äußeren Feldes. Für die Zeta-Potential Messungen wurde **P(HPMA) Kontrolle** als interner Standard verwendet, da auch schon kleine Mengen an komplexierten Ionen im Polyacrylamid zu einem leicht positiven oder negativen Potential führen können und schwer zu interpretieren sind. Außerdem sind keine Carboxylat-Gruppen im **P(HPMA) Kontrolle** Polymerrückgrat vorhanden, da dieses aus reinem HPMA Monomer hergestellt und unter analogen Bedingungen wie das Reaktivester Monomer polymerisiert wurde. Somit können die Zeta-Potentiale der verschiedenen Polymere direkt miteinander verglichen werden und sind ein Indikator für eventuell vorhandene Carboxylat-Gruppen im Polymer. Die graphische Darstellung der Zeta-Potentiale, sowie die erhaltenen Werte für die Polymer **P(HPMA)1-3** und **P(HPMA) Kontrolle** sind in Abbildung 37 gezeigt.

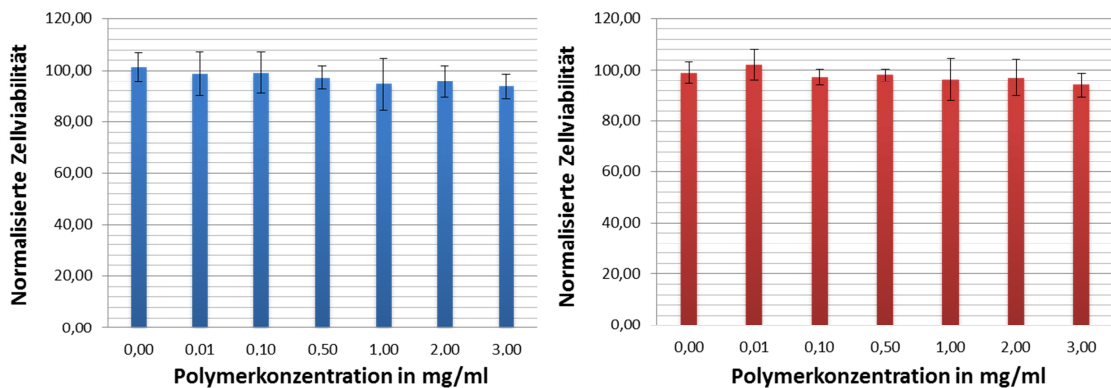


**Abbildung 37:** Zeta Potential Messungen von den Polymeren P(HPMA) Kontrolle (rot), P(HPMA)1 (grün), P(HPMA)2 (blau) und P(HPMA)3 (schwarz). Die graphische Darstellung (links) zeigt jeweils den Mittelwert von fünf Einzelmessungen bei einer Konzentration von 3 mg/ml in dest. Wasser. Die Tabelle (rechts) zeigt die gemessenen Zeta Potentiale für P(HPMA) Kontrolle und P(HPMA)1-3 mit dem dazugehörigen Fehler der Standardabweichung.

Für das partiell hydrolysierte **P(HPMA)3** wurde dabei ein stark negatives Zeta-Potential von  $-59,5 \pm 4,1$  erhalten. Ein nur leicht negatives Zeta-Potential von  $-15,8 \pm 2,0$  zeigte das Polymer **P(HPMA)2**, welches in Anwesenheit von 3 vol% Wasser im Lösemittel synthetisiert wurde. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Zeta-Potentiale von **P(HPMA)1** mit  $-0,3 \pm 0,3$  und **P(HPMA) Kontrolle** mit  $-0,5 \pm 1,1$  kaum voneinander und

zeigen nahezu neutrale Werte. Da **P(HPMA) Kontrolle** bewiesener Maßen keine Carboxylat-Gruppen entlang des Polymerrückgrats aufweist, kann aus den erhaltenen Zeta-Potentialwerten geschlossen werden, dass auch **P(HPMA)1** keine Carbonsäureeinheiten trägt. Somit sollten das Verhalten von **P(HPMA) Kontrolle** und **P(HPMA)1** in biologischen Systemen vergleichbar sein.

Dazu wurde zunächst die Zytotoxizität von beiden Polymeren mittels MTT Assay anhand von HeLa (*engl. human cervix adenocarcinoma*) und HUVEC (*engl. human umbilical vein endothelia*) Zellen überprüft (durchgeführt von Gibson *et al.*<sup>[121]</sup>). Gibson *et al.*<sup>[121]</sup> konnten bereits zeigen dass die Zellviabilität von EaHy 926 humaner Endothelzellen bei der Verwendung von konventionellen P(HPMA) vergleichbar ist zu P(HPMA) Polymeren die über den Reaktivansatz hergestellt wurden. In den Zytotoxizitätsexperimenten von HeLa und HUVEC Zellen konnte demnach wie erwartet keine polymerassoziierte Abnahme der Zellviabilität bis zu einer Konzentration von 3 mg/ml nach 72 Stunden Inkubation beobachtet werden (Zellviabilität von über 90%, siehe Abbildung 38).



**Abbildung 38:** Konzentrationsabhängige normalisierte Zellviabilität von P(HPMA)1 in HeLa Zellen (links) und in HUVEC Zellen (rechts) mit n=5.

Demnach hat die Syntheseroute keinen Einfluss auf die Zellviabilität, was die Beobachtungen von Gibson *et al.*<sup>[121]</sup> nochmals bestätigen.

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass der Reaktivesteransatz über Pentafluorophenylmethacrylat eine geeignete Methode darstellt, um funktionalisierte Polymere mit gleichem Polymerisationsgrad zu synthetisieren. Unter den genannten polymeranalogen Reaktionsbedingungen, wie der Verwendung absolutierter Lösemittel und Stickstoffatmosphäre bei 60 °C oder darunter, konnte keine Hydrolyse in <sup>1</sup>H, ig <sup>13</sup>C,

$^{19}\text{F}$ -NMR Spektroskopie oder bei Zeta-Potential Messungen detektiert werden. Dabei können bereits geringe Spuren von Wasser (3 vol%), kaum detektierbar mittels NMR Methoden, schon zu einem deutlich negativen Zeta-Potential führen, was die Bildung von Carboxylat-Gruppen während der polymeranalogen Reaktion und somit eine partielle Hydrolyse der Reaktivestergruppen beweist. Durch die Anwendung der beschriebenen Reaktionsbedingungen für **P(HPMA)1** kann der Reaktivesteransatz eingesetzt werden, um den Einfluss von Seitenkettenmodifikationen ohne Änderung des Polymerisationsgrades zu untersuchen.



---

### 3.4 Säurelabiler PEG-Linker

Wie in Kapitel 1.1 und 1.3.1 kurz erwähnt wurde, sind neben den bereits viel erforschten und sehr vielversprechenden HPMA basierten Trägermaterialien für den Wirkstofftransport, PEGylierte Systeme immer noch vorherrschend in diesem Bereich. HPMA Polymere können aufgrund ihres strukturellen Aufbaus Wasserstoffbrückenbindungen zu verschiedenen Bestandteilen des Blutes *in vivo* ausbilden (H-Brückendonator und Akzeptor). Diese Eigenschaft ist bei PEG-Systemen weniger ausgeprägt (nur H-Brückenakzeptor). Dadurch hat es eine sehr geringe Immunogenität und ist nicht-toxisch. Zusätzlich ist es sehr gut wasserlöslich.<sup>[151]</sup> Durch die Integration von verschiedenen Anteilen an PEG<sub>2kDa</sub>-Seitenketten in HPMA-LMA Blockcopolymere könnten also die Eigenschaften der HPMA Polymere noch weiter verbessert werden. So konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass mit steigendem PEG-Anteil im HPMA-Block die sich bildenden Aggregate kleiner werden und die Verweildauer im Blutkreislauf steigt.<sup>[152]</sup>

Die Vorteile der PEG-Ketten nutzten auch Yang *et al.* aus, um Amphiphile bestehend aus einer hydrophilen PEG-2000-Kette und einer aliphatischen Kette, die über eine benzyliche Imingruppe miteinander verknüpft sind, zu synthetisieren. Solch ein Amphiphil ist in der Lage, im wässrigen Milieu unter Mizellenbildung Wirkstoffe einzuschließen.<sup>[153]</sup> Iminbindungen sind dabei bereits unter schwach sauren Bedingungen hydrolysierbar und meist unter physiologischen Bedingungen instabil.<sup>[154]</sup> Befindet sich die Iminbindung in Konjugation zu Doppelbindungen, kann die Stabilität erhöht werden und die Spaltung tritt erst vermehrt bei einem niedrigerem pH-Wert auf. Auf Grundlage dessen ist es möglich, die Stabilität der Iminbindung so zu beeinflussen, dass sie unter physiologischen Bedingungen (pH-Wert ca. 7,4) stabil ist und sich im extrazellulären Bereich von nekrotischem Gewebe (pH-Wert ca. 6,8) spaltet. Während der Spaltung liegt eine positiv geladene Ammoniumstruktur auf der Mizellenoberfläche vor, die nun elektrostatisch mit der Membran in Wechselwirkung treten kann und somit für eine bessere Aufnahme in die Tumorzelle sorgt.

Diese Vorteile können für HPMA-basierte Blockcopolymere und statistische Copolymere ausgenutzt werden, indem man säurelabile PEG-Linker in diese Systeme integriert. Zusätzlich zum verbesserten Schutz vor der Anlagerung von Serumproteinen während der Zirkulationszeit im Blut, könnten so Targetstrukturen wie beispielsweise

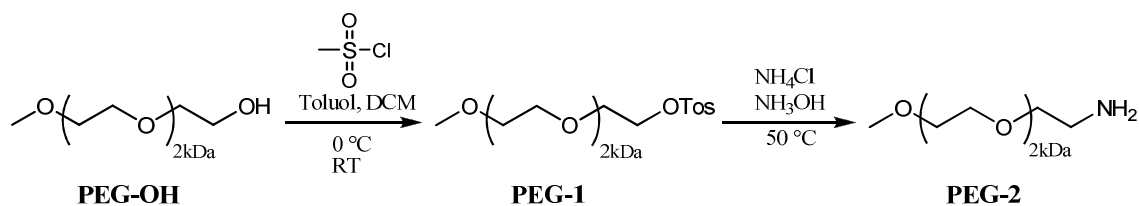
die Mannose abgeschirmt werden und erst im Zielgewebe durch die Abspaltung der PEG-Linker für die Rezeptoren der Zielzellen zugänglich gemacht werden.

In diesem Kapitel wird zunächst die Synthese eines aminfunktionalisierten PEG-Linkers, sowie die Auswirkungen der Integration dieses Linkers in HPMA-LMA Blockcopolymer beschrieben. Da der zu synthetisierende säurelabile Linker auf PEG<sub>2kDa</sub>-Monomethylether basiert, können durch Anbindung von PEG<sub>2kDa</sub>-Amin analog zu Allmeroth *et al.* bereits Schlüsse über das Aggregationsverhalten eines solchen Systems gezogen werden.<sup>[152]</sup>

Anschließend wird dann auf die Synthese eines säurelabilen PEG-Linkers eingegangen, wobei vor allem die pH-abhängige Spaltung der Benzylimino-Gruppe an diesem System näher betrachtet wird. Dabei wird untersucht, ob die Iminbindung des Linkers unter physiologischen Bedingungen stabil ist und bei einem pH-Wert von 6,8 die gewünschte Hydrolyseempfindlichkeit aufweist. Durch die gegebene Möglichkeit eine Aminfunktionalität anzubringen, wäre es dann möglich den Linker polymeranalog unter Verwendung des Reaktivesteransatzes in HPMA-LMA Blockcopolymer oder statistische HPMA-LMA Copolymer Systeme einzufügen.

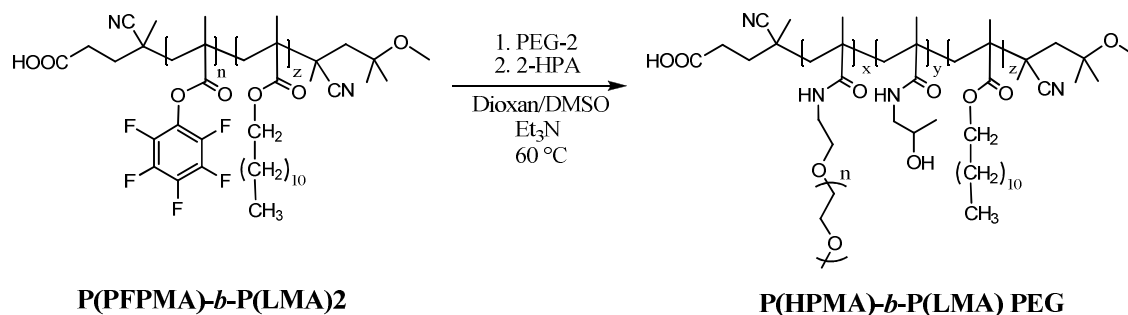
### 3.4.1 Permanente Oberflächenfunktionalisierung mit PEG

Um eine genügend große PEG-Corona zum Schutz vor Serumproteinen zu erhalten wird ein PEG-Linker mit einem Molekulargewicht von 2000 g/mol eingesetzt. Dieser wird für die polymeranaloge Reaktion der PFPMA Polymere in einer 2-stufigen Synthese (Schema 11) mit einer Aminfunktion ausgestattet. Dazu wird PEG<sub>2kDa</sub> Monomethylether (**PEG-OH**) mit Methansulfonylchlorid zu m-PEG<sub>2kDa</sub>-Mesylate (**PEG-1**) umgesetzt. Dieses wird anschließend in einer Ammoniumhydroxid-Lösung mit Ammoniumchlorid erhitzt und man erhält den gewünschten aminfunktionalisierten PEG-Linker (**PEG-2**).



**Schema 11:** 2-Stufige Synthese des aminfunktionalisierten PEG-Linkers (PEG-2).

Dieser kann nun in der polymeranalogen Reaktion der Reaktivesterpolymere zu HPMA Polymeren, analog zu den in Kapitel 3.3 beschriebenen Reaktionsbedingungen als Funktionalität mit eingesetzt werden (Schema 12). Dazu wird ein Reaktivester-*block*-Laurylmethacrylat Polymer (**P(PFPMA)-*b*-P(LMA)2**, siehe Tabelle 2 in Kapitel 3.1) in einer Mischung aus absolutiertem Dioxan und DMSO gelöst und mit dem aminfunktionalisierten PEG-Linker (**PEG-2**) versetzt, so dass ein PEG-Anteil von ungefähr 11% pro Polymerkette eingebaut wird. Am nächsten Tag werden die restlichen Reaktivestergruppen mit 2-HPA umgesetzt und das Polymer durch Dialyse gegen Wasser aufgereinigt und gefriergetrocknet. Zusätzlich wird zum Vergleich eine negativ Kontrolle ohne Zugabe von PEG synthetisiert, wodurch sich auch der Anteil des eingebauten PEG-Linkers abschätzen lässt.



**Schema 12:** Synthese von P(HPMA)-*b*-P(LMA) PEG über den PFPMA-Reaktivesteransatz.

Die ermittelten Molekulargewichte sowie die dazugehörigen Dispersitäten der beiden Polymere **P(HPMA)-*b*-LMA PEG** und **P(HPMA)-*b*-LMA 1** (negativ Kontrolle ohne PEG) sind in Tabelle 10 aufgelistet. Durch die unterschiedlichen Molekulargewichte der beiden Polymere kann der Anteil des angebondenen PEGs abgeschätzt werden. Wenn man die bei P(HPMA)-*b*-P(LMA) 1 zusätzlich angebondenen 2-HPA Einheiten vernachlässigt, kommt man auf eine Anbindung von ungefähr 10% PEG-Ketten pro Polymerkette.

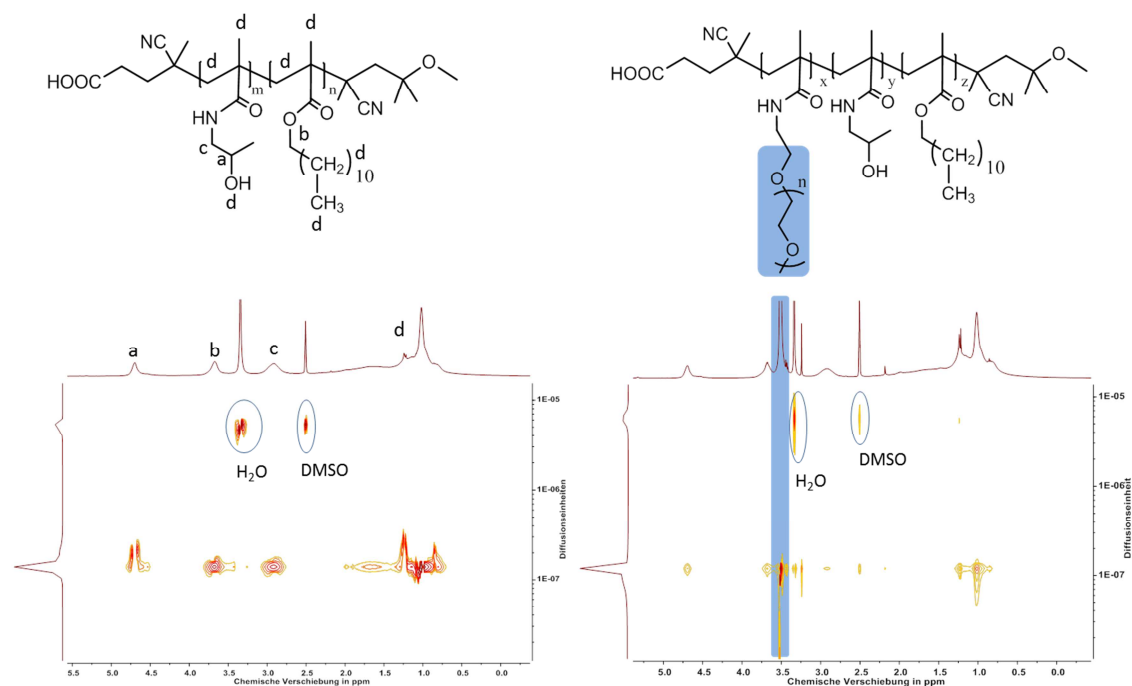
$$\text{Anzahl(PEG)} = \frac{(46.000 - 26.000) \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{2000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 10,0$$

Dabei muss man jedoch beachten, dass durch die Gel Permeations Chromatographie nur der hydrodynamische Radius gemessen wird und diese Zahl nur ein grober Richtwert darstellt.

**Tabelle 10:** Molekulargewichte, Anteil von PEG sowie die Dispersitäten von P(HPMA)-*b*-LMA PEG und der negative Kontrolle P(HPMA)-*b*-LMA 1. <sup>a)</sup> mittels HFIP-GPC.

Polymer	$M_n$ in g/mol <sup>a</sup>	Anteil PEG <sup>a</sup>	$\mathcal{D}^a$
P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA) PEG	46.000	10%	1,3
P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA) 1	26.000	-	1,3

Zur weiteren Charakterisierung wurde von beiden Polymeren jeweils ein <sup>1</sup>H-NMR und ein DOSY (engl. *diffusion-ordered-spectroscopy*), einer Art von Feldgradienten-NMR, aufgenommen. Die DOSY Spektren mit den integrierten <sup>1</sup>H-NMR Spektren sind in Abbildung 39 gezeigt. Betrachtet man die <sup>1</sup>H-Spektren im DOSY genauer, so kann man die Peaks den einzelnen Protonen zuordnen.



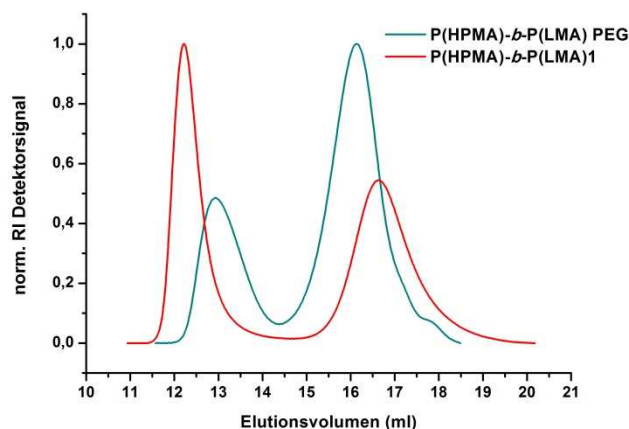
**Abbildung 39:** DOSY Spektren der negative Kontrolle P(HPMA)-*b*-LMA 1 (links) und von P(HPMA)-*b*-LMA PEG (rechts) in DMSO-*d*<sub>6</sub>.

Das Signal bei 4,69 ppm entspricht dabei dem Proton des Kohlenstoffs, der an die Hydroxylgruppe des HPMA's gebunden ist. Das Signal bei 3,68 ppm entspricht der CH<sub>2</sub>-Gruppe des Laurylmethacrylats in Nachbarschaft zur Estergruppe und bei 2,90 ppm treten die Protonen der Methylengruppe in Nachbarschaft des Stickstoffs auf. Im Bereich von 2 – 0.5 ppm erkennt man die Protonen des Polymerrückgrats, sowie die Methylgruppen des HPMA's und des LMA's. Vergleicht man die Spektren der negativ

Kontrolle **P(HPMA)-*b*-LMA 1** mit **P(HPMA)-*b*-LMA PEG** untereinander, so ist zu sehen, dass sie sich lediglich durch das intensive Signal bei 3,5 ppm unterscheiden, welches nur bei **P(HPMA)-*b*-LMA PEG** auftritt und den Protonen der PEG-Einheiten, die an das Polymer gebunden wurden, zugeordnet werden kann. Aufgrund der starken hygroskopischen Eigenschaften von DMSO ist bei beiden Polymeren jeweils ein intensives H<sub>2</sub>O-Signal zu sehen, welches sich mit den Hydroxylgruppen des HPMA überlagert.

Mit Hilfe des DOSYs ist es nun zusätzlich möglich, die Signale einzelner Stoffe in einem Gemisch, abhängig von ihrem Diffusionskoeffizienten und somit von ihrem hydrodynamischen Radius getrennt voneinander darzustellen. Aufgrund des höheren hydrodynamischen Radius treten die Signale des Polymeren bei einer deutlich geringeren Größenordnung der Diffusionseinheiten auf. Bis auf die beiden Lösungsmittelpeaks (DMSO und H<sub>2</sub>O) liegen alle zuvor zugeordneten Signale auf einer Ebene (Abbildung 39). Daraus kann man schließen, dass die Polymere frei von Verunreinigungen sind und der PEG-Linker durch das auf gleicher Ebene liegende Signal bei 3,5 ppm (Abbildung 39 rechts) erfolgreich in das Polymer eingebaut werden konnte.

Bei der Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung mittels HFIP-GPC, kam es nicht zu einer mono- sondern bimodalen Verteilung für beide Polymere, die in Abbildung 40 gezeigt ist.



**Abbildung 40:** Gel Permeations Chromatographie in HFIP für die Polymere P(HPMA)-*b*-LMA PEG (blau) und P(HPMA)-*b*-LMA 1 (rot).

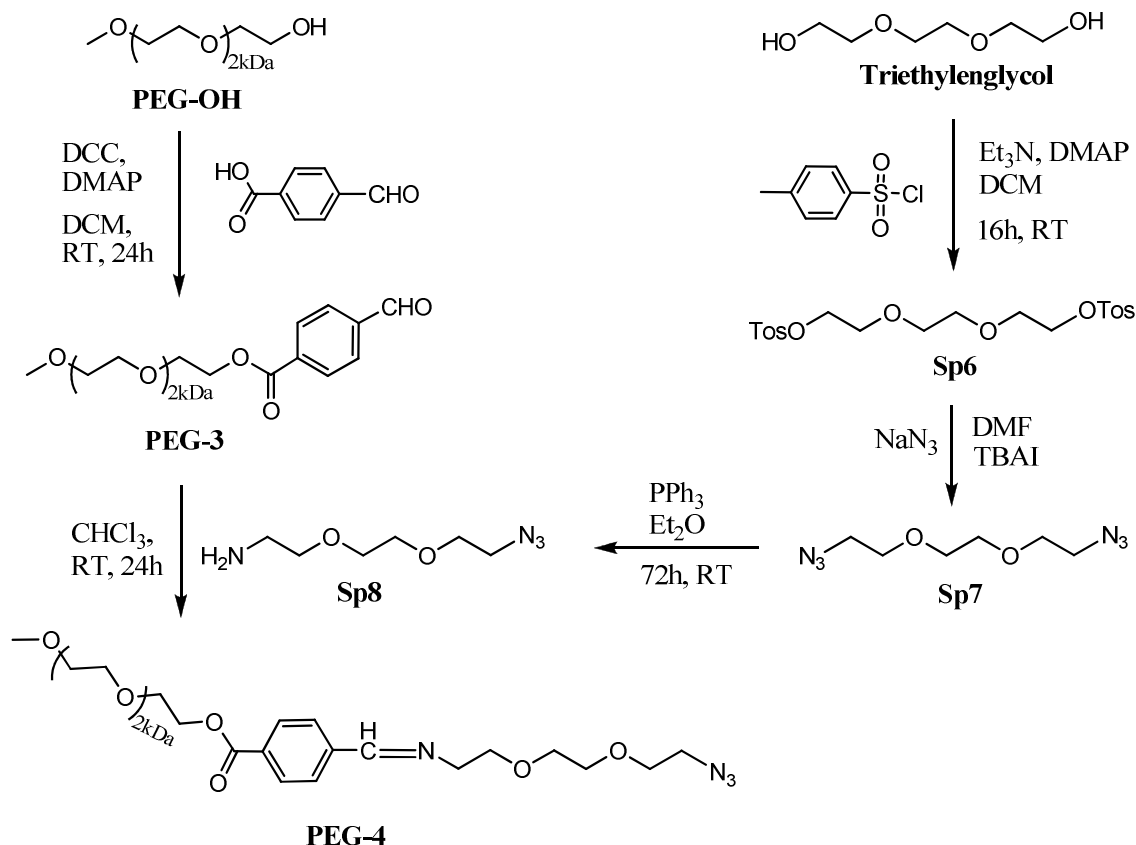
Die Signale bei geringem Molekulargewicht entsprechen jeweils den Unimeren und sind in Tabelle 10 mit aufgeführt. Das PEGylierte Polymer hat dabei durch die zusätzlich integrierten langen PEG-Ketten einen größeren hydrodynamischen Radius

und ein umgerechnet höheres Molekulargewicht ( $M_n=46.000$  g/mol) als die negativ Kontrolle ohne PEG-Ketten ( $M_n=26.000$  g/mol). Wegen des amphiphilen Charakters beider Polymere kommt es jedoch in HFIP als polarem Lösungsmittel zur Ausbildung von Überstrukturen durch Aggregation. **P(HPMA)-*b*-LMA PEG** (Abbildung 40 blaue Kurve) bildet hierbei deutlich kleinere Aggregate ( $M_n=512.000$  g/mol) als **P(HPMA)-*b*-LMA 1** ( $M_n=1.023.000$  g/mol). Die Integration von PEG-Seitenketten in HPMA-LMA Blockcopolymeren führt also zu kleineren Aggregaten was die Arbeiten von Allmeroth *et al.* bestätigen.<sup>[152]</sup> Im Folgenden soll nun dieser etablierte PEG-Linker mit einer säurelabilen Gruppe funktionalisiert und die pH-abhängige Spaltung untersucht werden.

### 3.4.2 Synthese des säurelabilen PEG-Linkers

Um die pH-abhängige Spaltung der Benzylimingruppe in einem PEG<sub>2kDa</sub>-System zu untersuchen wird PEG<sub>2kDa</sub> wie in Schema 13 gezeigt funktionalisiert. Dazu wird zunächst PEG<sub>2kDa</sub> Monomethylether (**PEG-OH**) mit *p*-Carboxybenzaldehyd nach Ding *et al.*<sup>[153]</sup> umgesetzt. Mechanistisch betrachtet, handelt es sich bei dieser Reaktion um eine Steglich-Veresterung.<sup>[155]</sup> Mit Hilfe dieser Reaktion, ist es möglich sterisch anspruchsvolle Alkohole unter milden Bedingungen zu verestern. Hierbei reagiert die Carbonsäuregruppe des *p*-Carboxybenzaldehyds mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zunächst zum aktivierten *O*-Acylisoharnstoff. Da jedoch die irreversible Umlagerung zum *N*-acylierten Harnstoff als Nebenreaktion auftritt, ist die Anwesenheit eines starken Nukleophils, wie 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) notwendig, das hinreichend schnell mit *O*-Acylisoharnstoff reagiert und ebenfalls ein hoch reaktives Amid bildet, das letztendlich mit dem Alkohol zum Endprodukt umgesetzt wird. Anschließend wird das so synthetisierte Methoxy-(Polyethylenglykol)-benzaldehyd (**PEG-3**) mit 2-(2-Azidodiethoxy)-ethanamin (**Sp8**) zu 4-(1-Imino-3,6-dioxaoctyl-azid)-(methoxy-(poly(ethylenglykol))-benzoesäureester (**PEG-4**) umgesetzt.

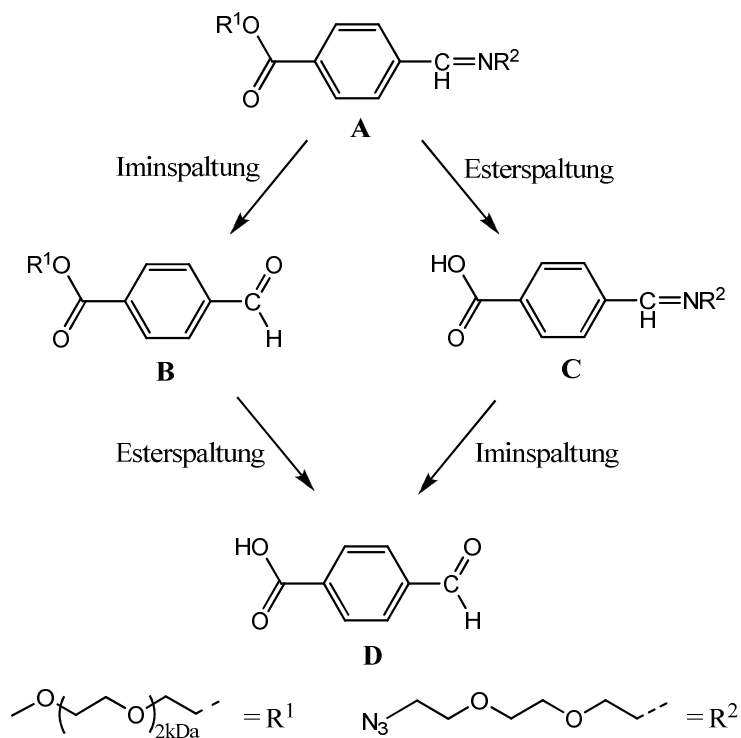
Der zu dieser Reaktion benötigte Spacer (**Sp8**) wird in drei Stufen nach bekannter Literatur<sup>[156][157]</sup> synthetisiert, in dem zunächst Triethylenglykol mit Tosylchlorid versetzt wird. Das erhaltene 1,2-Bis(2-tosylethoxy)ethan (**Sp6**) wird dann durch Erhitzen mit Natriumazid und Tetrabutylammoniumiodid über das Diazid (**Sp7**) mit anschließender Reduktion unter Verwendung von Triphenylphosphin zu 2-(2-Azidodiethoxy)-ethanamin (**Sp8**) umgesetzt (Schema 13).



**Schema 13:** Syntheschema des säurelabilen PEG-Linkers (PEG-4).

Das erhaltene Produkt (**PEG-4**) wird säulenchromatographisch aufgereinigt. Alle Zwischenstufen konnten mittels  $^1H$ -NMR-Spektroskopie charakterisiert werden.

Dabei erhält man durch die empfindliche Benzylimingruppe während der Aufreinigung des Produktes (**PEG-4**) verschiedene Spaltungsprodukte, die je nach Art der Aufreinigung zwar verringert, jedoch nicht gänzlich verhindert werden können. Die unterschiedlichen Spaltungsprodukte im Überblick sind in Schema 14 gezeigt. Führt man die Kopplung von **Sp8** mit **PEG-3** in absolutiertem Chloroform durch, erhält man ohne weitere Aufreinigung das gewünschte Produkt (**PEG-4**) mit einer Reinheit von 83% (berechnet mit  $^1H$ -NMR). Als mögliche Nebenprodukte entstehen die Spaltprodukte B, C und D aus Schema 14. Sowohl die Iminbindung als auch die Esterbindung werden dabei durch Aufreinigung mittels Dialyse gegen deionisiertes Wasser sehr stark gespalten. Um die Spaltprodukte möglichst gering zu halten, wird das Produkt (**PEG-4**) in kaltem Diethylether gefällt und man erhält einen farblosen Feststoff. Dieser wurde für die weiteren pH-Wertstudien verwendet.

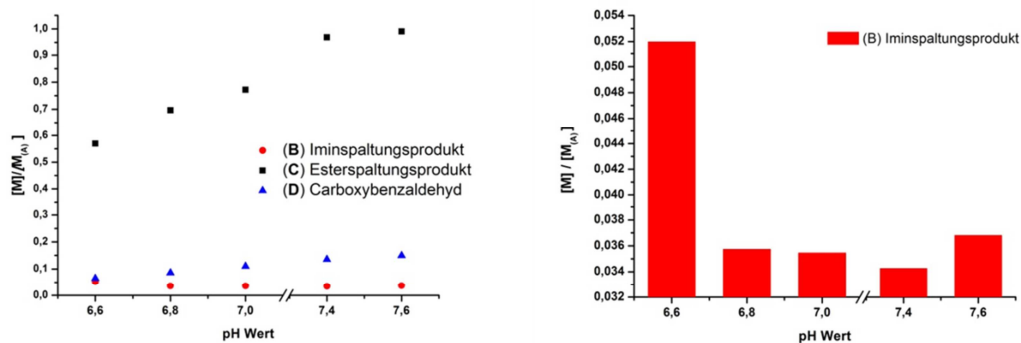


**Schema 14:** Die verschiedenen Spaltungsprozesse bei der Aufarbeitung.

### 3.4.3 pH-Studie des säurelabilen PEG-Linkers

Um die pH-abhängige Spaltung der Benzyliminbindung zu untersuchen, wurde zunächst der säurelabile PEG-Linker (**PEG-4** Schema 13, Verbindung **A** Schema 14) in PBS-Pufferlösungen mit zuvor unterschiedlich eingestellten pH-Werten gelöst, nach 48 h das Wasser durch Gefriertrocknung entfernt und mit Hilfe von  $^1H$ -NMR-Spektroskopie in  $DMSO-d_6$  charakterisiert. Um eine Vergleichbarkeit der Spektren zu erzielen, wurden die Integrale der Spaltungsprodukte (**B**, **C** und **D** Schema 14) zu dem Iminintegral des PEG-Linkers (**A** Schema 14) ins Verhältnis gesetzt. So kann gezeigt werden, in welchem Verhältnis die Spaltprodukte zur noch vorhandenen Linkerkonzentration stehen. In Abbildung 41 links sind die Verhältnisse der Spaltprodukte (**B**, **C** und **D**) in Relation zum PEG-Linker (**A**) bei den verschiedenen pH-Werten aufgetragen und in Abbildung 41 rechts ist noch einmal genauer die Spaltung der Iminbindung gezeigt.





**Abbildung 41:** Links: Anteil der Spaltungsprodukte B, C und D in Relation zum PEG-Linker (PEG-4) in Abhängigkeit des pH Wertes. Rechts: Anteil des Iminspaltungsproduktes in Relation zum PEG-Linker (PEG-4) in Abhängigkeit zum pH Wert.

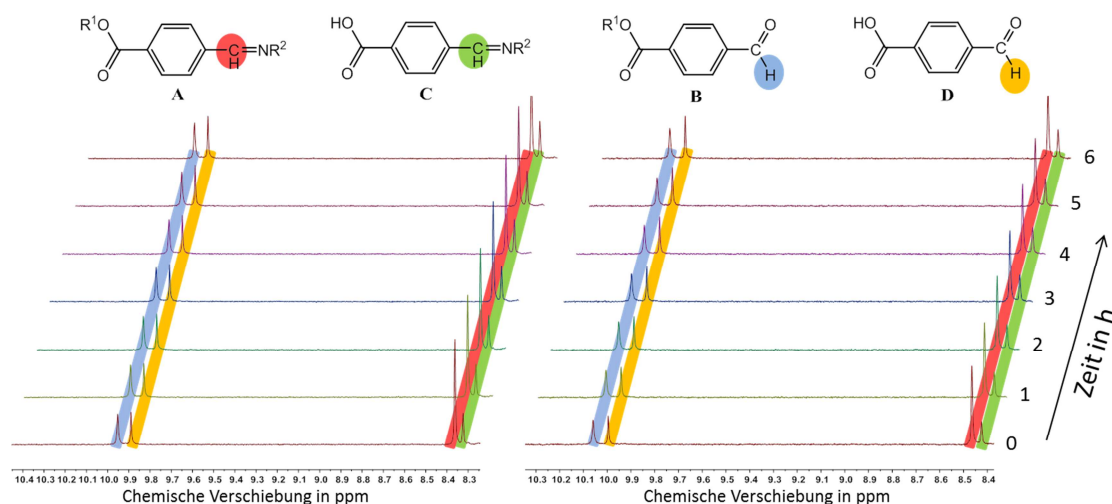
Es ist zu sehen, dass es bei einem pH-Wert von 7,6 und 7,4 vermehrt zur Esterspaltung kommt. Der PEG-Linker (A) und das entsprechende Esterspaltungsprodukt (C) liegen hier im Verhältnis von ungefähr 1:1 vor. Dies bedeutet, dass nach 48 h etwa 50% der Esterbindungen des PEG-Linkers (A) gespalten wurden. Mit fallendem pH-Wert geht diese Art der Spaltung zwar zurück, jedoch liegt sie bei einem pH von 6,8 immer noch bei ungefähr 40%. Die Iminspaltung des PEG-Linkers (A) tritt bei hohem pH-Wert dagegen kaum auf. Betrachtet man sich die Iminspaltung näher (Abbildung 41 rechts) sieht man eine Zunahme von ungefähr 70% des Iminspaltungsproduktes (B) bei einem pH-Wert von 6,6. Man sieht also eine Spaltung der Iminbindung bei saurem pH-Wert. Diese Messungen sind jedoch stark fehlerbehaftet, da durch die Verwendung von PBS-Puffer die Spaltungsprodukte auch als Salze vorliegen und in DMSO-d<sub>6</sub> teilweise ausfallen. Insgesamt kann man aus diesen Ergebnissen also nur sehen, dass zum einen die Esterbindung schon stark hydrolysiert und zum anderen, die Iminbindung bei saurem pH-Wert gespalten wird. Um die Spaltung der Iminbindung bei den interessierenden pH-Werten von 7,4 und 6,8 nun genauer untersuchen zu können, wurden Echtzeit <sup>1</sup>H-NMR Kinetik Messungen in deuteriertem Wasser bei diesen pH-Werten über einen Zeitraum von 6 h durchgeführt.

Dabei wurde der pH-Wert mit Hilfe einer handelsüblichen pH-Glaselektrode bestimmt, die mit wässrigen Pufferlösungen kalibriert wurde. Da bei der Echtzeit <sup>1</sup>H-NMR Kinetik Messung deuteriertes Wasser verwendet wird, wird wegen der deutlich höheren Masse und der einhergehenden höheren Bindungsaffinität der Deuteronen der pH-Wert der virtuelle pH\* gemessen. Überträgt man dabei das Verhalten in Deuteriumoxid auf das Verhalten in wässriger Lösung, wird vereinfachend angenommen, dass der gemessene

virtuelle pH-Wert ( $\text{pH}^*$ ) dem pH-Wert in einer wässrigen Lösung entspricht („cancel out approach“), da aufgrund der höheren Bindungsaffinität der Deuteronen Stoffe in deuteriertem Wasser eine größere Säurekonstante ( $\text{pK}_s$ ) als in wässriger Lösung aufweisen. <sup>[158]</sup>

Die Messungen wurden bei  $\text{pH}^* = 7,41$  durchgeführt, da die Stabilität des Linkers unter physiologischen Bedingungen untersucht werden sollen, sowie bei einem virtuellen pH von 6,80, der in etwa dem Wert des pHs im extrazellulären Bereich einer Tumorzelle entspricht. Dabei wurden für jede Messung zunächst alle 2 min. in einem Zeitraum von 3 h und dann weitere 3 h alle 3 min.  $^1\text{H}$ -NMR Spektren aufgenommen.

In Abbildung 42 sind die Spektren von beiden Messungen im Abstand von 1 h in dem Bereich gezeigt, in dem die Imin- respektive Aldehydsignale der vier Verbindungen (siehe Schema 14), die durch Ester- und Iminspaltung zustande kommen, auftreten.

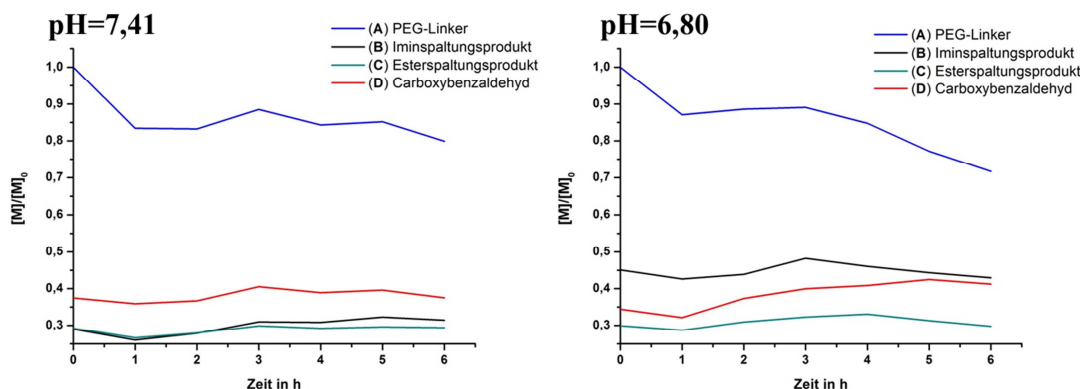


**Abbildung 42:** Pseudo-2D  $^1\text{H}$ -NMR Spektren der pH Studie des säurelabilen Linkers (PEG-4). Links:  $\text{pH} = 7,41$ . Rechts:  $\text{pH} = 6,80$ .

Auf den ersten Blick scheinen die Signale nahezu konstant zu bleiben. Deshalb sollen nun die Integrationsverhältnisse genauer betrachtet werden.

Dabei treten für die quantitative Auswertung einige Schwierigkeiten auf. Neben den Hydrolysereaktionen, die untersucht werden sollen, kommt es in  $\text{D}_2\text{O}$  auch zum Austausch von Protonen mit Deuteronen, die nicht mehr von der Integration erfasst werden. Dies hat zur Folge, dass es zu einer erheblichen Streuung der Messwerte kommt. Dadurch ist eine detaillierte kinetische Auswertung nicht ohne weiteres möglich. Zusätzlich ist jede der auftretenden Verbindungen an zwei Spaltungsprozessen

beteiligt. Aus diesen Gründen wurden in den folgenden graphischen Auswertungen nur die Messwerte nach jeweils 1 h aufgetragen, um den Trend der Bindungsspaltungen zu verdeutlichen. Zur Auftragung wurden alle Integrale der gebildeten Spaltungsprodukte zu der Ausgangsintensität des eigentlichen Linkers (**PEG-4**, Verbindung **A** in Schema 14) ins Verhältnis gesetzt und gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 43).



**Abbildung 43:** Auftragung  $[M]/[M]_0$  gegen die Zeit bei  $\text{pH}^* = 7,41$  (links) und bei  $\text{pH}^* = 6,80$  (rechts).

Durch einen starken Protonenaustausch mit den Deuteronen des Lösemittels zu Beginn der Messung sieht man, dass bei beiden pH-Werten die Intensitäten des Signals des PEG-Linkers (**A**) in der ersten Stunde zunächst abfällt (blaue Kurven in Abbildung 43). Bei der Kinetik Messung bei  $\text{pH}^* = 7,41$  (Abbildung 43 links) sieht man zudem eine gewisse Hydrolyseempfindlichkeit in Wasser, sowohl von der Iminbindung als auch von der Esterbindung. Jedoch bleiben die Konzentrationen der Spaltungsprodukte dann über einen Zeitraum von 6 h innerhalb der Fehlergrenze der NMR Messmethode konstant (3-5% Messfehler). Somit konnte gezeigt werden, dass der PEG-Linker (**A**) unter physiologischem pH-Wert eine gewisse Stabilität aufweist. Im Gegensatz dazu sieht man bei einem pH-Wert von 6,80 zusätzlich zu dem Protonenaustausch zu Beginn der Messung einen signifikanten Abbau des PEG-Linkers (**A**) (Abbildung 43 rechts blaue Kurve). In Folge dessen nehmen die möglichen Spaltungsprodukte des Linkers zu, wobei die Iminspaltung zu Abbauprodukt (**B**) (schwarze Kurve in Abbildung 43) im Vergleich zu der Messung bei physiologischem pH-Wert von 7,41 deutlich stärker ist.

Somit konnte also mittels der Echtzeit  $^1\text{H}$ -Kinetik Messung gezeigt werden, dass der PEG-Linker (**A**) bei einem pH-Wert von 6,8 deutlich hydrolyseempfindlicher ist als bei 7,4.

Durch eine anschließende Reduktion der Azid-Endgruppe, beispielsweise durch die Staudinger Reduktion, könnte dieser säurelabile PEG-Linker (**PEG-4**) aminfunktionalisiert werden und somit als weitere Funktionalität in die Polymersysteme mittels polymeranaloger Reaktion eingebaut werden.

---

## 3.5 Funktionalisierung von Polymeren

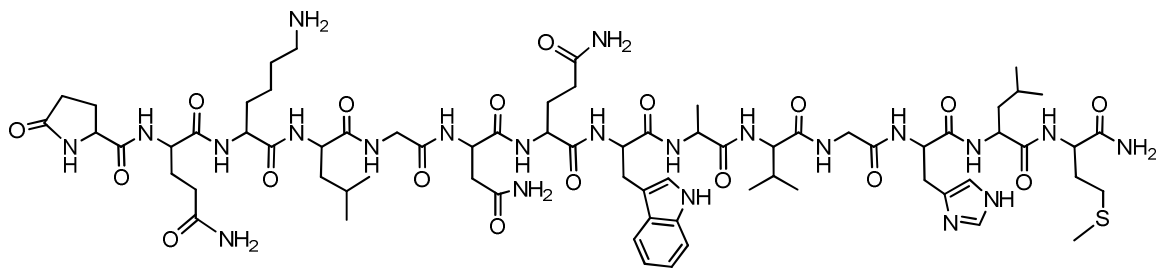
In den vorangegangenen Kapiteln 3.1 bis 3.4 wurde ausführlich auf die Synthese der HPMA-basierenden polymeren Trägermaterialien über den Reaktivesteransatz, sowie auf die Möglichkeit der Oberflächenmodifizierung durch PEGylierung für die Ausnutzung des passiven Targetings eingegangen. Dabei wurde der Aufbau der Reaktivesterpolymer ausführlich beschrieben (Kapitel 3.1 und 3.2) und es konnte gezeigt werden, dass die polymeranaloge Umsetzung zu HPMA-basierenden Polymeren unter den verwendeten Reaktionsbedingungen eine geeignete Methode darstellt, um solche Polymere mit gleichem Polymerisationsgrad ohne Nebenreaktionen zu synthetisieren (Kapitel 3.3). Im Folgenden soll nun auf die Funktionalisierungsmöglichkeiten unter dem Vorteil der Verwendung des Reaktivesteransatzes näher eingegangen werden. So können in einem Syntheseschritt die Reaktivesterpolymere zu HPMA-basierenden Systemen umgewandelt werden und gleichzeitig sowohl mit Markern für die Visualisierung der Polymere *in vitro* und *in vivo*, als auch mit Targetliganden für die Adressierung bestimmter Zellen, ausgestattet werden. Mögliche Liganden können dabei Antikörper, Antikörperfragmente, Peptide oder kleine Moleküle, wie beispielsweise Zuckerstrukturen, darstellen. Diese können dann an bestimmte Oberflächenrezeptoren auf den Zielzellen binden und führen somit zu einer verstärkten Zellaufnahme. Neben den sehr teuren und in der Anbindungschemie sehr anspruchsvollen Antikörpern sind im Gegensatz dazu Peptide und Zuckerstrukturen wesentlich stabiler, einfacher zu synthetisieren und anzubinden. Eine solche Funktionalisierung der HPMA-basierten Polymere mittels Bombesin (Peptid) und Mannose (Zucker), sowie verschiedene Markierungsstrategien für das *in vitro* und *in vivo* tracking wird in den folgenden Abschnitten dieser Arbeit ausführlich beschrieben.

### 3.5.1 Bombesinanbindung

Bei vielen Typen von humanen Krebszellen, wie beispielsweise bei Brust-, Prostata-, Lungen- und Pankreaskrebs, konnte eine deutliche Überexprimierung des Gastrin-Releasing-Peptid (GRP) Rezeptors festgestellt werden. Bombesin ist ein aus 14 Aminosäuren bestehendes Peptid, wobei vor allem die Aminosäuren 7-14 essentiell für die Rezeptorinteraktion sind. Dabei bindet Bombesin, analog zum humanen Gastrin-

Releasing-Peptid (GRP), mit einer sehr hohen Affinität und Spezifität an den GRP-Rezeptor. Dies konnte bereits durch eine Anreicherung von fluoreszenzmarkiertem Bombesin in GRP-Rezeptor tragenden Zellen in bestimmten Tumorarten in Mäusen nachgewiesen werden.

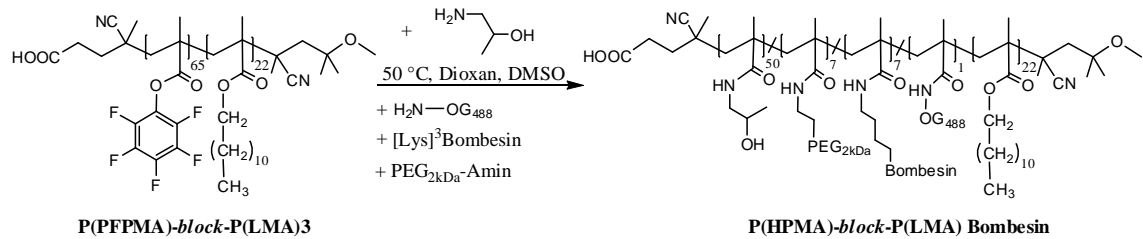
Da die Anbindung über den Reaktivesteransatz eine Aminfunktionalität des Bombesins voraussetzt, wurde Bombesin eingesetzt, welches an der dritten Stelle der Aminosäurekette mit einem Lysin modifiziert wurde ([Lys<sup>3</sup>]-Bombesin, Abbildung 44).



**Abbildung 44:** Strukturformel von [Lys<sup>3</sup>]-Bombesin (pGlu-Gln-Lys-Leu-Gly-Asn-Glu-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>).

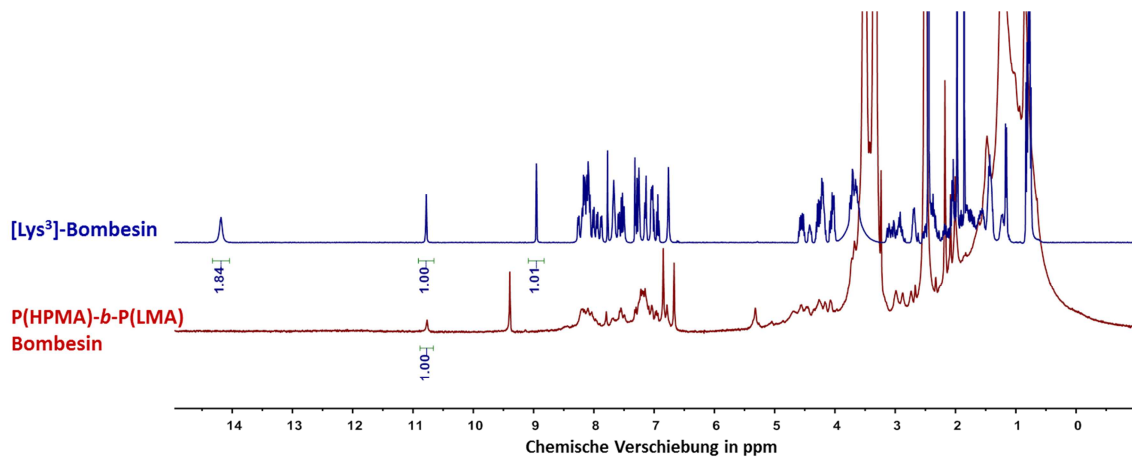
Für die Anbindung des [Lys<sup>3</sup>]-Bombesins wird **P(PFPMA)-block-P(LMA)3** (siehe Kapitel 3.1, Tabelle 2) verwendet und unter den Bedingungen analog zu den beschriebenen Reaktionsbedingungen in Kapitel 3.3 nach Schema 15 umgesetzt. Dazu wird **P(PFPMA)-block-P(LMA)3** in absolutiertem Dioxan und DMSO gelöst und mit Oregon Green Cadaverin 488 (Fluoreszenzfarbstoff) als Marker für mögliche *in vitro* Experimente, sowie mit dem in Kapitel 3.4.1 beschriebenen aminfunktionalisierten PEG Linker zur Erhöhung der Hydrophilie versetzt. Bei der nachfolgenden Zugabe der [Lys<sup>3</sup>]-Bombesin/DMSO-Lösung, sowie der entsprechenden Menge an Hilfsbase fiel ein Feststoff aus, der nur durch aufwändige Anpassung des Lösemittelsystems soweit gelöst werden konnte, dass nur noch eine leichte Trübung vorhanden war. Die Reaktionsmischung wurde dann 24 h bei 50 °C unter Schutzgasatmosphäre gerührt und die restlichen PFPMA Gruppen wurden mit 2-HPA umgesetzt. Das so bombesinfunktionalisierte P(HPMA)-block-P(LMA) wurde zur Aufreinigung mehrere Tage gegen Milli-Q Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Es entstand ein rötlicher Feststoff, der nur schwer löslich in DMSO ist und ein Gel in Wasser bildet. Dies kann durch die eher hydrophoben Aminosäureseitenketten des Bombesins hervorgerufen werden, da dadurch der hydrophobe Anteil im Blockcopolymer größer wird und es somit nicht mehr wasserlöslich ist. Außerdem kann es durch seine Peptidstruktur

Wasserstoffbrückenbindungen mit den HPMA-Seitenketten ausbilden, die dann im Polymer zu Überstrukturen und zu einer gelartigen Struktur in Wasser führen können.



**Schema 15:** Polymeranaloge Umsetzung von P(PFPMA)-block-P(LMA)3 zu P(HPMA)-block-P(LMA) Bombesin.

Betrachtet man nun die  $^1\text{H-NMR}$  Spektren von  $[\text{Lys}^3]$ -Bombesin und P(HPMA)-block-P(LMA) Bombesin in deuteriertem DMSO (Abbildung 45), so kann man jedoch deutlich die erfolgreiche Anbindung anhand der Abwesenheit der Aminbande des Lysins im  $[\text{Lys}^3]$ -Bombesin bei 14,17 ppm erkennen.



**Abbildung 45:**  $^1\text{H-NMR}$  Spektren in  $\text{DMSO-d}_6$ . Blau:  $[\text{Lys}^3]$ -Bombesin. Rot: P(HPMA)-block-P(LMA) Bombesin.

So konnte zwar erfolgreich ein bombesinfunktionalisiertes P(HPMA)-block-P(LMA) Copolymer synthetisiert werden, jedoch ist eine *in vitro* Anwendung durch die Wasserunlöslichkeit so nicht möglich.





---

### 3.6 Mannose als Targetligand: Mögliche Synthesestrategien

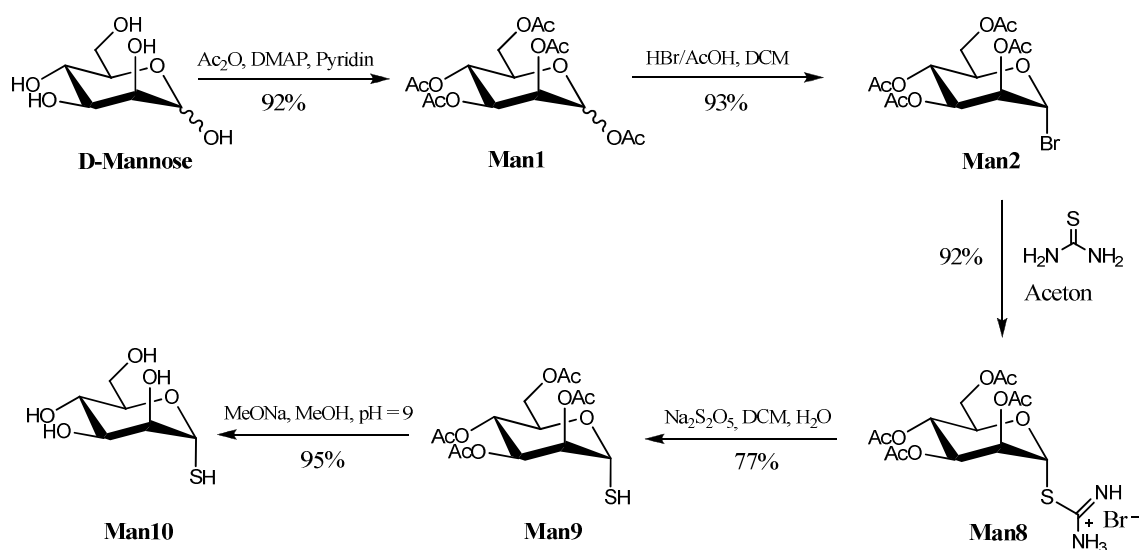
Weitaus wasserlöslichere Targetliganden sind, im Gegensatz zum Bombesin oder anderen Peptiden, Zuckerstrukturen, wie beispielsweise Mannosederivate. Sie gehören zu der Klasse der kleinen Moleküle und können somit auch keine Überstrukturen wie Peptide ausbilden und haben weniger Einfluss auf die Polymerstruktur. Ein weiterer Vorteil von Mannose als Targetligand ist ein sehr vielseitiges Einsatzgebiet als Mannosemimetika in der Nanomedizin. Da Mannose, wie Eingangs ausführlich beschrieben wurde, an verschiedene Rezeptoren von Zellen des Immunsystems bindet, sind Mannosemimetika so nicht nur in der Krebstherapie einsetzbar, sondern finden auch Anwendung in der Behandlung von Entzündungs- und Autoimmunkrankheiten.

Um polymere Trägermaterialien mit Mannose zu funktionalisieren, gibt es verschiedene Strategien. So können beispielsweise alkinfunktionalisierte Mannosederivate über die kupferkatalysierte Klick-Reaktion in mit Azidgruppen ausgestattete Polymersysteme eingeführt werden. Eine andere metallkatalysatorfreie Alternative dazu ist die Reaktion eines thiolmodifizierten Mannoseliganden mit einem Polymer über eine Maleimidgruppe. Aminfunktionalisiert ist es möglich, die Mannose einerseits als Starter für die Polymerisation von Aminosäuren einzusetzen und sie andererseits über die in dieser Arbeit ausführlich beschriebene polymeranaloge Reaktion der Reaktivester zu HPMA Polymeren einzuführen. Im Folgenden soll nun zunächst auf die Synthese der verschiedenen Mannosederivate eingegangen und anschließend die Anbindung an eine Vielzahl verschiedener Polymersysteme gezeigt werden.

#### 3.6.1 Thiolmannose

Die Synthese der thiofunktionalisierten Mannose folgt einer literaturangelehnten Syntheseroute in fünf Stufen (siehe Schema 16).<sup>[159][160][161]</sup>

Im ersten Syntheseschritt wird die vollständig acetylierte Mannose (**Man1**) durch die Reaktion mit Acetanhydrid in Pyridin hergestellt und mittels Extraktion aufgereinigt. Es wird ein Anomerenverhältnis von  $\alpha$ - zu  $\beta$ -Anomer von ungefähr 10:4 <sup>1</sup>H-NMR spektroskopisch ermittelt. Dies spielt bei der Umsetzung zum Brommannosid (**Man2**) mit Bromwasserstoff in Eisessig jedoch keine Rolle, da durch den Nachbargruppeneffekt der in 2-Position befindlichen Acetylenschutzgruppe ausschließlich das  $\alpha$ -Anomer entsteht.



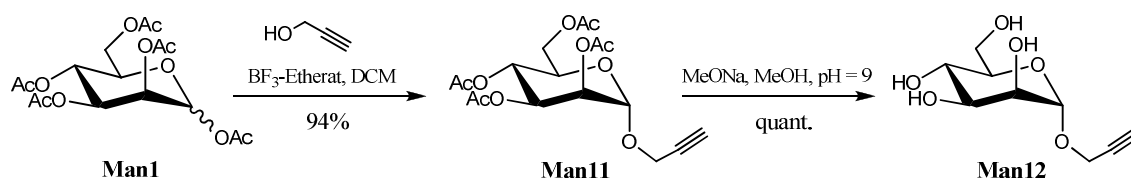
**Schema 16:** Synthese der thiofunktionalisierten Mannose.

Anschließend wird in einer stereospezifischen nukleophilen Substitution mit Thioharnstoff das Isothionium-Salz (**Man8**) als Intermediat erhalten, welches ohne weitere Aufreinigung im nächsten Reaktionsschritt Verwendung findet. Mit wässriger Natriummetabisulfit-Lösung wird dann in einer Zwei-Phasen-Reaktion die Thiofunktionalität eingeführt und die thiofunktionalisierte Mannose in einer anschließenden Deacetylierung nach Zemplén<sup>[162]</sup> bei einem pH-Wert von 9,0 in hoher Reinheit erhalten.

### 3.6.2 Alkinmannose

Die Darstellung der alkinfunktionalisierten Mannose setzt sich aus einer dreistufigen literaturbekannten Synthese zusammen (siehe Schema 17).<sup>[163]</sup>

Ausgehend von der vollständig acetylierten Mannose (**Man1**) (Synthese der ersten Stufe siehe Abschnitt 3.6.1) wird in einer mit  $\text{BF}_3$  als Lewisäure katalysierten Reaktion mit Propargylalkohol die Alkinfunktionalität eingeführt. Dabei entsteht wieder durch den Nachbargruppeneffekt der Acetylgruppe an der C2-Position ausschließlich das  $\alpha$ -Anomer (**Man11**).



**Schema 17:** Synthese der alkynefunktionalisierten Mannose

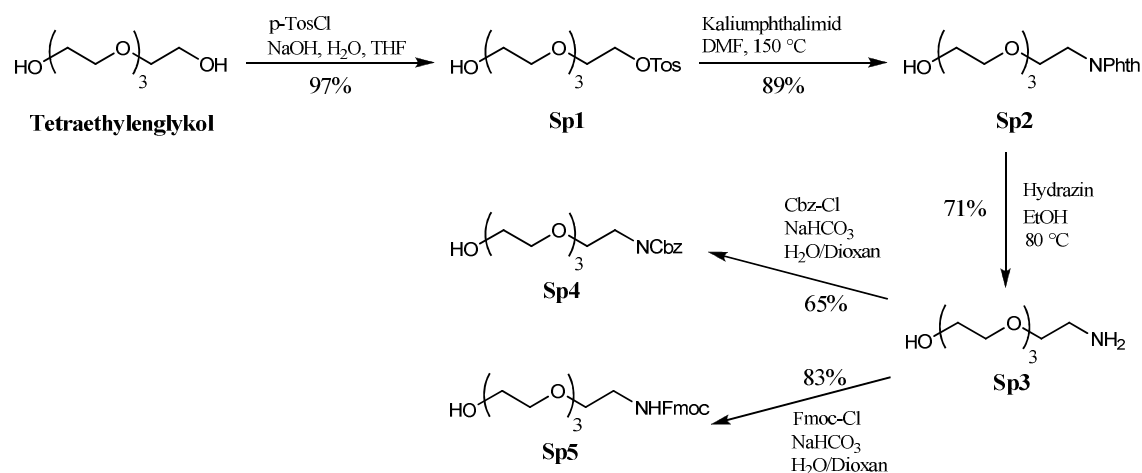
Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wird Verbindung **Man11** in einer anschließenden Deacetylierung nach Zemplén<sup>[162]</sup> bei einem pH-Wert von 8,5 zum gewünschten alkynefunktionalisierten Mannopyranosid (**Man12**) umgesetzt.

### 3.6.3 Aminfunktionalisierter Mannoselinker

Um eine optimale Anbindung der Mannosestrukturen an Polymersysteme zu ermöglichen, ist ein polarer und flexibler Spacer für die freie Beweglichkeit der Mannoseeinheiten am Polymerrückgrat nötig. Bei der Verwendung der thiol- und alkynefunktionalisierten Mannose sind die entsprechenden Polymersysteme bereits mit einem Spacer auf Tetraethylenglykolbasis funktionalisiert. Im Falle der Anbindung an Reaktivesterpolymere oder als Starter für die Polymerisation von Aminosäuren muss der Spacer an den Mannoseliganden gebunden werden. Dazu ist ein Spacer nötig, der über zwei unterschiedliche Funktionalitäten verfügt. Zum einen benötigt er die primäre Aminfunktionalität für die Anbindung an Reaktivesterpolymere oder für den Start der ringöffnenden Polymerisation der Aminosäuren und zum anderen eine freie Hydroxylgruppe, damit diese über die bewährte Glykosylierungsreaktion der Kohlenhydratchemie an die Mannose gebunden werden kann. Ein Spacer auf Tetraethylenglykolbasis hat sich aufgrund des kostengünstigen Ausgangsmaterials, sowie der einfachen Funktionalisierung für die Anbindung an Kohlenhydratstrukturen in unserer Arbeitsgruppe bereits etabliert und wird im Folgenden beschrieben.

Die Synthese des Fmoc- bzw. Cbz-blockierten bifunktionalen literaturbekannten Spacers erfolgt in einer 4-stufigen Synthese nach Gabriel<sup>[164]</sup> ausgehend von Tetraethylenglykol<sup>[165][156]</sup> (siehe Schema 18). Dabei zeigt sowohl die Fmoc- als auch die Cbz- Schutzgruppe eine orthogonale Stabilität gegenüber den acetylblockierten Hydroxylgruppen der Mannose. Zudem lassen sich beide Verbindungen bei einer Wellenlänge von 254 nm hervorragend detektieren und sind durch ihren unpolaren Charakter an Kieselgel leicht chromatographisch aufzureinigen.

Im ersten Reaktionsschritt wird das im großen Überschuss eingesetzte Tetraethylglykol mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid versetzt und man erhält in hoher Reinheit das monotosylierte Tetraethylglykol (**Sp1**). Eine anschließende S<sub>N</sub>2-Reaktion mit Kaliumphthalimid in absolutiertem Dimethylformamid liefert das entsprechende Monophthalimid (**Sp2**), welches mittels Hydrazinolyse in Ethanol mit Hydrazin zu Verbindung **Sp3** umgesetzt wird. Das dabei äquimolar entstehende Nebenprodukt Hydrazid wird durch Zugabe von verdünnter Salzsäure ausgefällt und kann dann über Celite vollständig abgetrennt werden.



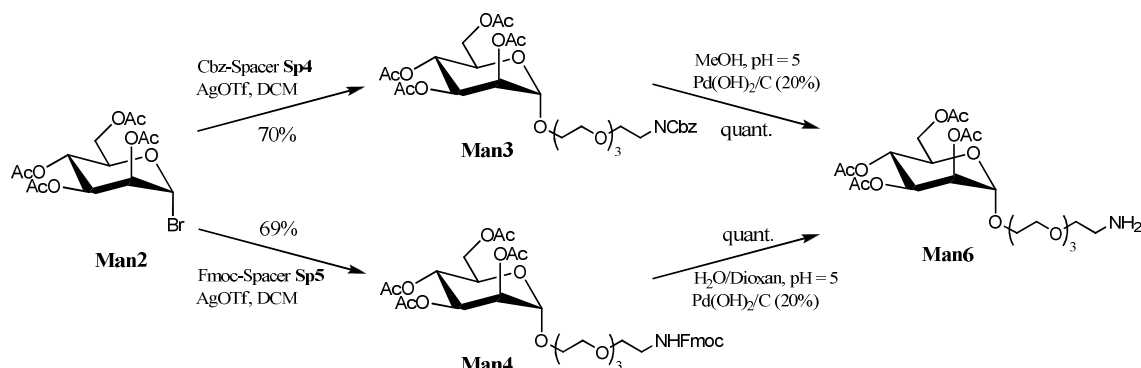
**Schema 18:** Synthese des Cbz-blockierten Spacers (**Sp4**) und des Fmoc-blockierten Spacers (**Sp5**).

Die so erhaltene primäre Aminfunktionalität des Spacers (**Sp3**) muss nun für die Anbindung an den Mannoseliganden blockiert werden. Dies kann durch die Einführung einer Cbz-Schutzgruppe erfolgen, indem **Sp3** mit Benzyloxycarbonylchlorid (Cbz-Cl) zu Verbindung **Sp4** umgesetzt wird oder mittels einer Fmoc-Blockierung von **Sp3** mit Fluoren-9-ylmethoxycarbonylchlorid (Fmoc-Cl), welche die Verbindung **Sp5** liefert. Dabei wird trotz der geringeren Ausbeute die Cbz-Blockierung bevorzugt, da im Fall der Deblockierung nur Kohlenstoffdioxid und Toluol entstehen und somit eine Aufreinigung wie sie bei der Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe nötig ist entfällt.

#### Acetylgeschützter Mannoselinker

Um die Mannoseeinheit mit dem nun bifunktionellen Spacer zu versehen, wird Verbindung **Man2** (Synthese siehe 3.6.1) mit dem Fmoc- bzw. Cbz-blockierten Spacer (**Sp4** bzw. **Sp5**) nach dem bewährten Glykosilierungsverfahren von Koenigs-Knorr<sup>[166]</sup> unter Verwendung von Silbertrifluoromethansulfonat (AgOTf) umgesetzt (Schema 19).

Dabei entsteht wieder aufgrund des Nachbargruppeneffekts in beiden Fällen (**Man3** und **Man4**) ausschließlich das  $\alpha$ -Anomer.

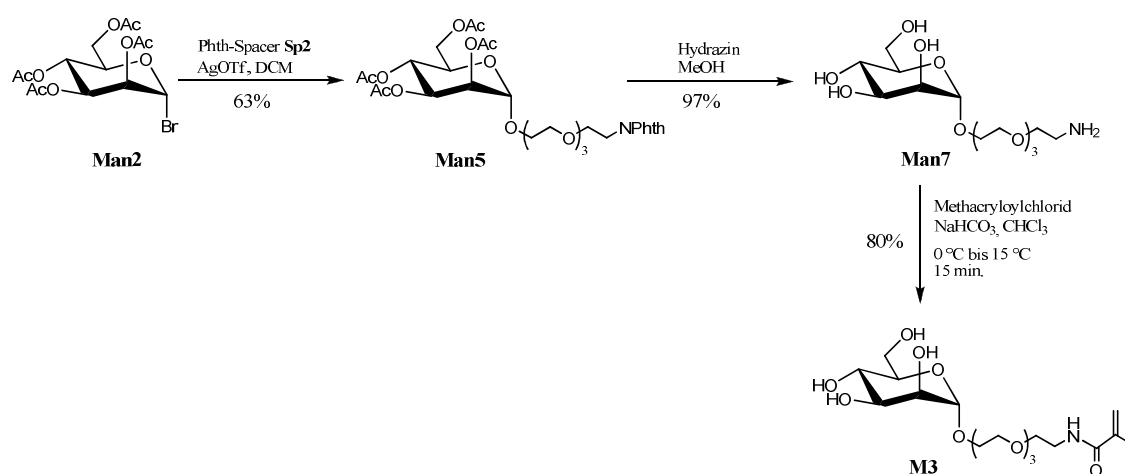


**Schema 19:** Synthese des acetylgeschützten aminfunktionalisierten Mannoselinkers (**Man6**) über zwei mögliche Syntheserouten.

Zur Deblockierung der Aminfunktion beider Verbindungen **Man3** und **Man4** wird auf das Hydrierungsverfahren mittels Wasserstoff und Palladiumhydroxid auf Aktivkohle als Katalysator zurückgegriffen. Verbindung **Man4** muss dabei säulenchromatographisch aufgereinigt werden, um das bei der Hydrierung entstehende Nebenprodukt 9-Methyl-9H-fluoren abzutrennen. Dabei ist ein Zusatz von Triethylamin sinnvoll, damit die Aminogruppe durch das Kieselgel nicht protoniert wird und besser eluiert. Dadurch kann jedoch im Laufe der Zeit eine teilweise Deacetylierung bedingt durch das basische Medium auftreten. Dieser Vorgang wird verstärkt durch das Entfernen des Lösemittels nach der säulenchromatographischen Reinigung, da dabei eine deutliche Erhöhung der Konzentration des Triethylamins stattfindet. Durch die Verwendung von verdünnter Ammoniak-Lösung anstelle des Triethylamins, kann die Deacetylierung verringert werden, da Ammoniak leicht flüchtig ist und durch Einleiten von Stickstoff vor dem Entfernen des Lösemittels aus der Produktlösung ausgetrieben werden kann. Da dies sehr zeitaufwendig ist, wird die Syntheseroute über den Cbz-blockierten Spacer bevorzugt. Bei der Entschützung entstehen in diesem Fall nur Kohlenstoffdioxid und Toluol als Nebenprodukte und somit ist, außer dem Entfernen des Palladiumkatalysators durch Filtration über Celite, keine weitere Aufreinigung mehr nötig. Verbindung **Man6** kann somit in hoher Reinheit gewonnen werden und wird in dieser Form als Starter für die Polymerisation von Aminosäuren verwendet.

Mannoselinker und Mannosemonomer

Der Mannoselinker kann für die polymeranaloge Umsetzung der Reaktivesterpolymere mit freien Hydroxylgruppen eingesetzt werden, da Polypentafluorphenol unter den in 3.3 beschriebenen Reaktionsbedingungen selektiv mit primären Aminogruppen reagiert. Dafür konnte der acetylierte Mannoselinker **Man6** nach dem bereits erfolgreich angewendeten Verfahren von Zemplén entschützt werden. Dies ist insgesamt jedoch eine umständliche Syntheseroute von insgesamt neun Stufen und wurde deswegen nicht angewendet. Der deacetylierte aminfunktionalisierte Mannoselinker für die polymeranaloge Reaktion wird entsprechend Schema 20 synthetisiert.



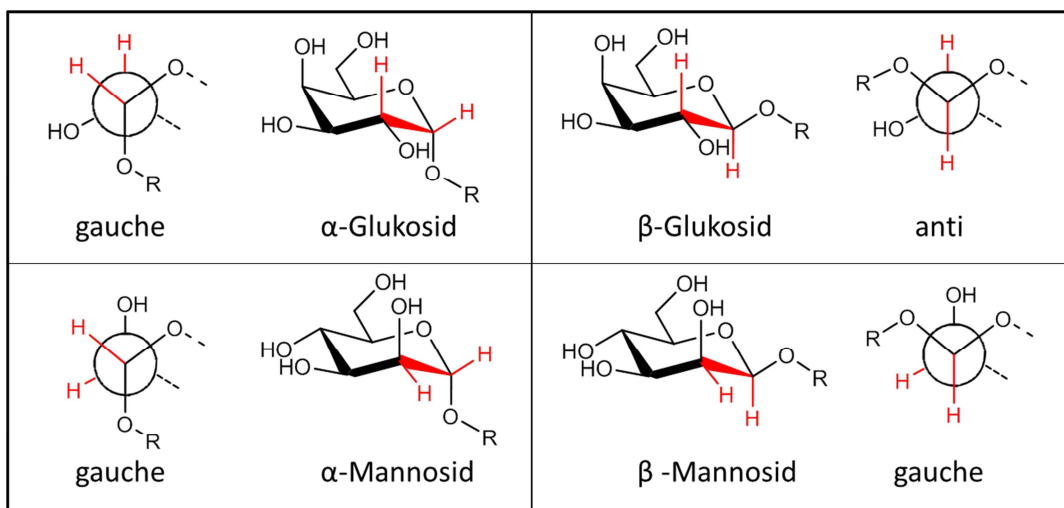
**Schema 20:** Synthese des aminfunktionalisierten Mannoselinkers (**Man7**) und des Mannosemonomers (**M3**).

Dazu wird ausgehend von Verbindung **Man2** (Synthese siehe 3.6.1) mittels des Verfahrens von Koenigs-Knorr<sup>[166]</sup> unter Verwendung des phthalimidfunktionalisierten Tetraethylglykolspaceers (**Sp2**, Synthese siehe Schema 18) und Silbertrifluoromethansulfonat (**AgOTf**) Verbindung **Man5** synthetisiert. Diese kann durch den unpolaren Charakter der Schutzgruppen leicht säulenchromatographisch aufgereinigt werden und man erhält das gewünschte Produkt in hoher Reinheit. Da Acetylschutzgruppen im basischen labil sind und wie die Phthalimidgruppe mittels Hydrazinolyse deblockiert werden können,<sup>[167]</sup> lassen sich alle Schutzgruppen in nur einem Schritt quantitativ in Methanol entfernen. Das Hydrazid fällt dabei als Niederschlag aus und kann durch Filtration über Celite leicht abgetrennt werden. Eine anschließende säulenchromatographische Reinigung mit verdünnter Ammoniak-Lösung als basischer Zusatz liefert in nur sechs Stufen den gewünschten aminfunktionalisierten Mannoselinker, der so für die polymeranaloge Reaktion der Reaktivesterpolymere eingesetzt werden kann. In einem weiteren Schritt kann aus diesem

Aminfunktionalisierten Mannoselinker ein Mannosemonomer mit einem flexiblen und polaren Spacer synthetisiert werden. Indem die Reaktionsbedingungen so gewählt werden, dass nur die freie Aminogruppe umgesetzt wird, erhält man nach säulenchromatographischer Aufreinigung Verbindung **M3**, die eindeutig mittels COSY und HSQC NMR Spektroskopie identifiziert werden konnte.

### Konfigurationsanalyse

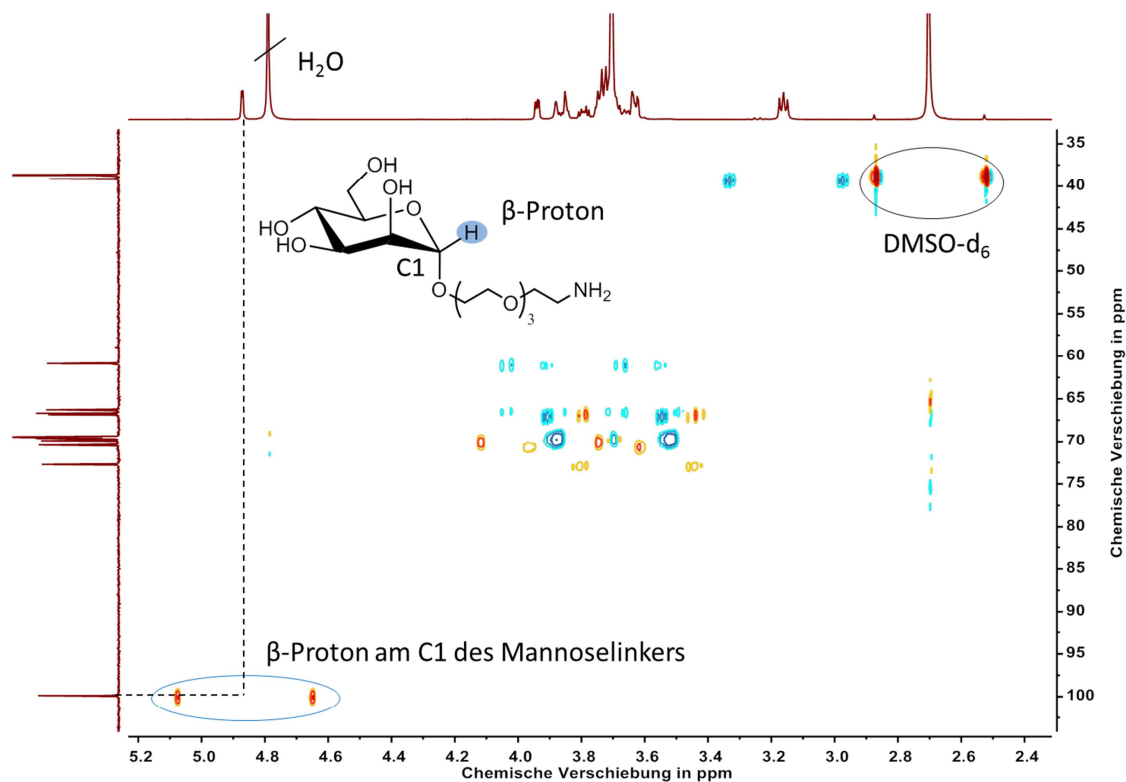
Für die Interaktion der Mannose mit dem entsprechenden Rezeptor wurde herausgefunden, dass die  $\alpha$ -glykosidische Bindung von großer Bedeutung für den biologischen Erkennungsprozess ist.<sup>[79]</sup> Während der Syntheseroute sollte durch den bereits erwähnten Nachbargruppeneffekt der Acetylschutzgruppe an 2-Position auch das  $\alpha$ -Anomer erhalten werden. Dies muss aber überprüft werden. Normalerweise kann man die verschiedenen Anomere von Zuckern im  $^1\text{H-NMR}$  unterscheiden, da das Signal des Protons an der 1-Position in ein Dublett aufspaltet und für das jeweilige Anomer unterschiedliche Kopplungskonstanten ergibt oder sich die chemische Verschiebung der Anomere wie im Falle des vollacetylierten Mannosids (**Man1**) unterscheiden. So erhält man beispielsweise für  $\alpha$ -Glukopyranose eine Kopplungskonstante von  $J^3=3.8$  Hz und für das  $\beta$ -Anomer eine Kopplungskonstante von  $J^3=8.0$  Hz.<sup>[168]</sup> Die Unterschiedlichen Kopplungskonstanten sind dabei auf die Winkel der beiden Protonen an der 1- und 2-Position zueinander zurückzuführen (siehe Abbildung 46).



**Abbildung 46:** Konfiguration der jeweiligen Anomere für ein Mannosid und ein Glukosid mit den dazugehörigen Newman-Projektionen.

Im Falle der Glukose unterscheiden sich die Winkel stark. So stehen die Protonen der  $\alpha$ -Form in einem  $60^\circ$  Winkel zueinander (gauche), da das Proton an der 1-Position äquatorial und das Proton an 2-Position axial angeordnet ist. Bei der  $\beta$ -Glukose sind beide Protonen axial angeordnet und stehen in einem Winkel von  $180^\circ$  zueinander (anti). Im Falle der Mannose ist eine solche Unterscheidung über ein normales  $^1\text{H-NMR}$  nicht möglich, da sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -Form zu einem  $60^\circ$  Winkel der Protonen an 1- und 2-Position führt (gauche).

Die sicherste Methode der Konfigurationsanalyse bei Mannosiden ist die Messung der  $^1\text{J}_{\text{CH}}$ -Kopplung, da sich die Länge der axialen und der äquatorialen Bindung unterscheiden. So besteht ein guter empirischer Zusammenhang zwischen der anomeren Konfiguration der Mannose und der anomeren CH-Kopplung. Messen kann man die  $^1\text{J}_{\text{CH}}$ -Kopplung beispielsweise durch ein nicht entkoppeltes HSQC-NMR. Arbeiten von Kunz *et al.*<sup>[169]</sup> zeigen für  $\beta$ -Mannopyranoside eine Kopplungskonstante von  $^1\text{J}_{\text{CH}} = 160$  Hz und für  $\alpha$ -Mannopyranoside eine Kopplungskonstante von  $^1\text{J}_{\text{CH}} = 170$  Hz. Betrachtet man sich nun ein solches NMR Spektrum des aminfunktionalisierten Mannoselinkers (**Man7**) kann man die Konfiguration eindeutig bestimmen (Abbildung 47).



**Abbildung 47:** Gekoppeltes HSQC-NMR Spektrum des aminfunktionalisierten Mannoselinkers (**Man7**) für den Nachweis der  $\alpha$ -glycosidischen Bindung.



In diesem Spektrum sieht man durch die bestehende  $^{13}\text{C}$ -Kopplung die Satelliten der Protonen, die im Falle des Protons an 1-Position bei 5,08 ppm und 4,65 ppm erscheinen.

Anhand dieses  $^1\text{J}_{\text{CH}}$ -Dubletts durch

$$5,08 \text{ ppm} - 4,65 \text{ ppm} = 0,43 \text{ ppm}$$

ergibt sich durch die Messung an einem 400 MHz Spektrometer eine Kopplungskonstante von

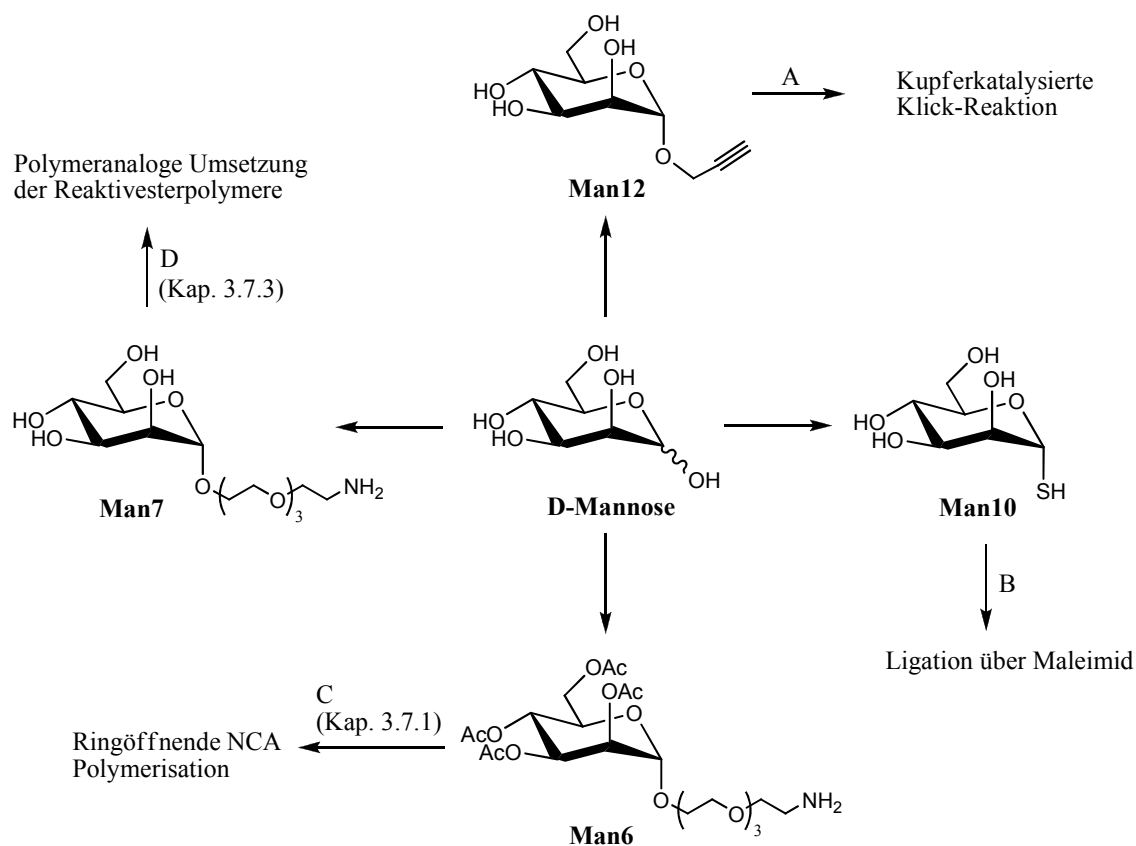
$$^1\text{J}_{\text{CH}} = 0,43 \text{ ppm} \times 400 \text{ MHz} = 172 \text{ Hz.}$$

Damit konnte gezeigt werden, dass wie erwartet die biologisch aktive  $\alpha$ -glykosidische Bindungsform der Mannose vorliegt.



### 3.7 Anbindung von Mannosestrukturen an Polymersysteme

Die verschiedenen funktionalisierten Mannosebausteine (Synthesen siehe Kapitel 3.6) können nun über unterschiedliche Anbindungsstrategien an eine Vielzahl von Polymersysteme angebunden werden. Eine Übersicht dazu ist in Schema 21 gezeigt, wobei in diesem Abschnitt kurz auf die Anbindung von **Man12** und **Man10** eingegangen wird (Schema 21 Reaktion A und B) Die Verwendung von Verbindung **Man6** und **Man7** wird dann in den Kapiteln 3.7.1 und 3.7.3 (Schema 21 C und D) ausführlicher beschrieben.

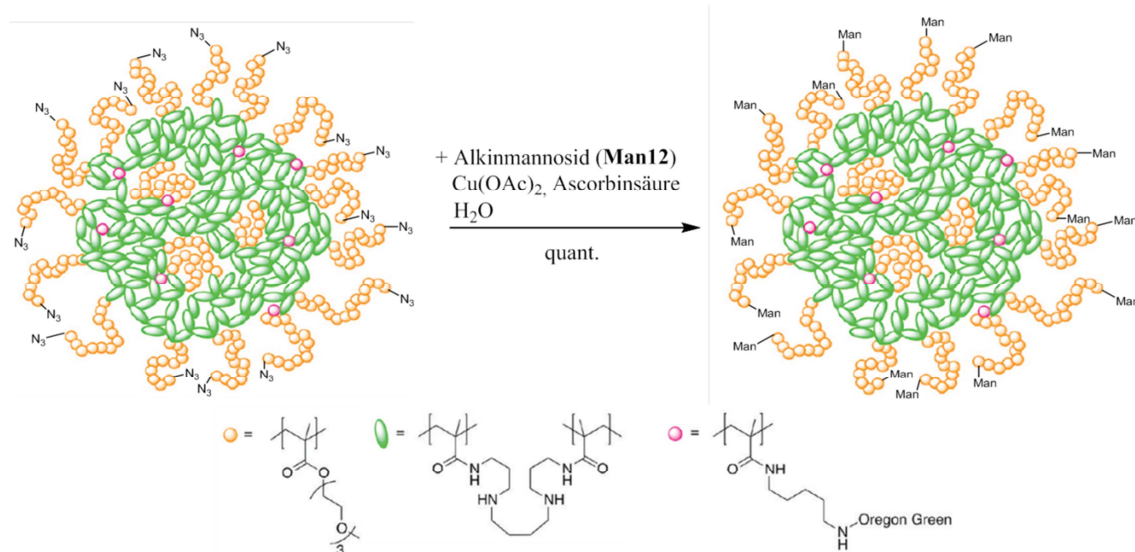


**Schema 21:** Übersicht der verschiedenen Anbindungsstrategien der Mannosebausteine an unterschiedliche Polymersysteme.

#### A) Klick-Reaktion

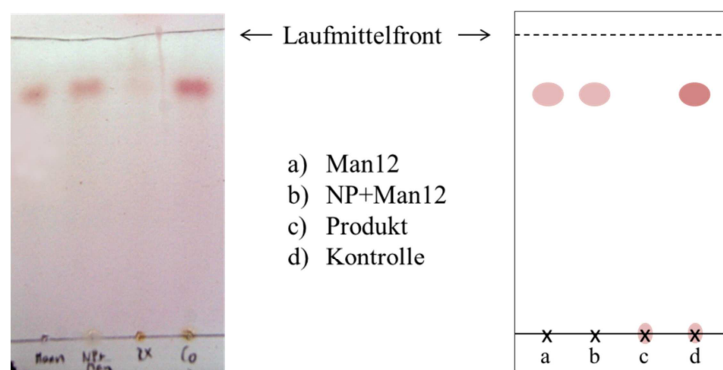
So kann beispielsweise mittels der kupferkatalysierte Klick-Reaktion,<sup>[59]</sup> das alkinfunktionalisierte Mannosid (**Man12**, Synthese siehe Kapitel 3.6.2) an ein azidfunktionalisiertes Polymersystem über ein 1,2,3-Triazol gebunden werden. Dazu wurden Nanohydrogelpartikel von Nuhn *et. al.*<sup>[170]</sup> mit azidfunktionalisierten Triethylglykolspace an den  $\alpha$ -ständigen Säuregruppen der Polymerketten

funktionalisiert, so zur Verfügung gestellt und mit Verbindung **Man12** zu mannosylierten Nanohydrogelen umgesetzt (Abbildung 48).



**Abbildung 48:** Umsetzung der azidfunktionalisierten Nanohydrogelpartikel von Nuhn *et al.*<sup>[170]</sup> mit dem Alkinmannosid (**Man12**).

Für die quantitative Anbindung wird dazu der azidfunktionalisierte Nanohydrogelpartikel (**P(MEO<sub>3</sub>)MA)<sub>12</sub>-b-P(1/2 Spermin)<sub>40</sub>-Azid**,  $M_n = 10.000$  g/mol) in Milli-Q Wasser suspendiert und mit einem äquivalent **Man12** pro Azidgruppe versetzt. Um sauerstofffreie Reaktionsbedingungen zu schaffen, wird die Suspension drei Freeze-Pump Zyklen unterworfen und dann unter Inertatmosphäre mit Kupfer(II)acetat und Ascorbinsäure versetzt. Der Nachweis der Mannoseanbindung erfolgte wegen der sehr geringen Ansatzgröße von einigen Mikrogramm mittels Dünnschichtchromatographie (Abbildung 49).

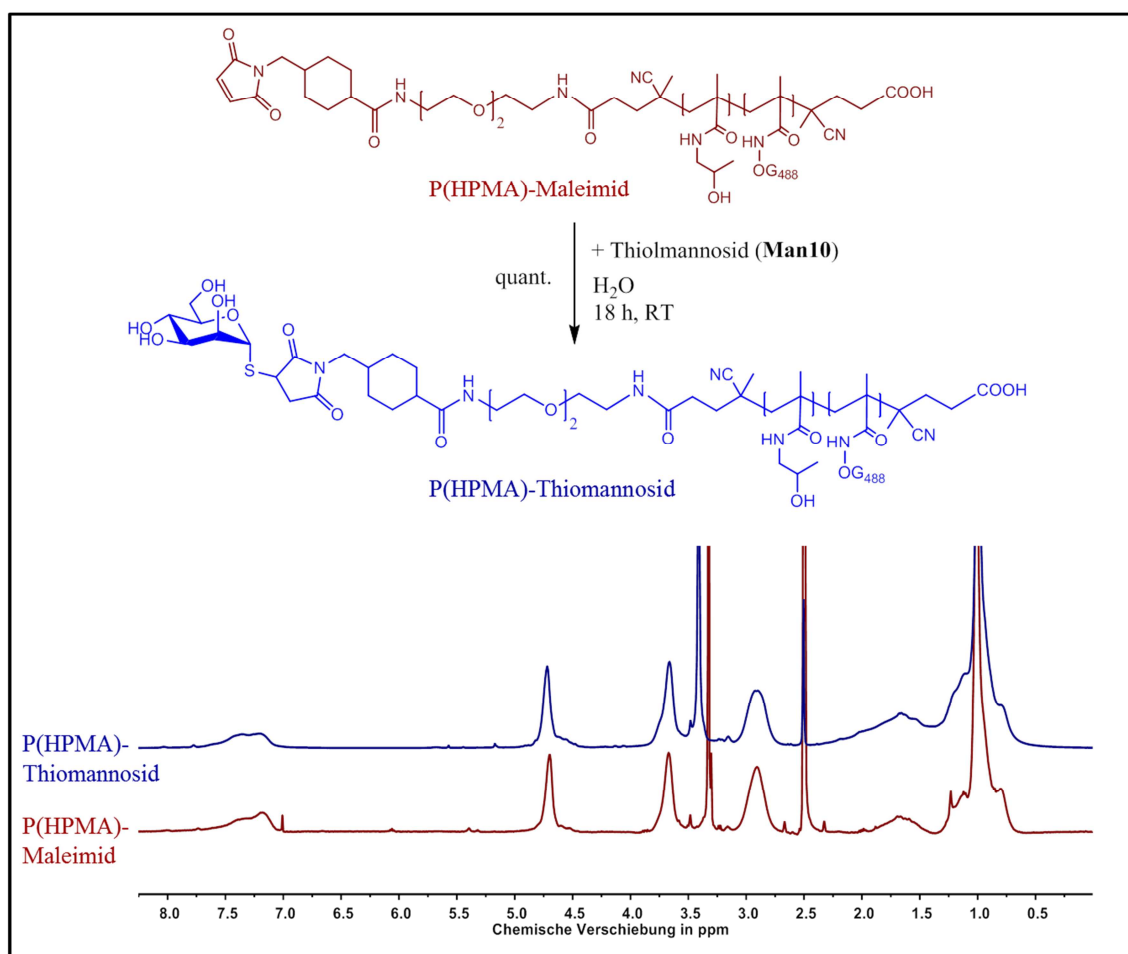


**Abbildung 49:** Links: Dünnschichtchromatogramm der Reaktion von azidfunktionalisierten Nanohydrogelpartikeln und **Man12**. Rechts: Gezeichnetes Schema zur Verdeutlichung. a)-d) Zeigen die verschiedenen Auftragungen vor und nach der Reaktion. a) Verbindung **Man12**, b) azidfunktionalisierter Nanohydrogelpartikel (NP) und **Man12** vor der Reaktion, c) Mannosylierter Nanohydrogelpartikel (Produkt), c) Auftragung von a), b) und c) als Kontrolle.

Abbildung 49 rechts zeigt dabei zur Verdeutlichung schematisch das aufgenommene Dünnschichtchromatogramm (Abbildung 49 links). Es wurden das Alkinmannosid (a, Man12), der azidfunktionalisierte Nanohydrogelpartikel mit Man12 vor der Reaktion (b, NP+Man12), der mannosylierte Nanohydrogelpartikel nach der Reaktion (c, Produkt) und als Kontrolle (d, Kontrolle) alle Verbindungen vor und nach der Reaktion aufgetragen. Die Entwicklung des Dünnschichtchromatogramms erfolgte in einer Wasser/Acetonitril Mischung mit einem Zusatz von Triethylamin und der Verwendung des zuckerspezifischen Nachweisreagenz zum Anfärben der Mannosefunktionalität. Man kann durch den dunklen Spot (Auftragung a in Abbildung 49) erkennen, dass **Man12** als kleines relativ polares Molekül mit dem Laufmittel mitgezogen wird ( $R_f = 0,81$ ). Vor der Reaktion (Auftragung b in Abbildung 49) liegt der Mannosebaustein immer noch frei vor, da der  $R_f$ -Wert ebenfalls bei 0,81 liegt. Bei der Auftragung nach der Reaktion (c, Produkt) ist hingegen nur ein Spot an der Startlinie zu erkennen. Da Polymere durch ihr hohes Molekulargewicht auf normalbeschichteten Dünnschichtchromatographieplatten nicht mit dem Laufmittel mitgezogen werden, kann man so zeigen, dass **Man12** erfolgreich an das Nanohydrogel angebunden werden konnte. Durch eine anschließende Dialyse gegen Milli-Q Wasser wird der mannosylierte Nanohydrogelpartikel aufgereinigt und vom Kupferkatalysator befreit.

### B) Ligation über Maleimid

Eine kupferfreie Alternative dazu ist beispielsweise die Ligation einer Thiofunktionalität mit einer Maleimidgruppe. Diese Art der Ligationstechnik hat sich bereits in unserer Arbeitsgruppe von Tappertzhofen *et al.* durch die Anbindung von Antikörpern an maleimidfunktionalisierte HPMA-basierte Polymere etabliert.<sup>[171]</sup> Diese Polymere konnten für die Anbindung des Thiolmannosids (**Man10**) zur Verfügung gestellt werden. Dazu wird das maleimidfunktionalisierte HPMA-Polymer (P(HPMA)-Maleimid,  $M_n = 10.800$  g/mol) mit einem großen Überschuss an Thiolmannosid **Man10** versetzt und bei Raumtemperatur mehrere Tage reagieren gelassen (durchgeführt von ). Die Aufreinigung erfolgte mittel Dialyse gegen Milli-Q Wasser. Das Reaktionsschema sowie der Nachweis der erfolgreichen Anbindung mittels  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie sind in Abbildung 50 gezeigt.



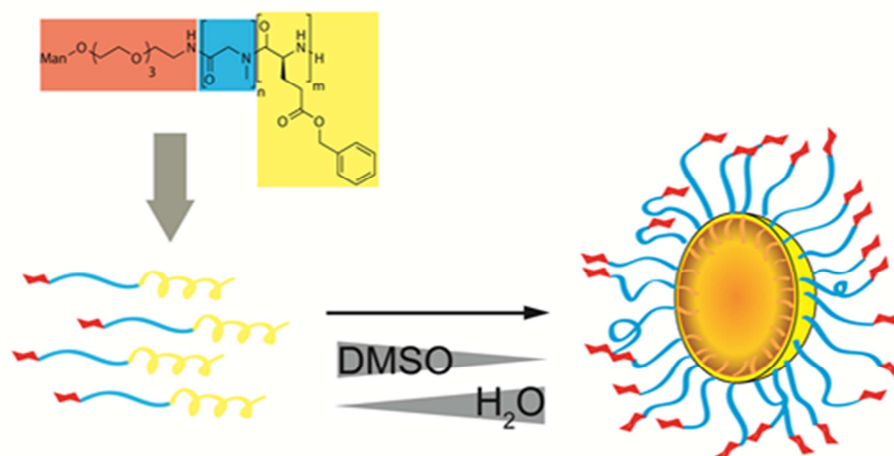
**Abbildung 50:** Funktionalisierung von P(HPMA)-Maleimid mit dem Thiomannosid (Man10) mit den dazugehörigen <sup>1</sup>H-NMR Spektren.

Durch das Verschwinden der Maleimidprotonen bei einer chemischen Verschiebung von 7,0 ppm, sowie einem qualitativen Nachweis durch Anfärben mittels des Zuckerreagenzes analog zum Nachweis der Klick-Reaktion der Nanohydrogelpartikel, konnte so die erfolgreiche Anbindung des Thiomannosid an die Maleimidengruppe des HPMA-Polymers gezeigt werden.

So ist sowohl eine Anbindung über die kupferkatalysierte Klick-Reaktion, als auch die Ligation über eine Thiol-Maleimid-Reaktion möglich, um polymere Systeme mit Mannose zu funktionalisieren. Die Umsetzungen der Aminfunktionalisierten Mannosebausteine **Man6** und **Man7** nach den Strategien C und D in Schema 21 werden nun in den folgenden Kapiteln ausführlicher beschrieben.

### 3.7.1 Mannose als Starter für die Polymerisation von Aminosäuren (N-Carboxyanhydriden)

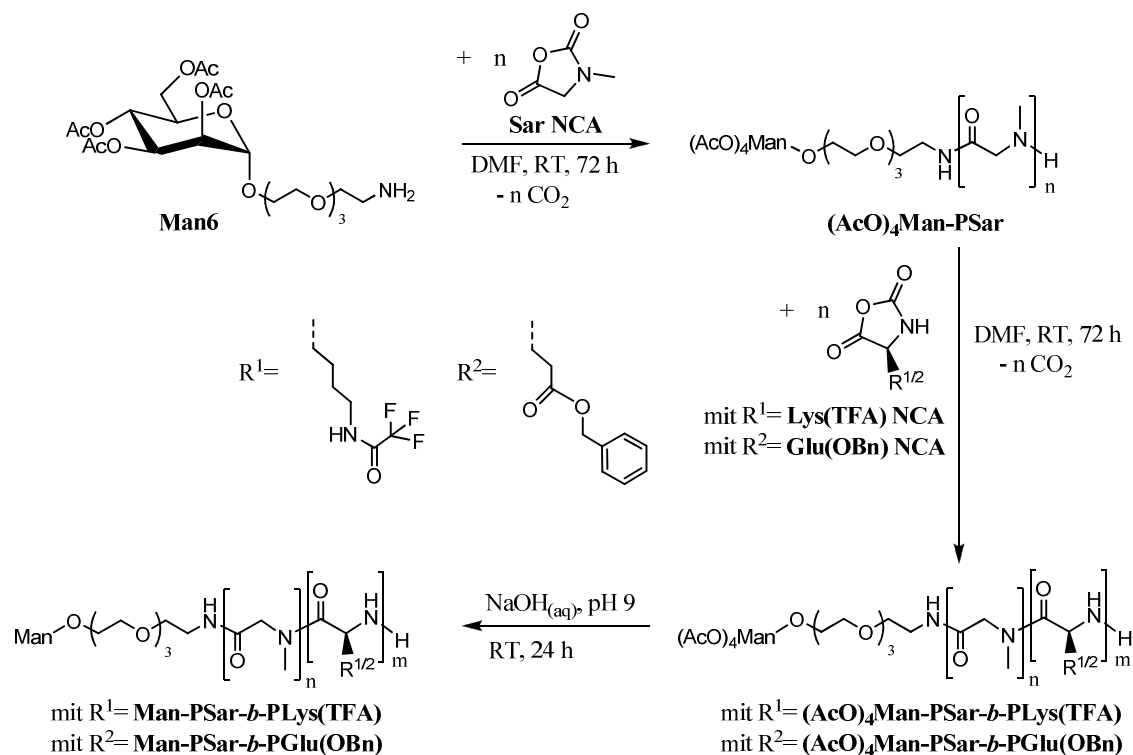
Wie in Kapitel 1.4 bereits beschrieben wurde, stellen Polypept(o)id-*block*-polypeptid Copolymere (Polypept(o)ide) ein vielversprechendes Material für den Wirkstofftransport als Mizellen (PeptoMizellen) und als Polyplexe (PeptoPlexe) für die Gentherapie dar, da sie *Stealth*-Eigenschaften (Polysarcosin) mit verschiedenen Funktionalitäten (Polyaminosäureseitenketten) in einem pept(o)iden Blockcopolymer vereinen. Werden diese Systeme mit einem Targetliganden wie Mannose funktionalisiert, können sie, falls der Ligand an der Oberfläche des Partikels frei zugänglich ist, direkt mit dem zellulären Transmembranprotein interagieren und so durch den bereits in Kapitel 1.2.1 beschriebenen Prozess der Endocytose verstärkt aufgenommen werden. Ist der Targetligand im hydrophilen Bereich des Blockcopolymer integriert, werden durch den Prozess der Selbstassemblierung von diesen amphiphilen Strukturen in einem polaren Lösemittel wie beispielsweise Wasser, Mizellen ausgebildet, welche die Targetstrukturen automatisch an der Oberfläche präsentieren (siehe Abbildung 51). Dadurch wird die generell eher schwache Bindungsstärke zwischen Mannose und dem Rezeptor durch den sogenannten Cluster-Glykosid-Effekt der in Kapitel 1.2 beschrieben wurde, verstärkt.



**Abbildung 51:** Selbstassemblierung des Man-PSar-block-PGlu(OBn) Blockcopolypept(o)ids in mannoserezeptor adressierende Mizellen.

Polysarcosin sowie andere Polypept(o)ide sind durch die nukleophile ringöffnende Polymerisation von  $\alpha$ -Aminosäure N-Carboxyanhydriden (NCAs) zugänglich. Dazu wird als Initiator der acetylierte Mannoselinker (**Man6**) (Synthese siehe 3.6.3, Schema 19) verwendet, der durch die primäre Aminogruppe die Polymerisation von Sarcosin (**Sar**), Lysin(TFA) (**LysTFA**) und Glutaminsäure(OBn) (**Glu(OBn)**) NCAs starten

kann (siehe Schema 22). Dazu wurden die bekannten Literaturvorschriften zur Synthese der verschiedenen NCAs verwendet<sup>[107][172]</sup> und nach Heller *et al.*<sup>[111]</sup> modifiziert.



**Schema 22:** Synthese von mannosefunktionalisiertem PSar-*block*-PGlu(OBn) und PSar-*block*-PLys(TFA) Blockcopolypept(o)iden (Polymerisation von P. Heller durchgeführt).

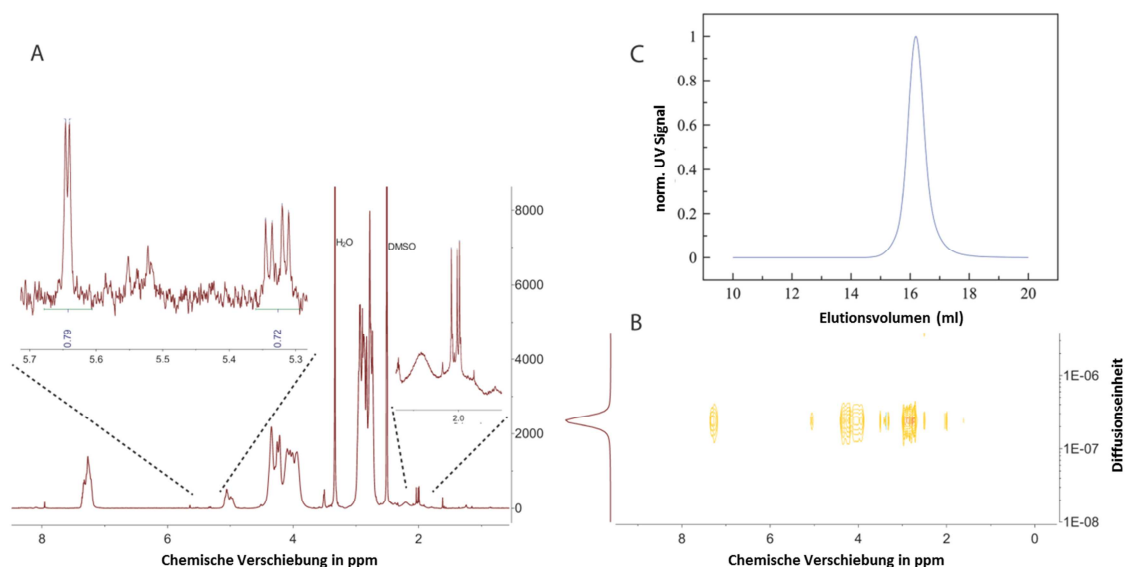
Der so synthetisierte **Sar NCA** (P. Heller) kann dann unter Schlenkbedingungen bei Raumtemperatur mit **Man6** als Initiator zum **(AcO)<sub>4</sub>Man-PSar** umgesetzt werden, welcher wiederum als Makroinitiator verwendet wird, um entweder einen PolyLys(TFA) Block oder einen PolyGlu(OBn) Block anzupolymerisieren (P. Heller). Die erhaltenen Blockcopolypept(o)ide, sowie PSar-*block*-PGlu(OBn) ohne Mannose als Vergleich sind in Tabelle 11 aufgelistet.

**Tabelle 11:** Eigenschaften der synthetisierten Blockcopolypept(o)ide und die nach der Entschützung der Mannose hergestellten Mizellen. <sup>a</sup> mittels <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie in DMSO-d<sub>6</sub>. <sup>b</sup> mittels GPC mit HFIP als Lösemittel und PMMA Standards. <sup>c</sup> mittels DLS in PBS Puffer, c=0.0667 g/L.

Polymer	Blocklängen- verhältnis berechnet	Blocklängen- verhältnis <sup>a</sup>	M <sub>n</sub> (g/mol) <sup>b</sup>	Đ <sup>b</sup>	R <sub>h</sub> (nm) <sup>c</sup>	μ <sub>2</sub> <sup>c</sup>
<b>Man-PSar-<i>b</i>-PGlu(OBn) (P1)</b>	300 : 30	277 : 28	46.200	1,13	63,7	0,13
<b>PSar-<i>b</i>-PGlu(OBn) (P2)</b>	300 : 30	329 : 25	40.700	1,19	72,8	0,15
<b>Man-PSar-<i>b</i>-PLys(TFA) (P3)</b>	300 : 30	319 : 29	49.400	1,17	-	-



Die Untersuchung der Polymere mittels HFIP-GPC (P. Heller) zeigten dabei eine enge monomodale Molekulargewichtsverteilung und niedrige Dispersitäten im Bereich von 1,13 – 1,19 (siehe Abbildung 52 C). Der Polymerisationsgrad kann dabei sehr präzise durch das Verhältnis der Integrale der Acetylschutzgruppen der Mannose (2,04 – 1,99 ppm) und der Polysarcosinrückgratprotonen im  $^1\text{H-NMR}$  bestimmt werden (siehe Abbildung 52 A). Die Aufnahme eines DOSY-NMRs zeigt durch nur eine diffundierende Spezies, dass weder freier Initiator noch niedermolekulare Polymere vorhanden sind (siehe Abbildung 52 B).



**Abbildung 52:** A)  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum in  $\text{DMSO-d}_6$ , B) DOSY NMR in  $\text{DMSO-d}_6$  und C) HFIP-GPC Plot von  $(\text{AcO})_4\text{Man-PSar-block-PGlu(OBn)}$ .

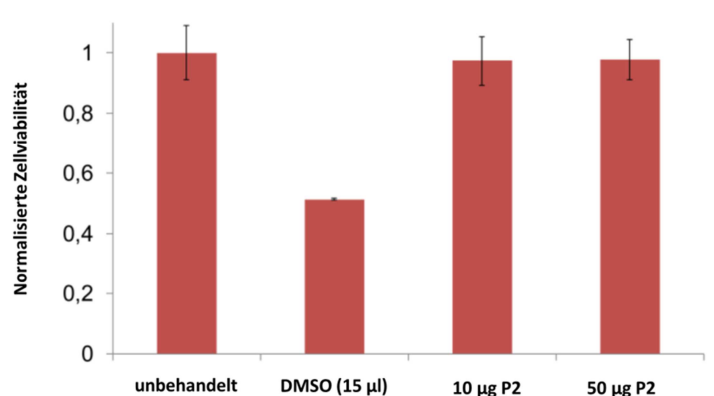
Die so synthetisierten Polymere verfügen über eine freie Aminoendgruppe, die so leicht mit einem Oregon Green 488 NHS-Ester für die Visualisierung der *in vitro* Experimente polymeranalog umgesetzt werden kann. Um die Mannosefunktionalität für die Mannoserezeptoren zugänglich zu machen, müssen die Acetylschutzgruppen entfernt werden. Dies kann im Falle von  $(\text{AcO})_4\text{Man-PSar-block-PGlu(OBn)}$  selektiv erfolgen, in dem wässrige Natriumhydroxid-Lösung mit  $\text{pH} = 9$  verwendet wird und somit die Benzylschutzgruppe der Aminosäure erhalten bleibt. Für eine Entschützung der Acetylschutzgruppen und der gleichzeitigen Deblockierung der Aminosäureschutzgruppe wird  $(\text{AcO})_4\text{Man-PSar-block-PGLys(TFA)}$  mit Hydrazin Hydrat versetzt. Mit dieser sehr vielseitigen Syntheseroute war es somit möglich mannosefunktionalisierte PeptoMizellen und PeptoPlexe herzustellen (P. Heller).

Für die Selbstassemblierung der mannosylierten Blockcopolypept(o)ide werden diese in  $\text{DMSO}$  gelöst und der Anteil an Wasser schrittweise erhöht (siehe Abbildung 51). Die

Charakterisierung der gebildeten Mizellen erfolgte von B. Weber mittel dynamischer Lichtstreuung (DLS) und zeigt in beiden Fällen P1 und P2 eine geringfügige Winkelabhängigkeit, die durch die Dispersität der entstandenen Mizellen entsteht. Die hydrodynamischen Radien sind dabei deutlich unter 100 nm und liegen mit 63,7 nm für P1 und 72,8 nm für P2 im Größenbereich für eine clathrin-vermittelte Endocytose.<sup>[173]</sup>

Die so analysierten Polymere P1 und P2 wurden anschließend in biologischen Zellversuchen von P. Heller untersucht. Zunächst wurde dabei die Zellaufnahme der mannosefunktionalisierten PeptoMizellen an DC 2.4 Zellen betrachtet. Diese Modellzelllinie exprimiert Mannose bindende Rezeptoren und ist für dendritische Zellen, durch die erfolgreiche Verwendung in vielen Publikationen für Zellaufnahmestudien von mannosemodifizierter Nanopartikel bereits etabliert.<sup>[174–176]</sup>

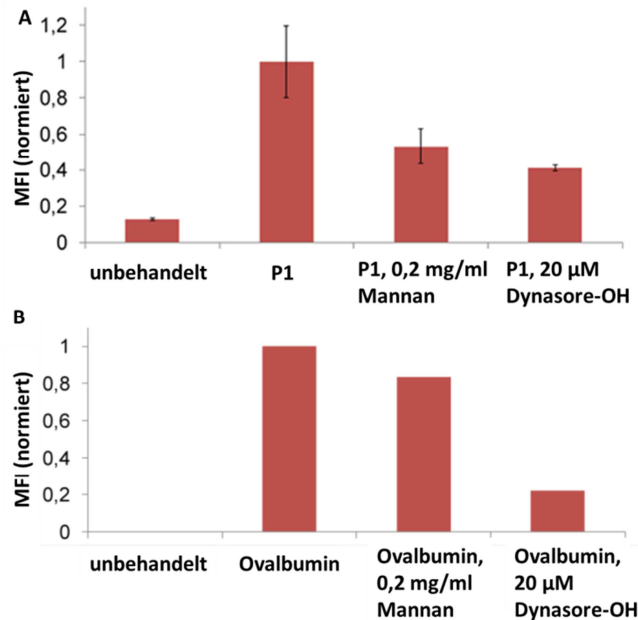
In den Zytotoxizitätsexperimenten von diesen DC 2.4 Zellen konnte dabei keine polymerassoziierte Abnahme der Zellviabilität bis zu einer Konzentration von 0,5 mg/ml beobachtet werden (Zellviabilität von über 95%, siehe Abbildung 53).



**Abbildung 53:** Normalisierte Zellviabilität von unbehandelten DC 2.4 Zellen und mit DMSO und P2 bei verschiedenen Konzentrationen behandelte DC 2.4 Zellen.

Die Bindung der mannosefunktionalisierten PeptoMizellen an den Mannoserezeptor, sowie die darauf folgende Mannoserezeptor medierte Endocytose wurden dann auf zwei verschiedene Arten näher untersucht. Dazu wurden die DC 2.4 Zellen mit Mannan preinkubiert um die Mannoserezeptoren zu blockieren und somit eine Mannoserezeptor initiierte Endozytose der funktionalisierten PeptoMizellen zu unterbinden. Um den Vorgang der Endocytose auf einer anderen Ebene zu verhindern, wurden die Zellen mit Dynasore-OH behandelt. Dieses Reagenz interferiert dabei nicht zwischen der Bindung der Peptomizellen mit dem Mannoserezeptor, sondern verhindert durch die Blockierung

von Dynamin-1 und Dynamin-2 die Ausbildung der endocytotischen Vesikel.<sup>[177]</sup> In beiden Fällen wurden die so inkubierten Zellen mit den mannosylierten PeptoMizellen (P1) und Ovalbumin (OVA), als Modellprotein für eine Mannoserezeptor medierte Aufnahme, behandelt (siehe Abbildung 54 A und B).<sup>[178]</sup>



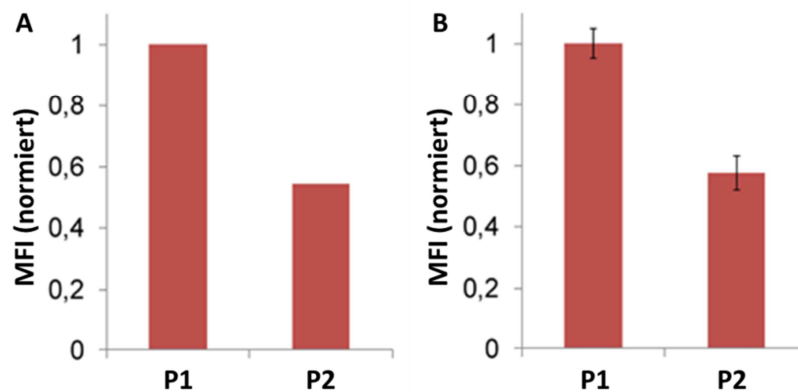
**Abbildung 54:** Zellaufnahme DC 2.4 Zellen A) nach Inkubation mit P1 und Mannan und Dynasore-OH, B) nach Inkubation Ovalbumin mit Mannan und Dynasore-OH.

Die Blockierung durch Mannan führte dabei im Falle des OVAs zu einer zu 25% verringerten Aufnahme (Abbildung 54 B) und im Falle von P1 zu einer 50% verminderten Aufnahme. Dass in beiden Fällen noch eine Zellaufnahme zu beobachten ist, kann dabei an der unvollständigen Blockierung der Mannoserezeptoren, einer mannosegetriggerten Rekrutierung (Recycling) von zusätzlichen Mannoserezeptoren an die Zelloberfläche und an alternativen Aufnahmemechanismen, wie beispielsweise der Makropinozytose und der Phagozytose, liegen.<sup>[179,180]</sup>

Nach Inkubation der Zellen mit Dynasore-OH wurde die Aufnahme von OVA und P1 um 80 und 60% verringert (siehe Abbildung 54). Dies zeigt, dass P1, genau wie OVA, hauptsächlich über die clathrin-vermittelte Endocytose aufgenommen wird und somit den endocytotische Mechanismus von P1 über den Mannoserezeptor bestätigt. Auch hier ist, wie im Falle der Behandlung mit Mannan, eine geringere Aufnahme zu erkennen, die ebenfalls auf alternative Aufnahmewege der Zellen zurückzuführen ist.

Nachdem so gezeigt werden konnte, dass P1 über den Mechanismus der rezeptorvermittelten Endocytose aufgenommen wird, soll im Folgenden der Vergleich zu nicht-mannosylierten PeptoMizellen gezogen werden. Dazu wurden zusätzlich zu

DC 2.4 Zellen, die Aufnahme an knochenmarksabgeleiteten dendritischen Zellen (BMDCs, engl. *bone marrow-derived DCs*) untersucht. BMDCs repräsentieren dabei Mannoserezeptor exprimierende DCs, die aus primären Vorläuferzellen erhalten werden. Wie erwartet, zeigt bei diesen Experimenten P1 eine signifikant höhere zelluläre Interaktion als P2, sowohl im Falle der DC 2.4 Zellen (Abbildung 55 A), als auch bei den BMDCs (Abbildung 55 B).



**Abbildung 55:** Vergleich der Aufnahmeeffektivität von A) DC 2.4 Zellen und B) Knochenmarksabgeleiteten DCs (engl. *bone marrow-derived DCs*, BMDCs)

Zusätzlich sind die Verhältnisse der Aufnahme von P1 zu P2 vergleichbar mit denen von P1 mit Mannan zu P1 ohne Mannan bzw. Dynasore-OH inkubierten Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die spezifische Interaktion der Mannose von P1 mit dem Mannoserezeptor der Zellen zu einer deutlich verstärkten Zellaufnahme durch die clathrin-vermittelte Endocytose führt. Gleichzeitig kann man jedoch auch unspezifische Zellaufnahmemechanismen, wie beispielweise die Makropinocytose beobachten, bei denen PeptoMizellen ungeachtet ihrer Mannosefunktionalität aufgenommen werden. All diese Ergebnisse bestätigen die Forschungsarbeiten anderer Arbeitsgruppen über die verstärkte Zellaufnahme mannosylierter Nanopartikel, wie beispielsweise PLGA oder Dextranpartikel.<sup>[175,181]</sup> Somit kann die Funktionalisierung von PeptoMizellen durch die wesentlich verstärkte Zellaufnahme, ein aktives Targeting von Mannoserezeptor präsentierenden Zellen, wie DCs oder Makrophagen, ermöglichen.

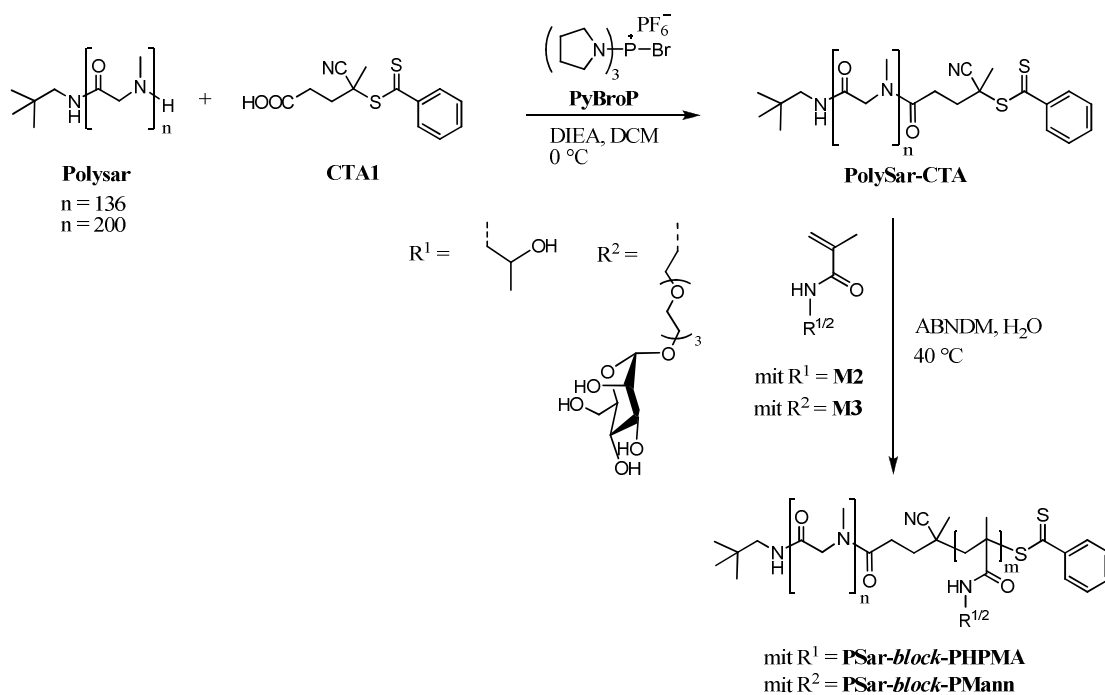
Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass Blockcopoly(ox)ide mit einer bioaktiven Endgruppenfunktionalität und geringer Dispersität von ungefähr 1,1 synthetisiert werden konnten. Dabei war es durch die gewählte Syntheseroute möglich, amphiphile Blockcopolymere mit Mannoseendgruppen unter Verwendung

verschiedener Schutzgruppen (orthogonale und simultane Entschützung) darzustellen. Diese Systeme sind so in der Lage, durch Selbstassemblierung in Wasser mizellare Strukturen auszubilden, die sowohl bei der Zelllinie DC 2.4 als auch bei BMDCs zu einer verstärkten Zellaufnahme führten. Dies zeigt noch einmal das große Potential mannosylierter PeptoMizellen über den Mannoserezeptor spezifisch Zellen des angeborenen Immunsystems zu adressieren.

### 3.7.2 Polysarcosin-*block*-Polymannose

Eine weitere Möglichkeit Polypept(o)ide mit Mannose als Targetligand zu versehen, ist die Kombination der ringöffnenden Polymerisation der NCAs mit einer anschließenden RAFT Polymerisation des Mannosemonomers (**M3**, Synthese siehe Kapitel 3.6.3 Schema 20). Somit ist es möglich, nicht nur eine Mannoseeinheit pro Polymerkette zu erhalten, sondern die Menge an Mannose beliebig zu variieren. Im Folgenden soll nun zunächst am Beispiel der Kombination von Polysarcosin mit PolyHPMA diese allgemeine Syntheseroute vorgestellt werden. Anschließend wird gezeigt, wie Polysarcosin-*block*-Polymannose anhand dieses Syntheseweges hergestellt werden kann.

Dazu wird zunächst von Huesmann *et al.*<sup>[182]</sup> der benötigte Sarcosin NCA nach literaturbekannter Vorschrift<sup>[107,172]</sup> hergestellt und zum Polysarcosin mit Hilfe von Neopentylamin als Starter (siehe dazu auch Kapitel 3.7.1 Schema 22) umgesetzt.<sup>[110,111]</sup> Um das Polysarcosin als Initiator für die RAFT-Polymerisation einsetzen zu können, muss es mit einer Thioesterendgruppe funktionalisiert werden, damit es als Kettentransferreagenz fungieren kann (siehe Schema 23).



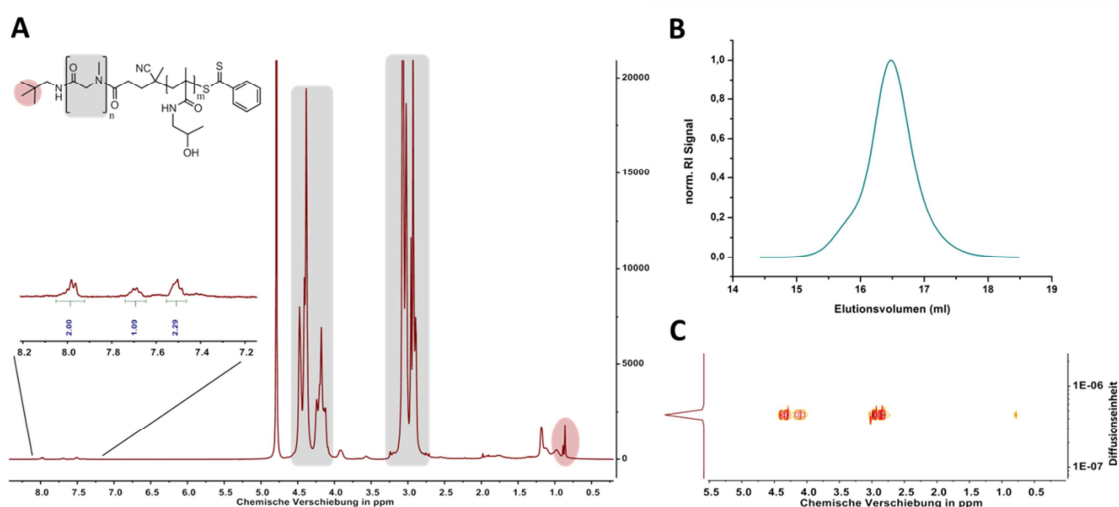
**Schema 23:** Synthese des PSar-CTAs und den Blockcopolymeren PSar-*block*-PHMA und PSar-*block*-PMan.

Da das Polysarcosin nur eine sekundäre Aminendgruppe aufweist wird ein spezielles Reagenz zum Koppeln sekundärer Amine mit Carbonsäuren (**PyBroP**)<sup>[183]</sup> verwendet und das Polysarcosin mit dem Kettentransferreagenz **CTA 1** (Synthese siehe Kapitel 3.1 Schema 1) zum **PolySar-CTA** umgesetzt. Diese Makro-CTA konnte mittels <sup>1</sup>H-NMR und DOSY eindeutig identifiziert werden und kann nun in einer RAFT Polymerisation analog zu den Bedingungen in Kapitel 3.1 eingesetzt werden, um **M2** oder **M3** an den Polysarcosinblock anzupolymerisieren. Die erhaltenen Polymere sind in Tabelle 12 aufgelistet.

**Tabelle 12:** Eigenschaften der synthetisierten Polysarcosin-CTAs und die nach anschließender RAFT Polymerisation hergestellten Blockcopolymere. <sup>a</sup> mittels <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie oder ig <sup>13</sup>C-NMR in D<sub>2</sub>O berechnet. <sup>b</sup> mittels GPC mit HFIP als Lösemittel und PMMA Standards gemessen.

Polymer	Blocklängenverhältnis <sup>a</sup>	M <sub>n</sub> (g/mol) <sup>a</sup>	M <sub>n</sub> (g/mol) <sup>b</sup>	Đ <sup>b</sup>
<b>PSar-CTA 1</b>	136	9.100	24.000	1,36
<b>PSar-<i>b</i>-PMan</b>	136 : 29	12.300	28.600	1,21
<b>PSar-CTA 2</b>	200	14.500	32.100	1,16
<b>PSar-<i>b</i>-PHPMA</b>	200 : 10	16.000	38.000	1,13

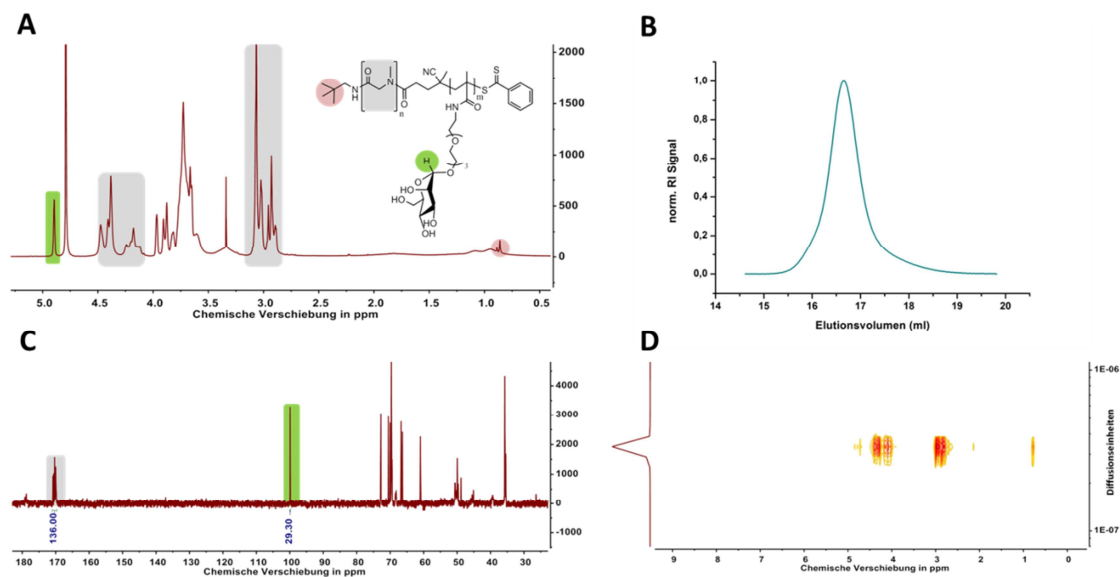
Die Untersuchung von **PSar-block-PHPMA** mittels HFIP-GPC zeigten dabei eine enge monomodale Molekulargewichtsverteilung und eine niedrige Dispersität von 1,13 (siehe Abbildung 56 B). Der Polymerisationsgrad kann dabei sehr präzise durch das Verhältnis der Integrale der Neopentylprotonen (0,86 ppm) oder der aromatischen Protonen der Dithioesterendgruppe (8,0 – 7,5 ppm) und der Polysarcosinrückgratprotonen (grau hinterlegt in Abbildung 56 A), sowie der HPMA-Rückgratprotonen (2,0 – 0,9 ppm) im  $^1\text{H-NMR}$  bestimmt werden (siehe Abbildung 56 A). Die Aufnahme eines DOSY-NMRs zeigt durch nur eine diffundierende Spezies, dass weder freier Initiator noch niedermolekulare Polymere vorhanden sind (siehe Abbildung 56 C).



**Abbildung 56:** A)  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum in  $\text{D}_2\text{O}$ , B) HFIP-GPC Plot mit PMMA als Standard und C) DOSY NMR in  $\text{D}_2\text{O}$  von **PSar-block-PHPMA**.

Auch **PSar-block-PMan** zeigt in der HFIP-GPC eine monomodale Verteilung und eine enge Dispersität von 1,21 (Abbildung 57 B). Der Polymerisationsgrad kann, wie auch im Falle von **PSar-block-PHPMA**, über die Neopentylendgruppe im  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum (Abbildung 57 A) bestimmt werden. Der Anteil der angebondenen Mannose kann dabei zum einen über das Signal des Protons an 1-Position bei einer chemischen Verschiebung von 4,8 ppm im  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum bestimmt werden und zum anderen über das Verhältnis der Signale des Carbonyl C-Atoms des Polysarcosins bei 170 ppm mit dem diskret auftretenden Signal des C1 der Mannose bei 99,9 ppm im inverse gated  $^{13}\text{C-NMR}$  (Abbildung 57 C). Die Blocklänge des Polysarcosins konnte somit auf 136 Einheiten und die des Mannoseblocks auf 29 Einheiten bestimmt werden. Auch in diesem Fall zeigt das DOSY-NMR (Abbildung 57 D), dass bei der durchgeführten

RAFT-Polymerisation des Mannosemonomers an den Polysarcosin-Makro-CTA keine Nebenreaktionen auftreten.



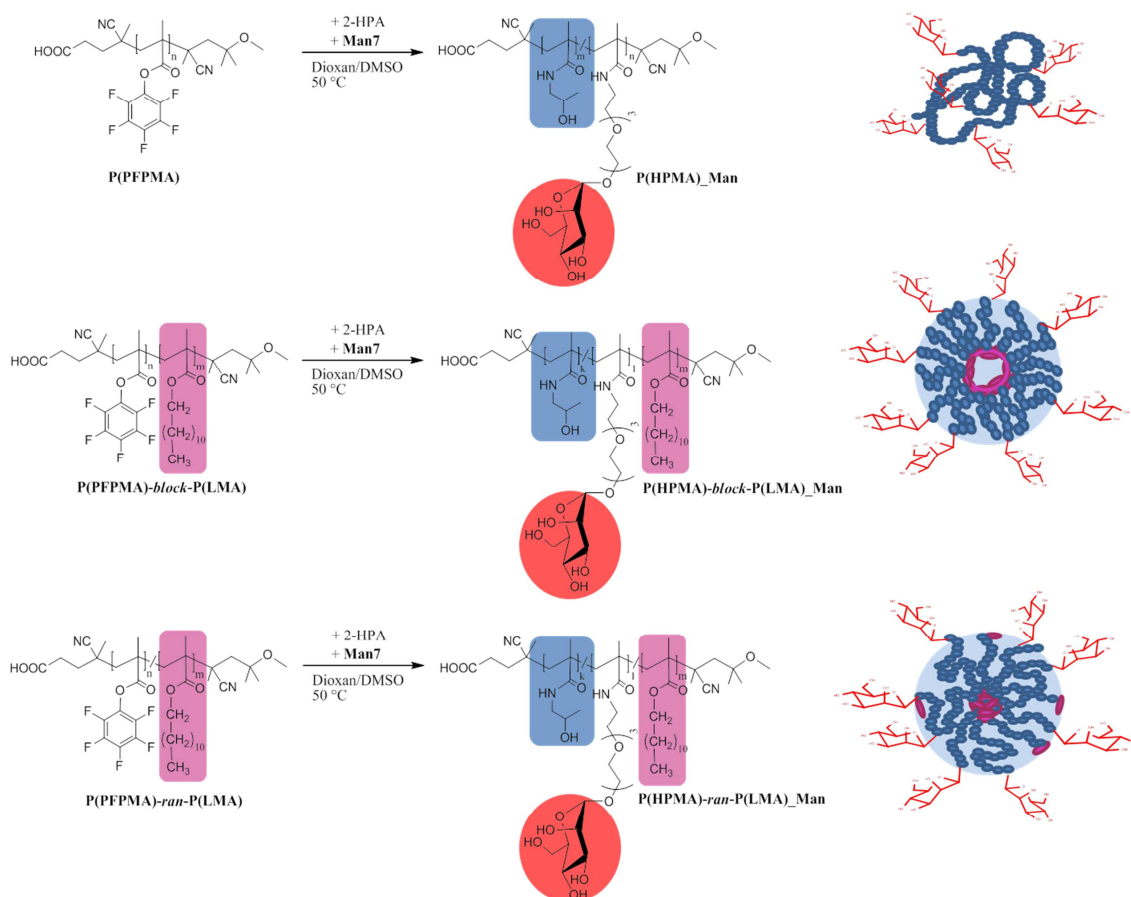
**Abbildung 57:** A)  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum in  $\text{D}_2\text{O}$ , B) HFIP-GPC Plot mit PMMA als Standard, C) inverse gated  $^{13}\text{C-NMR}$  in  $\text{D}_2\text{O}$  und D) DOSY NMR in  $\text{D}_2\text{O}$  von PSar-*block*-PMan.

Durch die Verknüpfung dieser beiden Polymerisationstechniken ist es somit möglich, eng verteilte monodisperse Polypept(o)ide herzustellen und diese erfolgreich in einer anschließenden RAFT-Polymerisation weiter zu funktionalisieren. In diesem Fall wurde Sarcosin-NCA polymerisiert und mit HPMA (M2) und einem Mannosemonomer (M3) umgesetzt. Durch  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie und im Falle des **PSar-*block*-PMan** auch mittels der quantitativen *ig*  $^{13}\text{C-NMR}$  Spektroskopie konnten die Blocklängen dabei sehr präzise bestimmt werden und man erhält monomodale, eng verteilte Polymere. Dabei ist durch die Konfigurationsanalyse der Mannose (siehe 3.6.3 Abbildung 47) zum einen die Bioaktivität gewährleistet und zum anderen durch den polaren und flexiblen Spacer auf Tetraethylenglykolbasis der Targetligand am Polymerrückgrat für die Mannoserezeptoren frei zugänglich.



### 3.7.3 Aminfunktionalisierter Mannoselinker für die polymeranaloge Reaktion der Reaktivester

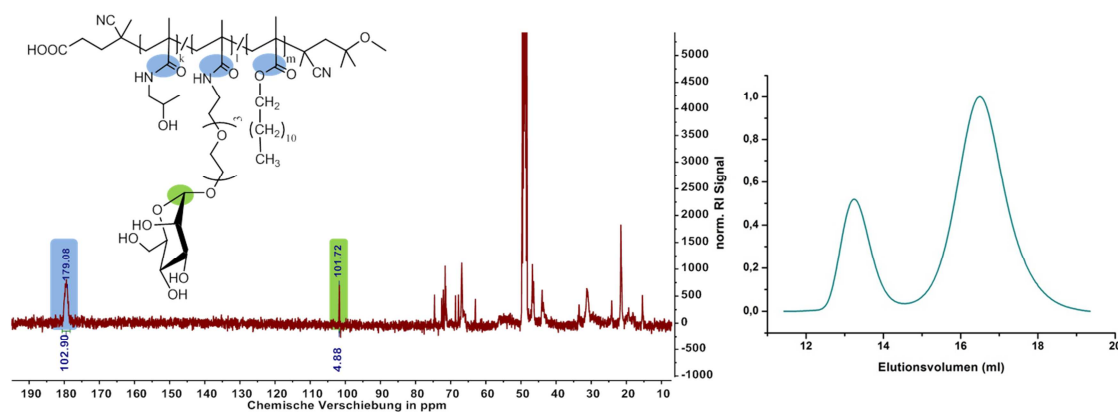
Die primäre Aminfunktion des Mannoselinkers kann auch, zusammen mit 2-Hydroxypropylamin (2-HPA), in der polymeranalogen Reaktion der PFPMA Reaktivesterpolymere eingesetzt werden um HPMA Polymere mit statistisch verteilten Mannoseeinheiten zu erhalten (siehe Schema 24).



**Schema 24:** Synthese von mannosylierten HPMA basierten Polymeren über den Reaktivesteransatz.

Dabei kann der vollständig entschützte Mannoselinker **Man7** (Synthese siehe Kapitel 3.6.3, Schema 20) eingesetzt werden, da die polymeranaloge Reaktion unter den verwendeten Reaktionsbedingungen (siehe Kapitel 3.3) selektiv für primäre Amine ist. Somit ist es möglich, die Menge an Mannose beliebig zu variieren und man erhält mannosylierte wasserlösliche Polymere, deren Targetliganden durch die statistische Verteilung über das Polymerrückgrat sowie durch den polaren flexiblen Spacer auf Tetraethylenglykolbasis, sterisch sehr gut für die Mannoserezeptoren zugänglich sind. Durch den damit einhergehenden Glykokluster Effekt<sup>[45]</sup> sind sie multivalent und die

Bindung an die Mannoserezeptoren wird zusätzlich verstärkt. Auch die Bioaktivität ist durch die Konfigurationsanalyse des Mannoselinkers (**Man7**) über ein gekoppeltes HSQC Spektrum (siehe Kapitel 3.6.3 Abbildung 47) gewährleistet. Um die so synthetisierten HPMA Polymere von freiem Farbstoff und anderen Verunreinigungen zu trennen, werden die Polymere mehrere Tage zunächst gegen Methanol und anschließend gegen Milli-Q Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Die vollständige Umsetzung der Reaktivesterpolymere kann dabei durch  $^{19}\text{F}$ -NMR nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.3). Der Anteil an Mannose konnte bei jedem Polymer mittels quantitativer *ig*  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie sehr präzise ermittelt werden, in dem das Integral der  $-\text{C}=\text{O}$  Kohlenstoffatome des Polymerrückgrats bei 179 ppm mit dem diskret auftretenden C1-Signals des Mannoselinkers bei 101 ppm miteinander ins Verhältnis gesetzt wird (siehe Abbildung 58 links).



**Abbildung 58:** Links: inverse gated  $^{13}\text{C}$ -NMR in MeOD und rechts: HFIP-GPC mit PMMA als Standard von P(HPMA)-*block*-P(LMA)<sub>Man</sub>.

Um die Polymere für die *in vitro* Experimente zu visualisieren wird bei der polymeranalogen Reaktion Oregon Green 488 Cadaverin, ein aminfunktionalisierter Fluoreszenzfarbstoff, zugegeben. Somit konnten unter der Verwendung von einem PFPMA Homopolymer (**P(PFPMA)5**, Synthese siehe Kapitel 3.1 Schema 3 und Tabelle 1), einem PFPMA-LMA Blockcopolymer (**P(PFPMA)-*block*-P(LMA)1**, Synthese siehe Kapitel 3.1 Schema 4 und Tabelle 2) und einem statistischen PFPMA-LMA Copolymer (**P(PFPMA)-*ran*-P(LMA)1**, Synthese siehe Kapitel 3.1 Schema 5 und Tabelle 3) mittels RAFT-Polymerisation und anschließender polymeranaloger Umsetzung nach den Reaktionsbedingungen von Kapitel 3.3 monomodale, engverteilte, mannosylierte Polymere auf HPMA-Basis hergestellt werden (siehe Tabelle 13), wobei die HPMA-LMA Blockcopolymere wie in Kapitel 3.4.1 auch schon gezeigt wurde, in

der HFIP GPC zusätzlich zu den Unimeren Aggregatstrukturen ausbilden (siehe Abbildung 58 rechts).

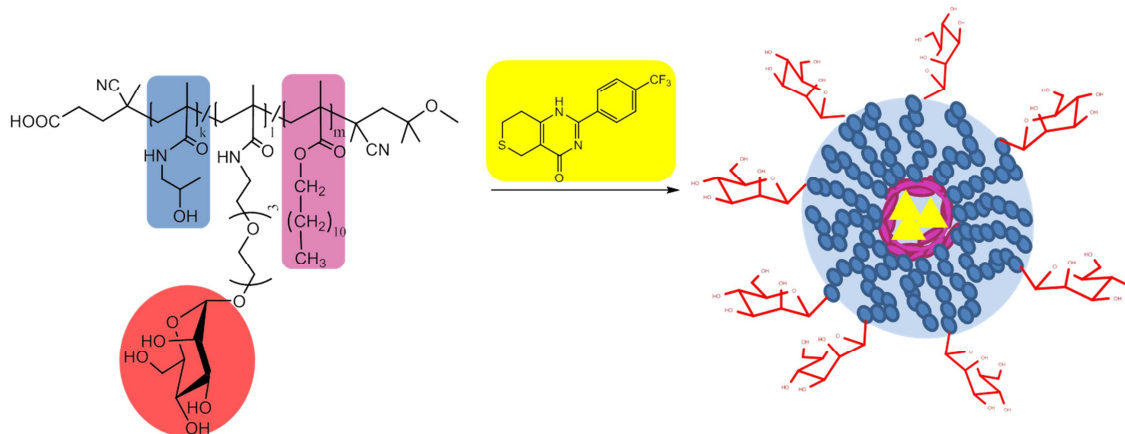
**Tabelle 13:** Eigenschaften der synthetisierten HPMA Polymere. <sup>a</sup> mittels <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie in CDCl<sub>3</sub> der PFPMA Vorläuferpolymere berechnet. <sup>b</sup> mittels ig <sup>13</sup>C-NMR der HPMA Polymere in D<sub>2</sub>O berechnet. <sup>c</sup> mittels GPC mit HFIP als Lösemittel und PMMA Standards gemessen. <sup>d</sup> mittels DLS mit c=0,1 g/L gemessen.

Polymer	Anteil LMA <sup>a</sup>	Anteil Man <sup>b</sup>	M <sub>n</sub> (g/mol) <sup>c</sup>	Đ <sup>c</sup>	R <sub>n</sub> (nm) <sup>d</sup>	μ <sub>2</sub> <sup>d</sup>
<b>P(HPMA)_0</b>	-	-	47.000	1,5	8,5	0,25
<b>P(HPMA)_Man</b>	-	3%	54.100	1,6	7,9	0,25
<b>P(HPMA)-b-P(LMA) (P1)</b>	7,4%	-	31.400	1,3	40,2	0,12
<b>P(HPMA)-b-P(LMA)_XAV</b>	7,4%	-	420.700	1,1	54,1	0,14
<b>P(HPMA)-b-P(LMA)_Man</b>	7,4%	5%	26.700	1,3	44,2	0,13
<b>P(HPMA)-b-P(LMA)_Man+XAV</b>	7,4%	5%	400.000	1,1	51,8	0,15
<b>P(HPMA)-r-P(LMA) (P2)</b>	7%	-	52.700	1,4	-	-
<b>P(HPMA)-r-P(LMA)_XAV</b>	7%	-	-	-	243,9	0,09
<b>P(HPMA)-r-P(LMA)_Man</b>	7%	4%	54.900	1,3	-	-
<b>P(HPMA)-r-P(LMA)_Man+XAV</b>	7%	4%	-	-	87,0	0,17

Diese Blockcopolymere sowie auch die statistischen Copolymer können in Wasser durch Selbstassemblierung mizellare Überstrukturen bilden (siehe Schema 24). Dies konnte auch schon bei mannosylierten Blockcopolypept(o)iden beobachtet werden, die so mit den Mannoserezeptoren von dendritischen Zellen interagieren können und über die clathrin-vermittelte Endocytose erfolgreich aufgenommen werden konnten (siehe Kapitel 3.7.1).

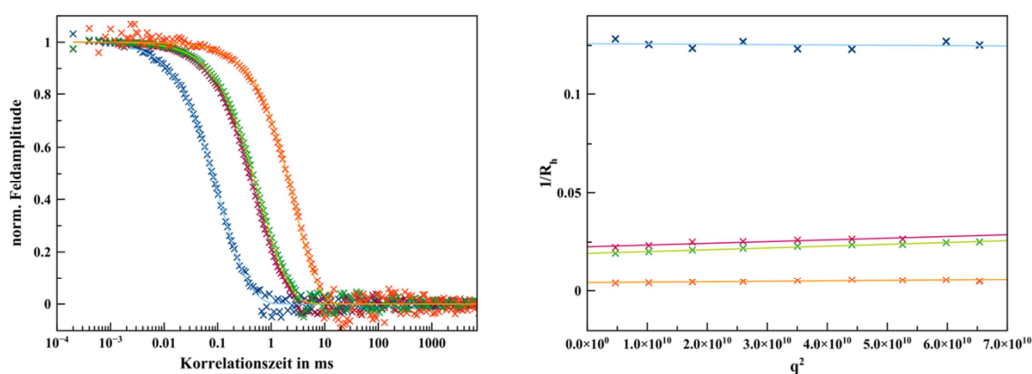
Durch den speziellen Aufbau solcher Poly(HPMA)-basierenden Mizellen, mit einem hydrophoben Kern und einer hydrophilen Schale sind sie, wie Eingangs in Kapitel 1.3.1 ausführlich beschrieben wurde, zusätzlich in der Lage hydrophobe Wirkstoffe einzuschließen und somit „wasserlöslich“ zu machen. Ein interessanter Wirkstoff dafür ist XAV 939. Dieser hydrophobe Wirkstoff kann in diese Mizellen eingelagert werden (siehe Abbildung 59) und greift auch in den Wnt-Signalweg von dendritischen Zellen durch den verstärkten Abbau des Proteins β-Catenin ein. Eine veränderte Aktivität dieses Wnt-Signalwegs und eine damit einhergehende erhöhte Konzentration des β-Catenins, wurde beispielsweise in Brustkrebs gefunden und stellt damit ein attraktives Ziel für die Krebsimmunotherapie dar.<sup>[184][185]</sup>

Um den Wirkstoff in die Polymermizellen einzulagern, wird sowohl das Polymer als auch XAV 939 in DMSO gelöst und diese Lösung langsam in Milli-Q Wasser getropft. Bei einer anschließenden Aufreinigung mittels präparativer Wasser GPC konnte kein freier Wirkstoff detektiert werden und das DMSO wurde vollständig abgetrennt.



**Abbildung 59:** Mizellbildung unter einschließen des hydrophoben Wirkstoffes XAV 939 am Beispiel des mannosylierten HPMA-LMA Blockcopolymers (P(HPMA)-*block*-P(LMA)\_Man).

Die erhaltene leicht trübe Lösung wurde dann von B. Weber mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) untersucht. Zusätzlich wurden zum Vergleich Mizellen ohne den Wirkstoff synthetisiert und ebenfalls in DLS Messungen untersucht (siehe Abbildung 60). Dabei wurden die Konzentrationen analog zu den späteren Zellexperimenten gewählt ( $c=0,1$  mg/ml).

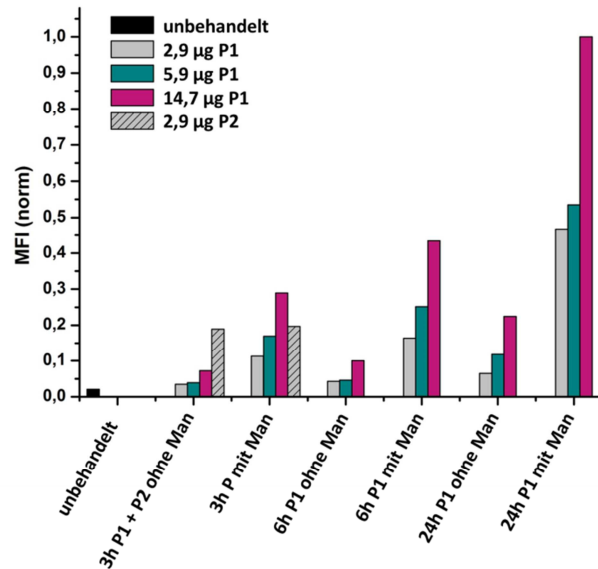


**Abbildung 60:** Links: DLS Autokorrelationsfunktionen bei  $90^\circ$  und rechts: die Bestimmung der hydrodynamischen Radien  $R_h$  (Rohdatenpunkte und die dazugehörige Fitfunktion von P(HPMA)\_Man (blau), P(HPMA)-*b*-P(LMA)\_Man (lila), P(HPMA)-*b*-P(LMA)\_Man+XAV (grün) und P(HPMA)-*r*-P(LMA)\_Man+XAV (orange)).

Die dynamische Lichtstreuung zeigt für die HPMA Homopolymere (blaue Korrelationskurve in Abbildung 60 links) einen deutlich kleineren hydrodynamischen Radius ( $R_h = 7,9$  bzw.  $8,5$  nm, siehe auch Tabelle 13) als für die HPMA-LMA

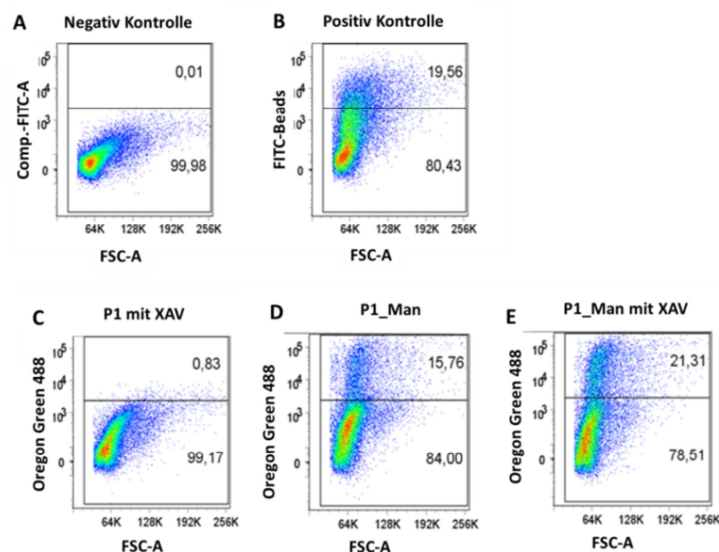
Blockcopolymer **P1** (lila Korrelationskurve in Abbildung 60 links). Da HPMa Homopolymere keine hydrophoben Teilbereiche aufweisen, sind sie besser in Wasser löslich und können somit auch keine Mizellen bilden. Werden die Blockcopolymer mit dem Wirkstoff beladen vergrößert sich der hydrodynamische Radius von 44,2 auf 51,8 nm (grüne Korrelationskurve in Abbildung 60 links). Dabei ist bei dieser Konzentration von 0,1 mg/ml in Milli-Q Wasser keine Ausbildung größer Aggregatstrukturen, wie sie in der HFIP GPC ( $c=2$  mg/ml) auftreten, zu beobachten. Die statistischen Copolymer **P2** können erst mit Wirkstoff sinnvoll mittels DLS vermessen werden, da vorher mehrere Populationen (Unimere, Mizellen und Aggregate) vorliegen. Durch XAV 939 können sich die hydrophoben Bereiche der statistischen Copolymer um das hydrophobe Molekül anordnen und bilden vorwiegend Partikel mit einer Größe von 87,0 nm (orangene Korrelationskurve in Abbildung 60). Insgesamt liegen jedoch sowohl die mannosylierten Blockcopolymer als auch die mannosylierten statistischen Copolymer in der Größenordnung für eine clathrin-vermittelte Endocytose vor und wurden von C. Kappel (Hautklinik Universität Mainz) so für Zellaufnahmeversuche an unbehandelten Knochenmarksabgeleiteten dendritischen Zellen (untouched BMDCs) eingesetzt. Dazu wurden zunächst die nicht beladenen Blockcopolymer (**P1**) in Kinetikstudien bei drei unterschiedlichen Konzentrationen untersucht (Abbildung 61). In allen Fällen steigt die Aufnahme aller Polymere mit der Zeit an, wobei die mannosylierten Blockcopolymer (**P1\_Man**) im Vergleich deutlich stärker aufgenommen werden. Dies bestätigt wiederum die Ergebnisse der Zellversuche der mannosylierten Blockcopolymer aus Kapitel 3.7.1, dass auch in diesem Fall die Partikel durch die Interaktion der angebundenen Mannose mit den Mannoserezeptoren der dendritischen Zellen über eine clathrin-vermittelte Endocytose verstärkt aufgenommen werden. Die nicht funktionalisierten Blockcopolymer zeigen auch hier eine geringe Aufnahme, was durch andere Aufnahmemechanismen, wie beispielsweise die Makropinocytose, hervorgerufen werden kann. Die statistischen Copolymer (**P2**) zeigen im Gegensatz dazu bereits nach 3 h mit 2,9  $\mu\text{g}$  Polymer keinen signifikanten Zellaufnahmeunterschied zwischen den mannosylierten und den nicht mannosylierten Partikeln (grau-gestreifte Balken in Abbildung 61). Dies kann daran liegen, dass die hydrophoben Teilbereiche durch die „statistische“ Verteilung auch in die hydrophile Corona ragen. Dadurch können hydrophobe Teilbereiche an der Oberfläche des Partikels liegen, mit der Zellmembran interagieren und somit unspezifisch aufgenommen werden. Auch die breite Verteilung der Partikel (kleine Unimere,

Mizellen und große Aggregate) führt durch unterschiedliche Zellaufnahmewege zu einer eher unspezifischen Aufnahme der Partikel. So werden die Partikel der statistischen Copolymere zwar insgesamt besser aufgenommen, jedoch ist eine spezifische und verbesserte Aufnahme durch die Mannosylierung nicht zu beobachten.



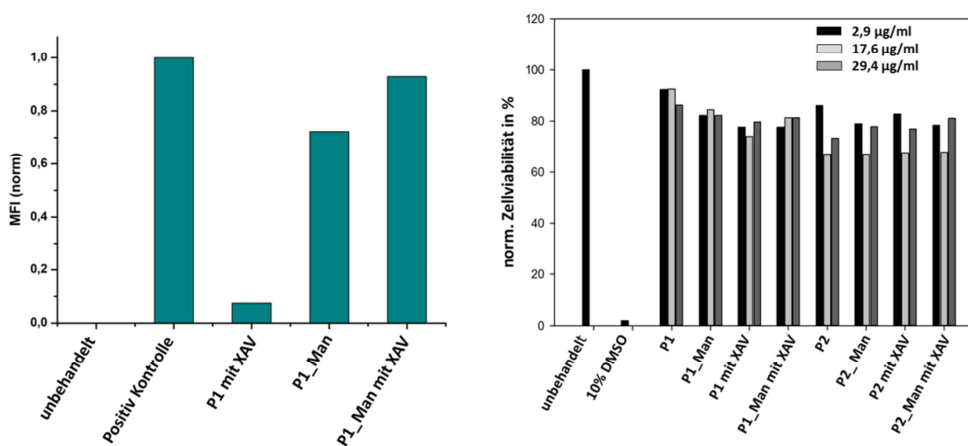
**Abbildung 61:** Kinetikstudien nach 3, 6 und 24 h Inkubationszeit von untouched BMDCs von P(HPMA)-*block*-P(LMA)<sub>Man</sub> (P1).

In einer weiteren Studie wurden von M. Bros nun die mit XAV 939 beladenen Blockcopolymere und deren Anbindung an BMDCs mittels Durchflusszytometrie (*engl. Fluorescence-activated cell sorting*, FACS) untersucht (Abbildung 62).



**Abbildung 62:** Durchflusszytometrische Messung (FACS) von mit XAV beladenen P(HPMA)-*b*-P(LMA) Mizellen an untouched BMDCs. A) Negativ Kontrolle. B) Positiv Kontrolle. C) P(HPMA)-*b*-P(LMA)<sub>XAV</sub> (P1 mit XAV). D) P(HPMA)-*b*-P(LMA)<sub>Man</sub>. (P1<sub>Man</sub>) E) P(HPMA)-*b*-P(LMA)<sub>Man</sub>+XAV (P1<sub>Man</sub> mit XAV).

Auch in diesem Fall werden die mannosylierten Partikel (Abbildung 62 D) stärker aufgenommen als die nicht-funktionalisierten Mizellen der Blockcopolymere (Abbildung 62 C). Zusätzlich sieht man, dass die beladenen mannosylierten Mizellen etwas stärker aufgenommen werden als die unbeladenen. Dies kann daran liegen, dass sich der hydrodynamische Radius der beladenen Mizellen von 44.2 auf 51.8 nm vergrößert und sich leichter über die clathrin-vermittelte Endocytose aufnehmen lassen. Verdeutlicht wird dies nochmal in Abbildung 63 links. Um zu zeigen, dass die Polymere auf die BMDCs keine zytotoxische Wirkung haben, wurde mittels MTT Assay (C. Kappel) die Zellviabilität aller Systeme bei verschiedenen Konzentrationen nachgewiesen (siehe Abbildung 63 rechts).



**Abbildung 63:** Links: Vergleich der Aufnahme von untouched BMDCs von mit XAV 939 beladenen Mizellen (n=2). Rechts: MTT Assay zur Messung der Zellviabilität aller Polymersysteme

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass sowohl HPMA-LMA Blockcopolymere, als auch statistische HPMA-LMA Copolymere mit ungefähr 4-5% Mannose als Targetligand synthetisiert werden konnten. Über den Reaktivesteransatz war es möglich, in nur einem Schritt sowohl die wasserlösliche Polymerrückgratgruppe (2-HPA), die Mannosefunktionalität als auch den Fluoreszenzfarbstoff für die Visualisierung *in vitro* herzustellen. Die Mannose konnte dabei quantitativ mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie ermittelt werden und die dynamische Lichtstreuung zeigte, dass die gebildeten Mizellen mit unter 100 nm für eine clathrin-vermittelte Endocytose über den Mannoserezeptor geeignet sind. Die mannosylierten Blockcopolymere wurden dabei überwiegend spezifisch aufgenommen; die statistischen Copolymere zeigten hingegen durch die Interaktion der hydrophoben Bereiche an der Partikeloberfläche eine überwiegend unspezifische Aufnahme. Die Blockcopolymere konnten dann erfolgreich

mit XAV 939 als hydrophoben Wirkstoff beladen werden und zeigten in den Aufnahmestudien von untouched BMDCs wieder eine verstärkte Aufnahme durch die Mannosefunktionen an der Oberfläche. Damit ist es also möglich diese mannosylierten HPMA-LMA Blockcopolymere zu verwenden um gezielt einen Wirkstoff an Zellen des Immunsystems zu adressieren.



---

### 3.8 Radioaktive Markierung

In den vorherigen Kapiteln wurde ausführlich auf die Funktionalisierung von Polymeren mit Targetstrukturen (z.B. mit Bombesin siehe Kapitel 3.5.1 und Mannose siehe Kapitel 3.7) und Fluoreszenzfarbstoffen für die Visualisierung *in vitro* eingegangen. Dabei zeigten sowohl die auf Polypept(o)idbasis synthetisierten Mizellen (Kapitel 3.7.1 und 3.7.2), als auch die nanopartikulären HPMA basierten Wirkstofftransporter (Kapitel 3.7.3) in Zellaufnahmestudien von BMDCs eine mannoserezeptor spezifische und verstärkte Aufnahme. Um diese Systeme nun auch *in vivo* testen zu können, sollen im Folgenden Strategien für eine radioaktive Markierung der Polymerstrukturen vorgestellt werden. Durch die Möglichkeit der molekularen Bildgebung mittels PET (Positron Emissions Tomographie, siehe dazu auch Kapitel 1.8) kann so nicht nur die Verteilung der Polymersysteme in den Organen sichtbar gemacht werden, sondern es ist zusätzlich auch eine quantitative Auswertung möglich. Wie in Kapitel 1.8.1 beschrieben wurde, kann durch die Anbindung eines bifunktionellen Chelators an das Polymersystem das entsprechende Radionuklid komplexiert werden. Eine andere Möglichkeit wäre die Beladung von Polymermizellen mit einem hydrophoben radioaktiven Komplex. Beide Strategien werden in den folgenden Kapiteln näher beschrieben, wobei hauptsächlich  $^{68}\text{Ga}$  als Radionuklid verwendet, da es, wie in Kapitel 1.8.1 schon erwähnt wurde, jederzeit nach Bedarf kostengünstig über ein  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  Generatorsystem produziert werden kann. Dafür wird das  $^{68}\text{Ga}$ -Radionuklid von A. De la Fuente (Kernchemie Universität Mainz) über den  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Radionuklidgenerator hergestellt. Das langlebige  $^{68}\text{Ge}$  wird dabei nach der radiochemischen Abtrennung vom bestrahlten Target auf einer Matrix fixiert, auf der sich das Mutternuklid kontinuierlich unter Elektroneneinfang in das Tochternuklid  $^{68}\text{Ga}$  umwandelt.



Dieses kann dann mit verdünnter Salzsäure eluiert werden. Um Verunreinigungen, wie gewisse Anteile von  $^{68}\text{Ge}$  (Durchbruch),  $^{136}\text{Zn}$  und Trägermaterial zu entfernen, wird in einem „Post-Processing“ dieses Eluat über einen Kationenaustauscher geleitet. Dort wird selektiv das  $^{68}\text{Ga}$  absorbiert und kann mit verschiedenen Lösemitteln wieder eluiert werden.<sup>[186,187]</sup>

Da  $^{68}\text{Ga}$  jedoch mit einer Halbwertszeit von 67,71 Minuten zerfällt, ist es für Langzeitbiodistributionsstudien *in vivo* weniger geeignet.

Daher soll am Ende dieses Kapitels ein kleiner Ausblick auf die Verwendung von  $^{89}\text{Zr}$  als Radionuklid gegeben werden.  $^{89}\text{Zr}$  hat nicht nur eine deutlich längere Halbwertszeit (3,27 Tage), sondern kann zusätzlich unter sehr milden Bedingungen mit Desferoxamin B (DFO) einen sehr stabilen Komplex bilden. Da sowohl die Glykopolymere durch ihre Zuckerstrukturen, als auch die Peptidstrukturen der Blockcopolypept(o)ide empfindlich gegenüber hohen Temperaturen und extremen pH-Werten sind, wäre eine Markierung dieser Systeme mit  $^{89}\text{Zr}$  von Vorteil.

### 3.8.1 Radioaktive Mizellen

Wie in Kapitel 3.7.3 beschrieben, ist es möglich HPMA-LMA Blockcopolymere erfolgreich mit einem hydrophoben Wirkstoff zu beladen. Die Aufreinigung der Mizellen mittels präparativer Wasser GPC wies keinen freien Wirkstoff auf und eine anschließende Vermessung der Mizellen mit dynamischer Lichtstreuung (DLS) zeigte eine Vergrößerung des hydrodynamischen Radius. Um nun die Stabilität solcher gebildeter Mizellen zu untersuchen, kann die Beladung durch einen hydrophoben radioaktiven Komplex ausgenutzt werden. Dabei werden die Mizellen bei 37 °C in einer Serumprotein-Lösung inkubiert und die austretende Radioaktivität ermittelt. Sind die gebildeten Mizellen stabil, können sie so auch *in vivo* eingesetzt werden um mittels PET Messung die Biodistribution zu untersuchen.

In Kapitel 3.4 wurde beschrieben, dass PEGylierte Systeme durch ihre *Stealth*-Eigenschaften die Interaktion mit den Bestandteilen des Blutes verringern, weswegen PEG immer noch vorherrschend im Bereich der Trägermaterialien für den Wirkstofftransport ist. Zusätzlich konnte auch gezeigt werden, dass durch eine Funktionalisierung von HPMA-LMA Blockcopolymeren mit PEG<sub>2kDa</sub>-Seitenketten die Löslichkeit der Polymere in Hexafluoroisopropanol (HFIP) verbessert und die Bildung von Aggregatstrukturen verringert werden konnte (siehe dazu auch Kapitel 3.4.1, Abbildung 40) Deswegen soll nun im Folgenden neben dem Vergleich von einem statistischen Copolymer (**P(PFPMA)-*ran*-P(LMA)2**, Synthese siehe Kapitel 3.1, Schema 5 und Tabelle 3) und einem Blockcopolymer (**P(PFPMA)-*block*-P(LMA)2**, Synthese siehe Kapitel 3.1 Schema 4 und Tabelle 2) ein analoges 10%iges PEGyliertes Blockcopolymer (Synthese siehe Kapitel 3.4.1, Schema 12, Tabelle 9 und Tabelle 10) untersucht werden, um herauszufinden ob die Funktionalisierung der Partikel mit PEG zu einer verbesserten Abschirmung vor Serumproteinen führt. Dabei wurde basierend auf den vielversprechendsten Systemen in Vorarbeiten von Allmeroth und Moderegger

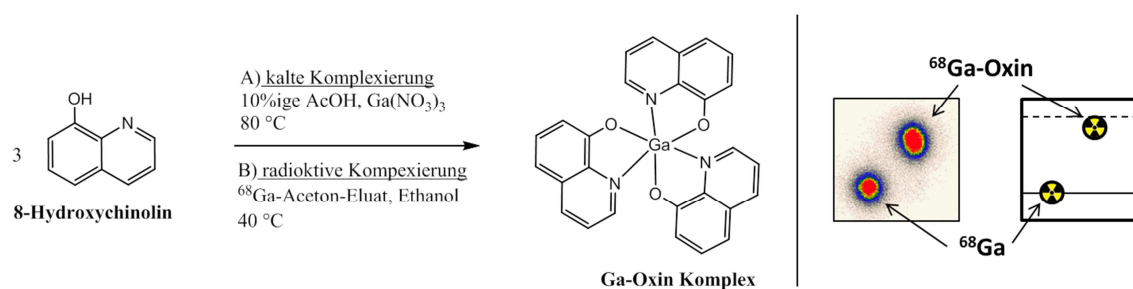
*et al.*<sup>[188][152]</sup> Polymere in analoger Größenordnung, PEG Funktionalisierung und LMA Anteil synthetisiert. Die verwendeten Polymere sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Als hydrophobe Komponente wird <sup>68</sup>Ga-Oxin eingesetzt (siehe Schema 25). Dieser Komplex konnte bereits erfolgreich für die Markierung von Blutplättchen verwendet werden und bildet einen stabilen Komplex mit hohen Komplexbildungskonstanten ( $K_1=14.5$ ,  $K_2=13.5$ ,  $K_3=12.5$ ).<sup>[189][190]</sup>

**Tabelle 14:** Eigenschaften der eingesetzten Polymere für die radioaktive Beladung.

Polymer	M <sub>n</sub> PFPMA-LMA Vorläufer	Đ	Anteil LMA	M <sub>n</sub> HPMA-LMA Polymer	M <sub>n</sub> in g/mol	Đ
P(HPMA)- <i>r</i> -P(LMA)2	68.400 g/mol	1,2	20%	44.400 g/mol	76.300	1,4
P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA)1	26.800 g/mol	1,3	23%	17.800 g/mol	26.000	1,3
P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA)PEG	26.800 g/mol	1,3	23%	36.400 g/mol	46.000	1,3

Da eine ausschließliche Beladung mit radioaktivem Komplex zu einer zu hohen radioaktiven Strahlung führen würde, wird hauptsächlich der „kalte“ Ga-Oxin Komplex eingesetzt. Dieser wurde von A. De la Fuente synthetisiert in dem 8-Hydroxychinolin in 10%iger Essigsäure gelöst, langsam mit Gallium(III)nitrat versetzt und bei 80 °C inkubiert wurde. Bei einem pH-Wert von 7,0 fällt dann der Ga-Oxin Komplex als gelber Niederschlag aus und wird so für die zusätzliche Beladung der Mizellen eingesetzt (siehe Schema 25 links A). Für den radioaktiven <sup>68</sup>Ga-Oxin Komplex wird das benötigte <sup>68</sup>Ga mittels Aceton vom Kationenaustauscher eluiert und mit einer ethanolischen 8-Hydroxychinolin-Lösung bei 40 °C inkubiert (A. De la Fuente). Der Nachweis einer erfolgreichen Komplexierung erfolgte dabei mittels Radiodünnschichtchromatographie (siehe Schema 25 rechts).



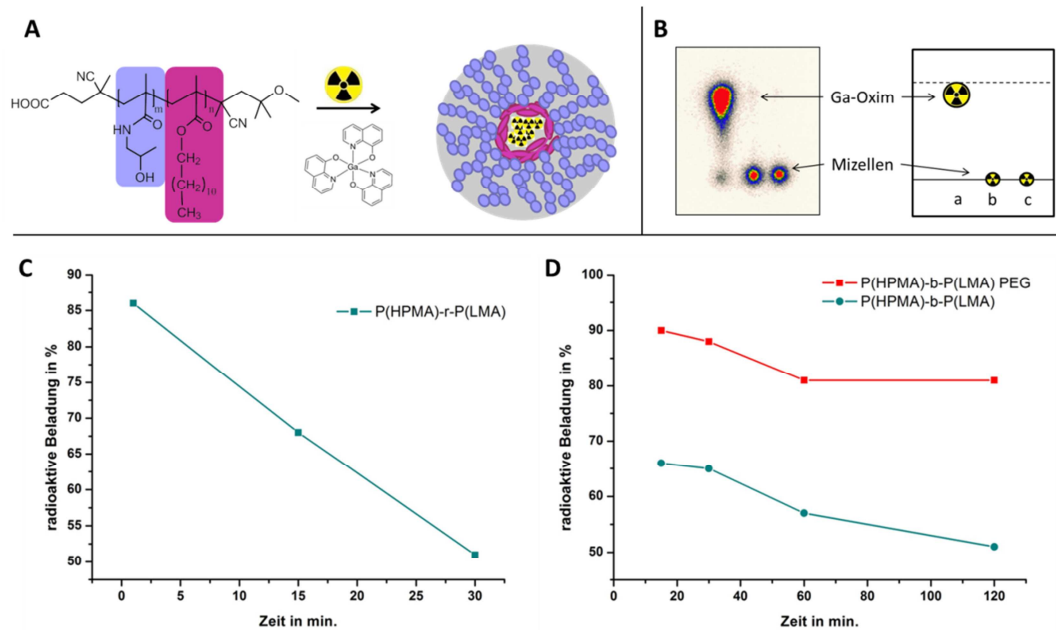
**Schema 25:** Links: Synthese des Ga-Oxin Komplexes. A) kalte Komplexierung. B) radioaktive Komplexierung. Rechts: Radiodünnschichtchromatogramm in CHCl<sub>3</sub>/MeOH (95:5) für den Nachweis, dass das Radionuklid <sup>68</sup>Ga komplett komplexiert wurde (durchgeführt von A. De la Fuente).

Um die Mizellen zu beladen, werden jeweils 5 mg des Polymers und 150 gew% des kalten Galliumkomplexes in DMSO gelöst und mit 600 µl des aktiven <sup>68</sup>Ga-Oxin

Komplexes in Natriumacetat Puffer versetzt. Anschließend werden 1 ml 0,9%ige NaCl-Lösung langsam unter vortexen tropfenweise zugefügt (siehe Abbildung 64 A) und die trübe Mizellösung zur Abtrennung von möglichen freien Ga- und  $^{68}\text{Ga}$ -Ionen über eine präparative Sephadex G-25 Säule mit 0,9% NaCl-Lösung als Eluent aufgereinigt. Somit können die Mizellen für eventuelle *in vivo* Experiment direkt eingesetzt werden. Die Bildung der Mizellen wurde dann direkt mittels Riodünnschichtchromatographie überprüft (siehe Abbildung 64 B). Dabei wurde als Eluent Zitronensäurepuffer bei  $\text{pH} = 4$  verwendet, in dem der  $^{68}\text{Ga}$ -Oxin Komplex mit der Laufmittelfront nach oben wandert ( $R_f = 0.8$ ). Freie  $^{68}\text{Ga}$ -Ionen bleiben bei dem aufgetragenen  $^{68}\text{Ga}$ -Oxin Komplex wegen ihrer Ionenstärke an der Startfront hängen (Abbildung 64 B Auftragung a). Die aufgereinigten Mizellen werden aufgrund des hohen Molekulargewichts der Polymere nicht mit eluiert und können durch die radioaktive Beladung an der Startlinie nachgewiesen werden ( $R_f = 0$ ). Anschließend werden dann 50  $\mu\text{l}$  der radioaktivmarkierten Mizellösung zu 500  $\mu\text{l}$  einer vorgewärmten 0,9%igen NaCl-Lösung und zu 250  $\mu\text{l}$  humanem Serum gegeben und 2 h bei 37 °C inkubiert und nach jeweils 15, 30, 60 und 120 min. mittels Riodünnschichtchromatographie ausgewertet. Dafür werden die Bereiche des  $R_f$ -Wertes des  $^{68}\text{Ga}$ -Oxins und die der beladenen Mizellen auf dem Dünnschichtchromatogramm integriert und so die radioaktive Beladung zu den jeweiligen Zeitpunkten von A. De la Fuente ausgerechnet (siehe Abbildung 64 C und D).

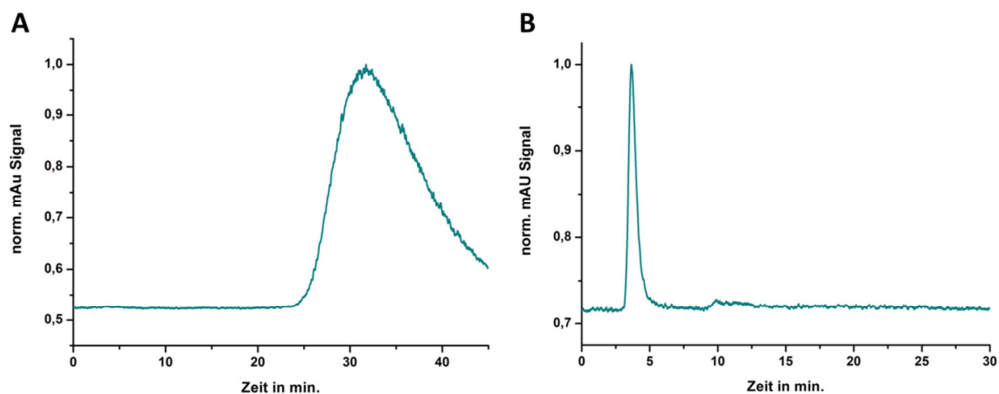
Dabei kann man deutlich erkennen, dass bei der Beladung der statistischen Copolymere bereits nach 15 min. Inkubation mit humanen Serumproteinen der  $^{68}\text{Ga}$ -Oxin Komplex aus den Mizellen austritt. Nach 30 min. sind die Mizellen nur noch mit 50% der Ausgangskonzentration an Radioaktivität beladen (Abbildung 64 C). Dies war zu erwarten, da statistische Copolymere durch ihre hydrophoben Teilbereiche, die auch an der Oberfläche der Mizellen auftreten können, leichter mit den hydrophoben Bereichen der Serumproteine wechselwirken können und somit teilweise den hydrophoben  $^{68}\text{Ga}$ -Oxin Komplex an diese abgeben. Im Gegensatz dazu sind die aus den Blockcopolymeren gebildeten Mizellen stabiler, da nach 30 min. noch 65% der radioaktiven Beladung in den Mizellen detektierbar ist. Durch ihren strukturellen Aufbau ist der radioaktive Komplex im Inneren der Mizelle schwerer durch die Proteine zugänglich und somit besser geschützt. Trotzdem scheint es auch hier eine Interaktion der hydrophilen HPMA Korona mit den Serumproteinen zu geben, da nach 2 h die radioaktive Beladung auf 50% sinkt. Im Gegensatz dazu scheint die

Oberflächenfunktionalisierung mit PEG<sub>2kDa</sub> die Blockcopolymermizelle stärker von den Proteinen abzuschirmen, da selbst nach 2 h noch eine Beladung von über 80% zu detektieren ist (siehe Abbildung 64 D).



**Abbildung 64:** A) Mizellbildung unter gleichzeitiger radioaktiver Beladung mit  $^{68}\text{Ga}$ -Oxim. B) Radiodünnschichtchromatogramm des Ga-Oxim Komplexes (a) und PEGylierter radioaktiv beladene Blockcopolymer Mizellen nach 15 min (b) und 30 min (c) Inkubation mit Serumproteinen bei 37 °C. C) und D) Stabilitätstest der mit  $^{68}\text{Ga}$ -Oxim Komplex beladenen Mizellen bei 37 °C in humaner Serumproteinlösung. Links: P(HPMA)-*ran*-P(LMA) Mizellen. Rechts: P(HPMA)-*block*-P(LMA)PEG Mizellen (rot) und P(HPMA)-*block*-P(LMA) Mizellen (blau).

Auch eine anschließende präparative HPLC, ausgestattet mit einer Sephadex G-25 Säule, zeigt bei den PEGylierter Blockcopolymermizellen keinen detektierbaren freien  $^{68}\text{Ga}$ -Oxim Komplex an (siehe Abbildung 65 A) freier  $^{68}\text{Ga}$ -Oxim Komplex und B) beladene PEGylierte Blockcopolymermizellen nach 2 h Inkubation mit Serumproteinen).

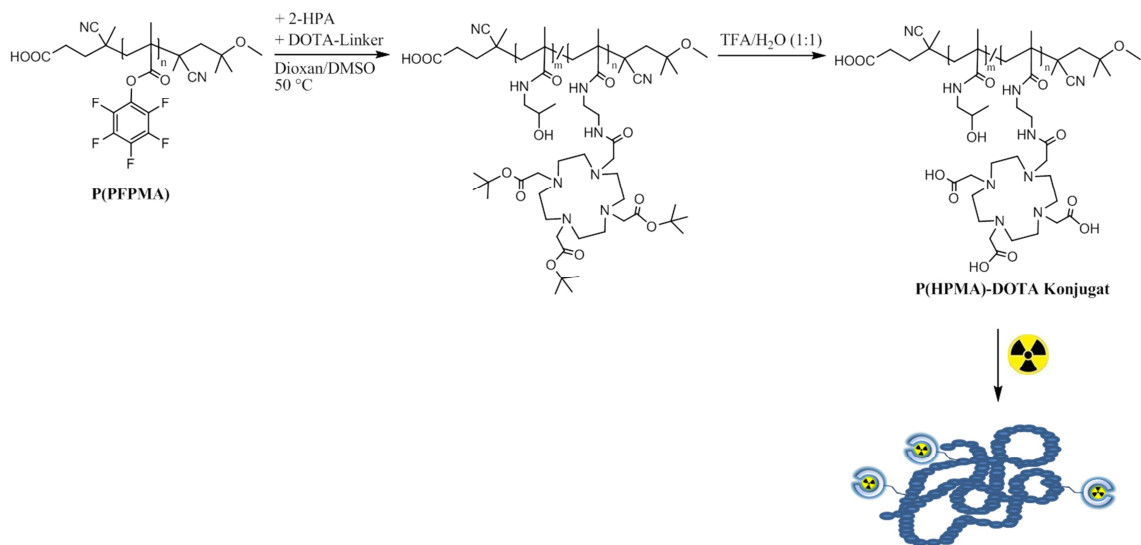


**Abbildung 65:** HPLC Radiochromatogramme A) freier  $^{68}\text{Ga}$ -Oxim Komplex. B) P(HPMA)-*b*-P(LMA) PEG beladene radioaktive Mizellen nach 120 min. Inkubation bei 37 °C mit Serumproteinen.

Es konnte also gezeigt werden, dass die radioaktive Beladung mit  $^{68}\text{Ga}$ -Oxin als hydrophobem Komplex sowohl bei statistischen HPMA-LMA Copolymeren, als auch bei HPMA-LMA Blockcopolymeren möglich ist. Die Blockcopolymeren zeigten dabei in humanem Blutserum eine signifikant höhere Stabilität der Mizellen, als die der beladenen statistischen Copolymeren. Die Funktionalisierung der Blockcopolymeren mit PEG<sub>2kDa</sub> führte dabei zu einer zusätzlichen Abschirmung des radioaktiven Kerns der Mizellen. Dies konnte zum einen durch radiodünnschichtchromatographische Auswertungen und zum anderen durch die Analyse mittels Radio HPLC nachgewiesen werden. Mit dieser Methode, einen hydrophoben radioaktiven Komplex mit in Polymermizellen einzulagern, kann somit sehr schnell und leicht die Stabilität von beladenen Mizellen gegenüber Serumproteinen festgestellt werden. In diesem Fall zeigt diese Methode noch einmal deutlich den Effekt der PEGylierung und der dadurch resultierenden besseren Abschirmung vor Serumproteinen.

### 3.8.2 Radioaktive Anbindung über die polymeranaloge Reaktion von aminfunktionalisierten Chelatoren

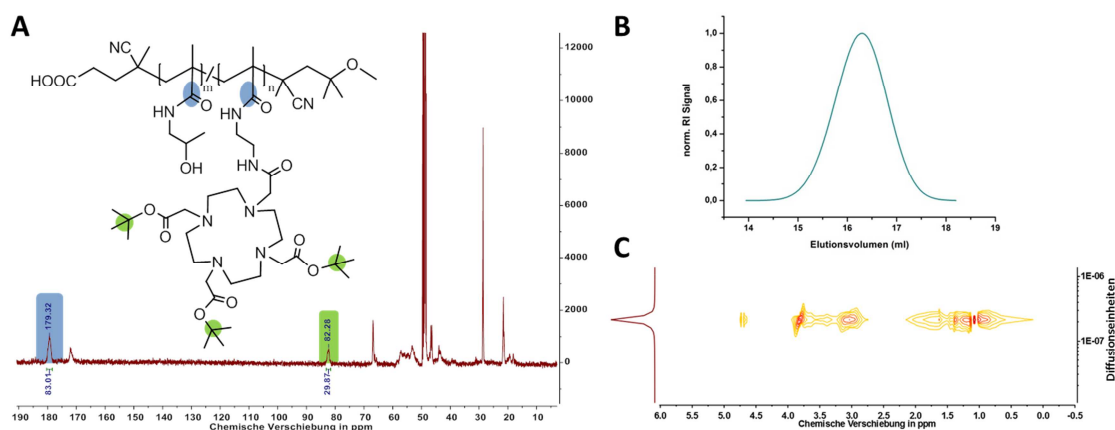
Eine weitere Methode, um nanopartikuläre Trägermaterialien radioaktiv zu markieren, ist die Funktionalisierung des Polymers mit einem Chelator, der dann in der Lage ist das gewünschte Radionuklid zu komplexieren. Dafür sind hocheffiziente Chelatoren nötig, damit der gebildete Komplex stabil ist. Der in der Nuklearmedizin am häufigsten verwendete Chelator ist 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA), da dieser mit vielen Nebengruppen- und Übergangsmetallen, also auch mit  $^{68}\text{Ga}$ , Komplexe mit extrem hoher Stabilität bildet. Im Falle der Synthese von HPMA Polymeren über den Reaktivesteransatz, kann der kommerziell erhältliche  $^t\text{Bu}_3$ -DOTA Chelator so nicht eingesetzt werden sondern muss mit einer frei zugänglichen primären Aminogruppe modifiziert werden. Der aminfunktionalisierte DOTA-Ligand wurde dabei von Eppard *et al.*<sup>[191]</sup> und A. Fuente der Arbeitsgruppe Rösch (Kernchemie Universität Mainz) synthetisiert und konnte so über die polymeranaloge Reaktion der Reaktivesterpolymere an das Polymerrückrad angebunden werden (siehe Schema 26).



**Schema 26:** Synthese des P(HPMA)-DOTA Konjugats und schematische Darstellung des radioaktiv markierten P(HPMA) Konjugats.

Dabei wurde immer ausgehend von demselben PFPMA Vorläufer Polymer (**P(PFPMA)6**, Synthese siehe Kapitel 3.1 Schema 3 und Tabelle 1) verschiedene Anteile des mit tert. Butyl geschützten DOTA-Liganden angebunden (**P(HPMA)-DOTA 1-4**), sowie eine negativ Kontrolle als vergleich ohne DOTA (**P(HPMA)-0**) angefertigt. Die Umsetzung erfolgte dabei analog zu den in Kapitel 3.3 beschriebenen Reaktionsbedingungen und wurde mittels  $^{19}\text{F}$ -NMR überprüft. Der Anteil an DOTA

konnte mittels der quantitativen  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie (ig  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie) ermittelt werden, in dem das Integral der Amid-Kohlenstoffatome des Polymerrückgrats bei 179 ppm mit den diskret auftretenden quartären Kohlenstoffatomen der tert. Butylschutzgruppe bei 82,8 ppm miteinander ins Verhältnis gesetzt wurde (siehe Abbildung 66 A).



**Abbildung 66:** A) inverse gated  $^{13}\text{C}$ -NMR eines  $^1\text{Butyl}$ -blockierten P(HPMA)-DOTA Konjugats zur Berechnung des DOTA Anteils in MeOD, B) HFIP GPC mit PMMA Standard und C) DOSY eines entschützten P(HPMA)-DOTA Konjugats in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Um die Carboxylgruppen für die Komplexierung frei zugänglich zu machen, wurden die P(HPMA)-DOTA Konjugate mit einer Mischung aus Wasser und Trifluoressigsäure (TFA) behandelt und anschließend mittels Dialyse aufgereinigt. Die so erhaltenen P(HPMA)-DOTA Konjugate wurden mittels GPC mit Hexafluoroisopropanol als Eluent untersucht und zeigten eine monomodale Verteilung mit geringen Dispersitäten ( $\bar{M}$  zwischen 1,2 und 1,3). Durch die Detektion von nur einer diffundierenden Spezies mittels DOSY, einer Art Feldgradienten NMR-Spektroskopie, konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die P(HPMA)-DOTA Konjugate frei von Verunreinigungen sind und kein freier DOTA-Linker mehr vorhanden war. Die Eigenschaften, sowie die Anteile an DOTA der synthetisierten HPMA-Polymere sind in Tabelle 15 aufgelistet, wobei die Molekulargewichte durch die Erhöhung der DOTA Anteile ansteigen.

Diese mit DOTA funktionalisierten HPMA Polymere können nun mit  $^{68}\text{Ga}$  radioaktiv markiert werden. Dafür werden verschiedene Anteile an Polymerlösung in Wasser (10 nmol, 20 nmol und 40 nmol) mit  $^{68}\text{Ga}$  Eluat inkubiert. Um Metallradionuklide stabil mit DOTA-Derivaten zu komplexieren sind relative hohe Temperaturen nötig (ca.  $95\text{ }^\circ\text{C}$ ). Deswegen werden alle Markierungsexperimente der HPMA-DOTA Konjugate bei  $95\text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt (A. De la Fuente). Um eine unspezifische radioaktive Markierung



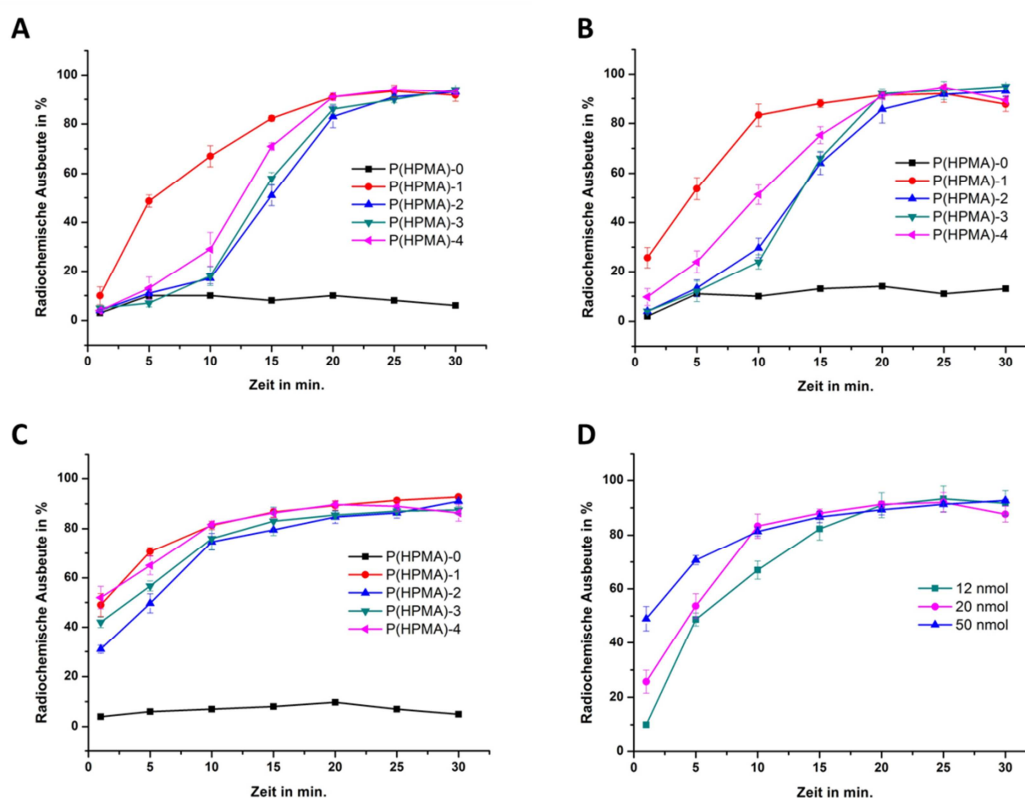
der HPMA Polymere auszuschließen wurde ein HPMA Polymer ohne DOTA Ligand (**P(HPMA)-0**) unter den gleichen Reaktionsbedingungen untersucht und mit den HPMA-DOTA Konjugaten verglichen.

**Tabelle 15:** Eigenschaften der P(HPMA)-DOTA Konjugate. <sup>a</sup> berechnet aus dem PFPMA Vorläufer Polymer. <sup>b</sup> gemessen mittels HFIP GPC mit PMMA als Standard. <sup>c</sup> mittels inverse gated <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie in MeOD.

Polymer	M <sub>n</sub> in g/mol <sup>a</sup>	M <sub>n</sub> in g/mol <sup>b</sup>	Đ <sup>b</sup>	Anteil DOTA <sup>c</sup>
<b>P(HPMA)-DOTA 1</b>	12.800	30.000	1,2	1,4%
<b>P(HPMA)-DOTA 2</b>	13.500	34.000	1,2	3,3%
<b>P(HPMA)-DOTA 3</b>	14.100	38.000	1,2	4,8%
<b>P(HPMA)-DOTA 4</b>	17.000	43.000	1,2	12%
<b>P(HPMA)-0</b>	12.100	22.000	1,3	-

Die Polymere werden mittels einer Sephadex G-25 Säule aufgereinigt um eventuell unkomplexiertes <sup>68</sup>Ga zu entfernen. Eluiert werden sie dabei mit 0,9% NaCl Lösung und können somit für spätere *in vivo* Experimente direkt eingesetzt werden. Die erfolgreiche Komplexierung des Radionuklids konnte dann mittels Radiodünnschichtchromatographie nachgewiesen werden, da das markierte Polymer aufgrund des hohen Molekulargewichts nicht mit eluiert wird und als radioaktiver „Spot“ an der Startlinie nachgewiesen werden kann (R<sub>f</sub>=0). Eventuell frei gewordenen <sup>68</sup>Ga wandert dagegen mit dem Laufmittel mit (R<sub>f</sub>=0,9). Somit kann die Stabilität des Komplexes durch die anschließende Messung der Radioaktivität des Dünnschichtchromatogramms mit einem „Flatbed instant imager“ quantitativ ausgewertet werden (A. De la Fuente). In Abbildung 67 A-C sind die radiochemischen Ausbeuten der Komplexierung des Radionuklids <sup>68</sup>Ga mit den P(HPMA)-DOTA Konjugaten 1-4 bei drei verschiedenen Konzentrationen (12 nmol (A), 20 nmol (B), 50 nmol (C)) gezeigt. Bei allen Konzentrationen konnten nach 20 Minuten gute radiochemische Ausbeuten von ungefähr 80% erzielt werden. Bei den Polymerkonzentrationen von 10 und 20 nmol zeigt das P(HPMA)-DOTA 1 Konjugat mit dem geringsten Anteil an DOTA die effizienteste Komplexierung (rote Kurve in Abbildung 67 A und B) und hat bereits nach 10 Minuten 70 bzw. 80% des Radionuklids komplexiert. Die P(HPMA)-DOTA Konjugate mit höherem DOTA Anteil (P(HPMA)-DOTA 2-4) benötigen 5 bis 10 Minuten länger, um die gleiche radiochemische Ausbeute zu erlangen. Dies liegt an der

knäuelartigen Struktur eines Polymers. Durch die Komplexierung des  $^{68}\text{Ga}$ -Radionuklids wird der DOTA-Komplex hydrophober und lagert sich vom polaren Lösemittel Wasser weg ins „Innere“ des Polymers. Durch diese Strukturveränderung sind die restlichen freien DOTA-Komplexe für die  $^{68}\text{Ga}$ -Ionen schwerer zugänglich und es dauert länger, um eine vollständige Komplexierung der DOTA Liganden am Polymer zu erreichen. Dieser Effekt tritt auch bei einer insgesamt höheren Polymerkonzentration auf, weswegen man bei einer Konzentration von 50 nmol nur noch einen geringen Unterschied zwischen den verschiedenen P(HPMA)-DOTA Konjugaten erkennt, wobei immer noch das P(HPMA)-DOTA Konjugat mit dem geringsten Anteil an DOTA die effizienteste radioaktive Markierung zeigt (siehe Abbildung 67 C).

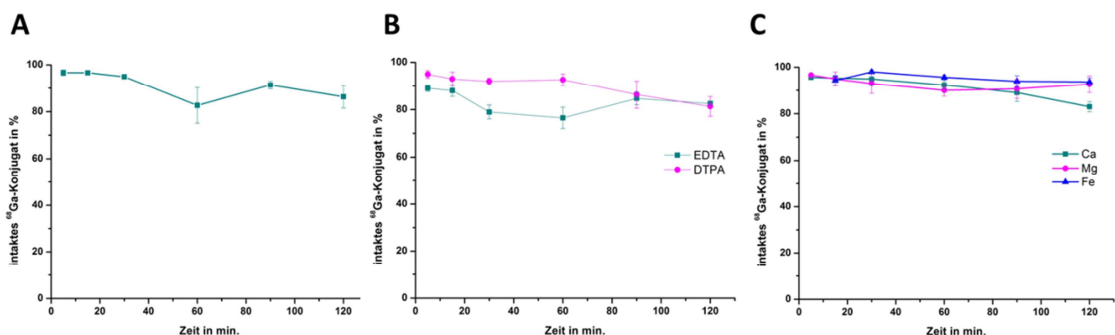


**Abbildung 67:** Radiochemische Ausbeute der HPMA-DOTA Konjugate P(HPMA)-DOTA 1-4 bei unterschiedlichen Polymerkonzentrationen mit Post-Processed  $^{68}\text{Ga}$  Aceton (30 min., 95 °C, n=3) A) 12 nmol, B) 20 nmol, C) 50 nmol und D) Vergleich von P(HPMA)-DOTA 1 bei verschiedenen Konzentrationen. Durchgeführt und ausgewertet von A. De la Fuente.

Da die Anbindung solcher Chelatoren auch einen Einfluss auf die Struktur des Polymers hat und zusätzlich das **P(HPMA)-DOTA 1** Konjugat mit dem niedrigsten Anteil an Chelator auch die effizienteste radioaktive Markierung zeigt, wird dieses Konjugat in weiteren Stabilitätstest von A. De la Fuente näher untersucht.

In vitro Stabilitätstests

Die Stabilität des am Polymer gebundenen radioaktiven  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA Komplexes ist ein sehr wichtiger Faktor in der Entwicklung von neuen Radiopharmazeutika. Dabei muss die Stabilität für mindestens zwei Halbwertszeiten des zu untersuchenden biologischen Prozesses gewährleistet sein. Deswegen wurden verschiedene Stabilitätstests von A. De la Fuente in Gegenwart anderer Metallkationen ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), anderer Chelatoren (EDTA, DTPA) und in humanem Serum durchgeführt, um die *in vivo* Stabilität der markierten Polymerkonjugate beurteilen zu können. Die Metallkationen  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  sind *in vivo* in hoher Konzentration vorhanden und könnten zu einer Austauschreaktion des Zentralkations im DOTA Komplex führen, der dann das radioaktive  $^{68}\text{Ga}$  frei setzen würde. Deswegen soll die Stabilität des P(HPMA)-DOTA Konjugats in Gegenwart dieser Metallkationen untersucht werden. Alle Stabilitätskinetiken werden dabei über einen Zeitraum von 120 min. bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt und sind in Abbildung 68 A-C gezeigt.



**Abbildung 68:** Stabilitätstests über 120 min. bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  ( $n=3$ ) mit 12 nmol Polymerkonjugat. A) in humanem Serum (HA), B) in Gegenwart von EDTA und DTPA, C) in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$ . Durchgeführt und ausgewertet von A. De la Fuente.

Die Ergebnisse zeigen selbst nach 2 Stunden Inkubation bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  eine sehr hohe Stabilität des radioaktiv markierten P(HPMA)-DOTA Konjugats sowohl gegenüber humanem Serum ( $>86\%$ ) und den beiden Chelatoren EDTA ( $>82\%$ ) und DTPA ( $>82\%$ ), als auch gegenüber anderen Metallkationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  (83%),  $\text{Mg}^{2+}$  ( $>92\%$ ) und  $\text{Fe}^{3+}$  ( $>93\%$ ) und sind somit für die Anwendung *in vivo* geeignet.

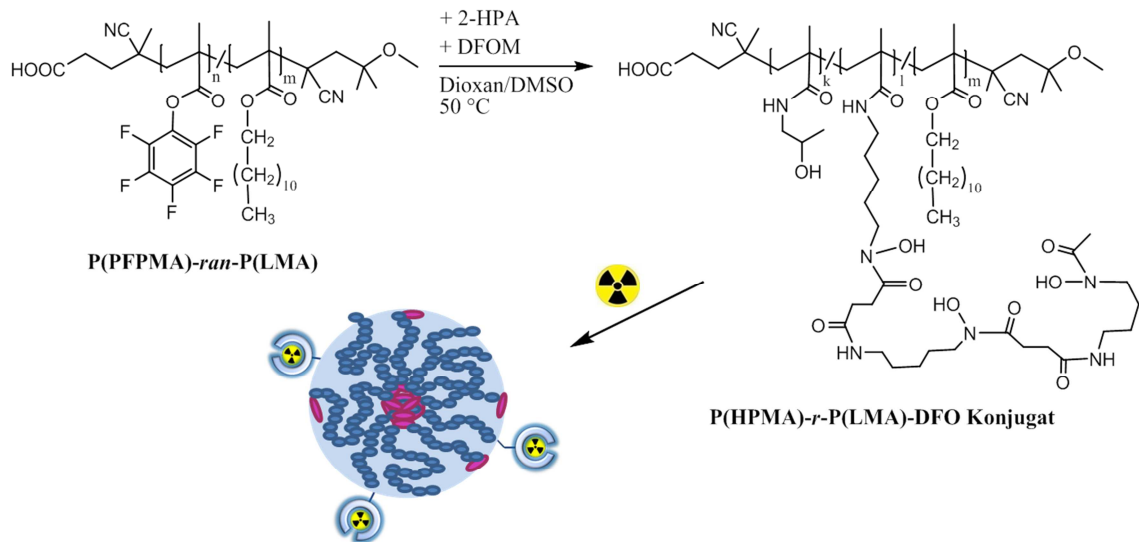
Somit konnte gezeigt werden, dass der aminfunktionalisierte DOTA-Ligand erfolgreich an HPMA Polymere angebunden und diese P(HPMA)-DOTA Konjugate schnell und effizient mit dem Radionuklid  $^{68}\text{Ga}$  markiert werden konnten. Die Stabilitäten dieser gebildeten  $^{68}\text{Ga}$ -Konjugate konnte in Kinetikstudien über 2 h bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  in humanem

Serum, in Gegenwart verschiedener Chelatoren (EDTA, DTPA) und Metallkationen ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) erfolgreich nachgewiesen werden.

### Radioaktive Markierung mittels $^{89}\text{Zr}$

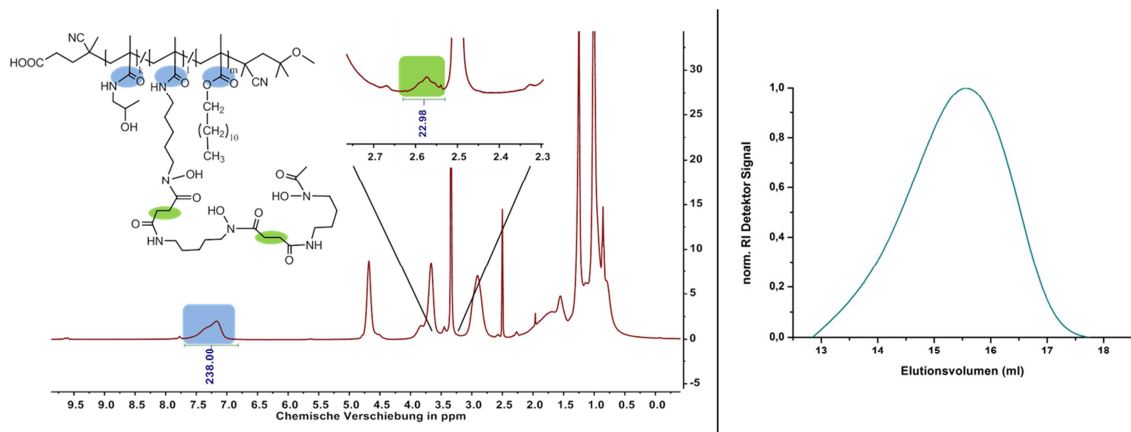
Nun weist die Markierung mittels  $^{68}\text{Ga}$  jedoch zwei Nachteile auf. Zum einen zerfällt  $^{68}\text{Ga}$  mit einer Halbwertszeit von 67,71 min. und ist somit nicht für Langzeitbiodistributionsstudien geeignet und zum anderen verlangt die Komplexbildung relative hohe Temperaturen von 95 °C. Da sowohl Glykopolymere durch die Zuckerstrukturen, als auch die Peptidstrukturen der Blockcopolymer(o)ide gegenüber hohen Temperaturen sehr empfindlich sind, eignen sich Radionuklide und Chelatoren, die bei niedrigen Temperaturen und moderaten pH-Werten bereits stabile Komplexe bilden. Unter diesen Aspekten eignet sich besonders  $^{89}\text{Zr}$  für die Markierung von empfindlichen Polymersystemen, da es bereits bei Raumtemperatur und einem pH-Wert von ungefähr 7 von Desferrioxamine B (DFO) komplexiert wird und sehr stabile Komplexe bildet. Auch trägt dieser Chelator eine freie primäre Amingruppe und eine aufwendige Funktionalisierung des Liganden wie es bei DOTA der Fall ist, entfällt. Zusätzlich zerfällt  $^{89}\text{Zr}$  mit einer Halbwertszeit von 3,27 Tagen und ist somit hervorragend für Langzeitstudien und die Detektion akkumulierender Nanopartikel auf Grund des EPR-Effekts geeignet.

Da die Markierung mit  $^{89}\text{Zr}$  nicht über ein Generatorsystem bei Bedarf produziert werden konnte und der Transport sehr aufwendig und kostenintensiv ist, wurde von A. De la Fuente in einem ersten Versuch überprüft ob eine erfolgreiche Markierung von Polymersystemen mittels  $^{89}\text{Zr}$  unter milden Bedingungen möglich ist. Dafür wird analog zu dem vielversprechenden statistischen HPMA-LMA Copolymer, welches in *in vivo* PET Untersuchungen von Allmeroth *et al.* bereits eine niedrige Leber Akkumulation und hohe Blutzirkulationszeiten aufwies,<sup>[188]</sup> **P(PFPMA)-*ran*-P(LMA)2** (Synthese siehe Kapitel 3.1, Schema 5 und Tabelle 3) mit einem LMA Anteil von ungefähr 20% über den Reaktivesteransatz synthetisiert und mit Desferoxamin Mesylat (DFOM) und 2-HPA in einer anschließenden polymeranalogen Reaktion analog zu den Reaktionsbedingungen in Kapitel 3.3 umgesetzt (siehe Schema 27). Die vollständige Umsetzung konnte dabei wieder mittels  $^{19}\text{F}$ -NMR überprüft werden und das Polymer wurde durch anschließende Dialyse von freiem DFO und anderen Verunreinigungen befreit.



**Schema 27:** Synthese des P(HPMA)-*ran*-P(LMA)-DFO Konjugats und schematische Darstellung des radioaktiv markierten Polymerkonjugats.

Der Anteil an DFO konnte mittels  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie ermittelt werden und die GPC in Hexafluoroisopropanol als Lösungsmittel zeigt eine monomodale Verteilung (siehe Abbildung 69).



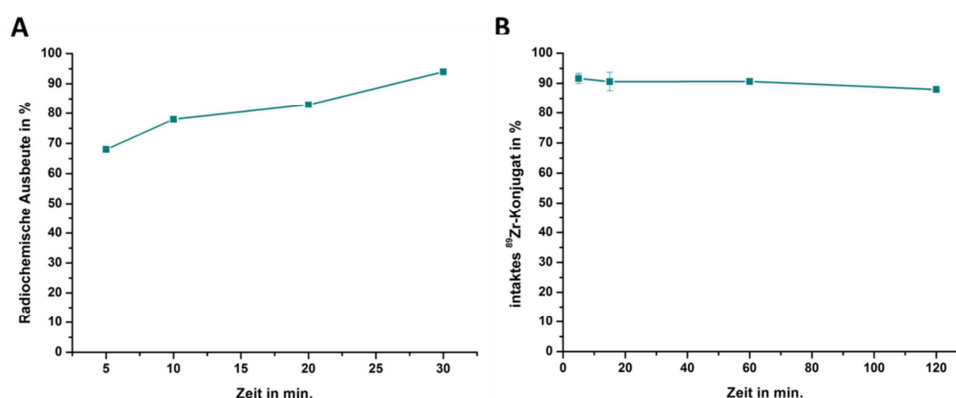
**Abbildung 69:** Links:  $^1\text{H-NMR}$  des P(HPMA)-*ran*-P(LMA)-DFO Konjugats in  $\text{DMSO-d}_6$ . Rechts: HFIP-GPC mit PMMA als Standard.

Dabei ist der berechnete Anteil von DFO nur ein Richtwert, da sich die Signale der acht Protonen des Chelators (grün hinterlegt in Abbildung 69 links) mit den Polymerrückgradprotonen leicht überlagern. Da zunächst nur wichtig ist, dass ein Polymer-DFO Konjugat hergestellt werden konnte, soll diese Genauigkeit jedoch zunächst ausreichen. Die Eigenschaften des synthetisierten P(HPMA)-*ran*-P(LMA)-DFO Konjugats sind in Tabelle 16 nochmal übersichtlich dargestellt.

**Tabelle 16:** Eigenschaften des P(HPMA)-*ran*-P(LMA)-DFO Konjugats. <sup>a</sup> berechnet aus dem PFPMA Vorläufer Polymer. <sup>b</sup> gemessen mittels HFIP GPC mit PMMA als Standard. <sup>c</sup> mittels <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie in DMSO-d<sub>6</sub> berechnet.

Polymer	M <sub>n</sub> in g/mol <sup>a</sup>	M <sub>n</sub> in g/mol <sup>b</sup>	Đ <sup>b</sup>	Anteil DFO <sup>c</sup>
P(HPMA)- <i>ran</i> -P(LMA)-DFO	51.100	78.500	1,5	1,2%

Dieses mit DFO funktionalisierte statistische HPMA-LMA Copolymer wurde nun von A. De la Fuente mit dem Radionuklid <sup>89</sup>Zr radioaktiv markiert. Dazu werden die Polymerkonjugatlösung in Wasser mit 2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethan Sulfonsäure (HEPES) als Puffer (pH = 7,4) versetzt und mit der Oxalsäurelösung, die das radioaktive <sup>89</sup>Zr Nuklid enthält, bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Um die so radioaktiv markierten Polymersysteme von unkomplexiertem <sup>89</sup>Zr abzutrennen, wird der Ansatz über Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. Die Qualitätskontrolle erfolgt wie auch schon bei den P(HPMA)-DOTA Konjugaten mittels Radiodünnschichtchromatographie in Zitronensäure Puffer bei einem pH-Wert von 4 und anschließender Auswertung über einen „Flatbed instant imager“. Dabei können die Dünnschichtchromatogramme durch die unterschiedlichen R<sub>f</sub> Werte des <sup>89</sup>Zr (R<sub>f</sub> = 0.9) und des <sup>89</sup>Zr -Konjugat (R<sub>f</sub> = 0) ausgewertet werden. In Abbildung 70 ist die radiochemische Ausbeute der Komplexierung des Radionuklids <sup>89</sup>Zr mit den P(HPMA)-*ran*-P(LMA)-DFO Konjugats gezeigt.



**Abbildung 70:** A) Radiochemische Ausbeute des P(HPMA)-*ran*-P(LMA)-DFO Konjugats bei einer Polymerkonzentration von 20 mmol mit <sup>89</sup>Zr (30 min., Raumtemperatur) B). Durchgeführt und ausgewertet von A. De la Fuente)

Dabei konnte bereits nach 20 min. eine gute radiochemische Ausbeute von ungefähr 80% erhalten werden die nach weiteren 10 Minuten auf über 90% angestieg. Auch erste Stabilitätstests in humanem Serum bei 37 °C über zwei Stunden zeigen, dass der

---

gebildete  $^{89}\text{Zr}$ -DFO Komplex zumindest gegenüber Proteinen und anderen Serumbestandteilen stabil ist, da die radiochemische Ausbeute über die gesamte Inkubationszeit konstant bei ungefähr 90% bleibt (siehe Abbildung 70 B).

Durch diese ersten Versuche konnte also nachgewiesen werden, dass zum einen der DFO Chelator erfolgreich an das Polymer gebunden werden konnte und zum anderen dieses Polymer-DFO Konjugat schnell und effizient mit radioaktivem  $^{89}\text{Zr}$  markiert werden konnte. Erste Stabilitätskinetiken in humanem Serum bestätigen die Bildung eines stabilen Komplexes über 2 h gegenüber Proteinen und anderen Serumbestandteilen. Somit zeigt die Verwendung von  $^{89}\text{Zr}$ -DFO Konjugaten anstelle von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA Konjugaten ein großes Potential für die radioaktive Markierung funktioneller polymerer Therapeutika, da diese Methode milde Markierungsbedingungen und lange Halbwertszeiten miteinander vereint.





---

## 4. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, Polymersysteme auf der Basis von *N*-(Hydroxy)propylmethacrylat zu synthetisieren, um gezielt Zellen des Immunsystems zu adressieren. Dazu wurden zunächst verschiedene Reaktivesterpolymere auf der Basis von Pentafluorophenyl-methacrylat (PFPMA) unter Verwendung der RAFT-Polymerisation mit enger Molekulargewichtsverteilung und unterschiedlichen Anteilen an LMA (Laurylmethacrylat) hergestellt.

Um eine genaue Aussage über den Aufbau eines statistischen PFPMA-LMA Copolymers treffen zu können, wurde die Copolymerisation von PFPMA und LMA im kleinen Maßstab bei verschiedenen Monomerzusammensetzungen im NMR Röhrchen durchgeführt und mittels Echtzeit <sup>1</sup>H-NMR Kinetikmessungen untersucht. Dies ermöglichte es, den gesamten Verlauf der Copolymerisation zu verfolgen und sowohl die Copolymerisationsparameter zu berechnen als auch genaue Aussagen über den Aufbau eines statistischen PFPMA-LMA Copolymers zu treffen.

Die so erhaltenen Reaktivesterpolymere wurden dann in einer polymeranalogen Reaktion unter Erhalt des Polymerisationsgrades in die gewünschten HPMA-Polymere umgewandelt. Um die quantitative Umsetzung ohne auftretende Nebenreaktionen zu untersuchen, wurden verschiedene Reaktionsbedingungen gewählt und unterschiedliche Analysemethoden verwendet. Damit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, über den Reaktivesteransatz qualitativ hochwertige amphiphile Polymersysteme ohne partielle Hydrolyse des Reaktivesters herzustellen, die normalerweise schwer zu synthetisieren und charakterisieren sind. Ein weiterer Vorteil dieser Syntheseroute ist, dass gleichzeitig sowohl Marker für die Visualisierung der Polymere *in vitro* und *in vivo*, als auch Targetliganden für die Adressierung bestimmter Zellen, eingeführt werden können.

Um nun gezielt Zellen des Immunsystems zu adressieren, wurde hauptsächlich Mannose als einfache Zuckerstruktur angebunden, da bekannt ist, dass mannosylierte Polymersysteme von Zellen des Immunsystems, wie beispielsweise dendritischen Zellen, aufgenommen werden. Dafür wurden zum einen verschieden funktionalisierte Mannosebausteine synthetisiert und zum anderen unterschiedliche Anbindungsstrategien an verschiedenen Polymersystemen durchgeführt. So konnte beispielsweise durch die Einführung einer Aminfunktionalität die Mannose einerseits als Starter für die Polymerisation von Aminosäuren eingesetzt, um amphiphile

mannosylierte Blockcopolypept(o)ide zu erhalten und andererseits über die polymeranaloge Reaktion der Reaktivester zu HPMA Polymeren eingeführt werden. Zusätzlich konnten die so mannosylierten HPMA-LMA Copolymere mit XAV 939 als hydrophoben Wirkstoff beladen werden, der bekannt dafür ist, auch in den Signalweg von dendritischen Zellen einzugreifen und der somit ein attraktives Ziel für die Krebsimmunotherapie darstellt.<sup>[184][185]</sup>

In anschließenden *in vitro* Studien an dendritischen Zellen konnte daher wie erwartet für beide Mizellsysteme, sowie auch für die mit Wirkstoff beladenen mannosylierten Systeme eine Mannoserezeptor-vermittelte spezifische Aufnahme beobachtet werden.

Um zusätzlich die Stabilität der gebildeten HPMA-LMA Polymer Mizellen genauer zu untersuchen, wurden diese mit einem hydrophoben radioaktiven Komplex beladen. Die Mizellen der HPMA-LMA Blockcopolymere zeigten dabei in humanem Blutserum eine signifikant höhere Stabilität, als die der statistischen Copolymere. Die Funktionalisierung der Blockcopolymere mit PEG<sub>2kDa</sub> führte dabei zu einer zusätzlichen Abschirmung des radioaktiven Kerns der Mizellen.

Als eine Möglichkeit die polymeren System für die Visualisierung in späteren *in vivo* Studien mittels PET (Positron Emissions Tomographie) zu markieren, wurden die Polymere mit einem Chelatligand funktionalisiert, der in der Lage ist, Radionuklide zu komplexieren. Dabei wurden sowohl <sup>68</sup>Ga als auch in ersten Versuchen langlebiges <sup>89</sup>Zr als Radionuklide verwendet. Die Stabilitäten der radioaktiv markierten Polymere konnte dabei in verschiedenen Kinetikstudien erfolgreich nachgewiesen werden. Dabei zeigte die Verwendung von <sup>89</sup>Zr ein großes Potential für die radioaktive Markierung polymerer mannosylierter Therapeutika, da diese Methode milde Markierungsbedingungen und lange Halbwertszeiten von 3,27 Tagen miteinander vereint.

Somit konnte gezeigt werden, dass erfolgreich verschiedene polymere Wirkstoffträgermaterialien auf HPMA-Basis hergestellt werden konnten, die durch die Funktionalisierung mit Mannose spezifisch und verstärkt von Zellen des Immunsystems aufgenommen wurden und zusätzlich mit einem hydrophoben Wirkstoff beladen werden konnten. Auch die Mannosylierung anderer Polymersysteme, wie die der bioabbaubaren Blockcopolypept(o)ide, war möglich und zeigt vielversprechende *in vitro* Ergebnisse. Für eine mögliche Untersuchung dieser Systeme *in vivo* mittels PET konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, HPMA Polymere radioaktiv zu markieren,

wobei auch erste Markierungsversuche mit einem langlebigen Radionuklid für Langzeitbiodistributionsstudien durchgeführt wurden.

Die Stabilitätstests von radioaktiv beladenen Mizellen zeigten, dass eine zusätzliche PEG Funktionalisierung der Blockcopolymermizellen sinnvoll wäre, da dadurch die Stabilität der Mizellen erhöht werden konnte. Dabei wäre der Einbau einer in pH-Wert Studien bereits untersuchten säurelabilen Iminbindung sinnvoll, da die Mizellen so während der Zirkulationszeit im Blut (pH = 7,4) vor der Anlagerung vor Serumproteinen geschützt wären und die Targetfunktionen erst im Zielgewebe (pH = 6,8) durch die Abspaltung der PEG-Linker für die Rezeptoren der Zielzellen zugänglich wären.



---

## 5. Experimenteller Teil

### 5.1 Allgemeines und Messgeräte

#### **Entgasen von Flüssigkeiten (Freeze-pump-thaw cycles).**

Der zu entgasende Ansatz wird in flüssigem Stickstoff eingefroren und unter Hochvakuum für 10 min. evakuiert. Der Reaktionskolben wird vom Vakuum getrennt und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur unter bestehendem Vakuum aufgetaut. Dieser Zyklus wird mindestens dreimal wiederholt.

#### **Lösemittel und Reagenzien.**

Alle Reagenzien und Lösemittel wurden von *Acros Organics*, *Sigma Aldrich*, *Roth* oder *Fluka* erworben und wenn nicht anders beschrieben ohne weitere Aufreinigung verwendet. Technische Lösemittel wurden vor der Verwendung destilliert und alle anderen Lösemittel wiesen den Reinheitsgrad *pro analysis (p.a.)* auf.

Dichlormethan und Chloroform wurden bei Bedarf über  $\text{CaH}_2$  frisch destilliert. THF, n-Hexan, Diethylether und 1,4-Dioxan wurden über eine Natrium/Kalium Legierung mit Benzophenon bei Bedarf absolutiert und frisch destilliert. Wasserfreies DMSO wurde in einer Septumflasche über aktiven Molekularsieb (4 Å) gelagert. DMF wurde von der Firma *VWR* käuflich erworben, über  $\text{BaO}$  getrocknet und unter Vakuum auf vorgetrocknetes Molekularsieb (3 Å) destilliert. Neopentylamin wurde von *TCI Europe* bezogen, über  $\text{NaOH}$  getrocknet und frisch destilliert.

2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril) (V-70) wurde von der Firma *Wako Chemicals* erworben. Oregon Green 488-X, succinimidyl Ester, 6-isomer, Cadaverin wurde von *Life Technologies* bzw. *Invitrogen* verwendet. Alle geschützten Aminosäuren wurden von *ORPEGEN* käuflich erworben und Dynasore-OH wurde freundlicherweise von Prof. T. Kirchhausen (Harvard Medical School, Boston) zur Verfügung gestellt.

Der DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-Tetraessigsäure)-Ligand für die radioaktive Markierung wurde von A. de la Fuente (Arbeitsgruppe Prof. Rösch Kernchemie Universität Mainz) synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

### **Dünnschichtchromatographie.**

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Aluminiumfertigplatten der Firma Merck verwendet. Für Normalphasentrennungen: 20 x 20 silica gel 60 F<sub>254</sub>, für Umkehrphasentrennungen: hydrophob modifizierte Kieselgelplatten des Typs RP 18 F<sub>254S</sub>. Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht der Wellenlängen 254 nm und 303 nm sowie folgender Färbereagenzien:

- Zucker-Reagenz:  
2,5 ml 3-Methoxyphenol, 200 ml Ethanol und 5,5 ml konz. Schwefelsäure
- Ninhydrin-Reagenz:  
0,6 g Ninhydrin, 200 ml Ethanol und 6 ml Eisessig
- Kaliumpermanganat-Reagenz:  
2,0 g Kaliumpermanganat, 10,0 g Natriumcarbonat und 200 ml Wasser

Die Entwicklung der Chromatogramme erfolgte nach eintauchen in eine der Reagenzien mit anschließender Wärmeeinwirkung.

### **Säulenchromatographie.**

Säulenchromatographische Trennungen wurden an Kieselgel mit einer Partikelgröße von 35-70 µm der Firma *Acros Organics*, Geel (Belgien) durchgeführt.

### **Dialysemembranen.**

Zur Reinigung der polymeren Systeme kamen Dialysemembranen der Firma *Carl Roth*, Karlsruhe (Germany) vom Typ Spectra/Por® 7 aus regenerierter Cellulose mit einer Ausschlussgrenze von 1000 g/mol sowie einer Ausschlussgröße von 3500 g/mol zum Einsatz. Die Dialysemembranen wurde zunächst mit Milli-Q Wasser konditioniert und während der Dialyse magnetisch gerührt. Das Dialysewasser wurde während der Reinigung (42-72 h) mehrfach ausgetauscht.

### **pH-Wert Bestimmungen.**

Die pH-Werte in organischen Lösemitteln wurde mittels pH-Indikatorstäbchen der Firma *Merck*, Darmstadt (Germany) bestimmt. Es wurden folgende Produkte verwendet:

- Acilit® (pH-Bereich: 0-6)
- Neutralit® (pH-Bereich: 5-10)
- Alkalit® (pH-Bereich: 7,5-14)
- Universalindikator (pH-Bereich: 0-14)

Das pH-Indikatorstäbchen wurde dabei zunächst mit Wasser befeuchtet und dann mit der zu bestimmenden Lösung beträufelt (Glasstab). Der pH-Wert wurde nach 15 s abgelesen.

Die pH-Werte in wässriger Lösung wurden mittels eines elektronischen pH-Messgerätes der Firma WTW, Weilheim vom Typ pH 538 bestimmt. Die verwendete pH-Elektrode des Modells SenTLX 61 war von der gleichen Firma. Die Kalibrierung des pH-Messgerätes erfolgte mittels Kalibrierlösungen der pH Werte  $4,00 \pm 0,05$ ,  $7,00 \pm 0,05$ ,  $10,00 \pm 0,05$ .

### **Massenspektrometrie.**

Elektronenspray Ionisation (ESI-MS) wurde an einem Navigato-Instrument der Firma *Thermo Electron*, Boston (USA) durchgeführt. Die Probenkonzentration betrug 0,1 mg/ml in Methanol/Acetonitril und/oder Wasser als Lösungsmittel. Messparameter: Flussrate: 0,75 ml/min, Cone-Voltage: 35-70 V, Stickstoffstrom: 300 l/min.

Die in dieser Arbeit angegebenen Massen beziehen sich auf die entsprechenden Neutalmoleküle. Zur Berechnung der Molmassen wurden die natürlichen Isotopenverteilungen verwendet. Sämtliche Verbindungen wiesen die zu erwartende Isotopenverteilung auf. Zur Vereinfachung wird in dieser Arbeit in der Regel der erste Isotopenpeak angegeben.

### **Gelpermeationschromatographie.**

Für die Charakterisierung der Reaktivester Polymere wurde eine THF-GPC Anlage der Firma *Jasco*, Groß-Umstadt (Germany) verwendet. Zum Einsatz kamen hierbei eine HPLC Pumpe vom Typ PU 1850, ein automatischer Probengeber der Bezeichnung AS1555 und Detektoren der Typenbezeichnungen UV 1575 (Ultraviolett Detektion) und RI 1530 (Brechungsindex Detektion). Die Probenkonzentration betrug 2 mg/ml unter der Verwendung von Tetrahydrofuran p.a. der Firma Sigma Aldrich als Lösungsmittel. Die Proben wurden mit Toluol als internen Standard versetzt und die

Flussrate betrug 1 ml/min. Als Säulenmaterial kam eine Gelpermeationssäule der Firma MZ-Analysentechnik, Mainz (Germany) mit der Porengröße  $10^2$ ,  $10^4$  und  $10^6$  Å zum Einsatz. Für die Kalibration wurden Polystyrolstandards der Firma Standard Services, Mainz (Germany) verwendet.

HPMA Polymere wurden mittels einer HFIP-GPC Anlage der Firma *Jasco*, Groß-Umstadt (Germany) analysiert. Als Eluent wurde Hexafluoroisopropanol (HFIP) verwendet mit der Zugabe von 3 g/l Kaliumtrifluoressigsäure. Durchgeführt wurden die Messungen bei 40 °C und einer Flussrate von 0,8 ml/min. Die Gelpermeationssäulen der Firma MZ-Analysentechnik enthielten modifiziertes Kieselgel (PFG-Säulen) mit einer Porengröße von  $10^2$  und  $10^3$  Å und einer Partikelgröße von 7 µm. Die Polymere wurden mit einem RI-Detektor des Typs 61362A, RID und mit einem UV/Vis-Detektor des Typs UV-2075, Plus detektiert. Das Molekulargewicht wurde mittels PMMA Standards der Firma Polymer Standard Services, Mainz (Germany) unter Zugabe von Toluol als Internen Standard berechnet.

Aufgereinigt wurden die HPMA polymere sowie deren Formulierungen mittels einer Wasser GPC Anlage der Firma *Jasco*, Groß-Umstadt (Germany). Hierbei kam eine HPLC Pumpe des Typs PU 2080+ und Detektoren vom Typ UV 2077+ sowie RI 2031+ zum Einsatz. Die Flussrate betrug zwischen 0.5 und 1 ml/min und als Eluent wurde Milli-Q Wasser verwendet. Als Säule wurde eine präparative Sephadexsäule G-25 (HiTrap™ Desalting Coloum, Sephadex G-25, Superfine, 0,9% NaCl) verwendet. Die Detektoren wurden auf eine Wellenlänge von 488 nm und 235 nm eingestellt.

Die Steuerung der Anlagen sowie die Auswertungen der Messdaten erfolgte rechnerunterstützt mit der Software WinGPC Unichrome 8.00 (Build 994) der Firma Polymer Standard Services, Mainz (Germany).

### **UV/Vis Spektroskopie.**

Für die Aufnahme von UV/Vis Spektren wurde ein UV/Vis Spektrometer der Firma *Jasco*, Groß-Umstadt (Germany) vom Typ V-630 verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der Software Spectra Manager in der Version 2.04. Es wurden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm eingesetzt.

### **NMR-Spektroskopie.**

Kernresonanzspektren wurden an NMR-Geräten der Firma *Bruker*, Billerica (USA) gemessen. Dabei kamen folgende Geräte zum Einsatz:



- 
- Bruker AV-300: 300 MHz- $^1\text{H}$ -NMR und 75,5 MHz- $^{13}\text{C}$ -NMR
  - Bruker AV-400: 400 MHz- $^1\text{H}$ -NMR, 100,6 MHz- $^{13}\text{C}$ -NMR und 377 MHz- $^{19}\text{F}$ -NMR

Wenn nicht anders angegeben wurden alle Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt und mittels ACDLabs oder MestReNova ausgewertet. Die chemische Verschiebungen  $\delta$  wurden in ppm angegeben und beziehen sich auf das Signal des deuterierten Lösemittels. Folgende Kennzeichnungen der Signale wurden verwendet:

s = Singulett, br = breites Signal, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, t = Triplet, tt = Triplet vom Triplet, dt = Dublett vom Triplet, m = Multiplett, q = Quartett.

Die Messungen von 2-D-Spektren erfolgten an einem Bruker Avance III HD 400. Es wurden folgende Messtechniken verwendet:

- **$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -Correlation Spectroscopy ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY)**

Gleichartige Kerne werden über ihre skalaren Kopplungen miteinander korreliert (homonukleares COSY), wodurch sich überlappende Signale in den Spektren zugeordnet werden können.

- **Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY)**

Diese Methode erlaubt es über Feldgradienten NMR Moleküle, die ein unterschiedliches Diffusionsverhalten aufweisen, getrennt zu erfassen.

- **Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy (HSQC)**

Verschiedenartig skalar koppelnde Kerne werden miteinander korreliert. In dieser Arbeit wurden  $^1\text{H}$  zu  $^{13}\text{C}$ -Korrelationen gemessen, wodurch die einzelnen H-Atome direkt dem ihm zugehörigen C-Atom zugeordnet werden können.

### **Dynamische Lichtstreuung**

Für die Messung der dynamischen Lichtstreuung wurden Polymerlösungen oder Lösungen mit Polymernizellen entsprechend der beschriebenen Konzentrationen hergestellt. Die Proben wurden in eine staubfreie Flow Box überführt und mittels eines Filters (LCR) mit einer Porengröße von 450 nm in eine staubfreie zylindrische Lichtstreuökuvette (Suprasil, 20 mm Durchmesser, Hellma, Mühlheim, Germany) filtriert.

Die Messapparatur bestand aus einem Uniphase He/Ne Laser ( $\lambda = 632,8 \text{ nm}$ ,  $22 \text{ mW}$ ), einem ALV-SP125 Goniometer, einem ALV/High QE APD-Avalanche Photodiode Glasfaser Detektor, einem ALV 5000/E/PCI Korrelator und einem Lauda RC-6 Thermostat, welcher die Temperatur auf  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  regulierte. Es wurden winkelabhängige Messungen für einen Bereich von  $30^\circ \leq q \leq 150^\circ$  in  $15^\circ$  Schritten durchgeführt. Für die Auswertung der Daten wurden die experimentell bestimmten Intensitätskorrelationsfunktionen in die Amplitudenkorrelationsfunktionen umgewandelt. Dafür wurde die Siegler Relation angewendet und erweitert um Negativwerte mit einzubinden. Die Basislinie wurde subtrahiert und  $g_1(t) = \text{SIGN}(G_2(t)) * \text{SQRT}(\text{ABS}((G_2(t)-A)/A))$  berechnet. Alle Feldkorrelationen zeigten einen typischen monomodalen Zerfall und wurden durch die Bildung der Summe von zwei Exponenten  $g_1(t) = a * \exp(-t/b) + c * \exp(-t/d)$  gefittet um die Polydispersität mit einzubeziehen. Durchschnittlich erscheinende Diffusionskoeffizienten  $D_{\text{app}}$  wurden mittels der Gleichung  $q^2 * D_{\text{app}} = (a * b^{-1} + c * d^{-1}) / (a + c)$  berechnet und ergaben den Winkelabhängigen Diffusionskoeffizient  $D_{\text{app}}$  oder den reziproken hydrodynamischen Radius  $\langle 1/R_h \rangle_{\text{app}}$ , entsprechend dem formal angewendetem Stoke-Einstein Gesetz. Nach Extrapolation von  $\langle 1/R_h \rangle_{\text{app}}$  nach  $q = 0$  wurden die z-Mittelwerte des  $R_h = \langle 1/R_h \rangle_{z-1}$  erhalten (nicht korrigiert für c-Abhängigkeit).

### **Zeta Potential**

Für die Messungen des Zeta Potentials wurde ein Malvern Zetasizer des Typs Nano ZS verwendet. Die Proben wurden mit einer Konzentration von  $3 \text{ g/l}$  in Milli-Q Wasser vermessen, wobei für jede Probe 5 unabhängige Messungen durchgeführt wurden. Berechnet wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung.

### **HPLC**

Präparative Trennungen von Substanzgemischen erfolgte mittels eines HPLC Systems der Firma Knauer, Berlin (Germany). Die Anlage bestand aus zwei HPLC Pumpen (Smartline 1000), einem UV-Detektor (Smartline 2500), einem RI-Detektor (Smartline 2400) und einem 2-Kanal-Online Degasser mit einem Totvolumen von  $7,7 \text{ ml}$  pro Kanal. Die Durchmischung der Lösemittel erfolgte mit einem dynamischen Mischer mit einem internen Volumen von  $5,9 \text{ ml}$  und die Probenschleife wies eine Kapazität von  $2000 \text{ } \mu\text{l}$  auf. Als Eluent wurde ein Gemisch aus Acetonitril HPLC Qualität der Firma VWR International, West Chester (USA) und Milli-Q-Wasser verwendet, wobei bei

Bedarf 0,1 % TFA zugesetzt wurde. Als Säule wurde eine Luna RP-C18 (2) der Firma Phenomenex, Torrance (USA) verwendet (250 mm x 30,0 mm, 100 Å, Axia, 10 µm). Die Aufzeichnungen sowie die Auswertungen wurden mittels einer D-7000 HPLC-System Manager Software (Version 4.1) durchgeführt. Für die präparative Trennung von Polymeren wurde eine Mischung aus THF und Milli-Q Wasser mit einem Gradienten von 40/60 zu 90/10 (THF/Wasser) über eine Zeitspanne von 50 min. verwendet. Der UV-Detektor wurde dabei auf eine Wellenlänge von 488 nm eingestellt.

### **FACS**

FACS Messungen wurden an einem FACS Canto II Durchflusszytometer der Firma BD Bioscience, San Diego (Canada) durchgeführt. Als Software Programm wurde BD FACS Diva Software der gleichen Firma verwendet. Zur Auswertung wurde die Software FlowJo der Firma FLOWJO, Ashland (USA) verwendet.

### **MTT Assays**

Die Zytotoxizität der Polymere und Mizellen wurde mittels MTT (3-(4,5-Dimethyltriazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid) Assays untersucht. Dafür wurden die jeweiligen Zellen in sterile Mikrotiterplatten ausgesät ( $2,2 \times 10^4$  Zellen/ml) und nach 24 h mit den Polymerlösungen inkubiert. Als Kontrolle wurden sowohl unbehandelte Zellen als auch mit 10% DMSO behandelte Zellen untersucht. Nach 68 h Inkubationszeit, wurde MTT (20 µl einer 5 mg/ml Lösung in PBS) zugegeben und die Zellen für 4 weitere Stunden inkubiert. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die ausgefallenen Formazon Kristalle in optisch reinem DMSO mittels eines UV/Vis Spektrometers (Viktor Wallace plate reader) bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen.

### **Zellkultivierung**

DC 2.4 Zellen, HeLa (human cervix adenocarcinoma) Zellen und HUVECs (human umbilical vein endothelia cells) werden bei 37 °C bei 5 % CO<sub>2</sub> in RPMI Medium unter Zugabe von 10 % FCS (PAA, Cölbe, Deutschland), 2 mM L-Glutamin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Gibco, Paisly, UK) und 50 µM β-Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) kultiviert. Das Medium wurde regelmäßig gewechselt.

Knochenmarksabgeleitete DCs (*engl. bone marrow-derived DCs*, BMDCs) werden aus Knochenmarkszellen von C57BL/6 Mäuse differenziert.<sup>[192][193]</sup> Das DC-Kulturmedium (IMDM mit 5 Vol.% FCS [PAA, Cölbe, Deutschland], 2 mM L-Glutamin [Gibco, Paisly, UK]) und 50  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) supplementiert mit 5% GM-CSF-haltiger Zellkulturüberstand [Zal et al. 1994<sup>[194]</sup>, von Dr. B. Stockinger, MRC National Institute for Medical Research, Mill Hill, London zur Verfügung gestellt]) wurde am 3. sowie am 6. Tag erneuert. BM-Zellen wurden auf 100 mm<sup>2</sup> Petrischalen (2x10<sup>6</sup> Zellen/10 ml) ausgesät und bei 37 °C und 10% CO<sub>2</sub> kultiviert. Aliquots nicht-adhärenter und nur leicht adhärenter unreifer BM-DCs wurden am 6. oder 7. Tag geerntet und in Wells einer Sechs-Well Mikrotiterplatte (StarLab, Hamburg, Deutschland) ausgesät (10<sup>6</sup> Zellen/ml) bzw. am 5. und 7. Tag in eine 24 Well Platte (0.5 x 10<sup>6</sup> Zellen/500  $\mu$ l) ausgesät und für Nano-Carrier-Inkubationsstudien verwendet. Alternativ dazu wurden BM-Zellen in 12-Well-Platten eingesät (5x10<sup>5</sup>/2.5 ml), an Tag 3 und 6 mit Medium versorgt und an Tag 6 bzw. 7 mit den Nano-Carriern inkubiert.

### **Radionuklid Gewinnung**

Zur Generierung des <sup>68</sup>Ga Radionukleotids wurde ein kommerzieller 1.100 MBq Generator mit <sup>68</sup>Ge(IV) beschichteten TiO<sub>2</sub> der Firma Cyclotron Co. Ltd., Obninsk (Russische Federation) verwendet. Dabei wurden typischerweise mit Batches von 80-300 MBq gearbeitet. <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga wurde mit 5 ml einer 0,1 M HCl eluiert und mittels eines Kationenaustauschers aufgereinigt. Nach weiterer Aufarbeitung<sup>[136]</sup> erhält man eine Aceton-<sup>68</sup>Ga-Lösung, die für die Markierung eingesetzt wird und eine Radioaktivität von ungefähr 10 MBq aufweist.

5 mCi (=185MBq) von <sup>89</sup>Zr in Oxalsäure wurden von der Firma PerkinElmer LAS (Germany) käuflich erworben. Die Radionuklide wurden von A. de la Fuente der Arbeitsgruppe Rösch, Kernchemie, Universität Mainz zur Verfügung gestellt.

### **Radio-Dünnschichtchromatographie**

Radio-Dünnschichtchromatographien wurden mittels eines Flatbed Instant Imager® der Firma Packard Canberra, Schwadorf (Österreich) ausgewertet.

### **Sonstige Messmethoden**

- ATR-FTIR Spektroskopie wurde an einem FT/IR-4100 Gerät der Firma Jasco, Groß-Umstadt (Germany) durchgeführt. Es wurde ein ATR Probenkopf der

Firma MIRacle™, Pike Technologies verwendet und die Auswertung erfolgte mittels der Software Spectra Manager 2.0 der Firma Jasco.

- Schmelzpunkte wurden an einem Mettler FP62 Schmelzpunktmessgerät der Firma Mettler Waagen GmbH gemessen

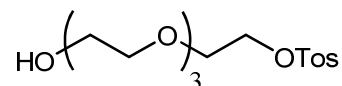
### **Nomenklatur**

Die Nomenklatur und Nummerierung mancher Verbindungen sind nicht IUPAC konsistent sondern wurden der aus Gründen der Übersicht verwendet.

## 5.2 Synthesen der aminfunktionalisierten Ethylenglykol Linker

### 5.2.1 Geschützter aminfunktionalisierter Tetraethylenglykol Spacer

#### Tetraethylenglykol Monotosylat (Sp1)<sup>[165]</sup>



Eine Mischung aus 4,11 g (103 mmol) Natriumhydroxid in 23 ml Wasser und 23 ml THF und 133,2 g (685 mmol) Tetraethylenglykol wird auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren wird innerhalb von 90 Minuten eine Lösung aus 12,15 g (65 mmol) p-Toluolsulfonsäurechlorid in 100 ml THF zugetropft. Es wird 2 h bei 0 °C sowie 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird auf Eiswasser gegossen, mit Dichlormethan extrahiert (4x150 ml) und mit Wasser gewaschen (2x75 ml). Die organischen Phasen werden gesammelt und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und das erhaltende schwach gelbe Öl im Hochvakuum getrocknet.

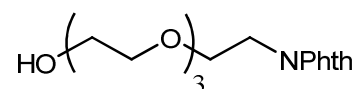
Ausbeute: 22 g (63 mmol, 97%), Lit.: 90%<sup>[165]</sup>, farbloses Öl. R<sub>f</sub> = 0,24 (cHex/EtOAc, 1:4).

<sup>300</sup>MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): [ $\delta/ppm$ ] = 7,77 (d, J = 8,5 Hz, 2H, -SO<sub>2</sub>-*o*-Ar-H), 7,32 (d, J = 8,5 Hz, 2H, -SO<sub>2</sub>-*m*-Ar-H), 4,14 (t, J = 4,5 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-OTos), 3,71 – 3,51 (m, 14H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 2,42 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>).

ESI-MS: [ $m/z$ ] = 371,13 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 371,11).

C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>7</sub>S (348,41 g/mol)

#### N-(11-hydroxy-3,6,9-trioxaundecyl)phthalimid (Sp2)<sup>[165]</sup>



Eine Mischung aus 22 g (63 mmol) Tetraethylenglykol Monotosylat (Sp1), 14 g (76 mmol) Kaliumphthalimid und 3 g Molekularsieb (3 Å) in 160 ml *N,N*-Dimethylformamid werden 10 h unter kräftigem Rühren bei 150 °C erhitzt und weitere 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Feststoff wird über Celite abfiltriert und mit *N,N*-Dimethylformamid gewaschen. Das Lösemittel wird im Hochvakuum

entfernt, das Rohprodukt mit Toluol kodestilliert (4x70 ml) und anschließend mittels Säulenchromatographie (Eluent: EtOAc) aufgereinigt.

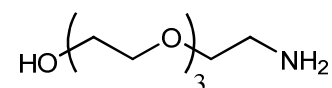
Ausbeute: 18,2 g (56 mmol, 89%), Lit.: 57%<sup>[165]</sup>, leicht gelbliches Öl.  $R_f = 0,34$  (EtOAc).

$300\text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $[\delta/\text{ppm}] = 7,85 - 7,81$  (m, 2H, Ar-H),  $7,72 - 7,68$  (m, 2H, Ar-H),  $3,88$  (t, 2H,  $J = 5,5$  Hz, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ),  $3,73$  (t, 2H,  $J = 5,8$  Hz, N- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ),  $3,75 - 3,52$  (m, 12H,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ).

ESI-MS:  $[m/z] = 346,14$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 346,13).

$\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_6$  (348,41 g/mol)

### 1-Amino-11-hydroxy-3,6,9-trioxaundecan (Sp3)



Eine Lösung aus 18,2 g (56 mmol) *N*-(11-hydroxy-3,6,9-trioxaundecyl)phthalimid (**Sp2**) in 100 ml Ethanol wird mit 3,5 ml (110 mmol) Hydrazin Hydrat versetzt und 2 h bei 80 °C gerührt, wobei ein weißer Feststoff ausfällt. Es wird auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 1,0 M HCl auf einen pH Wert von 1 eingestellt. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und der Ansatz in 200 ml Wasser wieder aufgenommen und über Celite filtriert. Der pH-Wert wird mit einer Natriumhydroxid Lösung auf 11 eingestellt und 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Das Wasser wird am Vakuum entfernt und das Rohprodukt in 300 ml Chloroform gelöst. Anschließend wird mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, über Celite filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

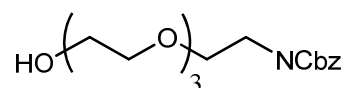
Ausbeute: 7,8 g (40 mmol, 71%), orangefarbenes Öl.

$300\text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $[\delta/\text{ppm}] = 3,71 - 3,50$  (m, 14H,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ),  $2,87 - 2,84$  (t, 2H,  $J = 4,2$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{-N}$ ).

ESI-MS:  $[m/z] = 194,14$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber.: 194,14).

$\text{C}_8\text{H}_{19}\text{NO}_4$  (193,24 g/mol)

**1-(Benzoylcarbonylamino-11-hydroxy-3,6,9-trioxa)undecan (Sp4)**<sup>[195]</sup>



Zu einer Lösung aus 7,8 g (40 mmol) 1-Amino-11-hydroxy-3,6,9-trioxaundecan (**Sp3**) und 6,7 g (80 mmol) NaHCO<sub>3</sub> in Wasser wird unter kräftigem Rühren bei 0 °C eine Lösung aus 8,6 ml (60 mmol) Benzyloxycarbonylchlorid in 50 ml Dioxan langsam zugetropft. Die Lösung wird 2 h bei 0 °C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird mit 50 ml Wasser verdünnt und mit Ethylacetat extrahiert (2x150 ml). Die organischen Phasen werden gesammelt und mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub> Lösung zurück extrahiert (2x150 ml). Die wässrige Phasen werden acidifiziert und mit 10%iger HCl Lösung auf einen pH-Wert von 1 gebracht. Anschließend wird mit Ethylacetat ausgeschüttelt (3x100 ml). Die organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösemittel unter Vakuum entfernt und das Produkt säulenchromatographisch aufgereinigt (Eluent: EtOAc).

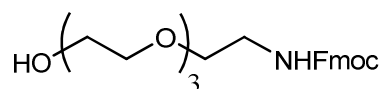
Ausbeute: 8,5 g (26 mmol, 65%), farbloses hochviskoses Öl. R<sub>f</sub> = 0,29 (EtOAc).

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): [δ/ppm] = 7,35 – 7,29 (m, 5H, Ar-H), 5,10 (s, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-Ar), 3,66 – 3,53 (m, 14H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3,35 (t, 2H, J = 9,5 Hz, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O).

ESI-MS: [m/z] = 350,17 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 350,22).

C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>6</sub> (327,24 g/mol)

**1-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-11-hydroxy-3,6,9-trioxaundecan (Sp5)**<sup>[156]</sup>



2,5 g (12,9 mmol) 1-Amino-11-hydroxy-3,6,9-trioxaundecan (**Sp3**) wird in einer Mischung aus 35 ml Dioxan und 19,5 ml 10%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung auf 0 °C gekühlt. Innerhalb von 10 Minuten wird eine Lösung aus 3,2 g (12,2 mmol) Fluoren-9-ylmethoxycarbonylchlorid in 20 ml Dioxan zugetropft und weiter 2 h bei 0 °C gerührt. Nach weiteren 15 h Rühren bei Raumtemperatur wird die Reaktionsmischung mit 50 ml Wasser verdünnt und mit Dichlormethan extrahiert (4x80 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, das Lösemittel im Vakuum entfernt und das Produkt säulenchromatographisch aufgereinigt. (Eluent: EtOAc/EtOH 5:0,3).



Ausbeute: 4,2 g (10,1 mmol, 83%), Lit.: 87%<sup>[156]</sup>, farbloses hochviskoses Öl.  $R_f = 0,27$  (EtOAc/EtOH, 5:0,2).

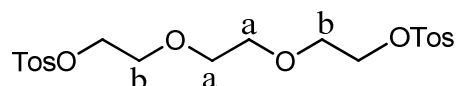
$300\text{ MHz-}^1\text{H-NMR (CDCl}_3\text{): } [\delta/\text{ppm}] = 7,75$  (d, 2H,  $J = 7,5$  Hz, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7,63 (d, 2H,  $J = 7,3$  Hz, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7,39 (t, 2H,  $J = 7,4$  Hz, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7,30 (t, 2H,  $J = 7,4$  Hz, H2-Fmoc, H7-Fmoc), 4,41 (d, 2H,  $J = 6,9$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$ ), 4,22 (t, 1H,  $J = 6,8$  Hz, H9-Fmoc), 3,70-3,53 (m, 14H,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 3,43-3,35 (m, 2H,  $\text{NH-CH}_2$ ).

*ESI-MS*:  $[m/z] = 416,15$  ( $[\text{M-H}]^+$ , ber.: 416,21), 438,18 ( $[\text{M+Na}]^+$ , ber.: 438,19).

$\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N O}_6$  (415,48 g/mol)

## 5.2.2 Aminfunktionalisierter Diethylenglykol-azid Spacer

### 1,2-Bis(2-tosylethoxy)ethan (Sp6)<sup>[157]</sup>



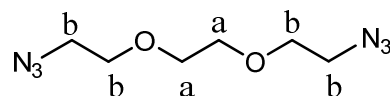
10 g (66,6 mmol) Triethylenglykol werden in 250 ml Dichlormethan gelöst. Unter Argon werden 28 g (146,9 mmol) Tosylchlorid, 21 ml (150 mmol) Triethylamin und 400 mg (3,3 mmol) 4-(Dimethylamino)-pyridin zugegeben und 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird mit Wasser gewaschen (2x100 ml), die organischen Phasen über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird in 60 ml Chloroform aufgenommen, in 600 ml Petrolether gefällt, abgesaugt und getrocknet.

Ausbeute: 30 g (67 mmol, 100%), farbloser Feststoff.  $R_f = 0,31$  ( $\text{CHCl}_3$ ). Smp.: 78,3 °C

$300\text{ MHz-}^1\text{H-NMR (CDCl}_3\text{): } [\delta/\text{ppm}] = 7,77$  (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H,  $-\text{SO}_2\text{-o-Ar-H}$ ), 7,32 (d,  $J = 8,5$  Hz, 2H,  $-\text{SO}_2\text{-m-Ar-H}$ ), 4,11 (t,  $J = 4,5$  Hz, 4H,  $-\text{CH}_2\text{-OTos}$ ), 3,61 (m, 4H, b), 3,49 (s, 4H, a), 2,41 (s, 6H,  $-\text{CH}_3$ ).

$\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{NO}_6$  (426,12 g/mol)

**1,2-Bis(2-azidoethoxy)ethan (Sp7)**



30 g (70 mmol) 1,2-Bis(2-tosylethoxy)ethan (**Sp6**) wird in 100 ml absolutiertem *N,N*-Dimethylformamid gelöst und entgast. Unter Argongegenstrom werden 8,5 g (140 mmol) Natriumazid und 1,05 g (2,8 mmol) Tetrabutylammoniumiodid zugegeben und die Suspension bei 80 °C 16 h gerührt. Der Ansatz wird mit 500 ml Chloroform verdünnt, mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (2x200 ml) und Wasser (2x200 ml) extrahiert und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt.

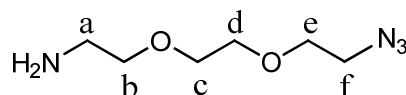
Ausbeute: 10,5 g (52 mmol, 74,3%), Lit.: 78%<sup>[157]</sup> gelbliches Öl. R<sub>f</sub> = 0,18 (Toluol).

<sup>300 MHz</sup>-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): [δ/ppm] = 3,66 (m, 8H, b), 3,38 (t, J = 5,1 Hz, 4H, a).

ESI-MS: [m/z] = 200,78 ([M-H]<sup>+</sup>, ber.: 201,10),

C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> (200,10 g/mol)

**1-Azido-3,6-dioxaoctyl-amin (Sp8)<sup>[196]</sup>**



Eine Lösung aus 13,16 g (50,2 mmol) Triphenylphosphin in 100 ml absolutiertem Diethylether wird langsam bei Raumtemperatur und unter kräftigem Rühren zu einer Lösung aus 10,5 g (52 mmol) 1,2-Bis(2-azidoethoxy)ethan (**Sp7**) in Et<sub>2</sub>O/THF/HCl 1 N, 5:1:5 (154 ml) getropft. Der Ansatz wird 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt und mit 4 N HCl gewaschen (1x70 ml). Die wässrige Phase wird mit Diethylether extrahiert (2x70 ml) und mit 2 N NaOH auf einen pH-Wert von 14 eingestellt. Diese basische wässrige Phase wird mit Dichlormethan extrahiert (2x70 ml), über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 6 g (52 mmol, 74,3%), Lit.: 99%<sup>[196]</sup> gelbliches, leicht viskoses Öl.

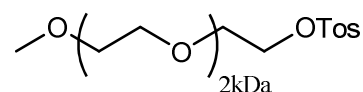
<sup>300 MHz</sup>-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): [δ/ppm] = 3,63 (m, 6H, c, d, e), 3,50 (t, J = 5,1 Hz, 2H, b), 3,37 (t, J = 5,1 Hz, 2H, a), 2,85 (t, J = 5,4 Hz, 2H, f), 1,48 (m, 2H, -NH<sub>2</sub>).

ESI-MS: [m/z] = 174,96 ([M-H]<sup>+</sup>, ber.: 175,11),

C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (174,11 g/mol)

### 5.2.3 PEG<sub>2kDa</sub> Linker mit Aminfunktionalität

#### m-PEG<sub>2kDa</sub>-Mesylate (PEG-1)



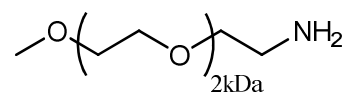
50 g (0,025 mol) mPEG<sub>2kDa</sub> wird in 250 ml Toluol suspendiert. Anschließend werden 125 ml des Toluols abdestilliert um restliche Wasserspuren aus der Reaktion zu ziehen. Der Ansatz wird auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 100 ml abs. Dichlormethan versetzt. Diese Lösung wird auf 0 – 5 °C gekühlt und es werden 3,66 ml (0,036 mol) Triethylamin hinzugefügt. Unter Rühren und bei 0 °C werden langsam 3,72 ml (0,032 mol) Methansulfonylchlorid über ein Septum zugetropft und die Reaktionsmischung weitere 2 h bei 4 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird am Rotationsverdampfer eingengt, über eine Glasfritte filtriert und zweimal in 500 ml eines Gemisches aus Isopropylalkohol/Diethylether (30:70) gefällt, zentrifugiert und getrocknet.

Ausbeute: 34,61 g (0,0168 mol, 67,2%). Farbloser, puderartiger Feststoff.

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): [δ/ppm] = 4,36 – 4,33 (m, 2H, CH<sub>3</sub>-SO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3,72 – 3,50 (m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-), 3,34 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>), 3,05 (s, 3H, -SO<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

M<sub>n</sub> = 20000 g/mol

#### PEG<sub>2kDa</sub> Amin (PEG-2)



3 g (1,5 mmol) m-PEG<sub>2kDa</sub>-Mesylate (PEG-1) wird mit 90 mg (1,68 mmol) Ammoniumchlorid in einem Rundkolben vorgelegt und in 900 ml einer 25%igen Ammoniumhydroxid-Lösung suspendiert. Die Reaktionsmischung wird auf 50 °C erhitzt, bis eine klare Lösung entsteht dann wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es werden weitere 300 ml Ammoniumhydroxid-Lösung zugegeben und weitere 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das bei der Reaktion entstehende Ammoniakgas wird in eine 2 N HCl Waschlösung eingeleitet. Die wässrige Reaktionslösung wird mit Dichlormethan (4x200 ml) extrahiert, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel am

Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wird dreimal in kaltem Diethylether gefällt, zentrifugiert (5 °C, 15 min, 4500 rpm), dekantiert und unter Vakuum getrocknet.

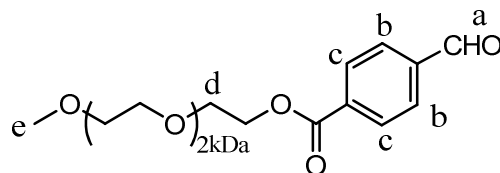
Ausbeute: 2,76 g (1,38 mmol, 92%). Leicht gelber, pulverartiger Feststoff.

$300\text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): [ $\delta/\text{ppm}$ ] = 3,88 – 3,50 (m,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ), 3,37 (s, 3H,  $-\text{O}-\text{CH}_3$ ), 2,94 (t, 2H,  $J = 5,1\text{ Hz}$ ,  $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ ).

$M_n = 20000\text{ g/mol}$

### 5.2.4 Säurelabiler $\text{PEG}_{2\text{kDa}}$ Linker mit Esterfunktionalität

#### Methoxy-(Poly(ethylenglykol))-benzaldehyd (PEG-3)<sup>[153]</sup>



8 g (4 mmol)  $\text{PEG}_{2\text{kDa}}$ -Monomethylether werden in 150 ml Dichlormethan gelöst. 6 g (40 mmol) *p*-Carboxybenzaldehyd, 1,3 g (10,4 mmol) 4-(Dimethylamino)-pyridin und 8,3 g (42 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid werden der Reaktionslösung zugegeben und die Suspension wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Feststoff wird filtriert und mit Dichlormethan gewaschen (2x20 ml).

#### Aufreinigung Methode A

Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer eingengt, in kaltem Diethylether gefällt, zentrifugiert (15 min, 4000 rpm) und dekantiert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Eluent: DCM/MeOH, 9,5:1,2), wobei zuerst alle Verunreinigungen mit Dichlormethan eluiert werden. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt, das Produkt in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 4,1 g (2 mmol, 50%), farbloser Feststoff.  $R_f = 0$  (DCM),  $R_f = 0,9$  (DCM/MeOH, 9,5:1,2).

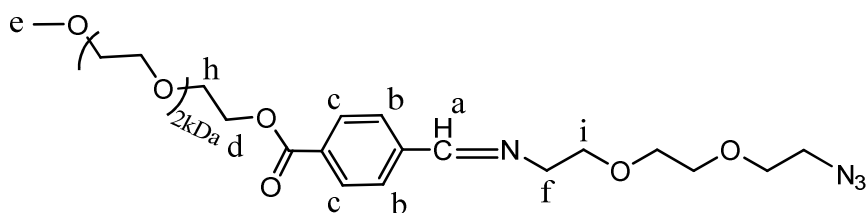
### Aufreinigung Methode B

Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und der Feststoff in 200 ml 2-Propanol bei 40 °C umkristallisiert. Der Feststoff wird abfiltriert und mit 2-Propanol (2x20 ml) und Diethylether (2x20 ml) gewaschen. Der Feststoff wird unter Vakuum bei 40 °C über Nacht getrocknet.

Ausbeute: 8,5 g (4 mmol, 100%), Lit.: 80%<sup>[153]</sup>, gelblicher Feststoff.

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): [ $\delta/ppm$ ] = 10,09 (s, 1H, a), 8,20 (d, 2H, J = 8,2 Hz, b), 7,94 (d, 2H, J = 8,5 Hz, c), 4,52 – 4,47 (m, 2H, d), 3,85 – 3,45 (m, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3,36 (s, 3H, e).

### **4-(1-Imino-3,6-dioxaoctyl-azid)-(methoxy-(poly(ethylenglykol))-benzoesäureester (PEG-4)<sup>[153]</sup>**



Zu einer Lösung aus 167 mg (1 mmol) 2-(2-Azidodieethoxy)-ethanamin (**PEG-3**) in 10 ml Dichlormethan wird eine Lösung aus 1 g (0,47 mmol) Methoxy-(Poly(ethylenglykol))-benzaldehyd in 50 ml Chloroform gegeben und 24 h bei 40 °C gerührt. Der Ansatz wird unter Vakuum eingeeengt und in 100 ml kaltem Diethylether mit einem Tropfen Ammoniak-Lösung gefällt, zentrifugiert (15 min, 4000 rpm) und dekantiert. Das erhaltende Produkt wird am Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,54 g (0,27 mmol, 57%), Lit.: 70%<sup>[153]</sup>, leicht gelber Feststoff.

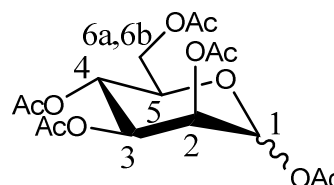
400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY] (CDCl<sub>3</sub>): [ $\delta/ppm$ ] = 8,34 (s, 1H, a), 8,08 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HbHc</sub> = 8,4 Hz, b), 7,79 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HcHb</sub> = 8,4 Hz, c), 4,50 – 4,45 (m, 2H, d), 3,84 – 3,44 (m, h, i {3,84 – 3,79}, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O {3,70 – 3,44}), 3,57 (m, 2H, g), 3,36 (s, 3H, e), 3,31 (m, 2H, f).

100,6 MHz-<sup>13</sup>C-NMR [HSQC] (CDCl<sub>3</sub>): [ $\delta/ppm$ ] = 166,2 (Ar-COO-), 161,9 (Ar-CH=N-), 140,1 (Ar-C=N-), 130,1 (Ar<sub>b</sub>-C=N-), 128,1 (Ar<sub>c</sub>-C=N-), 72,0 (N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-), 70,9 – 70,2 (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 69,28 (-COO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 64,42 (-COO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 61,33 (N<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 59,15 (-O-CH<sub>3</sub>), 50,75 (Ar-CH=N-CH<sub>2</sub>-).

## 5.3 Die Mannose Linker

### 5.3.1 Aminfunktionalisierter Mannose Linker

#### 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-mannopyranosid (**Man1**)<sup>[80]</sup>



Eine Lösung aus 5 g (27,7 mmol) D-Mannose in 200 ml Pyridin wird mit 39 ml (415 mmol) Essigsäureanhydrid versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wird im Hochvakuum entfernt und der Ansatz mit Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird in 200 ml Ethylacetat aufgenommen, mit 2 N HCl (3x50 ml) gewaschen und anschließend mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (3x50 ml) sowie gesättigter NaCl-Lösung (1x40 ml) extrahiert. Die organischen Phasen werden mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel wird im Vakuum entfernt. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Synthese verwendet.

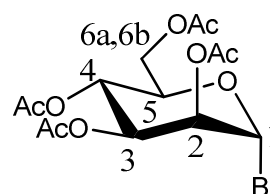
Ausbeute: 10 g (25,6 mmol, 92%), schwach gelbes hochviskoses Öl. Lit.: 100%<sup>[80]</sup>  
R<sub>f</sub> = 0,57 (Hex/EtOAc, 1:1).

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): [δ/ppm] = 6,06 (d, J=1,8 Hz, 1H, 1α), 5,84 (d, J=1,2 Hz, 1H, 1β), 5,46 (dd, J=1,1 Hz, 3,3 Hz, 1H, 2β), 5,24 – 5,34 (m, 3H, 2α, 3α, 4α), 5,12 (dd, J=3,3 Hz, 9,9 Hz, 1H, 3β), 4,23 – 4,32 (m, 2H, 4β, 5α), 4,12 – 4,02 (m, 4H, 6αα, 6βα, 6αβ, 6ββ), 3,78 (ddd, J=2,4 Hz, 5,3 Hz, 9,8 Hz, 1H, 5β), 2,19 – 1,94 (5s, 15H, -CH<sub>3</sub>).

ESI-MS: [m/z] = 413,52 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 413,11), 803,24 ([M-M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 803,23).

C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> (390,12 g/mol)

#### 2,3,4,6-Tetra-*O*-acteyl-D-mannopyranosylbromid (**Man2**)<sup>[80]</sup>



Zu einer Lösung aus 10 g (25,6 mmol) 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-mannopyranosid (**Man1**) in 25 ml Dichlormethan werden bei 0 °C unter Argonatmosphäre und kräftigem

Rühren 20 ml 33%iger HBr/Essigsäure zugetropft. Nach 2 h Rühren bei Raumtemperatur wird der Ansatz mit 200 ml Dichlormethan verdünnt und mit eiskaltem Wasser (3x200 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit einer gesättigten NaHCO<sub>3</sub>-Lösung neutralisiert, mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und das erhaltende Produkt wird ohne weitere Aufreinigung im nächsten Syntheseschritt verwendet.

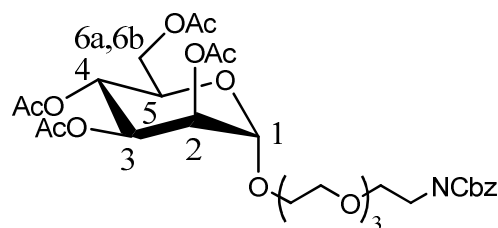
Ausbeute: 9,8 g (24 mmol, 93%), farbloses hochviskoses Öl. Lit.: 81%<sup>[80]</sup>. R<sub>f</sub> = 0,3 (Hex/EtOAc, 6:4).

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): [ $\delta$ /ppm] = 6,26 (d, J = 1,1 Hz, 1H, 1), 5,67 (dd, J = 3,4 Hz, 10,2 Hz, 1H, 3), 5,40 (dd, J = 1,6 Hz, 3,4 Hz, 1H, 2), 5,31 (t, J = 10,1 Hz, 1H, 4), 4,29 (dd, J = 4,8 Hz, 12,4 Hz, 1H, 5), 4,18 (ddd, J = 1,9 Hz, 4,9 Hz, 10,1 Hz, 1H, 6a), 4,09 (dd, J = 2,1 Hz, 12,4 Hz, 1H, 6b), 2,23 – 2,03 (4s, 12H, -CH<sub>3</sub>).

ESI-MS: [ $m/z$ ] = 412,16 ([M+H]<sup>+</sup>, ber.: 412,20).

C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>O<sub>5</sub>Br (411,20 g/mol)

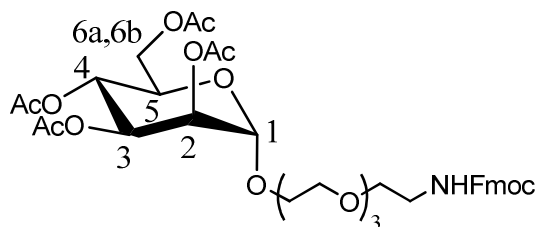
### 11-Benzyloxycarbonylamino-3,6,9-trioxaundecan-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-mannopyranosid (Man3)



2,4 g (5,9 mmol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-D-mannopyranosylbromid (**Man2**) und 2,9 g (8,9 mmol) 1-(Benzoylcarbonylamino-11-hydroxy-3,6,9-trioxa)undecan (**Sp4**) werden in 100 ml Dichlormethan gelöst, mit 3 g Molekularsieb (3 Å) versetzt und 30 Minuten unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss bei -20 °C gerührt. 1,9 g (7,5 mmol) Silbertrifluormethansulfonat werden unter Argon zu der Mischung gegeben und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird durch Zugabe von Triethylamin auf einen pH-Wert von 8 gebracht. Der Rückstand wird über Celite abfiltriert, mit Dichlormethan gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wird unter Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Eluent: EtOAc).

Ausbeute: 2,7 g (4,1 mmol, 70%), schwach gelbes, hochviskoses Öl.  $R_f = 0,6$  (EtOAc).  
 $400\text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $[\delta/\text{ppm}] = 7,34$  (m, 5H, Ar-H), 5,34 (dd,  $J = 3,2\text{ Hz}$ , 10 Hz, 1H, 4), 5,28 (d,  $J = 9,6\text{ Hz}$ , 1H, 3), 5,25 (t,  $J = 1,6\text{ Hz}$ , 1H, 2), 5,08 (s, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-Ar), 4,85 (d,  $J = 1,6$ , 1H, 1), 4,28 (dd,  $J = 5,2\text{ Hz}$ , 12 Hz, 1H, 5), 4,18 (t,  $J = 4,4\text{ Hz}$ , 1H, 6a), 4,06 (m, 1H, 6b), 3,63 – 3,53 (m, 14H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3,38 (q, 2H,  $J = 5,2\text{ Hz}$ , -CH<sub>2</sub>-O-Man), 2,13 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2,08 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2,02 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1,97 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>).  
 $\text{ESI-MS}$ :  $[m/z] = 680,28$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 680,64).  
 $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{NO}_{15}$  (657,66 g/mol)

**11-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3,6,9-trioxa-undecyl-2,3,4,6-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (Man4)**



1,6 g (3,9 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-D-mannopyranosylbromid (**Man2**) und 1,8 g (4,3 mmol) 1-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-11-hydroxy-3,6,9-trioxaundecan (**Sp5**) werden in 60 ml Dichlormethan gelöst, mit 3 g Molekularsieb (3 Å) versetzt und 30 Minuten unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss bei -20 °C gerührt. 1,2 g (4,7 mmol) Silbertrifluormethansulfonat werden unter Argon zu der Mischung gegeben und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird durch Zugabe von Triethylamin auf einen pH-Wert von 8 gebracht. Der Rückstand wird über Celite abfiltriert, mit Dichlormethan gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Eluent: EtOAc).

Ausbeute: 2 g (2,7 mmol, 69%), schwach gelbes, hochviskoses Öl.  $R_f = 0,6$  (EtOAc).  
 $400\text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $[\delta/\text{ppm}] = 7,76$  (dt,  $J = 7,7\text{ Hz}$ , 0,9 Hz, 2H, H4-Fmoc, H5-Fmoc), 7,60 (d,  $J = 7,4\text{ Hz}$ , 2H, H1-Fmoc, H8-Fmoc), 7,40 (t,  $J = 7,2\text{ Hz}$ , 2H, H3-Fmoc, H6-Fmoc), 7,31 (td,  $J = 7,4\text{ Hz}$ , 1,3 Hz, 2H, H2-Fmoc, H7-Fmoc), 5,36 (dd,  $J = 10\text{ Hz}$ , 3,2 Hz, 1H, 4), 5,3 (d,  $J = 9,7$ , 1H, 3), 5,26 (dd,  $J = 3,2\text{ Hz}$ , 1,8 Hz, 1H, 2), 4,86 (d,  $J = 1,7\text{ Hz}$ , 1H, 1), 4,41 (d,  $J = 6,9\text{ Hz}$ , 2H, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4,29 (dd,  $J = 12,4\text{ Hz}$ , 5,1 Hz, 1H, 5), 4,22 (t,  $J = 6,9\text{ Hz}$ , 1H, H9-Fmoc), 4,10 (m, 2H, 6a, 6b), 3,78 (m, 1H, Man-CHH-

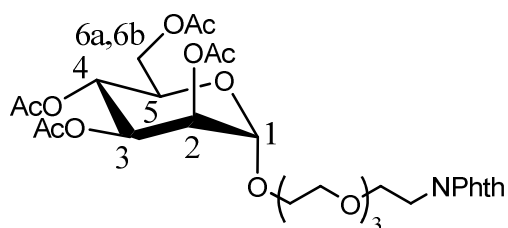


CH<sub>2</sub>-O ), 3,66–3,55 (m, 13H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3,38 (q, 2H, J = 5,3 Hz, -CH<sub>2</sub>-NH-Fmoc), 2,15 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2,09 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2,03 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1,98 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>).

*ESI-MS*: [*m/z*] = 768,30 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 768,27).

C<sub>37</sub>H<sub>47</sub>NO<sub>15</sub> (745,29 g/mol)

### 11-(*N*-Phthalimid)-3,6,9-trioxaundecan-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-β-*D*-mannopyranosid (Man5)



2 g (4,9 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-*D*-mannopyranosylbromid (**Man2**) und 2,4 g (7,3 mmol) *N*-(11-hydroxy-3,6,9-trioxaundecyl)phthalimid (**Sp2**) werden in 100 ml Dichlormethan gelöst, mit 3 g Molekularsieb (3 Å) versetzt und 30 Minuten unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss bei -20 °C gerührt. 1,9 g (7,3 mmol) Silbertrifluormethansulfonat werden unter Argon zu der Mischung zugegeben und die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Ansatz wird durch Zugabe von Triethylamin auf einen pH-Wert von 8 gebracht. Der Rückstand wird über Celite abfiltriert, mit Dichlormethan gewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Eluent: EtOAc/cHex, 4:1).

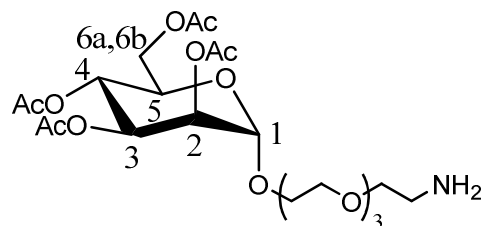
Ausbeute: 2 g (3,1 mmol, 63%), schwach gelbes, hochviskoses Öl. R<sub>f</sub> = 0,4 (EtOAc/cHex, 4:1).

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): [*δ/ppm*] = 7,84 (m, 2H, Ar-*H*), 7,72 (m, 2H, Ar-*H*), 5,35 (dd, J = 10 Hz, 3,2 Hz, 1H, 4), 5,3 (d, J = 9,7, 1H, 3), 5,26 (dd, J = 3,3 Hz, 1,8 Hz, 1H, 2), 4,86 (d, J = 1,6 Hz, 1H, 1), 4,29 (dd, J = 12,4 Hz, 5,1 Hz, 1H, 5), 4,13 – 4,04 (m, 2H, 6a, 6b), 3,9 (t, J = 5,9 Hz, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3,78 (m, 1H, Man-CHH-CH<sub>2</sub>-O), 3,74 (t, J = 5,9 Hz, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3,68 – 3,58 (m, 11H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 2,15 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2,10 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2,03 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1,98 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>).

*ESI-MS*: [*m/z*] = 676,21 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 676,21).

C<sub>30</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>15</sub> (653,23 g/mol)

**11-Amino-3,6,9-trioxa-undecyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (Man6)**



Methode A

0,5 g (0,76 mmol) 11-Benzyloxycarbonylamino-3,6,9-trioxaundecan-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-mannopyranosid (**Man3**) wird in 10 ml Methanol gelöst und vorsichtig mit Essigsäure ein pH-Wert von 5 eingestellt. Die Reaktionsmischung wird mittels Membranpumpenvakuum entgast und mit Argon geflutet. Im Argongegenstrom werden ca. 0,5 g Pd(OH)<sub>2</sub>/C (20%) als Katalysator zugegeben und erneut Vakuum gezogen. Der Reaktionskolben wird anschließend mit Wasserstoff geflutet (Hydrierblase) und der Ansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur kräftig gerührt. Die Wasserstoffatmosphäre wird mit einer Argonatmosphäre getauscht und der Katalysator über Filtration über Celite entfernt. Die Reaktionsmischung wird durch Zugabe einer gesättigten NaHCO<sub>3</sub>-Lösung neutralisiert und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 0,4 g (0,76 mmol, 100%), schwach gelbes, hochviskoses Öl. R<sub>f</sub> = 0,2 (Cyclohexane:EtOH:TEA (2:3:0,15)).

Methode B

1 g (1,34 mmol) 11-(Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3,6,9-trioxa-undecyl-2,3,4,6-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**Man4**) wird in 10 ml Dioxan und 3,5 ml dest. Wasser gelöst und vorsichtig mit Essigsäure ein pH-Wert von 5 eingestellt. Die Reaktionsmischung wird mittels Membranpumpenvakuum entgast und mit Argon geflutet. Im Argongegenstrom werden ca. 0,5 g Pd(OH)<sub>2</sub>/C (20%) als Katalysator zugegeben und erneut Vakuum gezogen. Der Reaktionskolben wird anschließend mit Wasserstoff geflutet (Hydrierblase) und der Ansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur kräftig gerührt. Die Wasserstoffatmosphäre wird mit einer Argonatmosphäre getauscht und der Katalysator über Filtration über Celite entfernt. Die Reaktionsmischung wird durch Zugabe einer gesättigten NaHCO<sub>3</sub>-Lösung neutralisiert und das Lösemittel unter Vakuum entfernt.

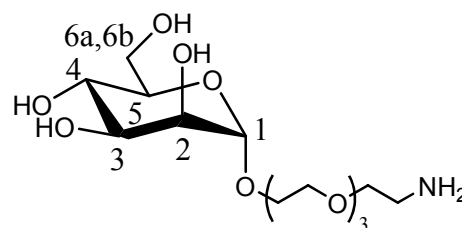
Ausbeute: 0,7 g (1.3 mmol, 100%), schwach gelbes, hochviskoses Öl.  $R_f = 0,2$  (Cyclohexane:EtOH:TEA (2:3:0,15)).

$400\text{ MHz-}^1\text{H-NMR (CDCl}_3\text{): } [\delta/\text{ppm}] = 6.61\text{ (br, -NH}_2\text{)}, 5.34\text{ (dd, } J = 3.2\text{ Hz, } 10\text{ Hz, } 1\text{H, } 4\text{)}, 5.28\text{ (d, } J = 9.6\text{ Hz, } 1\text{H, } 3\text{)}, 5.25\text{ (t, } J = 1.6\text{ Hz, } 1\text{H, } 2\text{)}, 4.87\text{ (d, } J = 1.6\text{ Hz, } 1\text{H, } 1\text{)}, 4.28\text{ (dd, } J = 5.2\text{ Hz, } 12\text{ Hz, } 1\text{H, } 5\text{)}, 4.22\text{ (t, } J = 4.4\text{ Hz, } 1\text{H, } 6\text{a)}, 4.10\text{ (m, } 1\text{H, } 6\text{b)}, 3.63\text{ – } 3.53\text{ (m, } 14\text{H, CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}, 3.05\text{ (m, } 2\text{H, -CH}_2\text{-NH}_2\text{)}, 2.15\text{ (s, } 3\text{H, -CH}_3\text{)}, 2.09\text{ (s, } 3\text{H, -CH}_3\text{)}, 2.03\text{ (s, } 3\text{H, -CH}_3\text{)}, 1.98\text{ (s, } 3\text{H, -CH}_3\text{)}.$

*ESI-MS*:  $[m/z] = 524.65\text{ ([M+H]}^+\text{, ber.: } 524.23; 546.20\text{ [M+Na]}^+\text{, ber.: } 546.21).$

$\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{NO}_{13}$  (523.23 g/mol)

### 11-Amino-3,6,9-trioxa-undecyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (Man7)



#### Methode A

1,7 g (2,6 mmol) 11-(*N*-Phthalimid)-3,6,9-trioxaundecan-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-mannopyranosid (**Man5**) werden in 35 ml Methanol gelöst und mit 0,95 ml Hydrazin-Hydrat Lösung (64%) versetzt. Der Ansatz wird unter Argon bei Raumtemperatur drei Tage gerührt, wobei ein farbloser Feststoff ausfällt. Dieser wird abfiltriert, das Filtrat wird im Vakuum eingedunstet und säulenchromatographisch aufgereinigt (Eluent: EtOH/NH<sub>3</sub>-Lösung (25%), 4,5:1).

Ausbeute: 900 mg (2,5 mmol, 97%), farbloses, hochviskoses Öl.  $R_f = 0,16$  (EtOH/NH<sub>3</sub>-Lösung (25%).

### Methode B

1,0 g (1,9 mmol) 11-Amino-3,6,9-trioxa-undecyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**Man6**) werden in 25 ml Methanol gelöst und tropfenweise mit einer methanolischen Natriummethanolat-Lösung auf pH-Wert 10,0 eingestellt. Der Ansatz wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und mit Essigsäure neutralisiert. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Eluent: EtOH/H<sub>2</sub>O/TEA, 3:0,5:0,5).

Ausbeute: 420 mg (1,1 mmol, 58%), farbloses, hochviskoses Öl.  $R_f = 0,2$  (EtOH/H<sub>2</sub>O/TEA, 3:0,5:0,5).

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY] (D<sub>2</sub>O): [ $\delta/ppm$ ] = 4,87 (d, <sup>3</sup>J<sub>H1,H2</sub> = 1,7 Hz, 1H, 1), 3,94 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H2,H3</sub> = 3,4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H2,H1</sub> = 1,7 Hz, 1H, 2), 3,88 – 3,66 (m, 19H, 6a,6b {3,88 – 3,83}, 3 {3,79}, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O {3,75 – 3,65}, 4 {3,63}, 5 {3,61}), 3,16 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>).

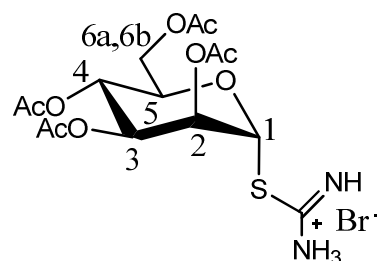
100,6 MHz-<sup>13</sup>C-NMR [HSQC] (D<sub>2</sub>O): [ $\delta/ppm$ ] = 99,96 (C1), 72,75 (C5), 70,51 (C3), 69,89 (C2), 69,61, 69,55, 69,52, 69,44 (O-CH<sub>2</sub>), 66,85 (C4), 66,60 (Man-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 60,83 (C6), 39,21 (CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>).

ESI-MS: [ $m/z$ ] = 356,56 ([M+H]<sup>+</sup>, ber.: 356,18); 378,18 [M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 378,16).

C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>9</sub> (355,18 g/mol)

### 5.3.2 Thiofunktionalisierte Mannose

#### 1-Isothiuronium-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acteyl)- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**Man8**)<sup>[160]</sup>



5 g (12,2 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acteyl-D-mannopyranosylbromid (**Man2**) und 1,5 g (19,5 mmol) Thioharnstoff werden in 15 ml absolutiertem Aceton gelöst und unter Argonatmosphäre bei 60 °C über Nacht gerührt. Der Ansatz wird mit 20 ml Dichlormethan versetzt und der farblose Feststoff wird abfiltriert. Das erhaltene Filtrat wird mit Wasser extrahiert (3x15 ml). Die wässrigen Phasen werden gesammelt und das

Wasser im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird in Chloroform aufgenommen und der Ansatz filtriert. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und der erhaltende Feststoff wird ohne weitere Aufreinigung im nächsten Reaktionsschritt verwendet.

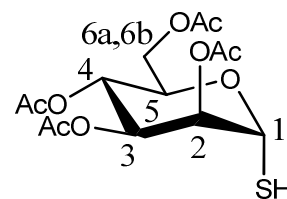
Ausbeute: 4,3 g (25,6 mmol, 92%), farbloser Feststoff.

$300\text{ MHz}^{-1}\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ):  $[\delta/\text{ppm}] = 9,36$  (br, m, 4H,  $-\text{NH}_2$ ), 5,36 (dd,  $J = 1,6\text{ Hz}$ , 3,4 Hz, 1H, 2), 5,18 (t,  $J = 9,8\text{ Hz}$ , 1H, 5), 5,05 (dd,  $J = 3,4\text{ Hz}$ , 10,0 Hz, 1H, 3), 4,31 (dt,  $J = 2,5, 9,7\text{ Hz}$ , 1H, 4), 4,23 (dd,  $J = 5,2\text{ Hz}$ , 12,3 Hz, 1H, 6a), 4,08 (dd,  $J = 2,1\text{ Hz}$ , 12,3 Hz, 1H, 6b), 2,17 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 2,09 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 2,03 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 1,89 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ).

$\text{ESI-MS}$ :  $[m/z] = 407,12$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber.: 407,10); 813,27 ( $[\text{M}-\text{M}+\text{H}]^+$ , ber.: 813,22).

$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}$  (406,10 g/mol)

### 2,3,4,6-Tetra-*O*-acteyl-1-thio- $\alpha$ -D-mannopyranosid (Man9)<sup>[160]</sup>



4 g (8,2 mmol) 1-Isothiouronium-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acteyl)- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**Man8**) und 2,0 g (10,7 mmol) Natriumpyrosulfit werden in 200 ml Dichlormethan und 90 ml dest. Wasser gelöst und für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wird auf Raumtemperatur abgekühlt und die Phasen werden separiert. Die wässrige Phase wird mit Dichlormethan zurückextrahiert (3x200 ml) und alle organischen Phasen werden gesammelt, mit Wasser gewaschen (1x50 ml), mit gesättigter NaCl-Lösung (1x50 ml) ausgeschüttelt und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und das erhaltene Produkt wird ohne weitere Aufreinigung im nächsten Syntheseschritt eingesetzt.

Ausbeute: 2,3 g (6,3 mmol, 77%), schwach gelbes, viskoses Öl.  $R_f = 0,5$  (EtOAc/PE, 1:1).

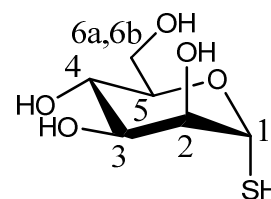
$300\text{ MHz}^{-1}\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $[\delta/\text{ppm}] = 5,54$  (dd,  $J = 6,9\text{ Hz}$ , 1,3 Hz, 1H, 1), 5,31 (br, 2H, 2, 3), 5,28 (br, 2H, 4, 5), 4,28 (dd,  $J = 12,1\text{ Hz}$ , 4,9 Hz, 1H, 6a), 4,09 (dd,  $J = 12,1$ ,

2,1 Hz, 1H, 6b), 2,15 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2,08 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 2,04 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1,98 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>).

*ESI-MS*: [*m/z*] = 365,11 ([M+H]<sup>+</sup>, ber.: 365,08).

C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub>S (364,08 g/mol)

### 1-Thiol- $\alpha$ -D-mannose (**Man10**)<sup>[161]</sup>



2,3 g (6,3 mmol) 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1-thio- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**Man9**) wird in absolutiertem Methanol gelöst und mit einer methanolischen Natriummethanolat-Lösung auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, wobei das Produkt als Natriumsalz ausfällt. Durch Zugabe von Amberlyst 15 und anschließendem entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man das gewünschte Produkt.

Ausbeute: 1,3 g (6 mmol, 95%), farbloses, viskoses Öl. R<sub>f</sub> = 0,5 (EtOAc/PE, 1:1).

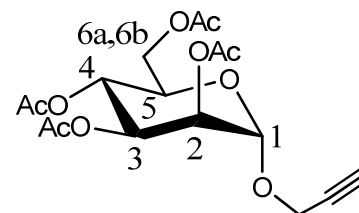
300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): [ $\delta$ /ppm] = 5,40 (d, J = 1,6 Hz, 1H, 1), 4,26 (dd, J = 3,3 Hz, 9,7 Hz, 1H, 3), 4,10 (m, 1H, 5), 3,86 (dd, J = 1,6 Hz, 3,3 Hz, 1H, 2), 3,75 (m, 2H, 6a, 6b), 3,58 (t, J = 9,8 Hz, 1H, 4).

*ESI-MS*: [*m/z*] = 195,15 ([M-H]<sup>+</sup>, ber.: 195,04).

C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>S (196,04 g/mol)

### 5.3.3 Alkinfunktionalisierte Mannose

#### Prop-2-ynyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**Man11**)<sup>[163]</sup>



Zu einer Lösung aus 1 g (2,5 mmol) 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetyl-D-mannopyranosid (**Man2**) in 40 ml absolutiertem Dichlormethan wird bei 0 °C unter Rühren und Argonatmosphäre 600  $\mu$ l (4,7 mmol) BF<sub>3</sub>-Etherat zugetropft. Die Reaktionsmischung wird bei Raumtemperatur 4 h gerührt und anschließend tropfenweise mit 600  $\mu$ l (10,2 mmol) Propargylalkohol versetzt. Der Ansatz wird weitere 12 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit 40 ml Dichlormethan verdünnt und mit 20%iger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (2x40 ml), sowie mit Wasser (1x40 ml) gewaschen. Die organischen Phasen werden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Eluent: EtOAc/Hex, 2:1).

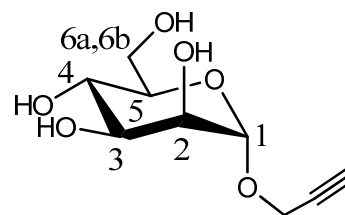
Ausbeute: 0,88 g (2,3 mmol, 94%), farbloses, hochviskoses Öl. Lit.: 81%<sup>[80]</sup>. R<sub>f</sub> = 0,3 (Hex/EtOAc, 6:4).

$300\text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>): [ $\delta$ /ppm] = 5,35 (dd, J = 8,3 Hz, 2,2 Hz, 1H, 3), 5,32 (d, J = 8,3 Hz, 1H, 4), 5,28 (dd, J = 2,8 Hz, 1,7 Hz, 1H, 2), 5,04 (d, J = 1,7 Hz, 1H, 1), 4,28 (dd, J = 5,2 Hz, 12,2 Hz, 1H, 6a), 4,28 (d, J = 2,4 Hz, 2H, -O-CH<sub>2</sub>C≡CH), 4,11 (dd, J = 12,2 Hz, 2,4 Hz, 1H, 6b), 4,01 (m, 1H, 5), 2,47 (t, J = 2,4 Hz, 1H, -O-CH<sub>2</sub>C≡CH), 2,17 – 1,99 (4s, 12H, -CH<sub>3</sub>).

*ESI-MS*: [ $m/z$ ] = 409,13 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber.: 409,10).

C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub> (386,12 g/mol)

**Prop-2-ynyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (Man12)**



440 mg (1,1 mmol) Prop-2-ynyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**Man11**) wird in 5 ml absolutiertem Methanol gelöst und mit einer methanolischen Natriummethanolat-Lösung auf einen pH-Wert von 8.5 eingestellt. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von Amberlyst 15 und anschließendem entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum erhält man das gewünschte Produkt.

Ausbeute: 245 mg (1,1 mmol, 100%), farbloser Feststoff.

$400\text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$  [ $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ ] (*MeOD*): [ $\delta/\text{ppm}$ ] = 4,96 (d,  $^3\text{J}_{\text{H1,H2}} = 1,7\text{ Hz}$ , 1H, 1), 4,27 (s, 2H, -O-CH<sub>2</sub>C≡CH), 3,83 (dd,  $^3\text{J}_{\text{H6a,H6b}} = 11,8\text{ Hz}$ ,  $^3\text{J}_{\text{H6a,H5}} = 2,3\text{ Hz}$ , 1H, 6a), 3,79 (dd,  $^3\text{J}_{\text{H2,H3}} = 3,2\text{ Hz}$ ,  $^3\text{J}_{\text{H2,H1}} = 1,7\text{ Hz}$ , 1H, 2), 3,70 (m, 1H, 6b), 3,66 (m, 1H, 3), 3,61 (t, J = 9,4 Hz, 1H, 4), 3,50 (ddd,  $^3\text{J}_{\text{H5,H4}} = 8,9\text{ Hz}$ ,  $^3\text{J}_{\text{H5,H6a}} = 5,9\text{ Hz}$ ,  $^3\text{J}_{\text{H5,H6b}} = 2,3\text{ Hz}$ , 1H, 5), 3,30 (t, J = 1,6 Hz, 1H, -O-CH<sub>2</sub>C≡CH).

$100,6\text{ MHz-}^{13}\text{C-NMR}$  [*HSQC*] (*D<sub>2</sub>O*): [ $\delta/\text{ppm}$ ] = 99,58 (C1), 74,91 (C5), 72,75 (C3), 71,76 (C2), 68,09 (C4), 62,61 (C6), 54,56 (-O-CH<sub>2</sub>C≡CH), 48,79 (-O-CH<sub>2</sub>C≡CH).

*ESI-MS*: [ $m/z$ ] = 241,05 ([M-Na]<sup>+</sup>, ber.: 241,06).

C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub> (218,08 g/mol)

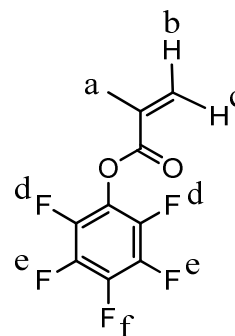


---

## 5.4 Monomersynthesen

### 5.4.1 Reaktivester Monomer

#### Pentafluorophenylmethacrylat (M1)<sup>[119]</sup>



19 ml (164 mmol) frisches Methacrylsäurechlorid wird tropfenweise zu einer auf 0 °C gekühlten Mischung aus 17,9 g (82 mmol) Pentafluorophenol und 17 ml (123 mmol) Triethylamin in 200 ml absolutiertem Dichlormethan gegeben. Nach 5 min. wird das Eisbad entfernt und der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Feststoff wird über Celite abfiltriert und mit Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wird mit Wasser extrahiert (1x 100 ml), über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt. (Eluent: PE). R<sub>f</sub> = 0,43 (PE). Zur weiteren Aufreinigung wird das Produkt unter Hochvakuum (2,4x10<sup>-2</sup> mbar) destilliert (Kopftemperatur 35 °C).

Ausbeute: 20,2 g (80 mmol, 97%), farblose Flüssigkeit. Lit.: 62%<sup>[80]</sup>. R<sub>f</sub> = 0,43 (PE).

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): [δ/ppm] = 6,45 (t, J = 1,0 Hz, 1H, c), 5,91 (m, 1H, b), 2,09 (m, 3H, a).

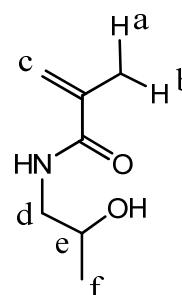
400 MHz-<sup>19</sup>F-NMR (CDCl<sub>3</sub>): [δ/ppm] = -163,68 (dd, J = 17,1 Hz, J = 21,7 Hz, 2F, e), -159,39 (t, J = 21,7 Hz, 2F, f), -153,97 (d, J = 17,4 Hz, 2F, d).

100,6 MHz-<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): [δ/ppm] = 163,22 (-COO-), 142,76 (O-C-Ar), 140,84, 140,09, 139,25, 138,32, 136,78 (-CF), 133,85 (-C=CH<sub>2</sub>), 130,11 (-C=CH<sub>2</sub>), 18,41 (-CH<sub>3</sub>).

C<sub>10</sub>H<sub>5</sub>F<sub>5</sub>O<sub>2</sub> (252,02 g/mol)

## 5.4.2 Wasserlösliches HPMA Monomer

### *N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid (M2)<sup>[197]</sup>



22,54 g (268 mmol) Natriumhydrogencarbonat und 16 ml (207 mmol) 1-Amino-2-propanol werden in 84 ml absolutiertem Dichlormethan suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Innerhalb 1 h werden unter kräftigen Rühren 20 ml (204 mmol) Methacryloylchlorid zugetropft und weitere 30 min. bei 15 °C gerührt. Der Ansatz wird mit 6,7 g (47,2 mmol) Natriumsulfat versetzt und der Feststoff abfiltriert. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Eluent: CHCl<sub>3</sub>/EtOH, 10:1).

Ausbeute: 23,3 g (163,2 mmol, 81%), farblose Kristalle. Lit.: 80%<sup>[197]</sup>. R<sub>f</sub> = 0,3 (CHCl<sub>3</sub>/EtOH, 10:1).

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR [<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY] (D<sub>2</sub>O): [δ/ppm] = 5,69 (m, 1H, a), 5,44 (m, 1H, b), 3,94 (td, <sup>3</sup>J<sub>HeHf</sub> = 6,7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HeHd</sub> = 4,7 Hz, 1H, e), 3,30 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HdHe</sub> = 4,7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HdHd</sub> = 13,9 Hz, 1H, d), 3,23 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HdHe</sub> = 7,0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HdHd</sub> = 13,9 Hz, 1H, d), 1,92 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HcHa</sub> = 1,0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HcHb</sub> = 1,5 Hz, 3H, c), 1,16 (d, <sup>3</sup>J<sub>HfHe</sub> = 6,4 Hz, 3H, f).

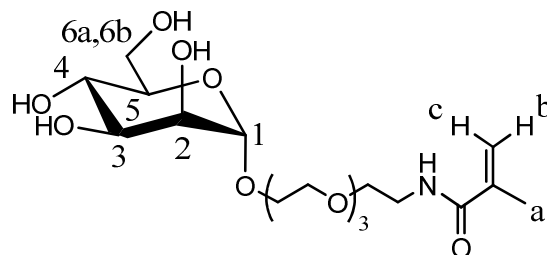
100,6 MHz-<sup>13</sup>C-NMR [HSQC] (D<sub>2</sub>O): [δ/ppm] = 172,10 (NH-CO-), 139,02 (-C=CH<sub>2</sub>), 120,99 (-C=CH<sub>2</sub>), 66,22 (Ce), 46,20 (Cd), 19,38 (Cf), 17,64 (Cc).

ESI-MS: [m/z] = 166,10 ([M-Na]<sup>+</sup>, ber.: 166,07).

C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub> (143,09 g/mol)

### 5.4.3 Mannose Monomer

#### 11-Amino-3,6,9-trioxa-undecyl- $\alpha$ -D-mannosyl Methacrylat (M3)



107,4 mg (0,64 mmol) Natriumhydrogencarbonat und 400 mg (0,56 mmol) 11-Amino-3,6,9-trioxa-undecyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid werden in absolutiertem Chloroform suspendiert und auf 0 °C abgekühlt. Unter kräftigem rühren werden tropfenweise 106,2  $\mu$ l (0,55 mmol) Methacryloylchlorid in 3 ml absolutiertem Chloroform zugefügt und weitere 30 min. bei 15 °C gerührt. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (Eluent:  $\text{NH}_3$ -Lösung (25%)/EtOH, 0,5:4,5).

Ausbeute: 186 mg (0,44 mmol, 80%), farbloser harziger Feststoff.  $R_f = 0,53$  ( $\text{NH}_3$ -Lösung (25%)/EtOH, 0,5:4,5).

400 MHz- $^1\text{H-NMR}$  [ $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ ] ( $\text{D}_2\text{O}$ ): [ $\delta/\text{ppm}$ ] = 5,69 (m, 1H, c), 5,45 (m, 1H, b), 4,87 (d,  $^3J_{\text{H}_1\text{H}_2} = 1,7$  Hz, 1H, 1), 3,95 (dd,  $^3J_{\text{H}_2\text{H}_1} = 1,7$  Hz,  $^3J_{\text{H}_2\text{H}_3} = 3,4$  Hz, 1H, 2), 3,89 – 3,63 (m, 19H, 6a,6b {3,88 – 3,83}, 3 {3,79},  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$  {3,75 – 3,65}, 4 {3,63}, 5 {3,61}), 3,46 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 5,4$  Hz, 2H,  $\text{NH-CH}_2$ ), 1,93 (m, 3H, a).

100,6 MHz- $^{13}\text{C-NMR}$  [ $\text{HSQC}$ ] ( $\text{D}_2\text{O}$ ): [ $\delta/\text{ppm}$ ] = 172,00 ( $-\text{CO-NH-}$ ), 139,02 ( $-\text{C}=\text{CH}_2$ ) 121,01 ( $-\text{C}=\text{CH}_2$ ), 99,89 (C1), 72,75 (C5), 70,51 (C3), 69,90 (C2), 69,59, 69,45, 69,39 ( $-\text{O-CH}_2$ ), 68,74 ( $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$ ), 66,68 (C4), 66,31 (Man-O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ), 60,86 (C6), 39,05 ( $-\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 17,64 ( $-\text{CH}_3$ ).

ESI-MS: [ $m/z$ ] = 424,23 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber.: 424,21), 446,21 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber.: 446,19).

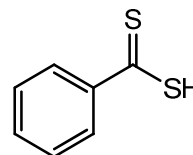
$\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{NO}_{10}$  (423,21 g/mol)

---

## 5.5 Kettentransferreagenzien für die RAFT Polymerisation

### 5.5.1 Säure-CTA

#### Dithiobenzoessäure<sup>[139]</sup>



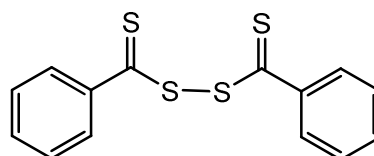
Eine Mischung aus 78,5 ml (0,157 mol) Phenylmagnesiumchlorid in 120 ml absolutiertem THF wird auf 40 °C erwärmt und unter Argonatmosphäre mit 14,2 ml (0,236 mol) Schwefelkohlenstoff tropfenweise unter kräftigem Rühren so zügig versetzt, dass die Temperatur 50 °C nicht überschreitet. Es wird 1 h bei 40 °C gerührt und der Ansatz auf ein Gemisch aus 175 ml Wasser, 25 ml konz. Salzsäure und Eis gegossen. Anschließend wird mit Diethylether extrahiert (1x300 ml), die organische Phase mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen (3x150 ml) und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und das luft- und lichtempfindliche Produkt direkt in der nächsten Reaktion umgesetzt.

Ausbeute: 18,8 g (0,122 mol, 78%), violettes Öl.

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): [ $\delta$ /ppm] = 8,06 (d, J = 8,2 Hz, 2H, HSSC-*o*-Ar-H), 7,59 (t, J = 7,7 Hz, 1H, HSSC-*p*-Ar-H), 7,40 (t, J = 8,2 Hz, 2H, HSSC-*m*-Ar-H), 6,35 (br, 1H, -SH).

C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>S<sub>2</sub> (154,25 g/mol)

#### Dithiobenzoyldisulfit<sup>[140]</sup>



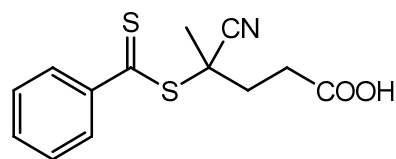
Zu einer Lösung aus 18,8 g (122 mmol) Dithiobenzoessäure in 120 ml Diethylether wird unter kräftigem Rühren tropfenweise, 14,16 g (55,8 mmol) Iod in 100 ml Diethylether und 9,5 g (57,4 mmol) Kaliumiodid in 500 ml Wasser eingetragen. Die Phasen werden anschließend getrennt und die organische Phase mit Wasser gewaschen (3x150 ml), mit

MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Aufreinigung und Charakterisierung in der nächsten Synthesestufe eingesetzt.

Ausbeute: 18,5 g (60,3 mmol, 99%), violetter Feststoff.

C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>S<sub>4</sub> (306,49 g/mol)

#### 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)sulfanyl)pentansäure (CTA1)<sup>[141]</sup>



18,5 g (60,3 mmol) Dithiobenzoesäure und 25,3 g (90,5 mmol) 4,4'-Azobiscyanopentansäure werden in je 150 ml absolutem Ethylacetat gelöst, im Hochvakuum 3x entgast und 16 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und das Produkt dreimalig säulenchromatographisch aufgereinigt (Eluent: CHCl<sub>3</sub>/EtOH, 20:1) und aus Benzol gefriergetrocknet.

Ausbeute: 10,9 g (39,2 mmol, 65%), Lit.: 68%<sup>[141]</sup> rot-violetter, amorpher Feststoff. R<sub>f</sub> = 0,39 (CHCl<sub>3</sub>/EtOH, 20:1).

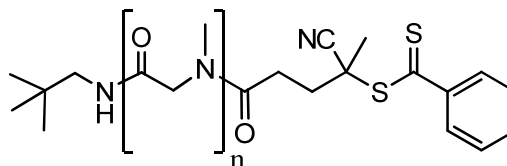
400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): [δ/ppm] = 7,91 (d, J = 8,6 Hz, 2H, -CSS-*o*-Ar-H), 7,57 (t, J = 7,4 Hz, 1H, -CSS-*p*-Ar-H), 7,40 (t, J = 7,7 Hz, 2H, -SSC-*m*-Ar-H), 2,61 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 1,94 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>).

100,6 MHz-<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): [δ/ppm] = 222,28 (-CSS-), 177,28 (-COOH), 144,60 (-CSS-ArC), 133,22 (CSS-*p*-ArC), 128,73 (CSS-*m*-ArC), 126,81 (CSS-*o*-ArC), 118,51 (CN), 45,73 (-C-CH<sub>3</sub>), 33,15 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH), 29,67 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH), 24,31 (CH<sub>3</sub>).

C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (279,38 g/mol)

## 5.5.2 Polysarcosin Makro CTA

### Poly(Sarcosin) Makro CTA (Poly(Sar)-CTA)



#### Allgemeine Synthesevorschrift:

4-Cyano-4-((thiobenzoyl)sulfanyl)pentansäure und Bromotripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat werden in 3-4 ml abs. Dichlormethan gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt. Das Polysarcosin (Synthetisiert und zu Verfügung gestellt von Huesmann *et al.*<sup>[111]</sup>) wird in 4 ml absolutiertem Dichlormethan gelöst und bei 0 °C langsam zur vorgelegten Säure-CTA Lösung zugetropft. Der Ansatz wird weitere 30 min. bei 0 °C gerührt und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Polymerlösung zweimalig in kaltem Diethylether gefällt, zentrifugiert (15 min, 5 °C, 4500 rpm) und dekantiert. Der Feststoff wird in Wasser aufgenommen und über eine Sephadex G-25 Säule aufgereinigt. Die Produktfraktionen werden vereinigt und gefriergetrocknet.

**Tabelle 17:** Ansätze für die Synthese der P(Sar)-CTAs 1 und 2.

	<b>Poly(Sarc)</b>	<b>Säure-CTA</b>	<b>PyBroP</b>	<b>DIEA</b>
<b>Poly(Sar)-CTA 1</b>	0,073 mmol 700 mg	0,109 mmol 30,55 mg	0,109 mmol 50,81 mg	0,291 mmol 50,79 µl
<b>Poly(Sar)-CTA 2</b>	5,848 µmol 100 mg	8,772 µmol 3,1 mg	0,8772 µmol 4,08 mg	0,023 mmol 4,07 µl

**Tabelle 18:** Eigenschaften der synthetisierten P(Sar)-CTAs 1 und 2. GPC wurde in Hexafluoroisopropanol mit PMMA als Standard gemessen.

	<b>Ausbeute</b>	<b>Polymerisationsgrad</b>	<b>M<sub>n</sub> in g/mol</b>	<b>Đ</b>
<b>Poly(Sar)-CTA 1</b>	8,86 mmol 630 mg, 90%	n = 136	9.100 ( <sup>1</sup> H-NMR) 24.000 (HFIP GPC)	1,36
<b>Poly(Sar)-CTA 2</b>	1,13 mmol 80 mg, 80%	n = 200	14.500 ( <sup>1</sup> H-NMR) 32.100 (HFIP GPC)	1,16

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): [δ/ppm] = 7,88 (m, 2H, *o*-Ar-H), 7,57 (m, 1H, *p*-Ar-H), 7,42 (m, 2H, *m*-Ar-H), 4,24 – 3,90 (br, (2n)H, NCH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-), 3,04 – 2,88 (br, (3n)H, N-CH<sub>3</sub>), 0,87 (br, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, Initiator).

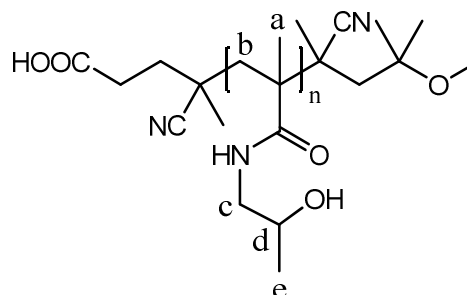
400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): [δ/ppm] = 7,97 (d, J = 7,8 Hz, 2H, *o*-Ar-H), 7,69 (t, J = 7,4 Hz, 1H, *p*-Ar-H), 7,42 (t, J = 7,8 Hz, 2H, *m*-Ar-H), 4,48 – 4,08 (m, br, (2n)H, NCH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-), 3,07 – 2,89 (m, br, (3n)H, N-CH<sub>3</sub>), 1,83 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1,33 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 0,88 (d, J = 10,6 Hz, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, Initiator).

---

## 5.6 Raft Polymerisationen

### 5.6.1 HPMA Homopolymere

#### Säure-CTA mediertes HPMA Polymer (P(HPMA) Kontrolle)



1g (6,9 mmol) *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamid (HPMA) (**M2**), 4,8 mg (0,017 mmol) 4-cyano-4-((thiobenzoyl)sulfanyl)pentansäure (**CTA1**) und 1 mg (0,0032 mmol) 2,2-Azobis-(2,4-dimethyl)valeronitril (ABNDM) werden in 8 ml Dimethylsulfoxid und 3 ml Wasser gelöst. Die Reaktionsmischung wird mittels Argon für 20 min. entgast und über Nacht unter einer Argonatmosphäre bei 40 °C gerührt. Die Polymerlösung wird anschließend 48 h gegen Milli-Q Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 203 mg (20 gew%). Rosafarbener pulverartiger Feststoff.

#### Entfernen der Dithioesterendgruppe:

203 mg des Polymers werden in 6 ml abs. Dimethylsulfoxid gelöst und mit einem 40-fachen Überschuss an Initiator versetzt. Die Reaktion wird bei 40 °C über Nacht gerührt, mit Wasser verdünnt und mit Diethylether extrahiert (2x10 ml) um überschüssigen Initiator zu entfernen. Das Polymer wird über 2 Tage gegen Wasser dialysiert (Dialysemembran: 1kDa) und gefriergetrocknet. Die Abwesenheit der Dithioesterbande bei 302 nm im UV/Vis Spektrum bestätigt die Vollständigkeit der Reaktion.

Ausbeute: 180 mg (89 gew%). Farbloser pulverartiger Feststoff.

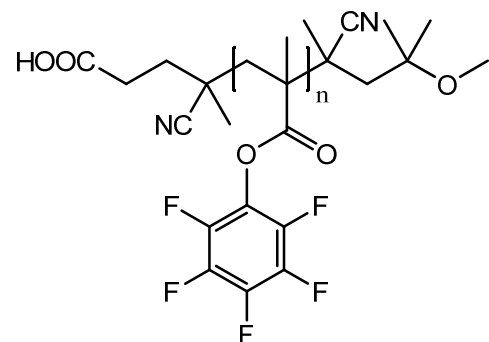
300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): [ $\delta/ppm$ ] = 7,62 (br, 1H, -NH), 3,90 (br, 1H, d), 3,56 (schwach, br, OH), 3,11 (br, 2H, c), 1,87 (br, (2n)H, b), 1,17 (br, (3n)H, a, e).



100,6 MHz-ige  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $[\delta/\text{ppm}] = 179,31$  (m, O=C-NH), 65,51 (m, C-OH), 47,03 (m, -HN-CH<sub>2</sub>-), 44,93 (m, quartäres C), 20,14 (m, CH<sub>2</sub>), 16,55 – 17,92 (m, -CH<sub>3</sub>, Polymerrückgrat).

$M_n = 26.900$  g/mol,  $\text{Đ}$ : 1,2 (HFIP GPC)

### 5.6.2 Säure CTA medierte PFPMA Homopolymere<sup>[198],[21]</sup>



Die RAFT Polymerisation von Pentafluorphenolmethacrylat (**M1**) mit 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)sulfanyl)pentansäure (**CTA1**) wird in einem Schlenkrohr durchgeführt. Alle RAFT Polymerisationen von PFPMA werden analog ausgeführt, so dass hier exemplarisch die Polymerisation für einen Polymerisationsgrad von  $n=92$  vorgestellt wird. Dafür werden 4 g (15,8 mmol) PFPMA in 5 ml abs. Dioxan gelöst und 47 mg (0,17 mmol) Säure-CTA, sowie 4 mg (0,013 mmol) ABNDM hinzugefügt. Nach drei Freeze-Pump Zyklen wird die Reaktionslösung in einem Ölbad bei 40 °C über Nacht gerührt. Die Polymerlösung wird dreimalig in n-Hexan gefällt, zentrifugiert (5 °C, 15 min., 4500 rpm) und unter Vakuum bei 40 °C über Nacht getrocknet. Diese so synthetisierten Polymere können als PFPMA-Makro CTAs für die Synthese von Blockcopolymeren weiter verwendet werden.

Ausbeute: 1,21 g (30 gew%). Rosafarbener, pulverartiger Feststoff.

#### Entfernen der Dithioesterendgruppe

500 mg des Polymers werden in absolutiertem Dioxan gelöst und mit einem 40-fachen Überschuss an Initiator versetzt. Die Reaktion wird bei 40 °C gerührt bis die Lösung farblos wird. Die Polymerlösung wird dreimalig in n-Hexan gefällt, zentrifugiert (5 °C, 15 min, 4500 rpm) und der Feststoff bei 40 °C über Nacht unter Vakuum getrocknet.

Die Abwesenheit der Dithioesterbande bei 302 nm im UV/Vis Spektrum bestätigt die Vollständigkeit der Reaktion.

Ausbeute: 470 mg (94 gew%). Farbloser pulverartiger Feststoff.

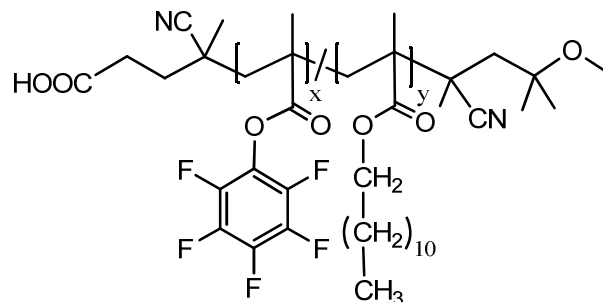
300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): [ $\delta/ppm$ ] = 2,1 – 2,5 (m, br, (2n)H, CH<sub>2</sub>), 1,26 – 1,61 (m, br, (3n)H, CH<sub>3</sub>).

400 MHz-<sup>19</sup>F-NMR (CDCl<sub>3</sub>): [ $\delta/ppm$ ] = -151,45 – -153,14 (br, (2n)F, *o*-Ar-F), -157,96 – -158,22 (br, (1n)F, *p*-Ar-F), -162,91 – -163,39 (br, (2n)F, *m*-Ar-F).

**Tabelle 19:** Ansätze zur Synthese der P(PFPMA) Polymere 1-10, sowie deren Ausbeute und Eigenschaften. <sup>a</sup> mit Dithioesterendgruppe mittels THF GPC und Polystyrol als Standard.

Polymer	PFPMA	Säure-CTA	ABNDM	Ausbeute	M <sub>n</sub> in g/mol <sup>a</sup>	Đ <sup>a</sup>
<b>P(PFPMA)1</b>	4 g	47 mg	4 mg	1,9 g	23.300	1,3
	15,8 mmol	0,17 mmol	0,013 mmol			
<b>P(PFPMA)2</b>	4 g	40 mg	4 mg	1,7 g	22.000	1,3
	15,8 mmol	0,14 mmol	0,013 mmol			
<b>P(PFPMA)3</b>	4 g	40.3 mg	5,0 mg	1,5 g	21.700	1,3
	15,8 mmol	0,14 mmol	0,016 mmol			
<b>P(PFPMA)4</b>	4 g	60 mg	7 mg	2,4 g	16.500	1,4
	15,8 mmol	0,21 mmol	0,023 mmol			
<b>P(PFPMA)5</b>	3 g	7 mg	5,2 mg	1,0 g	44.000	1,4
	11,9 mmol	0,03 mmol	0,017 mmol			
<b>P(PFPMA)6</b>	4 g	50 mg	8 mg	2,5 g	21.300	1,2
	15,8 mmol	0,18 mmol	0,026 mmol			

### 5.6.3 P(PFPMA)-*random*-P(LMA)



Die Copolymerisation von Pentafluorphenolmethacrylat (**M1**) mit Laurylmethacrylat und 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)sulfanyl)pentansäure (**CTA1**) wird in einem Schlenkrohr durchgeführt. Alle RAFT Polymerisationen von PFPMA mit LMA werden analog ausgeführt, so dass hier exemplarisch die Polymerisation für einen Polymerisationsgrad von  $n=185$  vorgestellt wird. Dafür werden 4 g (15,8 mmol) PFPMA und 0,4 g (1,57 mmol) frisch destilliertes LMA in 5 ml abs. Dioxan gelöst und 8,5 mg (0,03 mmol) Säure-CTA, sowie 1,9 mg (6,16  $\mu\text{mol}$ ) ABNDM aus einer Stammlösung hinzugefügt. Nach drei Freeze-Pump Zyklen wird die Reaktionslösung in einem Ölbad bei 40 °C über Nacht gerührt. Die Polymerlösung wird dreimalig in n-Hexan gefällt, zentrifugiert (5 °C, 15 min., 4500 rpm) und im Vakuum bei 40 °C über Nacht getrocknet.

Ausbeute: 1,2 g (30 gew%). Rosafarbener pulverartiger Feststoff.

#### Entfernen der Dithioesterendgruppe

500 mg des Polymers werden in abs. Dioxan gelöst und mit einem 40-fachen Überschuss an Initiator versetzt. Die Reaktion wird bei 40 °C gerührt bis die Lösung farblos wird. Die Polymerlösung wird dreimal in n-Hexan gefällt, zentrifugiert (5 °C, 15 min, 4500 rpm) und der Feststoff bei 40 °C über Nacht unter Vakuum getrocknet. Die Abwesenheit der Dithioesterbande bei 302 nm im UV/Vis Spektrum bestätigt die Vollständigkeit der Reaktion.

Ausbeute: 477 mg (95,4 gew.%)

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): [ $\delta/\text{ppm}$ ] = 4,00 (br, (2y)H, -COO-CH<sub>2</sub>) 2,48 – 0,83 (m, br, (-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>3</sub>, Polymerrückgrat).

400 MHz-<sup>19</sup>F-NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): [ $\delta/\text{ppm}$ ] = -151,45 – -153,14 (br, (2n)F, *o*-Ar-F), -157,96 – -158,22 (br, (1n)F, *p*-Ar-F), -162,91 – -163,39 (br, (2n)F, *m*-Ar-F).

## Experimenteller Teil

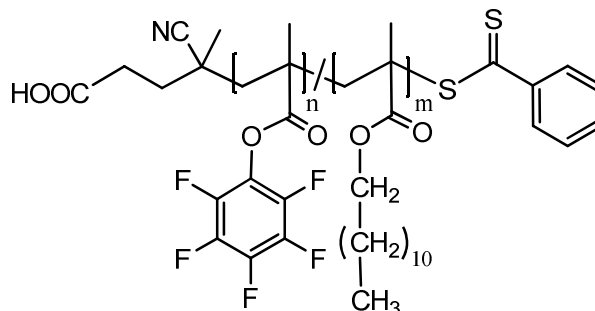
**Tabelle 20:** Ansätze für die Synthese der P(HPMA)-*ran*-P(LMA) Copolymere 1 und 2.

Polymer	PFPMA	LMA	Säure-CTA	ABNDM	Ausbeute
P(PFPMA)- <i>ran</i> - P(LMA)1	4 g 15,8 mmol	0,4 g 1,58 mmol	8,5 mg 0,03 mmol	1,9 mg 6,2 $\mu$ mol	820 mg
P(PFPMA)- <i>ran</i> - P(LMA)2	4 g 15,8 mmol	1,2 g 4,74 mmol	8,5 mg 0,03 mmol	1,9 mg 6,2 $\mu$ mol	1,2 g

**Tabelle 21:** Eigenschaften der synthetisierten P(HPMA)-*ran*-P(LMA) Copolymere 1 und 2. <sup>a</sup> nach Abkochen der Endgruppe mittels THF GPC mit Polystyrol als Standard gemessen. <sup>b</sup>berechnet mittels <sup>1</sup>H-NMR in CDCl<sub>3</sub>.

Polymer	M <sub>n</sub> in g/mol <sup>a</sup>	$\bar{D}$ <sup>a</sup>	Anteil LMA <sup>b</sup>
P(PFPMA)- <i>ran</i> - P(LMA)1	47.000	1,3	7%
P(PFPMA)- <i>ran</i> - P(LMA)2	68.400	1,2	20%

### 5.6.4 Untersuchung der Copolymerisation von PFPMA und LMA mittels Echtzeit $^1\text{H-NMR}$ Kinetik Messung



512,7 mg (2,034 mmol) PFPMA (**M1**) und 50,0 mg (0,197 mmol) frisch destilliertes LMA werden in einem Rundkolben mit Septum vorgelegt und in 0,44 ml Dioxan-d8 gelöst. Anschließend werden 250  $\mu\text{l}$  einer 20 mg/ml Säure-CTA (**CTA1**) Stammlösung zugegeben und die Reaktionslösung mittels Argonstrom für 20 min. entgast. In einem separaten Rundkolben mit Septum werden 50 mg ABNDM eingewogen, in 1 ml Dioxan-d8 gelöst und ebenfalls mittels Argonstrom für 20 min. entgast. Beide Kolben werden in eine Glovebox eingeschleust. Dort werden 12,5  $\mu\text{l}$  der 50 mg/ml ABNDM Stammlösung zu der Reaktionsmischung gegeben und anschließend in ein NMR-Röhrchen überführt, das mit einem Septum Luftdicht verschlossen wird. Daraufhin wird das NMR-Röhrchen der Glovebox entnommen. Bei einer Temperatur von 40 °C wird 12 h lang alle 5 min. ein  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum aufgenommen.

**Tabelle 22:** Ansätze für die Copolymerisationen Kinetik1-5.

Polymer	PFPMA	LMA	Säure-CTA	ABNDM	Dioxan-d8
<b>Kinetik1</b>	512,7 mg	50,03 mg	5,0 mg	0,63 mg	0,5 ml
	2,034 mmol	0,197 mmol	0,02 mmol	2,02 $\mu\text{mol}$	
<b>Kinetik2</b>	386,52 mg	165,93 mg	5,0 mg	0,63 mg	0,5 ml
	1,533 mmol	0,652 mmol	0,02 mmol	2,02 $\mu\text{mol}$	
<b>Kinetik3</b>	277,71 mg	279,44 mg	5,0 mg	0,63 mg	0,5 ml
	1,099 mmol	1,098 mmol	0,02 mmol	2,02 $\mu\text{mol}$	
<b>Kinetik4</b>	176,25 mg	391,90 mg	5,0 mg	0,63 mg	0,5 ml
	0,699 mmol	1,540 mmol	0,02 mmol	2,02 $\mu\text{mol}$	
<b>Kinetik5</b>	57,2 mg	504,7 mg	5,0 mg	0,63 mg	0,5 ml
	0,227 mmol	1,984 mmol	0,02 mmol	2,02 $\mu\text{mol}$	

## Experimenteller Teil

**Tabelle 23:** Eingesetzte Verhältnisse und gemessene Zusammensetzung der Ausgangskonzentration der Monomere PFPMA und LMA.

Polymer	Verhältnis PFPMA/LMA	Verhältnis Aus <sup>1</sup> H-NMR
<b>Kinetik1</b>	0,912 : 0,088	0,908 : 0,092
<b>Kinetik2</b>	0,702 : 0,298	0,702 : 0,298
<b>Kinetik3</b>	0,500 : 0,500	0,498 : 0,502
<b>Kinetik4</b>	0,299 : 0,701	0,307 : 0,693
<b>Kinetik5</b>	0,103 : 0,897	0,092 : 0,908

**Tabelle 24:** Werte für die numerische Berechnung mit Hilfe des Contour-Programms. Die Anteile beziehen sich dabei auf den Gesamtumsatz in ca. 5% Schritten bis 60% Gesamtumsatz.

Versuch	Anteil PFPMA in Lösung	Anteil PFPMA im Polymer
<b>Kinetik1</b>	0,90755	0,90609
	0,90762	0,88936
	0,90893	0,89757
	0,90955	0,89966
	0,91025	0,90378
	0,91062	0,89451
	0,91163	0,89877
	0,91266	0,90587
	0,91314	0,89214
	0,91529	0,89761
	0,91713	0,90712
<b>Kinetik2</b>	0,91825	0,90139
	0,70707	0,74356
	0,70486	0,72587
	0,70377	0,74505
	0,70147	0,75144
	0,69792	0,69811
	0,69791	0,70461
	0,69742	0,72347
	0,69541	0,72628
	0,69301	0,73354
	0,6892	0,72559
<b>Kinetik3</b>	0,68565	0,72688
	0,68105	0,70109
	0,49818	0,59295
	0,49228	0,55808
	0,48906	0,58978
	0,48255	0,56519
	0,47745	0,55852
	0,47195	0,57429
	0,46456	0,51046
	0,461	0,56469
	0,45302	0,54569
<b>Kinetik4</b>	0,44455	0,53229
	0,43561	0,51874
	0,42655	0,5105
	0,30676	0,42322
	0,29944	0,38848
	0,29428	0,41708
	0,28839	0,41274
	0,27909	0,43814
	0,26928	0,3545
	0,26337	0,37671
	0,25389	0,40908
<b>Kinetik5</b>	0,24321	0,35587
	0,23215	0,3413
	0,22105	0,34969
	0,2067	0,32986
	0,0922	0,1429
	0,08928	0,14629
	0,08604	0,18585
	0,08045	0,16716
	0,07477	0,13705
	0,07071	0,16784
	0,06436	0,11982
0,05967	0,13435	
0,0535	0,12657	
0,04674	0,10473	
0,04136	0,09175	
0,03545	0,08182	

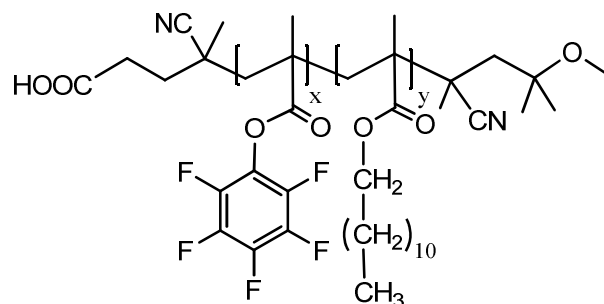
**Tabelle 25:** Werte für die Auftragung nach Fineman/Ross und Kelen/Tüdös nach je 5% Umsatz bis zu einem Gesamtumsatz von 60% von den Messungen Kinetik1-5 mit  $\alpha = 0,383$ .

	Umsatz	f	F	f <sup>2</sup> /F= G	f*(F-1)/F= H	ξ	η
<b>Kinetik1</b>	0,0483	9,8253	9,6479	10,0060	8,8069	0,9632	0,8478
	0,1119	9,9806	8,0383	12,3923	8,7390	0,9701	0,6841
	0,1580	10,0563	8,7623	11,5413	8,9086	0,9679	0,7471
	0,2136	10,1424	8,9657	11,4736	9,0112	0,9677	0,7600
	0,2556	10,1880	9,3926	11,0508	9,1033	0,9665	0,7962
	0,2996	10,3163	8,4792	12,5513	9,0996	0,9704	0,7035
	0,3513	10,4491	8,8788	12,2972	9,2722	0,9698	0,7313
	0,3945	10,5128	9,6235	11,4844	9,4204	0,9678	0,7938
	0,4507	10,8051	8,2708	14,1159	9,4987	0,9736	0,6552
	0,5023	11,0665	8,7666	13,9697	9,8041	0,9733	0,6831
	0,5526	11,2325	9,7661	12,9190	10,0823	0,9712	0,7580
	0,6020	11,5535	9,1405	14,6035	10,2896	0,9745	0,6866
<b>Kinetik2</b>	0,0568	2,3882	2,8994	1,9671	1,5645	0,8372	0,6658
	0,1035	2,3757	2,6478	2,1316	1,4785	0,8478	0,5881
	0,1509	2,3497	2,9223	1,8892	1,5456	0,8316	0,6804
	0,2072	2,3103	3,0231	1,7656	1,5461	0,8219	0,7197
	0,2538	2,3102	2,3124	2,3079	1,3112	0,8578	0,4873
	0,3039	2,3049	2,3853	2,2272	1,3386	0,8534	0,5129
	0,3537	2,2831	2,6162	1,9924	1,4104	0,8389	0,5939
	0,4003	2,2574	2,6534	1,9206	1,4067	0,8339	0,6108
	0,4519	2,2174	2,7529	1,7861	1,4119	0,8236	0,6511
	0,5006	2,1811	2,6442	1,7992	1,3562	0,8246	0,6216
	0,5507	2,1353	2,6614	1,7131	1,3329	0,8174	0,6360
	0,6007	2,1108	2,3454	1,8997	1,2108	0,8324	0,5305
<b>Kinetik3</b>	0,0586	0,9695	1,4566	0,6453	0,3039	0,6278	0,2957
	0,1025	0,9571	1,2628	0,7254	0,1992	0,6547	0,1798
	0,1570	0,9325	1,4377	0,6048	0,2839	0,6125	0,2875
	0,2060	0,9136	1,2998	0,6422	0,2107	0,6267	0,2057
	0,2564	0,8937	1,2651	0,6314	0,1872	0,6227	0,1847
	0,3065	0,8676	1,3490	0,5580	0,2244	0,5933	0,2386
	0,3564	0,8553	1,0427	0,7015	0,0350	0,6471	0,0323
	0,4024	0,8282	1,2972	0,5287	0,1897	0,5802	0,2082
	0,4524	0,8003	1,2011	0,5332	0,1340	0,5823	0,1463
	0,5031	0,7718	1,1380	0,5234	0,0936	0,5777	0,1034
	0,5519	0,7438	1,0778	0,5133	0,0537	0,5729	0,0600
	0,6003	0,7134	1,0429	0,4881	0,0293	0,5606	0,0337
<b>Kinetik4</b>	0,0590	0,4274	0,7337	0,2489	-0,1550	0,3942	-0,2456
	0,1106	0,4169	0,6352	0,2737	-0,2394	0,4171	-0,3648
	0,1513	0,4052	0,7155	0,2295	-0,1611	0,3750	-0,2632
	0,2103	0,3871	0,7028	0,2132	-0,1636	0,3579	-0,2747
	0,2562	0,3685	0,7797	0,1741	-0,1040	0,3128	-0,1869
	0,3044	0,3575	0,5491	0,2327	-0,2934	0,3783	-0,4769
	0,3581	0,3402	0,6043	0,1915	-0,2227	0,3337	-0,3879
	0,3995	0,3213	0,6922	0,1491	-0,1428	0,2805	-0,2686
	0,4531	0,3023	0,5524	0,1654	-0,2449	0,3019	-0,4468
	0,5036	0,2837	0,5181	0,1554	-0,2639	0,2889	-0,4905
	0,5534	0,2605	0,5377	0,1262	-0,2239	0,2481	-0,4402
	0,6027	0,2367	0,4922	0,1138	-0,2442	0,2294	-0,4919
<b>Kinetik5</b>	0,0545	0,0980	0,1667	0,0576	-0,4899	0,1309	-1,1129
	0,1053	0,0941	0,1713	0,0517	-0,4552	0,1191	-1,0481
	0,1527	0,0874	0,2282	0,0335	-0,2957	0,0806	-0,7108
	0,2048	0,0808	0,2007	0,0325	-0,3218	0,0784	-0,7753
	0,2534	0,0760	0,1588	0,0364	-0,4030	0,0870	-0,9618
	0,2993	0,0687	0,2016	0,0234	-0,2722	0,0578	-0,6705
	0,3539	0,0634	0,1361	0,0295	-0,4026	0,0718	-0,9769
	0,4032	0,0565	0,1552	0,0205	-0,3076	0,0510	-0,7631
	0,4537	0,0490	0,1449	0,0165	-0,2893	0,0416	-0,7248
	0,5001	0,0431	0,1169	0,0159	-0,3256	0,0399	-0,8172
	0,5526	0,0367	0,1010	0,0133	-0,3270	0,0338	-0,8261
	0,6034	0,0303	0,0891	0,0103	-0,3107	0,0264	-0,7908

**Relevante Peaks der eingesetzten Monomere:**

300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): [ $\delta/ppm$ ] = 6,42 (t, 1H, a), 6,04 (m, 1H, c), 5,92 (m, 1H, b), 5,50 (m, 1H, c).

### 5.6.5 P(PFPMA)-*block*-P(LMA)



500 mg (1,98 mmol,  $n_{\text{Endgruppe}} = 0,023$  mmol) P(PFPMA)-CTA (**P(PFPMA)2**) und 336 mg (1,32 mmol) frisch destilliertes Laurylmethacrylat werden in ein Schlenkrohr eingewogen und in 4 ml abs. Dioxan gelöst. 1,4 mg ABNDM (Zugabe einer aus abs. Dioxan hergestellten Stammlösung) werden zugegeben und der Ansatz wird drei Freeze-Pump Zyklen unterworfen. Anschließend wird 3 Tage unter Vakuum bei 40 °C polymerisiert. Die Polymerlösung wird dreimal in kaltem EtOH gefällt, zentrifugiert (0 °C, 20 min. 4500 rpm) und dekantiert. Der erhaltene Feststoff wird im Vakuum bei 40 °C getrocknet.

Ausbeute: 418 mg. Rosafarbener, pulverartiger Feststoff.

#### Entfernen der Dithioesterendgruppe

418 mg des Polymers werden in abs. Dioxan gelöst und mit einem 40-fachen Überschuss an Initiator versetzt. Die Reaktion wird bei 40 °C gerührt bis die Lösung farblos wird. Die Polymerlösung wird dreimal in n-Hexan gefällt, zentrifugiert (5 °C, 15 min, 4500 rpm) und der Feststoff bei 40 °C über Nacht unter Vakuum getrocknet. Die Abwesenheit der Dithioesterbande bei 302 nm im UV/Vis Spektrum bestätigt die Vollständigkeit der Reaktion.

Ausbeute: 348 mg (84 gew.%). Farbloser, pulverartiger Feststoff.

$300 \text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $[\delta/\text{ppm}] = 3,92$  (br, (2y)H,  $-\text{COO-CH}_2$ ) 2,41 – 0,86 (m, br,  $(-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_3$ , Polymerrückgrat).

$400 \text{ MHz-}^{19}\text{F-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $[\delta/\text{ppm}] = -151,45$  –  $-153,14$  (br, (2n)F, *o*-Ar-F),  $-157,96$  –  $-158,22$  (br, (1n)F, *p*-Ar-F),  $-162,91$  –  $-163,39$  (br, (2n)F, *m*-Ar-F).



**Tabelle 26:** Ansätze für die Synthese der Blockcopolymeren P(PFPMA)-*block*-P(LMA)1-3. <sup>a</sup> Stoffmenge der CTA-Endgruppe.

Polymer	P(PFPMA)-CTA	LMA	ABNDM	Ausbeute
P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA)1	500 mg (P(PFPMA) <sub>2</sub> )	336 mg	1,4 mg	348 mg
	1,98 mmol	1,32 mmol	4,54 μmol	
	0,023 mmol <sup>a</sup>			
P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA)2	500 mg (P(PFPMA) <sub>3</sub> )	336 mg	1,4 mg	460,7 mg
	1,98 mmol	1,32 mmol	4,54 μmol	
	0,023 mmol <sup>a</sup>			
P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA)3	500 mg (P(PFPMA) <sub>4</sub> )	337 mg	1,6 mg	500 mg
	1,98 mmol	1,32 mmol	4,54 μmol	
	0,023 mmol <sup>a</sup>			

**Tabelle 27:** Eigenschaften der Blockcopolymeren P(PFPMA)-P(LMA)1-3. <sup>a</sup> mittels THF GPC mit Polystyrol als Standard. <sup>b</sup> mittels <sup>1</sup>H-NMR ausgewertet.

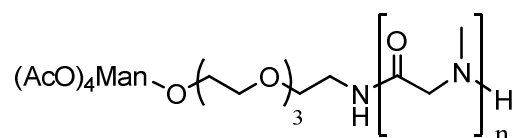
Polymer	M <sub>n</sub> in g/mol <sup>a</sup>	Đ <sup>a</sup>	Anteil LMA <sup>b</sup>
P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA)1	26.800	1,3	7,4%
P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA)2	26.800	1,3	23%
P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA)3	21.000	1,2	18%

---

## 5.7 Polymere mit Sarcosineinheiten

### 5.7.1 Mannose initiierte Block Copolypept(o)ide

#### Man-P(Sar)<sub>n</sub>



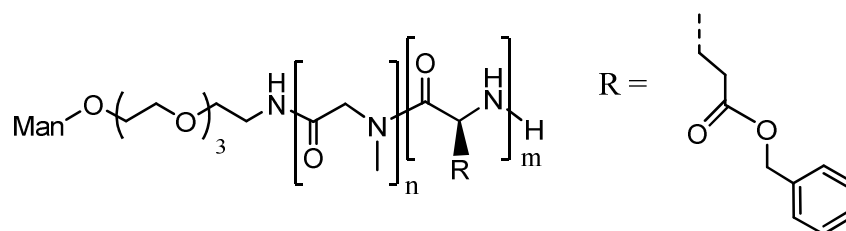
270,9 mg (2,35 mmol) Sarcosin N-Carboxyanhydrid werden unter Stickstoffgegenstrom in einen ausgeheizten Schlenkkolben überführt und in 3 ml abs. *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Um eine Stammlösung des Initiators herzustellen, werden 49,4 mg 11-Amino-3,6,9-trioxa-undecyl-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**Man6**) in 1 ml absolutiertem DMF gelöst und 0,25 ml dieser Lösung in den Reaktionskolben gegeben, welches dann einer Gesamtmenge von 12,3 mg (23,5  $\mu$ mol) Mannoseinitiator in der Reaktion entspricht. Als Negativkontrolle wird ein analoger Ansatz mit Neopentylamin als Initiator verwendet. Der Ansatz wird 3 Tage unter einem konstanten Druck von 1,25 bar trockenem Stickstoff unter Schlenkbedingungen bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss gerührt. Unter diesen Bedingungen kann das bei der Reaktion gebildete Kohlenstoffdioxid entweichen, ohne dass Verunreinigungen in die Reaktion gelangen können. Der Reaktionsverlauf wird mittels IR Spektroskopie verfolgt. Die Abwesenheit der NCA Banden bei 1853 und 1786  $\text{cm}^{-1}$  bestätigt die Vollständigkeit der Umsetzung und das Polymer wird in Diethylether gefällt und zentrifugiert (15 min, 4 °C, 4500 rpm). Die Flüssigkeit wird dekantiert und der Feststoff wird in frischem Diethylether mittels Ultraschallbad suspendiert. Dieser Vorgang des Zentrifugierens und Suspendierens wird weitere zweimal wiederholt. Das erhaltende Polymer wird in Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Dieses Polymer wurde von Philipp Heller synthetisiert.

Ausbeute: 69,9 mg (40%). Farbloser pulverartiger Feststoff.

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (*D*<sub>2</sub>O): [ $\delta$ /ppm] = 5,65 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 2,29 Hz, Man. Ini.), 5,35 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 4,17 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 5,87 Hz, Man. Ini.), 5,10 (t, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 10,16 Hz, Man. Ini.), 4,52 – 3,95 (br, (2n)H, -NCH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-), 3,70 – 3,47 (br, 14H, Man. Ini.), 3,19 – 2,60 (br, (3n+2)H, -NCH<sub>3</sub>- und Man. Ini.), 2,10-1,95 (br, 12H, -CO-CH<sub>3</sub> des Man. Ini.).

**Tabelle 28:** Eigenschaften von Man-P(Sar). <sup>a</sup> mittels <sup>1</sup>H-NMR in D<sub>2</sub>O. <sup>b</sup> mittels HFIP GPC und PMMA als Standard.

Polymer	M <sub>n</sub> berechnet <sup>a</sup>	Polymerisationsgrad <sup>a</sup>	M <sub>n</sub> <sup>b</sup>	Đ <sup>b</sup>
Man-P(Sar)	14.900 g/mol	209	30.500 g/mol	1,05

**Man-P(Sar)<sub>n</sub>-b-PGlu(OBn)<sub>m</sub>**


1 eq. des Man-P(Sar)<sub>n</sub> und m eq. Glu(OBn) NCA (Synthetisiert und zur Verfügung gestellt von Philipp Heller<sup>[111]</sup>) werden separat in je einen Schlenk Kolben eingewogen, 1 h unter Vakuum getrocknet und in absolutiertem DMF gelöst (0,1 g/ml). Beide Lösungen werden mittels einer Spritze unter Inertgas vereint und bei Raumtemperatur für 3 Tage unter Stickstoffatmosphäre polymerisiert. Die Reaktionskontrolle erfolgt mittels IR Spektroskopie (Abwesenheit der NCA Banden bei 1853 und 1786 cm<sup>-1</sup>). Das Polymer wird anschließend in kaltem Diethylether gefällt und zentrifugiert (4 °C, 15 min., 4500 rpm). Die Flüssigkeit wird dekantiert und der Rückstand in Diethylether mittels eines Ultraschallbades resuspendiert. Diese Suspension wird erneut zentrifugiert und dekantiert. Anschließend wird das Polymer in Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Dieses Polymer wurde von Philipp Heller synthetisiert.

Ausbeute: 93,70%. Farbloser, pulverartiger Feststoff.

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): [δ/ppm] = 7,41 – 7,07 (br, (5m)H, -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5,65 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 2,31 Hz, Man. Ini.), 5,34 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 3,90 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6,11 Hz, Man.Ini.), 5,16 – 4,85 (br, (2m+1)H, -CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> und Man. Ini.), 4,60 – 3,65 (br, (2n+1m)H, -NCH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-, -CO-CH-NH-), 3,54 – 3,47 (br, 14H, Man. Ini.), 3,17 – 2,62 (br, (3n+2)H, -NCH<sub>3</sub>-, Man. Ini.), 2,31 – 1,66 (br, (4m+12)H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOBn, -CO-CH<sub>3</sub> des Man. Ini.).

Funktionalisierung mit Oregon Green Cadaverin 488

In einem Glaskolben werden 42,06 mg des Man-P(Sar)<sub>277</sub>-b-PGlu(OBn)<sub>28</sub> in 1 ml DMSO unter trockener Stickstoffatmosphäre gelöst und 1,2 eq Oregon Green Cadaverin 488 NHS Ester (in Bezug auf die terminale Aminogruppe des Polymers) gelöst in

DMSO mittels einer Spritze zugegeben. Die Lösung wird unter Lichtausschluss für 3 Tage bei 40 °C unter trockener Stickstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung 3 Tage gegen Wasser dialysiert und das Polymer anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute: 41 mg (95,6%), Fluffiger, gelber Feststoff.

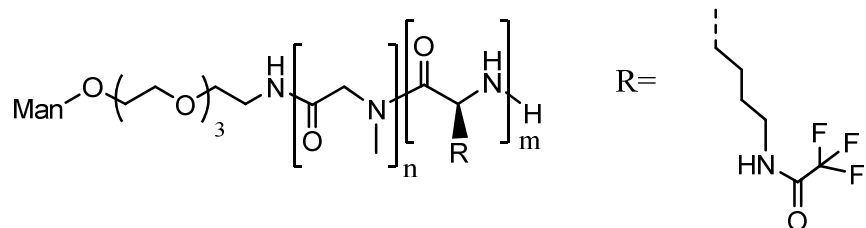
### Entschützung der Acetylschutzgruppen des Mannoseinitiators

30,3 mg des mit Oregon Green Cadaverin 488 markierten Polymers werden in 1 ml  $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$  mit einem pH-Wert von 9 suspendiert und für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird 3 Tage gegen Milli-Q Wasser dialysiert und mittels reversed phase HPLC von freiem Farbstoff getrennt. Das Polymer wird anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute 19,04 mg (63,2%). Fluffiger gelber Feststoff.

$400 \text{ MHz-}^1\text{H-NMR (DMSO-}d_6\text{): } [\delta/\text{ppm}] = 7,56 - 7,05 \text{ (br, (5m)H, -C}_6\text{H}_5\text{)}, 6,91 \text{ (d, } ^3\text{J}_{\text{H-H}} = 7,64 \text{ Hz, OG 488)}, 6,59 \text{ (dd, } ^3\text{J}_{\text{H-H}} = 2,37 \text{ Hz, } ^3\text{J}_{\text{H-H}} = 11,30 \text{ Hz, OG 488)}, 5,62 \text{ (1H, Man. Ini.)}, 5,23 - 4,84 \text{ (br, (2m)H, -CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5\text{)}, 4,65 - 3,67 \text{ (br, (2n+1m+3)H, -NCH}_3\text{-CH}_2\text{-CO-, -CO-CH-NH-, Man. Ini.)}, 3,54 - 3,47 \text{ (br, 14H, Man. Ini.)}, 3,10 - 2,62 \text{ (br, (3n+2)H, -NCH}_3\text{-, Man. Ini.)}, 2,41 - 1,60 \text{ (br, (4m)H, -CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOBn)}, 1,61 - 0,98 \text{ (br, OG 488)}, 0,91 - 0,74 \text{ (br, OG 488)}.$

$M_n = 46.200 \text{ g/mol}$ ,  $\text{Đ: } 1,13$  (HFIP GPC)

**Man-P(Sar)<sub>n</sub>-b-PLys(TFA)<sub>m</sub>**


Man-P(Sar)<sub>n</sub>-b-PLys(TFA)<sub>m</sub> wird analog zu der Synthese von Man-P(Sar)<sub>n</sub>-b-PGlu(OBn)<sub>m</sub> hergestellt. Dabei wird anstelle des Glu(OBn) NCA der Lys(TFA) NCA verwendet. Dieses Polymer wurde von Philipp Heller synthetisiert.

Ausbeute: 90%.

$400\text{ MHz-}^1\text{H-NMR (DMSO-}d_6\text{): } [\delta/\text{ppm}] = 9,49 - 9,21$  (br, (1m)H, -NH-CO-CF<sub>3</sub>), 5,65 (d, 1H,  $^3J_{\text{H-H}} = 2,29$  Hz, Man. Ini.), 5,35 (dd, 1H,  $^3J_{\text{H-H}} = 3,94$  Hz,  $^3J_{\text{H-H}} = 6,07$  Hz, Man. Ini.), 5,05 (t, 1H,  $^3J_{\text{H-H}} = 9,92$  Hz, Man. Ini.), 4,72 – 3,62 (br, (2n+1m)H, -NCH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-, -CO-CH-NH-), 3,50 (br, 14H, Man. Ini.), 3,23 – 3,05 (br, (2m)H, -CH<sub>2</sub>-NH-CO-CF<sub>3</sub>), 3,04 – 2,56 (br, (3n+2)H, -NCH<sub>3</sub>-, Man. Ini.), 2,15 – 0,90 (br, (6m+12)H, -CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-, -CO-CH<sub>3</sub> des Man. Ini.).

Entschützung der Acetylschutzgruppen des Mannoseinitiators sowie der TFA Gruppen

In einem Glaskolben werden 30 mg des Man-P(Sar)<sub>n</sub>-b-PLys(TFA)<sub>m</sub> in 1 ml Methanol gelöst, mit 10 eq. Hydrazin Hydrat (in Bezug auf die Acetyl- und TFA Schutzgruppen) versetzt und 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird dann gegen NaHCO<sub>3(aq)</sub> und anschließend gegen Milli-Q Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 81,3%

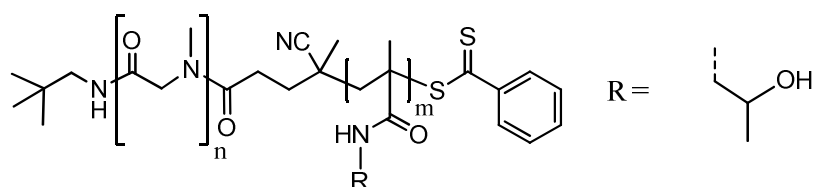
$400\text{ MHz-}^1\text{H-NMR (D}_2\text{O-}d_6\text{): } [\delta/\text{ppm}] = 5,50$  (d, 1H,  $^3J_{\text{H-H}} = 1,89$  Hz, Man. Ini.), 4,58 – 3,88 (br, (2n+1m)H, -NCH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-, -CO-CH-NH-), 3,73 – 3,46 (br, 14H, Man. Ini.), 3,24 – 2,50 (br, (3n+2m+2)H, -NCH<sub>3</sub>-, -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, Man. Ini.), 1,96 – 1,00 (br, (6m)H, -CH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>).

$M_n = 49.400\text{ g/mol}$ ,  $\text{Đ} = 1,17$  (HFIP-GPC)

### Mizellbildung

8,54 mg des Block Copolypept(o)ides werden in 2,2 ml DMSO gelöst und unter konstantem Rühren werden langsam 7,8 ml Milli-Q Wasser mittels einer Spritzenpumpe (0,5 ml/min) hinzugefügt. Die Mizelllösung wird 3 Tage gegen Milli-Q Wasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Das erhaltene Lyophilisat wird in PBS Puffer gelöst (2 mg/ml). Die Mizellen wurden von Philipp Heller synthetisiert.

#### 5.7.2 P(Sar)-*block*-P(HPMA)



20 mg (0,28 mmol,  $n_{\text{Endgruppe}} = 1,38 \mu\text{mol}$ ) **P(Sar)-CTA2** und 60,4 mg (0,422 mmol) *N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid (**M2**) werden in einen Rundkolben eingewogen und in 5 ml Milli-Q Wasser gelöst. Aus einer ABNDM Stammlösung (50 mg in 5 ml DMSO) werden 10  $\mu\text{l}$  (0,1 mg, 1,34  $\mu\text{mol}$ ) zu der Reaktionsmischung dazu gegeben und der Ansatz zum entgasen drei Freeze-Pump Zyklen unterworfen. Anschließend wird 3 Tage bei 40 °C polymerisiert. Das Polymer wird dann dreimal in kaltem Aceton gefällt, zentrifugiert (0 °C, 15 min. 4500 rpm) und dekantiert. Der gewonnene Feststoff wird in Wasser gelöst und gefriergetrocknet.

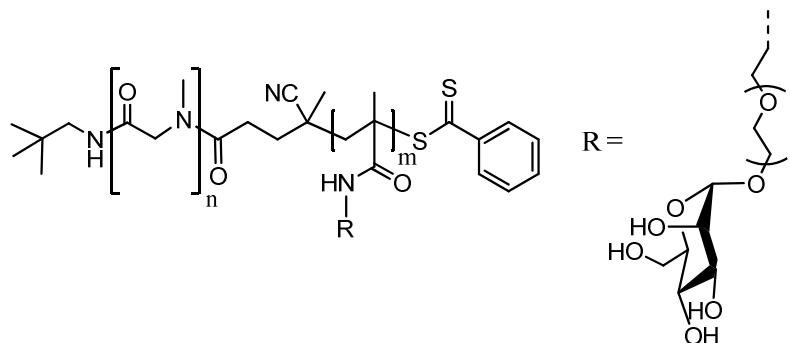
Ausbeute: 75 mg (93%). Leicht rosafarbener, pulverartiger Feststoff.

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): [ $\delta/\text{ppm}$ ] = 7,89 (m, 2H, *o*-Ar-H), 7,69 (m, 1H, *p*-Ar-H), 7,50 (m, 2H, *m*-Ar-H), 4,48 – 4,08 (br, (2m)H, NCH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-), 3,92 (br, (1n)H, a), 3,57 (br, OH), 3,08 – 2,89 (br, (3n)H, N-CH<sub>3</sub>), 1,98 – 0,89 (br, (5m)H, HPMA-Rückgrat), 0,86 (d, J = 10,6 Hz, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, Initiator).

**P(Sar)-block-P(HPMA):**  $M_n = 38.000 \text{ g/mol}$  (HFIP-GPC)

$\bar{D}$ : 1,13

### 5.7.3 P(Sar)-*block*-P(Man)



20 mg (0,28 mmol,  $n_{\text{Endgruppe}} = 2,08 \mu\text{mol}$ ) **P(Sar)-CTA 1** und 86,2 mg (0,203 mmol) 11-Amino-3,6,9-trioxa-undecyl- $\alpha$ -D-mannosyl Methacrylat (**M3**) werden in einen Rundkolben eingewogen und in 5 ml Milli-Q Wasser gelöst. Aus einer ABNDM Stammlösung (50 mg in 5 ml) werden 10  $\mu\text{l}$  (0,1 mg, 1,34  $\mu\text{mol}$ ) zu der Reaktionsmischung dazu gegeben und der Ansatz zum entgasen drei Freeze-Pump Zyklen unterworfen. Anschließend wird 3 Tage bei 40 °C polymerisiert. Die Polymerlösung wird 2 Tage gegen Milli-Q Wasser dialysiert und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 62 mg (58%). Leicht rosafarbener, pulverartiger Feststoff.

400 MHz- $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ): [ $\delta/\text{ppm}$ ] = 7,86 – 7,46 (br, 5H, Ar-H, (1n)H, -NH-), 4,90 (s, br, (1n)H, 1), 4,48 – 4,08 (br, (2m)H, NCH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-), 3,97 (br, (1n)H, 2), 3,91 (br, (1n)H, 3), 3,88 (br, (1n)H, 6a), 3,82 (m, br, (1n)H, 5), 3,78 – 3,24 (m, (16n)H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O, (1n)H, 6b, (1n)H, 4), 3,08 – 2,88 (br, (3n)H, N-CH<sub>3</sub>), 2,05 – 0,70 (br, (5m)H, Mannosepolymerrückgrat, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, Initiator {0,86}).

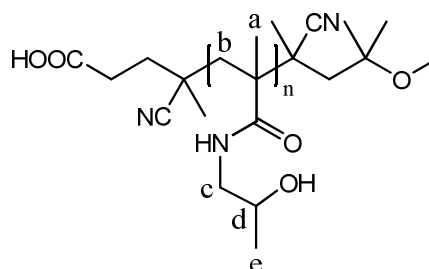
#### Relevante NMR-Peaks:

100,6 MHz- $^{13}\text{C-NMR}$  [inverse gated] ( $\text{D}_2\text{O}$ ): [ $\delta/\text{ppm}$ ] = 170,85 – 169,83 (O=C-N-), 99,91 (C1), 72,76 (C5), 70,52 (C3), 69,99 (C2), 69,64, 69,54, 69,44 (O-CH<sub>2</sub>), 66,74 (C4), 66,34 (Man-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 60,96 (C6), 50,66 – 48,62 (Ca), 36,72 – 36,43 (N-CH<sub>3</sub>).

**P(Sar)-*block*-P(Man):**  $M_n = 28.600 \text{ g/mol}$  (HFIP-GPC)  
 $D: 1,36$

## 5.8 Polymeranaloge Funktionalisierung

### 5.8.1 P(HPMA) aus PFPMA Reaktiver Polymeren



#### Allgemeine Arbeitsvorschrift

100 mg (0,4 mmol) des PFPMA Reaktiver Polymer **P(PFPMA)1** ( $M_n=23.300$  g/mol) werden in 3 ml abs. Dioxan gelöst. Um das Polymer zu markieren werden zusätzlich aus einer 5 mg/ml Oregon Green Cadaverin Stammlösung in absolutiertem Dimethylsulfoxid 354  $\mu$ l zu der Polymerlösung dazugegeben was einer Menge von 1,9 mg (0,0039 mmol) Oregon Green 488 Cadaverin entspricht sowie 0,4 mg (0,0039 mmol) Triethylamin als Hilfsbase. Der Ansatz wird über Nacht unter Argonatmosphäre bei 60 °C gerührt und anschließend mit 88 mg (1,17 mmol) 2-Hydroxypropylamin und 180 mg (1,17 mmol) Triethylamin versetzt. Die Lösung wird weitere 2 Tage bei 60 °C gerührt. Um freien Farbstoff abzutrennen wird 2 Tage gegen Methanol dialysiert. Nach weiteren 3 Tagen Dialyse gegen Milli-Q Wasser wird die Lösung gefriergetrocknet.

#### **P(HPMA)1**

Ausbeute: 87 mg (87%). Leicht gelber, pulverartiger Feststoff.

$400$  MHz- $^1$ H-NMR ( $D_2O$ ): [ $\delta/ppm$ ] = 7,68 – 7,58 (m, br, (1n)H, -NH), 3,92 (br, (1n)H, d), 3,51 – 2,7 (br, (2n)H, c), 2,62 – 1,50 (br, (2n)H, b), 1,48 – 0,41 (br, (6n)H, a, e).

$100,6$  MHz- $^{13}$ C-NMR [inverse gated] ( $D_2O$ ): [ $\delta/ppm$ ] = 179,03 (m, O=C-NH), 65,74 (m, C-OH), 47,0 (m, CH<sub>2</sub>), 45,31 (m, quartäres C), 20,17 (m, -CH<sub>3</sub>), 16,46 – 18,14 (m, -CH<sub>3</sub>, Polymerrückgrat).

$400$  MHz- $^{19}$ F-NMR ( $D_2O$ ): wurde gemessen und zeigte keine Signale, d.h. die Pentafluorophenyleinheiten wurden vollständig umgesetzt.

$M_n = 24.960$  g/mol (HFIP-GPC)

$\bar{D}$ : 1,3



Variante 1

Das PFPMA Reaktivester Polymer P(PFPMA)1 wird in 3 ml Dioxan gelöst und zusätzlich werden 3% Wasser dieser Lösung zugefügt. Anschließend werden Oregon Green 488 Cadaverin, 2-Hydroxypropylamin, sowie die jeweils entsprechende Menge an Triethylamin als Hilfsbase, wie oben beschrieben hinzugefügt.

**P(HPMA)2**

Ausbeute: 83 mg (83%). Leicht gelber, pulverartiger Feststoff.

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): [ $\delta/ppm$ ] = 7,68 – 7,58 (m, br, 1H, -NH), 3,92 (br, 1H, d), 3,51 – 2,7 (br, 2H, c), 2,62 – 1,50 (br, 2H, b), 1,48 – 0,41 (br, 3H, a).

100,6 MHz-<sup>13</sup>C-NMR [inverse gated] (D<sub>2</sub>O): [ $\delta/ppm$ ] = 179,03 (m, O=C-NH), 65,74 (m, C-OH), 47,0 (m, CH<sub>2</sub>), 45,31 (m, quartäres C), 20,17 (m, -CH<sub>3</sub>), 16,46-18,14 (m, -CH<sub>3</sub>, Polymerrückgrat).

400 MHz-<sup>19</sup>F-NMR (D<sub>2</sub>O): wurde gemessen und zeigte keine Signale, d.h. die Pentafluorophenyleinheiten wurden vollständig umgesetzt.

M<sub>n</sub> = 23.900 g/mol (HFIP-GPC)

D: 1,5

Variante 2

Das Reaktivester Polymer P(PFPMA)1 wird in 3 ml Dioxan gelöst und Oregon Green 488 Cadaverin werden wie oben beschrieben hinzugefügt. Anschließend werden 6,7 mg (0,12 mmol) KOH (0,5 eq. pro PFPMA Einheit) in 150  $\mu$ l Wasser hinzugefügt und der Ansatz über Nacht bei 60 °C gerührt. Es wird ein <sup>19</sup>F-NMR aufgenommen, um die Prozentuale Umsetzung der PFPMA Einheiten in Carboxylatgruppen zu berechnen (66% Umsetzung). Anschließend wird Hydroxypropylamin wie oben beschrieben zugegeben und das Polymer durch Dialyse aufgereinigt.

**P(HPMA)3**

Ausbeute: 54 mg (70%). Leicht gelber, pulverartiger Feststoff.

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): [ $\delta/ppm$ ] = 7,68 – 7,58 (m, br, 1H, -NH), 3,92 (br, 1H, d), 3,51 – 2,7 (br, 2H, c), 2,62 – 1,50 (br, 2H, b), 1,48 – 0,41 (br, 3H, a).

100,6 MHz-<sup>13</sup>C-NMR [inverse gated] (D<sub>2</sub>O): [ $\delta/ppm$ ] = 185,80 (m, COOH), 180,99 (m, O=C-NH), 65,56 (m, C-OH), 47,0 (m, CH<sub>2</sub>), 44,9 (m, quartäres C), 19,94 (m, -CH<sub>3</sub>), 16,46 – 18,14 (m, -CH<sub>3</sub>, Polymerrückgrat).

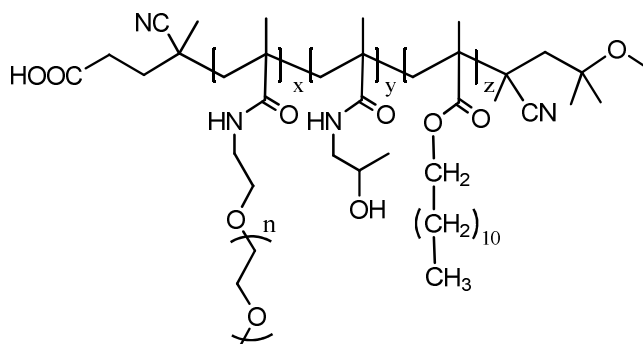
$400\text{ MHz-}^{19}\text{F-NMR}$  ( $D_2O$ ): wurde gemessen und zeigte keine Signale, d.h. die Pentafluorophenyleinheiten wurden vollständig umgesetzt.

$M_n = 10.080\text{ g/mol}$  (HFIP-GPC)

$D$ : 1,4

## 5.8.2 PEGylierung

### HPMA-*block*-LMA Polymer mit PEG<sub>2kDa</sub> Seitenketten<sup>[152]</sup>



101,2 mg (0,035 mmol) des PFPMA-LMA Reaktivester Blockcopolymer (**P(PFPMA)-*b*-P(LMA)2**) werden im Rundkolben vorgelegt und in 4,9 ml absolutiertem Dioxan und 0,5 ml absolutiertem DMSO gelöst. 52,9 mg (0,027 mmol) des PEG<sub>2kDa</sub>-Amins werden in 0,4 ml abs. DMSO gelöst und mit einem Tropfen Triethylamin zu der Reaktionslösung gegeben. Unter Argonatmosphäre wird 24 h bei 60 °C gerührt. Anschließend werden 110,5 mg (1,471 mmol) 2-Hydroxypropylamin und die entsprechende Menge Triethylamin zugegeben und weitere 2 Tage bei 60 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit Wasser verdünnt, 2 Tage gegen Milli-Q Wasser dialysiert und abschließend gefriergetrocknet. Zusätzlich wurde von diesem Polymer eine negativ Kontrolle ohne der Zugabe von PEG<sub>2kDa</sub>, analog zur Allgemeinen Arbeitsvorschrift in 5.8.1 synthetisiert.

Ausbeute: 89,5 mg. Farbloser, pulverartiger Feststoff.

$400\text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$  ( $DMSO-d_6$ ):  $[\delta/ppm] = 7,36 - 7,19$  (br, (1xy)H, -NH), 4,69 (br, (-CH-OH), 3,69 – 3,41 (m, br, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-, (2y)H, -NH-CH<sub>2</sub>-), 3,33 (s, br, (2x)H, -NH-CH<sub>2</sub>-), 2,91 (br, (2y)H, -NH-CH<sub>2</sub>), 2,33 – 0,81 (m, br, -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>3</sub>, Polymerrückgrat).

$400\text{ MHz-}^{19}\text{F-NMR}$  ( $DMSO-d_6$ ):  $[\delta/ppm] =$  wurde gemessen und zeigte keine Signale, d.h. die Pentafluorophenyleinheiten wurden vollständig umgesetzt.

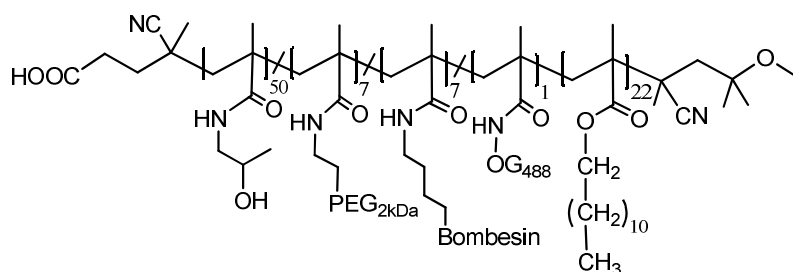
**Tabelle 29:** Ansätze für die Synthese von HPMA-LMA Blockcopolymeren mit und ohne PEG Funktionalisierung.

Polymer	P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA)	PEG <sub>2000</sub>	2-HPA	Ausbeute
<b>P(HPMA)-<i>b</i>-P(LMA) PEG</b>	101,2 mg (P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA) <sub>2</sub> ) 0,035 mmol	52,9 mg 0,027 mmol	1,5 mmol 113,5 µl	89,5 mg
<b>P(HPMA)-<i>b</i>-P(LMA)1</b>	101 mg (P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA) <sub>2</sub> ) 0,0035 mmol	-	1,5 mmol 113,5 µl	49,1 mg

**Tabelle 30:** Eigenschaften der synthetisierten HPMA-LMA Blockcopolymeren mit und ohne PEG<sub>2kDa</sub> Funktionalisierung. <sup>a</sup>mittels HFIP GPC und PMMA als Standard. <sup>b</sup>mittels <sup>1</sup>H-NMR in DMSO-d<sub>6</sub>.

Polymer	M <sub>n</sub> in g/mol <sup>a</sup>	Anteil PEG <sup>b</sup>	Đ <sup>a</sup>
<b>P(HPMA)-<i>b</i>-P(LMA) PEG</b>	46.000	9-10%	1,3
<b>P(HPMA)-<i>b</i>-P(LMA) 1</b>	26.000	-	1,3

### 5.8.3 Bombesinanbindung



50 mg (0,2 mmol) des Blockcopolymeren **P(PFPMA)-*block*-P(LMA)3** werden in ein Schlenkrohr eingewogen und in 1 ml abs. Dioxan gelöst. 2 mg (4 µmol) Oregon Green Cadaverin 488 werden in 6 ml absolutem DMSO gelöst und zu der Polymerlösung gegeben, so wie die dazugehörige Menge an Triethylamin. Die Reaktion findet, unter Rühren, bei einer Temperatur von 40 °C statt.

Nach Ende der ersten Reaktionszeit (24 h) werden 47 mg (0,03 mmol) [Lys 3]-Bombesin und 44 mg (0,02 mmol) PEG-Amin (**PEG2**) zusammen in 2 ml abs. DMSO gelöst und mit Triethylamin versetzt. Diese Lösung wird zu der Reaktionsmischung gegeben und weitere 66 h bei 40 °C gerührt. Nach Ende der zweiten Reaktionszeit werden 46 mg (0,61 mmol) 2-HPA und Triethylamin zugegeben.

Zum Aufreinigen wird drei Tage gegen Milli-Q Wasser dialysiert. Verwendeter Dialyseschlauch: Spectra/Por 3 Dialysis Membrane MWCO: 3.500.

Ausbeute: 60 mg (85%). Leicht rötlicher Feststoff.

Relevante Peaks:

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): [ $\delta/ppm$ ] = 10,77 (s; Bombesin), 4,07 (br.; 2H; -COO-CH<sub>2</sub>-), 3,51 (br; 182H; PEG); 2,99 (br; 2H; NH-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>3</sub>), 2,7 (s; OG 488), 2,3 (s; OG 488), 1,21 (br; Polymerrückgrat).

**Tabelle 31:** Ansätze für die Synthese des bombesinfunktionalisierten HPMA-LMA Blockcopolymers. <sup>b</sup>über Reaktivester Vorläufer Polymer berechnet.

Polymer	P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA)	PEG <sub>2000</sub> (PEG2)	[Lys3]-Bombesin	2-HPA	Ausbeute	M <sub>n</sub> in g/mol <sup>b</sup>
P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA) Bombesin	101 mg (P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA)3) 0,35 mmol	44 mg 0,022 mmol	47 mg 0,029 mmol	0,61 mmol 49,4 µl	89,5 mg	36.700
P(HPMA)- <i>b</i> -LMA2	50 mg (P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA)3) 0,19 mmol	-	-	0,77 mmol 59,6 µl	49,1 mg	13.500

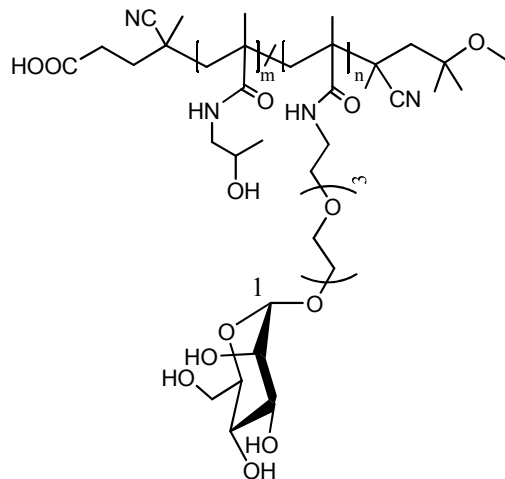
### 5.8.4 Mannoseanbindung

Allgemeine Arbeitsvorschrift

PFPMA Reaktivester Polymer wird in 4 ml absolutiertem Dioxan und 1,5 ml absolutiertem Dimethylsulfoxid gelöst. Um das Polymer zu markieren, werden zusätzlich aus einer 5 mg/ml Stammlösung (Oregon Green Cadaverin 488) in absolutiertem Dimethylsulfoxid 1 mol% des Farbstoffes mit der entsprechenden Menge Triethylamin als Hilfsbase dazugegeben. Der Ansatz wird über Nacht unter Argonatmosphäre bei 50 °C gerührt und anschließend mit 10 mol% 11-Amino-3,6,9-trioxa-undecyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**Man7**) aus einer 1 mg/ml DMSO Stammlösung mit der entsprechenden Menge Triethylamin versetzt. Die Reaktionsmischung wird weitere 24 h bei 50 °C unter Argonatmosphäre gerührt und nach der Zugabe von 352 mol% 2-Hydroxypropylamin sowie 352 mol% Triethylamin weitere 3 Tage bei 50 °C reagieren gelassen. Um freien Farbstoff abzutrennen wird 2 Tage gegen Methanol dialysiert. Nach weiteren 3 Tagen Dialyse gegen Milli-Q Wasser wird die Lösung

gefriergetrocknet. Es wird zu jedem Polymer eine Negativ Kontrolle analog zu der Allgemeinen Arbeitsvorschrift in 5.8.1 synthetisiert.

### P(HPMA)\_Man



**Tabelle 32:** Ansätze für die Synthese von HPMA Polymeren mit und ohne Mannosefunktionalisierung.

Polymer	P(PFPMA)	OG 488	Man-Linker (M7)	2-HPA
<b>P(HPMA)_Man</b>	100 mg (P(PFPMA)5) 0,4 mmol	1,13 mg 2,3 $\mu$ mol	39,7 $\mu$ mol 14,09 mg	1,4 mmol 109 $\mu$ l
<b>P(HPMA)_0</b>	100 mg (P(PFPMA)5) 0,4 mmol	1,13 mg 2,3 $\mu$ mol	-	1,6 mmol 121,2 $\mu$ l

**Tabelle 33:** Eigenschaften der synthetisierten HPMA Polymere mit und ohne Mannosefunktionalisierung.  
<sup>a</sup> über PFPMA Reaktivester Vorläuferpolymer berechnet. <sup>b</sup> mittels HFIP GPC und PMMA als Standard.  
<sup>c</sup> mittels <sup>13</sup>C-NMR in D<sub>2</sub>O.

Polymer	Ausbeute	M <sub>n</sub> in g/mol <sup>a</sup>	M <sub>n</sub> in g/mol <sup>b</sup>	Đ <sup>b</sup>	Anteil Mannose <sup>c</sup>
<b>P(HPMA)_Man</b>	47 mg	25.700	54.100	1,6	3%
<b>P(HPMA)_0</b>	42 mg	25.700	47.000	1,5	-

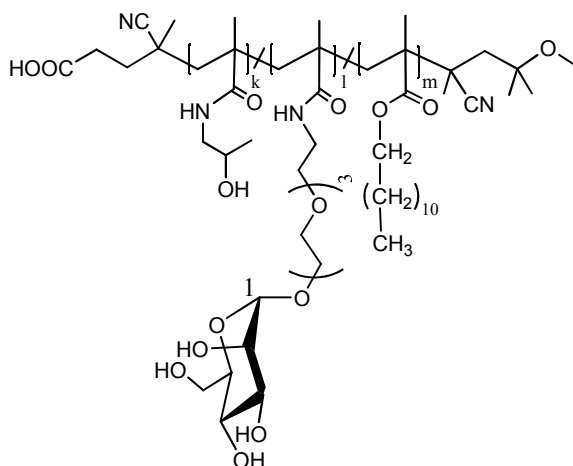
400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): [ $\delta/ppm$ ] = 7,68 – 7,54 (m, br, (1xy)H, -NH), 4,88 (br, (1x)H, 1), 4,07 – 2,85 (m, br, (3y)H, d, c, Mannoselinker Protonen), 2,52 – 0,61 (br, Polymerrückgrat Protonen).

Relevante Peaks:

100,6 MHz-<sup>13</sup>C-NMR [inverse gated] (D<sub>2</sub>O): [ $\delta/ppm$ ] = 180,19 – 178,45 (m, O=C-NH), 99,89 (C1).

400 MHz-<sup>19</sup>F-NMR (D<sub>2</sub>O): wurde gemessen und zeigte keine Signale, d.h. die Pentafluorophenyleinheiten wurden vollständig umgesetzt.

**P(HPMA)-random-P(LMA)\_Man**



**Tabelle 34:** Ansätze für die Synthese von statistischen HPMA-LMA Copolymeren mit und ohne Mannosefunktionalisierung.

Polymer	P(PFPMA)- <i>ran</i> -P(LMA)	OG 488	Man7	2-HPA
<b>P(HPMA)-<i>ran</i>-P(LMA)_Man</b>	100 mg (P(PFPMA)- <i>ran</i> -P(LMA)1), 0,4 mmol	1,97 mg 2,1 $\mu$ mol	40,1 $\mu$ mol 14,1 mg	1,4 mmol 108,9 $\mu$ l
<b>P(HPMA)-<i>ran</i>-P(LMA)_0</b>	100 mg (P(PFPMA)- <i>ran</i> -P(LMA)1), 0,4 mmol	1,97 mg 2,1 $\mu$ mol	-	1,6 mmol 121 $\mu$ l

**Tabelle 35:** Eigenschaften der synthetisierten statistischen HPMA-LMA Copolymeren mit und ohne Mannosefunktionalisierung. <sup>a</sup> über PFPMA Reaktivester Vorläuferpolymer berechnet. <sup>b</sup> mittels HFIP GPC und PMMA als Standard. <sup>c</sup> mittels ig <sup>13</sup>C-NMR in MeOD.

Polymer	Ausbeute	M <sub>n</sub> in g/mol <sup>a</sup>	M <sub>n</sub> in g/mol <sup>b</sup>	D <sup>b</sup>	Anteil Mannose <sup>c</sup>	Anteil LMA <sup>a</sup>
<b>P(HPMA)-<i>ran</i>-P(LMA)_Man</b>	69 mg	28.200	54.900	1,3	4%	7%
<b>P(HPMA)-<i>ran</i>-P(LMA)_0</b>	75 mg	28.200	52.700	1,4	-	7%

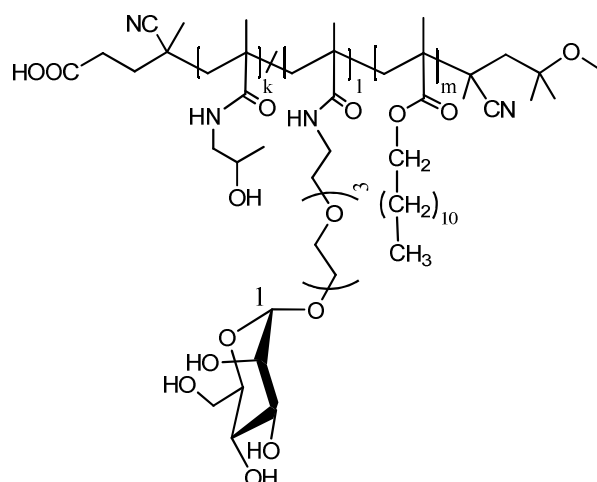
400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (MeOD): [ $\delta/ppm$ ] = 7,53 – 7,39 (m, br, (1xy)H, -NH), 4,82 (br, (1x)H, 1), 4,60 (br, (2z)H, -COO-CH<sub>2</sub>-), 4,11 – 2,77 (m, br, (3y)H, d, c, Mannoselinker Protonen), 2,65 – 0,64 (br, (23z)H, Laurylmethacrylat Protonen, Polymerrückgrat Protonen).

Relevante Peaks:

100,6 MHz-<sup>13</sup>C-NMR [inverse gated] (MeOD): [ $\delta/ppm$ ] = 180,10 – 178,56 (m, O=C-NH), 101,72 (C1).

400 MHz-<sup>19</sup>F-NMR (MeOD): wurde gemessen und zeigte keine Signale, d.h. die Pentafluorophenyleinheiten wurden vollständig umgesetzt.

**P(HPMA)-*block*-P(LMA)\_Man**



Abweichungen zur allgemeinen Arbeitsvorschrift

Nach der Zugabe des Farbstoffes wird zunächst 8 mol% des PEG<sub>2000</sub> Linkers bzw. des Poly(Sarcosin) Linkers mit der entsprechenden Menge Triethylamin dazugegeben und 30 h bei 50 °C gerührt. Anschließend werden 10 mol% des Mannose Linkers aus einer 1 mg/ml Stammlösung in abs. DMSO zugegeben und 24 h bei 50 °C gerührt. Dann werden 364 mol% 2-HPA sowie die entsprechende Menge Triethylamin zugegeben und die Reaktionsmischung weitere 3 Tage bei 50 °C gerührt. Die Aufarbeitung erfolgt wie in der oben beschriebenen Allgemeinen Arbeitsvorschrift.

## Experimenteller Teil

**Tabelle 36:** Ansätze für die Synthese von HPMA-LMA Blockcopolymeren mit und ohne Mannosefunktionalisierung.

Polymer	P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA)	OG 488	Man7	2-HPA
P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA)_Man	100 mg P(PFPMA)- <i>b</i> -LMA1), 0,27 mmol	3,8 µmol 1,91 mg	39,7 µmol 14,1 mg	1,4 mmol 109 µl
P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA)_0	100 mg P(PFPMA)- <i>b</i> -LMA1), 0,27 mmol	3,8 µmol 1,91 mg	-	1,6 mmol 121 µl

**Tabelle 37:** Eigenschaften der synthetisierten HPMA-LMA Blockcopolymeren mit und ohne Mannosefunktionalisierung. <sup>a</sup> über PFPMA Reaktivester Vorläuferpolymer berechnet. <sup>b</sup> mittels HFIP GPC und PMMA als Standard. <sup>c</sup> mittels <sup>13</sup>C-NMR in MeOD.

Polymer	Ausbeute	M <sub>n</sub> in g/mol <sup>a</sup>	M <sub>n</sub> in g/mol <sup>b</sup>	Đ <sup>b</sup>	Anteil Mannose <sup>c</sup>	Anteil LMA <sup>a</sup>
P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA)_Man	62 mg	16.800	31.400 420.700	1,3 1,1	5%	7,4%
P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA)_0	71 mg	16.800	26.700 400.000	1,3 1,1	-	7,4%

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (MeOD): [ $\delta/ppm$ ] = 7,58 – 7,39 (m, br, (1xy)H, -NH), 4,62 (br, (2z)H, -COO-CH<sub>2</sub>-), 3,90 – 2,80 (m, br, (3y)H, d, c, Mannoselinker Protonen), 2,60 – 0,86 (br, (23z)H, Laurylmethacrylat Protonen, Polymerrückgrat Protonen).

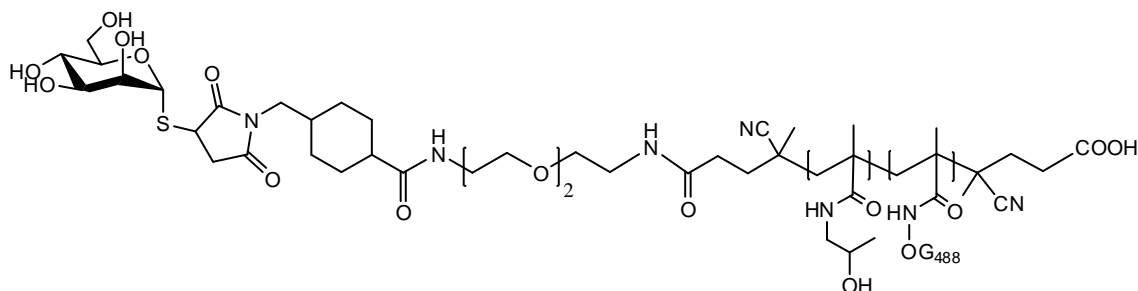
### Relevante Peaks:

100,6 MHz-<sup>13</sup>C-NMR [inverse gated] (MeOD): [ $\delta/ppm$ ] = 180,10 – 178,56 (m, O=C-NH), 101,72 (C1).

400 MHz-<sup>19</sup>F-NMR (MeOD): wurde gemessen und zeigte keine Signale, d.h. die Pentafluorophenyleinheiten wurden vollständig umgesetzt.



## HPMA Polymer mit Mannoseendgruppe

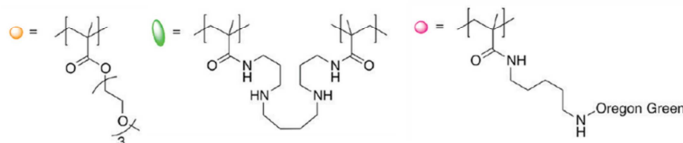
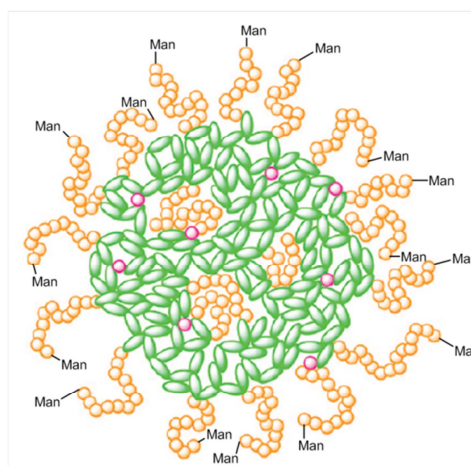


100 mg ( $n_{\text{Endgruppe}} = 9,26 \mu\text{mol}$ ) des HPMA Polymers mit Maleimidendgruppe (Synthetisiert und zur Verfügung gestellt von Kristof Tappertzhofen<sup>[171]</sup>) werden in 3 ml Milli-Q Wasser gelöst, mit 15 mg (0,07 mmol) Thiolmannosid (**Man10**) versetzt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird anschließend 3 Tage gegen Milli-Q Wasser dialysiert (MWCO 3500) und das Polymer anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute: 100 mg (100%). Farbloser Feststoff.

$600 \text{ MHz-}^1\text{H-NMR (DMSO-}d_6\text{): } [\delta/\text{ppm}] = 7,36 - 7,17 \text{ (m, br, (1n)H, -NH), } 5,56, 5,16, 4,13, 4,05 \text{ (Mannoseprotonen), } 4,71 \text{ (br, (1n)H, -C-OH), } 3,22 - 3,15 \text{ (m, br, 12H, PEG-Spacer), } 3,66 \text{ (br, (3n)H, d), } 2,92 \text{ (br, (2n)H, c), } 2,34 - 0,39 \text{ (br, Polymerrückgrat Protonen).}$

## Nanohydrogelpartikel mit Mannosefunktionalität



Die Azid funktionalisierten Nanohydrogelpartikel, synthetisiert und zur Verfügung gestellt von Nuhn *et al.*<sup>[170]</sup>, werden im Ultraschallbad resuspendiert und mit 1 eq. Prop-

2-ynyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (**Man12**) pro Azidfunktionalität versetzt. Diese Lösung wird drei Freeze-pump Zyklen unterworfen. Aus einer mit Wasser (3x sekuriert) hergestellten Stammlösung (3 mg/ml Cu(II)(OAc)<sub>2</sub> und 11,7 mg/ml Vitamin C) werden 1,5 eq. Kupfer(II)acetat und 6 eq. Vitamin C diesem Reaktionsgemisch hinzugefügt und alles erneut dreimal durch sekurieren entgast. Der Ansatz wird 90 h bei 40 °C gerührt. Analog dazu wird die Reaktion mit Partikeln ohne Farbstoffmarkierung durchgeführt. Zur Aufreinigung wird mehrere Tage gegen Milli-Q Wasser dialysiert und die Lösung gefriergetrocknet. Nachweis der Mannoseanbindung durch Dünnschichtchromatographie in H<sub>2</sub>O: ACN (1:1) + 1 Tropfen TEA. R<sub>f</sub> (Mannoselinker) = 0,81, R<sub>f</sub> (Mannosylierter Partikel) = 0.

**Tabelle 38:** Ansätze für die Synthese der mit OG 488 markierten Nanohydrogelpartikel.

P(MEO <sub>3</sub> MA) <sub>12</sub> - b-P(PFPMA) <sub>40</sub>	P(MEO <sub>3</sub> MA) <sub>12</sub> -b- P(1/2 Spermin) <sub>40</sub>	Azid	Man12	Cu(OAc) <sub>2</sub>	Vit. C	H <sub>2</sub> O
13.300 g/mol	10.000 g/mol 1,19 mg	0,12µmol	0,119 µmol 7,5 µmol (x3)	0,18 µmol 32,4 µg	0,71 µmol 125,7 µg	690µl

**Tabelle 39:** Ansätze für die Synthese unmarkierten Nanohydrogelpartikel.

P(MEO <sub>3</sub> MA) <sub>12</sub> - b-P(PFPMA) <sub>40</sub>	P(MEO <sub>3</sub> MA) <sub>12</sub> -b- P(1/2 Spermin) <sub>40</sub>	Azid	Man12	Cu(OAc) <sub>2</sub>	Vit. C	H <sub>2</sub> O
13.300 g/mol	10.000 g/mol 3,3 mg	0,33µmol	0,33 µmol 20,7 µmol	0,50 µmol 89,9 µg	1,98 µmol 348,7 µg	1,9ml

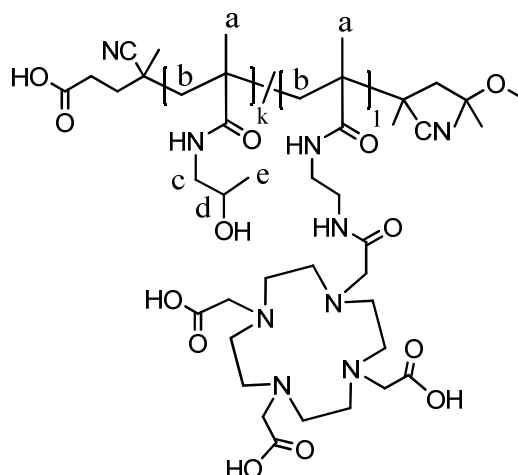
### 5.8.5 Chelator Anbindung für radioaktive Markierung

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift

PFPMA Reaktivester Polymer wird in 4 ml absolutiertem Dioxan und 1,5 ml absolutiertem Dimethylsulfoxid gelöst. Der Ansatz wird mit 2,5 mol% des aminfunktionalisierten Chelators (Synthetisiert und bereitgestellt von A. de la Fuente der Arbeitsgruppe Rösch, Kernchemie, Universität Mainz) aus einer 20,4 mg/ml DMSO Stammlösung mit der entsprechenden Menge Triethylamin versetzt. Die Reaktionsmischung wird 2 Tage bei 50 °C unter Argonatmosphäre gerührt und nach Zugabe von 390 mol% 2-Hydroxypropylamin sowie 390 mol% Triethylamin weitere 3 Tage bei 50 °C reagieren gelassen. Um freien Chelator abzutrennen wird 2 Tage gegen

Methanol dialysiert. Nach weiteren 3 Tagen Dialyse gegen Milli-Q Wasser wird die Lösung gefriergetrocknet. Es wird zu jedem Polymer eine Negativ Kontrolle analog zu der Allgemeinen Arbeitsvorschrift in 5.8.1 synthetisiert.

### Statistische HPMA-DOTA Copolymere



**Tabelle 40:** Ansätze für die Synthese der P(HPMA)-DOTA Konjugate 1-4 sowie der negativ Kontrolle P(HPMA)<sub>0</sub>.

Polymer	P(PFPMA)	DOTA-Linker	2-HPA
<b>P(HPMA)_DOTA_1</b>	130 mg (P(PFPMA) <sub>6</sub> )	12,9 µmol	2,0 mmol
	0,51 mmol	7,93 mg	155,2 µl
<b>P(HPMA)_DOTA_2</b>	200 mg (P(PFPMA) <sub>6</sub> )	43,6 µmol	3,1 mmol
	0,79 mmol	26,8 mg	244,6 µl
<b>P(HPMA)_DOTA_3</b>	200 mg (P(PFPMA) <sub>6</sub> )	74,5 µmol	3,1 mmol
	0,79 mmol	45,8 mg	244,6 µl
<b>P(HPMA)_DOTA_4</b>	200 mg (P(PFPMA) <sub>6</sub> )	136 µmol	3,1 mmol
	0,79 mmol	83,6 mg	244,6 µl
<b>P(HPMA)_0</b>	120 mg (P(PFPMA) <sub>6</sub> )	-	1,9 mmol
	0,48 mmol		148,1 µl

**Tabelle 41:** Eigenschaften der synthetisierten P(HPMA)-DOTA Konjugate sowie der negativ Kontrolle P(HPMA)\_0. <sup>a</sup> über PFPMA Reaktivester Vorläuferpolymer berechnet. <sup>b</sup> mittels HFIP GPC und PMMA als Standard. <sup>c</sup> mittels ig <sup>13</sup>C-NMR in MeOD.

Polymer	Ausbeute	M <sub>n</sub> in g/mol <sup>a</sup>	M <sub>n</sub> in g/mol <sup>b</sup>	Đ <sup>b</sup>	Anteil DOTA <sup>c</sup>
P(HPMA)_DOTA_1	71 mg	12.800	30.000	1,2	1,4%
P(HPMA)_DOTA_2	123 mg	13.500	34.000	1,2	3,3%
P(HPMA)_DOTA_3	131 mg	14.100	38.000	1,2	4,8%
P(HPMA)_DOTA_4	142 mg	17.000	43.000	1,2	12%
P(HPMA)_0	62 mg	12.100	22.000	1,3	-

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (MeOD): [ $\delta/ppm$ ] = 7,73 – 7,54 (m, br, (1xy)H, -NH), 3,90 (br, (1y)H, d), 3,78 – 3,54 (Chelatorprotonen), 3,54 – 2,68 (br, (2y)H, c), 2,62 – 1,57 (br, (2xy)H, b, Chelatorprotonen), 1,56 – 0,69 (br, (6xy)H, a, e, {1,2,3} Boc-Gruppe Chelator).

#### Relevante Peaks:

100,6 MHz-<sup>13</sup>C-NMR [inverse gated] (MeOD): [ $\delta/ppm$ ] = 180,19 – 178,45 (m, O=C-NH), 82,82 (quartäres C der Bock-Schutzgruppe).

400 MHz-<sup>19</sup>F-NMR (MeOD): wurde gemessen und zeigte keine Signale, d.h. die Pentafluorophenyleinheiten wurden vollständig umgesetzt.

#### Entschützung der Boc-Gruppen mittels TFA

Das geschützte P(HPMA)-DOTA Konjugat wird in einer 1:1 Mischung aus Wasser und Trifluoressigsäure gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Anschließend wird zwei Tage gegen Milli-Q Wasser dialysiert und durch Gefriertrocknung wird das entschützte P(HPMA)-DOTA Konjugat erhalten.

#### Radioaktive Markierung mit <sup>68</sup>Ga

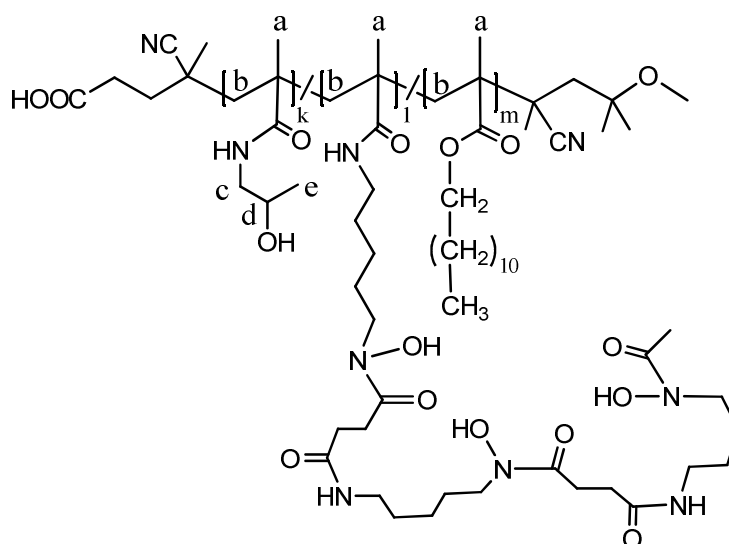
400  $\mu$ l des Aceton <sup>68</sup>Ga-Eluats werden zu 4,6 ml einer 1 mg/ml konzentrierten P(HPMA)-DOTA Konjugatlösung in Wasser gegeben und der Reaktionsansatz anschließend auf 95 °C erwärmt. Parallel wird dazu eine Negativkontrolle mit den analogen HPMA-Polymeren ohne DOTA Funktionalisierung durchgeführt. Um die so radioaktiv markierten Polymersysteme von unkomplexiertem <sup>68</sup>Ga abzutrennen wird der

Ansatz über eine Sephadex G-25 HiTrap<sup>TM</sup> mit einer Flussrate von 0.5 ml/min aufgereinigt. Die Qualitätskontrolle erfolgt mittels Radiodünnschichtchromatographie in 0,1 M Zitronensäure Puffer (pH = 4).  $R_f$  ( $^{68}\text{Ga}$ ) = 0,9;  $R_f$  ( $^{68}\text{Ga}$ -Konjugat) = 0.

#### Stabilitätstests in humanem Serum

50  $\mu\text{l}$  der aufgereinigten und radioaktivmarkierten Polymerlösung werden zu 500  $\mu\text{l}$  einer vorgewärmten 0,9%igen NaCl-Lösung und 250  $\mu\text{l}$  humanem Serum gegeben. Die Stabilität wird über 2 h bei 37 °C untersucht und mittels Radiodünnschichtchromatographie ausgewertet.

#### **HPMA basierte mit DFO konjugierte Polymere**



**Tabelle 42:** Ansätze für die Synthese des P(HPMA)-*ran*-P(LMA)-DFO Konjugats sowie der negativ Kontrolle P(HPMA)-*ran*-P(LMA)<sub>0</sub>.

Polymer	Vorläufer Polymer	DFO-Linker	2-HPA
<b>P(HPMA)-<i>ran</i>-P(LMA)<sub>DFO</sub></b>	120 mg (P(PFPMA)- <i>ran</i> -P(LMA) <sub>2</sub> )	14,8 $\mu\text{mol}$	2,4 mmol
<b>P(HPMA)-<i>ran</i>-P(LMA)<sub>2</sub></b>	0,59 mmol	9,81 mg	183,2 $\mu\text{l}$
<b>P(HPMA)-<i>ran</i>-P(LMA)<sub>0</sub></b>	40 mg (P(PFPMA)- <i>ran</i> -P(LMA) <sub>2</sub> )	-	1,6 mmol
<b>P(LMA)<sub>2</sub></b>	0,16 mmol	-	121 $\mu\text{l}$

**Tabelle 43:** Eigenschaften des synthetisierten P(HPMA)-*ran*-P(LMA)-DFO Konjugats sowie der negativ Kontrolle P(HPMA)-*ran*-P(LMA)\_2. <sup>a</sup> über PFPMA Reaktivester Vorläuferpolymer berechnet. <sup>b</sup> mittels HFIP GPC und PMMA als Standard. <sup>c</sup> mittels ig <sup>13</sup>C-NMR in D<sub>2</sub>O.

Polymer	Ausbeute	M <sub>n</sub> in g/mol <sup>a</sup>	M <sub>n</sub> in g/mol <sup>b</sup>	Đ <sup>b</sup>	Anteil DFO <sup>c</sup>
<b>P(HPMA)-<i>ran</i>-P(LMA)_DFO</b>	69 mg	51.100	78.500	1,5	1,2%
<b>P(HPMA)-<i>ran</i>-P(LMA)_2</b>	21 mg	50.500	76.300	1,4	-

400 MHz-<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): [ $\delta/ppm$ ] = 7,83 – 7,52 (m, br, (1xy)H, -NH), 3,98 (br, (1y)H, d), 3,72 – 3,54 (Chelatorprotonen), 3,54 – 2,86 (br, (2y)H, c), 2,78 (br, (4x)H, f, Chelator), 2,59 – 2,38 (br, (8x)H, g, Chelator), 2,29 – 1,55 (br, (2xy)H, b, Chelatorprotonen), 1,53 – 0,44 (br, (6xy)H, a, e, Chelatorprotonen).

400 MHz-<sup>19</sup>F-NMR (D<sub>2</sub>O): wurde gemessen und zeigte keine Signale, d.h. die Pentafluorophenyleinheiten wurden vollständig umgesetzt.

#### DFO Markierung mit <sup>89</sup>Zr

157  $\mu$ l einer 2 mg/ml P(HPMA)-*r*-P(LMA)-DFO Konjugatlösung (20 mmol) werden zu einer Mischung aus 1,5 ml 0,25 M HEPES Puffer (pH = 7,4) und 50  $\mu$ l einer 1 M Oxalsäure Lösung, die 10 MBq des radioaktiven <sup>89</sup>Zr Nukleotids enthält, gegeben und bei Raumtemperatur für 30 min. inkubiert. Parallel wird dazu eine Negativkontrolle mit dem analogen P(HPMA)-*r*-P(LMA) Polymer ohne DFO-Funktionalisierung durchgeführt. Um die so radioaktiv markierten Polymersysteme von unkomplexiertem <sup>89</sup>Zr abzutrennen wird der Ansatz über eine PD10 Size Exclusion Chromatographie aufgereinigt. Die Qualitätskontrolle erfolgt mittels Radiodünnschichtchromatographie in 0,1 M Zitronensäure Puffer (pH = 4). R<sub>f</sub> (<sup>89</sup>Zr) = 0,9; R<sub>f</sub> (<sup>89</sup>Zr -Konjugat) = 0, Radioaktive Ausbeute: 95%

#### Stabilitätstests in Humanem Serum

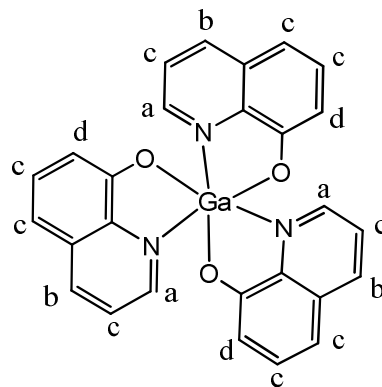
50  $\mu$ l der aufgereinigten und radioaktivmarkierten Polymerlösung werden zu 500  $\mu$ l einer vorgewärmten 0,9%igen NaCl-Lösung und 250  $\mu$ l humanem Serum gegeben und 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Analyse mittels Radiodünnschichtchromatographie.

---

## 5.9 Polymer Formulierungen

### 5.9.1 Einlagerung von Ga<sup>68</sup>-Komplex in HPMA-LMA Copolymere zur radioaktiven Beladung

#### Synthese des „kalten“ Ga-Komplexes

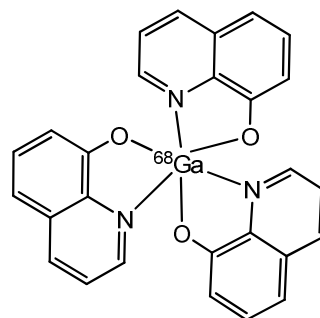


1,75 g (12 mmol) 8-Hydroxyquinoline wird in 150 ml 10%iger Essigsäure gelöst und langsam mit 0,94 g (3,45 mmol) Gallium(III)nitrat bei Raumtemperatur versetzt. Die Reaktionslösung wird auf 80 °C unter Rühren erhitzt und 10 Minuten refluxiert. Anschließend wird der pH-Wert mittels einer konzentrierten Ammoniaklösung auf 7,0 eingestellt wobei sich ein gelber Niederschlag bildet. Diese Suspension wird eine weitere Stunde unter Reflux gerührt. Der Niederschlag wird filtriert, mit heißem Wasser gewaschen und bei 100 °C getrocknet.

*IR* [ $cm^{-1}$ ]:  $\nu = 3043$  ( $-CH_{Aromat}$ -Valenz); 1600, 1577, 1496 ( $-C=C$ -Valenz, aromatische Ringschwingungen); 1463 ( $-C=O$  bzw.  $-C=N$ -Valenz (Oxin)).

*400 MHz*<sup>-1</sup>*H-NMR* ( $CDCl_3$ ): [ $\delta/ppm$ ] = 8,88 – 8,84 (m, 3H, a), 8,21 – 8,19 (d, 3H, b), 7,51 – 7,34 (m, 9H, c), 7,05 – 7,03 (m, 3H, d).

## Synthese des radioaktiven $^{68}\text{Ga}$ -Komplexes



0,4 ml des Aceton  $^{68}\text{Ga}$ -Eluats  $^{68}\text{Ga}$ -Lösung in Aceton wird mit 1 ml 0,5 M Natriumacetat Puffer (pH = 6,5) versetzt und 20 min. bei 40 °C mit 200  $\mu\text{l}$  (1,38  $\mu\text{mol}$ ) einer 10 mg/ml Oxin-Lösung in Ethanol inkubiert. Der Nachweis erfolgt mittels Radiodünnschichtchromatographie (Eluent:  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 95:5).  $R_f (^{68}\text{Ga}) = 0$ ,  $R_f (^{68}\text{Ga-Oxin}) = 0,9$ .

## Blockcopolymer und statistische Copolymer Formulierungen

5 mg des Polymers und 150 gew% des kalten Galliumkomplexes werden in insgesamt 300  $\mu\text{l}$  absolutiertem DMSO gelöst und mit 600  $\mu\text{l}$  des radioaktiven  $^{68}\text{Ga}$ -Komplexes in Natriumacetat Puffer (0,5 M) versetzt. Anschließend werden 1 ml 0,9%ige NaCl-Lösung tropfenweise zugefügt. Die Aufreinigung erfolgt mittels einer G-25 Sephadex Säule. Der Nachweis erfolgte über Radiodünnschichtchromatographie (Eluent: Zitronensäure Puffer (pH = 4)).  $R_f (^{68}\text{Ga-Oxin}) = 0,9$ ,  $R_f (\text{Mizellen}) = 0$ .

**Tabelle 44:** Ansätze für die radioaktive Beladung der verschiedenen HPMA-LMA Copolymere.

Polymer	Einwaage Polymer	Einwaage Komplex
<b>P(HPMA)-<i>b</i>-P(LMA) PEG</b>	5 mg	7.5 mg
<b>P(HPMA)-<i>b</i>-P(LMA) 1</b>	5 mg	7.5 mg
<b>P(HPMA)-<i>ran</i>-P(LMA) 2</b>	5 mg	7.5 mg

## Stabilitätstests in Humanem Serum

50  $\mu\text{l}$  der aufgereinigten und radioaktivbeladenen Mizelllösung werden zu 500  $\mu\text{l}$  einer vorgewärmten 0,9%igen NaCl-Lösung und 250  $\mu\text{l}$  humanem Serum gegeben und 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Analyse mittels Radiodünnschichtchromatographie.



## 5.9.2 Einlagerung von XAV939 als Wirkstoff für CDs in HPMA-LMA Copolymermizellen

### Blockcopolymer und statistische Copolymer Formulierungen

10 mg des Polymers und 50 gew% des hydrophoben Wirkstoffes XAV 939 werden in 200 µl absolutiertem DMSO gelöst und anschließend unter vortexen in 0,7 ml Milli-Q Wasser getropft. Die Probe wird über eine präparative Wasser-GPC mittels einer Sephadex G-25 Säule aufgereinigt, um die Probe von DMSO und freiem Wirkstoff zu befreien. Die Detektoren werden dabei auf die Wellenlängen des Fluoreszenzfarbstoffes (488 nm) und des Wirkstoffes (235 nm) eingestellt. Dabei wurde bei allen Proben kein freier Farbstoff detektiert. Die Konzentrationsbestimmung der erhaltenen Fraktionen erfolgt durch Gefriertrocknung eines aliquoten Anteils.

**Tabelle 45:** Ansätze für die Synthese der Mizellen der HPMA-LMA Copolymere.

Polymer	Einwaage	XAV939	DMSO	Wasser	Endkonzentration
<b>P(HPMA)-b- P(LMA)_Man</b>	5 mg 0,3 mmol	2,5 mg 0,008 mmol	200 µl	0,7 ml	c(ges) = 1,42 mg/ml, c(Polymer) = 0,96 mg/ml, c(XAV) = 0,48 mg/ml, c(Mannose) = 0,05 mg/ml
<b>P(HPMA)-b- P(LMA)_Man</b>	5 mg 0,3 mmol	-	200 µl	0,7 ml	c = 1,7 mg Polymer/ml, c = 0,085 mg Mannose/ml
<b>P(HPMA)-b- P(LMA)_0</b>	5 mg 0,3 mmol	2,5 mg 0,008 mmol	200 µl	0,7 ml	c(ges) = 1,54 mg/ml, c(Polymer) = 1 mg/ml, c(XAV) = 0,5 mg/ml
<b>P(HPMA)-b- P(LMA)_0</b>	5 mg 0,3 mmol	-	200 µl	0,7 ml	c(polymer) = 2,1 mg/ml
<b>P(HPMA)-ran- P(LMA)_Man</b>	5 mg 0,4 µmol	2,5 mg 0,008 mmol	200 µl	0,7 ml	c(ges) = 1,5 mg/ml, c(Polymer) = 1 mg/ml, c(XAV) = 0,5 mg/ml, c(Mannose) = 0,04 mg/ml
<b>P(HPMA)-ran- P(LMA)_Man</b>	5 mg 0,2 µmol	-	200 µl	0,7 ml	c = 0,7 mg Polymer/ml, c = 0,028 mg Mannose/ml
<b>P(HPMA)-ran- P(LMA)_0</b>	5 mg 0,2 µmol	2,5 mg 0,008 mmol	200 µl	0,7 ml	c(ges) = 1,12 mg/ml, c(Polymer) = 0,75 mg/ml, c(XAV) = 0,37 mg/ml
<b>P(HPMA)-ran- P(LMA)_0</b>	5 mg 0,2 µmol	-	200 µl	0,7 ml	c = 1,2 mg Polymer/ml

---

## 5.10 Zellexperimente

### 5.10.1 Zellexperimente von Block Copolypept(o)iden

#### Zellaufnahme

Am ersten Tag werden 150.000 DC 2.4 Zellen oder BMDCs in 500 µl Medium auf eine 24 Well Platte ausgesät. Am nächsten Tag werden 20 µl Mizelllösung pro Well hinzugefügt und nach 1 h mit PBS EDTA Puffer (DC 2.4) oder durch pipettieren (BMDCs) geerntet. Die Zellen werden anschließend zweimal mit PBS EDTA Puffer gewaschen und mit PBS Puffer mit 0,7% PFA fixiert und mittels FACS vermessen.

#### Blockierungsstudien mit Mannan und Dynasore-OH

Am ersten Tag werden DC 2.4 Zellen ausgesät wie in der Zellaufnahme beschrieben. Am nächsten Tag werden die Zellen für 2 h mit Mannan (0,2/2 mg/ml) oder 30 min. mit Dynasore-OH (20 µmol) inkubiert. Die Zellen werden anschließend 4x mit Medium gewaschen und mit Mizellen (50 µg pro Well) oder Ovalbumin (20 µg) pro Well versetzt. Nach 1 h werden die Zellen geerntet und mit PBS Puffer mit 0,7% PFA fixiert und mittel FACS vermessen.

### 5.10.2 Zellexperimente von HPMA-LMA Copolymeren

#### Zellaufnahme

Am 5. und 7. Tag der BMDC Kultur werden 150.000 BMDCs in 500 µl Medium auf eine 24 Well Platte ausgesät. Am nächsten Tag werden 20 bzw. 50 µl Mizelllösung pro Well hinzugefügt und nach 24 h mit PBS EDTA Puffer oder durch pipettieren geerntet. Die Zellen werden anschließend zweimal mit PBS EDTA Puffer gewaschen und mit PBS Puffer mit 0,7% PFA fixiert und mittels FACS vermessen. Es wurden folgende Antikörper zum Anfärben verwendet: CD40-PE (BD Bioscience), CD86-PECy (eBioscience), MHCII-e-Fluor450 (eBioscience), CD11c-APC (eBioscience), CD19-PE(BD Bioscience), CD11b-PECy7 (eBioscience), CD206-Briliant Violet 421 (Biolegend), CD11c (eBioscience).

---

## 6. Abkürzungen

Å	Ångström
ABNDM	2,2'-Azobis-(4-methoxy-2,4-dimethyl)valeronitril
AgOTf	Silbertrifluoromethansulfonat
AIBN	Azo-bis-isobutylnitril
Ala	Alanin
ASGPR	heptazellulärer asiaglykoprotein Rezeptor
Asn	Asparagin
ATRP	atom transfer radical polymerisation
BA	Butylacrylat
BaO	Bariumoxid
BF <sub>3</sub>	Bortrifluorid
BMDC	bone marrow-derived DCs
BOC	Di- <i>tert.</i> -butyl-dicarbonat
BPO	Benzoylperoxid
br	breites Signal
c	Konzentration
ca.	ungefähr
CaH <sub>2</sub>	Calciumhydrid
Cbz	Benzyloxycarbonyl
Cbz-Cl	Benzyloxycarbonylchlorid
CDCl <sub>3</sub>	Deuteriertes Chloroform
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
CMC	critical micell concentration
COSY	Correlation Spectroscopy
CRD	carbohydrate recognition domain
CSIRO	Commonwealth Science & Industrial Research Organisation
CTA	chain transfer agent
CuAAC	kupferkatalysierte Azid-alkin Cycloaddition
d	Dublett
DC	Dendritic Cell
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan

## Abkürzungen

---

DC-SIGN	Dendritic Cell-specific Intercellular adhesion molecules-3-Grabbing non-integrin
dd	Dublett vom Dublett
DFO	Deferoxamin B
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d <sub>6</sub>	Deuteriertes Dimethylsulfoxid
DOSY	diffusion-ordered-spectroscopy
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-Tetraessigsäure
dt	Dublett vom Triplett
DTPA	Penta(carboxymethyl)diethylentriamin
EaHy 926	humane Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamtetraessigsäure
ELVIS	extravasation through leaky vasculature and the subsequent inflammatory cell-mediated sequestration
ESI	Elektronenspray Ionisation
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Fe	Eisen
Fmoc	Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl
Fmoc-Cl	Fluoren-9-ylmethoxycarbonylchlorid
g	Gramm
gew%	Gewichtsprozent
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Glu(O(Bn))	Glutaminsäure benzylgeschützt
Gly	Glycin
GPC	gel permeation chromatographie
GRP	Gastrin-Releasing-Peptid
h	Stunden
HAI	Influenza Hämagglutinin Inhibitors
H-Brücken	Wasserstoffbrücken
He	Helium

---

HeLa	human cervix adenocarcinoma
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethan Sulfonsäure
HFIP	Hexafluoroisopropanol
His	Histidin
HPLC	High pressure liquid chromatographie
HPMA	<i>N</i> -(2-Hydroxypropyl)methacrylamid
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy
HUVEC	human umbilical vein endothelia
Hz	Hertz
ID/g	Injizierte Dosis pro Gramm Gewebe
ig <sup>13</sup> C	inverse gated <sup>13</sup> C
IR	Infrarot
K <sub>1</sub> , K <sub>2</sub> , K <sub>3</sub>	Komplexbildungskonstanten
kDa	kiloDalton
konz.	konzentriert
L	Liter
Leu	Leucin
LMA	Laurylmethacrylat
Lys	Lysin
m	Multiplett
M <sub>1</sub> und M <sub>2</sub>	Monomerkonzentrationen
Man	Mannose
MeOD	Deuteriertes Methanol
MeOH	Methanol
Met	Methionin
MeV	Megaelektronenvolt
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
MHz	Megahertz
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMR	macrophage mannose rezeptor
mr	heterotaktische Triaden

## Abkürzungen

---

MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid
mW	milliWatt
n	Anzahl
NAS	<i>N</i> -Arcyloxysuccinimid
NCA	<i>N</i> -substituierte $\alpha$ -Aminosäure <i>N</i> -Carboxyanhydride
NCS	Neocarzinostatin
Ne	Neon
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
nm	nanomol
NMAS	<i>N</i> -Methacryloxysuccinimid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NPC1161	8-[(4-amino-1-methylbutyl)amino]-5-[3,4-dichlorophenoxy]-6-methoxy-4-methylquinoline
OAc	Acetylschutzgruppe
OVA	Ovalbumin
P(PFPMA)	Polypentafluorophenylmethacrylat
P(Sar)	Polysarcosin
p.a.	pro analysis
PAsp	PolyAsparagin
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PET	Positronen Emissions-Tomographie
PFPA	Pentafluorophenylacrylat
PFPMA	Pentafluorophenylmethacrylate
PGA	Polyglutaminsäure
PGE <sub>1</sub>	Prostaglandin E <sub>1</sub>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration einer Lösung
pH*	Virtueller pH-Wert
Phe	Phenylalanin
PK1 und 2	Prague-Kelee 1 und 2
pKs	Negativ dekadischer Logarithmus der Säurekonstante

---

PLGA	Polylactidglutaminsäure
PLL	Poly-L-Milchsäure
Pman	Polymannose
PMMA	Poly(methyl methacrylat)
ppm	parts per million
PRP	pattern recognition receptor
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PyBroP	Bromotripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
q	Quartett
$r_1$ und $r_2$	Copolymerisationsparameter
RAFT	reversible addition-fragmentation chain transfer
ran	random
RES	retikuloendotheliales System
$R_f$	Retentionsfaktor
$R_h$	Hydrodynamischer Radius
RI	Brechungsindex
RP	reversed Phase
rr	syndiotaktische Triaden
s	Sekunde(n)
s	Singulett
Sarc	Sarcosin
SMANCS	Polymer in Konjugation mit Neocarzinostatin
Smp	Schmelzpunkt
t	Triplett
THF	Tetrahydrofuran
Trp	Tryptophan
tt	Triplett vom Triplett
UV	Ultraviolett
V	Volt
Val	Valin
Vis	Visuell
Wnt	Wingless Int-1

---

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] M. Ferrari, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, 5, 161–171.
- [2] R. Duncan, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, 6, 688–701.
- [3] R. Haag, F. Kratz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, 45, 1198–1215.
- [4] H. Maeda, *Bioconjug. Chem.* **2010**, 21, 797–802.
- [5] R. M. Schiffelers, G. A. Koning, L. M. Timo, P. C. A. Janssen, R. J. Kok, G. Molema, G. Storm, *J. Control. Release* **2003**, 91, 115–122.
- [6] A. M. Wu, P. D. Senter, *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 1137–1146.
- [7] S. G. Spain, N. R. Cameron, *Polym. Chem.* **2011**, 2, 60–68.
- [8] J. M. Irache, H. H. Salman, C. Gamazo, S. Espuelas, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, 5, 703–724.
- [9] R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2, 347–360.
- [10] J. Kopecek, P. Kopecková, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, 62, 122–49.
- [11] P. A. Vasey, S. B. Kaye, R. Morrison, A. D. Conjugates, C. Twelves, P. Wilson, R. Duncan, A. H. Thomson, L. S. Murray, T. E. Hilditch, et al., *Clin. Cancer Res.* **1999**, 5, 83–94.
- [12] L. W. Seymour, D. R. Ferry, D. Anderson, S. Hesslewood, P. J. Julyan, R. Poyner, J. Doran, A. M. Young, S. Burtles, D. J. Kerr, *J. Clin. Oncol.* **2002**, 20, 1668–1676.
- [13] J. Strohalm, J. Kopecek, *Die Angew. Makromol. Chemie* **1978**, 70, 109–118.
- [14] M. Teodorescu, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **1999**, 32, 4826–4831.
- [15] C. W. Scales, Y. a Vasilieva, A. J. Convertine, A. B. Lowe, C. L. McCormick, *Biomacromolecules* **2005**, 6, 1846–1850.
- [16] C.-Y. Hong, C.-Y. Pan, *Macromolecules* **2006**, 39, 3517–3524.
- [17] J.-F. Lutz, Z. Zarafshani, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, 60, 958–970.
- [18] P. J. Roth, D. Kessler, R. Zentel, P. Theato, *J. Polym. Science Part A Polym. Chem.* **2009**, 47, 3118–3130.
- [19] P. J. Roth, K. T. Wiss, R. Zentel, P. Theato, *Macromolecules* **2008**, 41, 8513–8519.
- [20] L. Nuhn, M. Barz, R. Zentel, *Macromol. Biosci.* **2014**, 14, 607–618.
- [21] M. Barz, R. Luxenhofer, R. Zentel, A. V Kabanov, *Biomaterials* **2009**, 30, 5682–5690.
- [22] P. Ehrlich, *Int. Wochenschrift für Wissenschaft, Kunst und Tech.* **1907**, 125–132.



- 
- [23] C. de Duve, R. Wattiaux, *Annu. Rev. Physiol.* **1966**, *28*, 435–492.
- [24] H.-G. Batz, G. Franzmann, H. Ringsdorf, *Angew. Chemie Int. Ed.* **1972**, *11*, 1103–1104.
- [25] H.-G. Batz, G. Franzmann, H. Ringsdorf, *Makromol. Chemie* **1973**, *127*, 27–47.
- [26] G. Pasut, F. M. Veronese, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 933–961.
- [27] T. Sun, Y. S. Zhang, B. Pang, D. C. Hyun, M. Yang, Y. Xia, *Angew. Chemie* **2014**, *126*, 12520–12568.
- [28] Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387–6392.
- [29] P. A. Dinndorf, J. Gootenberg, M. H. Cohen, P. Keegan, R. Pazdur, *Oncologist* **2007**, *12*, 991–998.
- [30] H. Maeda, G. Y. Bharate, J. Daruwalla, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *71*, 409–419.
- [31] J. Fang, H. Nakamura, H. Maeda, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 136–151.
- [32] K. Greish, J. Fang, T. Inutsuka, A. Nagamitsu, H. Maeda, *Clin. Pharmacokinet.* **2003**, *42*, 1089–1105.
- [33] M. D. Blanco, R. M. Olmo, J. M. Teijón, *Targeted Nanoparticles for Cancer Therapy*, **2012**.
- [34] F. Marcucci, F. Lefoulon, *Drug Discov. Today* **2004**, *9*, 219–228.
- [35] A. Nori, K. D. Jensen, M. Tijerina, P. Kopeckova, J. Kopecek, *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14*, 44–50.
- [36] N. Larson, H. Ghandehari, *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 840–853.
- [37] A. Kübelbeck, “[http://commons.wikimedia.org/wiki/File%3ARingsdorf\\_model\\_02.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File%3ARingsdorf_model_02.svg),” **2009**.
- [38] F. Danhier, O. Feron, V. Préat, *J. Control. Release* **2010**, *148*, 135–146.
- [39] T. Lammers, F. Kiessling, W. E. Hennink, G. Storm, *J. Control. Release* **2012**, *161*, 175–187.
- [40] P. J. Julyan, L. W. Seymour, D. R. Ferry, S. Daryani, M. Boivin, J. Doran, M. David, D. Anderson, C. Christodoulou, A. M. Young, et al., *J. Control. Release* **1999**, *57*, 281–290.
- [41] H. Zhao, Y. Li, Y. Hu, *Clin. Proteomics* **2014**, *11*, 1–10.
- [42] J. R. Kramer, T. J. Deming, *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 671–682.
- [43] S. R. S. Ting, G. Chen, M. H. Stenzel, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1392–1412.
- [44] S. G. Spain, N. R. Cameron, *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 60.
- [45] J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555–578.

- [46] G. Ercolani, L. Schiaffino, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2011**, *50*, 1762–1768.
- [47] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2006**, *45*, 2348–2368.
- [48] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, L. E. C. Opin, C. Biol, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922–14933.
- [49] M. A. Sparks, K. W. Williams, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 778–783.
- [50] M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4179–4190.
- [51] X. Qian, S. J. Metallo, I. S. Choi, H. Wu, M. N. Liang, G. M. Whitesides, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1805–1810.
- [52] I. Papp, J. Dervede, S. Enders, S. B. Riese, T. C. Shiao, R. Roy, R. Haag, *Chembiochem* **2011**, *12*, 1075–1083.
- [53] D. Ponader, F. Wojcik, F. Beceren-braun, J. Dervede, L. Hartmann, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1845–1852.
- [54] D. K. Cureton, R. H. Massol, S. Saffarian, T. L. Kirchhausen, S. P. J. Whelan, *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, 1–15.
- [55] L. Pelkmans, J. Kartenbeck, A. Helenius, *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 473–484.
- [56] H. Li, Z. M. Qian, *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 225–250.
- [57] Z. M. Qian, H. Li, H. Sun, K. Ho, *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 561–587.
- [58] S.-K. Choi, M. Mammen, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4103–4111.
- [59] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [60] S. Slavin, J. Burns, D. M. Haddleton, C. R. Becer, *Eur. Polym. J.* **2011**, *47*, 435–446.
- [61] S. T. Reddy, M. A. Swartz, J. A. Hubbell, *Trends Immunol.* **2006**, *27*, 573–579.
- [62] S. D. Conner, S. L. Schmid, *Nature* **2003**, *422*, 37–44.
- [63] A. Aderem, D. M. Underhill, *Annu. Rev. Immunol.* **1999**, *17*, 593–623.
- [64] J. A. Swanson, C. Watts, *Trends Cell Biol.* **1995**, *5*, 424–428.
- [65] F. H. Jacek, “<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pinocytosis.svg>,” **2007**.
- [66] T. Kanaseki, K. E. N. Kadota, *J. Cell Biol.* **1969**, 202–220.
- [67] L. M. Bareford, P. W. Swaan, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 748–758.
- [68] P. D. Stahl, J. S. Rodman, M. J. Miller, P. H. Schlesinger, *Proc. Natl. Acadamy Sci.* **2007**, *75*, 1399–1403.

- [69] B. F. Sallusto, M. Cella, C. Danieli, A. Lanzavecchia, *J. Exp. Med.* **1995**, *182*, 389–400.
- [70] L. M. van den Berg, S. I. Gringhuis, T. B. H. Geijtenbeek, *Ann. New York Acad. Sci.* **2012**, *1253*, 149–158.
- [71] C. E. Napper, M. H. Dyson, M. E. Taylor, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 14759–14766.
- [72] E. J. Soilleux, *Clin. Sci.* **2003**, *104*, 437–446.
- [73] J. J. Reina, J. Rojo, *Brazilian J. Pharm. Sci.* **2013**, *49*, 109–124.
- [74] X. Dong, W. J. Storkus, R. D. Salter, *J. Immunol.* **1999**, *163*, 5427–5434.
- [75] T. E. Wileman, M. R. Lennartz, P. D. Stahl, *Proc. Natl. Acadamy Sci.* **1986**, *83*, 2501–2505.
- [76] M. E. Taylor, J. T. Conarytn, M. R. Lennartzg, P. D. Stahl, K. Drickamer, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 12156–12162.
- [77] D. J. Fiete, M. C. Beranek, J. U. Baenziger, *Proc. Natl. Acadamy Sci.* **1998**, *95*, 2089–2093.
- [78] M. E. Taylor, K. Drickamer, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 399–404.
- [79] W. Weis, K. Drickamer, W. A. Hendrickson, *Nature* **1992**, *360*, 127–134.
- [80] C. Nóbrega, J. T. Vázquez, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2793–2801.
- [81] V. Kery, J. J. F. Krepinsky, C. D. Warren, P. Capek, P. D. Stahl, *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *298*, 49–55.
- [82] L. Sprincl, J. Exner, O. Sterba, J. Kopecek, *J. Biomed. Mater. Res.* **1976**, *10*, 953–963.
- [83] P. A. Vasey, S. B. Kaye, R. Morrison, A. D. Conjugates, C. Twelves, P. Wilson, R. Duncan, A. H. Thomson, L. S. Murray, T. E. Hilditch, et al., *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 83–94.
- [84] N. E. Schoemaker, C. van Kesteren, H. Rosing, S. Jansen, M. Swart, J. Lieverst, D. Fraier, M. Breda, C. Pellizzoni, R. Spinelli, et al., *Br. J. Cancer* **2002**, *87*, 608–614.
- [85] J. M. Meerum Terwogt, W. W. ten Bokkel Huinink, J. H. Schellens, M. Schot, I. A. Mandjes, M. G. Zurlo, M. Rocchetti, H. Rosing, F. J. Koopman, J. H. Beijnen, *Anticancer. Drugs* **2001**, *12*, 315–323.
- [86] J. M. Rademaker-Lakhai, C. Terret, S. B. Howell, J. M. Rademaker-lakhai, C. M. Baud, R. F. De Boer, D. Pluim, *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 3386–3395.
- [87] S. Low, J. Kopeček, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *10*, 1189–1204.
- [88] D. Wang, M. Sima, R. L. Mosley, J. P. Davda, N. Tietze, C. Miller, P. R. Gwilt, P. Kopeckova, J. Kopecek, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *3*, 717–725.
- [89] J. Kopeček, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 49–59.

- [90] X.-M. Liu, S. C. Miller, D. Wang, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 258–271.
- [91] A. Nan, S. L. Croft, V. Yardley, H. Ghandehari, *J. Control. Release* **2004**, *94*, 115–127.
- [92] A. Nan, N. P. D. Nanayakkara, L. a Walker, V. Yardley, S. L. Croft, H. Ghandehari, *J. Control. Release* **2001**, *77*, 233–243.
- [93] L. W. Seymour, R. Duncan, *J. Biomed. Mater. Res.* **1987**, *21*, 1341–1358.
- [94] K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *47*, 113–131.
- [95] M. Talelli, C. J. F. Rijcken, C. F. van Nostrum, G. Storm, W. E. Hennink, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 231–239.
- [96] M. Yokomaya, G. S. Kwon, T. Okano, Y. Sakurai, T. Seto, K. Kataoka, *Bioconjug. Chem.* **1992**, *3*, 295–301.
- [97] A. V. Kabanov, S. V. Vinogradov, Y. G. Suzdaltseva, V. Alakhov, *Bioconjug. Chem.* **1995**, *6*, 639–643.
- [98] A. Lavasanifar, J. Samuel, G. S. Kwon, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 169–190.
- [99] R. Gref, A. Domb, P. Quellec, T. Blunk, R. H. Müller, J. M. Verbavatz, R. Langer, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *16*, 215–233.
- [100] C. Konak, B. Ganchev, M. Teodorescu, K. Matyjaszewski, P. Kopeckova, J. Kopeček, *Polym.* **2002**, *43*, 3735–3741.
- [101] M. Barz, M. Tarantola, K. Fischer, M. Schmidt, R. Luxenhofer, A. Janshoff, P. Theato, R. Zentel, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 3114–3118.
- [102] M. Allmeroth, *From Defined Polymer Architectures to Structure-Property Relationships in Vivo*, **2012**.
- [103] E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, G. M. Whitesides, *Langmuir* **2001**, *17*, 5605–5620.
- [104] E. Hara, M. Ueda, C. J. Kim, A. Makino, I. Hara, E. Ozeki, S. Kimura, *J. Pept. Sci.* **2014**, *20*, 570–577.
- [105] M. Sisido, Y. Imanishi, T. Higashimura, *Makromol. Chemie* **1977**, *178*, 3107–3114.
- [106] L. Guo, D. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18072–18074.
- [107] C. Fetsch, A. Grossmann, L. Holz, J. F. Nawroth, R. Luxenhofer, *Macromolecules* **2011**, *44*, 6746–6758.
- [108] A. Makino, E. Hara, I. Hara, E. Ozeki, S. Kimura, *Langmuir* **2014**, *30*, 669–674.
- [109] T. Kidchob, S. Kimura, Y. Imanishi, *J. Control. Release* **1998**, *51*, 241–248.
- [110] A. Birke, D. Huesmann, A. Kelsch, M. Weilba, J. Xie, M. Bros, T. Bopp, C. Becker, K. Landfester, M. Barz, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 548–557.

- [111] P. Heller, A. Birke, D. Huesmann, B. Weber, K. Fischer, A. Reske-Kunz, M. Bros, M. Barz, *Macromol. Biosci.* **2014**, *14*, 1380–1395.
- [112] K. Matyjaszewski, J. Xia, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2921–2990.
- [113] J. Chiefari, Y. K. B. Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T. P. T. Le, R. T. A. Mayadunne, G. F. Meijs, C. L. Moad, G. Moad, et al., *Macromolecules* **1998**, *31*, 5559–5562.
- [114] D. Pissuwan, C. Boyer, K. Gunasekaran, T. P. Davis, V. Bulmus, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 412–420.
- [115] G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Aust. J. Chem.* **2009**, *62*, 1402–1472.
- [116] T. Wieland, W. Schäfer, E. Bokelmann, *Justus Liebig's Ann. der Chemie* **1951**, *7*, 99–104.
- [117] R. Schwyzer, B. Iselin, M. Feurer, *Helv. Chim. Acta* **1955**, *38*, 69–79.
- [118] M. Eberhardt, P. Théato, *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, *26*, 1488–1493.
- [119] M. Eberhardt, R. Mruk, R. Zentel, P. Théato, *Eur. Polym. J.* **2005**, *41*, 1569–1575.
- [120] M. A. Gauthier, M. I. Gibson, H.-A. Klok, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2009**, *48*, 48–58.
- [121] M. I. Gibson, E. Fröhlich, H.-A. Klok, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2009**, *47*, 4332–4345.
- [122] T. Lammers, R. Kühnlein, M. Kissel, V. Subr, T. Etrych, R. Pola, M. Pechar, K. Ulbrich, G. Storm, P. Huber, et al., *J. Control. Release* **2005**, *110*, 103–118.
- [123] M. Hemmelmann, C. Knoth, U. Schmitt, M. Allmeroth, D. Moderegger, M. Barz, K. Koynov, C. Hiemke, F. Rösch, R. Zentel, *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32*, 712–717.
- [124] H. Abdollahi, V. Najafi, F. Ziaee, K. Kabiri, F. Narimani, *Macromol. Res.* **2014**, *22*, 1330–1336.
- [125] S. Koltzenburg, M. Maskos, O. Nuyken, *Polymere: Synthese, Eigenschaften Und Anwendungen*, Springer-Verlag, **2014**.
- [126] A. Natalello, M. Werre, A. Alkan, H. Frey, *Macromolecules* **2013**, *46*, 8467–8471.
- [127] F. Mayo, F. M. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, *66*, 1594–1601.
- [128] M. Fineman, S. D. Ross, *J. Polym. Sci.* **1950**, *5*, 259–265.
- [129] T. Kelen, F. Tüdös, *J. Macromol. Sci. Part A - Chem.* **1975**, *9*, 1–27.
- [130] T. Kelen, F. Tüdös, B. Turcsanyi, *J. Polym. Science Polym. Chem. Ed.* **1977**, *15*, 3047–3074.
- [131] A. M. van Herk, *J. Chem. Educ.* **1995**, *72*, 138–140.

- [132] A. M. Van Herk, T. Droge, *Macromol. Theory Simul.* **1997**, *1276*, 1263–1276.
- [133] T. Lammers, V. Subr, K. Ulbrich, W. E. Hennink, G. Storm, F. Kiessling, *Nano Today* **2010**, *5*, 197–212.
- [134] H. Herzog, *Radiat. Phys. Chem.* **2007**, *76*, 337–342.
- [135] A. Saleem, N. Charnley, P. Price, *Eur. J. Cancer* **2006**, *42*, 1720–1727.
- [136] E. Eppard, N. S. Loktionova, F. Rösch, *Appl. Radiat. Isot.* **2014**, *91*, 92–96.
- [137] G. Fischer, U. Seibold, R. Schirrmacher, B. Wängler, C. Wängler, *Molecules* **2013**, *18*, 6469–6490.
- [138] K. Fukukawa, R. Rossin, A. Hagooly, E. D. Pressly, J. N. Hunt, B. W. Messmore, K. L. Wooley, M. J. Welch, C. J. Hawker, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1329–1339.
- [139] J. Houben, *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1906**, *39*, 3219–3233.
- [140] K. A. Aamer, G. N. Tew, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2007**, *45*, 5618–5625.
- [141] G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Polym.* **2008**, *49*, 1079–1131.
- [142] M. Tsunda, *Die Makromol. Chemie* **1963**, *72*, 174–182.
- [143] J.-C. Blazejewski, J. W. Hofstraat, C. Lequesne, C. Wakselman, U. E. Wiersum, *J. Fluor. Chem.* **1998**, *91*, 175–177.
- [144] J. K. Kim, D. H. Suh, *J. Fluor. Chem.* **2004**, *125*, 369–375.
- [145] S. Perrier, P. Takolpuckdee, C. A. Mars, *Macromolecules* **2005**, *38*, 2033–2036.
- [146] J.-F. Lutz, D. Neugebauer, K. Matyjaszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6986–6993.
- [147] A. Natalello, A. Alkan, F. R. Wurm, H. Frey, *ACS Macro Lett.* **2014**, *3*, 560–564.
- [148] P. W. Tidwell, G. a. Mortimer, *J. Polym. Sci. Part A Gen. Pap.* **1965**, *3*, 369–387.
- [149] P. Augustijns, M. Brewster, *Solvent Systems and Their Selection in Pharmaceuticals and Biopharmaceutics*, Springer-Verlag, **2007**.
- [150] J. Zhang, W. Liu, T. Nakano, Y. Okamoto, *Polym. J.* **2000**, *32*, 694–699.
- [151] P. Caliceti, F. M. Veronese, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 1261–1277.
- [152] M. Allmeroth, D. Moderegger, D. Gündel, H.-G. Buchholz, N. Mohr, K. Koynov, F. Rösch, O. Thews, R. Zentel, *J. Control. Release* **2013**, *172*, 77–85.
- [153] C. Ding, J. Gu, X. Qu, Z. Yang, *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 1163–1170.
- [154] G. A. Lemieux, C. R. Bertozzi, *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 506–513.
- [155] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chemie* **1978**, *90*, 556–557.

- [156] O. M. Martin, S. Mecozzi, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5539–5547.
- [157] L. I. Willems, M. Verdoes, B. I. Florea, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, *ChemBiochem* **2010**, *11*, 1769–1781.
- [158] A. Krężel, W. Bal, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 161–166.
- [159] R. Bukowski, L. M. Morris, R. J. Woods, T. Weimar, *European J. Org. Chem.* **2001**, 2697–2705.
- [160] D. A. Fulton, J. F. Stoddart, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8309–8319.
- [161] R. Caraballo, L. Deng, L. Amorim, T. Brinck, O. Ramström, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 6115–6121.
- [162] G. Zemplén, A. Kunz, *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1923**, *56*, 1705–1710.
- [163] M. Bergeron-Brlek, T. C. Shiao, M. C. Trono, R. Roy, *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 1479–1489.
- [164] S. Gabriel, *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1887**, *20*, 2224–2236.
- [165] H. Xie, O. Braha, L.-Q. Gu, S. Cheley, H. Bayley, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 109–120.
- [166] W. Koenigs, E. Knorr, *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1901**, *34*, 957–981.
- [167] H. Kunz, *Angew. Chemie Int. Ed.* **1987**, *26*, 294–308.
- [168] M. U. Roslund, P. Tähtinen, M. Niemitz, R. Sjöholm, *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 101–112.
- [169] W. Gunther, H. Kunz, *Carbohydr. Res.* **1992**, *228*, 217–241.
- [170] L. Nuhn, M. Hirsch, B. Krieg, K. Koynov, K. Fischer, M. Schmidt, M. Helm, R. Zentel, *ACS Nano* **2012**, *6*, 2198–2214.
- [171] K. Tappertzhofen, V. V Metz, M. Hubo, M. Barz, R. Postina, H. Jonuleit, R. Zentel, *Macromol. Biosci.* **2013**, *13*, 203–214.
- [172] M. Oya, R. Katakai, H. Nakai, *Chem. Lett.* **1973**, 1143–1144.
- [173] J. Rejman, V. Oberle, I. S. Zuhorn, D. Hoekstra, *Biochem. J.* **2004**, *169*, 159–169.
- [174] Z. Cui, S.-J. Han, L. Huang, *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 1018–1025.
- [175] L. Cui, J. A. Cohen, K. E. Broaders, T. T. Beaudette, J. M. J. Fr, *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 949–957.
- [176] X. Sun, S. Chen, J. Han, Z. Zhang, *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 2929–2942.
- [177] E. Macia, M. Ehrlich, R. Massol, E. Boucrot, C. Brunner, T. Kirchhausen, *Dev. Cell* **2006**, *10*, 839–850.
- [178] S. Burgdorf, V. Lukacs-Kornek, C. Kurts, *J. Immunol.* **2006**, *176*, 6770–6776.

- [179] U. Gazi, L. Martinez-Pomares, *Immunobiology* **2009**, *214*, 554–561.
- [180] P. D. Stahl, R. A. B. Ezekowitz, *Curr. Opin. Immunol.* **1998**, *10*, 50–55.
- [181] N. Brandhonneur, F. Chevanne, V. Vié, B. Frisch, R. Primault, M.-F. Le Potier, P. Le Corre, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2009**, *36*, 474–485.
- [182] D. Huesmann, A. Birke, K. Klinker, S. Tu, H. Joachim, M. Barz, *Macromolecules* **2014**, *47*, 928–936.
- [183] J. Coste, E. Frérot, P. Jouin, *J. Org. Chem.* **1994**, 2437–2446.
- [184] S.-M. A. Huang, Y. M. Mishina, S. Liu, A. Cheung, F. Stegmeier, G. A. Michaud, O. Charlat, E. Wiellette, Y. Zhang, S. Wiessner, et al., *Nature* **2009**, *461*, 614–620.
- [185] X. Tian, W. Hou, Y. Fang, J. Fan, H. Tong, S. Bai, Q. Chen, H. Xu, Y. Li, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2013**, *32*, 1–9.
- [186] D. Mueller, I. Klette, R. P. Baum, M. Gottschaldt, M. K. Schultz, W. A. P. Breeman, *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23*, 1712–1717.
- [187] K. P. Zhernosekov, D. V. Filosofov, R. P. Baum, P. Aschoff, H. Bihl, A. A. Razbash, M. Jahn, M. Jennewein, F. Rösch, *J. Nucl. Med.* **2007**, *48*, 1741–1748.
- [188] M. Allmeroth, D. Moderegger, B. Biesalski, K. Koynov, F. Rösch, O. Thews, R. Zentel, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2841–9.
- [189] Y. Yano, T. F. Budinger, S. N. Ebbe, C. A. Mathis, K. M. Brennan, B. R. Moyer, *J. Nucl. Med.* **1985**, *26*, 1429–1437.
- [190] L. G. Sillén, A. E. Martell, E. Högfeltd, D. D. Perrin, *Stability Constants of Metal-Ion Complexes.*, London : Chemical Society, London, **1971**.
- [191] E. Eppard, *Radiomarkierung von HPMA-Basierten Funktionalisierten Polymeren Mit Metallischen Radionukliden Für Die Medizinische Anwendung Als Theranostika*, **2013**.
- [192] C. Scheicher, M. Mehlig, R. Zecher, K. Reske, *J. Immunol. Methods* **1992**, *154*, 253–264.
- [193] K. Gisch, N. Gehrke, M. Bros, C. Priesmeyer, J. Knop, A. B. Reske-Kunz, S. Sudowe, *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2007**, *144*, 183–196.
- [194] T. Zal, A. Volkmann, B. Stockinger, *J. Exp. Med.* **1994**, *180*, 2089–2099.
- [195] T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley-Interscience, **1999**.
- [196] E. Klein, S. DeBonis, B. Thiede, D. a Skoufias, F. Kozielski, L. Lebeau, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6474–6488.
- [197] K. Ulbrich, V. Šubr, J. Strohalm, D. Plocová, M. Jelínková, B. Říhová, *J. Control. Release* **2000**, *64*, 63–79.
- [198] P. Theato, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2008**, *46*, 6677–6687.



---

## 8. Veröffentlichungen

### 8.1 Publikationen

"PFPPMA-LMA Polymer structure investigation in RAFT Copolymerisation by real-time <sup>1</sup>H-NMR Spectroscopy" **N. Mohr**, S. Meffert, A. Müller, R. Zentel (in Vorbereitung).

"Mannose as ligand for targeting cells of the immune system: Enhanced uptake of dendritic cells by mannosylated HPMA-LMA Copolymers" **N. Mohr**, C. Kappel, M. Bros, S. Grabbe, R. Zentel (in Vorbereitung).

"Labeling of HPMA-based polymer-conjugates with metallic radionuclides for theranostic applications" E. Eppard, A. De la Fuente, M. Allmeroth, **N. Mohr**, R. Zentel, F. Rösch (in Vorbereitung).

Back Cover: *Macromol. Biosci.* 1/2015 P. Heller, **N. Mohr**, A. Birke, B. Weber, A. Reske-Kunz, M. Bros, M. Barz *Macromolecular Bioscience* **2015**, *15(1)*, 148.

"Directed Interactions of Block Copolypept(o)ides with Mannose-binding Receptors: PeptoMicelles targeted to Cells of the Innate Immune System" P. Heller, **N. Mohr**, A. Birke, B. Weber, A. Reske-Kunz, M. Bros, M. Barz *Macromolecular Bioscience* **2014**, *15(1)*, 63-73.

"A Deeper Insight into the Postpolymerization Modification of Pentafluorophenyl-methacrylates to Poly-N-(2-hydroxypropyl)-methacrylamide" **N. Mohr**, M. Barz, R. Forst, R. Zentel *Macromolecular Rapid Communication* **2014**, *35(17)*, 1522-1527.

"PEGylation of HPMA-based block copolymers enhances tumor accumulation *in vivo*: A quantitative study using radiolabeling and Positron Emission Tomography" M. Allmeroth, D. Moderegger, D. Gründel, H.-G. Buchholz, **N. Mohr**, K. Koynov, F. Rösch, O. Thews, R. Zentel *Journal of Controlled Release* **2013**, *172(1)*, 77-85.

## 8.2 Konferenzen und Präsentationen

Posterpräsentation und Kurzvortrag mit dem Thema: “Targeting cells of the immune system: Glyco-polymers for biomedical applications” *International Symposium on Polymer Therapeutics*, Valencia, Spanien. (Mai 2014)

Vortrag mit dem Thema: “Targeting cells of the immune system: Glyco-polymers for biomedical applications” *ACS National Meeting*, Dallas, Texas (USA). (März 2014)

Teilnahme an der Konferenz: *Makromolekulares Kolloquium Freiburg* (Februar 2013)

Posterpräsentation und Kurzvortrag mit dem Thema: “Synthesis of HPMa-based glycopolymers for targeting cells of the immune system” *International Symposium on Polymer Therapeutics*, Valencia, Spanien. (Mai 2012)

Teilnahme an der Konferenz: *Makromolekulares Kolloquium Freiburg* (Februar 2012)

## 9. Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne das Mitwirken und die Unterstützung vieler besonderer Menschen nicht möglich gewesen. Deswegen möchte ich allen, die zum Gelingen beigetragen haben meinen tiefsten Dank aussprechen.

In erster Linie gilt mein herzlichster Dank meinem Doktorvater \_\_\_\_\_ für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die guten Arbeitsbedingungen, sowie das interessante interdisziplinäre Thema. Besonders möchte ich mich für die stets gewährten Freiheiten, die ich bei der Bearbeitung meines Themas hatte und die immerwährende Ansprechbarkeit bedanken. Darüber hinaus bin ich ihm dankbar, dass er mir die Teilnahme an verschiedenen nationalen und internationalen Konferenzen, bei denen ich meine Ergebnisse vorstellen konnte, ermöglichte.

Ganz besonders möchte ich mich bei \_\_\_\_\_ für seine stets sehr hilfreichen Diskussionen und die Unterstützung während meiner gesamten Zeit als Doktorandin bedanken. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch ganz herzlich bei meinem Kooperationspartner \_\_\_\_\_ bedanken, der durch seinen großen Beitrag, wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Meinen tiefen Dank möchte ich \_\_\_\_\_ aussprechen, der mir gerade zum Ende meiner Doktorarbeit mit seiner Hilfsbereitschaft, seinem Rat und hilfreichen Diskussionen sehr weitergeholfen hat, sowie \_\_\_\_\_ für seine Unterstützung bei der Strukturaufklärung der Zuckerstrukturen.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Kooperationspartnern \_\_\_\_\_ (Kernchemie) und \_\_\_\_\_ (Hautklinik), sowie auch \_\_\_\_\_ (Hautklinik) bedanken, ohne die ein Großteil dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich bedanke mich ganz besonders bei \_\_\_\_\_ für die hervorragende präparative Unterstützung, sowie für eine vertrauensvolle und gute Zusammenarbeit.

, und möchte ich für die Synthese und Bereitstellung der Polymersysteme, sowie für hilfreiche Diskussionen sehr danken. danke ich für die Unterstützung bei den Zeta Potential Messungen.

Meiner Auszubildenden möchte ich mich ebenfalls für ihre stete Freundlichkeit, ihren Fleiß und ihre große Hilfe im Labor danken. hat mich während meiner Zeit als Doktorandin persönlich sehr viel weiter gebracht, auch dafür bedanke ich mich.

Meinen Bachelorstudenten und , sowie meinen Modulantinnen und danke ich sehr herzlich für ihre gewissenhafte Arbeit und das sehr gute Arbeitsklima, das ich mit ihnen erleben durfte.

danke ich für seine stete Hilfsbereitschaft. Vor allem durch seine Hilfe bei technischen Problemen jeder Art hat er mich während dieser Zeit sehr Unterstützt.

Danken möchte ich , und für die sorgfältige und gewissenhafte Durchsicht von Teilen dieser Arbeit, sowie allen **ehemaligen** und **aktuellen Mitgliedern des Arbeitskreises** für die schöne gemeinsame Zeit und das hervorragende Arbeitsklima.

Mein tiefster Dank gilt **all meinen Freunden** und **meiner Familie**, die mich während der gesamten Zeit unterstützt haben und mit denen ich viele schöne Stunden in Mainz und Umgebung neben der Wissenschaft verbracht habe. Vor allem danke ich meinem **Ehemann** , der jederzeit für mich da war und mir während der Doktorarbeit die nötige Kraft zum Durchhalten gegeben hat!

Zuletzt möchte ich mich noch an allen anderen wenden, die mich oder meine Arbeit unterstützt haben und die ich vergessen habe zu erwähnen, und sagen: Vielen Dank!