



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Synthese und Charakterisierung zylindrischer Poly(2-oxazolin)bürsten als Nanocarrier für Drug Delivery Systeme

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Chemie

dem Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der
Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von

Jasmin Bühler

geboren in Neuwied

Mainz, Juni 2013

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der Promotion: 27.06.2013

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2010 bis Juli 2013 am Institut für Physikalische Chemie angefertigt.

Ich versichere, dass ich meine Doktorarbeit selbstständig verfasst und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, 27.05.2013

Inmitten der Schwierigkeiten liegt die Möglichkeit.

(Albert Einstein)

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Inspiziert durch natürlich vorkommende Peptide, sind Poly(2-oxazoline) vielversprechende Kandidaten für Anwendungen in Bereichen des kontrollierten Wirkstoff- bzw. Gentransportes, wie die moderne Biomedizin dies fordert. Da Polyoxazoline als strukturisomere Amide von natürlichen Polypeptiden aufgefasst werden können, zeigen diese synthetischen Polymere in direktem Vergleich erhebliche Vorteile etwa hinsichtlich Zytotoxizität und Effizienz, was wesentlich dazu beitragen kann, aktuelle Hürden biomedizinischer Fragestellungen hinsichtlich Transport und Targeting zu überwinden. Darüber hinaus sollten zylindrische Polymerbürsten aufgrund ihrer molekularen, architekturbedingten Formanisotropie und jüngsten Ergebnissen insbesondere zur formabhängigen Endozytose sehr aussichtsreiche Kandidaten für den Einsatz zum Wirkstofftransport sein.

Die vorliegende Arbeit widmete sich deshalb der Synthese und Charakterisierung von biokompatiblen zylindrischen Poly(2-oxazolin)bürsten als potentielle Nanotransporter von Wirkstoffen, Biomolekülen oder genetischem Material. Als Monomer wurde zunächst 2-Isopropylloxazolin gewählt, da das Polymer eine Phasenübergangstemperatur von 37 °C besitzt, was für Konjugatsynthesen wie auch diverse biomedizinische Applikationen interessant sein kann. Durch terminierende Methacrylamid Funktionalisierung der lebenden kationischen Oxazolinpolymerisation bzw. nachfolgende Endgruppen Transferreaktionen sind Makromonomere im Bereich 1000-5000 g/mol zugänglich. Erstmals gelang es so 2-Oxazolin basierte, hochmolekulare zylindrische Bürsten mit Konturlängen im Bereich von 250 nm mittels „Grafting Through“ Technik in freier radikalischer Polymerisation herzustellen.

Ausgehend von der entwickelten Syntheseroute konnten so neben Homo- und Blockcopolymerbürsten von 2-Ethyl-2-oxazolin und 2-Isopropyl-2-oxazolin auch Bürstenmoleküle aus statistischen Copolymeren von 2-Ethyl-2-oxazolin und unsubstituiertem 2-Oxazolin hergestellt werden. Während letztere die Einführung kationischer Gruppen durch selektivere Abspaltmethoden der Formylreste erlauben und so etwa DNA/RNA Komplexierungen ermöglichen können, bietet andererseits der in dieser Arbeit erstmalig demonstrierte Einsatz Azid-funktionalisierter Initiatoren zur kationischen Oxazolinpolymerisation unter Beibehaltung aller anderen sonstigen Reaktionsschritte auch die Möglichkeit der Synthese Azid-Endgruppen-funktionalisierter Makromonomere. Die „Grafting Through“ Methodik der freien radikalischen Makromonomer Polymerisation ist selbst bei diesen funktionalisierten Systemen von großem Vorteil, erlaubt sie auch hier den Zugang zu hochmolekularen Substraten mit einem Pfropfungs- bzw. Funktionalisierungsgrad von 100 %, da jede Seitenkette dieser zylindrischen Bürsten die aussenliegende, und damit sterisch leichter zugängliche funktionale Gruppe trägt. Dabei gelang es die Syntheseroute so zu gestalten, dass es möglich war alle vorgestellten Polymerbürsten mittels statischer und dynamischer Lichtstreuung hinsichtlich absoluter Molmasse und molekularer Dimension zu charakterisieren.

In weiteren Reaktionen konnten dann reaktive Fluoreszenzfarbstoffe mit Hilfe kupferfreier 1,3 dipolarer Addition (kupferfreie „Click-Chemie“) an die Azid-funktionalisierten Polymerbürsten angebunden werden, so dass eine wesentliche Voraussetzung für die Detektion in *in vivo* und *in vitro* Experimenten erfüllt werden kann. Darüber hinaus gelingt

die quantitative polymeranaloge Umsetzung der Azid- zu Aminogruppen durch eine polymeranalog geführte Reduktion nach Staudinger; damit können an diesen Systemen auch etablierte Konjugationstechniken an Aminogruppen durchgeführt werden. Zudem erlauben die Aminogruppen-haltigen Polymerbürsten durch Protonierung schon bei physiologischem pH die Komplexierung von DNA oder RNA.

Erste Lichtstreuungsmessungen in Blutserum zeigen im Falle der kationischen Aminogruppen tragenden Polymerbürsten zwar Aggregation, was aber durch entsprechende Umsetzung nach Konjugation wahrscheinlich unterdrückt werden kann, zeigen doch die entsprechenden Precursorpolymerbürsten mit Azidgruppen in Serum keinerlei Aggregation.

Zellaufnahmestudien in dendritische Zellen zeigen nur im Falle einer Azid-funktionalisierten Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste eine unspezifische Aufnahme. Die hydrophileren Poly(2-oxazolin)bürsten weisen keine unspezifische Aufnahme auf, was eine wichtige Anforderung für die Verwendung als Polymercarrier in der Krebsimmuntherapie ist.

Summary

The controlled delivery of genes and drug therapeutics are a vital aspect of modern medicine. Inspired by naturally occurring polypeptides, poly-(2-oxazoline)s are excellent candidates for applications in the field of drug and gene delivery as their structure is similar to natural polypeptides. These synthetic polymers thus offer potential advantages to overcome current obstacles in drug and gene therapeutics in terms of cytotoxicity and efficiency. Cylindrical polymer brushes have become increasingly popular because of their anisotropic character and the recent results on the shape dependent endocytosis.

Hence, this work focuses on the synthesis and characterization of biocompatible poly(2-oxazoline) brushes as potential nanocarriers for the delivery of drugs, genes and other biomolecules. As first monomer 2-isopropyl-2-oxazoline was chosen as it exhibits a lower critical solution temperature of 37°C which seems to be an interesting property for conjugations and different biomedical applications. Macromonomers in the range of 1000-5000 g/mol were obtained by termination of the living cationic oxazoline polymerization with a primary functionalization step and subsequent transfer reactions to end up with methacrylamide end group. For the first time high molecular weight cylindrical brushes with poly(2-oxazoline) side chains and a contour length of 250 nm were synthesized by grafting through.

According to the established synthesis route poly(2-oxazoline) homo and blockcopolymer brushes consisting of 2-ethyl-2-oxazoline and/or 2-isopropyl-2-oxazolin were prepared as well as brush polymers consisting of statistical copolymers of 2-ethyl-2-oxazolin and non-substituted 2-oxazoline. After selective cleavage of formyl rests the latter polymer brush offers imine units either for conjugation or after protonation for polyelectrolyte complexation. By the usage of azide functionalized initiators for the cationic oxazoline polymerization it is also possible to synthesize azide end group functionalized macromonomers, which can be polymerized by free radical polymerization too. Thus high molecular weight polymer brushes with a grafting and functional density of 100 % were obtained. Moreover the way of synthesis allows the characterization of all polymer brushes by static and dynamic light scattering in terms of absolute molecular weight and molecular dimensions. In further reactions the azide groups were utilized for dye labeling of the brushes by copper-free 1,3 dipolar addition (copper-free click-chemistry), which is an essential requirement for experimental *in vitro* and *in vivo* detection. In addition the polymer analogues Staudinger reduction of the azide end groups was successful, leading to amine end groups of each side chain, which offers a versatile route for conjugation reactions and provides cationic charges, even at physiological pH, for complex formation with DNA and siRNA.

First dynamic light scattering studies in human blood serum exhibit little aggregation of the amino end group functionalized brush polymers. Presumably the aggregation may be suppressed after appropriate conjugation reactions as the azid end group modified precursor brushes show nearly no aggregation in serum.

Cell studies show only for the pure azide-functionalized poly(2-isopropyl-2-oxazolin) an unspecific uptake into dendritic cells. In contrast, the more hydrophilic brushes are not unspecifically internalized. This is an important feature for the application as a polymeric carrier in cancer immunotherapy.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Motivation und Zielsetzung.....	3
2 Theoretische Grundlagen.....	6
2.1 Zylindrische Polymerbürsten als „haarige“ Nanoobjekte.....	6
2.1.1 Synthese zylindrischer Polymerbürsten.....	7
2.1.2 Formanisotropie: zylindrische und stäbchenförmige polymere Nanoobjekte im medizinischen Bereich.....	11
2.2 Poly(2-oxazolin)e.....	14
2.2.1 2-Oxazoline.....	14
2.2.2 Lebende kationische ringöffnende Polymerisation (LCROP).....	15
2.2.3 Thermoresponsive Poly(2-oxazolin)e.....	17
2.2.4 Poly(2-oxazolin)e als Polymertherapeutika: Ein Überblick.....	19
2.2.5 Poly(2-oxazolin) basierende Polymerbürsten.....	27
2.3 Kupferfreie Click-Chemie.....	30
3 Charakterisierungsmethoden.....	32
3.1 Gelpermeationschromatographie (GPC).....	32
3.2 MALDI-ToF Spektroskopie.....	34
3.3 UV-Vis Spektroskopie.....	36
3.4 Lichtstreuung.....	36
3.4.1 Statische Lichtstreuung.....	37
3.4.2 Dynamische Lichtstreuung.....	42
3.4.3 Das ρ - Verhältnis.....	45
3.4.4 Aufbau einer Lichtstreuapparatur.....	46
3.5 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR).....	47
3.6 Rasterkraftmikroskopie (AFM).....	50
3.7 Infrarot (IR)-Spektroskopie.....	52
3.8 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie.....	53
4 Ergebnisse und Diskussion.....	58
4.1 Synthese zylindrischer Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürsten.....	59
4.1.1 Synthese eines Methacrylatderivates zur Funktionalisierung linearer Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)en.....	59
4.1.2 Herstellung eines Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)makromonomers.....	61
4.1.3 Synthese und Charakterisierung zylindrischer Poly(2-isopropyl-2- oxazolin)bürsten.....	67
4.1.4 Phasenübergangstemperatur des PiPrOx-Makromonomers	

im Vergleich zur PiPrOx-Bürste.....	71
4.1.5 Moleküllkollaps der Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste im Bereich des Phasenübergangs.....	73
4.1.5 Zusammenfassung von Kapitel 4.1.....	74
4.2 Synthese, Charakterisierung und polymeranaloge Umsetzung Azid- funktionalisierter Poly(2-oxazolin)bürsten.....	76
4.2.1 Synthese eines Azid-funktionalisierten Initiators.....	76
4.2.2 Synthese Azid-funktionalisierter Poly(2-oxazolin)makromonomere.....	78
4.2.3 Synthese und Charakterisierung Azid-funktionalisierter zylindrischer Poly(2-oxazolin)bürste.....	83
4.2.4 Farbstoffmarkierung der zylindrischen N ₃ -Poly(2-oxazolin)bürsten mittels kupferfreier Click-Chemie.....	90
4.2.5 Polymeranaloge Umsetzung der Azid-Gruppen mittels Staudinger Reduktion.....	96
4.2.6 Phasenübergangsverhalten der Polymerbürsten in Abhängigkeit ihrer Funktionalisierung.....	100
4.2.7 Untersuchung des Aggregationsverhaltens der zylindrischen N ₃ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste mittels dynamischer Lichtstreuung.....	104
4.2.8 Aggregationsverhalten der Azid- und Amino-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten in humanem Serum.....	106
4.2.9 Zellaufnahmestudien der farbstoffmarkierten Azid- funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten in dendritische Zellen.....	111
4.2.10 Zusammenfassung des Kapitels 4.2.....	114
4.3 Synthese und Charakterisierung zylindrischer Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)bürsten.....	116
4.3.1 Synthese eines unsubstituierten 2-Oxazolin-Monomers.....	116
4.3.2 Synthese eines Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)makromonomers.....	119
4.3.3 Synthese und Charakterisierung einer zylindrischen Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)bürste.....	123
4.3.4 Abspaltung der Formylseitenketten der zylindrischen Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)bürsten.....	127
4.3.5 Zusammenfassung des Kapitels 4.3.....	131
5 Zusammenfassung und Ausblick.....	132
6 Material und Methoden.....	137
6.1 Synthesevorschriften.....	137
6.1.1 Synthese des N-Hydroxysuccinimidmethacrylsäureesters.....	137
6.1.2 Synthese des N-(6-Hydroxyhexyl)-methacrylamids.....	138
6.1.3 Synthese des 6-Methacrylamid-1-hexylchloroformiats.....	138
6.1.4 Synthese des 6-Azido-1-hexanols.....	139
6.1.5 Synthese des 6-Azido-1-hexyl-tosylats.....	139

6.1.6	Synthese des N-Hydroxyethylformamids.....	140
6.1.7	Synthese des N-(β -Chlorethylformamid)s.....	140
6.1.8	Ringschluss des N-(β -Chlorethylformamid)s zum 2-Oxazolin	141
6.1.9	Lebende kationische ringöffnende Polymerisation von 2-Isopropyl-2-oxazolin.....	141
6.1.10	Abspaltung der terminalen Boc-Schutzgruppe zur Herstellung eines Amino-endfunktionalisierten Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)s.....	142
6.1.11	Synthese des Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)makromonomers.....	143
6.1.12	Lebende kationische ringöffnende Polymerisation von 2-Oxazolinen mit Azid-funktionalisiertem Initiator.....	144
6.1.13	Synthese eines Azid-funktionalisierten Poly(2-ethyl-block-2-isopropyl-2-oxazolin)s via lebender kationischer ringöffnender Polymerisation.....	145
6.1.14	Abspaltung der terminalen Boc-Schutzgruppe der in 6.1.9 und 6.1.10 dargestellten Poly(2-oxazolin)e zur Herstellung eines Amino-endfunktionalisierten Polymers.....	146
6.1.15	Synthese der Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)makromonomere.....	146
6.1.16	Radikalische Polymerisation der Poly(2-oxazolin)makromonomere.....	147
6.1.17	Synthese eines Azid-funktionalisierten Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin) via lebender kationischer ringöffnender Polymerisation.....	148
6.1.18	Reduktion der Azid-Gruppen des Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)s mittels Staudinger Reduktion.....	149
6.1.19	Synthese eines Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)makromonomers.....	149
6.1.20	Abspaltung der Formylgruppen einer zylindrischen Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)bürste.....	150
6.1.21	Reduktion der Azid-Gruppen der Poly(2-oxazolin)bürsten mittels Tris(2-carboxyethyl)phosphin.....	150
6.1.22	Farbstoffmarkierung der Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten mit Hilfe von kupferfreier Click Chemie.....	151
6.2	Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel.....	152
6.3	Verwendete Geräte.....	154
6.3.1	GPC-Messungen.....	154
6.3.2	Statische und dynamische Lichtstreuungsmessungen.....	154
6.3.3	NMR-Messungen.....	155
6.3.4	UV/Vis und-Fluoreszenzspektroskopie-Messungen.....	155
6.3.5	dn/dc-Messungen.....	156
6.3.5	MALDI-ToF Messungen.....	156

6.3.6 AFM-Messungen.....	156
6.3.7 FCS-Messungen.....	156
6.3.8 IR-Messungen.....	157
7 Anhang.....	158
Abkürzungsverzeichnis.....	174
Literaturverzeichnis.....	176
Danksagung.....	186

1 Einleitung

Polymere begegnen uns heutzutage fast überall im alltäglichen Leben. Besonders im Bereich der Biomedizin steigt das Interesse an natürlichen und synthetischen Polymeren ganz erheblich. Das erste therapeutische Polymer-Konjugat wurde vor mehreren Jahrzehnten von H. Ringsdorf^[19] entwickelt, während Polymertherapeutika und Nanomedizin erst die letzten Jahre in den Focus der Wissenschaftler gerieten.^[20] Das Fehlen an effizienten Transportsystemen für makromolekulare Wirkstoffe, wie Proteine, Peptide oder Oligonukleotide ist eine Hürde die bei der rapiden Entwicklung der momentanen Forschung „bald überwunden“ wird.^[21]

In den Forschungsarbeiten der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass der Transport von Wirkstoffen unter Verwendung von polymeren Nanopartikeln zu einer Verbesserung der Pharmakokinetik, Biodistribution und der Stabilität bei *in vitro* und *in vivo* Experimenten führt.^[22-24] Daher besteht die Hoffnung, dass die Kopplung von Medizin und Polymerchemie langfristig ein hohes therapeutisches Potential besitzt, vor allem im Hinblick auf neue, weniger invasive Anti-Tumor-Therapien oder im Bereich der Gentransfektion.^[21]

Immer öfter werden statt natürlich auftretender Polymere auch synthetische Polymere in der Nanomedizin verwendet, da sie die Möglichkeit der Molekulargewichtskontrolle, die Addition von biomimetischen Funktionen sowie bioresponsiven Elementen ermöglichen.^[21] Die Polymere oder Biomaterialien für solche Wirkstofftransportsysteme müssen einer Vielzahl von Anforderungen gerecht werden. Neben einer geringen Toxizität und Immunogenizität, sind die effiziente Wirkstoffkopplung und Freisetzung sowie die gezielte Adressierung von großer Bedeutung. All dies erfordert eine gewisse Komplexität der Biomaterialien, wohingegen aus pharmazeutischer Sicht, die Polymertherapeutika so simpel wie möglich sein sollten.^[5] In dieser Hinsicht sind Poly(2-oxazolin)e eine interessante Polymerklasse. Neben ihrer Biokompatibilität und geringen Zytotoxizität^[25], ermöglicht die Art ihrer Synthese auch den Zugang zu komplexeren Topologien.^[26]

Nicht nur die chemische Struktur des Polymers spielt eine große Rolle, auch Anzahl und Dichte der Funktionalitäten, Größe, Form und Oberflächenbeschaffenheit sind entscheidende Faktoren bei der Frage der Effektivität eines Polymertherapeutikums.^[27] Die moderne Polymerchemie fokussiert immer mehr die Synthese von multivalenten, verzweigten oder gefropften Polymeren, Dendrimeren und dendronisierten sowie sternenförmigen Polymeren (Abbildung 1.1). Die Vorteile sind klar: definierte chemische Zusammensetzung, höhere Oberflächenfunktionalität und die Kreation definierter dreidimensionaler Strukturen.^[21]

Langfristig kann nur das Verständnis des Zusammenspiels von Polymerzusammensetzung und Architektur zu einem erfolgreichen und effizienten Polymertherapeutikum führen.^[27]

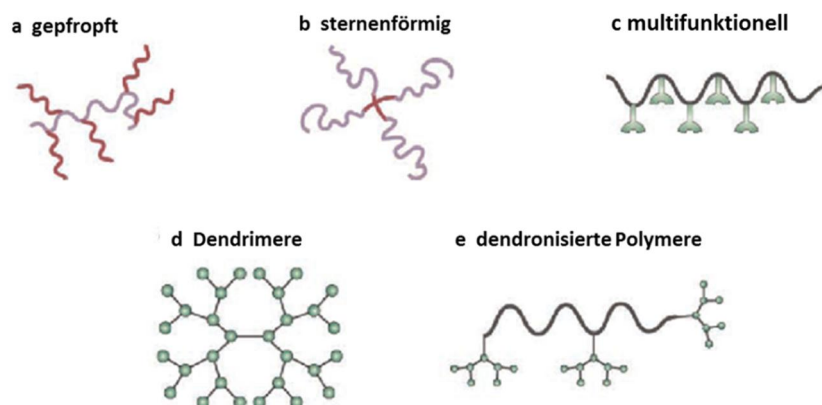


Abbildung 1.1: Neue Polymerarchitekturen für die Anwendung im Bereich der Polymertherapeutika

Die Darstellung von Systemen mit spezifischen, zielgerichteten und auch biologischen Funktionen ist noch immer eine der größten Herausforderungen aktueller chemischer Forschung. Neue, effizientere und vor allem hochselektive Reaktionen sowie Methoden, die den aufwendigen Einsatz von Schutzgruppen und komplexen Aufreinigungsschritten einer herkömmlichen Totalsynthese überwinden, sind die Reaktionen der Zukunft. In dieser Hinsicht scheinen die bioorthogonalen Reaktionen, die unempfindlich gegenüber den meisten funktionellen Gruppen in biologischen Systemen sind, die vielversprechendsten. Unter ihnen ist in letzter Zeit die Cu(I)-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen Aziden und Alkinen in den biomedizinischen Bereichen gefragt. Diese Art der Reaktion, der sogenannten „Click-Chemie“ zugeordnet, ermöglicht die spezifische und hocheffiziente

kovalente Anbindung von verschiedenen Molekülen durch eine Kohlenstoff-Heteroatom-Kohlenstoff Bindung in wässriger Lösung.^[28] Wegen der großen Toxizität von Kupfer und dem großen Aufwand der Reinigung zu Entfernung geringer Kupferspuren ist neben der Cu(I)-katalysierten „Click-Chemie“ mittlerweile auch die kupferfreie „Click-Chemie“ stark verbreitet und Bestandteil aktueller Forschung.^[29] Dabei handelt es sich um die Reaktion eines Azides mit einem cyclischen Oktinsystem, deren Reaktion ohne jegliche Katalyse schneller und effizienter zur 1,3-dipolaren Addition verläuft. In biologischen und medizinischen Anwendungsbereichen hat die kupferfreie „Click-Chemie“ auf Grund der Toxizität von Kupfer für Zellen und Organismen die Cu(I) katalysierte „Click Chemie“ fast vollständig abgelöst.^[6] Die kupferfreie „Click-Chemie“ stellt zum jetzigen Zeitpunkt eine der verbreitetsten bioorthogonalen Reaktionen dar und ist ein vielversprechender Kandidat für die Funktionalisierung von Polymertherapeutika.

1.1 Motivation und Zielsetzung

Der kontrollierte, zielgerichtete Transport von Genen und Wirkstoffen gerät immer mehr in den Fokus biomedizinischer Forschung. Die Synthese geeigneter Polymere für den effizienten Transport von Wirkstoffen, Genen oder Proteinen ist momentan ein intensiv bearbeitetes Thema biomedizinischer Polymerforschung. Eine der größten Hürden ist die Schwierigkeit alle an ein Polymertherapeutika gestellten Anforderungen in einem Multiparameter System zu vereinigen.

Poly(2-oxazolin)e scheinen ideale Polymere für Anwendungen im biomedizinischen Bereich zu sein, da zum einen die Art ihrer Synthese, die lebende kationische ringöffnende Polymerisation, schon das Einbringen von Funktionalitäten für spätere Modifikationen prinzipiell ermöglicht und zum anderen lässt ihre strukturelle Ähnlichkeit zu den natürlich vorkommenden Polypeptiden auf eine höhere Biokompatibilität hoffen.

Die bisherigen Forschungsarbeiten zeigen bereits, dass Poly(2-oxazolin)e eine geringe Zytotoxizität und hohe Biokompatibilität^[30,31] besitzen, was gute Voraussetzungen für die Anwendung im Bereich der Polymertherapeutika sind.

Auf Grundlage von 2-Oxazolinen sollen Bürstenpolymere hergestellt werden, die für die Anwendung in der Krebsimmuntherapie sowie zur Komplexierung von DNA und siRNA geeignet sind. Im Vergleich zu ihren linearen Analoga ermöglichen Polymerbürsten das Einbringen einer Vielzahl an funktionellen Gruppen, die für nachfolgende Formulierungen und Modifizierungen als Wirkstoffsysteme von erheblichem Vorteil sind. Außerdem zeigt sich immer mehr, dass es eine Abhängigkeit zwischen der Aufnahme von Nanopartikeln und ihrer Form gibt.^[32]

Dr. Frauke Kühn konnte beispielsweise in ihrer Dissertation zeigen, dass zylindrische, quaternisierte Polyvinylpyridinbürsten im Vergleich mit ihren linearen Analoga eine bessere Zellaufnahme und Transfektionseffizienz aufweisen.^[33]

Um sich einer allgemeinen Synthese- und Charakterisierungsstrategie zu nähern, soll zu Beginn eine Referenzpolymerbürste basierend auf 2-Isopropyl-2-oxazolin mittels „Grafting Through“ Technik dargestellt werden. Das Monomer 2-Isopropyl-2-oxazolin besitzt laut Literatur eine Phasenübergangstemperatur von 37°C^[34], was eine interessante Eigenschaft, für beispielsweise Untersuchungen des Moleküll kollaps im Bereich der Übergangstemperatur, sein könnte. Nach erfolgreicher Synthese soll diese Strategie übertragen werden, um funktionalisierte zylindrische Poly(2-oxazolin)bürsten darzustellen, die in zukünftigen Forschungsarbeiten mit verschiedenen Biomolekülen, wie Antikörper, Antigenen oder Proteinen modifiziert werden können. Die funktionelle Gruppe soll so gewählt sein, dass sie durch polymeranaloge Reaktionen modifiziert und in eine andere funktionale Gruppe umgewandelt werden kann, so dass diese einer effizienten Konjugationschemie zugänglich sind. Da die kationische Polymerisation den Einsatz starker Elektrophile als Initiatoren bedingt, muss jede Funktionalisierung eines Monomeren oder Initiators eine weitreichende Inertheit der Funktionalität gegen Elektrophile und Nukleophile garantieren, da ansonsten der lebende ionische Charakter der Polymerisation gefährdet wird bzw. verzweigte Strukturen resultieren würden. Andererseits bietet das lebende „kationisch wachsende“ Kettenende die Möglichkeit zur schnellen und effizienten terminalen Funktionalisierung mit entsprechenden Nukleophilen zum Makromonomer. Die nachfolgende radikalische Polymerisation der Makromonomere zum Bürstenpolymer verlangt aber zudem, dass radikalische Übertragungsreaktionen zu diesen funktionellen Gruppen nicht möglich sind. Darüber hinaus soll eine Funktionalisierung durch Protonierung oder Alkylierung es erlauben latente oder permanente kationische Ladungsträger zu

generieren, so dass der Zugang zu neuartigen kationischen Bürstenpolymeren möglich wird, die es auf Poly(2-oxazolin)basis mit all seinen Vorteilen gestatten auch DNA bzw. siRNA zu komplexieren.

Alle erhaltenen Polymerbürsten sollen mittels statischer und dynamischer Lichtstreuung sowie Rasterkraftmikroskopie charakterisiert werden. UV-Vis Spektroskopie sowie temperaturabhängige dynamische Lichtstremessungen sollen zur Untersuchung der thermoresponsiven Polymerbürsten verwendet werden. Um erste Eindrücke über das Verhalten der dargestellten Polymerbürsten in einem biologisch relevanten Medium zu erhalten, wird, nach einer Methode ^[35,36], die in der Arbeitsgruppe von Prof. M. Schmidt etabliert wurde, das Aggregationsverhalten der Bürstenpolymere in humanem Blutserum analysiert.

Abschließend sollen die Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten hinsichtlich ihrer unspezifischen Zellaufnahme in dendritische Zellen getestet werden. Für eine Anwendung in der Krebsimmuntherapie ist es wichtig, dass die verwendeten Polymere keine unspezifische Zellaufnahme zeigen, da man die Zellen spezifisch, über beispielsweise die Anbindung eines Antikörpers an ein Carrierpolymer, adressieren möchte.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Zylindrische Polymerbürsten als „haarige“ Nanoobjekte ^[1]

Zylindrische Polymerbürsten ^[2] sind einzigartige Makromoleküle, deren Architekturen und die daraus resultierenden Eigenschaften sowohl experimentell als auch theoretisch interessant sind. Die Architektur von Polymerbürsten variiert von dicht oder lose grafted, flexiblen oder starren Seitenketten und Rückgrat bis hin zu Homo- oder Copolymeren. Jede dieser strukturellen Variablen hat Auswirkungen auf die Eigenschaften der Bürsten, dennoch ist es die Grafting Dichte, die den größten Einfluss auf Konformation und Topologie hat. Eine hohe Pfropfdichte ermöglicht die entropisch nicht bevorzugte Elongation des Rückgrats und damit verbunden eine Formanisotropie (WLC).^[37] Auf Grund ihrer Struktur werden zylindrische Polymerbürsten auch molekulare Flaschenbürsten genannt.^[38] Diese einzigartige Struktur ermöglicht neue Anwendungsmöglichkeiten wie beispielsweise als Sensoren ^[39], Elastomere ^[40] oder Template für Nanowires.^[41]

Flaschenbürsten werden auch in der Natur speziell im menschlichen Organismus gefunden. Proteoglykane ^[42], sind bürstenähnliche Polyelektrolyte, die aus einem Proteinrückgrat und Kohlenhydrat-Seitenketten bestehen.^[37] Sie befinden sich an unterschiedlichen Stellen im Körper und üben verschiedenste Funktionen aus, von Signaltransduktion über Schutz der Zelloberfläche bis hin zur Säuberung der Lunge. ^[43-45] Es wird angenommen, dass ihre funktionellen Eigenschaften aus ihrer Bürstenstruktur resultieren, die eine sehr dichte Packung funktioneller Gruppen ermöglicht (Abbildung 2.1.1).

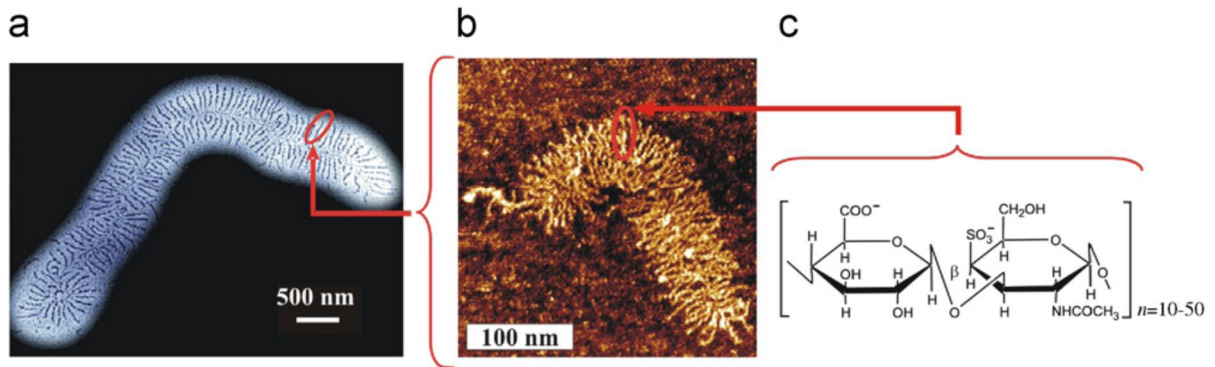


Abbildung 2.1.1: Struktur eines Proteoglykanaggregats im Knorpelgewebe ^[46]

a) Transmissionselektronenmikroskopische Abbildung des Aggregats, b) Proteinrückgrat mit Glukosaminoglycan-Seitenketten, c) Chemische Struktur des Disaccharides der Wiederholungseinheit der Seitenkette

2.1.1 Synthese zylindrischer Polymerbürsten ^[2,3]

Im Allgemeinen gibt es drei verschiedene Methoden zur Synthese von zylindrischen Polymerbürsten mit dicht gepfropften Seitenketten. Abbildung 2.1.2 zeigt die drei verschiedenen Ansätze „Grafting Through“, „Grafting Onto“ und „Grafting From“.

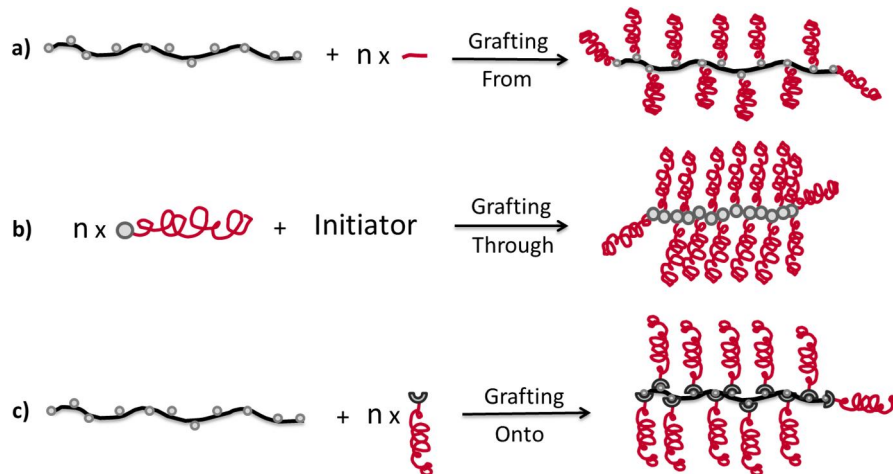


Abbildung 2.1.2: Schematische Darstellung der verschiedenen Methoden zur Synthese von zylindrischen Bürsten. a) Grafting From; b) Grafting Through; c) Grafting Onto

a) Grafting From

Die Grafting-From Methode basiert auf dem Wachstum der Seitenketten von Initiatorgruppen aus, die an das Polymerrückgrat gebunden sind. Mit Hilfe dieser Technik können wohldefinierte zylindrische Bürsten mit hoher Pfropfdichte erhalten werden. Dabei wird zuerst das Rückgrat der Polymerbürste mittels verschiedener kontrollierbarer Polymerisationstechniken synthetisiert und mit Initiatorgruppen funktionalisiert, die im weiteren Schritt die Polymerisation der Seitenketten initiieren. Ein bekanntes System besteht aus einem Poly(hydroxyethylmethacrylat)-Rückgrat, das mit Bromo-iso-Buttersäurebromid funktionalisiert wird. Durch „Atom Transfer Radical Polymerization“ (ATRP) der Monomereinheiten an den Bromid-funktionalisierten Enden findet die Polymerisation der Seitenketten statt. ^[47,48] Da die ATRP eine Form der radikalischen Polymerisation darstellt, ist sie tolerant gegenüber vielen in Monomeren enthaltenen funktionellen Gruppen und ermöglicht die Synthese von Polymerbürsten mit verschiedenen Funktionalitäten. Des Weiteren können durch sequentielle Zugabe von Monomeren Kern-Schale Strukturen erhalten werden. Eine weitere bekannte Methode ermöglicht die Synthese von Polypeptidbürsten. Sie beruht auf einem aminofunktionalisiertem Rückgrat, an dem die ringöffnende Polymerisation von Leuchs'schen Anhydriden initiiert wird. ^[49,50] Die Verwendung von blockcopolymeren Makroinitiatoren mit nur einem funktionalisierten Block ermöglicht die Synthese von „rod-coil“ Polymeren, die durch Selbstorganisation supramolekulare Strukturen ausbilden können. ^[51]

Ein Vorteil dieser Methode ist die separate Synthese des Rückgrats, da die Länge bzw. die Polydispersität der Hauptkette kontrolliert werden können. Nachteil der Methode ist, dass keine 100%ige Pfropfdichte der Seitenketten erreicht und keine exakte Aussage über die Pfropfdichte getroffen werden kann, es sei denn die Seitenketten könnten abgespalten werden. Die Pfropfdichte von Bürsten, die nach dieser Technik erhalten werden variiert zwischen 30% bis 90%. ^[52,48] Weiter ist von Nachteil, dass keine unabhängige Analyse der Seitenketten stattfinden kann. Daher ist es schwierig die mittlere Länge der Seitenketten zu ermitteln. Dies ist nur möglich, wenn die Grafting Dichte, das Molekulargewicht und die mittlere Anzahl der Monomereinheiten des Rückgrats unabhängig bestimmt werden können.

b) Grafting Through

Die „Grafting Through“-Technik wird schon seit mehr als zwei Jahrzehnten zur Synthese von zylindrischen Polymerbürsten angewendet.^[53] Durch Polymerisation von Makromonomeren werden Polymerbürsten mit einer extrem hohen Pfropfdichte erhalten. Im Jahr 1989 synthetisierte Tsukahara^[53] die ersten Bürsten mit Hilfe dieser Methode. Durch radikalische Polymerisation von Styrolmakromonomeren mit einer terminalen Vinylgruppe wurden Bürsten mit einer hohen Graftingdichte erhalten. In der Regel werden die Oligomere durch lebende Polymerisationen hergestellt, da diese eine hohe Kontrolle über die Länge des Oligomers bietet und meist mit einer geringen Polydispersität verbunden ist. Auch die Herstellung von Blockstrukturen ist durch die lebenden Polymerisationstechniken gegeben. Generell ist es schwierig Polymakromomere mit einem hohen Polymerisationsgrad zu synthetisieren, da die Konzentration der polymerisierbaren Gruppen meist gering ist und die Sterik der Seitenketten zunehmend eine Hinderung darstellt. Bis jetzt war es nur mit Hilfe der radikalischen Polymerisation in stark konzentrierten Makromonomerlösungen^[38,53-56] möglich, Bürsten mit einem wesentlich höheren Polymerisationsgrad der Hauptkette im Vergleich zur Seitenkette darzustellen. Versuche mittels anionischer^[57], kationischer^[58] oder „Atom Transfer Radical Polymerization“^[59] zylindrische Bürsten zu synthetisieren scheiterten aufgrund des geringen Polymerisationsgrades des Rückgrats. Wie oben erwähnt kommt es bei der radikalischen Polymerisation meist zu einer sterischen Hinderung. Eine Alternative zu der radikalischen Polymerisation ist die ring-öffnende Methathese Polymerisation (ROMP) von beispielsweise Norbornenyl Makromonomeren.^[60] Gnanou und seine Mitarbeiter verwendeten dieses System erfolgreich, indem sie aus Norbornenyl-terminiertem Poly(ethylenoxid)^[61] mittels ROMP molekulare Bürsten synthetisierten. Auch Grubbs verwendete die Technik der ringöffnenden Methathese Reaktion um zyklische Nanostrukturen aus dendronisierten Makromonomeren herzustellen.^[62]

Vorteile dieser Methode sind die 100%ige Pfropfdichte der Bürste und die Möglichkeit die Seitenketten zuvor separat zu charakterisieren. Da bei der „Grafting Through“ Technik hauptsächlich die radikalische Polymerisation zur Herstellung von Bürsten verwendet wird, ist es vergleichsweise einfach möglich Kern-Schale Strukturen zu erhalten. Diese können durch Verwendung eines Blockmakromonomers bzw. durch die Polymerisation einer Mischung aus verschiedenen Makromonomeren realisiert werden.^[63]

Von großem Nachteil sind hingegen die geringe Größenkontrolle der Bürsten und die unvollständige Umsetzung, die mit der radikalischen Polymerisation assoziiert sind. Meist haben die erhaltenen Polymerbürsten eine vergleichsweise breite Verteilung. Folglich müssen die Polymakromonomere fraktioniert und nicht umgesetztes Makromonomer abgetrennt werden.

c) Grafting Onto

Bei der „Grafting Onto“ Methode werden Rückgrat und Seitenkette separat synthetisiert. Durch Konjugation End-funktioneller Gruppen der Seitenketten mit funktionellen Gruppen am Rückgrat werden zylindrische Bürsten erhalten. Bis jetzt basiert die „Grafting Onto“ Technik auf der lebenden anionischen Polymerisation der Seitenketten, die durch Zugabe eines Rückgrats mit elektrophilen Gruppen zu einer Bürste oder sternförmigen Nanostrukturen, abhängig von der Länge der Hauptkette, verbunden werden. Ein bekanntes System besteht aus der Kupplung von Polystyrollithium Seitenketten an ein Poly(2-chlorethylvinylether)rückgrat.^[64,65] Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung der „Click-Chemie“. Matyjaszewski et al. synthetisierten zylindrische Polymerbürsten, indem sie ein Azid-funktionalisiertes Poly(ethylenglykol) mit einem Alkin-funktionalisiertem Polymethacrylat reagieren ließen.^[66]

Durch die Verwendung von Blockcopolymeren als Seitenketten ist es mit dieser Technik ebenfalls möglich Kern-Schale Strukturen zu erhalten. Auch rod-coil-Nanostrukturen können dargestellt werden, wenn das Rückgrat aus einem Blockcopolymer mit nur einem funktionalisierten Block besteht.^[67]

Ein neuerer Ansatz zu Synthese von zylindrischen Bürsten beruht auf der „Grafting Onto“ Methode durch nicht kovalente Wechselwirkungen. Hierbei werden die Bürstenstrukturen durch sekundäre Interaktionen wie Wasserstoffbrücken^[68] oder ionische^[69] Wechselwirkungen erhalten, jedoch handelt es sich dabei eher um Surfactant-Komplexe, man kann also nicht von hochmolekularen Bürstenstrukturen sprechen. Der größte Vorteil dieser Methode ist das unabhängige Design der Seitenketten und des Rückgrats, um wohl definierte polymere Bürsten zu erhalten. Besonders die gleichzeitige Kontrolle über die Polydispersität der Haupt- und Seitenkette stellt einen Vorteil gegenüber den andern beiden

Techniken dar, bei denen entweder die Polydispersität der Seitenkette oder Hauptkette kontrolliert werden können.

Nachteilig ist die geringe Pfropfdichte der Polymerbürsten, die aus kinetischen und thermodynamischen Gründen limitiert ist. Durch die zunehmende Pfropfdichte während der Kopplung und der damit verbundenen zunehmenden sterischen Hinderung verringert sich die Diffusion der Seitenketten zu den reaktiven Gruppen an der Hauptkette. Des Weiteren ist die Kopplung von Seitenketten an eine Bürste mit einer hohen Pfropfdichte entropisch ungünstig, da die Konformation der Hauptkette von Random Coil in eine gestrecktere Konformation wechseln muss. Um eine hohe Graftingdichte zu erhalten ist ein Überschuss an lebenden Seitenketten erforderlich. Die nicht reagierten Seitenketten müssen dann abgetrennt werden, was ein weiterer Nachteil dieser Methode darstellt. Wie bei der „Grafting From“ Methode ist es auch hier sehr schwierig die exakte Pfropfdichte der Bürste zu bestimmen.

2.1.2 Formanisotropie: zylindrische und stäbchenförmige polymere Nanoobjekte im medizinischen Bereich

Die Nanomedizin ist ein Gebiet das in den letzten Jahrzehnten die Aufmerksamkeit vieler Forscher und Forschungsgruppen erhalten hat. Die Problematik herkömmlicher niedermolekularer Wirkstoffsysteme liegt neben der glomerulären Eliminierung auch in der unspezifischen Verteilung im Körpergewebe. Daher wird eine erhöhte Wirkstoffkonzentration benötigt, die in einer erhöhten Toxizität resultiert.^[35]

Zum jetzigen Zeitpunkt steht die Synthese von Nanopartikeln, - carrier oder – vesikeln, die zum Wirkstofftransport eingesetzt werden können im Fokus. Die Ansprüche an ein solches System sind sehr hoch, da es darum geht den menschlichen Körper zu überlisten. Einige Anforderungen sind beispielsweise eine geringe Toxizität, lange Zirkulationszeiten im Organismus, erfolgreiche Zellaufnahme, gezielte Adressierung an bestimmte Zellen (z.B. Tumorzellen), effiziente Wirkstoffkopplung, Freisetzung des Wirkstoffes sowie eine geringe Immunogenizität. Somit sollte ein Nanopartikel neben seiner Biokompatibilität Funktionalitäten zum Anbringen von verschiedensten Molekülen besitzen, um diesen Ansprüchen gerecht zu werden. Herkömmliche lineare Nanopartikel weisen meist nur

wenige Funktionalitäten auf, die sterisch nur schwierig zu erreichen sind. Zylindrischen Polymerbürsten, wie sie auch in dieser Arbeit synthetisiert werden, besitzen an jedem Seitenkettenende einen Terminus, der eine Funktionalisierung tragen kann. Durch die Abstoßung der benachbarten Ketten sind diese Enden an der Oberfläche der Bürste lokalisiert und sterisch einfach für weitere Funktionalisierungen erreichbar.^[1] Die Polyfunktionalität der Polymerbürsten ermöglicht das simultane Anbringen von verschiedenen Molekülen, angefangen von Farbstoffen, die in frühen Stadien der Forschung unverzichtbar sind, bis hin zu Wirkstoffen, Adressierungsmolekülen oder Stoffen, die die Biokompatibilität steigern. So könnten polyfunktionelle Polymerbürsten die Synthese eines „perfekten“ Nanocarriers ermöglichen.

Aber nicht nur die Funktionalisierung und Biokompatibilität des Nanopartikels oder des Polymernanoobjektes spielen eine entscheidende Rolle, sondern auch Form, Größe und Oberflächenbeschaffenheit. Vor allem bei der Zellaufnahme sind dies entscheidende Kriterien.^[27] Bis heute wurden viele Forschungsarbeiten zu Größe und Oberflächenbeschaffenheit veröffentlicht. Diese Arbeiten beschäftigen sich hauptsächlich mit sphärischen Partikeln. Ein Verständnis für den Einfluss der Form solcher Nanoobjekte fehlt noch weitestgehend.^[27] Arbeiten aus den letzten Jahren zeigen, dass auch anisotrope Partikel mit zylindrischen oder stäbchenförmigen Strukturen Vorteile gegenüber ihren sphärischen Analoga besitzen.^[70,71] Discher und Mitarbeiter berichten über wurmartige Mizellen für den Transport des Antitumorwirkstoffes Paclitaxel.^[32] In dieser Arbeit werden wurmartige Mizellen und sphärische Mizellen aus Poly(ethylenglykol)-Block-Poly(ϵ -caprolacton) in Bezug auf ihre Zirkulationszeiten, Wirkstoffbeladung und Toxizität verglichen. Die wurmartigen Mizellen zeigten *in vivo* Blutzirkulationen von bis zu einer Woche, was länger ist als für die meisten bekannten Partikel. Die wurmartige Mizelle kann in gewissem Sinne auch mit einem Filovirus verglichen werden, der auch längere Zeit im menschlichen Körper zirkulieren kann. Die wurmartigen Mizellen werden daher auch Filomizellen genannt. Neben der erhöhten Zirkulationszeit können die Filomizellen mit doppelt so viel Paclitaxel beladen werden als die sphärischen Mizellen. Ein weiterer Vorteil von anisotropen Partikeln verglichen mit sphärischen ist die geringe Erkennung durch Makrophagen. Makrophagen sind Zellen des Immunsystems die fremde Partikel erkennen und aufnehmen. In einer Studie von J.Champion wird die Aufnahme von wurmartigen Polystyrolpartikeln in Makrophagen

mit sphärischen verglichen.^[71] Durch Adsorption des IgG Antikörpers an beide Formen der Polystyrolpartikel wurde die Erkennung durch Makrophagen sichergestellt. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass sphärisch Partikel mehr als dreimal so oft von Makrophagen internalisiert wurden als zylindrische Teilchen. Durch die größere Oberfläche des wurmartigen Partikels kann dieser viel besser mit der Zelloberfläche wechselwirken und an der Zelloberfläche der Makrophage adsorbieren (Abbildung 2.1.3).

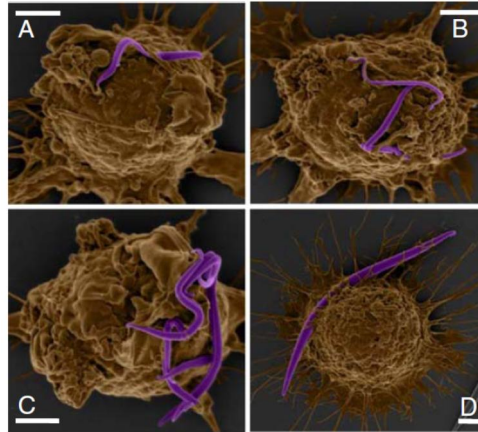


Abbildung 2.1.3: Scanning Elektronen Mikroskopie: Zeigt die Adsorption von wurmartigen Partikeln an eine Makrophage^[71]

Bisher wurde auf die Form der Partikel eingegangen. Jedoch ist ein weiterer Vorteil von molekularen Polymerbürsten zum einen der hohe Funktionalisierungsgrad, der durch die Seitenketten eingeführt werden kann und zum anderen die hohe Dichte an Seitenketten, die Polymerbürsten normalerweise besitzen. De Simone^[72] und Mitarbeiter berichten über Nanopartikel unterschiedlicher Poly(ethylen glykol) (PEG) Dichte der Corona. Abhängig von dem Grad der PEGylierung nehmen die am Nanopartikel angebrachten PEG-Ketten unterschiedliche Konformationen ein. Bei einer geringen PEG-Dichte spricht man von der „Mushroom“-Konformation, bei einer hohen Dichte an PEG-Ketten handelt es sich um eine „Bürsten“-Konformation (Abbildung 2.1.4).

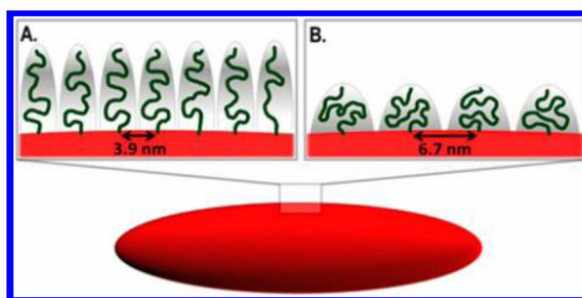


Abbildung 2.1.4: Schematische Darstellung des mit PEG funktionalisierten Nanopartikels .

A) Bürstenkonformation und B) „Mushroom-Konformation“ ^[72]

Die Partikel in der Bürstenkonformation zeigten eine wesentlich geringere Proteinadsorption und geringere Makrophagenaufnahme und somit eine höhere Zirkulationszeit im Blut. Dieses Erkenntnis kann auf zylindrische Bürsten übertragen werden sofern die Seitenketten sich ähnlich verhalten wie PEG. Die in dieser Arbeit verwendeten Poly(2-oxazolin)e zeigen bezüglich der Proteinadsorption aus biologischen Medien ein ähnliches Verhalten und werden schon jetzt als Alternative zu PEG angesehen. ^[20]

2.2 Poly(2-oxazolin)e

2.2.1 2-Oxazoline

Oxazoline sind 5-gliedrige heterozyklische Verbindungen mit einer Iminoether Bindung. Es gibt drei strukturisomere Oxazolin Klassen mit unterschiedlicher Position der Doppelbindung. Unter ihnen wurden 2-Oxazoline bisher am meisten erforscht und werden am häufigsten verwendet.

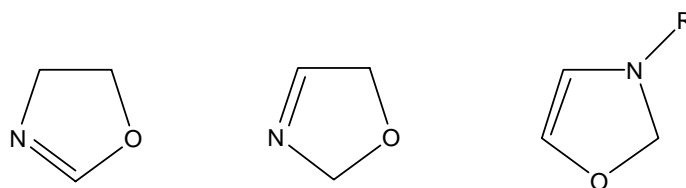


Abbildung 2.2.1: 2-Oxazolin, 3-Oxazolin und 4-Oxazolin (von links nach rechts)

2.2.2 Lebende kationische ringöffnende Polymerisation (LCROP) ^[4]

Durch ringöffnende Polymerisation wird das zyklische System der 2-Oxazoline geöffnet und Polypeptid-analoge Polymere können erhalten werden. 1966 berichteten Kagiya et al. zum ersten Mal von der ringöffnenden Polymerisation der 2-Oxazoline.^[73] Es wurde gezeigt, dass bei der lebenden kationischen Polymerisation von 2-Oxazolinen kaum unerwünschte Terminierungsschritte sowie Abbruch durch Kettenttransfer stattfinden. Durch Forschungsarbeiten in den darauffolgenden Jahrzehnten konnte gezeigt werden, dass der Kettenwachstumsmechanismus entweder kationisch oder kovalent ist abhängig vom gewählten Initiator. Verwendet man kationische Initiatoren wie Methyltriflate, ist die Polymerisation kationisch. Da die kationische Wachstumsspezies des Oxazoliniumsalzes stabil ist, wurde diese Methode daher auch häufig zur Darstellung von Blockcopolymeren oder end-funktionalisierten Polymeren verwendet. Ist der Initiator etwas mehr nukleophiler, wie beispielsweise *p*-Toluolsulfonat oder Alkylhalogenide, verlangsamt sich die Polymerisation und findet über einen anderen Mechanismus statt, den „Kovalenten Mechanismus“.

In Abbildung 2.2.2 ist der allgemeine Mechanismus der lebenden kationischen ringöffnenden Polymerisation gezeigt.

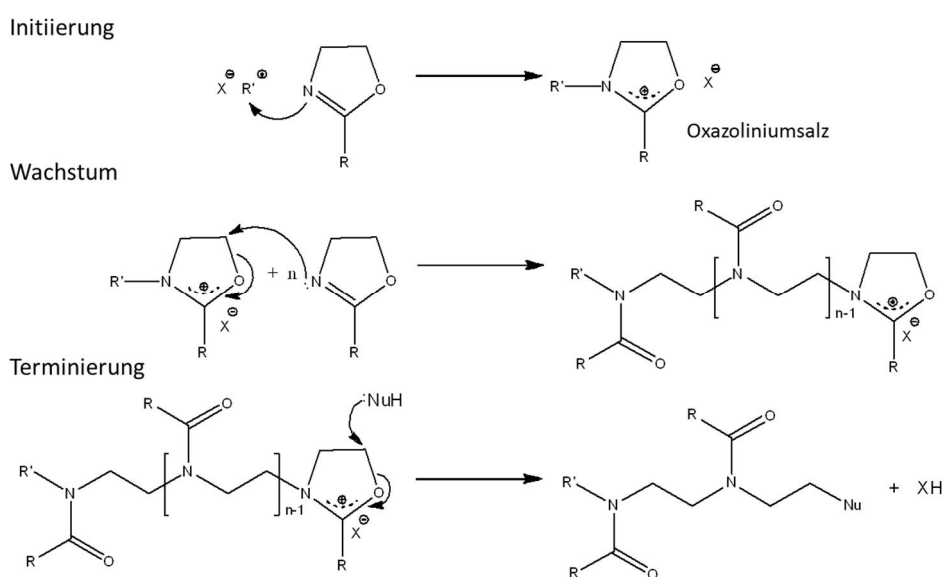


Abbildung 2.2.2: Mechanismus der lebenden kationischen ringöffnenden Polymerisation der 2-Oxazoline

Bei der Initiation mit Elektrophilen wie Lewis oder Brönsted Säuren geht der nukleophile Stickstoff des 2-Oxazolin Rings in ein Oxazoliniumkation über. Der resultierende Oxazoliniumring kann dann mit einem weiteren 2-Oxazolin unter Ringöffnung reagieren und eine lineare Amidstruktur wird gebildet. Dieser Prozess kann weitergeführt werden bis das Monomer aufgebraucht oder ein nukleophiles Terminierungsreagenz die Polymerisation beendet. Durch Erhöhen der Nukleophilie des Initiator-Gegenions und des Monomers wird angenommen, dass sich der ionische Charakter der LCROP verringert. Mit Gegenionen der nicht nukleophilen Trifluoromethylsulfonate (Triflate, OTf) ist die wachsende 2-Oxazolin Spezies das Kation und die Wachstumsrate steigt signifikant.^[74] Methyltrifluorsulfonate sind viel verwendete Initiatoren und besitzen viele Vorteile in der LCROP. Durch ihre hohe Reaktivität reagieren sie sogar schon unter Raumtemperatur schnell mit 2-Oxazolin und das Wachstum kann bei Temperaturen über 40°C starten. Um definierte Polymere mit einer engen Verteilung zu erhalten ist eine schnelle und quantitative Initiierung im Hinblick auf das Wachstum erforderlich. Die sofortige Initiierung sowie dieselbe sterische und elektrostatische Beschaffenheit von Oxazoliniumtriflatsalz und wachsendem Kettenende ermöglichen die Synthese von Poly(2-oxazolin)en mit einer geringen Polydispersität. ($M_w/M_n \sim 1.02-1.20$)

Trotz des ausgeprägt lebenden Charakters sind Nebenreaktionen möglich wie beispielsweise Kettentransferreaktionen, die hauptsächlich bei Temperaturen über 120°C stattfinden und bei geringen $[M_0]/[I_0]$ Verhältnissen deutlich an Bedeutung gewinnen.^[75,76]

Durch den lebenden Charakter der 2-Oxazolin Polymerisationen können verschiedene Architekturen, Zusammensetzungen, Co- und Blockcopolymere sowie Seitenketten- und Endfunktionalisierungen erhalten werden. Die Polypeptid-ähnlichen Polyamide haben daher ein breites Spektrum an möglichen Anwendungen. In den letzten Jahrzehnten gab es immer mehr Forschungsarbeiten zur Anwendung im biomedizinischen Bereich. Durch ihre Biokompatibilität scheinen sie auch mögliche Kandidaten für Drug und Gene Delivery Systeme zu sein.^[77,78] Wasserlösliche Poly(2-oxazolin)e mit einer „Lower Critical Solution Temperatur“ (LCST) ^[79,80] ermöglichen Anwendungen im Bereich der thermoresponsiven bzw. sogenannten „smarten“ Materialien.

2.2.3 Thermoresponsive Poly(2-oxazolin)e

Polymere die eine abrupte physikalische oder chemische Änderung aufgrund eines externen Stimulus aufweisen zählen zu den stimuliresponsiven Polymeren. Physikalische Stimuli bewirken einen Wechsel in den intermolekularen Wechselwirkungen und werden durch Temperatur, elektrische oder magnetische Felder sowie mechanischen Stress ausgelöst. Unter chemischen Stimuli versteht man Änderungen des pH-Wertes oder der Ionenstärke, die Änderungen in den Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten oder der Polymerketten und der Lösungsmittelmoleküle bewirken. Dieses Verhalten von polymeren Systemen ist sehr nützlich für Anwendungen in Bereich des Wirkstofftransportes. ^[81,82]

Hydrophile Polymere mit einer sogenannten „Lower critical solution Temperatur“ (LCST) werden durch ihre reversible Eigenschaft zunehmend interessanter. ^[83] Diese Polymere sind unterhalb ihrer LCST in Wasser durch Ausbilden von Wasserstoffbrückenbindungen löslich. Durch Erhöhung der Temperatur verstärken sich die hydrophoben intra- und intermolekularen Wechselwirkungen und der Beitrag der Wasserstoffbrücken zur Solvation wird vermindert. Liegt die Temperatur über der LCST dehydratisiert das Polymer und wird unlöslich (Abbildung 2.2.3). Die hydrophoben Wechselwirkungen werden nun entropisch begünstigt, da die Wassermoleküle, die aus dem ursprünglichen solvatisierten Zustand freigesetzt werden, einen Entropiegewinn des Gesamtsystems bewirken.

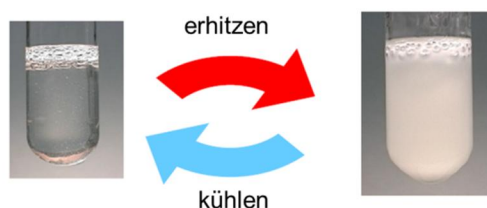


Abbildung 2.2.3: Thermo-responsives Polymer in Wasser unter (links) und über (rechts) seiner LCST

Mit Hilfe von strukturellen Veränderungen wie Molekulargewicht ^[84,85] Endgruppen ^[85,86] oder molekulare Struktur kann ^[87] die LCST variiert werden. Die Phasenübergangstemperatur wird durch Einbringen von hydrophoben Gruppen oder durch Erhöhen des Molekulargewichts erniedrigt.

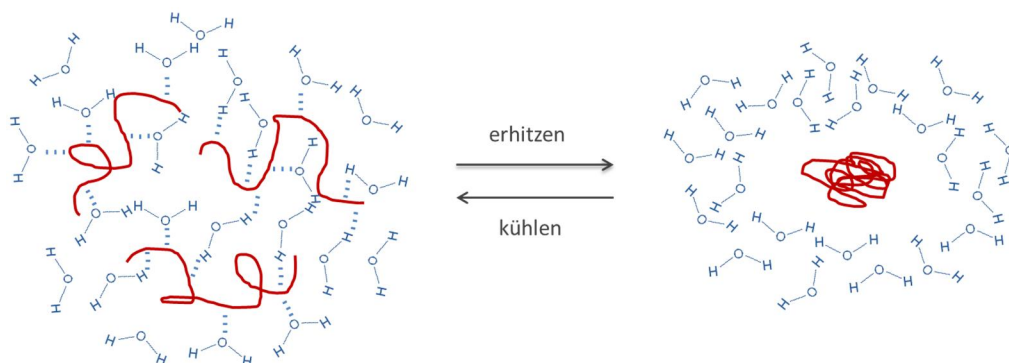


Abbildung 2.2.4: Schematische Darstellung der reversiblen temperaturabhängigen Löslichkeit linearer Polymere. links: hydratisiertes Polymer unterhalb der LCST und rechts: Einzelmoleküllkollaps und intermolekulare Aggregation durch den Wasserverlust oberhalb der LCST.

1988 berichten Kwei und Mitarbeiter erstmals von einer Thermosensitivität bei wässrigen Poly(2-ethyl-2-oxazolin) (PEtOx) Lösungen.^[88] Der Phasenübergang ist dabei abhängig von der Polymerkonzentration und wurde für PEtOx zwischen 61-64°C gefunden, je nach Molekulargewicht (20-500 kDa). Poly(2-ethyl-2-oxazolin)e mit einem Molekulargewicht unter 10 kDa scheinen keine Übergangstemperatur zu besitzen^[89], was jedoch durch Einbringen beispielsweise einer hydrophoben Endgruppe verändert werden kann. Durch Zugabe von Natriumchlorid kann die LCST von PEtOx soweit abgesenkt werden, dass es ausgesalzt werden kann, eine Zugabe von Tetrabutylammoniumbromid bewirkt das Gegenteil, eine Erhöhung der LCST.^[88] Kobayashi und Mitarbeiter führten 1992 Poly(2-isopropyl-2-oxazolin) (PiPrOx) als thermoresponsives Polymer mit einer LCST zwischen 36°C und 39°C ein.^[34] Kataoka et al. berichten über n-Propyloxazolin Polymere (PnPrOx), die eine LCST von 24°C besitzen.^[90] PiPrOx und PnPrOx sind Strukturisomere (C₆H₁₁NO) und potentielle Alternativen zu Poly(N-isopropylacrylamid) (PNIPAM), welches eine LCST von 32°C hat und als „Gold Standard“ unter den LCST Polymeren angesehen wird, besonders im biomedizinischen Bereich.^[91]

Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass bei der Klasse der Poly(2-oxazolin)e (POx) ein breiter LCST Bereich abgedeckt werden kann. Kataoka und Mitarbeiter berichteten ebenfalls von Gradientencopolymeren bestehend aus iPrOx und EtOx, die je nach Anteil an EtOx eine Übergangstemperatur zwischen 39°C und 67°C besitzen. Die LCST steigt linear mit dem Anteil an EtOx an.^[92] Durch Copolymerisation von iPrOx mit verschiedenen 2-Alkyl-2-oxazolinen kann ein großer Übergangsbereich zwischen 9°C und 75°C abgedeckt werden.^[93]

Die Phasenübergangstemperaturen hängen nicht nur von der Zusammensetzung des jeweiligen Polymers ab, sondern auch vom Polymerisationsgrad oder der Struktur.^[94] So besitzen beispielsweise gepfropfte Copolymere oder molekulare Büsten mit einem Polymethacrylat- oder Polymethacrylamidrückgrat eine geringere LCST als ihre zugehörigen linearen Polymere.^[95]

Bestimmte Poly(2-oxazolin)e besitzen eine „Upper Critical Solution Temperatur“ (UCST). Die UCST von Polymeren hängt vom Druck, Polymerisationsgrad sowie der Polydispersität ab. Poly(2-phenyl-2-oxazolin) (PPhOx) beispielsweise zeigt eine UCST in Ethanol.^[96] Die Zugabe von Wasser erhöht die Löslichkeit des PPhOx, bis ein Maximum bei 6-25% Wasser in Ethanol erreicht wird. Es wird vermutet, dass das Maximum der Löslichkeit durch eine kompatibilisierende Hydrathülle um das Polymer verursacht wird. Einzelne Wassermoleküle scheinen Wasserstoffbrückenbindungen mit den Amidgruppen im Polymer auszubilden.^[96]

2.2.4 Poly(2-oxazolin)e als Polymertherapeutika: Ein Überblick ^[5]

Biomaterialien, die im Bereich des Wirkstofftransportes eingesetzt werden sollen, sind einer Vielzahl an komplexen Problemen gegenübergestellt. Angefangen bei der Art der Verabreichung, dem Transport des Wirkstoffes zum Ziel und die spezifische Freisetzung des Wirkstoffes. Das sind nur wenige der Anforderungen, die an ein solches Drug Delivery System gestellt werden. Ein besonders wichtiger Aspekt der Biomaterialien ist die geringe Wechselwirkung mit biologisch aktiven Komponenten. Idealerweise sollten eingesetzte Wirkstoffsysteme kaum Toxizität und Immunogenizität zeigen. Ebenso ist eine geringe Interaktion mit Proteinen oder eine unspezifische Akkumulation in Organen zu vermeiden.^[5] Bisher gibt es unzählige verschiedene Ansätze zur Synthese eines erfolgreichen Drug Delivery Systems. Daher werden sie in Polymer-Protein Konjugate, Polyplexe, Polymer-Wirkstoff-Konjugate und Polymermizellen, -aggregate und -nanopartikel unterteilt.^[97,21] Abbildung 2.2.5 gibt einen Überblick über bisher beschriebene Polymertherapeutika basierend auf Poly(2-oxazolin)en.

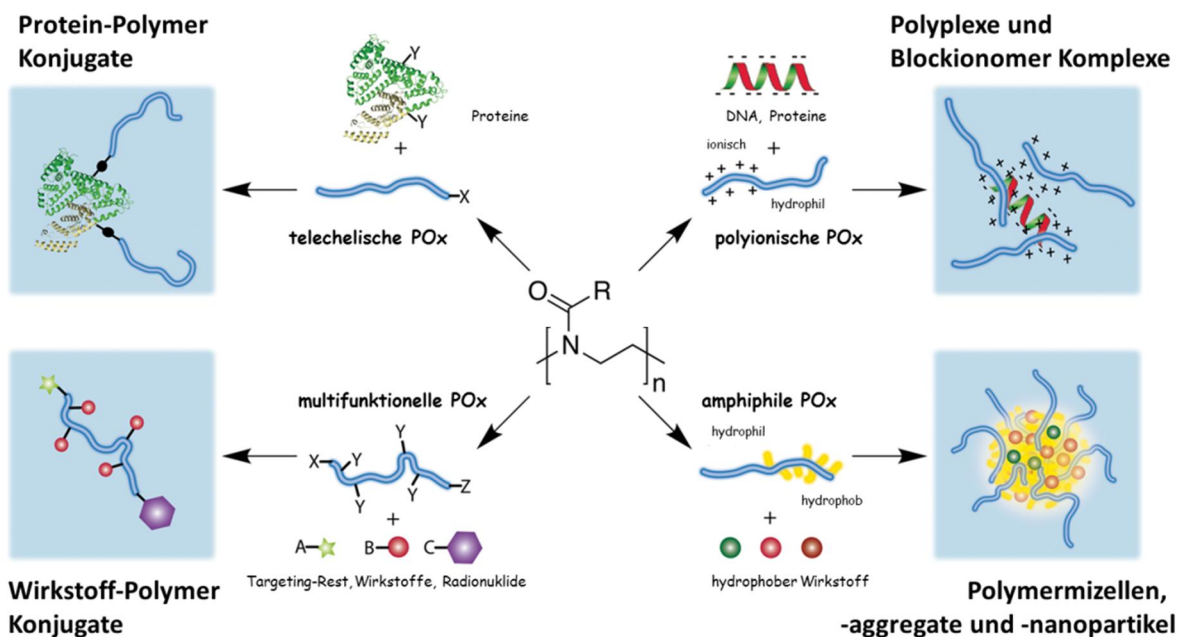


Abbildung 2.2.5: Überblick über Poly(2-oxazolin) basierende Polymertherapeutika ^[5]

Strukturelle Vielseitigkeit

Ein wichtiger Aspekt bei der Synthese eines polymeren Wirkstoffsystems ist die Möglichkeit die Architektur des Transportsystems gezielt maßzuschneidern („tailoring“). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Architektur eines solchen Systems extremen Einfluss auf die pharmakokinetischen Eigenschaften hat.^[98-100] Die lebende kationische ringöffnende Polymerisation von 2-Oxazolinen ist eine einfache und effiziente Methode die Struktur der Polymere variieren zu können. Ein direkter Ansatz ist beispielsweise die Verwendung verschiedener Initiatoren oder Terminierungsreagenzien, durch die die Architektur kontrolliert oder Funktionalitäten zum Anbringen von Targeting-Molekülen variiert werden können.^[101] Mono- oder bifunktionelle Initiatoren ermöglichen die Synthese von symmetrischen oder asymmetrischen Telechelpolymeren.^[102] Sogar drei- oder vierarm Sternpolymere ^[103] können durch multifunktionelle Initiatoren syntetisiert werden und Makroinitiatoren ermöglichen die Synthese von gepfropften Copolymeren oder molekularen Polymerbürsten.^[104,95] Um tatsächlich definierte Strukturen zu erhalten ist eine hohe Initiatoreffizienz sowie eine schnelle Initiierung im Vergleich zum Wachstum notwendig.

Biokompatibilität

Die Biokompatibilität ist eine sehr komplexe Eigenschaft und hängt von den Wechselwirkungen eines Materials mit den biologischen Komponenten ab. Solche Wechselwirkungen können hydrophober sowie elektrostatischer Natur sein oder auch durch Wasserstoffbrückenbindungen verursacht werden.

Bisherige Forschungsarbeiten zu diesem Thema zeigen, dass Poly(2-oxazolin)e ideale Kandidaten in dieser Hinsicht sind.

Untersuchungen verschiedener Poly(2-oxazolin)e wie lineare, hydrophobe, amphiphile^[105,106], sternenförmige oder sogar Hybridsystemen aus Poly(L-lactid)-b-Poly(2-ethyl-2-oxazolin)en^[107] ergaben eine geringe *in vitro* Zytotoxizität in verschiedenen Zelllinien. Des Weiteren zeigten Makrophagen, die mit PEOx inkubiert wurden keine Veränderungen in ihrer metabolischen oder phagozytotischen Aktivität.^[108] Die orale Verabreichung von PEOx bei Ratten und die dermale bei Kaninchen zeigten LD₅₀ Werte über 4 g/kg. Auch Irritationen der Augen (Kaninchen) und der Haut (Schweine) können nicht beschrieben werden.^[109] Die intravenöse Injektion von PEOx in Ratten mit Dosen von bis zu 2 g/kg zeigte keine gravierenden Folgen auf die Tiere und eine histologische Untersuchung der Nieren, Leber und Milz ergab keine Unterschiede im Vergleich zu den Kontrolltieren.^[110] Auch wenn es für Poly(2-methyl-2-oxazolin) bisher keine vergleichbare Studie gibt, zeigen erste Tests zur Zytotoxizität^[105] und Körperverteilung^[31] ähnliche Ergebnisse. Studien zur Proteinwechselwirkung von verschiedenen Poly(2-oxazolin)en (PMeOx, PEOx und Poly(2-n-propyl-2-oxazolin)) zeigen eine Tendenz zur Proteinadsorption mit zunehmender Hydrophobizität. Die hydrophileren Polymere scheinen sogar die Proteinadsorption vollständig unterdrücken zu können, wohingegen das PnPrOx zur Proteinadsorption führt und daraus folgend auch zur Zelladhäsion. Die geringe unspezifische Proteinadsorption der hydrophilen Poly(2-oxazolin)e ist eine sehr wichtige Eigenschaft in Bezug auf die Blutzirkulation und die Verteilung im Körper. So zeigen die hydrophilen POx abhängig von ihrem Molekulargewicht eine Körperverteilung wie sie sonst nur bei Systemen mit sogenanntem „Stealth“ Verhalten zu beobachten sind. PEOx und PMeOx mit einem Molekulargewicht von 5000 g/mol werden mit der ersten renalen Passage schnell aus dem Körper über die renalen Extraktionswege ausgeschieden^[31], wohingegen PMeOx mit einem Molekulargewicht von 15000 g/mol und 30000 g/mol längere Zirkulationszeiten (bis zu 2

Tage) zeigen. Dieselbe Studie zeigte auch eine geringe Aufnahme der Polymere in Leber und Milz.^[30]

Aufgrund der bisherigen Studien scheinen Poly(2-oxazolin)e potentielle Kandidaten für die klinische Verwendung zu sein. Obwohl noch viel mehr Arbeit in Bezug auf deren Biosicherheit gemacht werden muss, sprechen die geringe Zytotoxizität und Immunogenizität für diese Polymerklasse. Auch im Vergleich mit PEG als der „Golden Standard“ schneidet PMeOx, das eine äquivalente Proteinwechselwirkung besitzt, besser ab, da es eine bessere chemische Stabilität^[111] sowie eine geringe unspezifische Akkumulation in den Organen aufweist.^[31]

Polymer-Protein Konjugate

Durch ihre hohe chemische Funktionalität können POx auch in Protein Konjugaten verwendet werden. Noch immer ist das Interesse an Polymer-Protein Konjugaten hoch, um die Effizienz eines solchen Konjugates im therapeutischen Proteintransport zu steigern. Jedoch scheitern viele Systeme an Problemen wie schlechte pharmakokinetische Eigenschaften, Immunogenizität oder die Unfähigkeit biologische Barrieren, wie zum Beispiel die Blut-Hirnschranke oder einfach Zellmembranen zu passieren.^[112] Es ist bekannt, dass PEGylierung, die kovalente Modifikation von Proteinen oder Polymeren mit Polyethylenglykol (PEG), mit linearem oder verzweigtem PEG die *in vivo* Stabilität sowie die Blutzirkulation vieler Proteintherapeutika erhöht. Zudem zeigen PEGylierte Systeme eine verminderte Immunogenizität. Aber dennoch erhöht die PEGylierung nicht den Proteintransport durch Zellmembranen und biologische Barrieren um ihr Ziel zu erreichen. Daher sind die zukünftigen Herausforderungen mit der Synthese von Systemen verbunden, die den intrazellulären Transport von Proteinen erhöhen und dabei die Vorteile der PEGylierung beibehalten.

In ersten Studien zur Proteinmodifikation mit POx (POxylierung) wurden verschiedene Proteine wie Trypsin, Catalase, RNase, Insulin oder Serumalbumin an die hydrophilen Poly(2-oxazolin)e PEtOx und PMeOx konjugiert und alle zeigten ein vergleichbares Verhalten zu PEGylierten Systemen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.^[5] PEtOx-Insulin Konjugate zeigten bei *in vivo* Studien an Ratten ein vermindertes Glukoselevel über acht Stunden verglichen mit zwei Stunden für Insulin alleine.^[5] Hutter und Mitarbeiter berichten über die überraschend

hohe Konjugationseffizienz des „Green Fluorescence Proteins“ (GFP) an „Bottle-Brush-Brushes“ aus Poly(2-isopropenyl-2-oxazolin-graft-PEtOx) auf Graphit. Neben der erhöhten Konjugationseffizienz zeigte sich auch, dass das GFP seine native Struktur beibehielt und die Proteinstabilität zum freien GFP sichtlich erhöht wurde.^[113] Die bisherigen Beispiele zeigen nur die erfolgreiche Konjugation an POx und dass die hydrophilen POx zu PEG vergleichbare Eigenschaften besitzen.

Eine wichtige Hürde ist der Transport der Proteine über Zellmembranen.^[5] Über Jahre wurden Versuche unternommen um die Membranwechselwirkungen von Proteinen zu erhöhen. Dabei wurden hydrophobe Reste, wie Fettsäuren, an Proteinen angebracht, die als Anker für die Proteine an der Zelloberfläche dienen sollten.^[114] Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von amphiphilen Blockcopolymeren zur Proteinmodifikation. In einer Studie von Kabanov et al.^[114] wurden Blockcopolymerer aus 2-Butyl-2-oxazolin als hydrophober Anteil und 2-Methyl-2-oxazolin sowie 2-Ethyl-2-oxazolin als hydrophiler Part hergestellt. Es wurden Konjugate aus Horseradishperoxidase und Poly(2-methyl-2-oxazolin-b-2-butyl-2-oxazolin), PEtOx-b-PBuOx, PMeOx und einem statistischen Copolymer aus EtOx und BuOx synthetisiert und ihre Aufnahme in MDCK und Caco-2 Zellen verglichen. In allen Konjugaten behielt das gekoppelte Enzym seine enzymatische Aktivität. Die Zellexperimente zeigten in beiden Zelllinien eine deutlich höhere Aufnahme von PEtOx-b-PBuOx und PMeOx-b-PBuOx verglichen mit dem statistischen Copolymer aus EtOx und BuOx sowie dem Homopolymer aus MeOx.^[114]

In einer darauf aufbauenden aktuellen Studie von Kabanov und Mitarbeitern^[115] wurden Konjugate bestehend aus PEtOx-b-PBuOx und Superoxid Dismutase 1 sowie PMeOx-b-PBuOx und dem Enzym hergestellt. Alle Konjugate zeigen keine Zytotoxizität sowie eine erhöhte Aufnahme in CATH Neuron Zellen verglichen mit dem Enzym allein oder dem PEGylierten Enzym. Wie auch schon zuvor behielt das konjugierte Enzym seine enzymatische Aktivität und zeigte keine Konformationsänderungen. Besonders interessant ist jedoch, dass die Enzym-POx Konjugate in der Lage sind die Bluthirnschranke zu überwinden und somit zu einem interessanten Kandidaten für die Therapie von Superoxid bedingten Erkrankungen im Gehirn werden.^[115]

Polyplexe

Poly(2-oxazolin)e waren lange Zeit von großem Interesse für die Anwendung als „Gene Delivery System“. Sie gelten als eine zuverlässige Quelle von definiertem und linearem Poly(ethylenimin) (PEI), dass durch die Hydrolyse von Poly(2-oxazolin)en erhalten werden kann.^[5] PEI ist eines der meist verwendeten Polymeren zur DNA-Transfektion wegen seiner überdurchschnittlich hohen Transfektionseffizienz in vielen Zellen. Neben PEI wurden auch schon Forschungen an POx als „Gene Delivery“ Transporter gemacht. Park und Mitarbeiter^[116] stellten Co-Polymere aus EtOx und Ethylenimin her, indem sie die kontrollierte Hydrolyse von PEtOx ausnutzten. Es zeigte sich deutlich, dass die Zytotoxizität von der Ladungsdichte sowie dem Molekulargewicht abhängt. Allgemein sind Polykationen toxisch, da sie starke Wechselwirkungen mit der Zellmembran und Proteinen eingehen. Für ein effizientes Gene Delivery System ist es daher wichtig eine Balance zwischen Toxizität und Transfektionseffizienz zu finden.^[5] Park et al. konnten mit ihren PEtOx-co-PEI zeigen, dass die gleiche Transfektionseffizienz bei Reduktion der Toxizität erhalten werden kann.^[116] In einer Studie von Lühmann und Mitarbeitern^[117] konnte gezeigt werden, dass Polymerbürsten bestehend einem Poly(L-lysin) Rückgrat und Poly(2-methyl-2-oxazolin) Seitenketten erfolgreich COS-7 Zellen transfizieren können. Allerdings konnten nur Bürsten mit einer geringen Pfropfdichte (10%) und kurzen PMeOx Seitenketten wirklich effiziente Transfektionsergebnisse zeigen. Bürsten mit einer höheren Grafting-Dichte konnten aus sterischen Gründen die DNA nicht so effektiv kondensieren und bei der Verwendung von größeren PMeOx Seitenketten entstanden DNA-Kondensate, die auf Grund ihrer Größe nicht mehr von Zellen aufgenommen wurden. Beides resultierte in einer verminderten Transfektionseffizienz.

Bisher gibt es nur wenige Gruppen, die Poly(2-oxazolin)e als Gen-Carrier verwenden. Dennoch scheinen die ersten Ergebnisse vielversprechend und die Vielfältigkeit der POx Chemie macht diese Polymerklasse auch zukünftig interessant für das Feld des „Gene Deliveries“.^[5]

Nanopartikel

Ein verbreitetes Problem bei der Anwendung vielversprechender Wirkstoffe besonders in der Krebstherapie ist die begrenzte Wasserlöslichkeit dieser Moleküle und somit ihre geringe Verfügbarkeit im Körper. Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Wasserlöslichkeit eines solchen Wirkstoffes zu erhöhen, beispielsweise durch die Kopplung an ein hydrophiles Polymer oder das Lösen des Wirkstoffes in Polymermizellen. Poly(2-oxazolin)e eignen sich dafür besonders, da die Art ihrer Synthese einen einfachen Zugang zu Blockcopolymeren mit einem hydrophilen und hydrophoben Block bietet. Diese polymeren Amphiphile eignen sich optimal für den Wirkstofftransport durch Kompartimentierung in Polymersome, Mizellen oder Vesikel.^[5] Eine Studie von Meier et al.^[118] beschäftigte sich mit der Antikörperkonjugation an POx Polymersome. Die Polymersome wurden aus einem Blockcopolymer aus Poly(dimethylsiloxan)-block-poly(2-methyl-2-oxazolin) erhalten. Diese Diblockcopolymere besitzen am hydrophilen Ende eine terminale Aminofunktionalität, die mit Amino-spezifischen Linkern reagieren kann. Mittels der Bis-arylhydrazon Konjugationschemie wurde der Antikörper Trastuzumab konjugiert, der spezifisch SKBR3 Brustkrebszellen adressiert. Das Konjugat zeigte ebenfalls die spezifische Adressierung der Brustkrebszellen.

Wie oben bereits erwähnt, ist die geringe Wasserlöslichkeit der meisten wirksamen Krebsmedikamente das größte Problem. Doppelt amphiphile Poly(2-oxazolin)mizellen zeigen eine extrem hohe Beladungskapazität für hydrophobe Wirkstoffe wie beispielsweise Paclitaxel im Vergleich zu den schon kommerziellen Systemen wie Taxol.^[77] In einer Studie von Kabanov^[77] und Mitarbeitern wurden Mizellen aus ABA Dreiblockcopolymeren hergestellt bestehend aus PMeOx-b-PBuOx-b-PMeOx. Es wurden Polymere geringer Polydispersität sowie geringerem Molekulargewicht erhalten. Die Anzahl der Wiederholungseinheiten der verschiedenen Blöcke wurde variiert, wobei die äußeren Blöcke immer gleich lang waren. Die Polymermizellen dieser POx, die sich spontan in Wasser bilden, zeigen alle eine extrem hohe Beladungskapazität von bis zu 45 Gw%. *In vitro* und *in vivo* Experimente zeigen keine Zytotoxizität der Polymere und das eingekapselte Paclitaxel behielt seine volle Aktivität. Durch die sich entwickelnde Tumorresistenz ist die Krebstherapie mit nur einem Wirkstoff meist nicht erfolgreich. Auch Tumore, die erst auf eine solche Therapie ansprechen, bilden im Nachhinein wirkstoffresistente Gene. Zudem

besitzen die meisten Tumore sogenannte „Tumor initiiierende Zellen“, die ein hohes Proliferationspotential besitzen und von Natur aus resistent sind. Daher besteht die Therapie der meisten Krebsarten heutzutage aus einer Kombination verschiedener Chemotherapien. [119] In einer kürzlichen Arbeit von Han et al. [119] konnten mehrere Anti-Krebswirkstoffe wie Paclitaxel, Docetacel, Etoposide und Bortezomib, in POx Mizellen gelöst werden (Abbildung 2.2.6). Wieder wurde ein amphiphiles Dreiblockcopolymer bestehend aus PMeOx-b-PBuOx-b-PMeOx verwendet, das schon in der zuvor beschriebenden Studie eine extrem hohe Beladungskapazität von Paclitaxel zeigte. [77]

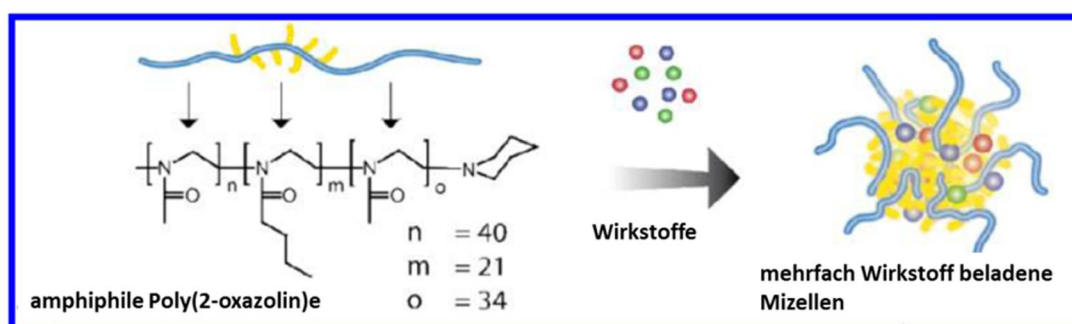


Abbildung 2.2.6 Chemische Struktur der amphiphilen POx Copolymere, (PMeOx-b-PBuOx-b-PMeOx), und schematische Darstellung der mit mehreren Wirkstoffen beladenen Mizelle [119]

Dabei konnten sogar nochmalig erhöhte Beladungskapazitäten gefunden werden mit bis zu 50 Gw% des Wirkstoffes in der endgültigen Formulierung. Außerdem zeigte die mehrfache Beladung mit verschiedenen Wirkstoffen eine erhöhte Stabilität des Wirkstoffes verglichen mit der einfachen Beladung. Die Mizellen, mit verschiedenen Wirkstoffen beladen, konnten diese zu Krebszellen transportieren und zeigten in mehreren Tumormodellen die erwünschten synergistischen Effekte.

Zusammenfassend ist erkennbar, dass die Klasse der Poly(2-oxazolin)e viele wichtige Aspekte vereinigt. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die POx eine gute Biokompatibilität besitzen. Durch ihre strukturelle und funktionelle Vielfältigkeit sind sie sehr interessant für vielseitige Anwendungen im therapeutischen Bereich.

2.2.5 Poly(2-oxazolin) basierende Polymerbürsten

Neben vielen verschiedenen molekularen Bürsten wurden auch bereits zylindrische Bürsten mit Oxazolinseitenketten dargestellt. Jordan und Mitarbeiter synthetisierten mit Hilfe der „Grafting From“-Methode zylindrische Poly(2-oxazolin)bürsten mit unterschiedlichen Oxazolinseitenketten.^[95] Dabei wird zuerst ein Makroinitiatorsalz durch anionische Polymerisation von 2-Isopropenyl-2-oxazolin hergestellt und anschließend das Wachstum der Seitenketten via lebender kationischer ringöffnender Polymerisation von verschiedenen 2-Alkyl-2-oxazolinen initiiert (Abbildung 2.2.7).^[95]

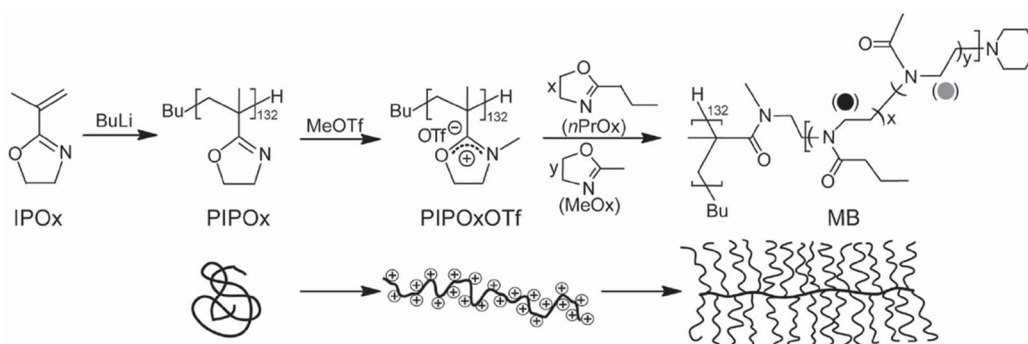


Abbildung 2.2.7: Schematische Darstellung der Synthese von molekularen Bürsten durch anionische Polymerisation von 2-Isopropenyl-2-oxazolin (IOx) für das Rückgrat, Umwandlung in das PIPPOxOTf Makroinitiatorsalz und pfpfen der Seitenketten durch lebende kationische ringöffnende Polymerisation von beispielsweise MeOx oder nPrOx^[120]

Basierend auf dieser Synthesemethode werden Bürsten unterschiedlicher Rückgratlänge sowie entweder 2-n-Propyl-2-oxazolin Seitenketten oder 2-Isopropyl-2-oxazolin Seitenketten synthetisiert. In kinetischen Untersuchungen zur Initiierung konnte gezeigt werden, dass die Polymerisationsrate offensichtlich unabhängig von der Größe des Makroinitiators ist. Die LCROP von nPrOx und iPrOx ausgehend von den Makroinitiatoren folgt einer Kinetik erster Ordnung und die Molmasse der Bürste steigt linear mit dem Monomerumsatz. Die Polymerbürsten zeigen ein thermoresponsives Verhalten, das von Seitenkettenlänge und -zusammensetzung, Rückgratlänge sowie der Konzentration abhängt.^[104] In einer weiterführenden Studie wurde mit Hilfe der oben erwähnten Synthesestrategie Poly(2-oxazolin)bürsten sowohl als statistische als auch Blockcopolymere in den Seitenketten aus

MeOx und nPrOx dargestellt und die Abhängigkeit ihrer Phasenübergangstemperatur untersucht. Wie auch schon zuvor beschrieben hängt die Übergangstemperatur stark von der Zusammensetzung der Seitenketten ab und steigt linear mit dem Anteil an hydrophilem Monomer an. Die Temperaturen konnten zwischen 20°C und 80°C variiert werden. Die Übergangstemperaturen der Blockcopolymerbürsten sind hingegen zusätzlich noch abhängig von der Blocksequenz.

In der Gruppe von Schubert wurden mit Hilfe der „Grafting-Through“ Technik Kamm- und Bürstenpolymere synthetisiert.^[121-124] Dazu wurden im ersten Schritt Makromonomere aus 2-Ethyl-2-oxazolin dargestellt. Die EtOx Monomere wurden mittels LCROP polymerisiert und mit *in situ* gebildetem Triethylammoniummethacrylat zum Methacrylsäureester terminiert. Durch die Polymerisation der Makromonomere mit Hilfe der RAFT Methode (Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer Polymerization) wurden bürstenartige Strukturen erhalten (Abbildung 2.2.8).^[122] Die Variation der Rückgratlänge zwischen 9 und 95 Wiederholungseinheiten und „Small Angle Neutron Scattering“ (SANS) zeigte, dass bei einem Polymerisationsgrad des Rückgrats von 30 ein Übergang der ellipsoiden in die zylindrische Konformation stattfindet.^[123]

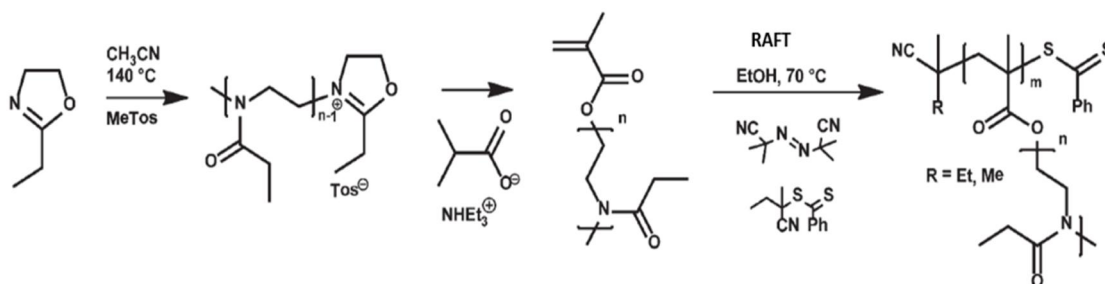


Abbildung 2.2.8: Schematische Darstellung der Syntheseroute des 2-Ethyl-2-oxazolin Makromonomers^[122]

Nachdem die zuvor beschriebenen Synthesewege sich mit dem „Grafting From“ und „Grafting Through“ Ansatz beschäftigen, beschreibt die Studie von Guillerm et al.^[125] die Synthese von Kammpolymeren mit PMeOx Seitenketten und einem ϵ -Caprolacton Rückgrat durch die „Grafting Onto“ Methode. Dazu wurde im ersten Schritt ein statistisches Copolymer aus ϵ -Caprolacton und α -Iod- ϵ -caprolacton hergestellt. Durch nukleophile Substitution mit Natriumazid wurden die Iod-Gruppen ausgetauscht und ein Azid-

funktionalisiertes Polymer erhalten. In einem separaten Schritt wurden die MeOx Polymere mit Hilfe der lebenden kationischen ringöffnenden Polymerisation erhalten. Die Initiierung mit Propargyltosylat ermöglicht die Funktionalisierung der Oxazolinseitenketten mit einer Alkin Endgruppe. Durch „Click-Chemie“ bzw. der Huisgen Cycloaddition von Alkinen mit Aziden unter Kupfer-Katalyse wurden die 2-Methyl-2-oxazolinseitenketten an das Poly- ϵ -Caprolacton gepfropft (Abbildung 2.2.9). Aufgrund der schlechten Analytik fehlt allerdings eine hinreichende Charakterisierung dieser Strukturen.

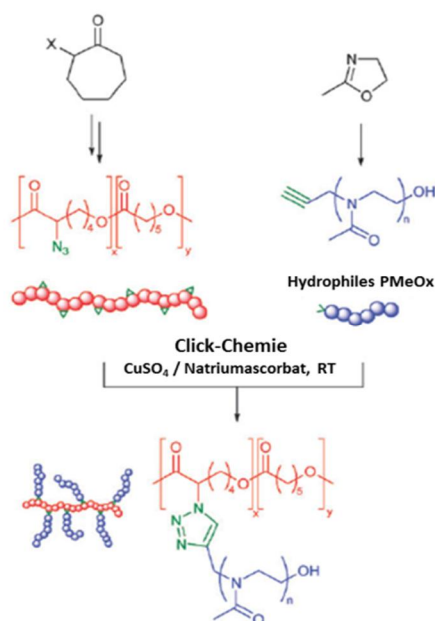


Abbildung 2.2.9: Reaktionsschema für die Synthese von Poly(ϵ -caprolacton)-graft-Poly(2-methyl-2-oxazolin)

[125]

Die zuvor beschriebenen zylindrischen Polymerbürsten mit Poly(2-oxazolin) Seitenketten sind alle durch einen relativ geringen Hauptkettenpolymerisationsgrad von $P < 100$ begrenzt.

2.3 Kupferfreie Click-Chemie ^[6]

Über die Cycloaddition von Aziden und Alkinen unter Bildung von Triazolen wurde erstmals von Micheal ^[126] Ende der 1890er berichtet und in der Mitte des 20. Jahrhunderts von Huisgen ^[127] vertieft bearbeitet. Ähnlich der Staudinger Ligation war die größte Limitierung der Azid-Alkin Cycloaddition deren reaktionsträge Kinetik. Um die Jahrtausendwende bemerkten Sharpless ^[128] und Medal ^[129] das Potential der Huisgen Cycloaddition zur Kupplung von hochfunktionalisierten Molekülen. Sie berichteten, dass unter Verwendung von Cu(I) Katalysatoren die Reaktionsrate drastisch erhöht werden kann. Heutzutage wird diese Reaktion als das Vorbild der „Click-Chemie“ angesehen und in verschiedenen Bereichen der Chemie und auch Biologie verwendet. Der größte Nachteil der Reaktion, vor allem in Hinsicht auf die Anwendung im biologischen oder medizinischen Bereich, ist die Zytotoxizität des Kupfer (I) Katalysators. Daher sind Alternativen ohne die Verwendung von Cu(I) oder anderen Übergangsmetallen gesucht. Der experimentelle Befund von Wittig und Krebs aus dem Jahre 1961, dass Cyclooctine explosionsartig mit Phenylaziden reagieren, ist auf die enorme freiwerdende Ringspannungsenergie von 18 kcal/mol zurückzuführen. Neuere Ansätze basieren auf funktionalisierten Cyclooctinen, wobei Wasserlöslichkeit und Reaktivität optimiert werden müssen. So wird durch Elektronenakzeptorsubstitution, etwa Fluor oder auch in dibenzokondensierten Systemen die Reaktionsgeschwindigkeit um mehr als zwei Größenordnungen erhöht (Abbildung 2.3.1). Die in der Regel immer noch begrenzte Wasserlöslichkeit soll durch weitere Substitution zu überwinden sein, was Gegenstand aktuell laufender Arbeiten ist. ^[6]

2 Theoretische Grundlagen

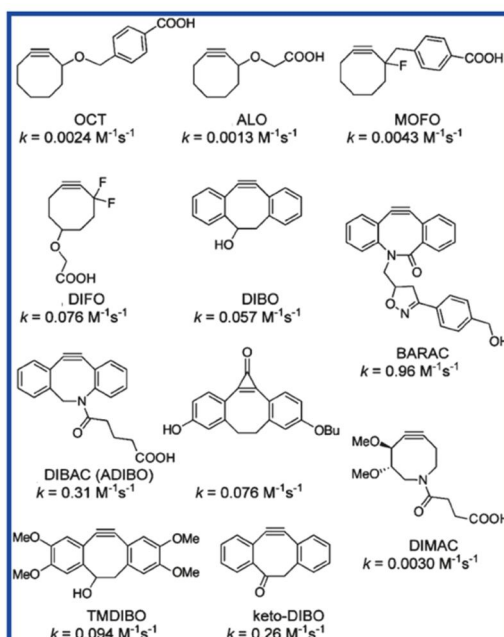


Abbildung 2.3.1: Überblick über Cyclooctine für kupferfreie „Click-Chemie“. k steht für die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion zweiter Ordnung mit Benzylazid ^[6]

Die kupferfreie „Click-Chemie“ wird zu den bioorthogonalen Reaktionen gezählt, das heißt, dass sie weder mit biologischen Systemen wechselwirkt noch interferiert. Zum jetzigen Zeitpunkt ist diese Art der Reaktion eine einfache und saubere Methode zur Funktionalisierung und Markierung verschiedenster Systeme, wie beispielsweise Zellimaging, Farbstoffmarkierungen von Polymeren, Zellen oder anderen Molekülen. Durch ihre milden Bedingungen ist die Reaktion von Aziden mit Cyclooctinen auch interessant für die Kopplung von Biomolekülen wie Antikörper, Proteine oder Zucker an verschiedenste Makromoleküle.

3 Charakterisierungsmethoden

Im folgenden Kapitel werden die verwendeten Charakterisierungsmethoden beschrieben. Besonders die statische sowie dynamische Lichtstreuung und die Atomic Force Mikroskopie stellen wichtige Methoden in der Analyse und Abbildung von polymeren Strukturen dar.

3.1 Gelpermeationschromatographie (GPC) ^[7,8]

Die Gel-Permeations-Chromatographie (GPC), auch Size-Exclusion-Chromatographie (SEC) genannt, ist eine spezielle Form der Flüssigkeitschromatographie und eine wichtige Methode zur Bestimmung der Molmassenmittelwerte von Polymeren. Dabei wird eine verdünnte Polymerlösung auf eine Serie von Säulen mit porösem Füllmaterial gegeben und mit einem Lösungsmittelstrom eluiert. Bei dem porösen Füllmaterial handelt es sich um hochvernetztes Polystyrol, das durch Kontakt mit dem Elutionsmittel aufquillt und Poren ausbildet. Die Porengröße kann über den Vernetzungsgrad des Polystyrols sowie das Elutionsmittel variiert werden.

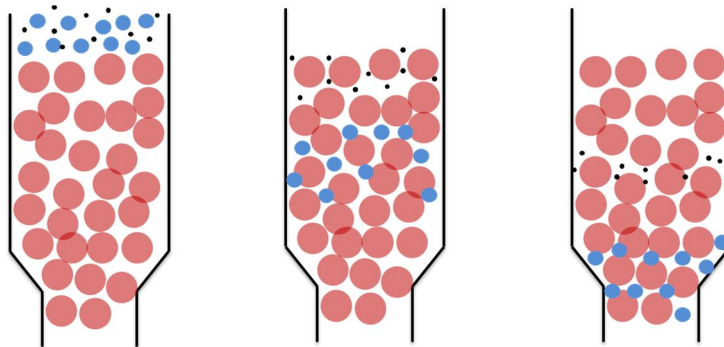


Abbildung 3.1.1: Schematische Darstellung des Trennmechanismus einer GPC-Säule

Abbildung 3.1.1 zeigt den schematischen Trennmechanismus. Das Trennprinzip der Moleküle beruht auf Größenausschluss. Jedes Teilchen besitzt ein hydrodynamisches Volumen, das molekulargewichtsabhängig ist. Dieses hydrodynamische Volumen steuert die Permeation der Polymermoleküle in die Poren des mikroporösen Gels. Die Makromoleküle verteilen sich auf die mobile Lösungsmittelphase sowie die stationäre Gelphase. Dieser

diffusionsbestimmte Prozess führt dazu, dass das kontinuierlich fließende Elutionsmittel alle Moleküle, die eine gewisse Größe, die sogenannte obere Ausschlussgrenze überschreiten und nicht in die stationäre Phase eindringen können, gemeinsam mit der mobilen Phase zuerst eluieren. Kleinere Moleküle mit einem größeren Permeationsvermögen dringen zunächst in die stationäre Phase ein. Durch den entstehenden Konzentrationsgradienten, infolge des Lösungsmittelstroms, zwischen mobiler und stationärer Phase werden auch die kleineren Moleküle mit der Zeit eluiert. Die Teilchen mit der geringsten Größe verweilen dabei am längsten in den Poren und werden zuletzt eluiert. Ist die untere Ausschlussgrenze erreicht findet keine Trennung der kleinen Moleküle mehr statt. Die Teilchen dringen ungehindert in die Poren ein und verlassen diese ohne Trennung.

Die Detektion der eluierenden Lösung findet durch einen UV- und/oder Brechungsindexdetektor statt. In beiden Fällen ist das Signal bei der Detektion der Wiederholungseinheit proportional zur Massenkonzentration des Polymers im Eluat. Werden lediglich Endgruppen detektiert zum Beispiel mit UV, wird die molare Konzentration der Ketten bestimmt und damit direkt die Zahlenverteilung abgebildet.

Die GPC stellt keine Absolutmethode dar, da für jedes Polymer eine eigene Kalibrierung mit engverteilten Standards durchgeführt werden muss, um eine exakte Beziehung zwischen Molekulargewicht und Elutionsvolumen zu erhalten. Für ein gegebenes Polymer-Lösungsmittel-System gilt:

$$\log M = a - b \cdot V_e \tag{3.1}$$

V_e : Elutionsvolumen

M: Molekulargewicht

a, b: Konstanten

Mittels Elutionsvolumen kann über eine Eichkurve $\log M$ berechnet werden und somit kann man die Elutionskurve in eine Verteilungskurve umrechnen.

3.2 MALDI-ToF Spektroskopie ^[8,9]

Die matrixgestützte Laserionisationsdesorptions-Massenspektroskopie ist eine Absolute Methode und stellt eine besondere Art der Massenspektrometrie dar. Bei der Bestrahlung von Molekülen mit Licht können diese angeregt werden, wenn das eingestrahlte Licht absorbiert wird. Ist die Energie des Lichts groß genug kann das zur Ionisierung der Moleküle führen (Fotoionisation). Bei Substanzen, die keine Chromophore sind oder bei einer anderen Wellenlänge als der des eingestrahlten Lichts absorbieren, verwendet man eine stark absorbierende niedermolekulare Verbindung bekannter Struktur und bestrahlt diese stets mit der gleichen Wellenlänge, so wird sie die gleichen Absorptionseigenschaften aufweisen und lässt sich als Matrix verwenden. Die zu untersuchende Substanz wird in die Matrix eingebettet. Die Matrix überträgt ihre Energie schnell und ohne thermische Zersetzung auf die Untersuchungssubstanz, die dann durch Protonen oder Alkaliionen ionisiert und dem Gemisch durch äußere elektrische Felder entzogen wird. Das Verhältnis von Matrix zu Probe beträgt meist 1000:1. Welche Matrix verwendet wird hängt von der chemischen Zusammensetzung der zu untersuchenden Probe ab. So ist zum Beispiel 2,5-Dihydroxybenzoesäure eine allgemein verwendete Matrix.

Zur Detektion eignet sich das Flugzeit-Massenspektrometer (Time-of-Flight Spectrometer, ToF), das eine simultane Detektion aller durch den Laserpuls entstandenen Ionen ermöglicht. Die aus der Matrix tretenden Ionenpakete werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt und fliegen dann durch eine feldfreie Zone bevor sie auf einen Detektor treffen (Abbildung 3.2.1). Für eine saubere Auftrennung muss die Geschwindigkeit proportional zum Masse-Ladungsverhältnis sein. Aus der Flugzeit lassen sich dann die Massen aller Ionen bestimmen. Wird ein Reflektron verwendet werden Energieunterschiede gleicher Ionen kompensiert und man erhält eine bessere Auflösung.

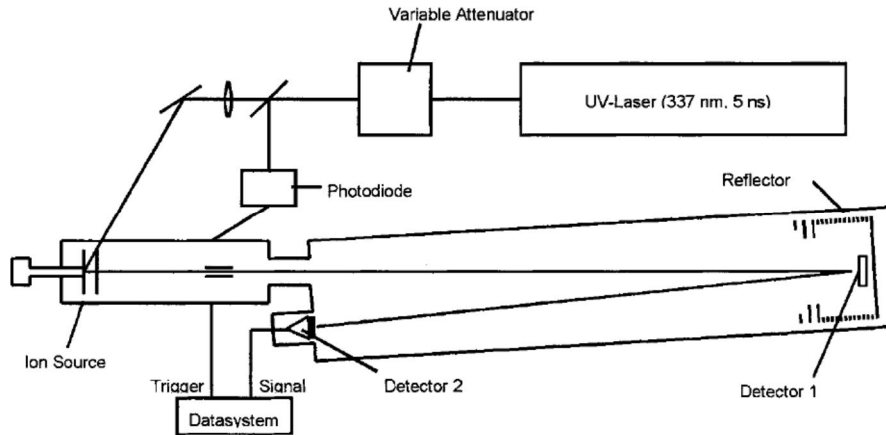


Abbildung 3.2.1: Schematische Darstellung eines MALDI-ToF Spektrometers mit Reflektion^[130]

Mit dieser Methode können Proteine bis 400 000 g/mol und synthetische Polymere bis 40 000 g/mol untersucht werden. Aufgrund der Molmassenverteilung von synthetischen Polymeren werden keine scharfen Signale wie bei einer Isotopenverteilung erhalten sondern eine sogenannte Massenverteilung (Abbildung 3.2.2).

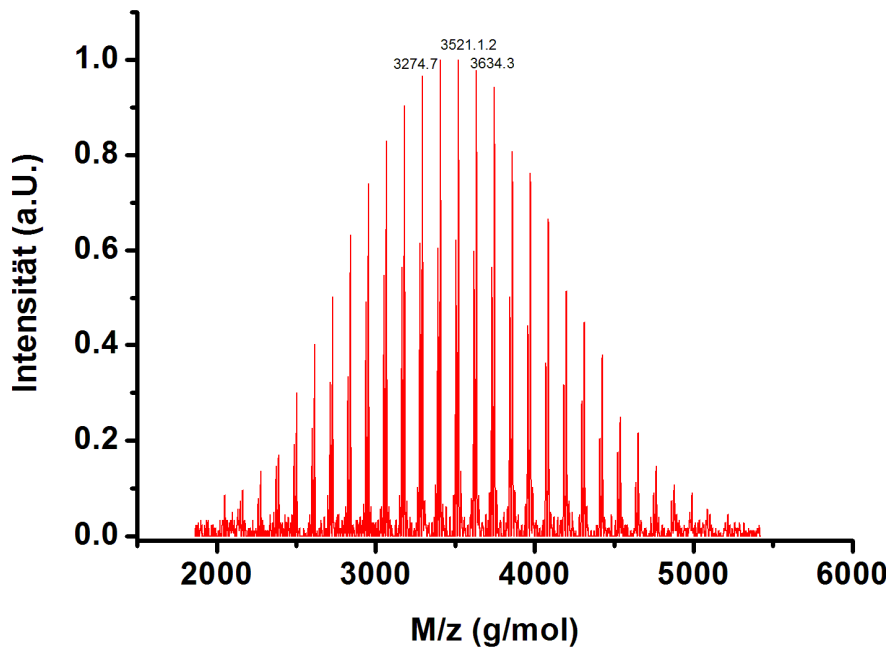


Abbildung 3.2.2: MALDI-ToF Spektrum eines PiPrOx-Makromonomers

3.3 UV-Vis Spektroskopie ^[10]

Moleküle können elektromagnetische Strahlung absorbieren. Besitzt das eingestrahlte Licht eine Wellenlänge von ca. 200-750 nm (UV/Vis-Bereich), werden in der Regel die Valenzelektronen des Moleküls angeregt. Die Elektronen werden von dem von ihnen besetzten Orbital in ein höher liegendes unbesetztes Orbital angehoben. Hauptsächlich handelt es sich dabei um n- und π -Orbitale. Für monochromatisches Licht (unter Vernachlässigung der Reflexionen und des Streuverlusts) gilt nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz, dass die Abschwächung der Intensität des durchgestrahlten Lichts, also die Absorption A durch ein homogenes, isotropes Medium proportional zur molaren Konzentration c und der Schichtdicke d der Küvette ist.

$$A = \log \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (3.2)$$

I_0 und I beschreiben die Strahlungen vor und nach dem Durchgang durch die Probe. Die Proportionalitätskonstante ε ist eine stoffspezifische Konstante, die molarer dekadischer Absorptionskoeffizient genannt wird. Die Gesamtabsorption setzt sich aus den Einzelabsorptionen der gelösten Stoffe additiv zusammen. Wird die Absorption A einer Probe für jede Wellenlänge λ ermittelt und trägt $A(\lambda)$ gegen λ auf, so erhält man das Absorptions- bzw. UV/Vis-Spektrum.

3.4 Lichtstreuung ^[11]

Materie besteht aus Atomen, welche wiederum aus positiv geladenen Protonen und negativ geladenen Elektronen bestehen. Wenn Licht mit der Materie wechselwirkt, werden die Elektronen, die den Kern umgeben, verschoben und es wird ein klassischer Hertz'scher Dipol ausgebildet. (Abbildung 3.4.1) Da Licht aus elektromagnetischen Wellen besteht oszilliert der induzierte Dipol und strahlt damit selbst elektromagnetische Strahlung in alle Raumrichtungen aus.

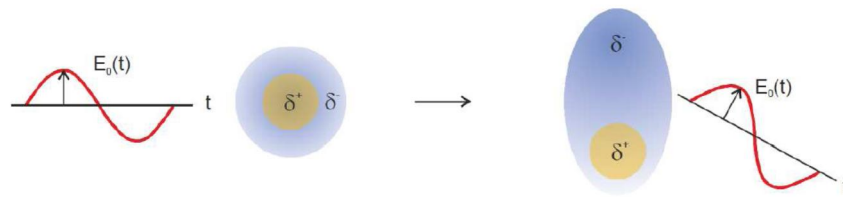


Abbildung 3.4.1: Wechselwirkung elektromagnetischer Wellen mit Materie und Induzierung eines Dipols

Dieses Phänomen nennt man Lichtstreuung. Da es von der Dynamik und Struktur der Moleküle abhängt, wird dies zur Charakterisierung von Polymeren oder allgemein Nanopartikeln verwendet. Die Lichtstreuung ist eine Absolutmethode, die ohne Kalibrierung mit Standards auskommt. Man unterscheidet in „statische Lichtstreuung“ und „dynamische Lichtstreuung“. Bei der statischen Lichtstreuung wird die zeitlich gemittelte Intensität winkelabhängig gemessen und man kann das Molekulargewicht, den Trägheitsradius sowie den zweiten Virialkoeffizienten des osmotischen Drucks (A_2) bestimmen. Mittels dynamischer Lichtstreuung wird die zeitliche Fluktuation der Streuintensität, verursacht durch die Brown'sche Bewegung der Teilchen in Lösung, gemessen. Daraus kann der Diffusionskoeffizient und somit der hydrodynamische Radius der Moleküle bestimmt werden.

3.4.1 Statische Lichtstreuung

Die statische Lichtstreuung betrachtet ausschließlich elastische Streuung, bei der die Wellenlänge der gestreuten Welle mit der einfallenden Welle übereinstimmt. Die theoretische Herleitung der fundamentalen Gleichung zur statischen Lichtstreuung wurde von Lord Rayleigh hergeleitet und galt nur für verdünnte Gase. Durch Erweiterung der Gleichung mit der Fluktuationstheorie von Einstein und Smoluchowsky wurde sie auch auf Flüssigkeiten und Lösungen anwendbar. Streuung kann nur beobachtet werden, wenn das betrachtete Volumenelement einen anderen Brechungsindex besitzt als die Umgebung. In reinen Flüssigkeiten tritt dies durch Dichteschwankungen auf, in Lösungen kommen noch Konzentrationsschwankungen dazu.

Für die statische Streuintensität von Lösungen mit Teilchen mit einem Trägheitsradius kleiner $\lambda/20$ (10 nm) gilt für das Rayleighverhältnis:

$$R(\theta) = \frac{4\pi^2}{\lambda^4 N_L} \left[\rho n_0^2 \left(\frac{dn}{d\rho} \right)^2 RT\beta + \left(n_0 \frac{dn}{dc} \right)^2 RT \frac{M_0}{\rho_0} \frac{c}{\left(\frac{-d\Delta\mu}{dc} \right)} \right] \quad (3.3)$$

$R(\theta)$: Rayleighverhältnis

λ_0 : Wellenlänge des Primärstrahls

N_L : Avogardokonstante

ρ : Dichte

n_0 : Brechungsindex des Lösungsmittels

n : Brechungsindex der Lösung

ρ_0 : Dichte des Lösungsmittels

R : Ideale Gaskonstante

T : Temperatur

β : isotherme Kompressibilität

M_0 : Molekulargewicht des Lösungsmittels

$\Delta\mu$: Differenz der chemischen Potentiale des Lösungsmittels und der Lösung

c : Konzentration der Probe

$\left(\frac{dn}{d\rho} \right)$: Brechungsindexinkrement (nach der Dichte)

$\left(\frac{dn}{dc} \right)$: Brechungsindexinkrement (nach der Konzentration)

In der Praxis wird mit der absoluten Streuintensität eines bekannten Stoffes, meist Toluol, und des verwendeten Lösungsmittels kalibriert. So wird das in Gleichung 3.4 beschriebene Rayleighverhältnis erhalten:

$$R(\theta) = \frac{I(\theta)_P - I(\theta)_{LM}}{I(\theta)_{st.}} \cdot I(\theta)_{st. absolut} \quad (3.4)$$

$I(\theta)_p$: Streuintensität der Probe

$I(\theta)_{LM}$: Streuintensität des verwendeten Lösungsmittels

$I(\theta)_{St.}$: Streuintensität des Standards (Toluol)

$I(\theta)_{St. absolut}$: absolute Streuintensität des Standards (Toluol)

Das Rayleighverhältnis setzt sich aus dem Streubetrag durch die Dichteschwankungen sowie aus dem Betrag der Konzentrationsschwankungen der Probe zusammen. Für verdünnte Lösungen wird angenommen, dass sich die Dichteschwankungen von Probe und reinem Lösungsmittel nicht unterscheiden. Demnach wird das Brechungsindexinkrement der Dichte null und Gleichung 3.3 vereinfacht sich zu 3.5:

$$R(\theta) = \frac{4\pi^2}{\lambda^4 N_L} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 RT \frac{M_0}{\rho_0} \frac{c}{\left(-\frac{d\Delta\mu}{dc} \right)} \quad (3.5)$$

Die konzentrationsabhängige Änderung des chemischen Potentials kann durch die konzentrationsabhängige Änderung des osmotischen Drucks beschrieben werden. Für die Änderung des chemischen Potentials mit der Konzentration gilt unter realen Bedingungen:

$$-\left(\frac{d\Delta\mu}{dc} \right) = \frac{M_0}{\rho_0} \left(\frac{d\pi}{dc} \right) = \frac{M_0}{\rho_0} RT \left(\frac{1}{M} + 2A_2c + \dots \right) \quad (3.6)$$

A_2 : zweiter Virialkoeffizient

M : Molekulargewicht des gelösten Stoffes

π : osmotischer Druck

Durch Einsetzen von Gleichung 3.6 in Gleichung 3.5 und anschließendem Umformen erhält man:

$$\frac{Kc}{R} = \frac{1}{M} + 2A_2c \quad (3.7)$$

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda_0^4 N_L} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 : \text{Kontrastfaktor}$$

In Gleichung 3.7 wird angenommen, dass jedes Teilchen ein Punktstreuer mit nur einem Streuzentrum ist. Dies gilt für Partikel mit Radien kleiner $\lambda/20$ bzw. 10 nm. Ihre Streuzentren im Molekül liegen so eng beieinander, dass nur konstruktive Interferenz auftritt und somit die Streuintensität unabhängig vom Streuwinkel ist. Sind die Teilchen größer $\lambda/20$ kann man sie nicht mehr als Punktstreuer beschreiben. In diesem Fall befinden sich mehrere Streuzentren in einem Molekül. Zwischen den Streustrahlen treten dann sowohl konstruktive als auch destruktive Interferenz auf. Die Streuintensität ist nun winkelabhängig, da sich die Interferenz mit dem Beobachtungswinkel ändert. Die zusätzlichen intrapartikulären Interferenzen müssen berücksichtigt werden. Durch Erweiterung von Gleichung 3.7 mit dem Partikelformfaktor, der die Winkelabhängigkeit der Streuintensität beschreibt gilt nun:

$$\frac{Kc}{R} = \frac{1}{MP(q)} + 2A_2c \quad (3.8)$$

$$P(q) = \frac{1}{N^2} \sum_i^N \sum_j^N \langle \exp(iqr_{ij}) \rangle : \text{Partikelformfaktor}$$

$$q = |q| = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) : \text{Streuvektor}$$

$$r_{ij} = r_i - r_j : \text{Abstandsvektor der Streuzentren } i \text{ und } j$$

N: Anzahl der Streuzentren

θ : Streuwinkel

Für kleine q liefert eine Taylorentwicklung des Partikelformfaktors:

$$P(q) = 1 - \frac{q^2}{3! N^2} \sum_i^N \sum_j^N \langle r_{ij}^2 \rangle + \dots \quad (3.9)$$

Für das Quadrat des Trägheitsradius gilt:

$$\langle R_g^2 \rangle = \frac{1}{N} \sum_i^N \langle r_i^2 \rangle = \frac{1}{2N^2} \sum_i^N \sum_j^N \langle r_{ij}^2 \rangle \quad (3.10)$$

Durch Einsetzen von Gleichung 3.9 in Gleichung 3.8 ergibt sich für den Formfaktor $P(q)$ für $q \cdot R < 1$:

$$P(q) = 1 - \frac{1}{3} q^2 \langle R_g^2 \rangle + \dots \quad (3.11)$$

Die bis jetzt aufgeführten Gleichungen gelten nur unter der Annahme, dass es sich bei den Proben um monodisperse Partikel handelt. In der Realität sind synthetische Polymere polydispers und unterliegen einer Molekulargewichtsverteilung. Wird die Polydispersität mit in Betracht gezogen ergibt sich für das Quadrat des Trägheitsradius nun:

$$\langle R_g^2 \rangle_z = \frac{\sum_i m_i M_i \langle R_g^2 \rangle_i}{\sum_i m_i M_i} \quad (3.12)$$

Für den Formfaktor $P(q)$ gilt nun:

$$P(q) = 1 - \frac{1}{3} q^2 \langle R_g^2 \rangle_z + \dots \quad (3.13)$$

Unter Verwendung folgender Beziehung

$$1 - x = \frac{1}{1+x} \quad \text{für } x \ll 1 \quad (3.14)$$

mit $x = \frac{1}{3} q^2 \langle R_g^2 \rangle_z$ ergibt sich nach einsetzen von $P(q)$ in Gleichung 3.8 die Zimmgleichung für polydisperse Systeme ^[131]:

$$\frac{Kc}{R(\theta)} = \frac{1}{M_w} \left(1 + \frac{1}{3} q^2 \langle R_g^2 \rangle_z \right) + 2A_2c \quad (3.15)$$

Indem man $\frac{Kc}{R(\theta)}$ gegen $q^2 + c$ aufträgt erhält man den sogenannten Zimm-Plot (Abbildung 3.4.2). Die Extrapolationen von $c \rightarrow 0$ sowie $q \rightarrow 0$ liefern das z-Mittel des Trägheitsradienquadrat, das Gewichtsmittel der Molmasse und den zweiten Virialkoeffizienten des osmotischen Drucks.

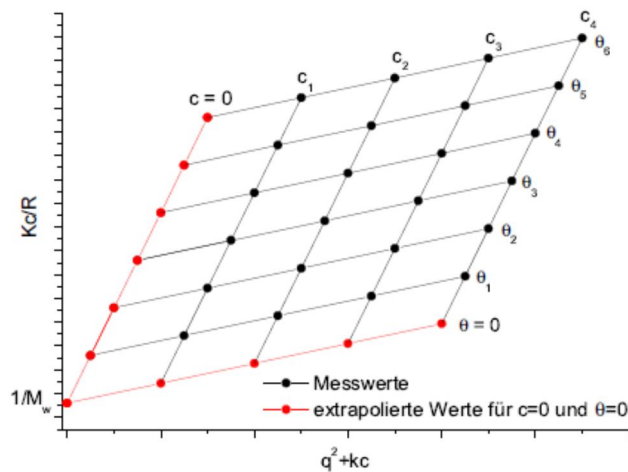


Abbildung 3.4.2: Exemplarischer Zimm-Plot

3.4.2 Dynamische Lichtstreuung

Wie bereits erwähnt, werden bei der dynamischen Lichtstreuung die zeitlichen Fluktuationen der Streuintensität, verursacht durch die Bewegung der Teilchen in Lösung, korreliert. Nach dem Wiener-Khintchine-Theorem ^[132,133] gibt es eine sogenannte Autokorrelationsfunktion der Streuintensität $g_2(t)$ ^[134], die besagt, dass es zu jedem Intensitätsspektrum im Frequenzraum eine fouriertransformierte Funktion im Zeitraum gibt. Die Autokorrelationsfunktion beschreibt die zeitliche Fluktuation der Streuintensität, die durch die Teilchenbewegung im Streuvolumen hervorgerufen wird. Experimentell wird sie durch Autokorrelation der gemessenen Intensitätsfluktuationen erhalten:

$$g_2(t) = \langle I(0)I(t) \rangle \quad (3.16)$$

$I(0)$: Streuamplitude zum Zeitpunkt 0

$I(t)$: Streuamplitude zum Zeitpunkt t

t: Zeitabstände der Kanäle des Autokorrelators

$\langle \dots \rangle$: zeitliches Mittel

Mit Hilfe von $g_2(t)$ und der ebenfalls experimentell zugänglichen Basislinie A kann mit der Siegert-Relation (3.17) die Autokorrelationsfunktion des Streufeldes $g_1(t)$ bestimmt werden, die als Quotient aus dynamischen und statischen Strukturfaktor definiert ist ^[135]:

$$g_1(t) = \frac{S(q, t)}{S(q)} = \sqrt{\frac{g_2(t) - A}{A}} \quad (3.17)$$

$S(q, t)$: dynamischer Strukturfaktor

$S(q)$: statischer Strukturfaktor

A: experimentell bestimmte Basislinie

Für kleine monodisperse Teilchen wird $g_1(t)$ als monoexponentiell abfallende Funktion beschrieben:

$$g_1(t) = B \exp(-q^2 D t) \quad (3.19)$$

B: Signal-Rausch-Verhältnis

D: translatorischer Diffusionskoeffizient

Ist die Probe polydispers muss $g_1(t)$ als ein z-Mittel der Exponentialfunktionen der Teilchensorte i beschrieben werden:

$$g_1(t) = B \frac{\sum_i m_i M_i \exp(-q^2 D_i t)}{\sum_i m_i M_i} \quad (3.20)$$

D_i : translatorischer Diffusionskoeffizient der Teilchensorte i

m_i : Massenanteil der Teilchensorte i

M_i : Molmasse der Teilchensorte i

Durch Auftragung von $d \ln g_1(t)/dt$ gegen q^2 erhält man aus der Anfangssteigung das z-Mittel des Diffusionskoeffizienten D_z :

$$\left[\frac{d \ln g_1(t)}{dt} \right]_{t \rightarrow 0} = q^2 \frac{\sum m_i M_i D_i}{\sum m_i M_i} = q^2 D_z \quad (3.21)$$

Da D_z sowohl winkel als auch konzentrationsabhängig ist, muss analog zum Zimm-Plot $q \rightarrow 0$ und $c \rightarrow 0$ extrapoliert werden, um das wahre z-Mittel des Diffusionskoeffizienten zu erhalten.

$$D_{app}(q, c) = D_z (1 + C \langle R_g^2 \rangle_z q^2 + \dots) (1 + k_d c + \dots)$$

(3.22)

C : dimensionslose Größe, von der Molekülstruktur abhängig

$$k_d: k_d = 2A_2M - k_f - v_p$$

$$f(c) = f_0(1 + k_f \cdot c)$$

v_p : partielles Molvolumen des Polymers

$$f_0: \text{Reibungskoeffizient mit } f_0 = \frac{kT}{D_z}$$

Mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung lässt sich aus den extrapolierten Werten für D_z ein kugeläquivalenter hydrodynamischer Radius berechnen, welcher den Reziprokwert eines inversen z-Mittels darstellt:

$$R_h \equiv \left\langle \frac{1}{R_h} \right\rangle_z^{-1} = \frac{kT}{6\pi\eta_0 D_z} \quad (3.23)$$

R_h : hydrodynamischer Radius

η_0 : Viskosität des Lösungsmittels

3.4.3 Das ρ - Verhältnis

Mit Hilfe des ρ -Verhältnisses lässt sich eine Aussage über die Topologie der zu untersuchenden Teilchen im Größenbereich von 20 bis 200 nm machen. Es verbindet dabei die charakteristischen Größen der statischen und dynamischen Lichtstreuung. Das ρ -Verhältnis ist definiert als:

$$\rho = \frac{R_g}{R_h} = \frac{\langle R_g^2 \rangle_z^{\frac{1}{2}}}{\left\langle \frac{1}{R_h} \right\rangle_z^{-1}} \quad (3.24)$$

Bei polydispersen Systemen muss die Mittelwertberechnung, wie das z-Mittel des Trägheitsradienquadrates bzw. das z-Mittel des reziproken hydrodynamischen Radius beachtet werden. *Tabelle 3.4.1*^[11] zeigt die ρ -Verhältnisse verschiedener Partikeltopologien.

Tabelle 3.4.1: ρ -Verhältnisse verschiedener Partikeltopologien

Topologie	ρ -Verhältnis
Homogene Kugel	0.775
Hohlkugel	1
Ellipsoid	0.775-4
Polymerknäuel monodispers	1.505
Zylinder der Länge 1 und Durchmesser d	$\frac{1}{\sqrt{3}} \cdot \ln\left(\frac{1}{D} - 0.5\right)$

3.4.4 Aufbau einer Lichtstreuapparatur

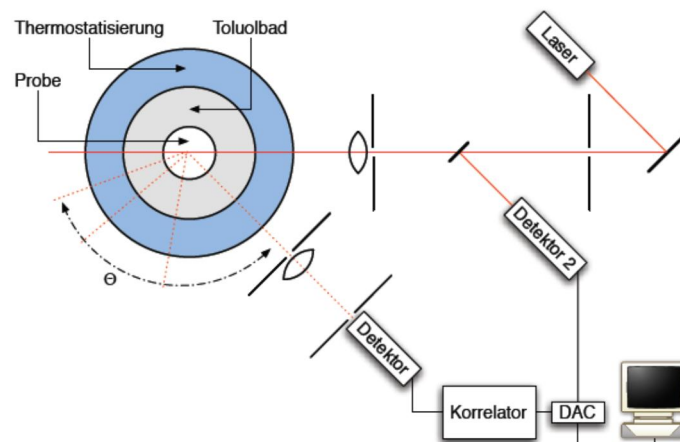


Abbildung 3.4.3: Schematischer Aufbau einer Lichtstreuapparatur^[33]

Abbildung 3.4.3 zeigt den schematischen Aufbau einer Lichtstreuapparatur.^[134] Typischerweise besteht eine solche Apparatur aus der Lichtquelle (Laser), verschiedenen Linsen und Lochblenden um den Strahl zu fokussieren, dem Detektor (Photomultiplier), der auf einem beweglichen Goniometerarm befestigt ist und einer Auswerteeinheit (Korrelator, Digital-Analog-Wandler, Computer). Normalerweise wird bei Streuwinkeln zwischen 15 und

150° gemessen. Ein zweiter Detektor (Photomultiplier oder Photodiode zeichnet die Stabilität der Laserstärke auf. In einem temperierten Toluolbad, dessen Brechungsindex dem von Glas ähnelt, um Reflexionen zu vermeiden, steht die Küvette mit der Probenlösung.

3.5 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) ^[12,13]

Mit Hilfe dieser Methode wurden vor allem die Makromonomere untersucht und deren Funktionalisierungsgrade bestimmt. Die Kernspinresonanzspektroskopie ist eine besondere Art der Absorptionsspektroskopie und wird als NMR-Spektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance) bezeichnet.

Durch Absorption elektromagnetischer Strahlung durch magnetische Atomkerne, die sich in einem statistischen äußeren Magnetfeld befinden, entsteht das Resonanzspektrum. Atome, die eine ungerade Anzahl an Neutronen oder Protonen aufweisen besitzen ein magnetisches Moment (z.B. ¹H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁹F, ²⁹Si...). Ein magnetischer Kern, der sich in einem statischen Magnetfeld befindet, hat aufgrund seines magnetischen Kernmoments verschiedene Orientierungsmöglichkeiten, die durch die magnetische Kernspinquantenzahl m_i bestimmt werden.

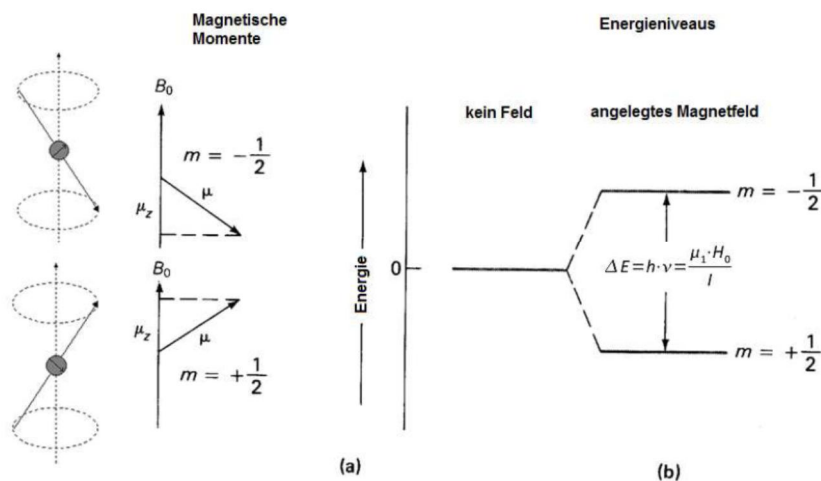


Abbildung 3.5.1: Schematische Darstellung der Energieniveaueaufspaltung bei Atomen mit einem Kernspin $\neq 0$, durch Anlegen eines äußeren Magnetfeldes ^[136]

Durch ein elektromagnetisches Wechselfeld dessen magnetischer Vektor senkrecht auf dem statischen Magnetfeld steht, kann eine Umorientierung der Kernmomentachsen erzwungen werden. Die Energie wird dabei aus dem Hochfrequenzfeld aufgenommen (Kernresonanz).

Diese Energie (ΔE) und die ihr entsprechende Frequenz der absorbierten Strahlung hängen von den magnetischen Eigenschaften des Atomkerns ab und sind der Stärke des äußeren Magnetfeldes H_0 proportional:

$$\Delta E = h\nu = \frac{\mu_1 H_0}{i} \quad (3.25)$$

ΔE : Energiedifferenz

h : Planck'sches Wirkungsquantum

μ_1 : magnetisches Kernmoment

i : Kernspin

Kerne, die ein großes $\frac{\mu_1}{i}$ Verhältnis besitzen und somit ΔE relativ groß ist eignen sich besonders gut für diese Art der Spektroskopie. Dazu gehören Kerne mit einem Kernspin $i = 1/2$ wie ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P . Nicht nachweisbar sind die häufig vorkommenden Elemente ^{12}C , ^{16}O und ^{32}S , da ihr Kernspin null beträgt.

Um den Resonanzabfall messen zu können wird in der Regel eine Probe mit der zu untersuchenden Substanz (flüssig oder in Lösung) in das statische Magnetfeld eingebracht. Dabei ist die Substanz von einer Induktionsspule umgeben, in der ein hochfrequentes Wechselfeld erzeugt wird. Man variiert die Feldstärke solange, bis der Resonanzfall eintritt, dann nimmt die Probe die Energie aus dem Wechselfeld auf, was in einer Änderung des Stromes, der zur Erzeugung des Wechselfeldes benötigt wird, resultiert. Die Stromänderung, das sogenannte Resonanzsignal lässt sich messen und man erhält das kernmagnetische Resonanzspektrum.

Betrachtet man nun Atomkerne mit Elektronenhülle wird der Kern von dieser abgeschirmt und das äußere Magnetfeld in der Umgebung des Kerns wird geschwächt (diamagnetische Abschirmung).

$$H_{eff} = H_0 - \sigma \cdot H_0 \quad (3.26)$$

H_{eff} : effektives Magnetfeld

H_0 : statisches Magnetfeld

σ : magnetische Abschirmung

Das Resonanzsignal erscheint somit erst bei einer gegenüber dem nicht abgeschirmten Kern größeren äußeren Feldstärke. Diesen Effekt bezeichnet man als chemische Verschiebung (chemical shift), da er von der elektronischen Umgebung bzw. der chemischen Umgebung des Kerns abhängt.

Teilt man nun die Feldstärke/ Frequenzdifferenzen durch H_0 bzw. ν_0 , erhält man eine von der Feldstärke des angewandten Magnetfeldes unabhängige Maßzahl für die chemische Verschiebung:

$$\delta = \frac{H_s - H_i}{H_0} = \frac{\nu_s - \nu_i}{\nu_0} \quad (3.27)$$

H_s : Resonanzfeldstärken des Standards

H_i : Resonanzfeldstärken der Probe

H_0 : statisches Magnetfeld

ν_s : Resonanzfrequenzen des Standards

ν_i : Resonanzfrequenzen der Probe

ν_0 : Sendefrequenz

δ ist eine dimensionslose Größe zwischen 10^{-5} und 10^{-7} . Sie wird daher in ppm (parts per million) angegeben. Als innerer Standard für die NMR-spektroskopische Untersuchung wird bei ^1H - und ^{13}C -Kernen meist Tetramethylsilan (TMS) verwendet, da es nur eine Resonanzfrequenz hat, die von der Konzentration und der chemischen Zusammensetzung der Lösung unabhängig ist.

3.6 Rasterkraftmikroskopie (AFM) ^[14,15]

Die Rasterkraftmikroskopie (engl. Atomic Force Microscopy) ist eine Technik, die zur Abtastung von Oberflächen dient. Mittels dieser Methode können zylindrische Bürstenpolymere und Konformationsänderungen von Nanoteilchen abgebildet werden und es ist darüber hinaus möglich einzelne Moleküle zu manipulieren.

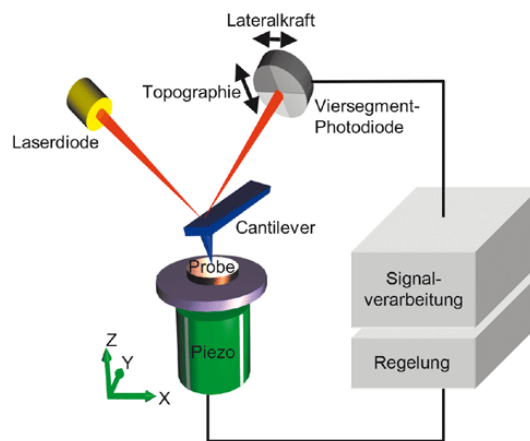


Abbildung 3.6.1: Schematische Darstellung eines Rasterkraftmikroskops

Abbildung 3.6.1 zeigt den Aufbau eines Rasterkraftmikroskops. Die zu untersuchende Probe wird mittels Schleuderbeschichtung (spin coating) auf einen Träger gebracht der wiederum dann mit einer feinen Spitze abgetastet wird. Der Träger befindet sich in einem 3D-Piezoscanner und die atomare Spitze ist an einen mikroskopischen Balken (Cantilever) befestigt. Die geringe Kraftkonstante des Cantilevers erlaubt es geringe Änderungen der Wechselwirkungen in der Nähe der Oberfläche zu detektieren. Durch Bewegung des 3D-Piezoscanners unterhalb der Spitze wird die Probe Zeile für Zeile abgetastet und es kann ein 2D-Höhenprofil der Oberfläche erstellt werden. Die Informationen für die erhaltenen Bilder stammen aus der elektrischen Regelung der Piezokristalle am Scanner (x,y-Information) sowie der Auslenkung des Cantilevers (Höheninformation).

Für die AFM gibt es verschiedene Betriebsmodi. Im „contact-mode“ bewegt sich die Spitze mit ständigem Kontakt zur Oberfläche. Die Höheninformation (z-Signal) ergibt sich aus der Auslenkung des Cantilevers oder bei konstantem Fotodiodenstrom aus der z-Position des Scanners. Die Spitze befindet sich dabei im ständigen Kontakt zu Probe, weshalb nur harte

Proben vermessen werden können. Im „tapping-mode“ wird ein oszillierender Cantilever verwendet, der es auch ermöglicht weiche Proben abzubilden. Hierbei wird mittels des Piezos der Cantilever mit der Spitze in der Nähe seiner Resonanzfrequenz angeregt und schwingt mit ca. 300 kHz. Die Höhenänderung wird in diesem Fall über die Änderung der Amplitude bzw. Phase der Schwingung ermittelt, die ebenfalls durch das Fotodiodensignal detektiert wird. Insbesondere zur Analyse von Polymeren (weiche Materie) ist der tapping mode gut geeignet, da ein Verkleben der Spitze und somit auch Verunreinigung der Spitze verhindert werden können, da die Spitze keinen dauerhaften Kontakt zu Probe hat.

Die zuvor angesprochenen Träger für die Probe bestehen meist aus Graphit oder MICA. Sie müssen atomar glatt und frei von Fehlstellen sein, da sonst die Qualität der Abbildung verschlechtert würde. Lässt sich die Probe nicht auf Graphit oder MICA abbilden, kann die Oberfläche durch Auftragung von Metallionen, Silanierung oder Thiolierung noch modifiziert werden.

Mittels geeigneter Software oder auch per Hand können die erhaltenen Bilder polymeranalytisch ausgewertet werden, wobei sich dafür das Höhenbild am besten eignet. Die Mittelwerte für die Längenverteilung beispielsweise zylindrischer Polymerbürsten ergeben sich wie folgt:

$$l_n = \frac{\sum_i n_i l_i}{\sum_i n_i} \quad (3.28)$$

$$l_w = \frac{\sum_i n_i l_i^2}{\sum_i n_i l_i} \quad (3.29)$$

l_i : gemessene Länge

n_i : Anzahl der Längen l_i

Hierbei ist l_n das Zahlenmittel und l_w das Gewichtsmittel der Längenverteilung.

3.7 Infrarot (IR)-Spektroskopie ^[9]

Die Infrarot-Spektroskopie basiert auf der Absorption von elektromagnetischen Wellen im infraroten Frequenzbereich. Die Moleküle gehen aus dem Schwingungszustand $\nu=0$ in den ersten angeregten Schwingungszustand $\nu=1$ über. Einen Schwingungsübergang dieser Art bezeichnet man als Grundschiwingung. Zudem können auch Valenz- und Streckschwingungen auftreten, die sich in einer Änderung der Bindungswinkel bzw. Änderung im Abstand zwischen den Atomen in Bindungsrichtung bemerkbar machen. Zudem gibt es noch Oberschwingungen, die Übergänge in höhere Schwingungsniveaus beschreiben und Kombinationsschwingungen, die bei einer Kopplung von verschiedenen Schwingungen auftreten. Jedoch spielen diese Schwingungen in der IR-Spektroskopie nur eine nebensächliche Rolle, da die Intensität meist sehr niedrig ist.

IR-aktiv sind nur solche Moleküle, die ein induzierbares Dipolmoment besitzen, das durch den Übergang in ein höheres Schwingungsniveau entsteht. Moleküle, in denen die Schwingungen symmetrisch zum Schwingungszentrum verlaufen, zeigen keine Änderung des Dipolmoments und deswegen sind solche Moleküle nur raman-aktiv. (Änderung der Polarisierbarkeit)

In einem IR-Spektrum wird die Transmission gegen die Wellenzahl aufgetragen. Folgender Zusammenhang besteht zwischen Transmission und Absorption:

$$A \sim \log\left(\frac{1}{T}\right) \tag{3.30}$$

Für die Wellenzahl gilt folgende Beziehung:

$$\tilde{\nu} = \frac{E}{h \cdot c} \tag{3.31}$$

$\tilde{\nu}$: Wellenzahl

E : Energie

h : Planck'sches Wirkungsquantum

c : Lichtgeschwindigkeit

Ein typisches IR-Spektrometer besteht aus der Anregungsquelle und einem optischen System bestehend aus Spiegeln und Linsen, die das Anregungslicht auf die Probe und den austretenden Strahl auf den Detektor (Photomultiplier) lenken. Das Interferometer, welches die Gangdifferenz der einfallenden Strahlung mittels eines Spiegels ändert, sitzt zwischen Probe und Anregungsstrahl. Es bewirkt, dass die Molekülschwingungen alle auf einmal angeregt werden. Daher muss die detektierte Intensität über eine Fouriertransformation von der Zeitabhängigkeit in eine Frequenzabhängigkeit transformiert werden. Deshalb haben die IR-Spektrometer von heute auch den Namen Fourier-Transform-IR-spektrometer.

3.8 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (engl. Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) ermöglicht die Beobachtung der freien Diffusion fluoreszierender Moleküle in Lösung. Es werden die Intensitätsfluktuationen der erfassten Emission gemessen, die einzelne Fluorophore durch Diffusion in und aus dem Beobachtungsvolumen verursachen. Durch Korrelation des zeitabhängigen Intensitätssignals kann der Diffusionskoeffizient des Fluorophors bestimmt werden. ^[137]

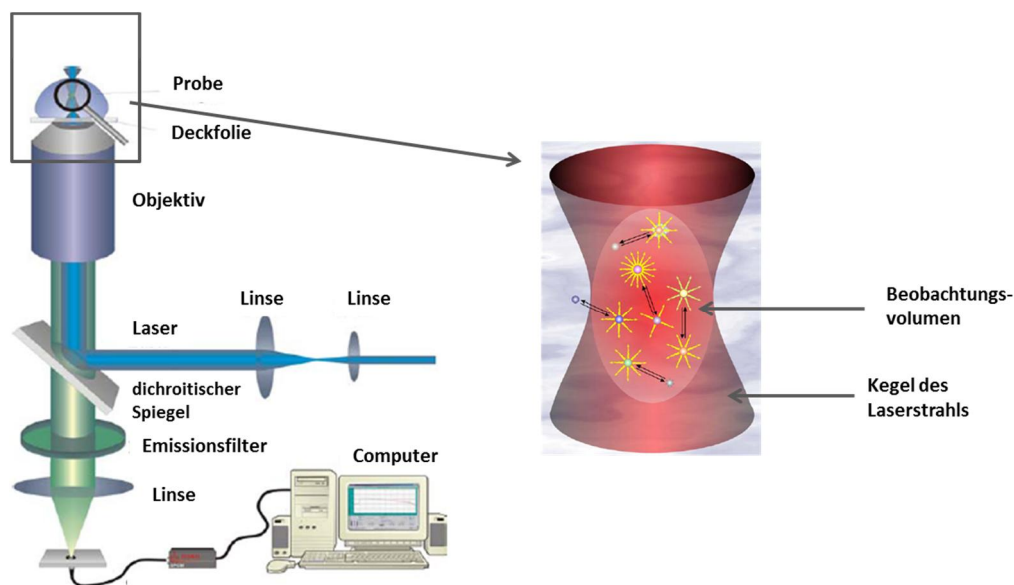


Abbildung 3.8.1: Prinzipieller Aufbau einer FCS-Apparatur mit Vergrößerung des Fokusbereichs ^[138]

Abbildung 3.8.1 zeigt den allgemeinen Aufbau einer FCS-Apparatur. Das Beobachtungsvolumen wird durch einen fokussierten Laserstrahl in einem konfokalen Aufbau geformt. Seine ellipsoide Form hat eine laterale Ausdehnung von 300 nm und 1.5 µm in z-Richtung. Die Partikelkonzentrationen, die zur Messung benötigt werden befinden sich im nanomolaren-Bereich, damit möglichst wenige Fluorophore zeitgleich im Beobachtungsvolumen durch den Laser angeregt werden (Einzelmoleküldetektion). Das Emissionslicht wird, nachdem es einen dichroitischen Spiegel passiert hat, von einer Avalanche Photodiode detektiert. Durch eine Lochblende vor dem Detektor wird Licht, das von Bereichen außerhalb des Beobachtungsvolumen stammt, abgeblockt.

Das Prinzip der FCS kann folgendermaßen beschrieben werden: Bei einem zylindrischen Beobachtungsvolumen mit den oben genannten Ausdehnungen beträgt das Volumen nach $V = \pi r^2 h$ etwa $0.1 \cdot 10^{-15}$ L. Bei einer Fluorophorkonzentration von 10 nM würden sich in einem stationären Experiment im Mittel 0.6 Moleküle dort aufhalten. Durch die zufällige Diffusion der Fluorophore kommt es zur zeitabhängigen Fluktuationen der Molekülanzahl im Volumen und somit auch zu zeitabhängigen Fluktuationen der Fluoreszenzintensität, die zur Auswertung korreliert wird (Abbildung 3.8.2).

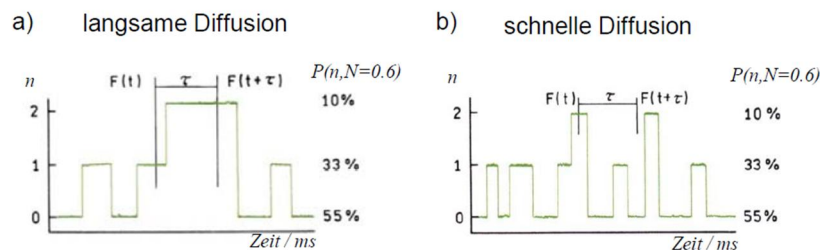


Abbildung 3.8.2: Zeitabhängige Fluktuation der Anzahl an Fluorophore n im Beobachtungsvolumen einer FCS-Apparatur; a) langsame Diffusion, b) schnelle Diffusion ^[137]

Basierend auf einer Poisson-Verteilung

$$P(n, N) = \frac{N^n}{n!} e^{-N} \tag{3.32}$$

kann die Wahrscheinlichkeit $P(n, N)$ berechnet werden, mit der sich zeitgleich n Fluorophore im Volumen aufhalten, wenn die Fluorophoranzahl im Mittel N beträgt. Abbildung 3.8.2 zeigt beispielhaft für $N = 0.6$ die Wahrscheinlichkeiten für kein, ein und zwei Fluorophore im Beobachtungsvolumen.

Die Autokorrelationsfunktion der Fluoreszenzintensität (nomiert auf die mittlere Intensität im Quadrat)

$$G'(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t + \tau) \rangle}{\langle F \rangle^2} \quad (3.33)$$

multipliziert die Fluoreszenzintensität $F(t)$ zu einem zeitlichen Startpunkt t (mit $t_{abs} = 0$) mit der Fluoreszenzintensität $F(t + \tau)$ zu einem späteren Zeitpunkt $(t + \tau)$. Dies wird sehr häufig für verschiedene Startzeiten $t_{abs} = 0$ durchgeführt und über alle Werte gemittelt $\langle g \rangle$. Entscheidend ist dabei die Fluktuation $\delta F(t)$ der Intensität $F(t)$ um den Mittelwert $\langle F \rangle$, gegeben durch

$\delta F(t) = \langle F \rangle - F(t)$, so dass Gleichung 3.33 umgeformt werden kann zu:

$$G'(\tau) = \frac{\langle F(0)F(\tau) \rangle}{\langle F \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta F(0)\delta F(\tau) \rangle}{\langle F \rangle^2} \quad (3.34)$$

Und die Autokorrelationsfunktion der Intensitätsfluktuationen wie folgt beschrieben werden kann:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(0)\delta F(\tau) \rangle}{\langle F \rangle^2} \quad (3.35)$$

Unter der Annahme, dass die Fluktuationen nur durch lokale Fluorophorkonzentrationsfluktuationen δC hervorgerufen werden und nicht durch andere Prozesse, wie zum Beispiel Intersystem-Crossing in strahlungslose Triplet-Zustände, erhält man

$$G(\tau) = \frac{B^2 \iint p(r)p(r') \langle \delta C(r, 0) \delta C(r', \tau) \rangle dV d'V}{[BC \int p(r) dV]^2} \quad (3.36)$$

C : mittlere Konzentration

B : Helligkeit (als Produkt aus Detektionseffizienz, Absorptionsquerschnitt und Quanten ausbeute der Emission)

r : Position des Fluorophors zum Zeitpunkt $t = 0$ bzw. r' wenn $t = \tau$

$p(r); p(r')$: Detektionsprofil an der Position r bzw. r'

Das Detektionsprofil entspricht dem Intensitätsprofil des fokussierten Laserstrahls, das über eine konfokale Optik beobachtet wird und durch eine dreidimensionale ellipsoide Gauß-Funktion beschrieben werden kann.

$$p(r) = I_0 \exp[-2(x^2 + y^2)/s^2] \exp(-\frac{2z^2}{u^2}) \quad (3.37)$$

s, u : Ausdehnung des ellipsoiden Volumens

Die Korrelationsfunktion für dreidimensionale Diffusion ist gegeben durch:

$$\langle \delta C(r, 0) \delta C(r', \tau) \rangle = \bar{C} (4\pi D\tau)^{2/3} \exp[-|r - r'|^2 / 4D\tau] \quad (3.38)$$

D : Diffusionskoeffizient

Setzt man Gleichung 3.38 in Gleichung 3.36 ein erhält man nach mathematischen Umformungen die Korrelationsfunktion für dreidimensionale Diffusion im Beobachtungsvolumen der FCS-Apparatur.

$$G(\tau) = G(0) \left(1 + \frac{4D\tau}{s^2}\right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{u^2}\right)^{-1/2} \quad (3.39)$$

$G(0)$: Amplitude für $\tau = 0$

Durch Umformen der Gleichung 3.39 mit der mittleren Anzahl an Fluorophore N im Beobachtungsvolumen V mit den Verhältnis der axialen zur radialen Ausdehnung ($S=s/u$) sowie der Diffusionszeit τ_D wird Gleichung 3.40 erhalten, mittels welcher die Auswertung der FCS-Messdaten erfolgt.^[139]

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2\tau_D}\right)^{-1/2} \quad (3.40)$$

Im Unterschied zur dynamischen Lichtstreuung mit der exponentiellen Autokorrelationsfunktion erhält man für die Autokorrelation des FCS-Signals eine hyperbolische Zeitabhängigkeit.

Gleichung 3.41 beschreibt den Zusammenhang der Diffusionszeit τ_D mit dem Diffusionskoeffizient für fluoreszierende Partikel, die nicht dem Ideal eines punktförmigen Fluorophors entsprechen.^[139]

$$\tau_D = \frac{r_0^2 + R_h^2}{4D} \quad (3.41)$$

R_h beschreibt den hydrodynamischen Radius, der für sphärische Partikel über die Stokes-Einstein-Gleichung (vgl. Gl. 3.32) mit dem Diffusionskoeffizienten D zusammenhängt, so dass zusätzlich ein Iterationsverfahren zur Auswertung nötig ist.

Um das Beobachtungsvolumen ($S=s/u$) zu bestimmen wird meist mit einem Fluorophor, dessen Diffusionskoeffizient bekannt ist, kalibriert. Hierzu eignet sich beispielsweise Rhodamin 6G in Wasser mit einem Diffusionskoeffizient von $D_{25^\circ\text{C}} = 2.8 \cdot 10^{-6} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$.^[140]

4 Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden Kapitel wird die Synthese von zylindrischen Bürsten auf der Basis von Poly(2-oxazolin)en durch die „Grafting Through“ Methode beschrieben. Der „Grafting Through“-Ansatz wurde gewählt um eine 100 %ige Grafting Dichte zu erzielen. Außerdem war eine separate Charakterisierung der Seitenketten möglich und es konnten zudem ausreichend hohe Molmassen erreicht werden.

Der erste Teil dieses Kapitels beschäftigt sich mit der Synthese eines Referenzpolymers bei dem 2-Isopropyl-2-oxazolin (IsOx) als Monomer gewählt wurde. Polymere aus IsOx besitzen eine Phasenübergangstemperatur von ungefähr 37°C ^[34] weshalb sie besonders interessant für Anwendungen im biomedizinischen Bereich sein können.

Die am Referenzpolymer erarbeitete Synthesestrategie wurde auf die Synthese von Azid-Endgruppen funktionalisierten Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürsten sowie Poly(2-ethyl-2-oxazolin)bürsten übertragen. Neben den Homopolymerbürsten wurden auch Azid-funktionalisierte Kern-Schale Bürsten mit 2-Ethyl-2-oxazolin als äußerem Block und 2-Isopropyl-2-oxazolin als innerem Block synthetisiert. Mittels Untersuchungen zum Aggregationsverhalten in humanem Serum, kupferfreier Click-Chemie und polymeranalogen Reaktionen wird die prinzipielle vielseitige Einsetzbarkeit dieser Polymere bei biomedizinischen Fragestellungen gezeigt.

Im weiteren Verlauf wird die Synthese einer Poly(2-oxazolin)bürste mit statistisch copolymerisierten Ethyl- und Formylseitenketten beschrieben. Durch Abspaltung der Formylschutzgruppen unter milden Bedingungen können Bürsten mit Imineinheiten erhalten werden, die zur Komplexierung von DNA geeignet sind.

4.1 Synthese zylindrischer Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürsten

Wie zuvor bereits erwähnt, wurde zur Synthese der zylindrischen Polymerbürsten die „Grafting-Through“ Methode gewählt. Dazu muss im ersten Schritt ein Makromonomer hergestellt werden, das eine polymerisierbare Gruppe besitzt, die im Weiteren zu einem Polymakromonomer polymerisiert werden kann. Um die gewünschten Makromonomere zu erhalten, wurden lineare Poly(2-oxazolin)ketten mit synthesebedingter terminaler sekundärer Aminogruppe zu einer Methacrylamid Gruppe funktionalisiert. Im nächsten Schritt konnten diese linearen Ketten dann durch freie radikalische Polymerisation zu zylindrischen Polymerbürsten polymerisiert werden. Es wurde bewusst die Methacrylamidfunktionalisierung gewählt, da das System, im Vergleich zu literaturbekanntem, keine hydrolyseempfindlichen Esterbindungen besitzt.

4.1.1 Synthese eines Methacrylatderivates zur Funktionalisierung linearer Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)en

Bei dem Molekül welches zur Funktionalisierung der linearen POx gewählt wurde, handelt es sich um ein 6-Methacrylamid-1-hexylchloroformiat, welches in einer zweistufigen Synthese ausgehend von 1-Amino-6-hexanol erhalten wurde. Im ersten Schritt wurde 1-Amino-6-hexanol mit einem N-Hydroxysuccinimidmethacrylsäureester umgesetzt, der zuvor in einer separaten Reaktion aus N-Hydroxysuccinimid und Methacrylsäurechlorid erhalten wurde (Abbildung 4.1.1).

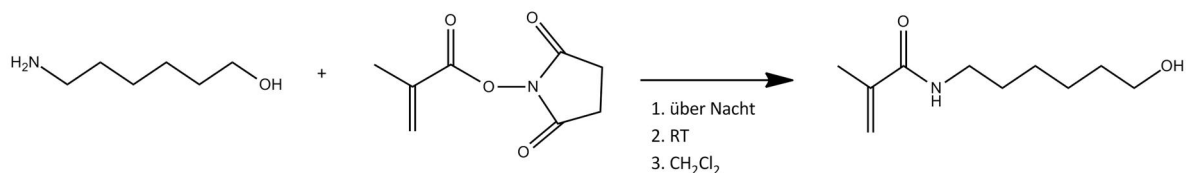


Abbildung 4.1.1: Syntheschema zur Herstellung von N-(6-Hydroxyhexyl)-methacrylamid

Die erfolgreiche Umsetzung wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie überprüft (Abbildung 4.1.2). Im Protonenspektrum sind keine Signale zu erkennen, die nicht dem gewünschten Produkt zugeordnet werden können.

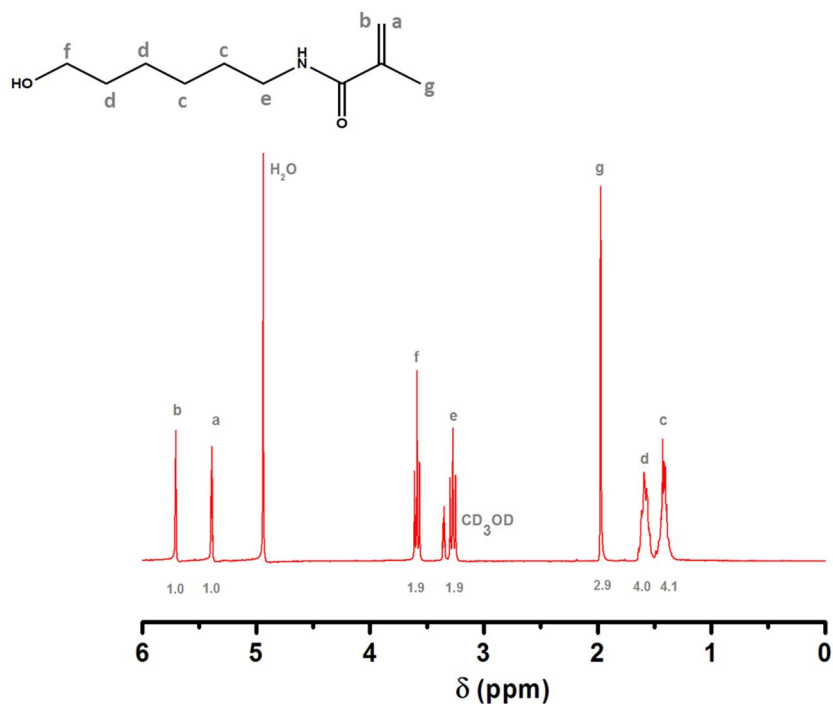


Abbildung 4.1.2: $^1\text{H-NMR}$ von N-(6-Hydroxyhexyl)-methacrylamid (300 MHz, $T=293\text{ K}$, LM: CDCl_3)

Im zweiten Schritt wurde das N-(6-Hydroxyhexyl)-methacrylamid mit Triphosgen umgesetzt, um das gewünschte 6-Methacrylamid-1-hexylchloroformiat zu erhalten (Abbildung 4.1.3). Da das erhaltene Chloroformiat luft- und lichtempfindlich ist wurde das isolierte Produkt sofort weiterumgesetzt.

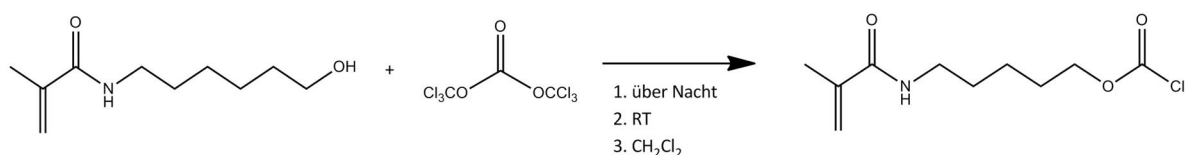


Abbildung 4.1.3: Syntheschema zur Herstellung von 6-Methacrylamid-1-hexylchloroformiat

Mit Hilfe der IR-Spektroskopie wurde überprüft, ob die Reaktion erfolgreich war. Chloroformiate besitzen eine charakteristische Schwingung bei $1700\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$

Wellenzahlen. Abbildung 4.1.4 zeigt das IR-Spektrum des synthetisierten Chloroformiats mit der charakteristischen Schwingung bei einer Wellenzahl von 1770 cm^{-1} (links) und das IR-Spektrum nach Umsetzung zum PiPrOx-Makromonomer (rechts). Nach der Reaktion des 6-Methacrylamid-1-chloroformiat mit dem linearen PiPrOx (siehe Kapitel 4.1.2) ist die Chloroformiatbande nicht mehr zu erkennen, was auf die erfolgreiche Umsetzung schließen lässt.

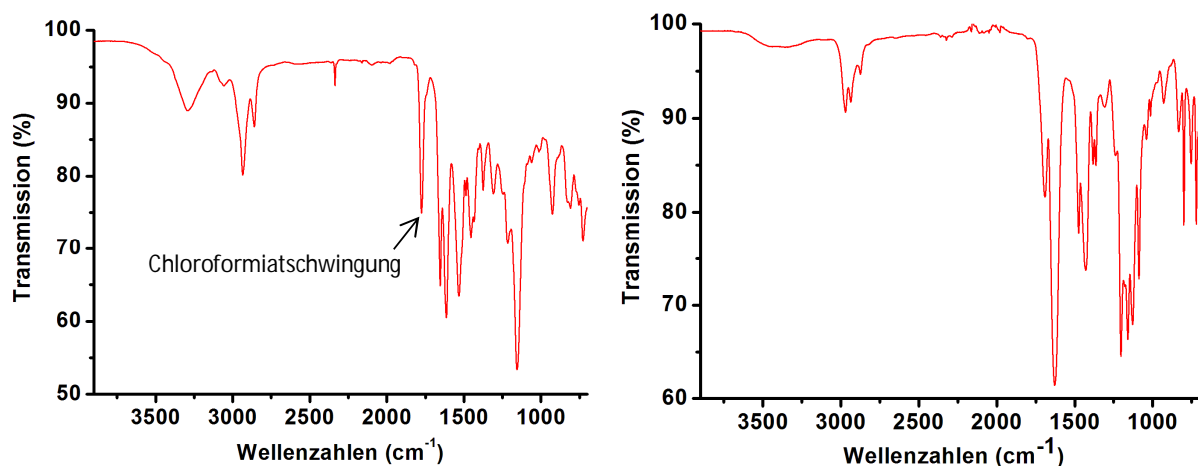


Abbildung 4.1.4: Links: IR-Spektrum des 6-Methacrylamid-1-hexylchloroformiat; rechts: IR-Spektrum des Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)makromonomers

4.1.2 Herstellung eines Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)makromonomers

Die Herstellung des Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)makromonomers besteht typischerweise aus drei Syntheseschritten. Im ersten Schritt wurde das Monomer 2-Isopropyl-2-oxazolin mittels lebender kationischer ringöffnender Polymerisation nach bekannten Vorschriften polymerisiert.^[122] Als Initiator wurde p-Toluolsulfonsäuremethylester verwendet, da dieser eine schnelle und quantitative Initiierung der Polymerisation ermöglicht. Der Abbruch erfolgte mit 1-Boc-piperazin, somit wurde bei der Terminierung eine latente Aminofunktionalität eingeführt, die als Tert-butyl-carbamat geschützt vorliegt (Abbildung 4.1.5). Das erhaltene Polymer wurde durch eine Flashchromatographie aufgereinigt und mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ (Abbildung 4.1.6) und MALDI-ToF (Abbildung 4.1.7) Spektroskopie analysiert.

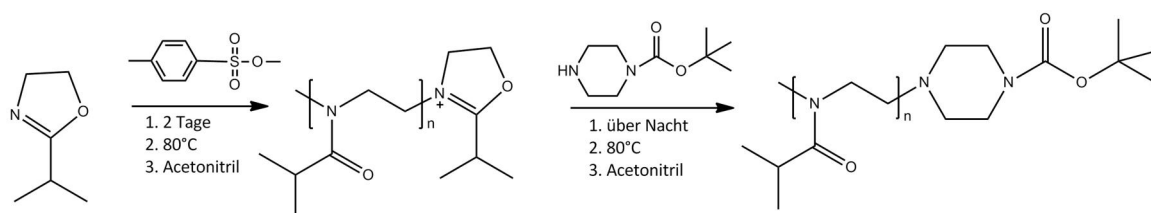


Abbildung 4.1.5: Reaktionsschema zu Herstellung des Boc-geschützten Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)s (PiPrOx)

Der Polymerisationsgrad P_n des linearen PiPrOx wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ und MALDI-ToF Spektroskopie errechnet. Das charakteristische Signal der Boc-Protonen im $^1\text{H-NMR}$ konnte in Beziehung zu den Protonen der Isopropylseitenkette gesetzt und somit der Polymerisationsgrad P_n ermittelt werden. NMR und MALDI-ToF liefern in sehr guter Übereinstimmung einen zahlenmittleren Polymerisationsgrad von $P_n = 27$. Da das NMR als Endgruppen-basierende Äquivalentmethode das identische Ergebnis liefert, wie die aus MALDI-TOF bestimmte Zahlenmittel fundierte Häufigkeitsverteilung und der daraus berechnete zahlenmittlere Polymerisationsgrad, ist davon auszugehen, dass innerhalb eines Fehlers von ca. 2 % eine quantitative Einführung der latenten sekundären Aminoendgruppe gelingt.

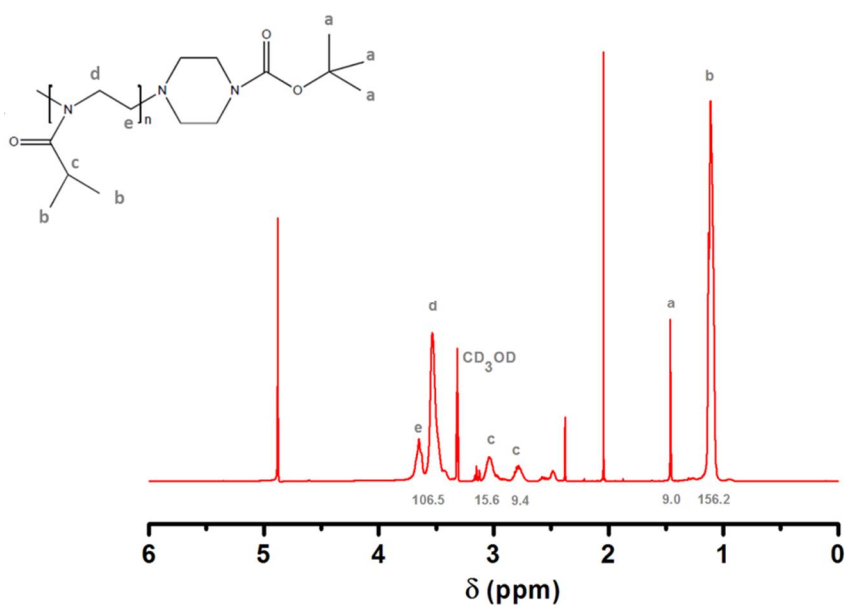


Abbildung 4.1.6: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des Boc geschützten Poly(2-isopropyl-2-oxazolin) (400 MHz, $T = 293\text{ K}$, LM: CD_3OD)

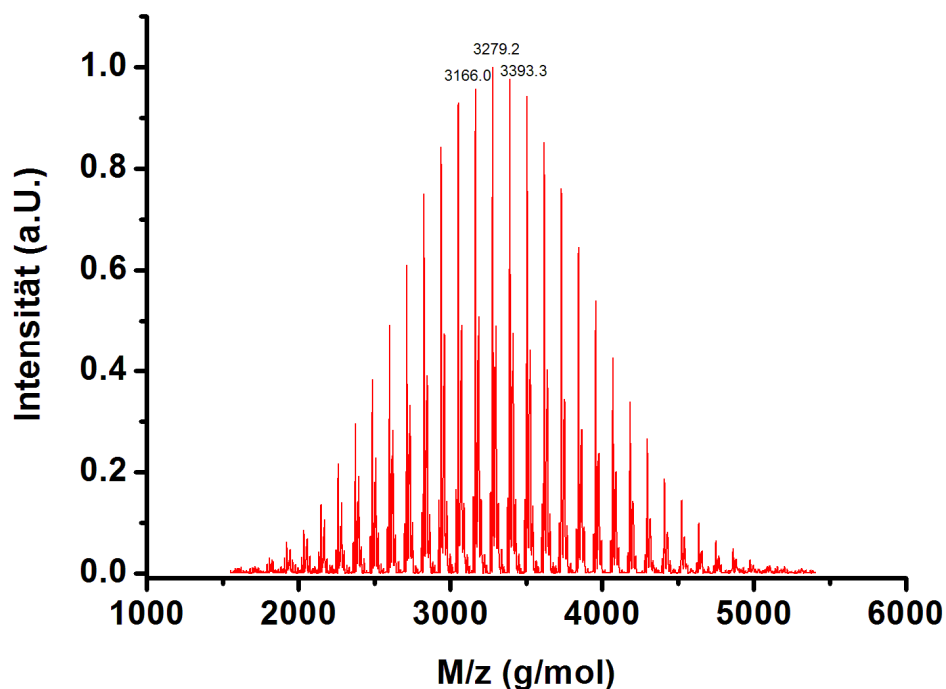


Abbildung 4.1.7: MALDI-ToF Spektrum des Boc geschützten Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)s

Zur Funktionalisierung des PiPrOx mit der Methacrylamidgruppe wird eine freie Aminogruppe an einem Ende des linearen PiPrOx benötigt, daher wurde im zweiten Schritt die Boc-Schutzgruppe am Terminus des Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)s abgespalten (Abbildung 4.1.8). Durch anschließende Behandlung mit einem Anionentauscher wurde die freie Aminogruppe erhalten.

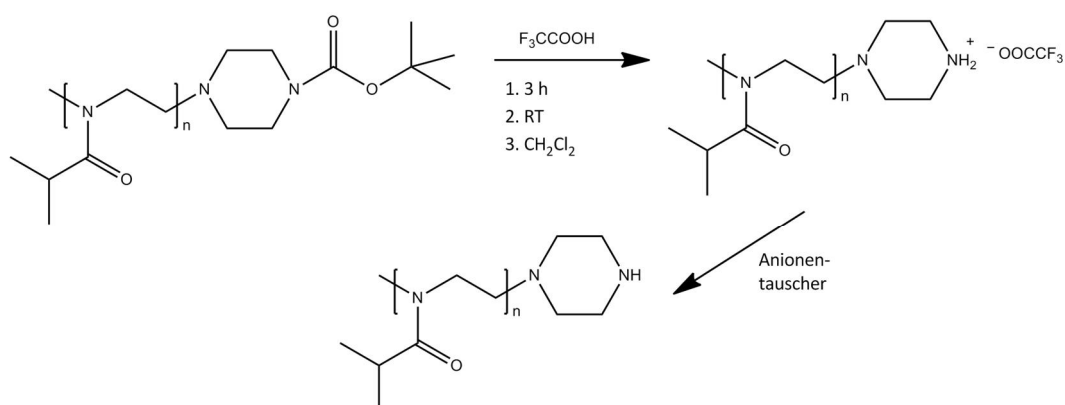


Abbildung 4.1.8: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe des PiPrOx

Die Aufnahme des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums des entschützten PiPrOx zeigt, dass die Reaktion quantitativ verlief. Das Spektrum der geschützten Probe (Abbildung 4.1.6) zeigt eindeutig die Protonen der Boc-Schutzgruppe bei einer chemischen Verschiebung von 1.5 ppm. Das NMR Spektrum der entschützten Probe (Abbildung 4.1.9) weist bei einer chemischen Verschiebung von 1.5 ppm keinen Peak mehr auf.

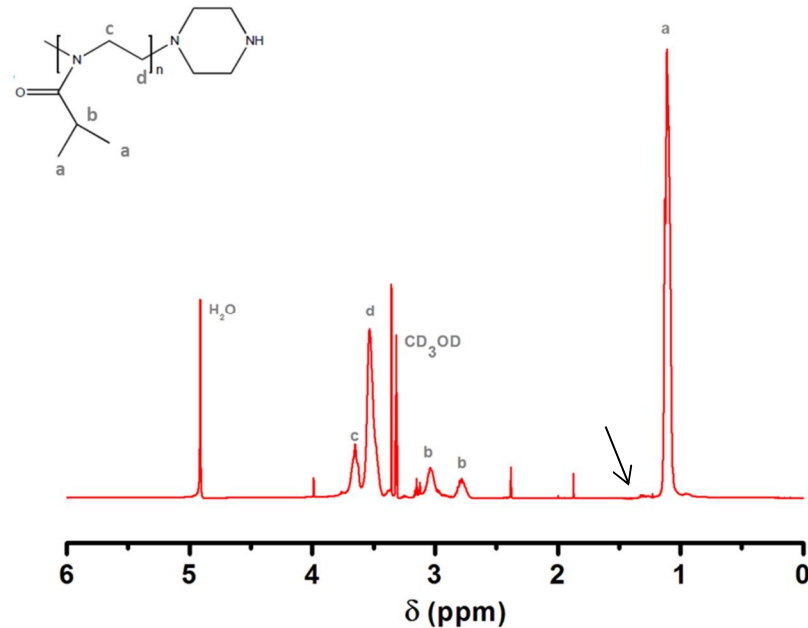


Abbildung 4.1.9 $^1\text{H-NMR}$ des entschützten Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)s (300 MHz, $T = 293\text{ K}$, LM: CD_3OD)

Im dritten Schritt wurde das 6-Methacrylamid-1-hexylchloroformiat mit dem Poly(2-isopropyl-2-oxazolin) nach einer Vorschrift von Fischer und Eisenbach ^[141] umgesetzt. Das freie Amin des PiPrOx reagiert mit dem Chloroformiat unter Abspaltung von Salzsäure zum gewünschten Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)makromonomer (Abbildung 4.1.10).

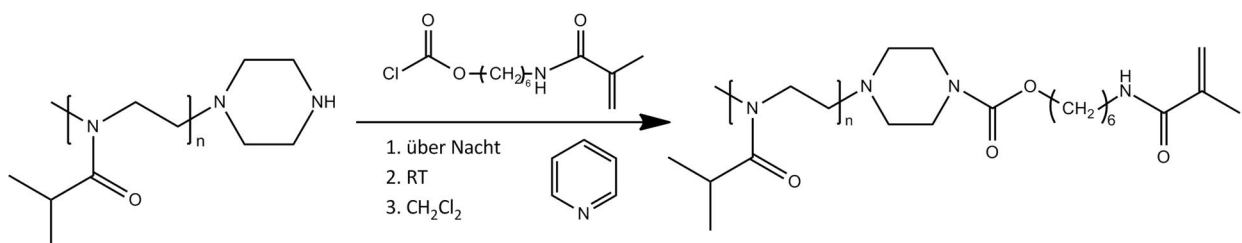


Abbildung 4.1.10: Kupplung des 6-Methacrylamid-1-hexylchloroformiates an das Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)

Das Makromonomer wurde durch Flashchromatographie aufgereinigt, so dass die radikalische Polymerisation möglich wird. Mit Hilfe von GPC (Abbildung 4.1.11), $^1\text{H-NMR}$ (Abbildung 4.1.12) und MALDI-ToF Spektroskopie (Abbildung 4.1.13) wurde das Makromonomer analysiert.

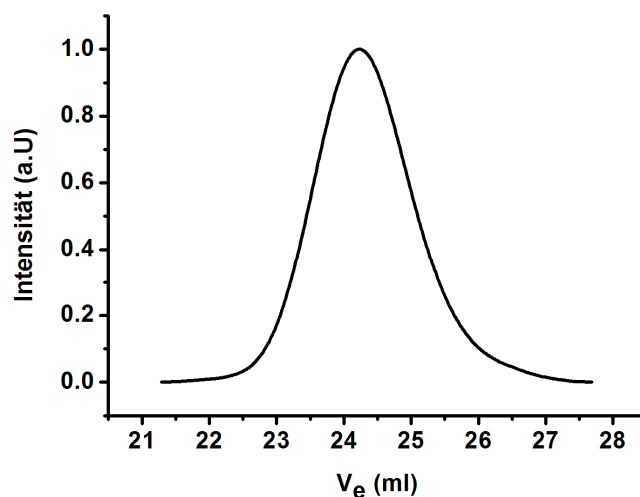


Abbildung 4.1.11: Gelpermeationschromatogram des Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)makromonomers in DMF (LiBr 1g/l, T=333 K)

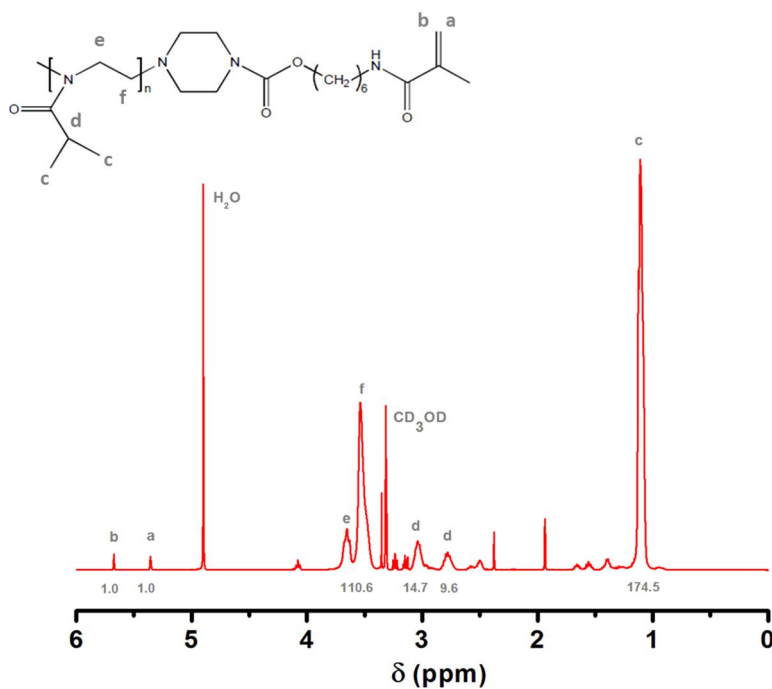


Abbildung 4.1.12: $^1\text{H-NMR}$ des Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)makromonomers (400MHz, T=293 K, LM: CD_3OD)

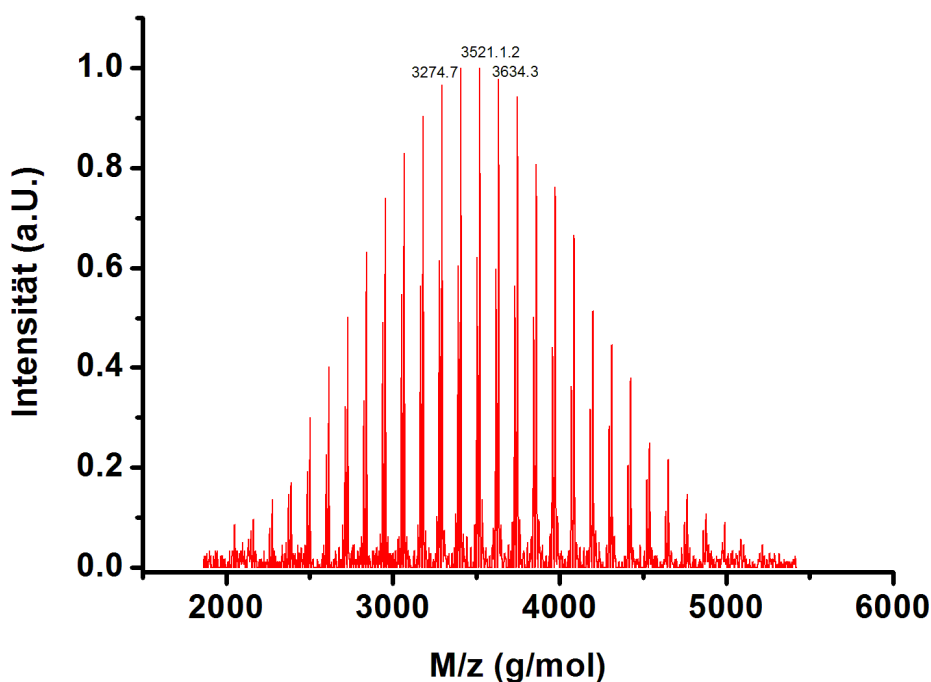


Abbildung 4.1.13: MALDI-ToF Spektrum des Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)makromonomers

In *Tabelle 4.1.1* sind die Ergebnisse der Charakterisierung des PiPrOx-Makromonomers zusammengefasst.

Tabelle 4.1.1: Vergleich der Analyseergebnisse von GPC, ¹H-NMR und MALDI-ToF

	M_w/M_n	$M_n / \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$M_w / \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	P_n
MALDI-ToF	1.03	3500	3600	28
¹ H-NMR		4000		32
GPC	1.04	5400*	5700*	

*Polystyrol Kalibrierung

Precursor und Makromonomer mit Methacrylamid Endgruppe zeigen nach MALDI-TOF mit einer Abweichung von weniger als 5 % identische zahlenmittlere Polymerisationsgrade. Damit liefert das NMR einen Funktionalisierungsgrad von ca. 90 % bei Annahme fehlerfreier Endgruppenbestimmung.

Allerdings ist die Molmasse, die aus den GPC-Daten erhalten wird viel zu groß. Dies ist leicht zu erklären, durch den Unterschied in der Molmasse pro Längeneinheit zwischen Poly(2-

isopropyl-2-oxazolin) und Polystyrol, das zur Kalibrierung verwendet wurde. Da Polystyrol ein um 25% größeres Masse-zu-Länge-Verhältnis besitzt, überschätzt die Polystyrolkalibrierung die eigentliche Molmasse des PiPrOx-Makromonomers und diese erscheint in der GPC viel größer. Kleinere Effekte, die zu einer vergrößerten Molmasse führen könnten, sind das ausgeschlossene Volumen, dessen Einfluss bei Oligomeren vernachlässigt werden kann oder ein Unterschied in der statistischen Kuhn-Segment-Länge.

4.1.3 Synthese und Charakterisierung zylindrischer Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürsten

Die Synthese des Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)makromonomers wurde in Kapitel 4.1.2 beschrieben. Durch die freie radikalische Polymerisation der Methacrylamidgruppe werden zylindrische Bürstenstrukturen erhalten. Wie schon aus den Arbeiten von Tsukahara et al. ^[53,142] bekannt ist, wird eine ungewöhnlich hohe Konzentration des Makromonomers benötigt um einen hohen Polymerisationsgrad zu erhalten. Nur so ist es möglich, den osmotischen Gradienten an den wachsenden Oligomeren und eine Diffusion der Makromonomere zur sterisch abgeschirmten wachsenden Radikalkette zu überwinden. Daher wurden die Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)makromonomere bei einer Temperatur von 62°C in Wasser für 24 h unter Argon polymerisiert (Abbildung 4.1.14). Wie schon in Kapitel 2 beschrieben, besitzt das Poly(2-isopropyl-2-oxazolin) eine Phasenübergangstemperatur von ungefähr 37°C. Die Polymerisationstemperatur von 62°C wurde bewusst über der Phasenübergangstemperatur in Wasser gewählt, so dass die Phasenseparation eintritt. Da die Konzentration des Makromonomers in der verdünnten Phase zu vernachlässigen ist, findet die Polymerisation hauptsächlich in der hochkonzentrierten Phase statt. Der wasserlösliche Initiator verteilt sich ebenfalls zwischen den beiden Phasen, wobei der Verteilungskoeffizient zu Ungunsten der polymerreichen, hydrophoberen Phase angenommen wird, so dass die Polymerisation in der hochkonzentrierten Polymerphase bei geringerer Radikalkonzentration höhere Molmassen liefert.

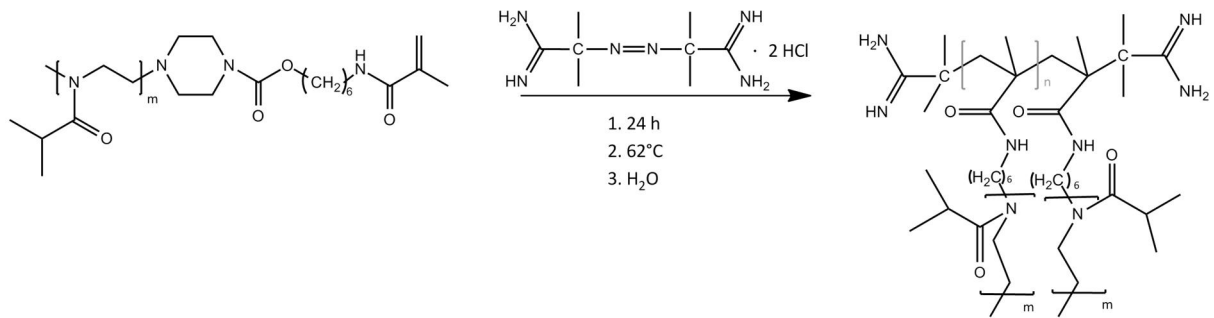


Abbildung 4.1.14: Reaktionsschema zur Synthese der Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste

Nach beendeter Polymerisation wurde eine trübe feste Polymerphase neben einer wässrigen Phase erhalten, die in Methanol gelöst wurde. Das Methanol wurde abgedampft und das Polymer wurde anschließend gefriergetrocknet um letzte Wasserreste zu entfernen. Um überschüssiges Makromonomer und niedermolekulare kugelförmige Polymerfraktionen abzutrennen wurde das erhaltene Polymer mit Hilfe von Amicon Zentrifugenfilter (Ausschlussgrenze 30000 g/mol) aufgereinigt.

Die erhaltenen Polymerbürsten wurden mittels GPC, dynamischer und statischer Lichtstreuung sowie Rasterkraftmikroskopie (AFM) charakterisiert.

Abbildung 4.1.15 zeigt das Gelpermeationschromatogramm der Polymerbürste. Es lässt sich erkennen, dass es sich um eine relativ breite Verteilung mit einer leichten Schulter bei kleineren Molmassen handelt. Die Polydispersität (PDI) beträgt 3.7. Diese breiten Verteilungen sind jedoch nicht untypisch für freie radikalische Polymerisationen, da die Abbruchreaktionen Disproportionierung und Rekombination nebeneinander auftreten und so der PDI stark variieren kann. Zudem wurde bei sehr hohen Umsätzen in gelartiger Phase polymerisiert.

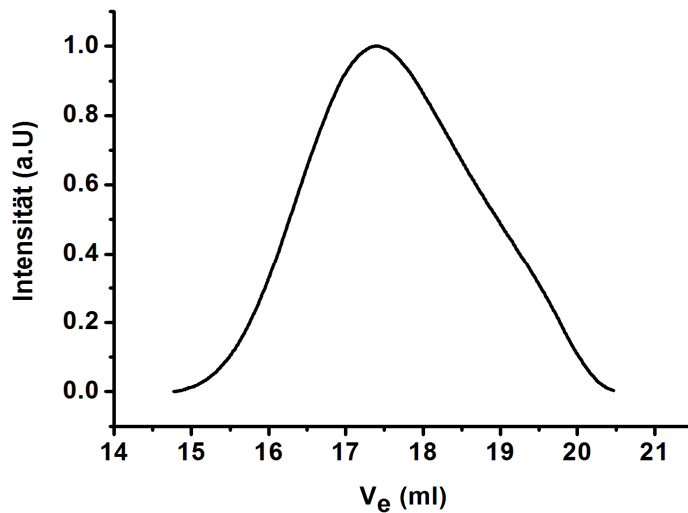


Abbildung 4.1.15: Gelpermeationschromatogram der Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürsten in DMF (LiBr 1g/l, $T=333$ K)

In Abbildung 4.1.16 und Abbildung 4.1.17 ist der Zimmplot sowie das Ergebnis der dynamischen Lichtstreuung der PiPrOx-Bürste gezeigt. Der Trägheitsradius der Bürste liegt bei 72.6 nm und der hydrodynamische Radius bei 41 nm. Somit ergibt sich ein ρ -Verhältnis von 1.77.

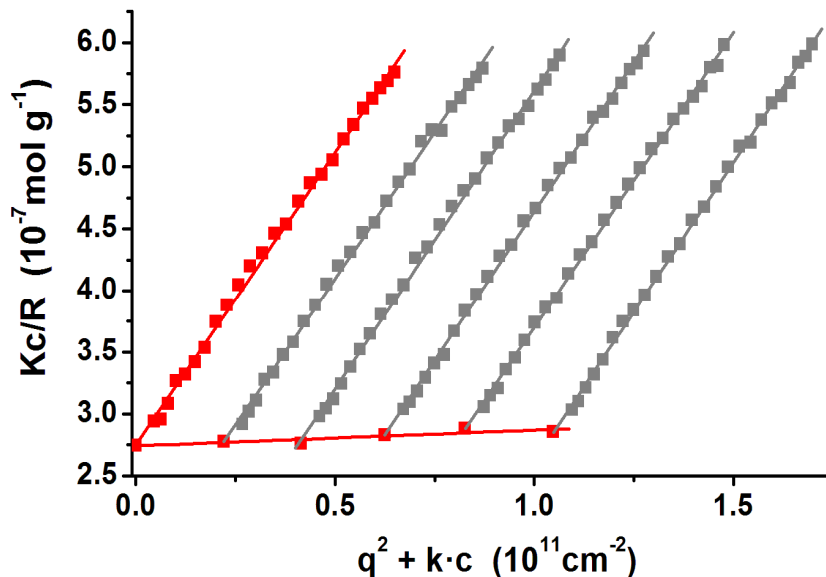


Abbildung 4.1.16: Zimmplot der PiPrOx-Bürste in Methanol bei $T=293$ K zwischen 30 und 150 Grad (5 Gradschritte); $c_1=0.2096$ g/l; $c_2=0.165$ g/l; $c_3=0.125$ g/l; $c_4=0.0828$ g/l; $c_5=0.0413$ g/l; $M_w=3.64 \cdot 10^6$ g/mol; $R_g=72.6$ nm; $A_2=4.66 \cdot 10^{-8}$ mol \cdot cm $^{-3}$ /g 2 ; $dn/dc=0.1434$ cm 3 /g; Salz: Lithiumbromid ($c=5$ mM); $k=5 \cdot 10^{14}$ cm/g

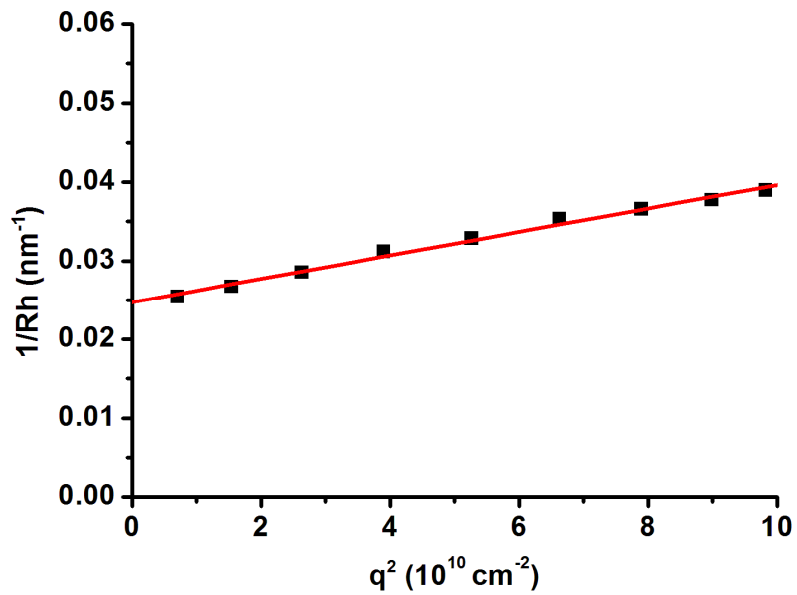


Abbildung 4.1.17: DLS der PiPrOx-Bürste in Methanol bei 293 K zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte); $c = 0.372 \text{ g/l}$; $\eta = 0.5867 \text{ cp}$; $R_h = 41 \text{ nm}$; Salz: Lithiumbromid ($c = 5 \text{ mM}$)

Als abbildende Charakterisierungsmethode wurde die Rasterkraftmikroskopie (AFM) gewählt. Abbildung 4.1.18 zeigt eine Aufnahme der PiPrOx-Bürsten, die durch spin coating auf eine Mica-Oberfläche aufgebracht wurden. Es ist eindeutig die wurmartige Topologie der Bürsten zu erkennen, welche nach den Ergebnissen der statischen und dynamischen Lichtstreuung erwartet wurden.

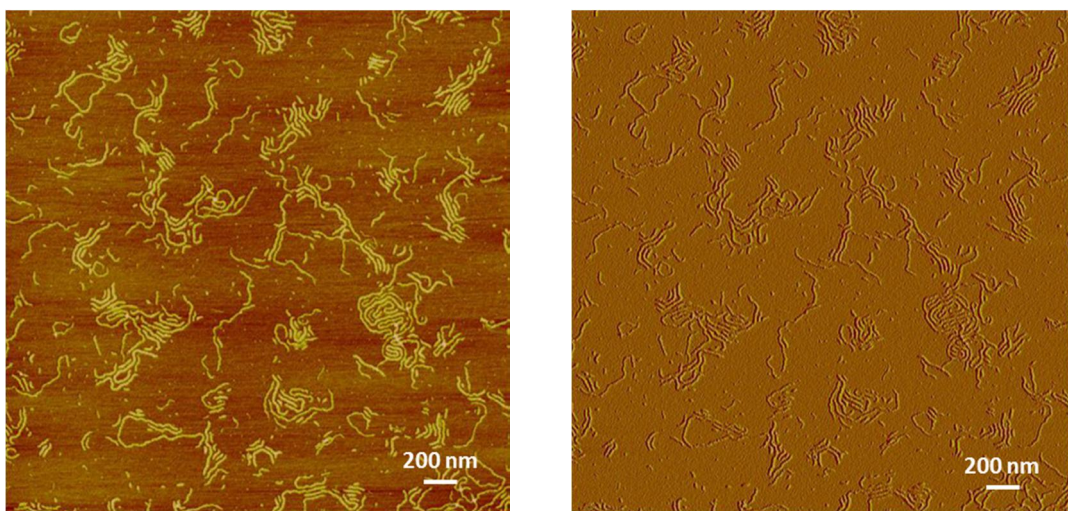


Abbildung 4.1.18: Trockene AFM-Aufnahme der Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste nach spin coating aus wässriger Lösung auf Mica; $c_{\text{Probe}} = 0.025 \text{ g/l}$; links: Höhenbild; rechts: Amplitudenbild

Der Polymerisationsgrad des Gewichtsmittels P_w beträgt 1050, wie die Ergebnisse aus Lichtstreuung und AFM zeigen (Tabelle 4.1.2). Die Konturlänge des Gewichtsmittels L_w , die aus der Lichtstreuung bestimmt wurde, passt sehr gut zu dem L_w , das aus den AFM-Messungen erhalten wurde, unter der Annahme, dass die Länge einer Wiederholungseinheit der Hauptkette 0.25 nm beträgt. Die AFM Polydispersität $L_w/L_n = 2.9$ stimmt qualitativ mit $M_w/M_n = 3.7$ aus den GPC-Messungen überein.

Tabelle 4.1.2: Ergebnisse der dynamischen und statischen Lichtstreuung sowie der AFM-Messung

R_g / nm	R_h / nm	A_2 / mol cm ³ g ⁻²	\bar{M}_w / g mol ⁻¹	L_w (LS) / nm	L_w^* (AFM) / nm	L_w/L_n^* (AFM)
72.6	41	$4.66 \cdot 10^{-8}$	$3.64 \cdot 10^6$	262	287	2.9

* Mittelwert aus 746 Polymerketten

Die Anwendung des Wurmkettenmodells^[143] unter Berücksichtigung der Polydispersität und Annahme einer Schulz-Flory Kettenlängenverteilung^[144] liefert eine statistische Kuhnlänge von $l_k = 110$ nm. Trotz der etwas größeren Polydispersität scheint die Schulz-Flory-Verteilung ein angemessenes Modell zu sein, da es sinnvolle Werte für l_k liefert, auch wenn die eigentliche Verteilung breiter ist. Die hohe Kettensteifheit, die sich in der großen Kuhnlänge widerspiegelt, passt sehr gut zu den visuellen Eindrücken auf den AFM-Aufnahmen der Einzelmolekülketten, die nicht Teil eines „Clusters“ sind. Die Tendenz zur Bildung von zweidimensionalen Clustern ist die Konsequenz von inter- und intramolekularen Wechselwirkungen, die durch den Absorptions- oder Trocknungsprozess beim Vorbereiten der AFM-Probe auftritt.

4.1.4 Phasenübergangstemperatur des PiPrOx-Makromonomers im Vergleich zur PiPrOx-Bürste

Die wasserlöslichen Poly(2-oxazolin)e besitzen, wie in Kapitel 2 beschrieben, in Wasser gelöst eine Phasenübergangstemperatur. Die Übergangstemperaturen (T_T) des PiPrOx-Makromonomers und der zylindrischen Bürste wurden mit Hilfe der UV-Spektroskopie bestimmt. Abbildung 4.1.19 zeigt die Trübungskurven für Makromonomer (rot) und Polymakromonomer (schwarz), die bei der Messung der Absorption bei 400 nm als Funktion

der Temperatur erhalten wurden. Es lassen sich eine Übergangstemperatur von $T_T = 50\text{ °C}$ für das PiPrOx-Makromonomer und eine Phasenübergangstemperatur von $T_T = 31\text{ °C}$ für die PiPrOx-Bürste ablesen. Der Übergang der Bürste scheint etwas schärfer (1.7 °C) zu sein im Vergleich zum Makromonomer (2.3 °C). Aus der Literatur ist bekannt, dass der Übergang von zylindrischen Bürstenpolymeren mit Poly(2-oxazolin)seitenketten vergleichsweise scharf ist. Der Unterschied von 20 °C zwischen dem Makromonomer und dem Polymakromonomer wurde erwartet, da die Phasenübergangstemperatur neben der Konzentration oder dem Salzgehalt auch von dem Molekulargewicht und der Dichte an hydrophoben Seitenketten abhängt. Dies bedeutet, dass mit zunehmendem Molekulargewicht und zunehmender Dichte an Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)ketten der Beitrag der Wasserstoffbrückenbindungen zur Löslichkeit gesenkt wird und die inter- und intramolekularen Wechselwirkungen zunehmen bis es schließlich zur Aggregation kommt. Da die lokale Dichte von PiPrOx-Ketten in der Polymerbürste viel größer ist verglichen mit der Dichte im Makromonomer, kommt es hier schon bei niedrigeren Temperaturen zur Aggregation der Polymere.

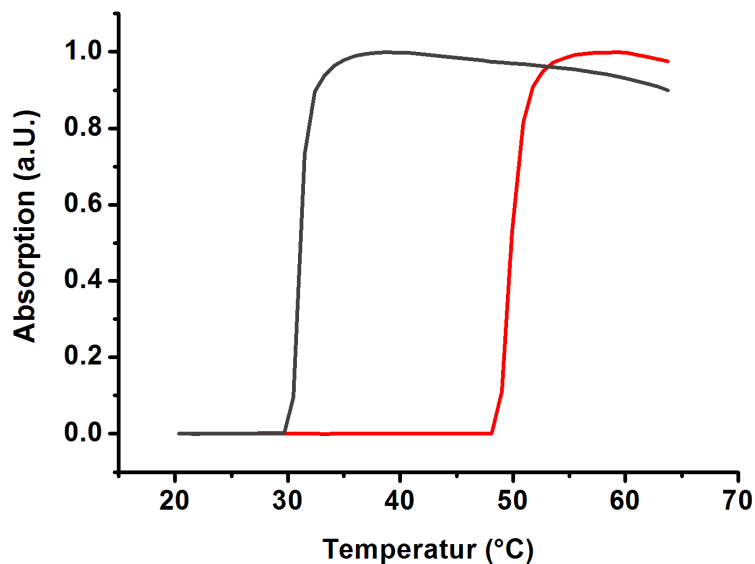


Abbildung 4.1.19: Absorption bei einer Wellenlänge von 400 nm als Funktion der Temperatur; $c = 1\text{ g/l}$; rote Kurve: PiPrOx-Makromonomer; schwarze Kurve: PiPrOx-Bürste

4.1.5 Moleküllkollaps der Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste im Bereich des Phasenübergangs

Da wie in Kapitel 4.1.4 gezeigt, die PiPrOx-Bürsten einen Phasenübergang besitzen, sollte nun das Phasenübergangsverhalten mittels dynamischer Lichtstreuung detaillierter untersucht werden, ähnlich zu früheren Studien von Bürstenpolymeren mit PNIPAM Seitenketten.^[145] Dynamische Lichtstreuung wurde bei einer kleinen Konzentration von $c = 0.043$ g/l gemessen, wobei die Temperatur erhöht wurde. Anfangs wurde in 2 °C Schritten erhöht, bis man bei 28 °C in die Nähe des Phasenübergangs kam und man nun in 0.5 °C – 0.2 °C Schritten die Temperatur erhöhte. Der hydrodynamische Radius wurde als Funktion der Temperatur aufgetragen (Abbildung 4.1.20) und es lässt sich eine eindeutige Abnahme des R_h bis hin zur Phasenübergangstemperatur bei $T_T = 29.8$ °C beobachten.

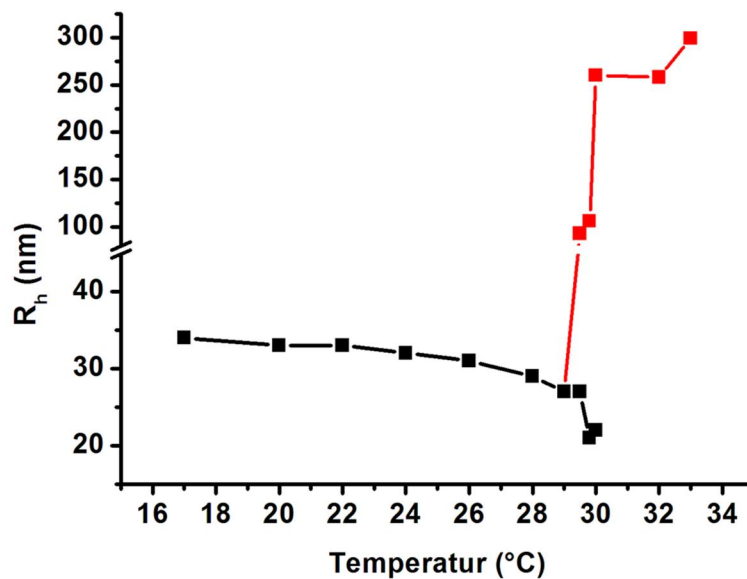


Abbildung 4.1.20: Kollaps und Aggregation der PiPrOx-Bürsten in wässriger Lösung als Funktion der Temperatur; $c = 0.043$ g/l; bis 29 °C wurden die Werte erst 30 min nachdem die gewünschte Temperatur erreicht wurde aufgenommen; ab 29 °C eine Stunde nachdem die gewünschte Temperatur erreicht wurde

Außerdem lässt sich erkennen, dass bei einer Temperatur von 29.8 °C neben Aggregaten mit einer Größe von 100 nm, auch kollabierte Einzelketten existieren. Mit zunehmender Zeit und Temperatur wachsen Fraktion und Größe der Aggregate, bis bei einer Temperatur von $T =$

33°C Aggregate von Größenordnungen zwischen 300 nm und Mikrometern die Streuintensität dominieren. Dies steht in Kontrast zu zylindrischen Bürsten mit PNIPAM Seitenketten, die bis 3°C oberhalb der Übergangstemperatur stabil als sphärische Einzelmoleküle vorlagen.^[145] Die Bildung von Aggregaten aus mehreren Ketten ist ähnlich zu den flexiblen linearen Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)en^[146] sowie zu kurzkettigen zylindrischen Poly(2-ethyl-2-oxazolin)bürsten.^[123]

Die weitere Abnahme von R_h der Einzelmolekülketten im Bereich der Koexistenz von Aggregaten und Einzelketten kann durch einen weiteren Kollaps der Polymerbürste bis hin zu einem R_h von 22 nm erklärt werden oder durch Fraktionierungseffekte, wenn etwa bevorzugt längere Polymerketten im bereits phasenseparierten Bereich aggregieren.

4.1.5 Zusammenfassung von Kapitel 4.1

Die „Grafting-Through“-Methode kann verwendet werden, um hochmolekulare Poly(2-oxazolin)bürsten zu synthetisieren. Es konnte mit Hilfe dieser Methode ein Referenzsystem hergestellt werden, an dem erste Charakterisierungsversuche erfolgreich durchgeführt wurden und eine allgemeine Methodik der Charakterisierung erarbeitet werden konnte.

Um dieses Referenzsystem zu synthetisieren wurde in einer mehrstufigen Synthese ein Makromonomer aus 2-Isopropyl-2-oxazolin hergestellt. Dazu wurde in zwei Stufen ein Reagenz zu Methacrylamidfunktionalisierung von linearem Poly(2-isopropyl-2-oxazolin) synthetisiert. Dieses 6-Methacrylamid-1-hexylchloroformiat wurde dann an ein durch die Terminierung der lebenden kationischen ringöffnenden Polymerisation aminfunktionalisiertes lineares Poly(2-isopropyl-2-oxazolin) gekoppelt. Durch anschließende freie radikalische Polymerisation oberhalb der Phasenübergangstemperatur konnten zylindrische Bürsten mit einem hohen Molekulargewicht erhalten werden. Mittels Analyse durch dynamische und statische Lichtstreuung konnten der Trägheitsradius und der hydrodynamische Radius sowie das Molekulargewicht bestimmt werden. Die Abbildung mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie visualisierte schließlich die gewünschten stäbchenförmigen Strukturen. Zur Bestimmung der Phasenübergangstemperaturen der Makromonomers und der Polymerbürsten wurde die Absorption als Funktion der Temperatur untersucht. Die Übergangstemperatur der Bürsten ($T_T = 31^\circ\text{C}$) unterscheidet sich um 19°C von der des

Makromonomer (50°C). Abschließend konnte mittels dynamischer Lichtstreuung das Phasenübergansverhalten der PiPrOx-Bürsten an der Phasengrenze untersucht werden. Bis zur ihrer Phasenübergangstemperatur kann eine Abnahme des hydrodynamischen Radius beobachtet werden. Oberhalb ihrer T_T liegen kollabierte Einzelmolekülketten neben sekundären Aggregaten vor.

4.2 Synthese, Charakterisierung und polymeranaloge Umsetzung Azid-funktionalisierter Poly(2-oxazolin)bürsten

Die in Kapitel 4.1 beschriebene Synthese der Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürsten als Referenzsystem diente zur Etablierung einer Syntheseroute um Poly(2-oxazolin)bürsten durch die „Grafting Through“-Technik darzustellen und erste Charakterisierungsversuche durchzuführen. Im Folgenden soll nun die Synthese von Poly(2-oxazolin)bürsten mit einer Azid-Funktionalisierung beschrieben werden. Durch Click-Chemie oder Reduktion der Azid-Gruppe zu einem sekundären Amin können die Bürsten mit Farbstoffen oder biologisch aktiven Molekülen wie Proteinen, Antikörper und Zuckerreste funktionalisiert werden.

4.2.1 Synthese eines Azid-funktionalisierten Initiators

Für die Synthese der Azid-funktionalisierten Bürstenpolymere wurde ein Initiator hergestellt, der bei der Initiierung der lebenden kationischen Polymerisation der 2-Oxazoline eine Azid-Gruppe am α -Terminus einführt. So werden später zylindrische Poly(2-oxazolin)bürsten mit eine Azid-Gruppe pro Seitenkette erhalten.

Der gewünschte Azid - Initiator wurde in einer zweistufigen Synthese nach der Vorschrift von Kim et al. ausgehend von 6-Chlorohexanol hergestellt.^[16] Durch nukleophile Substitution des 6-Chlorohexanols mit Natriumazid wurde im ersten Schritt 6-Azidohexanol erhalten (Abbildung 4.2.1).

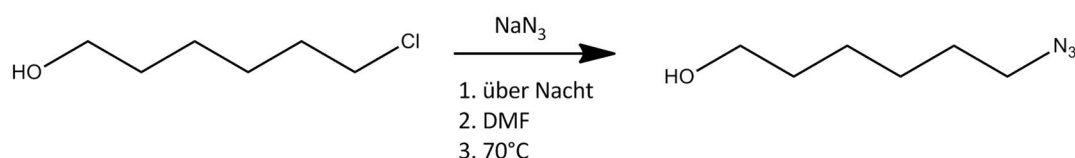


Abbildung 4.2.1: Reaktionsschema zur Herstellung von 6-Azidohexanol

Dieses wurde im nächsten Schritt ohne weitere Aufreinigung sofort verwendet. Das 6-Azidohexanol wurde mit Tosylchlorid unter Abspaltung von Salzsäure zum gewünschten 6-Azido-1-hexyltosylat umgesetzt (Abbildung 4.2.2). Die Hexylkette zwischen der Azid-Gruppe

und dem Tosylrest wurde gewählt, da so in den Polymerbürsten noch ein hydrophober Spacer eingebaut wird, der im Hinblick auf eventuelle Zellexperimente von Vorteil sein könnte.

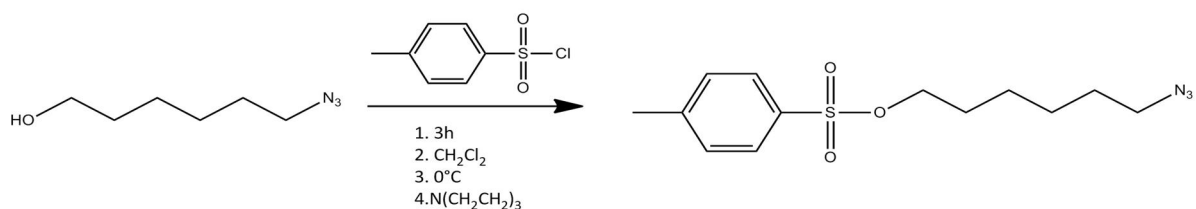


Abbildung 4.2.2: Reaktionsschema zur Synthese des Azid-Initiators, 6-Azido-1-hexyltosylat

Nach Aufreinigung des Produktes durch Flashchromatographie wurde die erfolgreiche Umsetzung mittels ¹H-NMR-Spektroskopie und IR-Spektroskopie überprüft. Besonders die IR-Spektroskopie eignet sich zum Nachweis von Azid-Gruppen, da diese im IR eine charakteristische Schwingung bei ungefähr 2100 cm⁻¹ besitzen. Das Protonenspektrum zeigt keine Signale, die nicht dem gewünschten Produkt zugeordnet werden können (Abbildung 4.2.3).

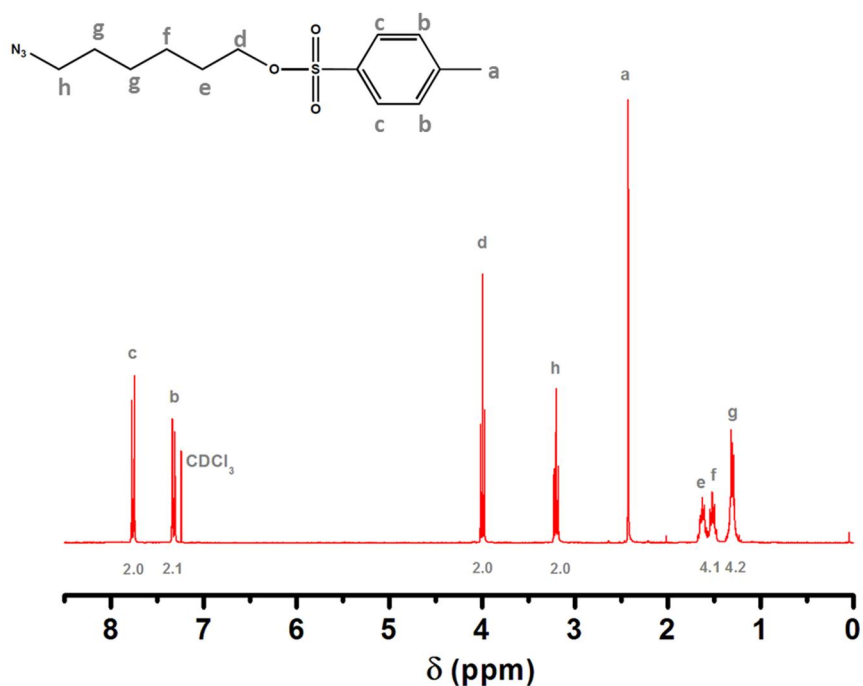


Abbildung 4.2.3: ¹H-NMR-Spektrum des 6-Azido-1-hexyltosylats (300 MHz, T=293 K, LM: CDCl₃)

In Abbildung 4.2.4 ist das IR-Spektrum des Azid-Initiators gezeigt. Wie erwartet lässt sich die charakteristische Azid-Schwingungsbande bei einer Wellenzahl von 2100 cm^{-1} eindeutig zuordnen.

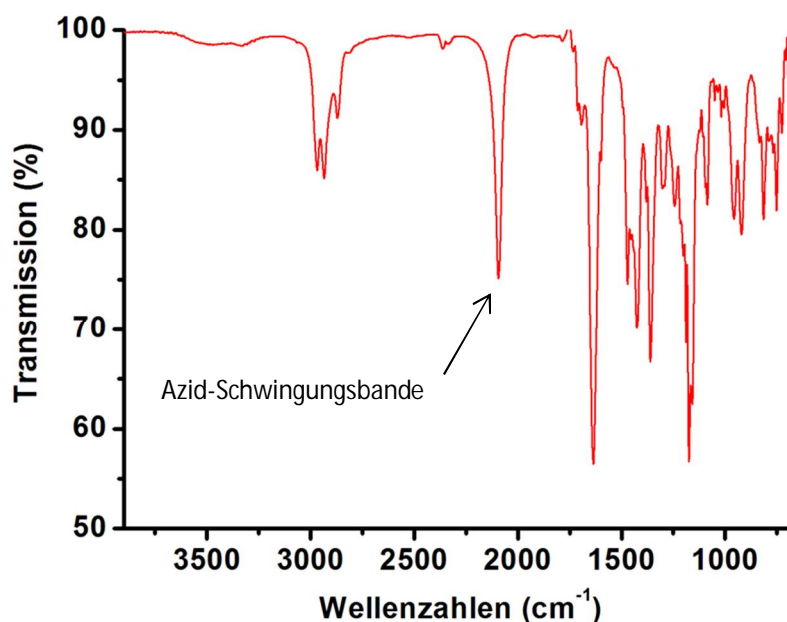


Abbildung 4.2.4: IR-Spektrum des 6-Azido-1-hexyltosylats

4.2.2 Synthese Azid-funktionalisierter Poly(2-oxazolin)makromonomere

Die Herstellung der Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)makromonomere erfolgte analog zu der in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Synthesestrategie zur Darstellung eines Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)makromonomers. Im ersten Schritt wurde das gewünschte Monomer, 2-Ethyl-2-oxazolin oder 2-Isopropyl-2-oxazolin, mittels lebender kationischer ringöffnender Polymerisation polymerisiert. Als Initiator wurde nun das Azido-Tosylat verwendet, das die Azid-Gruppe am α -Terminus einführt. Der Abbruch folgte wie schon zuvor durch Mono-boc-piperazin. Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde das lineare Poly(2-oxazolin), das am α -Terminus die Azid-Gruppe besitzt und am ω -Terminus eine sekundäre Amingruppe, mit dem 6-Methacrylamid-1-hexyl-chloroformiat am ω -Ende funktionalisiert um die polymerisierbare Methacrylamidgruppe einzubringen (Abbildung 4.2.5).

4 Ergebnisse und Diskussion

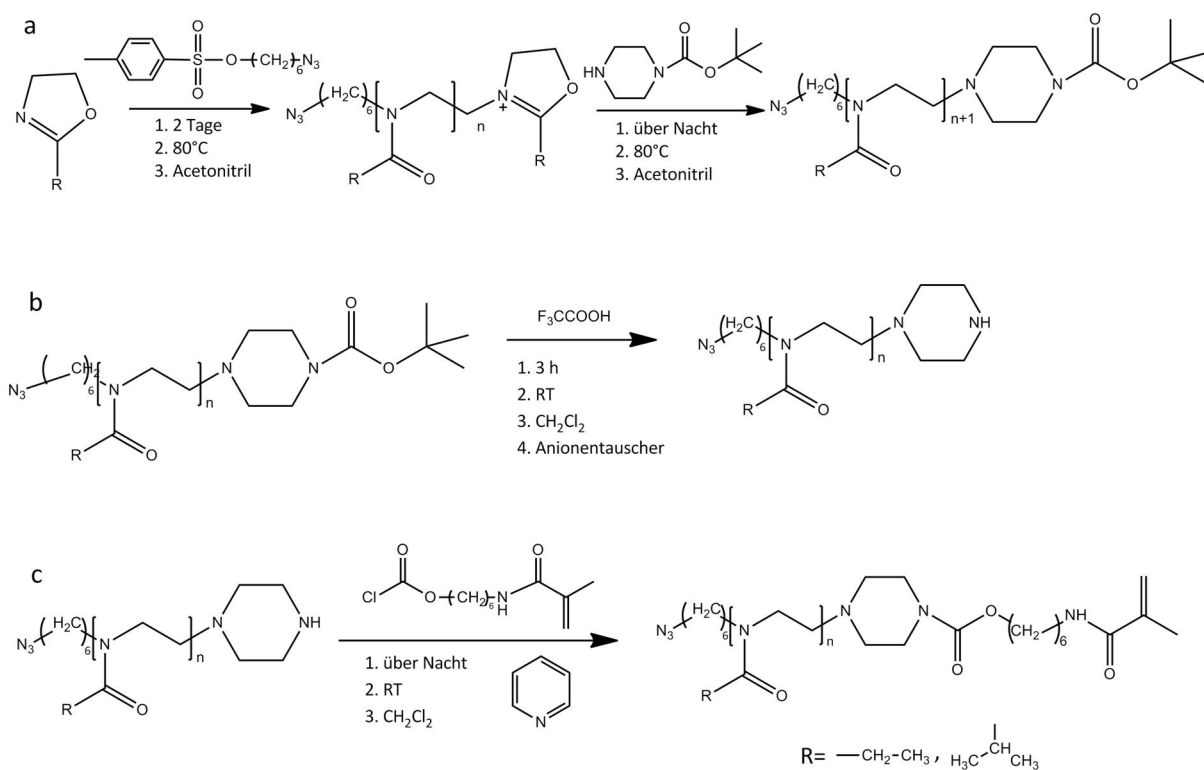
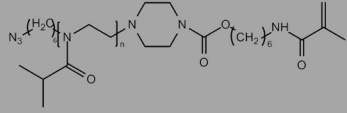
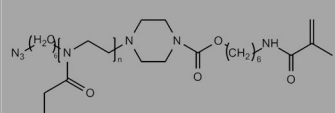
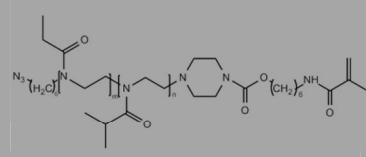


Abbildung 4.2.5: Reaktionsschema zur Synthese Azid-funktionalisierter Poly(2-oxazolin)makromonomere. a: lebende kationische ringöffnende Polymerisation des 2-Oxazolinmonomers mit Azid-Initiator; b: Abspaltung der Boc-Schutzgruppe; c: Funktionalisierung mit der Methacrylamidgruppe

Es wurden neben den Homopolymermakromonomeren aus 2-Ethyl-2-oxazolin und 2-Isopropyl-2-oxazolin auch ein Block-co-makromonomer hergestellt mit einem Poly(2-ethyl-2-oxazolin)block am Azid-Terminus und einem Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)block am ω -Ende. Die lebende kationische ring-öffnende Polymerisation von 2-Ethyl-2-oxazolin wurde durch den Azid-Initiator gestartet, mittels Dünnschichtchromatographie wurde auf den vollständigen Umsatz des EtOx geprüft, bevor das 2-Isopropyl-2-oxazolin für den zweiten Block zugegeben wurde. Der Abbruch und die weitere Funktionalisierung erfolgten dann Analog zu der zuvor beschriebenen Syntheseroute. Das Blocklängenverhältnis wurde mit Hilfe der 1H -NMR-Analyse auf 60% PEtOx zu 40% PiPrOx bestimmt. Nach der Funktionalisierung mit dem 6-Methacrylamid-1-hexylchloroformiat wurden die Makromonomere durch Dialyse gegen Methanol mit einer Ausschlussgrenze von 1000 g/mol aufgereinigt, um überschüssiges Chloroformiat abzutrennen. Mittels GPC, 1H -NMR-Spektroskopie, IR- und MALDI-ToF Spektroskopie wurden die Makromonomere analysiert.

Tabelle 4.2.1 fasst die Ergebnisse aus NMR-Spektroskopie, GPC und MALDI-ToF-Spektroskopie der Makromonomere zusammen.

Tabelle 4.2.1: Vergleich der Analyseergebnisse aus $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, GPC und MALDI-ToF-Spektroskopie

	$\text{N}_3\text{-PiPrOx}$ 	$\text{N}_3\text{-PEtOx}$ 	$\text{N}_3\text{-PEtOx-b-PiPrOx}$ 
M_w/M_n (MALDI)	1.13	1.2	-
M_w/M_n (GPC)	1.16	1.25	-
M_n (MALDI) / $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	4707	3623	-
M_n ($^1\text{H-NMR}$) / $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	4946	3694	5869
M_n (GPC)* / $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	8877	10322	-
M_w (MALDI) / $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	5292	4330	-
M_w (GPC)* / $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	10340	12866	-
P_n ($^1\text{H-NMR}$)	40	33	61
P_n (MALDI)	38	32	

* Polystyrol-Kalibrierung

Da sowohl die GPC als auch die MALDI-ToF Messungen nicht ohne Probleme verliefen, konnte aus Substanzmangel das Blockcopolymer nicht durch diese beiden Methoden analysiert werden. Vergleicht man die Resultate der verschiedenen Analysemethoden für die Makromonomere $\text{N}_3\text{-PiPrOx}$ und $\text{N}_3\text{-PEtOx}$ so lässt sich erkennen, dass die Ergebnisse aus NMR und MALDI-ToF gut übereinstimmen. Desweiteren fällt auf, dass die Werte der Molmasse, die aus den GPC-Messungen erhalten wurden viel zu groß sind. Dies liegt daran, wie auch schon in Kapitel 4.1.2 beschrieben, dass Poly(2-oxazolin)e und Polystyrol, dass zur Kalibrierung verwendet wurde, ein unterschiedliches Masse-zu-Länge Verhältnis besitzen, welches die Molmasse größer erscheinen lässt. Möglicherweise führt die Unlöslichkeit der $\text{C}_6\text{-Spacer}$ zwischen Azid-Gruppe und Polymer in DMF zur Bildung von Aggregaten, die das Molekulargewicht ebenfalls größer erscheinen lassen. Abbildung 4.2.6 zeigt exemplarisch die

GPC-Messung für das N₃-PiPrOx Makromonomer. In Abbildung 4.2.7 und Abbildung 4.2.8 sind das ¹H-NMR- und MALDI-ToF-Spektrum für das N₃-PiPrOx gezeigt. Alle weiteren Spektren der anderen Makromonomere sind im Anhang ersichtlich.

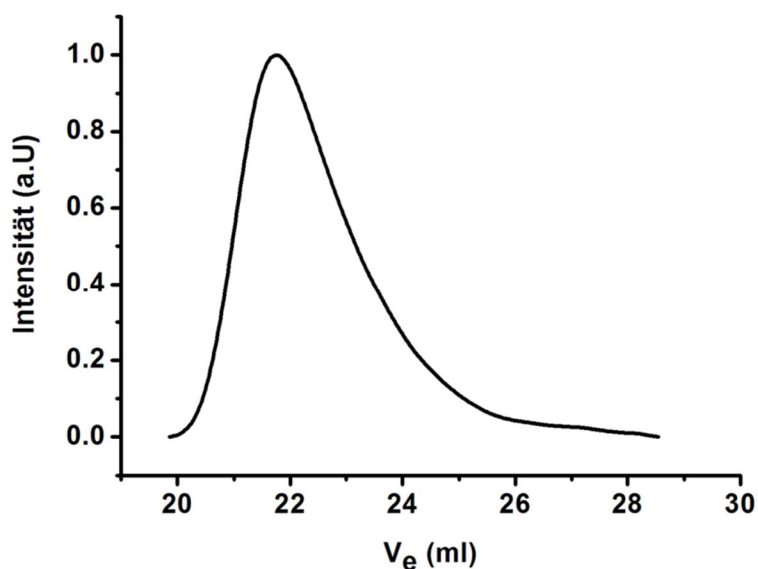


Abbildung 4.2.6: Gelpermeationschromatogram des Azid-funktionalisierten Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)makromonomers in DMF (LiBr 1g/l, T=333 K)

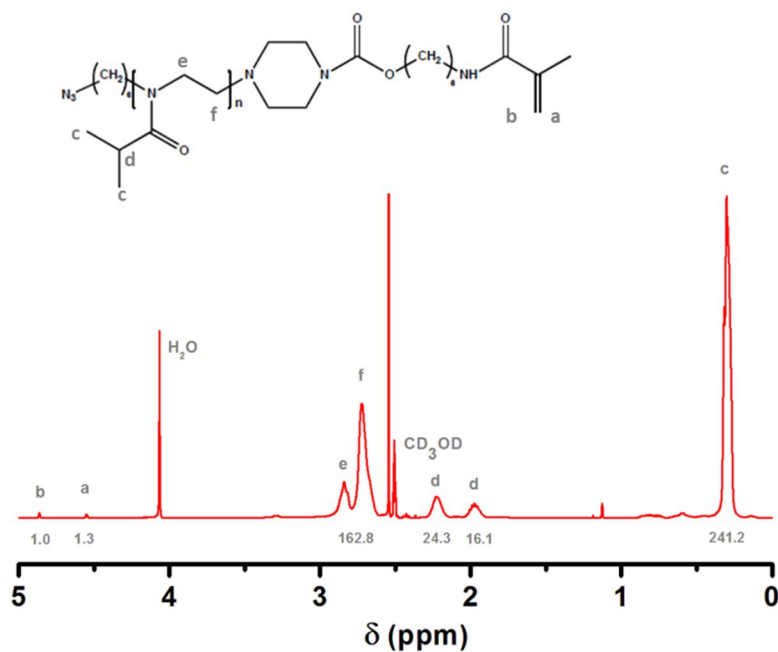


Abbildung 4.2.7: ¹H-NMR des N₃-Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)makromonomers (400MHz, T=293 K, LM: CD₃OD)

Durch die Bestimmung des Verhältnisses der Methacrylamidprotonen zu den Protonen der Isopropylseitenketten bzw. der Ethylseitenkette konnte der Polymerisationsgrad P_n aus dem NMR bestimmt werden. Die Hauptverteilung des MALDI-ToF Spektrum stellt das Azid-funktionalisierte PiPrOx-Makromonomer dar, allerdings findet eine Fragmentierung der Azidgruppe statt, so dass N_2 freigesetzt wird und eine Aminogruppe zurück bleibt. Die Tatsache, dass Fraktionierungseffekte in der MALDI-ToF Spektroskopie nicht unterbunden werden können und es Probleme bei den Messungen mit den Makromonomeren gab führte dazu, dass für alle weiteren Berechnungen die Werte aus der 1H -NMR Spektroskopie verwendet wurden.

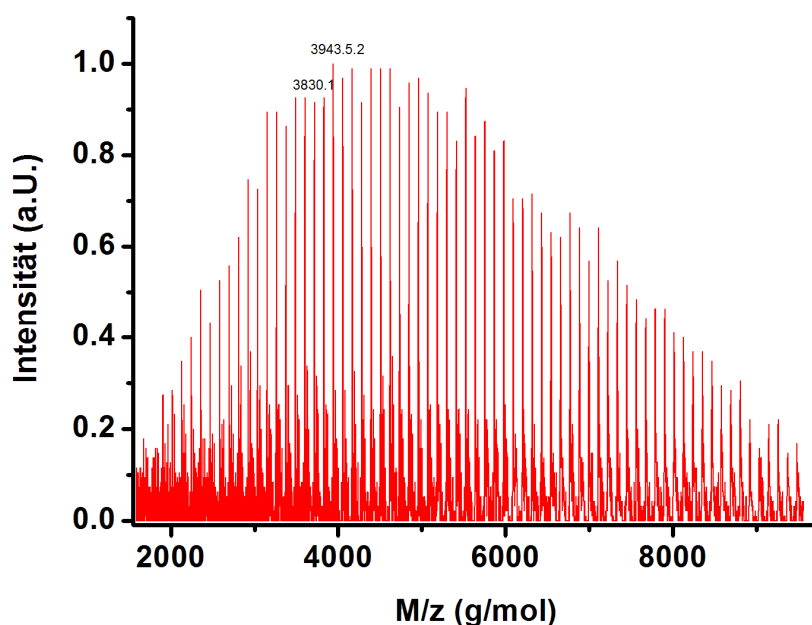
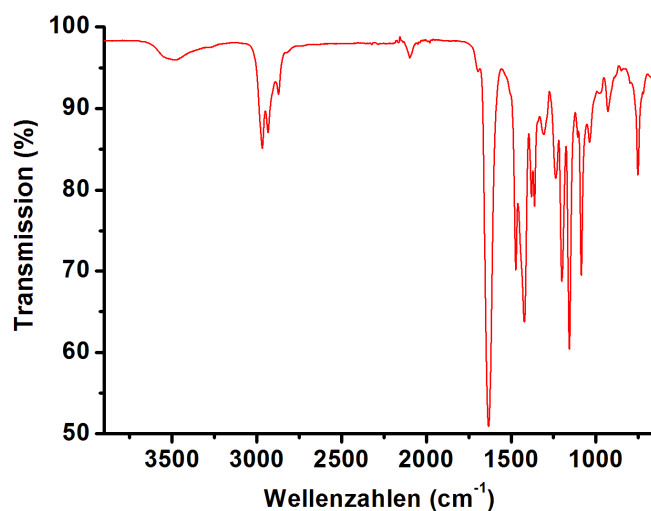


Abbildung 4.2.8: MALDI-ToF Spektrum des Azid-funktionalisierten Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)-makromonomers

Die Azid-Funktionalität der Makromonomere wurde mittels IR-Spektroskopie nachgewiesen. Abbildung 4.2.9 zeigt beispielhaft das IR-Spektrum des N_3 -PiPrOx-Makromonomers mit der charakteristischen Azid-Schwingung bei 2100 cm^{-1} . Auch die beiden anderen Makromonomere zeigen eine Schwingungsbande bei 2100 cm^{-1} , die Spektren sind im Anhang ersichtlich.

Abbildung 4.2.9: IR-Spektrum des N_3 -PiPrOx-Makromonomers

4.2.3 Synthese und Charakterisierung Azid-funktionalisierter zylindrischer Poly(2-oxazolin)bürsten

Nachdem die Synthese von drei verschiedenen Azid-funktionalisierten Makromonomeren erfolgreich war, werden diese nun wie schon in Kapitel 4.1.3 beschrieben durch freie radikalische Polymerisation der Methacrylamidgruppen zu Bürstenstrukturen umgesetzt. Um einen hohen Polymerisationsgrad zu erhalten, wurde in hochkonzentrierten wässrigen Lösungen für 24 h bei 62°C polymerisiert (Abbildung 4.2.10). Da das N_3 -PiPrOx-Makromonomer eine Phasenübergangstemperatur besitzt, die unterhalb von 62°C liegt, wurde in diesem Fall im Bereich der Phasenseparation polymerisiert.

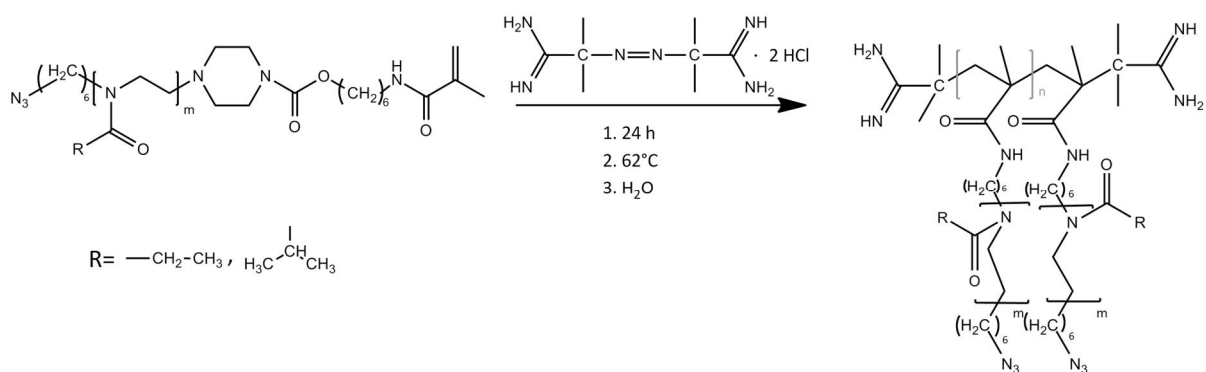


Abbildung 4.2. 10: Reaktionsschema zur Synthese von Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten

In allen Polymerisationsansätzen, unabhängig davon welches Makromonomer verwendet wurde, erhielt man eine hochviskose bis feste Polymerlösung, die in Methanol gelöst wurde. Das Methanol wurde abgedampft und der Rückstand gefriergetrocknet um Wasserrückstände zu entfernen. Anschließend wurden die Polymakromomere durch Ultrafiltration mittels Amicon Zentrifugenfilter aufgereinigt, um überschüssiges Makromonomer und kugelförmige Polymerfraktionen abzutrennen. Die erhaltenden Polymerbürsten wurden mittels IR-Spektroskopie, GPC, dynamischer und statischer Lichtstreuung sowie Rasterkraftmikroskopie (AFM), als abbildende Methode charakterisiert. Um zu überprüfen, ob die Azid-Gruppen die freie radikalische Polymerisation überstanden haben, wurden zuerst IR-Spektren der Bürstenpolymere gemessen. Abbildung 4.2.11 zeigt exemplarisch das IR-Spektrum der N_3 -PiPrOx-Bürste, alle weiteren IR-Spektren können im Anhang gefunden werden. Wie auch schon in den Spektren der Makromonomere ist für alle drei Bürstenpolymere die charakteristische Azid-Schwingungsbande bei einer Wellenzahl von 2100 cm^{-1} sichtbar und somit gezeigt, dass die Polymerbürsten erfolgreich mit Azidgruppen funktionalisiert wurden.

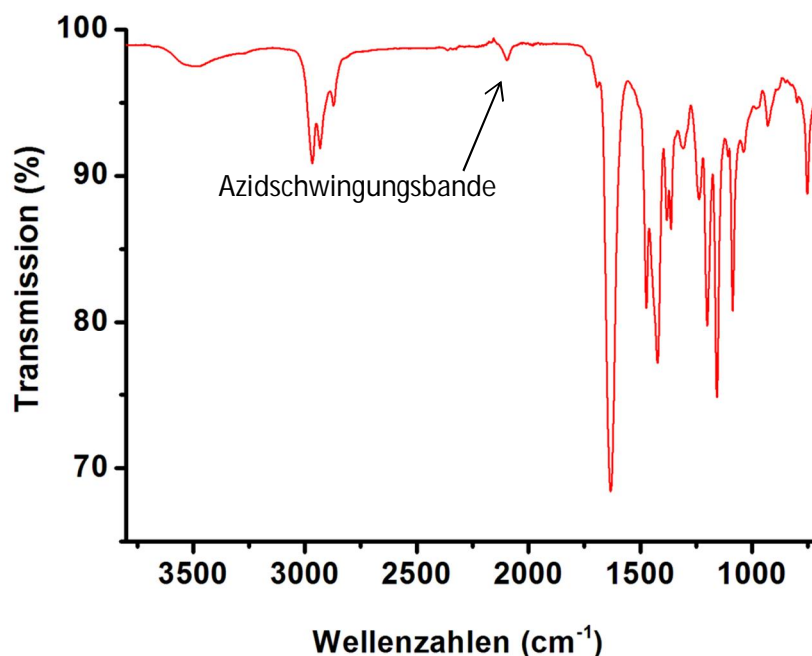


Abbildung 4.2.11: IR-Spektrum der N_3 -PiPrOx-Bürste

Abbildung 4.2.12 zeigt die Gelpermationschromatogramme der drei verschiedenen N_3 -POx-Bürsten. In allen drei Fällen lässt sich eine breitere jedoch überwiegend monomodale Verteilung erkennen. Die Breite der Verteilung ist ein typisches Artefakt für die freie Radikalik, die durch ihre geringe Kontrolle meist zu breiteren Verteilungen führt. Besonders bei der Blockcopolymerbürste lässt sich ein Tailing hin zu den kleineren Molmassen erkennen, das entweder durch Adsorption an die Säule oder durch Reste einer kleineren Molmassenverteilung, die nicht abgetrennt werden konnte, verursacht wird.

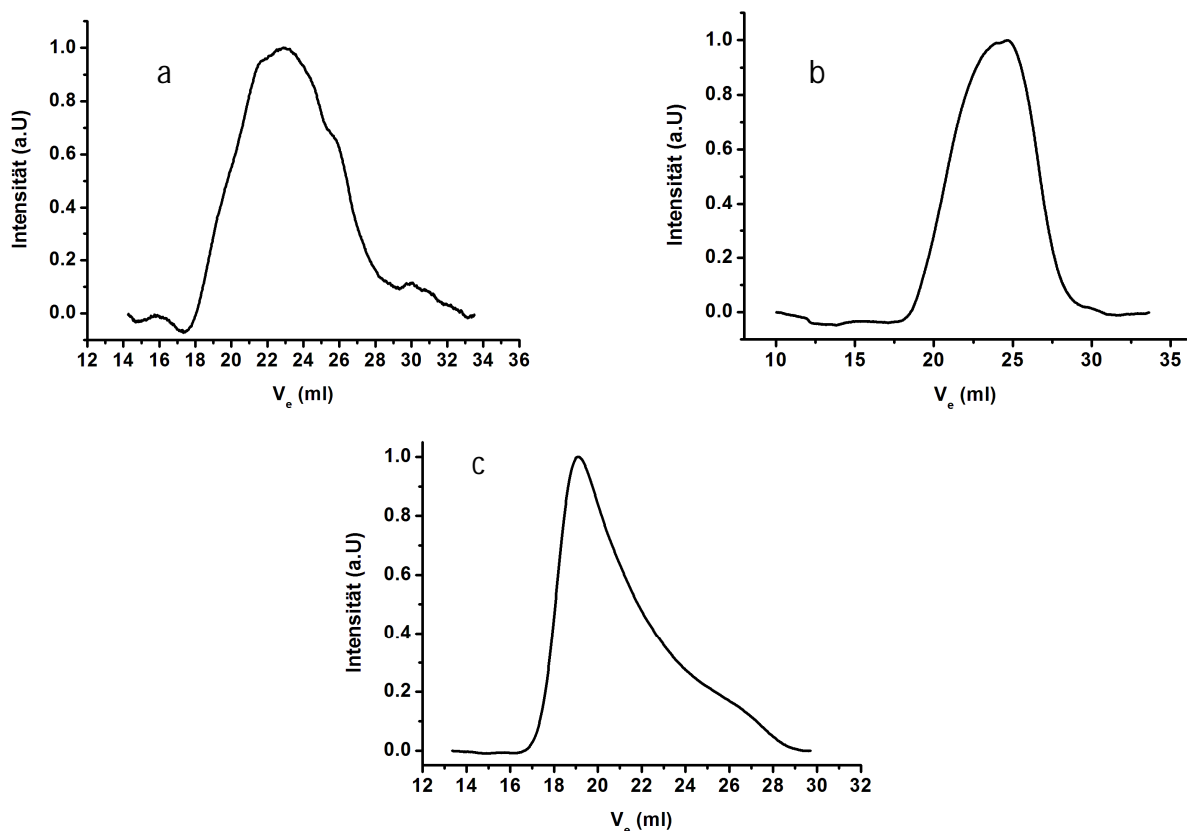


Abbildung 4.2.12: Gelpermationschromatogramme der verschiedenen N_3 -Poly(2-oxazolin)bürsten in DMF (LiBr 1g/l, $T = 333$ K); a: N_3 -PiPrOx-Bürste; b: N_3 -PEtOx-Bürste; c: N_3 -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste

Alle Bürsten wurden mit dynamischer und statischer Lichtstreuung untersucht. Abbildung 4.2.13 zeigt die Zimplots und die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung für die drei verschiedenen Azid-funktionalisierten zylindrischen Poly(2-oxazolin)bürsten.

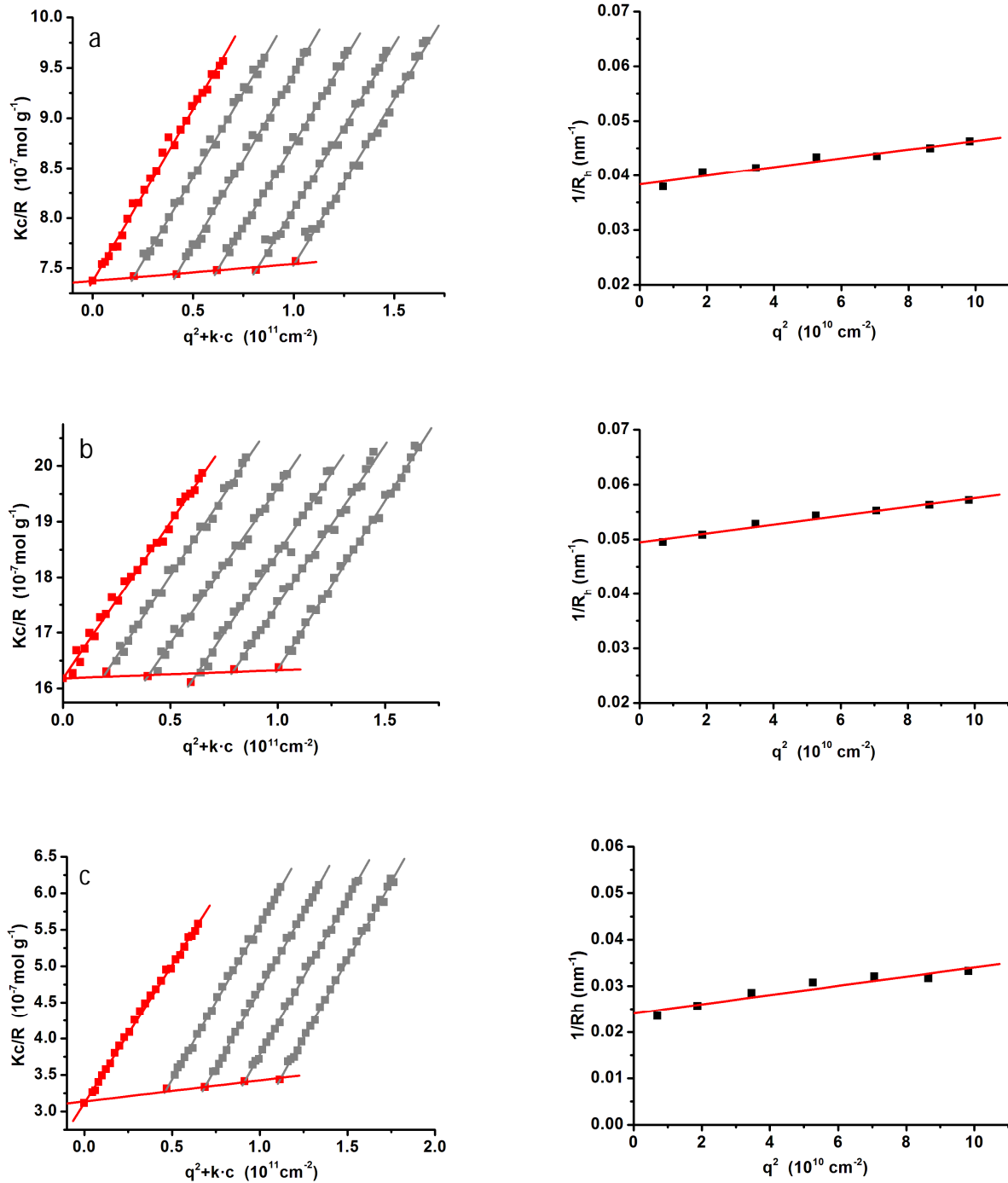


Abbildung 4.2.13: links: Zimmplots der drei verschiedenen Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten in Methanol bei $T=293$ K zwischen 30 und 150 Grad (5 Gradschritte); Salz: Lithiumbromid ($c = 5$ mM)

a: N_3 -PiPrOx-Bürste, $c_1 = 0.5056$ g/l; $c_2 = 0.4065$ g/l; $c_3 = 0.3100$ g/l; $c_4 = 0.2091$ g/l; $c_5 = 0.1032$ g/l; $M_w = 1.36 \cdot 10^6$ g/mol; $R_g = 37.38$ nm; $A_2 = 1.69 \cdot 10^{-8}$ mol·cm³/g²; $dn/dc = 0.1633$ cm³/g; $k = 2 \cdot 10^{11}$ cm/g

b: N_3 -PEtOx-Bürste, $c_1 = 0.503$ g/l; $c_2 = 0.3990$ g/l; $c_3 = 0.2982$ g/l; $c_4 = 0.1978$ g/l; $c_5 = 0.1017$ g/l; $M_w = 6.18 \cdot 10^5$ g/mol; $R_g = 32.29$ nm; $A_2 = 1.476 \cdot 10^{-8}$ mol·cm³/g²; $dn/dc = 0.1773$ cm³/g; $k = 2 \cdot 10^{11}$ cm/g

4 Ergebnisse und Diskussion

c: N₃-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste, $c_1 = 0.2231 \text{ g/l}$; $c_2 = 0.1829 \text{ g/l}$; $c_3 = 0.1376 \text{ g/l}$; $c_4 = 0.0941 \text{ g/l}$; $M_w = 3.21 \cdot 10^6 \text{ g/mol}$; $R_g = 60.53 \text{ nm}$; $A_2 = 7.23 \cdot 10^8 \text{ mol} \cdot \text{cm}^3 / \text{g}^2$; $dn/dc = 0.1767 \text{ cm}^3 / \text{g}$; $k = 5 \cdot 10^{11} \text{ cm/g}$

rechts: DLS der POx-Bürsten in Methanol bei $T = 293 \text{ K}$ zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte); Salz: Lithiumbromid ($c = 5 \text{ mM}$); $\eta = 0.5867$; *a:* N₃-PiPrOx-Bürste, $c = 0.4935 \text{ g/l}$; $R_h = 26 \text{ nm}$; *b:* N₃-PEtOx-Bürste, $c = 0.5128 \text{ g/l}$; $R_h = 21 \text{ nm}$; *c:* N₃-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste, $c = 0.3408 \text{ g/l}$; $R_h = 42 \text{ nm}$

Alle Werte der statischen und dynamischen Lichtstreuung sowie die Ergebnisse aus den GPC-Messungen sind in *Tabelle 4.2.2* noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 4.2.2: Ergebnisse der GPC-Messungen sowie der dynamischen und statischen Lichtstreuung der Azid-funktionalisierten POx-Bürsten

	$M_n \text{ (GPC)}^*$ / g mol^{-1}	$M_w \text{ (GPC)}^*$ / g mol^{-1}	PDI (GPC)	R_g / nm	R_h / nm	$\rho =$ R_g/R_h	$M_w \text{ (LS)}$ / $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	dn/dc $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$	P_w (LS)
N ₃ -PiPrOx-Bürste	$2.68 \cdot 10^{5*}$	$4.89 \cdot 10^{5*}$	1.83	37.38	26	1.44	$1.26 \cdot 10^6$	0.1633	254
N ₃ -PEtOx-Bürste	$2.06 \cdot 10^{5*}$	$3.47 \cdot 10^{5*}$	1.68	32.29	21	1.54	$6.18 \cdot 10^5$	0.1773	167
N ₃ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste	$4.45 \cdot 10^{5*}$	$1.10 \cdot 10^{6*}$	2.47	60.53	42	1.44	$3.21 \cdot 10^6$	0.1767	547

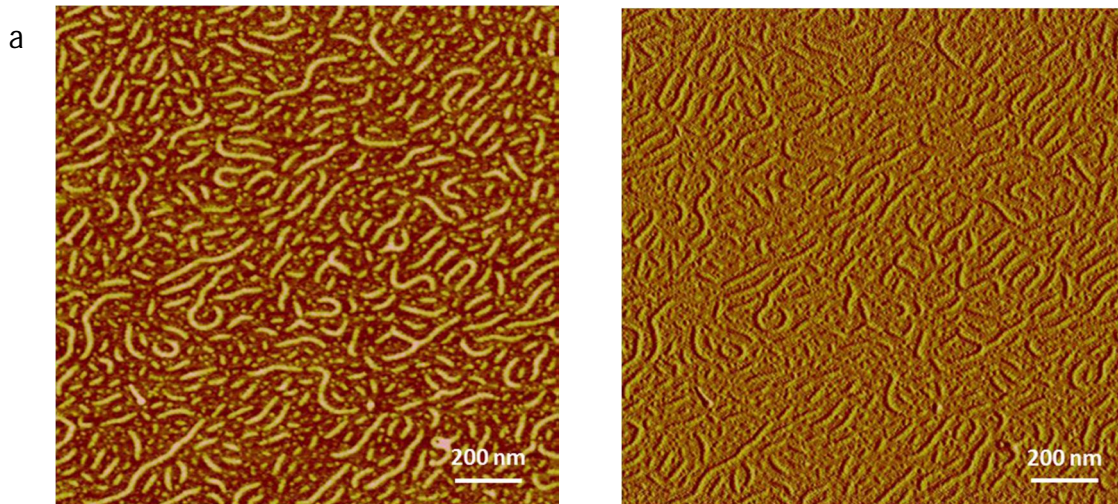
* Polystyrolkalibrierung

Die Trägheitsradien der Azid-funktionalisierten Polymerbürsten liegen zwischen 32 nm und 62 nm, während die hydrodynamischen Radien zwischen 21 und 42 nm schwanken und somit ρ -Verhältnisse zwischen 1.4 und 1.6 erhalten werden. Die Polymerisationsgrade P_w , die aus der Lichtstreuung erhalten werden, liegen zwischen 165 und 550. Es fällt auf, dass die Polymerisationsgrade der Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten deutlich kleiner sind als der Polymerisationsgrad der unfunktionalisierten Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste, der 1050 beträgt. Ein möglicher Grund könnte die unterschiedliche Aufreinigung der Makromonomere sein. Während das unfunktionalisierte PiPrOx-Makromonomer durch Flashchromatographie aufgereinigt wurde, fand die Aufreinigung der Azid-funktionalisierten Makromonomere durch Dialyse statt, da kein geeignetes Laufmittel bzw. Laufmittelgemisch für die Aufarbeitung durch Flashchromatographie gefunden werden konnte. Möglicherweise blieben durch die Dialyse Verunreinigungen zurück, die die Polymerisation störten und zu vergleichsweise kleineren Polymerisationsgraden führten. Die Thermolyse der Azidgruppe und ein damit verbundener Abbruch der Polymerisation können ausgeschlossen werden, da

die Temperaturen zur Thermolyse der Azidgruppen bei über 100°C liegen, die Polymerisation aber nur bei 62°C stattgefunden hat. [147,148]

Dennoch konnten noch ausreichend hohe Molekulargewichte und Polymerisationsgrade erhalten werden. Außerdem ist erkennbar, dass die Werte für das mittlere Gewichtmittel M_w der Azid-Bürsten, das durch statische Lichtstreuung bestimmt wurde, sich deutlich von dem Wert M_w , der aus den GPC-Messungen erhalten wurde unterscheidet. Dies liegt daran, dass die GPC-Messungen auf linearen Polystyrolkalibrierungen beruhen, die Azid-Bürsten aber verzweigte Strukturen darstellen. Ein Bürstenpolymer mit dem gleichen Molekulargewicht wie ein lineares Polymer besitzt einen größeren hydrodynamischen Radius durch die gegenseitige sterische Abstoßung der Seitenketten und die damit verbundene Aufweitung. Dem entgegenwirkend findet eine Verkürzung der Hauptkette im Vergleich zum linearen Polymer statt. Die Verkürzung der Hauptkette überwiegt bei Polymerbürsten und führt in der GPC zu scheinbar kleineren Molmassen. So lässt die GPC keine exakte Aussage über das Molekulargewicht der Probe zu, stattdessen erhält man eine Idee über die Molekulargewichtsverteilung.

Nach spin coaten auf eine Mica-Oberfläche konnten die N_3 -POx-Bürsten mittels Rasterkraftmikroskopie abgebildet werden (Abbildung 4.2.14). Es lassen sich wurmartige Strukturen erkennen, deren Längen und Verteilungen mit den Ergebnissen aus der statischen und dynamischen Lichtstreuung korrelieren.



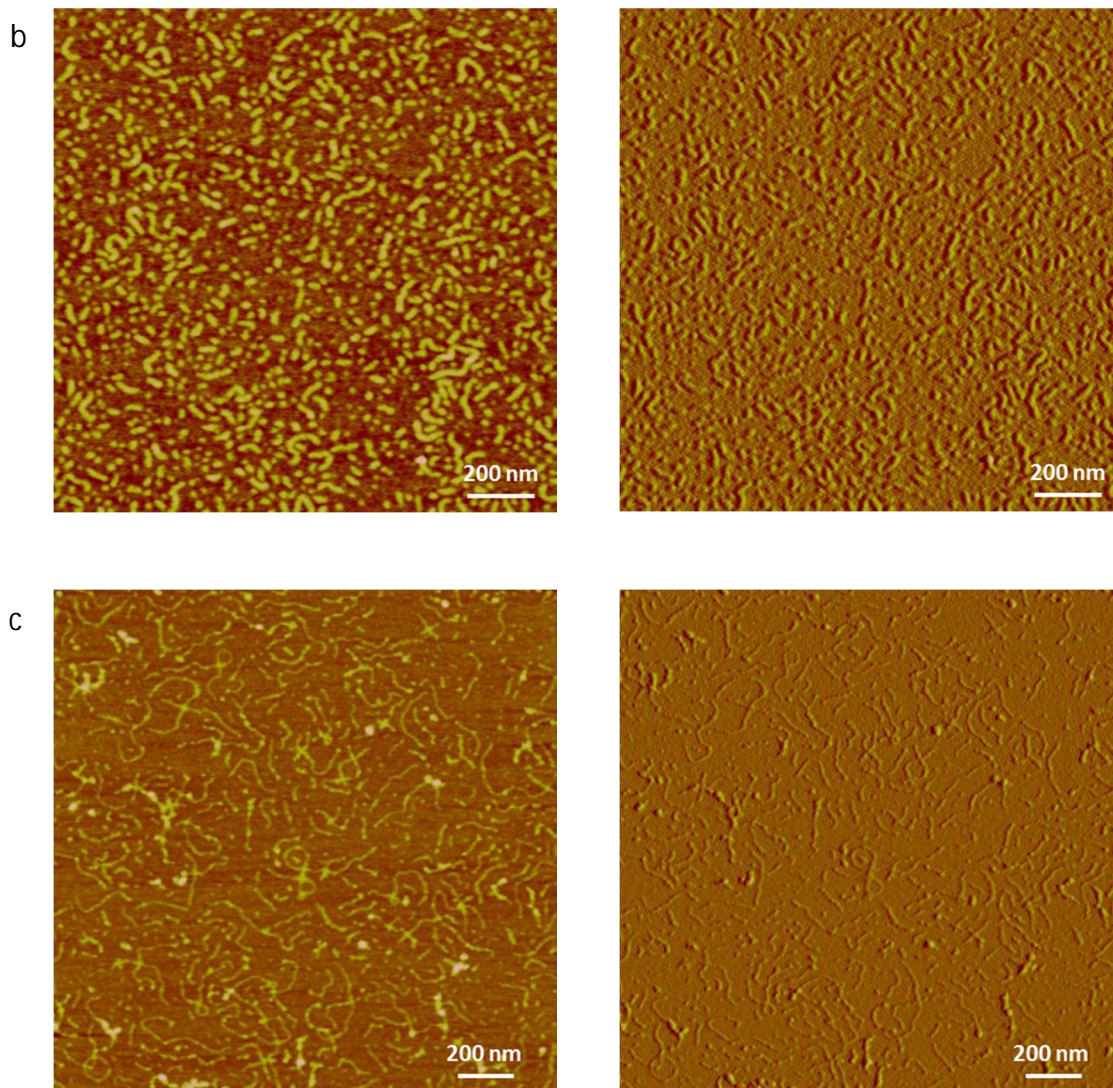


Abbildung 4.2.14: Trockene AFM-Aufnahmen der N_3 -Poly(2-oxazolin)e nach spin coating aus wässriger Lösung auf Mica; $c = 0.1 \text{ g/l}$; links: Höhenbilder; rechts: Amplitudenbilder; a: N_3 -PiPrOx-Bürste, b: N_3 -PEtOx-Bürste, c: N_3 -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste

Die unterschiedlichen Molekulargewichte, die in der statischen Lichtstreuung erhalten wurden, spiegeln sich in den AFM-Aufnahmen deutlich wieder. So ist zu erkennen, dass die N_3 -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste die längste Konturlänge passend zum größten Molekulargewicht aufweist. Im Gegensatz dazu erkennt man in der Aufnahme der N_3 -PEtOx-Bürste, die mit ca. $620\,000 \text{ g/mol}$ das kleinste Molekulargewicht besitzt, neben wurmartigen Strukturen auch eine Vielzahl an niedermolekularen kugelförmigen Molekülen. In allen drei Aufnahmen sind kugelförmige Anteile zu erkennen, die mittels Ultrafiltration nicht abgetrennt werden konnten. Fraglich ist nun woher die extrem unterschiedlichen Molmassen der drei

zylindrischen Bürstenpolymere kommen. Vermutlich liegt es daran, dass der Umsatz der Funktionalisierung mit der Methacrylamidgruppe der Makromonomere aus NMR zwischen 60% und 90% schwankt. So sind nur 60% des N₃-PEtOx-Makromonomers mit einer polymerisierbaren Gruppe funktionalisiert, 75% der N₃-PiPrOx-Makromonomere und 90% der N₃-PEtOx-b-PiPrOx-Makromonomere. Da keine Abtrennung der linearen Polymere ohne Methacrylamidgruppe bei der Dialyse stattfindet und die Aufreinigung über die Säulenchromatographie wie oben erwähnt nicht möglich waren, stellten die Makromonomere eine Mischung aus Methacrylamid-funktionalisierten und unfunktionalisierten Molekülen dar. Beim Ansetzen der Polymerisationslösungen stimmen die Konzentrationen an Makromonomer nicht exakt und die linearen Polymere könnten darüber hinaus die Radikale mit ihrer freien Aminogruppe stören, was zu geringeren Molekulargewichten führt.

4.2.4 Farbstoffmarkierung der zylindrischen N₃-Poly(2-oxazolin)bürsten mittels kupferfreier Click-Chemie

Die Azid-Alkin Click Chemie ist eine hoch effiziente und spezifische Reaktion, die gegenüber den meisten funktionellen Gruppen tolerant ist. Meistens wird sie mit Cu(I) als Katalysator eingesetzt. Volet et al. hat beispielsweise α - und ω -Azid-end-funktionalisierte lineare Poly(2-methyl-2-oxazolin)e synthetisiert und diese mit verschiedenen Alkinen unter Kupferkatalyse umgesetzt.^[149] Binder und Gruber haben ebenfalls Azid-funktionalisierte Poly(2-oxazolin)e hergestellt. Dabei handelt es sich um Blockcopolymere bestehend aus 2-Azidophenyl-2-oxazolin und 2-Methyl-2-oxazolin.^[150] Wie in Kapitel 2 beschrieben, steigert die Kupferkatalyse die Reaktionsgeschwindigkeit dieser 1,3-dipolaren Cycloaddition enorm, jedoch ist im Hinblick auf eine biologische Anwendung die Wahl von Kupfer als Katalysator nicht empfehlenswert, da Cu(I)-Ionen hoch toxisch für Zellen und Organismen sind. Bertozzi und Mitarbeiter haben eine Methode entwickelt bei der es möglich ist, ohne Kupfer(I) Zusatz zu „clicken“. ^[6,29] Dabei werden cyclische Oxtinverbindungen verwendet, die aufgrund ihrer Ringspannung auch unkatalysiert spontan bereits bei Raumtemperatur mit Aziden reagieren. Zum jetzigen Zeitpunkt sind verschiedene Moleküle mit solchen Cyclooxitinen

funktionalisiert, so dass von Farbstoffen bis hin zu Antikörpern alles mittels kupferfreier Click Chemie reagiert werden kann.

Die erfolgreiche Synthese von Azid-funktionalisierten zylindrischen Poly(2-oxazolin)bürsten wurde in Kapitel 4.2.3 beschrieben. Um die Aktivität der Azid-Gruppen zu überprüfen besonders in Hinblick auf eine Anwendung im biomedizinischen Bereich, wurden die Azid-Bürsten mit dem Farbstoff Carboxyrhodamin 110 gelabelt. So sind diese für weiterführende Versuche wie beispielsweise Zellexperimente bereits farbstoffmarkiert. Der Farbstoff-Carboxyrhodamin 110 ist mit einem PEG-Spacer aus vier Ethylenglykol Wiederholungseinheiten funktionalisiert und trägt eine Dibenzocyclooctin (DBCO) Funktionalität. Da sowohl Farbstoff als auch DBCO-System sehr hydrophob sind, trägt der PEG-Spacer zur Hydrophilie des Moleküls bei.

Im Reaktionsansatz wurde so viel Farbstoff mit der Bürste reagiert, dass theoretisch zwei Farbstoffmoleküle pro Bürste klicken sollten. Mit Hilfe von Ultrafiltration in Amiconzentrifugeneinsätzen (Ausschlussgrenze 3000 g/mol) wurde der überschüssige freie Farbstoff abgetrennt.

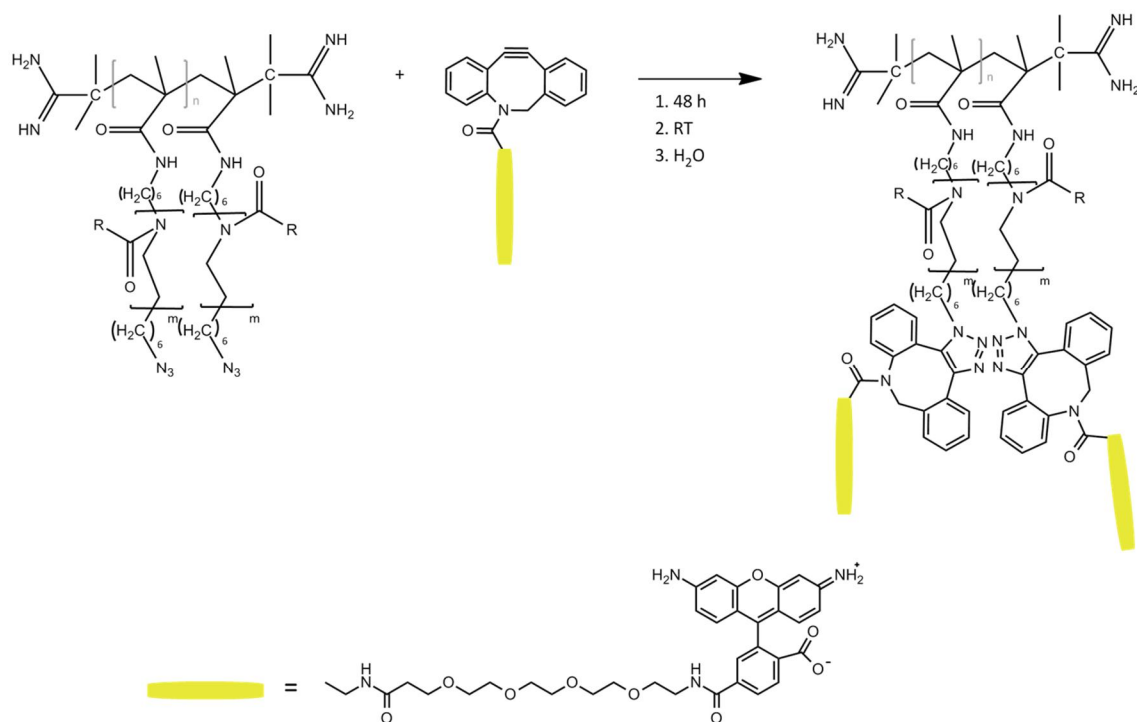


Abbildung 4.2.15: Reaktionsschema der kupferfreien Click-Reaktion zwischen dem DBCO-funktionalisierten Farbstoff Carboxyrhodamin und den Azid-POx-Bürsten

Abbildung 4.2.15 zeigt die Farbstoffmarkierung der Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten mit Hilfe der kupferfreien Click-Chemie. Die Farbstoff-gelabelten zylindrischen Bürsten wurden mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) analysiert um zu überprüfen, ob die Reaktion erfolgreich war und wieviele Farbstoffe kovalent an einer Polymerbürste gebunden sind (Abbildung 4.2.16).

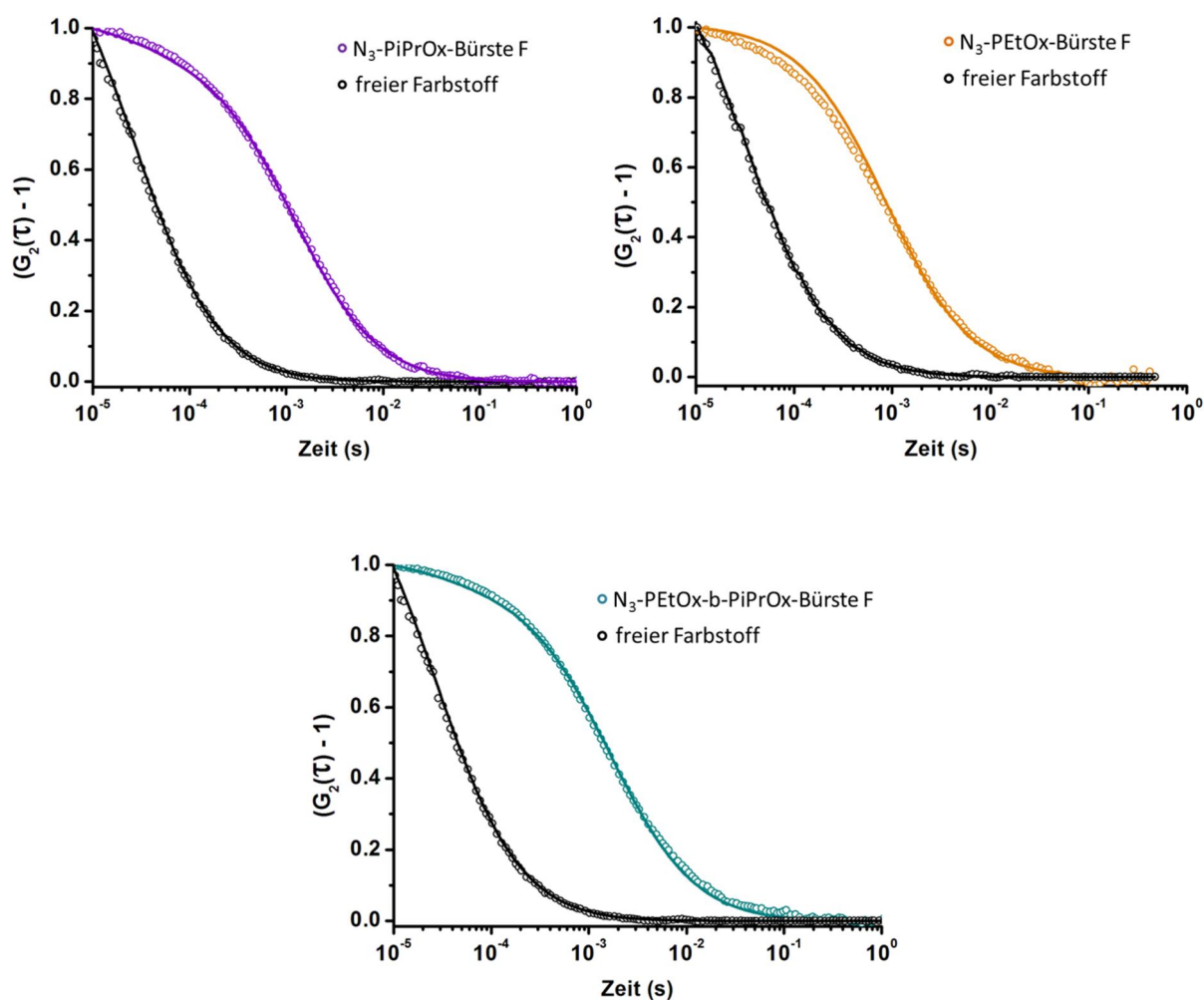


Abbildung 4.2.16: FCS Autokorrelationsfunktionen des freien Farbstoffs und der Farbstoff gelabelten N_3 -POx-Bürsten in H_2O , $T = 295.15$ K, $\eta = 0.9581$

Zum Vergleich sind jeweils die Autokorrelationsfunktion des freien Farbstoffs und der jeweiligen Polymerbürste aufgetragen. Wie erwartet ist die Diffusionszeit der Farbstoff-markierten Polymerbürsten viel größer, was ein erster Beweis für die erfolgreiche kovalente Bindung des Farbstoffs an das Polymer ist. Über die Stokes-Einstein Beziehung kann aus der FCS der hydrodynamische Radius der gelabelten Bürstenpolymere berechnet werden, wobei

der Diffusionskoeffizient aus dem Zusammenhang der Diffusionszeit und konfokalem Detektionsvolumen erhalten wird. Über den Zusammenhang der Polymerphotocounts zu den Farbstoffphotocounts kann die Anzahl der gebundenen Farbstoffe bestimmt werden.

Tabelle 4.2.3: Übersicht über die Ergebnisse der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie der Farbstoff-markierten N₃-POx-Bürsten

	R _h (FCS)/ nm	R _h (LS) in H ₂ O /nm	Anzahl der gebundenen Farbstoffe
N ₃ -PiPrOx-Bürste F	26	24	3
N ₃ -PEtOx-Bürste F	19	23	4
N ₃ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste F	36	36	4.6

In *Tabelle 4.2.3* sind die Ergebnisse der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie gezeigt. Die Werte für die hydrodynamischen Radien, die aus den FCS-Messungen erhalten werden, stimmen gut mit den Werten aus der dynamischen Lichtstreuung überein (DLS-Messungen der Azid-funktionalisierten POx-Bürsten in Wasser siehe Anhang). Daraus lässt sich schließen, dass durch die gebundenen Farbstoffe keine Aggregation induziert wird. Die Autokorrelationsfunktionen der Bürstenpolymere wurden mit einem Zweikomponentenfit angenähert. Die eine Komponente stellt die Farbstoff-markierte Polymerbürste und die andere noch vorhandenen freien Farbstoff dar. In allen Polymerlösungen wurde ein Anteil von 10 % freiem Restfarbstoff detektiert, der nicht vollständig durch die Ultrafiltration abgetrennt werden konnte.

Um Absorption der Farbstoffe an die Bürstenpolymere durch nicht kovalente Wechselwirkungen auszuschließen wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, bei dem unfunktionalisierter Farbstoff mit Polymerlösungen der drei verschiedenen Azid-Bürsten gemischt wurde. Anschließend wurden diese Mischungen ebenfalls mit der FCS analysiert. Dies erlaubt es zu überprüfen, ob außer dem freien Farbstoff selbst auch die Polymerbürsten korrelieren, was als Hinweis auf die unerwünschte Adsorption von Farbstoffmolekülen an die N₃-POx-Bürsten interpretiert werden müsste. *Abbildung 4.2.17* zeigt exemplarisch die Autokorrelationsfunktion für die Mischung des unfunktionalisierten freien Farbstoffs und der N₃-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste. Anhand der Diffusionszeiten lässt sich erkennen, dass es sich um die Korrelation des freien Farbstoffes handelt und keine größeren Moleküle korrelieren. Die

Ergebnisse der Messungen für die N₃-PEtOx-Bürste und N₃-PiPrOx-Bürsten zeigen ebenfalls nur die Korrelation des freien Farbstoffes (Abbildung siehe Anhang). Somit kann die Adsorption des Farbstoffes an die Polymerbürsten ausgeschlossen werden.

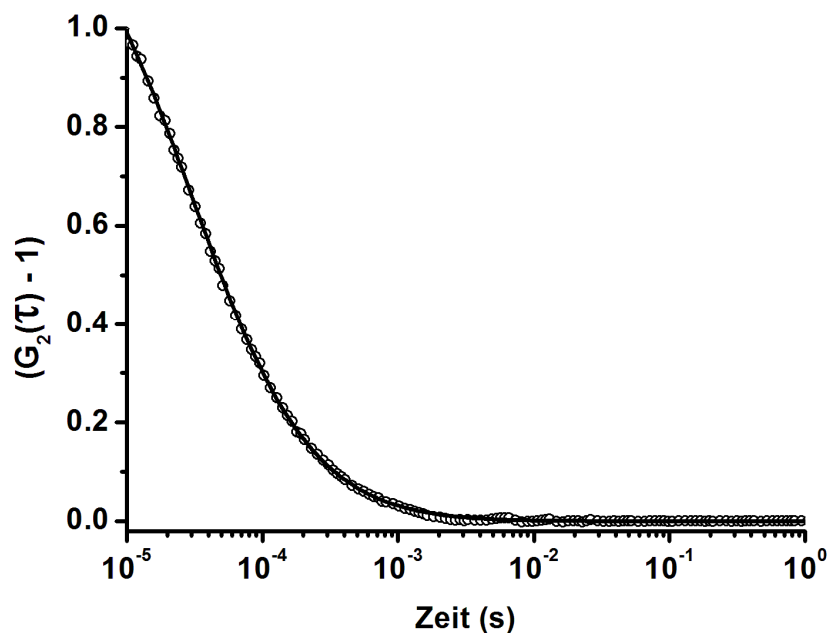


Abbildung 4.2.17: FCS Autokorrelationsfunktion der Mischung aus freiem unfunktionalisiertem Farbstoff und der N₃-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste in H₂O, T= 295.15 K, $\eta= 0.9581$

Um zu überprüfen, ob die kovalente Anbindung die Fluoreszenz Quantenausbeute des gebundenen Farbstoffes verändert, wurden Lösungen der Farbstoff-markierten Polymerbürsten sowie des freien Farbstoffes mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie analysiert (Abbildung 4.2.18, Abbildung 4.2.19).

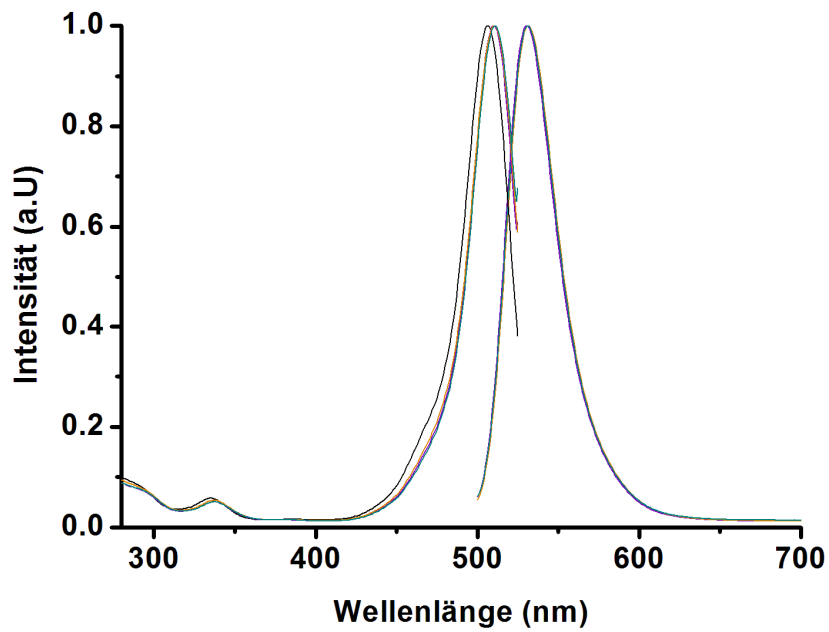


Abbildung 4.2.18: Vergleich der Anregungs- und Emissionsspektren der Farbstoff-markierten N_3 -POx-Bürsten und des freien Farbstoffs (normierte Werte)

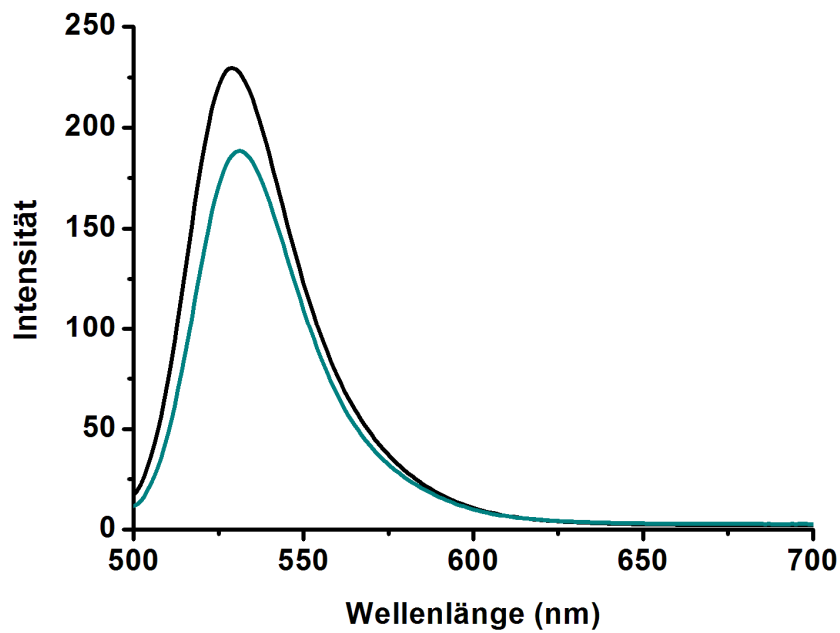


Abbildung 4.2.19: Exemplarischer Vergleich des Emissionsspektrum zwischen dem freien Farbstoff und dem an der N_3 -PEtPOx-b-PiPrOx- Bürste gebundenen bei identischer optischer Dichte und spektralen Parametern (Intensität, Wellenlänge, Spaltbreiten, Empfindlichkeit)

Das Anregungs- und Emissionsspektrum des freien Farbstoffes ändert sich nicht im Vergleich zu den Polymer- gebundenen Farbstoffmolekülen. Exemplarisch wird der Vergleich des Emissionsspektrums des freien Farbstoffes und der Azid-funktionalisierten Blockcopolymerbürste gezeigt. Die Intensität der Emission des an das Polymer gebundenen Farbstoffes nimmt um ca. 20 % ab verglichen mit der Intensität der Emission des freien Farbstoffes. Das Quenching, das durch die Polymerbürsten verursacht wird, ist somit vergleichsweise gering. Die kupferfreie Click-Chemie scheint eine gute Alternative zu den bisher verwendeten Methoden zum etablierten Labeling von Polymeren über beispielsweise Aktivester darzustellen.

4.2.5 Polymeranaloge Umsetzung der Azid-Gruppen mittels Staudinger Reduktion

Heutzutage gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten zur Synthese von definierten Polymeren, jedoch ist die Synthese funktioneller Polymere sehr anspruchsvoll. Viele funktionelle Monomere stören oder inhibieren die Polymerisation. Nachträgliche Modifikationsreaktionen auch „polymeranaloge Reaktionen“ genannt, bieten einen breiten Zugang zur Darstellung funktioneller Polymere.^[151]

Die analoge Reduktion der Azid-Gruppen zur Staudinger Reaktion ermöglicht die Darstellung zylindrischer Amino-funktionalisierter Poly(2-oxazolin)bürsten. Bei der Staudinger Reduktion reagieren Triphenylphosphin und das gewünschte Azid zu einem cis-konfigurierten Phosphazid. Durch konzertierte Stickstoffabspaltung entsteht ein Phosphazen, das sich durch Hydrolyse in Triphenylphosphinoxid und das Amin umsetzen (Abbildung 4.2.20).^[152]

4 Ergebnisse und Diskussion

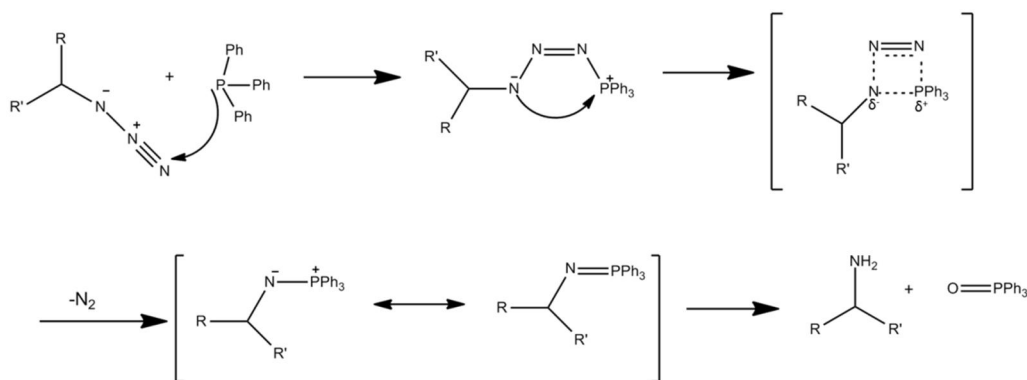


Abbildung 4.2.20: Mechanismus der Staudinger Reduktion

Die Azid-funktionalisierten POx-Bürsten wurden analog der niedermolekular beschriebenen Staudinger Reduktion nach einer Vorschrift von Nepomniaschij et al. umgesetzt.^[18] Der Unterschied liegt darin, dass anstatt des wasserunlöslichen und somit auch ungeeigneten Triphenylphosphins, das wasserlösliche Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) verwendet wurde. Dies macht die spätere Abtrennung des überschüssigen TCEP leichter. Die Polymerbürsten sind gut in Methanol und Wasser löslich, Triphenylphosphin hingegen ist Wasser unlöslich und in Methanol nur hinreichend löslich, so dass es in Testreaktionen nicht vollständig abgetrennt werden konnte.

Die N₃-Poly(2-oxazolin)bürsten wurden mit einem 5-fachen molaren Überschuss an Tris(2-carboxyethyl)phosphin in Wasser umgesetzt (Abbildung 4.2.21). Mittels Ultrafiltration wurde das Überschüssige TCEP und dessen Reaktionsprodukt (TCEPO) abgetrennt.

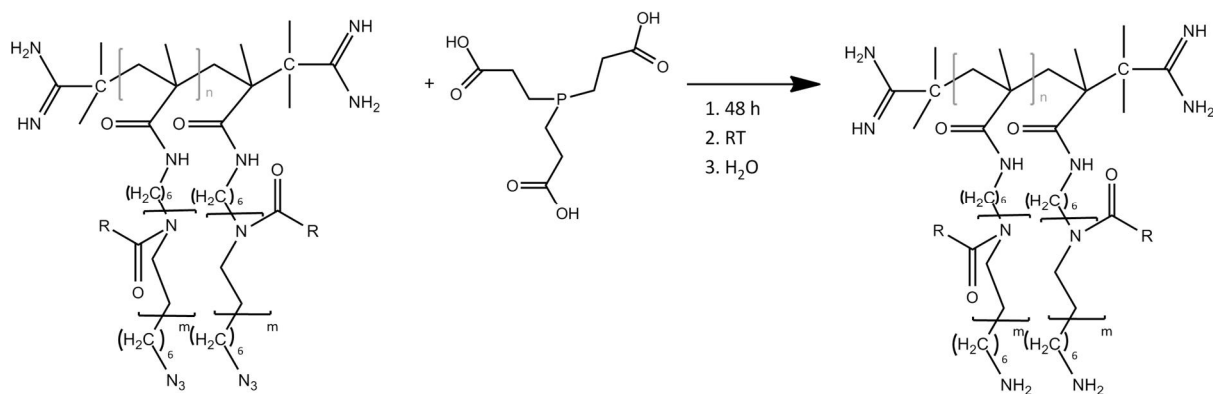


Abbildung 4.2.21: Reaktionsschema der polymeranalogen Reduktion der Azid-POx-Bürsten

Die nach der Reduktion erhaltenen zylindrischen Bürsten wurden mittels IR-Spektroskopie und dynamischer Lichtstreuung analysiert. Durch die IR-Spektroskopie kann überprüft werden, ob der quantitative Umsatz erzielt wurde.

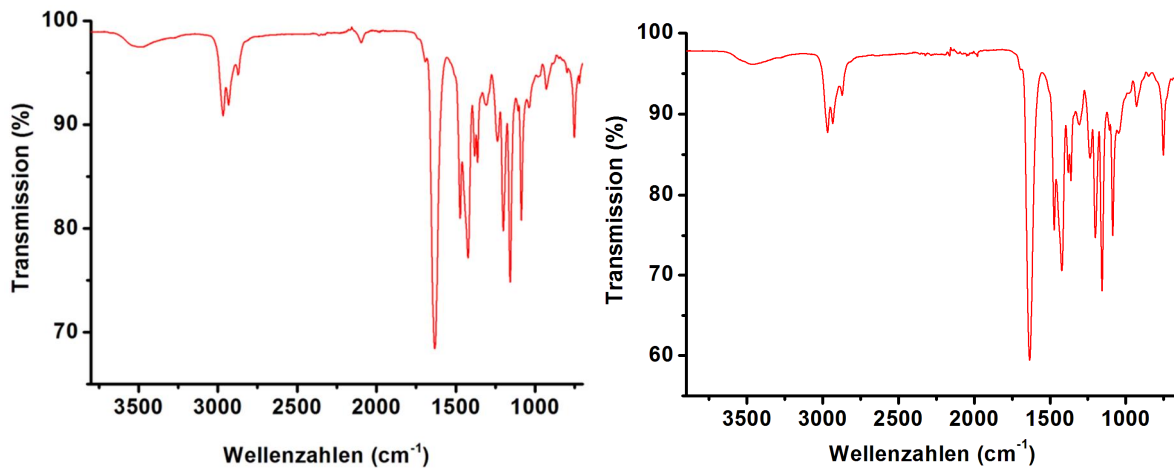


Abbildung 4.2.22: links: IR-Spektrum der N_3 -PiPrOx-Bürste; rechts: IR-Spektrum der N_3 -PiPrOx-Bürste nach Reduktion

Abbildung 4.2.22 zeigt exemplarisch die IR-Spektren der Azid-funktionalisierten PiPrOx-Bürste vor (links) und nach der Reduktion mit TCEP (rechts). Es lässt sich eindeutig erkennen, dass die Azid-Schwingungsbande komplett verschwunden ist, was die erfolgreiche Reduktion der Azid-Gruppen belegt. Auch die Reduktion der anderen beiden Azid-funktionalisierten Bürstenpolymere war erfolgreich, die IR-Spektren der reduzierten Bürsten können im Anhang eingesehen werden.

Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung wurde überprüft, ob der hydrodynamische Radius wie zu erwarten unverändert geblieben ist.

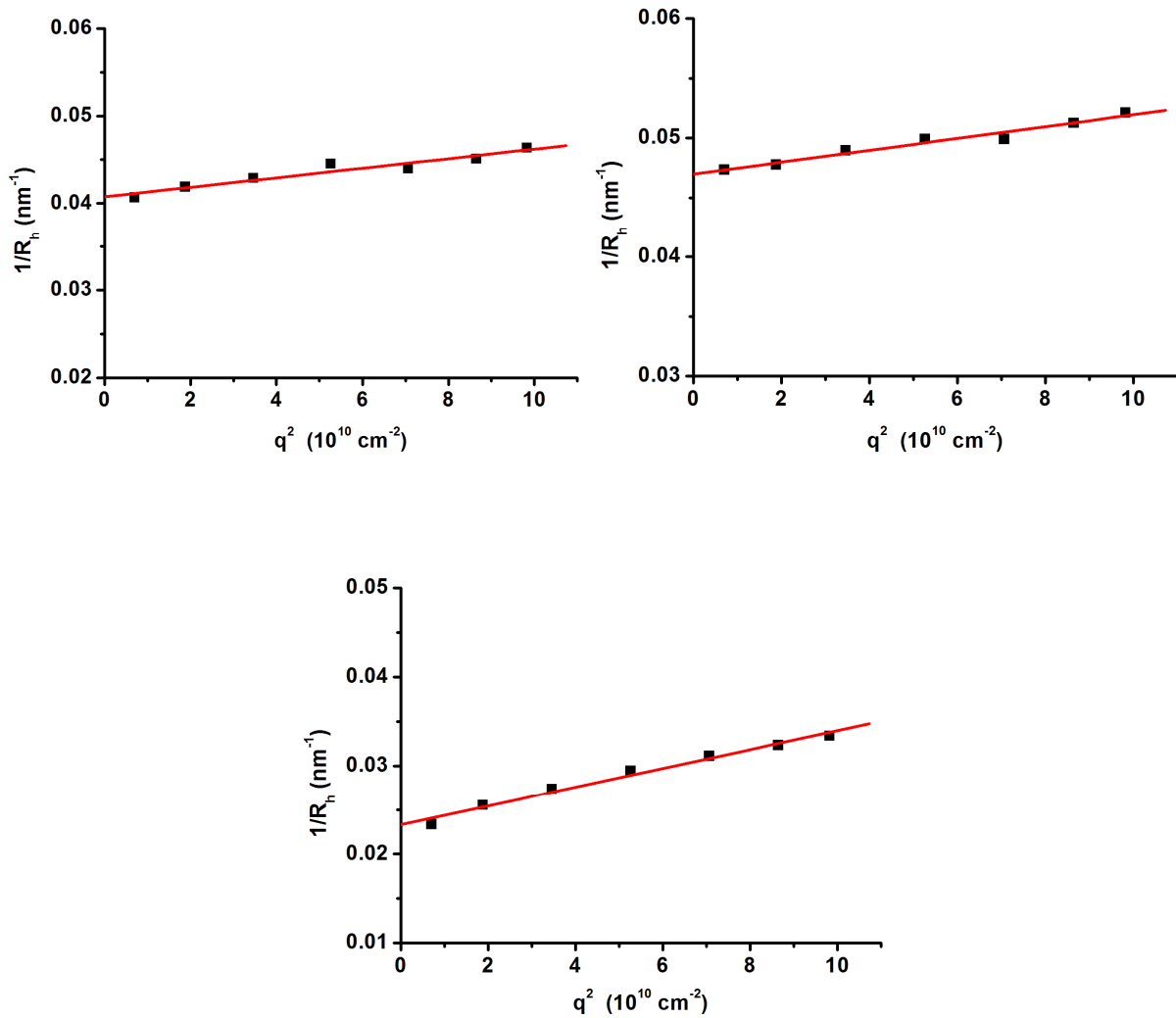


Abbildung 4.2.23: DLS der $\text{NH}_2\text{-POx}$ -Bürsten in Methanol bei $T= 293 \text{ K}$ zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte); Salz: Lithiumbromid ($c= 50 \text{ mM}$); $\eta= 0.5867$; rechts: $\text{NH}_2\text{-PiPrOx}$ -Bürste, $c= 0.4935 \text{ g/l}$; $R_h= 24.5 \text{ nm}$; links: $\text{NH}_2\text{-PEtOx}$ -Bürste, $c= 0.5128 \text{ g/l}$; $R_h= 21 \text{ nm}$; mitte: $\text{NH}_2\text{-PEtOx-b-PiPrOx}$ -Bürste, $c= 0.3408 \text{ g/l}$; $R_h= 43 \text{ nm}$

Abbildung 4.2.23 zeigt die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung der NH_2 -funktionalisierten POx-Bürsten in Methanol. Die Ergebnisse der wässrigen DLS-Messungen können im Anhang eingesehen werden. Die Radien der wässrigen und methanolischen Messungen stimmen im Rahmen des Fehlers überein.

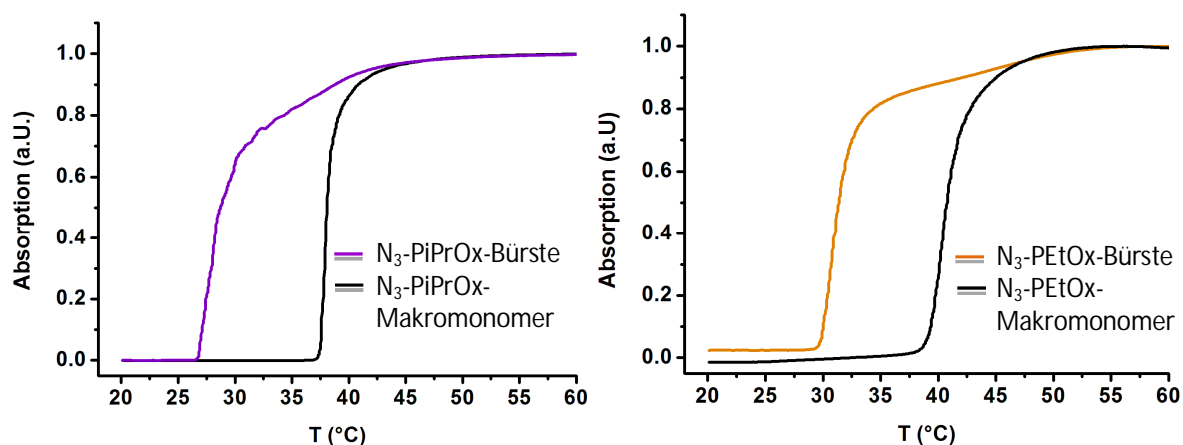
Tabelle 4.2.4: Übersicht über die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung der zum Amin reduzierten $\text{NH}_2\text{-POx}$ -Bürsten

	$\text{N}_3\text{-PiPrOx-Bürste}$	$\text{NH}_2\text{-PiPrOx-Bürste}$	$\text{N}_3\text{-PEtOx-Bürste}$	$\text{NH}_2\text{-PEtOx-Bürste}$	$\text{N}_3\text{-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste}$	$\text{NH}_2\text{-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste}$
R_h (MeOH)/ nm	26	24.5	21	21.3	42	43

Tabelle 4.2.4 zeigt eine Übersicht der hydrodynamischen Radien der Azid-funktionalisierten Polymerbürsten im Vergleich zu den reduzierten Amino-funktionalisierten Bürsten. Die Radien der Amino-modifizierten Bürsten stimmen im Bereich des Fehlers mit den Radien der Azid-funktionalisierten POx-Bürsten überein und es konnten keine Aggregate oder größere Strukturen detektiert werden.

4.2.6 Phasenübergangsverhalten der Polymerbürsten in Abhängigkeit ihrer Funktionalisierung

Analog zu der Bestimmung der Phasenübergangstemperaturen der Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste und des Makromonomers, wurden auch die Übergangstemperaturen der Azid-funktionalisierten Makromonomere, der Azid-funktionalisierten POx-Bürsten sowie der Amino-funktionalisierten Bürsten mittels UV-Spektroskopie bestimmt.



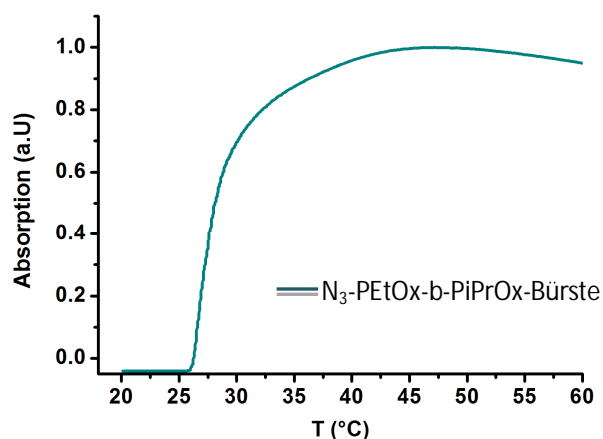


Abbildung 4.2.24: Absorption bei einer Wellenlänge von 400 nm als Funktion der Temperatur; $c = 1\text{g/l}$; links: $\text{N}_3\text{-PiPrOx}$ -Makromonomer und Bürste; rechts: $\text{N}_3\text{-PEtOx}$ -Makromonomer und Bürste, Salz: $c = 3\text{ M NaCl}$; mitte: $\text{N}_3\text{-PEtOx-b-PiPrOx}$ -Bürste, Salz: $c = 2.5\text{ M NaCl}$

Abbildung 4.2.24 zeigt die Absorption der Azid-funktionalisierten Makromonomere sowie Polymerbürsten als Funktion der Temperatur. Aus Mangel an Substanz konnte die Trübungskurve für das $\text{N}_3\text{-PEtOx-b-PiPrOx}$ -Makromonomer nicht gemessen werden. Es zeigt sich jedoch anhand der anderen beiden Polymere, dass wie zu erwarten die Übergangstemperatur des linearen Makromonomers deutlich höher liegt als die der Polymerbürste. Wie schon in Kapitel 4.1.4 beschrieben, ist das Phasenübergangsverhalten stark von der Dichte der Hydrophobie bestimmt. Die Bürstenpolymere besitzen durch ihre Seitenketten, im Vergleich zu den linearen Makromonomeren eine wesentlich hydrophobere Umgebung, die sich in einer niedrigeren Phasenübergangstemperatur zeigt. *Tabelle 4.2.1* gibt einen Überblick über die Phasenübergangstemperaturen der Azid-funktionalisierten Makromonomere sowie Polymerbürsten.

Tabelle 4.2.5 Übersicht der Phasenübergangstemperaturen der Azid-funktionalisierten Makromonomere sowie Polymerbürsten

	$\text{N}_3\text{-PiPrOx}$ -Makromonomer	$\text{N}_3\text{-PiPrOx}$ -Bürste	$\text{N}_3\text{-PEtOx}$ -Makromonomer (3M NaCl)	$\text{N}_3\text{-PEtOx}$ -Bürste (3M NaCl)	$\text{N}_3\text{-PEtOx-b-PiPrOx}$ -Bürste (2.5 M NaCl)
$T_T / ^\circ\text{C}$	37	26	38	29	26

Die Makromonomere besitzen eine um 10°C erhöhte Phasenübergangstemperatur verglichen mit der Polymerbürste. Vergleicht man die Phasenübergangstemperatur der unfunktionalisierten Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste ($T_T = 31\text{ °C}$) mit der Temperatur der Azid-funktionalisierten Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste ($T_T = 26\text{ °C}$) so fällt auf, dass die N_3 -funktionalisierte PiPrOx-Bürste eine um 5°C niedrigere Übergangstemperatur besitzt. Die Einführung der Azid-Gruppe am Ende jeder Seitenkette senkt die Phasenübergangstemperatur, durch den Anstieg der Hydrophobie im Polymer. Dies führt dazu, dass die inter-und intramolekularen Wechselwirkungen bei tieferer Temperatur einsetzen und es zu einem frühzeitigen Kollaps und zur weiteren Aggregation mit Phasenseparation kommt.

Die Phasenübergangstemperatur von Poly(2-ethyl-2-oxazolin)en liegt laut Literatur zwischen 60 und 70°C.^[25] Beim Aufheizen der N_3 -PEtOx-Makromonomere und Bürsten konnte jedoch keine Zunahme der Absorption detektiert werden. Daher wurde Natriumchlorid zu den wässrigen Lösungen zugegeben bis zu einer finalen Konzentration von 3 mol/l. Nun konnte sowohl für das N_3 -PEtOx-Makromonomer als auch für die Bürste ein Phasenübergang beobachtet werden, da die Zugabe von Salz die Phasenübergangstemperatur senkt („Aussalzeffekt“). Auch die Bestimmung der Phasenübergangstemperatur der N_3 -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste fand bei einer Salzkonzentration von 2.5 M NaCl statt, da salzfrei auch hier kein Phasenübergang im Bereich von 20-70°C detektiert werden konnte. Durch Salzzugabe konnte ein Übergang bei 26°C beobachtet werden. Dies ist interessant, denn man hätte erwarten können, dass aufgrund der geringen Übergangstemperatur des Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)block der Phasenübergang ohne Salzzugabe zu beobachten sein kann. Jedoch scheint es, als würde der äußere PEtOx-Block den inneren PiPrOx-Block abschirmen. Um diese Vermutung zu bestätigen wird im nächsten Kapitel das Aggregationsverhalten in Abhängigkeit der Temperatur mittels dynamischer Lichtstreuung analysiert.

In Abbildung 4.2.25 sind die Trübungskurven der Azid-funktionalisierten Bürsten sowie der reduzierten Bürsten gezeigt. Schon auf den ersten Blick lässt sich erkennen, dass die reduzierten Bürsten (schwarz) in allen drei Fällen eine höhere Phasenübergangstemperatur besitzen als die Azid-funktionalisierten Bürsten. Dies war zu erwarten, da die entstandenen Amino-Gruppen die Hydrophilie der Bürsten sowie den Beitrag der

Wasserstoffbrückenbindungen zur Löslichkeit steigern, was sich folglich in einem Anstieg der Phasenübergangstemperatur zeigt.

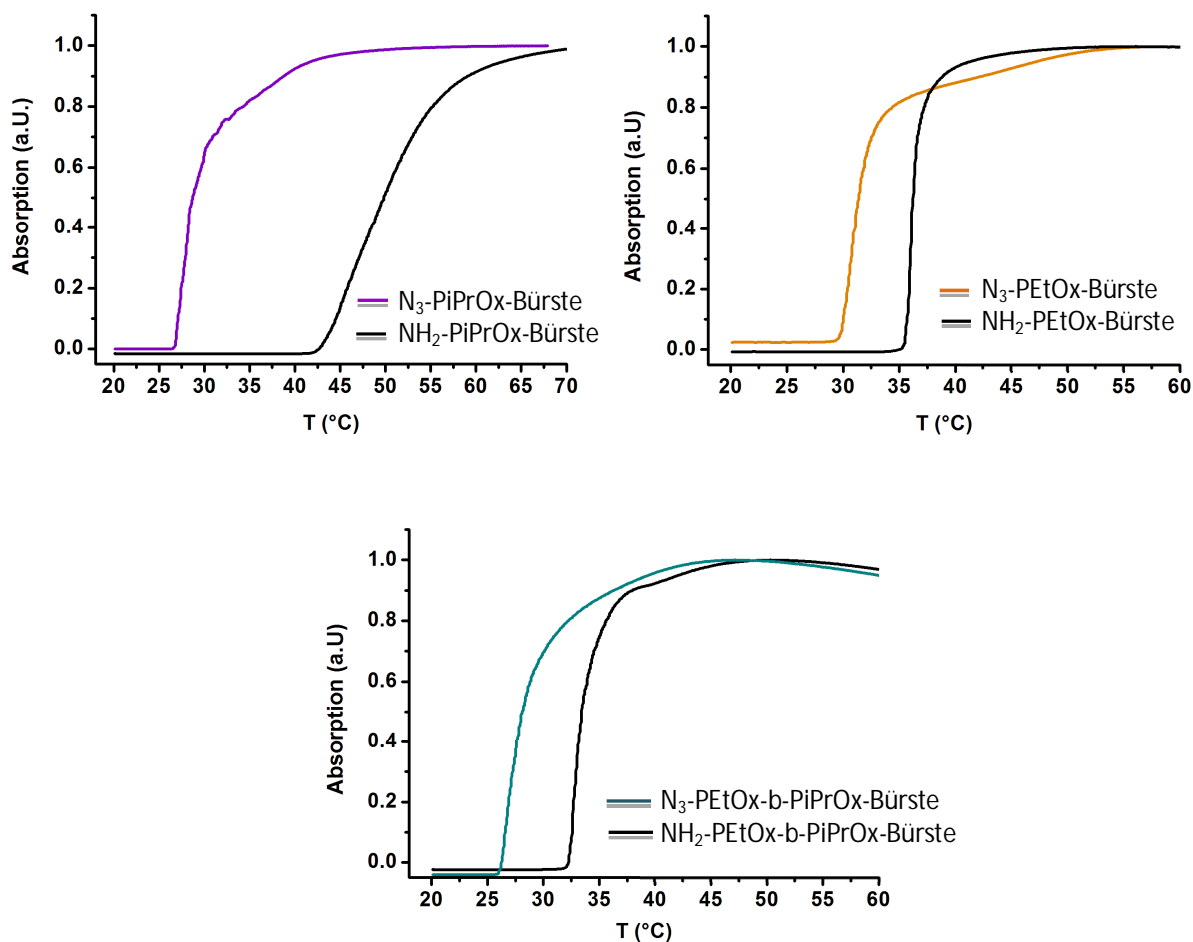


Abbildung 4.2.25: Absorption bei einer Wellenlänge von 400 nm als Funktion der Temperatur; $c = 1 \text{ g/l}$; links: N₃-PiPrOx- und NH₂-PiPrOx-Bürste; rechts: N₃-PEtOx- und NH₂-PEtOx-Bürste, Salz: $c = 3 \text{ M NaCl}$; mitte: N₃-PEtOx-b-PiPrOx- und NH₂-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste, Salz: $c = 2.5 \text{ M NaCl}$

Tabelle 4.2.6: Übersicht der Phasenübergangstemperaturen der Azid-funktionalisierten sowie der Amino-funktionalisierten Polymerbürsten

	N ₃ -PiPrOx-Bürste	NH ₂ -PiPrOx-Bürste	N ₃ -PEtOx-Bürste (3M NaCl)	NH ₂ -PEtOx-Bürste (3M NaCl)	N ₃ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste (2.5 M NaCl)	NH ₂ -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste (2.5MNaCl)
T _T / °C	26	42	29	35	26	32

Tabelle 4.2.6 zeigt eine Übersicht der Phasenübergangstemperaturen der Azid-funktionalisierten POx-Bürsten im Vergleich zu den Amino-funktionalisierten POX-Bürsten. Wie erwartet zeigen alle Amino-modifizierten Poly(2-oxazolin)bürsten eine höhere Phasenübergangstemperatur als die Azid-funktionalisierten. Durch die Amino-Gruppen werden die Hydrophilie sowie die Möglichkeit der Wechselwirkungen über Wasserstoffbrücken gesteigert und die Polymerbürsten bleiben länger solvatisiert. Auffällig ist der Unterschied des Phasenübergangs der NH₂-PiPrOx-Bürste (links) im Vergleich zu dem der N₃-PiPrOx-Bürste (rechts). Die Differenz der Phasenübergangstemperaturen beträgt 16°C und der Anstieg verläuft sehr breit. Da die Azid-funktionalisierten zylindrischen Polymerbürsten nach ihrer Reduktion zum Amin durch Protonierung im wässrigen Milieu positive Ladungen tragen, kommt es zur elektrostatischen Abstoßung der Moleküle; die Aggregation setzt also erst später ein und verläuft langsamer. Dieses Phänomen lässt sich bei den anderen beiden Amino-funktionalisierten Bürstenpolymeren nicht beobachten, da die Messung des Phasenübergangs nur durch Salzzugabe stattfinden kann. Die Zugabe von Salz bewirkt eine Abschirmung der positiven Ladungen, wodurch die elektrostatischen Wechselwirkungen inhibiert werden. Der Phasenübergang ist somit schärfer und die Differenz der Übergangstemperaturen geringer.

4.2.7 Untersuchung des Aggregationsverhaltens der zylindrischen N₃-PEtOx-b-PiPrOx-Bürste mittels dynamischer Lichtstreuung

Das Aggregationsverhalten der Azid-funktionalisierten Kern-Schale Bürste ist besonders interessant, da es so scheint als würde der äußere PEtOx-Block den inneren PiPrOx-Block abschirmen und eine Aggregation verhindern. Durch temperaturabhängige Untersuchungen mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung soll dies nun analysiert werden. Dynamische Lichtstreuung wurde im Temperaturbereich von 15°C-45°C, deutlich oberhalb der Phasenübergangstemperatur des PiPrOx-Blocks, bei einer Konzentration von $c=0.032$ g/l gemessen. Die Temperatur wurde in zwei Grad Schritten erhöht und der hydrodynamische Radius wurde als Funktion der Temperatur aufgetragen (Abbildung 4.2.26).

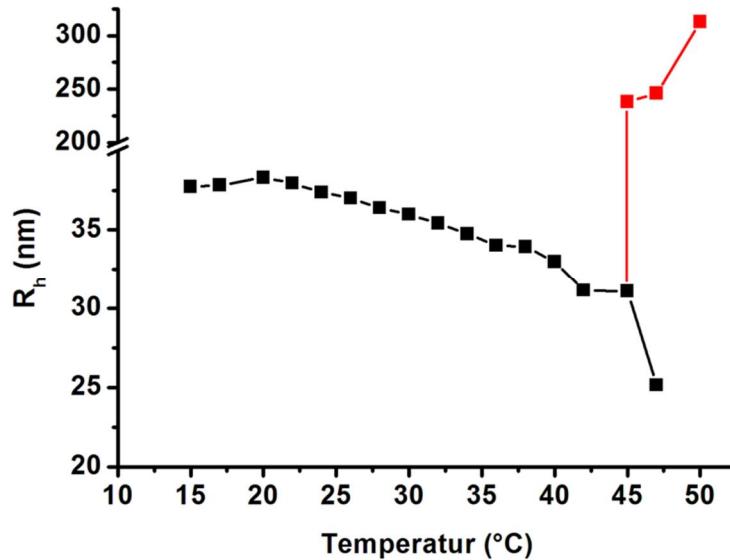


Abbildung 4.2.26: Aggregationsverhalten der N_3 -PEtOx-b-PiPrOx-Kern-Schale Bürste in wässriger Lösung als Funktion der Temperatur; $c = 0.032$ g/l; Salz: Natriumbromid ($c = 10$ mM); alle Werte wurden erst 30 min nachdem die gewünschte Temperatur erreicht wurde aufgenommen

Im Temperaturintervall von 20°C bis 42°C lässt sich in Folge des einsetzenden Molekülkollapses eine kontinuierliche Abnahme des hydrodynamischen Radius beobachten. Im Bereich des Phasenübergangstemperatur des PiPrOx-Blocks (30°C-37°C) zeigt sich keine Aggregation, so dass man tatsächlich von einer Art Abschirmung bzw. Stabilisierung durch den hydrophilen PEtOx-Block ausgehen kann. Die Abnahme des hydrodynamischen Radius kann durch den Kollaps des inneren Blocks erklärt werden. Zudem entstehen durch den Kollaps des inneren Blocks sphärische Bereiche in den Polymerbürsten, die zu einer Abnahme des Durchmessers des Moleküls führen. Durch intramolekulare Wechselwirkungen der kollabierten Blöcke mit den Nachbarblöcken ist die Hauptkette gezwungen Solvatationsmoleküle freizusetzen, wodurch auch eine Verkürzung der Hauptkette verursacht wird.

Bei einer Temperatur von 45°C sind die intra- und nun auch intermolekulare Wechselwirkungen der kollabierten Blöcke so groß, dass Aggregate im Bereich von 200 nm auftreten. Die PEtOx-Blöcke sind nicht mehr ausreichend groß, um die Wechselwirkungen der PiPrOx-Blöcke zu stabilisieren. Neben ersten Aggregaten können bei 45°C auch noch Einzelmoleküle detektiert werden, jedoch wachsen die Aggregate sehr schnell, so dass bei 50°C Aggregate von 300 nm die Streuintensität dominieren. Somit trifft die Aussage, die aus

den UV-Messungen getroffen wurden, dass der PEtOx-Block den PiPrOx-Block abschirmt nur begrenzt zu. Bis zu einer Temperatur von 42°C kann man tatsächlich von einer Stabilisierung durch den hydrophilen PEtOx-Block ausgehen, danach überwiegen die hydrophoben Wechselwirkungen des kollabierten PiPrOx-Blocks und es kommt zur Aggregation. Eine Vergrößerung des PEtOx-Block könnte die Stabilisierung vermutlich erhöhen und eine Aggregation weiter hinauszögern oder verhindern

4.2.8 Aggregationsverhalten der Azid- und Amino-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten in humanem Serum

Die Analyse von Nanopartikeln in Anwesenheit von Serumsproteinen ist sehr wichtig, vor allem im Hinblick auf eine Anwendung im medizinischen Bereich, da jegliche Art von Absorptionsprozessen die Oberflächenbeschaffenheit des Nanopartikels ändern und sich somit auch die Verteilungseigenschaften des Partikels im Körper sowie die zellulären Wechselwirkungen verändern.^[153] Dies kann außerdem zur Bildung von größeren Aggregaten oder sogar zur Blutgerinnung führen, wodurch es zur Thrombose kommen kann. In unserer Gruppe wurde eine Analysemethode entwickelt, die es ermöglicht mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung das Aggregationsverhalten von Nanopartikeln in humanem Blutserum zu untersuchen.^[36]

Poly(2-oxazolin)e sind strukturell verwandt mit Polypeptiden, weswegen sie auch häufig als Pseudopeptide angesehen werden. Wie in Kapitel 2 beschrieben sind sie im Allgemeinen biokompatibel und von großem Interesse für die medizinische Anwendung. Folglich wird erwartet, dass sie nur eine geringe Proteinabsorption zeigen. Die in dieser Arbeit synthetisierten N₃-sowie NH₂-funktionalisierten POx wurden von Sabine Gietzen auf ihr Aggregationsverhalten in humanem Blutserum untersucht. Die Datenauswertung erfolgte analog zu der von Rausch und Mitarbeitern veröffentlichten Methodik.^[36]

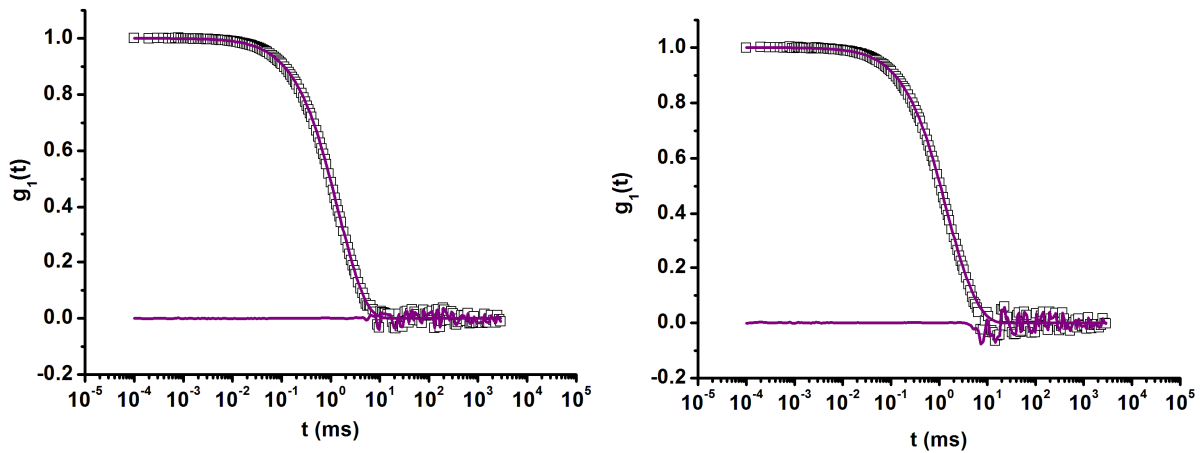


Abbildung 4.2.27: Datenpunkte der Autokorrelationsfunktion der N_3 -PEtOx-Bürste (links) und der N_3 -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste (rechts) in humanem Serum; Streuwinkel 60° ; --- Multikomponentenfit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum und Polymerbürste

Abbildung 4.2.27 zeigt die Datenpunkte der Autokorrelationsfunktionen der Mischung aus Serum und der N_3 -PEtOx-Bürste (links) sowie der Mischung aus Serum und der N_3 -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste (rechts). Die Datenpunkte können perfekt durch einen Multikomponentenfit bestehend aus Anteilen des Serums und einem Anteil der Bürste beschrieben werden, was bedeutet, dass keine oder nur vernachlässigbare Aggregationen stattfinden.

In Abbildung 4.2.28 sind die Datenpunkte der Autokorrelationsfunktion der Mischung aus Serum und der N_3 -PiPrOx-Bürste bei 30° (links) und 60° (rechts) gezeigt. Ein Multikomponentenfit aus den Serumsanteilen und dem Anteil der Bürste ist in violett gezeigt. Es lässt sich erkennen, dass das dieser Fit die Datenpunkte nicht alle erfassen kann. Durch Ergänzung des Multikomponentenfit mit einem weiteren Anteil, der ein Aggregat beschreibt lassen sich die Datenpunkte perfekt anfitten (grüner Fit). Es ist sowohl bei 30° als auch bei 60° ein Aggregatanteil zu erkennen.

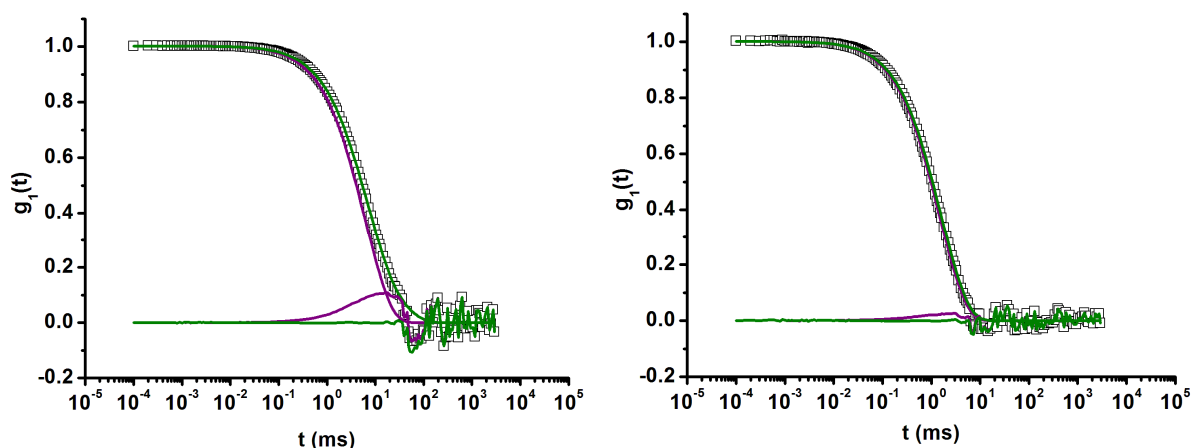


Abbildung 4.2.28: Autokorrelationsfunktionen der N_3 -PiPrOx-Bürste in humanem Serum; links: Streuwinkel 30° ; rechts: Streuwinkel 60° ; --- Multikomponentenfit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum und Polymerbürste; --- Multikomponentenfit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum und Polymerbürste sowie zusätzlicher Aggregat-beschreibender Funktion

Tabelle 4.2.7 zeigt die verschiedenen Radien und Intensitätsbeiträge der Mischung aus der N_3 -PiPrOx-Bürste und des Serums. Neben den hydrodynamischen Radius des Serums können Aggregaten im Bereich von 150nm-300 nm angefitet werden.

Tabelle 4.2.7: Übersicht über die hydrodynamischen Radien und den Intensitätsbeitrag der Mischung aus Serum und der N_3 -PiPrOx-Bürste (S= Serum; I= prozentuale Anteil der Intensität aus dem Beitrag der Ampiltude $g_1(t)$ berechnet; P= untersuchter Partikel; A=Aggregat)

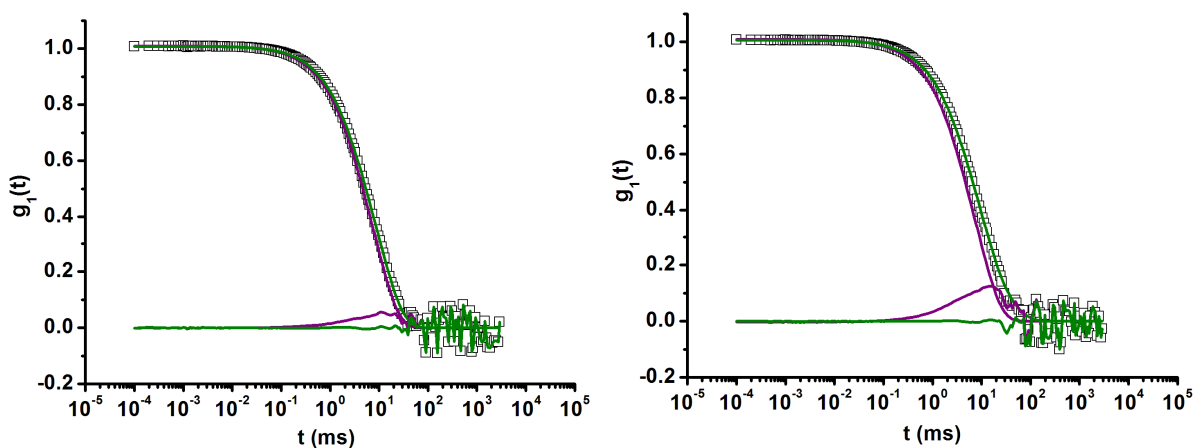
	R_h (S)/ nm	I (S)/ %	R_h (P)/ nm	R_h (A)/ nm	I (A) /%
30°	36	77	23.5	364	20
60°	36	76	23.8	112	17

Der Unterschied des Aggregationsverhaltens der N_3 -PiPrOx-Bürste im Vergleich zu den anderen beiden Bürstenpolymeren ist die Folge der Hydrophobizität. Während die anderen beiden Bürsten eine hydrophile Oberflächenbeschaffenheit besitzen, ist die der N_3 -PiPrOx-Bürste eher hydrophob. K. Rausch ^[35] hat schon in ihrer Dissertation gezeigt, dass hydrophobe Partikel zur Aggregation in humanem Serum neigen. Die hydrophoben Bereiche des Partikels können mit Serumproteinen, wie beispielsweise den Lipoproteinen, wechselwirken und führen folglich zu Aggregaten von mehreren hundert Nanometern. Ein weiterer Schritt wäre nun die Analyse der einzelnen Serumsbestandteile mit der N_3 -PiPrOx-Bürste um herauszufinden welche Serumsbestandteile die Aggregation verursachen. Durch

Erhöhen der Hydrophilie des Partikels, beispielsweise durch PEGylierung kann die Aggregatbildung minimiert oder sogar verhindert werden. Die reine N_3 -PEtOx-Bürste sowie die N_3 -PEtOx-b-PiPrOx-Bürste zeigen keine Aggregation, da die Oberfläche ausreichend hydrophil ist. Der PEtOx-Block der Kern-Schale Bürste schirmt den hydrophoben PiPrOx – Block ab, sodass eine Aggregation verhindert wird. Die Unterschiede in der Hydrophilie spiegeln sich nicht nur im Aggregationsverhalten im Serum wieder sondern auch im Phasenübergangsverhalten, dass mit dem beobachteten Aggregationsverhalten in Serum korreliert.

Nach der Reduktion der N_3 -funktionalisierten Polymerbürsten wurden auch die Amino-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten von Sabine Gietzen in humanem Serum analysiert. Durch Einführung der Amino-Gruppen entstehen positive Ladungen. Der Einfluss der Oberflächenladung auf die Proteinkorona wird als wichtiger Parameter diskutiert und schon in der Arbeit von Kristin Rausch konnte gezeigt werden, dass Ladungen einen erheblichen Einfluss auf das Aggregationsverhalten von Nanopartikeln in Serum besitzen.^[35]

Abbildung 4.2.29 zeigt die Datenpunkte der Autokorrelationsfunktionen der NH_2 -funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten. In allen drei Fällen ist eine Fitfunktion aus den Serumskomponenten sowie der Polymerbürstenkomponente nicht ausreichend, wie das Residuum des violetten Fits zeigt. Um alle Datenpunkte exakt beschreiben zu können ist eine zusätzliche Aggregat-beschreibende Funktion nötig (grüner Fit). Das heißt alle Amino-funktionalisierten POx-Bürsten bilden Aggregate mit Bestandteilen des Serums.



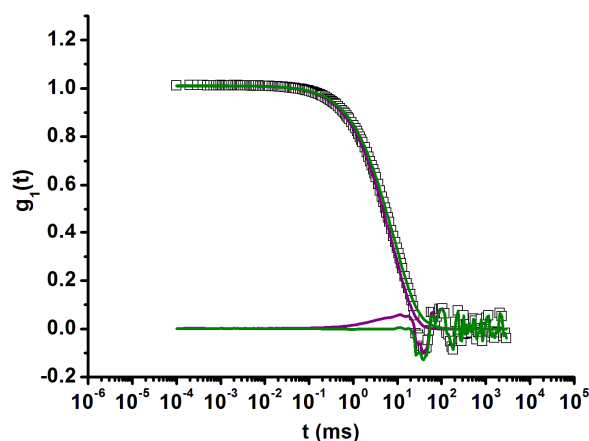


Abbildung 4.2.29: Autokorrelationsfunktionen der $\text{NH}_2\text{-PiPrOx}$ -Bürste (links), der $\text{NH}_2\text{-PEtOx}$ -Bürste (rechts) und der $\text{NH}_2\text{-PEtOx-b-PiPrOx}$ -Bürste der in humanem Serum; Streuwinkel 30° ; --- Multikomponentenfit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum und Polymerbürste; --- Multikomponentenfit und zugehöriges Residuum der Fitkomponenten aus Serum und Polymerbürste sowie zusätzlicher Aggregatbeschreibender Funktion

In *Tabelle 4.2.8* sind die hydrodynamischen Radien und die Intensitätsbeiträge der Mischung aus Serum und $\text{NH}_2\text{-POx}$ -Bürsten gezeigt. Alle Bürstenpolymere zeigen Aggregate im Bereich von 300 nm. Die Intensitätsbeiträge der Aggregate schwanken, so dass der Beitrag der Aggregate der $\text{NH}_2\text{-PiPrOx}$ -Bürste zu der Gesamtintensität am geringsten ist. Es ist nicht genau zu verstehen, warum die Aggregate der $\text{NH}_2\text{-PiPrOx}$ Bürste den geringsten Beitrag zur Gesamtintensität haben. Um exakte Aussagen darüber treffen zu können, müsste die Komposition der Aggregate untersucht werden. So ließe sich dann analysieren welche Proteine an der Aggregatbildung beteiligt sind und ob es Unterschiede in der Aggregatkomposition der verschiedenen N_3 -Bürstenpolymere gibt.

Tabelle 4.2.8: Übersicht über die hydrodynamischen Radien und den Intensitätsbeitrag der Mischung aus Serum und $\text{NH}_2\text{-POx}$ -Bürsten (S= Serum; I= prozentuale Anteil der Intensität aus dem Beitrag der Amplitude $g_1(t)$ berechnet; P= untersuchter Partikel; A=Aggregat) bei 30°

	R_h (S) / nm	I (S) / %	R_h (P) / nm	R_h (A) / nm	I (A) / %
$\text{NH}_2\text{-PiPrOx}$ -Bürste	39	83	23	345	13
$\text{NH}_2\text{-PEtOx}$ -Bürste	39	74	24	335	25
$\text{NH}_2\text{-PEtOx-b-PiPrOx}$ -Bürste	39	89	34	299	36

Die Aggregatbildung der Amino-funktionalisierten Bürsten ist nicht verwunderlich, da schon K. Rausch in ihrer Dissertation zeigen konnte, dass positiv oder negativ geladene Partikel mit den Serumkomponenten wechselwirken. Eine Vielzahl der im Serum enthaltenen Proteine ist positiv oder negativ geladen und neigen zu elektrostatischen Wechselwirkungen mit den geladenen Partikeln.

Möglicherweise aggregieren negativ geladene Proteine mit der NH₂-PiPrOx-Bürste, die eine weitere Aggregation mit beispielsweise hydrophoben Proteinen verhindern, weswegen der Intensitätsbeitrag kleiner ist im Vergleich zu den hydrophilen Bürsten und zu der Azid-funktionalisierten PiPrOx-Bürste. Die Beschreibung der Abhängigkeit zwischen der Oberflächenladung und der Aggregation ist schwierig, da der exakte Ladungszustand des Partikels im Serum nicht bekannt ist. K.Rausch konnte zeigen, dass im Gegensatz zu stark positiv oder negativ geladenen Partikeln, schwach positiv oder schwach negativ geladene Teilchen deutlich weniger zur Aggregation neigen. Um die Aggregatbildung zu minimieren oder zu unterdrücken könnte man zuerst versuchen die wechselwirkenden Komponenten zu identifizieren und im zweiten Schritt die Ladungen des Partikels versuchen abzuschirmen. Möglicherweise reicht die Konjugation von verschiedenen Molekülen wie Antikörper, Antigen oder Zuckern bereits aus, um ausreichend viele Ladungen abzuschirmen und eine Aggregation zu verhindern.

4.2.9 Zellaufnahmestudien der farbstoffmarkierten Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten in dendritische Zellen

Im Hinblick auf eine Anwendung in der Krebsimmuntherapie wurden die farbstoffmarkierten Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten auf ihre unspezifische Aufnahme in dendritischen Zellen getestet. Es ist wichtig, dass die verwendeten Carrierpolymere keine unspezifische Aufnahme in verschiedene Zelltypen zeigen, da man spezifisch dendritischen Zellen adressieren möchte. So ermöglicht z.B. das Anbringen von Antikörpern an das Carrierpolymer die gezielte Addressierung von dendritischen Zellen.^[154] Der Vergleich von unspezifischer und spezifischer Aufnahme bei Addressierung erlaubt dann die Bestimmung der Spezifität.

In Abbildung 4.2.30 sind die CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy)-Aufnahmen der farbstoffmarkierten N₃-funktionalisierten Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürsten gezeigt.

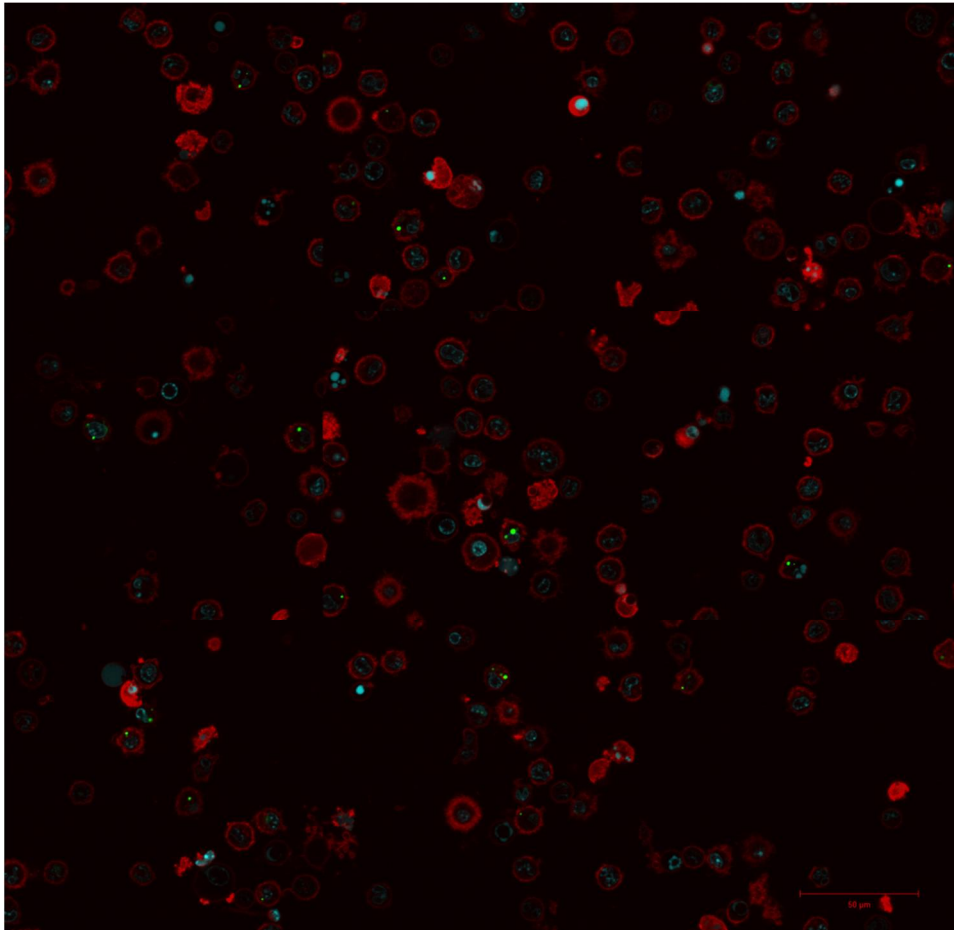


Abbildung 4.2.30: CLSM- Aufnahme der farbstoffmarkierten N₃-PiPrOx-Bürste in bmDc (bone marrow Dendritic cells); Inkubationszeit 4h bei 37 °C; $c = 10^{12}$ Teilchen; blau: Hoechst 33342 Farbstoffmarkierung des Zellkerns; rot: Cell Mask Orange Farbstoffmarkierung der Zellmembran, grün: DBCO-PEG4-Carboxyrhodamin 110 Farbstoffmarkierung der N₃-PiPrOx-Bürste

Es lassen sich vereinzelt Zellen erkennen, die eine unspezifische Aufnahme des Polymers (grün) zeigen. Der Mechanismus der molekularen Aufnahmewege in die Zelle ist bis heute nicht erklärt. Für eine Zellaufnahme muss das Molekül auf der Zelloberfläche adsorbieren. Leicht hydrophobe oder positiv geladene Moleküle oder Polymere adsorbieren auf der Zellmembran. Vermutlich sind die N₃-Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürsten gerade ausreichend hydrophob, so dass sie an die Zellmembran adsorbieren und folglich vereinzelt in die Zelle aufgenommen werden. Abbildung 4.2.31 zeigt die CLSM-Aufnahmen der

farbstoffmarkierten N_3 -funktionalisierten PEtOx-Bürste (links) und der farbstoffmarkierten N_3 -PEtOx-b-PIPrOx-Bürste (rechts). Hier lässt sich im Gegensatz zu der N_3 -PIPrOx-Bürste keine unspezifische Aufnahme erkennen. Beide Polymerbürsten besitzen einen hydrophileren Charakter im Vergleich zu der N_3 -PIPrOx-Bürste und üben vermutlich kaum Wechselwirkungen mit der Zellmembran aus, die zur unspezifischen Aufnahme führen könnten. Auch hier zeigt sich wieder, dass der Ethylblock der Kern-Schale Bürste den Isopropylblock abschirmt, so dass keine Zellaufnahme stattfinden kann im Gegensatz zu der reinen Azid-funktionalisierten Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste. Die hydrophile N_3 -PEtOx-Bürste sowie die Azid-funktionalisierte Kern-Schale Bürste scheinen ideale Kandidaten für die Anwendung als Carrier in der Krebsimmuntherapie, da sie keine unspezifische Aufnahme in dendritische Zellen zeigen und somit eine sehr wichtige Anforderung erfüllen.

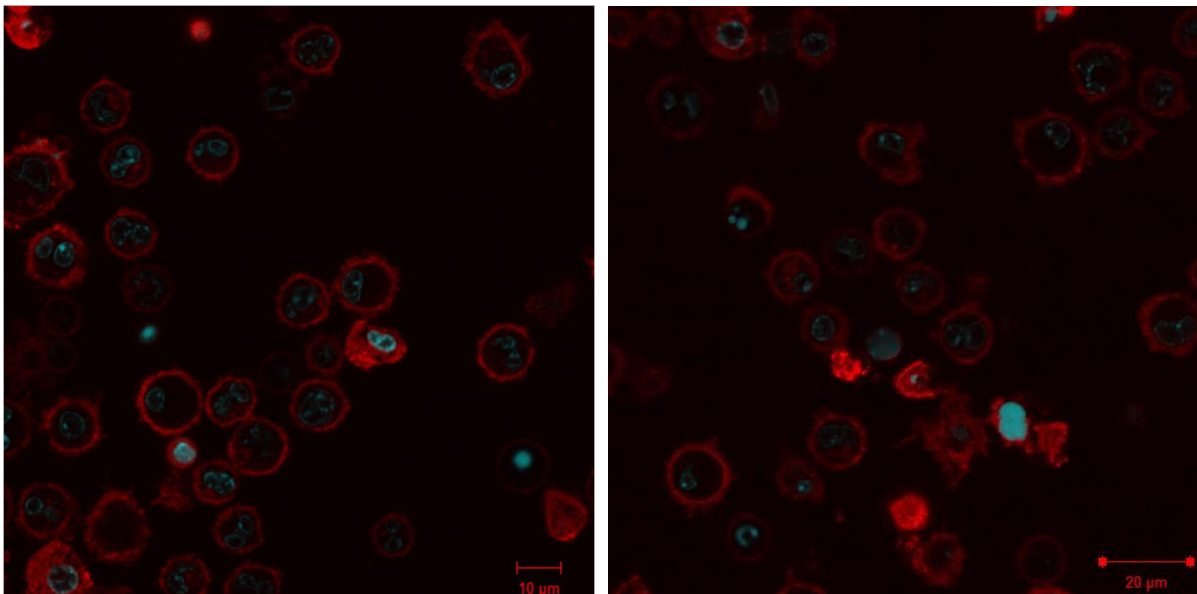


Abbildung 4.2.31: CLSM- Aufnahme der farbstoffmarkierten N_3 -PEtOx-Bürste(links) und der farbstoffmarkierten N_3 -PEtOx-b-PIPrOx-Bürste in bmDc; Inkubationszeit 4h bei 37 °C; $c= 10^{12}$ Teilchen; blau: Hoechst 33342 Farbstoffmarkierung des Zellkerns; rot: Cell Mask Orange Farbstoffmarkierung der Zellmembran

4.2.10 Zusammenfassung des Kapitels 4.2

Durch Verwendung der in Kapitel 4.1 beschriebenen Syntheseroute zur Darstellung einer Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste konnten nun Poly(2-oxazolin)bürsten mit einer Azid-funktionalisierung dargestellt werden. Dazu wurde in einer zweistufigen Synthese ein Azid-funktionalisiertes Tosylat hergestellt, das zur Initiierung der lebenden kationischen ringöffnenden Polymerisation der Oxazolin-Monomere verwendet wurde. Nach Funktionalisierung der linearen Azid-Poly(2-oxazolin)e mit dem Methacrylamidreagenz und anschließender freien radikalischen Polymerisation konnte eine Azid-funktionalisierte Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste, eine Azid-funktionalisierte Poly(2-ethyl-2-oxazolin)bürste sowie eine Azid-funktionalisierte Poly(2-ethyl-block-2-isopropyl-2-oxazolin)bürste erhalten werden. Mit Hilfe der statischen und dynamischen Lichtstreuung wurden Trägheitsradien im Bereich von 30 nm - 60 nm und hydrodynamische Radien von 20 nm - 40 nm bestimmt. Die Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten wurden durch kupferfreie Click-Chemie mit einem Carboxyrhodamin farbstoffmarkiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Farbstoff kovalent und nicht durch Adsorption gebunden ist. Mittels Fluoreszenzspektroskopie wurde gezeigt, dass die hohe Quantenausbeute des Farbstoffes trotz kovalenter Anbindung weitgehend erhalten bleibt.

Mit Hilfe der polymeranalogen Umsetzung nach Staudinger wurden die Azid-Gruppen zu Aminen reduziert. Durch dynamische Lichtstreuung wurde gezeigt, dass der hydrodynamische Radius durch die Reduktion kaum beeinflusst wird.

Des Weiteren wurden die Phasenübergangstemperaturen sowohl der Azid-funktionalisierten als auch der Amino-funktionalisierten Bürstenpolymere mittels UV-Spektroskopie bestimmt. Es zeigte sich, dass die Azid-funktionalisierte Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste eine um 5°C niedrigere Übergangstemperatur besitzt im Vergleich zur unfunktionalisierten Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste. Die Azid-Gruppe trägt zur Steigerung der Hydrophobizität bei und bewirkt so eine Erniedrigung der Phasenübergangstemperatur. Durch Reduktion der Azid-Gruppen zu Aminen wurde die Hydrophilie der Polymerbürsten gesteigert, was sich wiederum in einer Zunahme der Phasenübergangstemperatur zeigte.

Die Poly(2-ethyl-block-2-isopropyl-2-oxazolin)bürste erreichte, trotz des inneren Blocks mit einer Übergangstemperatur von um die 30°C, erst einen Übergang nach Salzzugabe. Es wurde vermutet, dass der äußere Ethyloxazolinblock den Inneren, zuerst kollabierenden

Isopropyl-oxazolinblock, stabilisiert. Um dies zu belegen wurden temperaturabhängige dynamische Lichtstreuungsmessungen durchgeführt. Erst deutlich oberhalb der Phasenübergangstemperatur des 2-Isopropyl-2-oxazolinblocks kommt es zur Bildung von Aggregaten, was tatsächlich auf eine Stabilisierung des inneren Blocks durch den äußeren Block schließen lässt.

Zudem wurde das Aggregationsverhalten der Polymerbürsten in Blutserum mittels dynamischer Lichtstreuung von Sabine Gietzen analysiert. Sowohl die Azid-funktionalisierte Poly(2-ethyl-2-oxazolin)bürste als auch die Azid-funktionalisierte Poly(2-ethyl-block-2-isopropyl-2-oxazolin)bürste zeigten keine Aggregatbildung in Blutserum. Die N_3 -funktionalisierte Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste dagegen zeigte Aggregate im Bereich von 300 nm, die auf hydrophobe Wechselwirkungen von Serumkomponenten mit dem Polymer zurückzuführen sind. Die Amino-funktionalisierten Bürstenpolymere zeigen alle Aggregate im Bereich von mehreren hundert Nanometern, die vermutlich durch Wechselwirkungen der positiv geladenen Polymerbürsten mit negativ geladenen Proteinen im Serum entstehen.

Abschließend wurden Zellstudien zu unspezifischer Aufnahme der Polymere in dendritische Zellen durchgeführt. Die hydrophilen Azid-funktionalisierten Poly(2-ethyl-2-oxazolin)- und Poly(2-ethyl-2-oxazolin-block-isopropyl-2-oxazolin)bürsten zeigen keine unspezifische Aufnahme im Gegensatz zu der etwas hydrophoberen Azid-funktionalisierten Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste.

4.3 Synthese und Charakterisierung zylindrischer Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)bürsten

Poly(2-oxazolin)e mit Formylseitenketten sind sehr interessant, da die Formylgruppe unter milden Bedingungen abgespalten werden kann und die erhaltenen Imineinheiten die Konjugation von verschiedensten Molekülen ermöglichen. Außerdem können durch Protonierung Polyelektrolyte erhalten werden, die für DNA oder siRNA Komplexierungen von großem Interesse sind.

Park und Mitarbeiter zeigten an linearem Poly(2-ethyl-2-oxazolin), dass durch kontrollierte Hydrolyse der Amidbindungen, unter drastischen Bedingungen, partiell positiv geladene Poly(2-ethyl-2-oxazoline) mit Imineinheiten entstehen, die sich gut als DNA-Komplexbildner eignen.^[116]

4.3.1 Synthese eines unsubstituierten 2-Oxazolin-Monomers

Bevor Poly(2-oxazolin)e mit Formylseitenketten hergestellt werden konnten, musste ein unsubstituiertes 2-Oxazolin Monomer dargestellt werden. Das gewünschte Monomer wurde in einer dreistufigen Synthese nach Saegusa erhalten.^[17] Im ersten Schritt wurde ein N-Hydroxyethylformamid durch Reaktion von Ethanolamin mit Ameisensäuremethylester hergestellt (Abbildung 4.3.1).

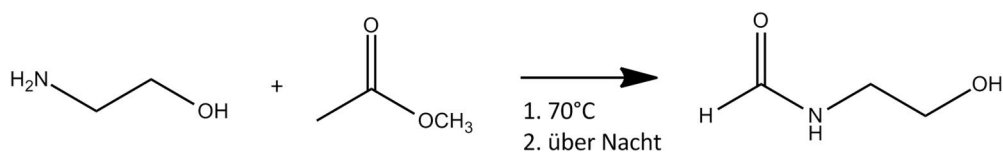


Abbildung 4.3.1: Reaktionsschema zur Darstellung von N-Hydroxyethylformamid

Die erfolgreiche Synthese wurde mit Hilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie (Abbildung 4.3.2) überprüft. Im Protonenspektrum sind keine Signale zu finden, die nicht dem gewünschten Produkt zugeordnet werden können.

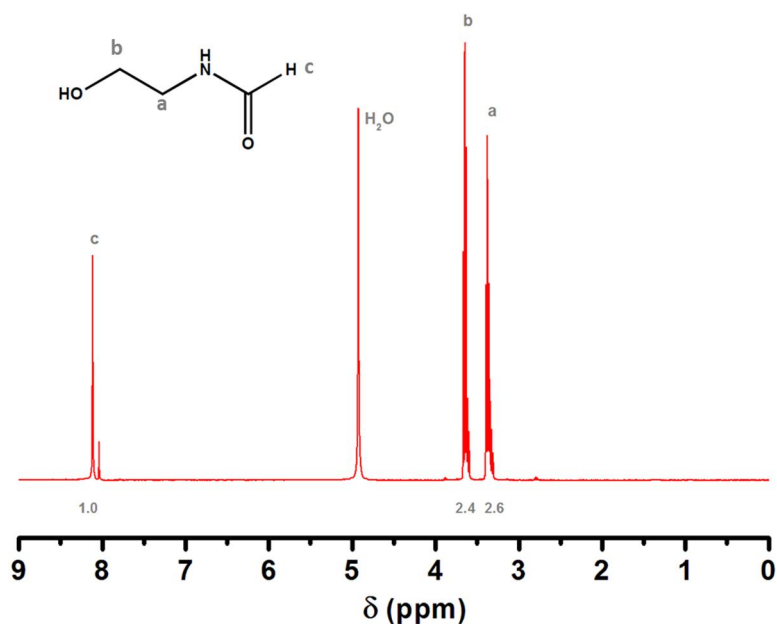


Abbildung 4.3.2: $^1\text{H-NMR}$ von *N*-Hydroxyethylformamid (300 MHz, $T=293\text{ K}$, LM: CDCl_3)

Im zweiten Schritt wurde das *N*-Hydroxyethylformamid mit Thionylchlorid zu *N*-(β -Chlorethylformamid) umgesetzt (Abbildung 4.3.3). Durch fraktionierte Destillation wurde das gewünschte Produkt erhalten, wie durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie (Abbildung 4.3.4) nachgewiesen werden konnte.

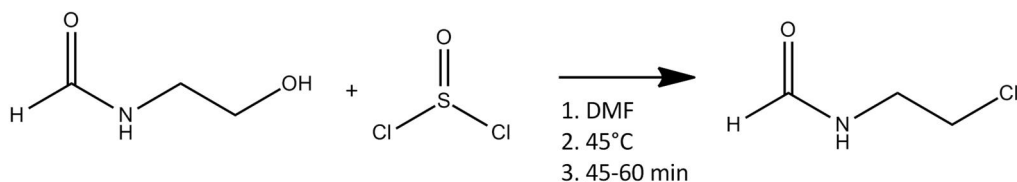


Abbildung 4.3.3: Reaktionsschema zur Darstellung von *N*-(β -Chlorethylformamid)

Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum zeigt neben den Produkt-zugehörigen Peaks noch ein paar weitere kleinere Peaks, die vom Lösungsmittel oder noch nicht umgesetzten *N*-Hydroxyethylformamid stammen, die die weitere Reaktion aber nicht stören.

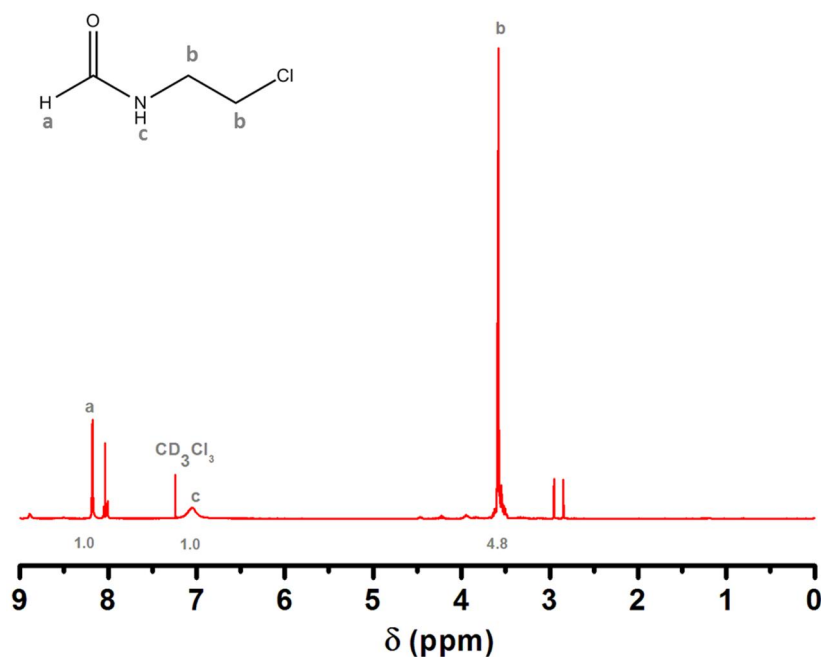


Abbildung 4.3. 4: ^1H -NMR von *N*-(β -Chlorethylformamid (300 MHz, $T=293\text{ K}$, LM: CDCl_3)

Im letzten Schritt wurde das *N*-(β -Chlorethylformamid) mit 50%iger wässriger KOH umgesetzt um den Ring zum 2-Oxazolin zu schließen (Abbildung 4.3.5). Durch zweifache Destillation wird das unsubstituierte 2-Oxazolin erhalten und mit ^1H -NMR-Spektroskopie analysiert.

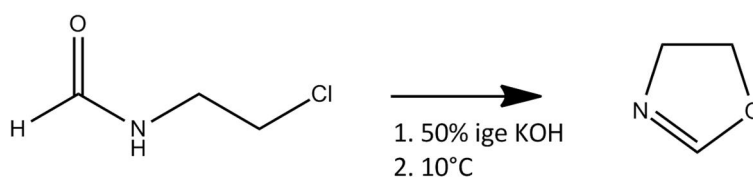


Abbildung 4.3.5: Reaktionsschema zur Darstellung von unsubstituiertem 2-Oxazolin

Das Protonenspektrum (Abbildung 4.3.6) zeigt keine Verunreinigungen. Der einzige Peak, der nicht zugordnet werden konnte ist auf geringe Wasserreste zurückzuführen. Daher wurde das Produkt in dieser Form für die weiteren Polymerisationen verwendet.

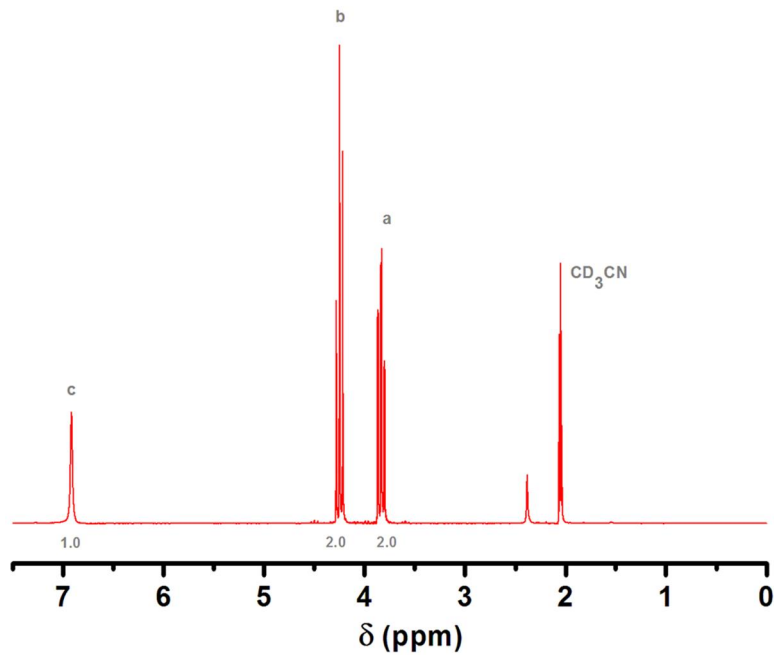


Abbildung 4.3. 6: $^1\text{H-NMR}$ von unsubstituiertem 2-Oxazolin (300 MHz, $T=293\text{ K}$, LM: CDCl_3)

4.3.2 Synthese eines Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)makromonomers

Die Herstellung des Poly(2-ethyl-co-2-formyl) (PEtOx-co-PForOx) erfolgte ebenfalls in drei Schritten. Im ersten Schritt wurde eine Mischung aus den zwei Monomeren 2-Ethyl-2-Oxazolin und unsubstituiertem 2-Oxazolin im Verhältnis 70 mol% / 30 mol% durch lebende kationische ringöffnende Polymerisation und Initiierung mit dem Azid-funktionalisierten Tosylat polymerisiert (Abbildung 4.3.7). Der Abbruch der Polymerisation erfolgte mit Methanol, so dass keine weitere funktionelle Gruppe eingeführt wurde, denn diese würde im weiteren Verlauf stören.

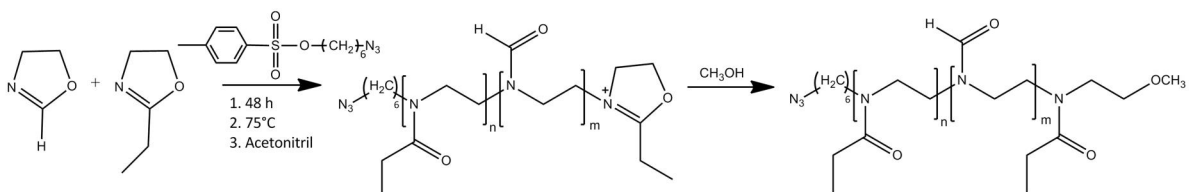


Abbildung 4.3.7: Reaktionsschema zur Herstellung von Azid-funktionalisiertem Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)

Der Umsatz und die Zusammensetzung des Polymers wurden mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie analysiert (Abbildung 4.3.8). Durch das Verhältnis der Formylprotonen im Vergleich zu den drei Protonen der Ethylseitenkette konnten die Zusammensetzung sowie der Polymerisationsgrad bestimmt werden. Wie theoretisch erwartet, wurde eine Zusammensetzung von 70 Mol% 2-Ethyl-2-oxazolin zu 30 Mol% unfunctionalisiertem 2-Oxazolin bei einem Polymerisationsgrad von $P_n=33$ erhalten. Das Molekulargewicht wurde aus dem NMR zu $M_n=3160$ g/mol berechnet.

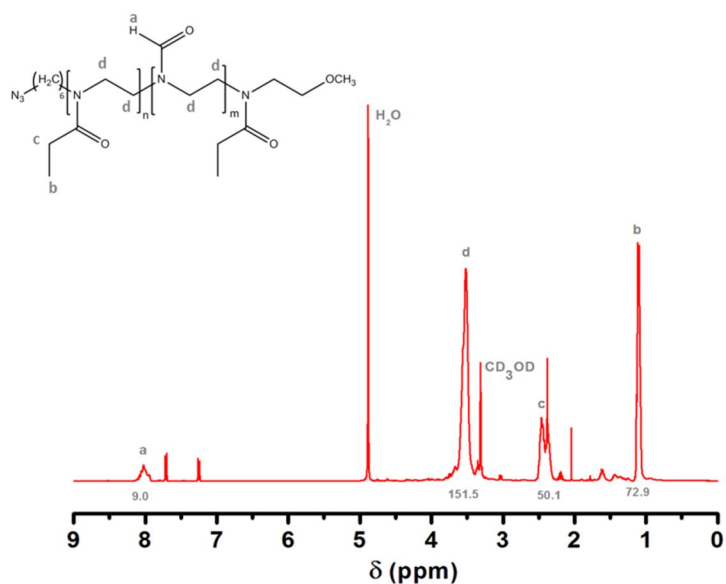


Abbildung 4.3.8: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des N_3 -Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)s (400 MHz, $T=293$ K, LM: CD_3OD)

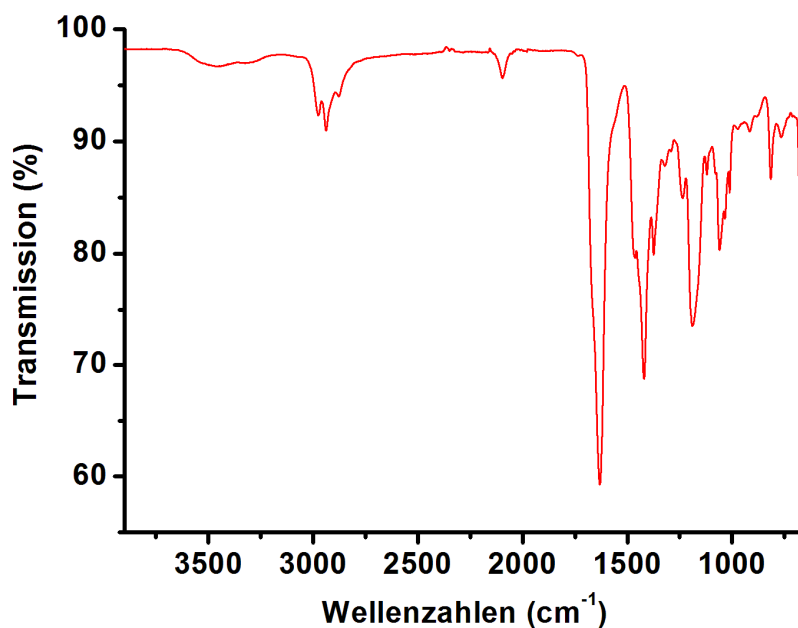


Abbildung 4.3.9: IR-Spektrum des N_3 -Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)

Abbildung 4.3.9 zeigt das IR-Spektrum des Azid-funktionalisierten Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)s. Wie auch schon zuvor kann durch Initiierung der lebenden kationischen Polymerisation mit dem Azid-modifizierten Initiator eine N_3 -Gruppe eingeführt werden, wie das IR-Spektrum mit der charakteristischen Azid-Schwingungsbande bei 2100 cm^{-1} zeigt.

Im zweiten Schritt wurde die am α -Ende durch den Initiator eingeführte Azid-Gruppe mittels Triphenylphosphin nach Staudinger zur Aminogruppe reduziert (Abbildung 4.3.10).

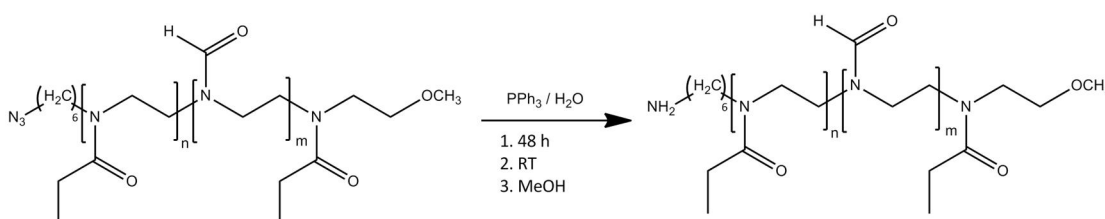


Abbildung 4.3.10: Reaktionsschema zur Reduktion der α -terminalen Azid-Gruppe

Mit Hilfe der IR-spektroskopie wurde kontrolliert, ob die Schwingungsbande der Azidgruppe bei 2100 cm^{-1} vollständig verschwunden ist. Abbildung 4.3.11 zeigt das IR-Spektrum nach der

Reduktion der Azid-Gruppe, wie erwartet ist keine Schwingungsbande bei 2100 cm^{-1} zu erkennen und die Reduktion war erfolgreich.

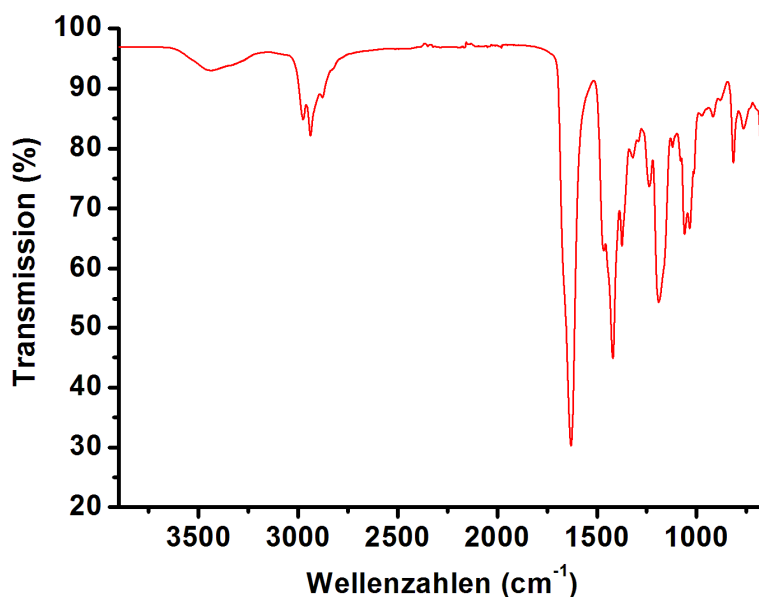


Abbildung 4.3.11: IR-Spektrum der NH_2 -PET-co-PForOx-Bürste

Durch die entstandene α -terminale Amino-Gruppe ist es nun möglich mit Hilfe eines Aktivesters im letzten Schritt eine polymerisierbare Gruppe einzuführen. Das Amin-funktionalisierte Poly(2-EtOx-co-2-ForOx) wurde mit einem N-Hydroxysuccinimid-methacrylsäureester zum gewünschten Makromonomer umgesetzt (Abbildung 4.3.12).

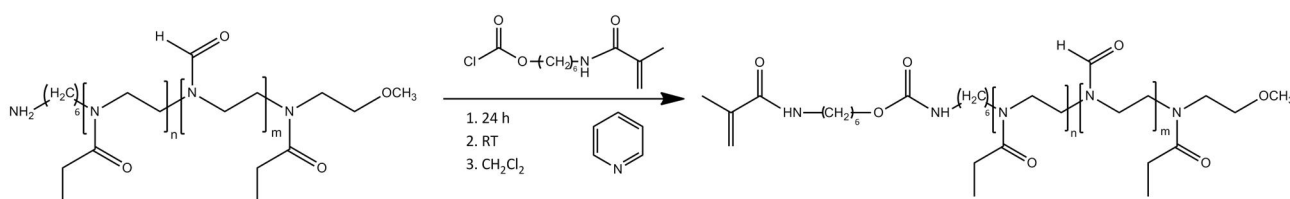


Abbildung 4.3.12: Reaktionsschema zur Herstellung des Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)makromonomers

Nach Dialyse gegen Methanol, um den überschüssigen N-Hydroxysuccinimidmethacrylsäureester abzutrennen, wurde das erhaltene Makromonomer mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie analysiert (Abbildung 4.3.13). Das Verhältnis der Formylprotonen zu den Protonen der Methacrylamidgruppe ergab ein Umsatz von 90%. Das Verhältnis der

Formylgruppen zu den Ethylgruppen konnte unverändert wieder zu 30 / 70 bestimmt werden und das Molekulargewicht wurde aus dem NMR zu $M_n = 3230$ g/mol berechnet.

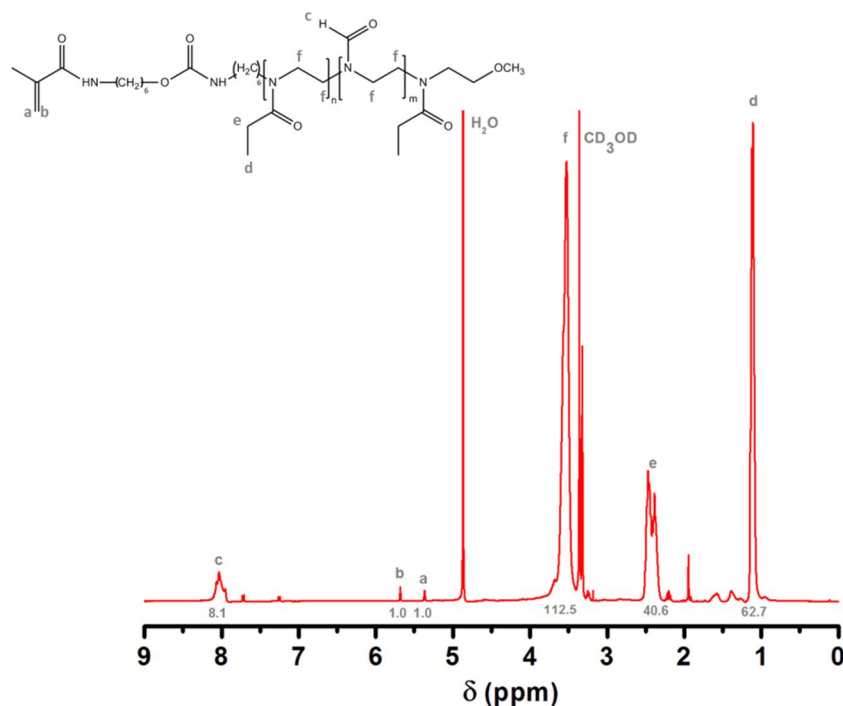


Abbildung 4.3.13: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)makromonomer (400 MHz, $T = 293$ K, LM: CD_3OD)

4.3.3 Synthese und Charakterisierung einer zylindrischen Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)bürste

Nachdem die Synthese des Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)makromonomers erfolgreich war, wurde dieses durch freie radikalische Polymerisation zu zylindrischen Bürstenstrukturen polymerisiert. Wie aus den Arbeiten von Tsukahara et al. bekannt ist und wie schon in Kapitel 4.1 beschrieben ist eine extrem hohe Konzentration des Makromonomers nötig um einen hohen Polymerisationsgrad zu erreichen. Daher wurde in einer stark konzentrierten wässrigen Lösung (1 g Makromonomer auf 1 ml Wasser) polymerisiert (Abbildung 4.3.14).

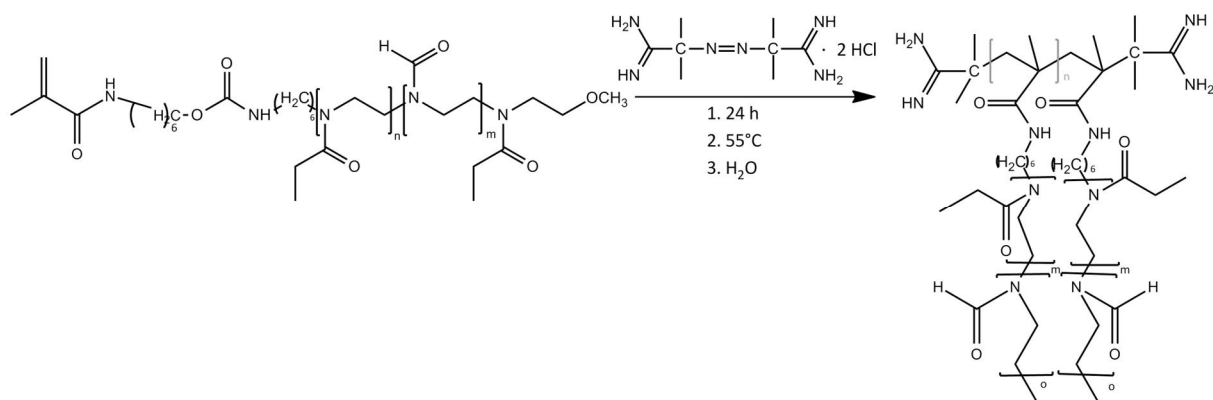


Abbildung 4.3.14: Reaktionsschema zu Synthese der Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)bürste

Nach beendeter Polymerisation wurde ein Gel erhalten, das in den meisten organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Chloroform, HFIP und auch Wasser unlöslich war. Wieso es zur Bildung eines Gels kommt kann kontrovers diskutiert werden. Beispielsweise ist eine Radikalübertragung durch den Formylrests denkbar, da die Übertragungskonstante des Formylrest wesentlich größer ist als etwa die von Wasser, so findet man in der Literatur anhand vergleichbarer Systeme, dass die Übertragungskonstante des Dimethylformamid in der freien Radikalik um eine Größenordnung höher ist als die von Wasser.^[155] Dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse von Schlüter und seinen Mitarbeitern, die dendronisierte Polymere mittels freier radikalischer Polymerisation in DMF darstellen.^[156] Daher ist die Ursache für das Ausgelieren des Polymers nicht eindeutig zu klären.

Durch eine Sol-Gel Extraktion aus Methanol konnte eine lösliche Fraktion Polymer erhalten werden, die durch statische und dynamische Lichtstreuung sowie Rasterkraftmikroskopie als abbildende Methode analysiert wurde.

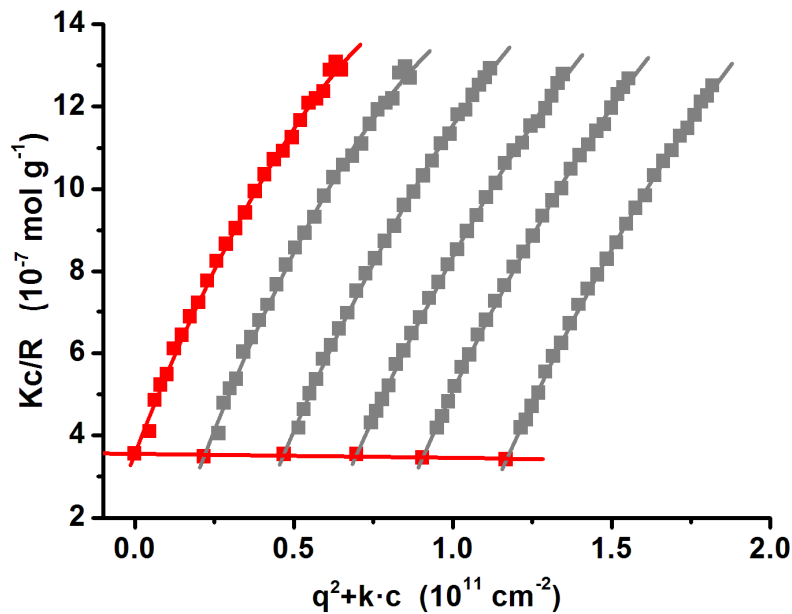


Abbildung 4.3.15: Zimmplot der Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)bürste in Methanol bei $T = 293 \text{ K}$ zwischen 30 und 150 Grad (5 Gradschritte); $c_1 = 0.2337 \text{ g/l}$; $c_2 = 0.1811 \text{ g/l}$; $c_3 = 0.1396 \text{ g/l}$; $c_4 = 0.0939 \text{ g/l}$; $c_5 = 0.0436 \text{ g/l}$; $M_w = 3.14 \cdot 10^6 \text{ g/mol}$; $R_g = 99.72 \text{ nm}$; $A_2 = -7.32 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-3} / \text{g}$; $dn/dc = 0.1555 \text{ cm}^3 / \text{g}$; Salz: Lithiumbromid ($c = 5 \text{ mM}$); $k = 5 \cdot 10^{11} \text{ cm} / \text{g}$

Abbildung 4.3.15 zeigt den Zimmplot der Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)bürste. Der Trägheitsradius beträgt ca. 100 nm. Der ungewöhnlich hohe Trägheitsradius und die Krümmung der Kurven ermöglichen kein lineares Fitten, weshalb statt eines linearen Fits ein polynom Fit zweiter Ordnung verwendet wurde. Die Polymerisationsmethode, mit der die Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)bürsten erhalten werden sollten, verursacht meist eine breite Verteilung. Durch die damit verbundene hohe Polydispersität ist eine hochmolekulare Fraktion enthalten, die für die Krümmung der Kurven verantwortlich ist.

In Abbildung 4.3.16 ist das Ergebnis der dynamischen Lichtstreuung gezeigt. Die aus der Sol-gel-Extraktion erhaltene Polymerfraktion besitzt einen hydrodynamischen Radius von 55 nm und somit ein ρ -Verhältnis von 1.8, das allerdings im Bereich der ρ -Verhältnisse der anderen zylindrischen Poly(2-oxazolin)bürsten liegt.

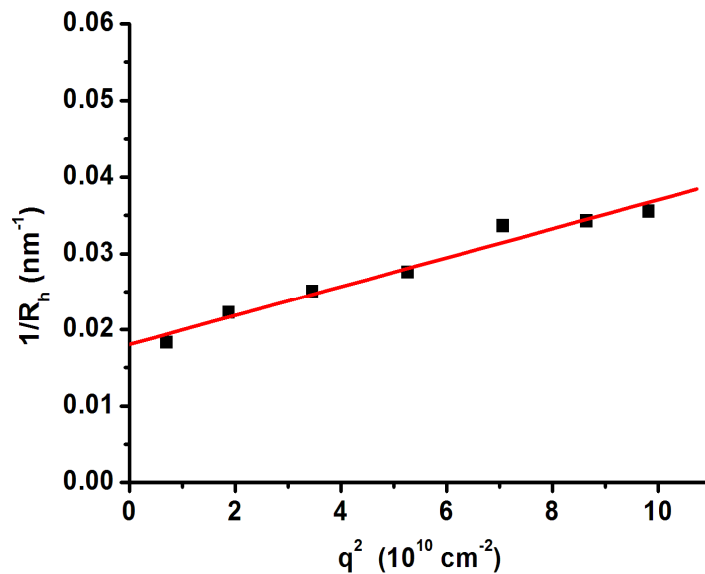


Abbildung 4.3.16: DLS der Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)bürste in Methanol bei 293 K zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte); $c=0.1619 \text{ g/l}$; $\eta= 0.5867 \text{ cp}$; $R_h= 55 \text{ nm}$; Salz: Lithiumbromid ($c=5 \text{ mM}$)

Abschließend sind in Abbildung 4.3.17 die Aufnahmen der Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)fraktion gezeigt, die durch spin coating aus wässriger Lösung auf eine Mica-Oberfläche aufgebracht wurde. Neben einem großen niedermolekularen kugelförmigen Anteil sind auch wurmartige Strukturen zu erkennen. Hingegen lassen sich keine vernetzten oder verzweigten Strukturen erkennen, die als Ursache für die beobachtete Gelierung in Frage kämen.

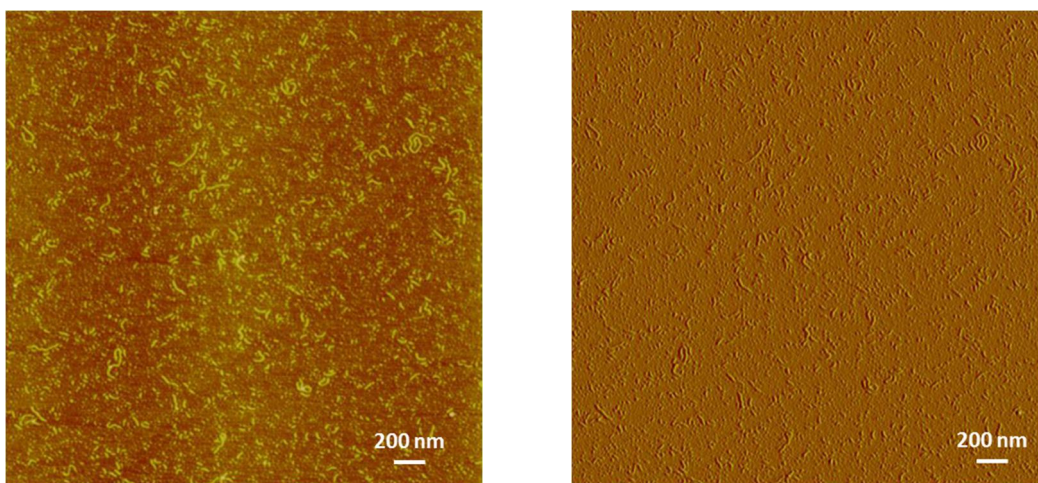


Abbildung 4.3.17: trockene AFM-Aufnahme der Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)bürste durch spin coating aus wässriger Lösung auf Mica; $c= 0.05 \text{ g/l}$; links: Höhenbild; rechts: Amplitudenbild

4.3.4 Abspaltung der Formylseitenketten der zylindrischen Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)bürsten

Um partiell positiv geladene Polymerbürsten oder eine Konjugationsmöglichkeit zu erhalten, wurden die Formylseitenketten abgespalten. Die daraus resultierenden Imineinheiten dienen als Konjugationsstelle oder nach Prototierung als positiv geladene Anteile in der Polymerbürste um DNA oder siRNA Komplexe zu bilden. Die Hydrolyse der Formylseitenketten kann unter wesentlich mildereren Bedingungen durchgeführt werden, als die Hydrolyse der Poly(2-ethyl-2-oxazolin)e nach Park et al. ^[116], weshalb dieser Ansatz gewählt wurde.

Die zylindrischen PEtOx-co-PForOx-Bürsten wurden mit 5%iger methanolischer Salzsäurelösung umgesetzt (Abbildung 4.3.18) und anschließend mittels ¹H-NMR Spektroskopie analysiert.

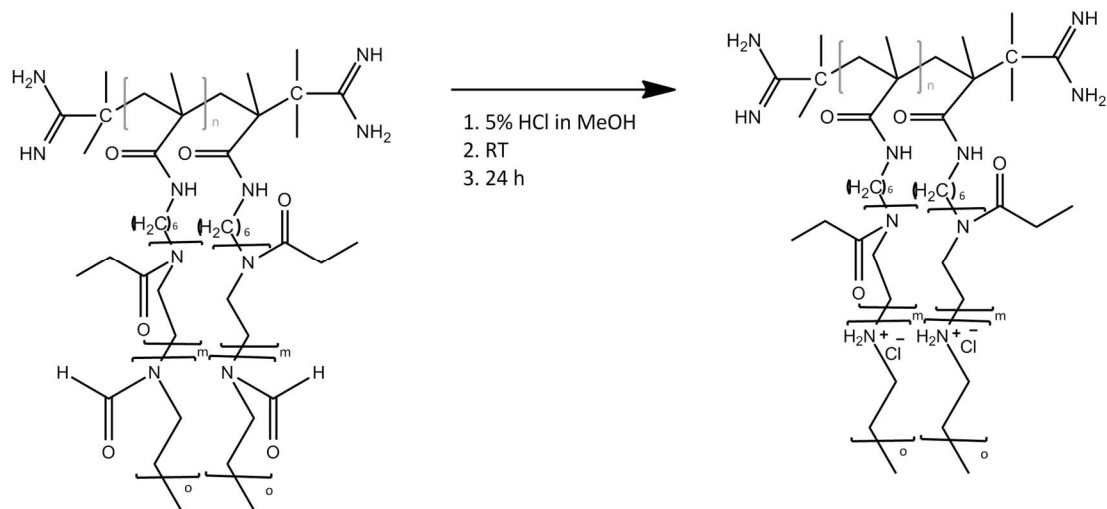


Abbildung 4.3.18: Reaktionsschema zur Hydrolyse der Formylseitenketten

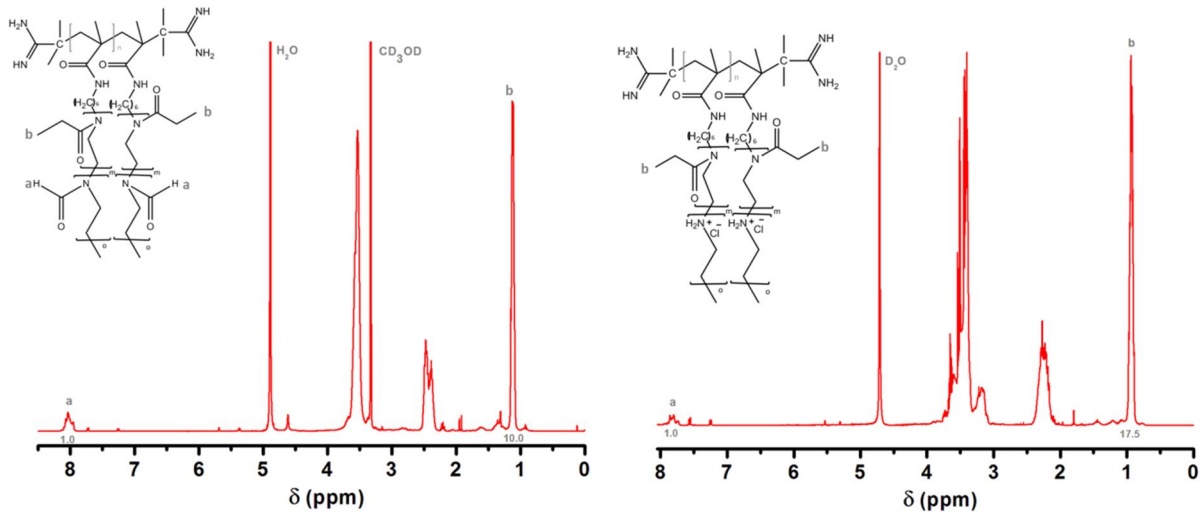


Abbildung 4.3.19: links: $^1\text{H-NMR}$ der Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)bürste (400 MHz, $T = 293\text{ K}$, LM: CD_3OD), rechts: $^1\text{H-NMR}$ der Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)bürste nach Reaktion mit 5%iger methanolischer Salzsäurelösung (400 MHz, $T = 293\text{ K}$, LM: D_2O)

Abbildung 4.3.19 zeigt das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum vor (links) und nach (rechts) Reaktion mit 5%iger methanolischer Salzsäurelösung. Vor dem Abspalten der Formylseitenketten ist das Verhältnis der Formylprotonen (a) zu den Protonen der Ethylseitenkette (b) im NMR 1/10, das heißt auf 1 Formylproton kommen 3 Ethylprotonen, was dem ursprünglichen Verhältnis von 30% Formylgruppen zu 70% Ethylgruppen entspricht. Nach der Hydrolyse mit 5%iger methanolischer Salzsäurelösung ist immer noch ein Signal zu erkennen, das den Formylprotonen zugeordnet werden kann. Aus dem Verhältnis der Protonen a (Formyl) zu den Protonen b (Ethyl) lässt sich ein Umsatz von 20% errechnen. Da 80% der Formylgruppen nicht reduziert werden konnten, wurde die Reaktion noch einmal mit einer 10%igen Lösung wiederholt und das Ergebnis mit Hilfe der NMR-Spektroskopie analysiert.

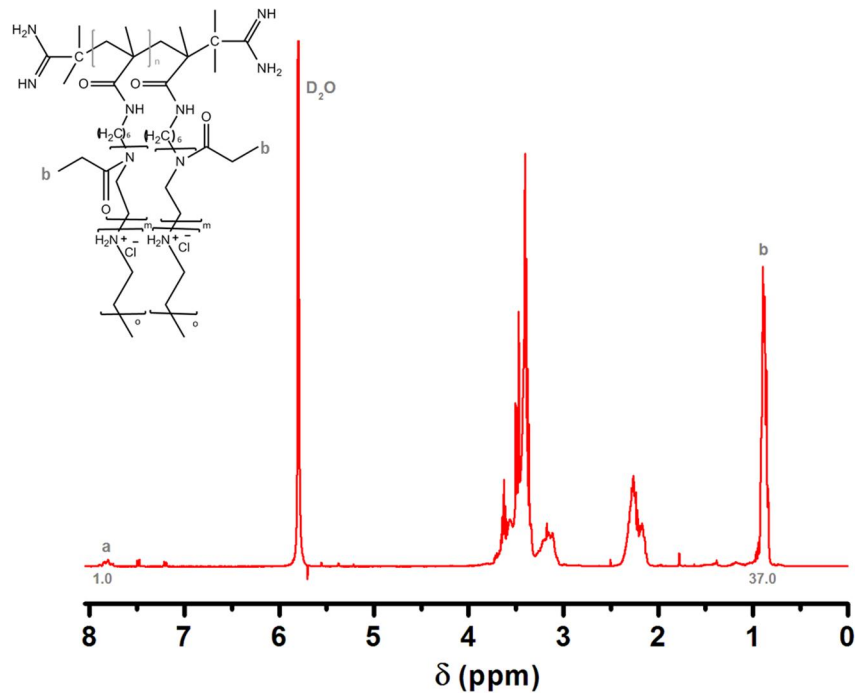


Abbildung 4.3.20: $^1\text{H-NMR}$ der Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)bürste nach Reaktion mit 10 % iger methanolischer Salzsäurelösung (400 MHz, $T = 293\text{ K}$, LM: D_2O)

Abbildung 4.3.20 zeigt das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum nach Reaktion mit 10 % iger Salzsäurelösung. Es lässt sich noch immer ein Signal bei 8 ppm erkennen, das den Protonen der Formylgruppe zugeordnet werden kann. Es könnte sich dabei auch um kleine Rückstände von Ameisensäure handeln, die bei der Reaktion entstanden ist und noch nicht vollständig entfernt werden konnten. Aus dem Verhältnis der Formylprotonen zu den Protonen der Ethylseitenkette lässt sich ein Umsatz von 70% errechnen. Die Hydrolyse von 70% der Formylgruppen zu Imineinheiten ist ausreichend, so dass kein weiterer Hydrolyseversuch unternommen wurde. Die Copolymerbürste bestehend aus Seitenketten mit Imineinheiten, Formyl-sowie-Ethylresten sollte mit dynamischer und statischer Lichtstreuung untersucht werden. Bei einer Konzentration von 1 g/l wurde die Bürste mittels dynamischer Lichtstreuung charakterisiert und es zeigte sich, dass die Streuintensität nicht ausreichte um die Probe zu messen. Filtrationsverluste konnten ausgeschlossen werden, da die Probe ebenfalls unfiltriert vermessen wurde, aber auch dabei reichte die Streuintensität nicht aus. Dies lässt darauf schließen, dass keine großen Teilchen in der Probe enthalten sind. GPC Messungen bestätigten diese Vermutung. Es konnte nur noch eine niedermolekulare Verteilung im Oligomerbereich detektiert werden (Abbildung 4.3.21).

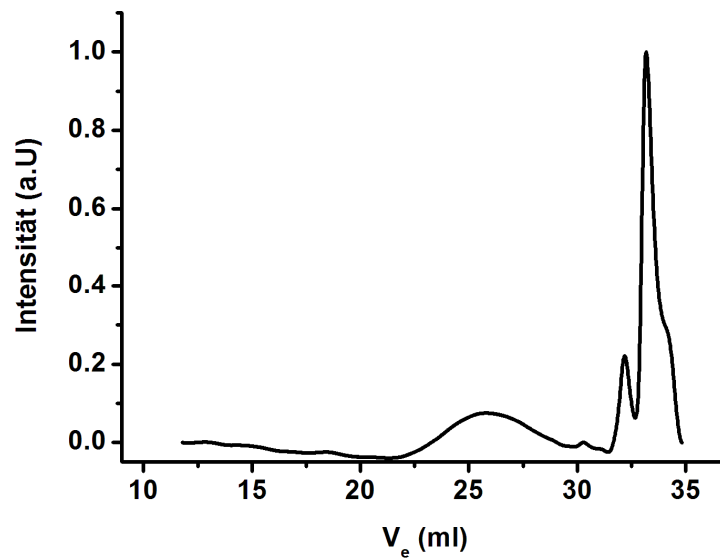


Abbildung 4.3.21: Gelpermeationschromatogramm der Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)bürste nach der Hydrolyse mit 10% iger HCl-Lösung in DMF (LiBr 1 g/l, T= 333 K, Oligomersäulensatz)

Das Chromatogramm zeigt neben der Molmassenverteilung noch zwei weitere Peaks, die an der Ausschlussgrenze eluieren und schon in den Lösungsmittelpeak hineinlaufen. Dabei handelt es sich entweder um Fragmente mit Molmassen um die 500 g/mol oder andere Lösungsmittel, die noch im Polymer gebunden waren.

Die aus der GPC erhaltenen Werte für die Molmasse $M_n = 3176$ g/mol stimmen gut mit der berechneten Molmasse für die Seitenketten überein, die zuvor aus dem $^1\text{H-NMR}$ des Makromonomers bestimmt wurde. Daher scheint es, als wurden durch die Reaktion mit den verdünnten Salzsäurelösungen die Amidbindungen zwischen dem Polymerrückgrat und den Seitenketten hydrolysiert, so dass nur noch Seitenketten und Seitenkettenfragmente detektiert werden können. Dies ist erstaunlich, da zum Beispiel für die Hydrolyse der Amidbindung der Poly(2-ethyl-2-oxazolin)e sehr viel härtere Bedingungen nötig sind als die hier verwendeten. Eine lokal hohe Konzentration an Ammoniumionen im Bereich der Hauptkette könnte eine Hydrolyse der Seitenkette hier eventuell zusätzlich begünstigen. (Nachbargruppeneffekte)

Neben der Hydrolyse mit verdünnter Salzsäurelösung wäre auch eine Abspaltung mit Hydrazin möglich gewesen, die eventuell die Fragmentierung von Haupt- und Seitenkette

verhindert hätte. Da die gesamte Probe mit der verdünnten Salzsäurelösung umgesetzt wurde, konnten weitere Hydrolyseversuche nicht getestet werden.

4.3.5 Zusammenfassung des Kapitels 4.3

Mit Hilfe der „Grafting-Through“-Methode konnten zylindrische Bürstenstrukturen mit Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)seitenketten hergestellt werden. Dazu wurde zuerst in einer mehrstufigen Synthese ein unsubstituiertes 2-Oxazolin hergestellt. Durch lebende kationische ringöffnende Polymerisation mit einem Azid-funktionalisierten Initiator wurde ein statistisches Copolymer mit einem Anteil von 70 Mol% 2-Ethyl-2-oxazolin und 30 Mol% unsubstituiertem 2-Oxazolin, sowie einer α -terminalen Azid-Funktionalisierung erhalten. Nach Reduktion der Azid-Gruppe mittels Staudinger Reduktion konnte die erhaltene Amino-Gruppe erfolgreich mit einer Methacrylamidgruppe funktionalisiert werden. Durch freie radikalische Polymerisation der erhaltenen Makromonomere wurden zylindrische Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)bürsten erhalten, wie mit Rasterkraftmikroskopie, dynamische und statischer Lichtstreuung gezeigt werden konnte. Die Polymerbürsten weisen eine breite Verteilung auf, der hydrodynamische Radius beträgt 55 nm und der Trägheitsradius 100 nm. Das mittlere Gewichtsmittel wurde aus der statischen Lichtstreuung zu $M_w = 3.14 \cdot 10^6$ g/mol bestimmt. Durch Hydrolyse der Formylgruppen mit Hilfe von verdünnter Salzsäure sollten partiell positiv geladene Polymerbürsten zur Komplexierung von DNA oder siRNA erhalten werden. Bei dem Versuch die Formylgruppen zu hydrolysieren wurden die Amidbindungen der Seitenketten zum Polymerrückgrat gespalten, so dass nach Reaktion mit der verdünnten Salzsäurelösung nur noch die fragmentierten Seitenketten mit Hilfe der GPC detektiert werden konnten.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die „Grafting-Through“-Methode verwendet werden kann um hochmolekulare Poly(2-oxazolin)bürsten herzustellen. Zu Beginn wurde eine zylindrische Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste synthetisiert, da Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)e eine Phasenübergangstemperatur in Wasser von 37°C besitzen, was eine interessante Eigenschaft für weitere Anwendungen sein kann. Durch statische und dynamische Lichtstreuung wurden der Trägheits- sowie der hydrodynamische Radius und das Molekulargewicht bestimmt. Mit Hilfe der UV-Spektroskopie wurden die Phasenübergangstemperaturen des Makromonomers sowie der Polymerbürste untersucht. Weiterin konnten durch temperaturabhängige Messungen mittels dynamischer Lichtstreuung das Aggregationsverhalten der zylindrischen Bürsten an ihrem Phasenübergang untersucht werden. Bis zur Phasenübergangstemperatur kann ein Kollaps der Bürste beobachtet werden, oberhalb ihrer Übergangstemperatur bildet sie Aggregate. Diese Beobachtung ist gegensätzlich zu Poly(N-isopropylacrylamid)bürsten, die bis 3°C oberhalb ihres Übergangs stabil als Einzelmoleküle vorliegen.^[145] Die Rasterkraftmikroskopie ermöglichte die Abbildung der zylindrischen Strukturen sowie die Bestimmung der Konturlänge der Bürsten, die mit der durch die statische Lichtstreuung ermittelten Konturlänge übereinstimmt. Abschließend konnte durch Anpassung der Lichtstreuergebnisse an die Wurmchentheorie von Kratky und Porod die Kuhlänge der Bürste berechnet werden, die sich auf $l_k = 110$ nm beläuft.

Da Poly(2-oxazolin)e neben einer geringen Zytotoxizität und einer hohen Biokompatibilität noch viele weitere positive Eigenschaften besitzen^[25] speziell im Hinblick auf eine Anwendung im medizinischen Bereich, beruht die weitergehende Arbeit vor allem auf der Synthese von funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten für die Verwendung als Drug Delivery System bzw. als Carrier für die Krebsimmuntherapie. Als funktionelle Gruppe wurde das Azid ausgewählt, da es kaum mit anderen reaktiven Gruppen wechselwirkt und somit die Polymerisationen und weitere Reaktionen nicht stört. Darüber hinaus eignet es sich für bioorthogonale Konjugationsstrategien.

Es wurde ein Azid-funktionalisierter Initiator hergestellt, der zu Initiierung der lebenden kationischen ringöffnenden Polymerisation von 2-Oxazolinmonomeren verwendet wurde. Der Abbruch der Reaktion erfolgte mit einem Mono-Boc-geschützten Piperazin. Nach Abspalten der Boc-Schutzgruppe am ω -Terminus konnte eine Methacrylamid-funktionalisierung eingebracht werden. Die nun erhaltenen Makromonomere mit einer Azid-Funktionalisierung am α -terminalen Ende wurden durch freie radikalische Polymerisation zu zylindrischen Strukturen polymerisiert. So konnten Bürstenpolymere mit einer Azid-Endgruppe pro Seitenkette erhalten werden. Es wurden zwei verschiedene Homopolymerbürsten mit Poly(2-ethyl-2-oxazolin)- und Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)seitenketten sowie eine Kern-Schale-Bürste mit einem Poly(2-ethyl-2-oxazolin)block außen und einem Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)block innen hergestellt. Die erhaltenen Azid-funktionalisierten Bürsten wurden mittels dynamischer und statischer Lichtstreuung untersucht und Trägheits- und hydrodynamische Radien zwischen 30 nm und 60 nm sowie 20 nm und 40 nm bestimmt.

Auch die Phasenübergangstemperaturen der Azid-funktionalisierten Bürsten wurden mittels UV-Spektroskopie untersucht. Die Kern-Schale Bürste sowie die Homopolymerbürste mit Poly(2-ethyl-2-oxazolin)seitenketten zeigten ohne Zugabe von Salz keinen Phasenübergang zwischen 20°C und 80°C. Erst nach Salzzugabe konnte der Phasenübergang soweit gesenkt werden, dass er im Bereich von 20°C-80°C detektiert werden konnte. Die Azid-funktionalisierte Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste erzielte im Vergleich zu der unfunktionalisierten Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste eine um 5°C erniedrigten Übergang, was darauf schließen lässt, dass die Azid-Gruppe durch Erhöhung der hydrophoben Wechselwirkung zur Erniedrigung der Phasenübergangstemperatur beiträgt.

Weiterhin wurde das Aggregationsverhalten der Kern-Schale-Bürste temperaturabhängig mittels dynamischer Lichtstreuung analysiert, da es interessant ist zu beobachten wie sich das Aggregationsverhalten oberhalb der Phasenübergangstemperatur des inneren Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)blocks verhält und in wie fern der äußere Poly(2-ethyl-2-oxazolin)block zur Stabilisierung beiträgt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass es bis 10°C oberhalb des Übergangs des inneren Blocks zu keiner Aggregation kommt. Danach reicht die Stabilisierung des äußeren Blocks nicht mehr aus und es kommt zu intra-und-intermolekularen Wechselwirkungen, die zur Bildung von Aggregaten führen.

Mit Hilfe der polymeranalogen Umsetzung nach Staudinger wurden die Azid-Gruppen der Bürstenpolymere zu Aminen reduziert. So ist die Möglichkeit gegeben in zukünftigen Experimenten andere Komponenten wie beispielsweise Antikörper oder Antigene, für die Verwendung in der Krebsimmuntherapie, zu konjugieren. Mittels IR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die Reduktion quantitativ stattfand, da nach Umsetzung keine Azidschwingungsbande detektiert werden konnte. Durch dynamische Lichtstreuung wurden Größenveränderungen untersucht. Da sich der hydrodynamische Radius nicht änderte, lässt es darauf schließen, dass keine Verunreinigungen in Form von Aggregaten enthalten sind. Die Phasenübergangstemperaturen der nun Amino-funktionalisierten Bürsten liegen wie erwartet höher im Vergleich zu den Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten. Durch die Aminogruppen werden die Hydrophilie und die Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen erhöht, wodurch die Bürstenpolymere länger solvatisiert bleiben.

Um erste Hinweise auf das Verhalten der Bürsten in biologisch relevanten Medien zu erhalten, wurde das Aggregationsverhalten der Azid- und Amino-funktionalisierten Polymerbürsten in humanem Blutserum mittels dynamischer Lichtstreuung analysiert. Sowohl die Azid-funktionalisierte Poly(2-ethyl-2-oxazolin)bürste als auch die Azid-modifizierte Kern-Schale Bürste zeigen keine Aggregation in Serum. Die N₃-funktionalisierte Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste und die Amino-funktionalisierten Bürsten zeigen alle Aggregationen im Bereich von 300 nm, die auf hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen der Serumkomponenten mit den Polymerbürsten beruhen.

Unter Verwendung der kupferfreien Click-Chemie wurden alle Azid-funktionalisierten Polymerbürsten mit Farbstoff-markiert. Der Farbstoff konnte unter Erhalt seiner Aktivität kovalent gebunden werden.

In weiterführenden Experimenten können die funktionellen Poly(2-oxazolin)bürsten als Carrier für Wirkstoffe oder Biomoleküle verwendet werden. Für die Konjugation diese Moleküle kann dann entweder der Ansatz der kupferfreien Click-Chemie gewählt werden, bei Verwendung der Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten oder die klassische Konjugationschemie über einen Linker bei Gebrauch der Bürstenpolymere mit den Aminogruppen.

Im Hinblick auf eine Anwendung als Carrier in der Krebsimmuntherapie wurde die unspezifische Zellaufnahme der Azid-funktionalisierten, farbstoffmarkierten Poly(2-

oxazolin)bürsten in dendritische Zellen getestet. Für die Verwendung in der Krebsimmuntherapie ist es wichtig, dass die verwendeten Carrierpolymere keine unspezifische Zellaufnahme zeigen, da man die Zellen spezifisch adressieren möchte. Die Untersuchungen zeigten, dass die hydrophilen Azid-funktionalisierten, farbstoffmarkierten Poly(2-ethyl-2-oxazolin)- und Poly(2-ethyl-2-oxazolin-block-isopropyl-2-oxazolin)bürsten keine unspezifische Aufnahme in dendritische Zellen aufweisen, im Gegensatz zu der etwas hydrophoberen Azid-funktionalisierten, farbstoffmarkierten Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)-bürste. Somit scheinen die Azid-modifizierten Poly(2-ethyl-2-oxazolin)bürsten und die Azid-funktionalisierten Kern-Schale Bürsten sich ideal für die Anwendung als Carrier in der Krebsimmuntherapie zu eignen, da sie keine unspezifische Aufnahme in dendritische Zellen zeigen und somit einer sehr wichtige Anforderung erfüllen.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass es mit Hilfe der „Grafting Through“-Methode möglich ist Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)bürsten darzustellen. Die Copolymerbürsten bestehen zu 70 mol% aus 2-Ethyl-2-oxazolin und zu 30 mol% aus unsubstituiertem 2-Oxazolin. Durch statische und dynamische Lichtstreuung wurden der Trägheits- sowie der hydrodynamische Radius und das Molekulargewicht bestimmt. Mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie konnte gezeigt werden, dass es sich tatsächlich um wurmartige, zylindrische Strukturen handelt. Nach Polymerisation des 2-Oxazolins entstehen Seitenketten mit Formylgruppen, die durch Umsetzung mit verdünnter Salzsäurelösung zu Imineinheiten hydrolysiert werden sollten. Diese Imineinheiten bieten eine weitere Konjugationsmöglichkeit für beispielsweise Antikörper und Antigene oder können durch Protonierung positive Ladungen aufweisen, so dass die Polymerbürste zu Komplexierung von DNA oder siRNA verwendet werden kann.

Die Hydrolyse der Formylgruppen führte zur Spaltung der Amidbindung zwischen Polymerseitenkette und -rückgrat, so dass mittels GPC nur noch die Detektion der fragmentierten Seitenketten nicht aber hochmolekularer Strukturen möglich war. Dies wurde nicht erwartet, da für die Spaltung der Amidbindungen normalerweise härtere Bedingungen notwendig sind. Eine andere Möglichkeit die Formylgruppen abzuspalten wäre die Hydrolyse mit Hydrazinderivaten ^[157] oder unter alkalischen Bedingungen mit Natriumhydroxid ^[158].

Im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Amino-endfunktionalisierten Polymerbürsten besitzen diese hier keinen erheblichen Vorteil. Durch Protonierung der Amino-

endmodifizierten Poly(2-oxazolin)bürsten können ebenfalls partiell positiv geladene Polymerbürsten erhalten werden, die in weiterführenden Experimenten auf ihre DNA-Komplexierungseigenschaften getestet werden sollen. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit wird der zukünftige Forschungsfokus auf den Azid- und Amino-endfunktionalisierten Polymerbürsten liegen.

6 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die experimentellen Details, der in den vorherigen Kapiteln diskutierten Ergebnisse, beschrieben. Erläuterungen der allgemeinen Methoden wie GPC, Lichtstreuung oder NMR sowie die verwendeten Chemikalien können am Ende des Kapitels gefunden werden.

6.1 Synthesevorschriften

6.1.1 Synthese des N-Hydroxysuccinimidmethacrylsäureesters

In einem 1L Dreihalsrundkolben werden 57.5 g (0,5 mol) N-Hydroxysuccinimid in 200 ml Dichlormethan mit Hilfe eines KPG-Rührers suspendiert. Dieser Suspension werden unter Kühlung im Eisbad 50.6 g (0.5 mol) Triethylamin und 53.3 g (0.5 mol) Methacrylsäurechlorid, jeweils in 150 ml Dichlormethan gelöst, zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird der Reaktionskolben über Nacht bei 4°C gelagert. Das am nächsten Tag ausgefallene Triethylaminhydrochlorid wird abgesaugt und die organische Phase wird mit 100 ml Eiswasser, 50 ml kalter gesättigter Natriumhydrogencarbonat Lösung sowie 200 ml Eiswasser gewaschen. Anschließend wird die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und evaporiert. Der erhaltene Feststoff wird durch Umkristallisieren aus Dichlormethan aufgereinigt.

Eigenschaften: farblose stäbchenförmige Kristalle

Ausbeute: 65 g (0.48 mol; 96% der Theorie)

¹H-NMR (CDCl₃, TMS; δ in ppm): 2.00 (s, 3H); 2.89 (m, 4H); 5.92 (q, 1H), 6.21 (q, 1H)

6.1.2 Synthese des N-(6-Hydroxyhexyl)-methacrylamids

10 g (0.085 mol) 1-Amino-6-hexanol werden in 140 ml Dichlormethan gelöst und mit 27 g (0.15 mol) N-Hydroxysuccinimidmethacrylsäureester (NHS-Methacrylsäureester), in 70 ml Dichlormethan gelöst, in einem 2 L Dreihalsrundkolben gemischt. Bei Kühlung im Eisbad werden 500 ml gesättigte NaHCO₃-Lösung zu getropft. Die Reaktionsmischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden 200 ml 2M Na₂CO₃ Lösung zugegeben um überschüssigen NHS-Methacrylsäureester zu hydrolysieren. Die Reaktionslösung wird nochmals über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wird die wässrige Phase zweimal mit 250 ml Dichlormethan extrahiert und mit der organischen Phase vereinigt. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit 200 ml kalter 0.05 M Salzsäure und 3-mal mit 300 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Dann wird die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet, gefiltert und eingeengt.

Eigenschaften: farbloser Feststoff

Aubeute: 11.12 g (0.06mol; 71% der Theorie)

¹H-NMR (CDCl₃, TMS; δ in ppm): 1.38 (m, 4H); 1.56 (m, 4H); 1.98 (s, 3H); 3.23 (t, 2H); 3.55 (t, 2H); 5.33 (q, 1H); 5.67 (q, 1H)

6.1.3 Synthese des 6-Methacrylamid-1-hexylchloroformiats

In einem 100 ml Dreihalsrundkolben mit Innenthermometer werden 1.86 g Triphosgen (0.006 mol) in 6.4 ml Dichlormethan gelöst. Dieser Lösung werden 3.2 g (0.017mol) N-(6-Hydroxyhexyl)-methacrylamid, in 20 ml Dichlormethan gelöst, zügig zugetropft. Nach Kühlen der Reaktionsmischung auf 0°C werden 1.37g (0.017 mol) Pyridin in 6.7 ml Dichlormethan langsam zugetropft, dabei ist darauf zu achten, dass die Innentemperatur nicht über 15°C steigt. Nach beendeter Zugabe wird die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel evaporiert. Der Rückstand wird in 32 ml Ethylacetat aufgeschlemmt. Das entstandene Pyridinhydrochlorid wird abfiltriert und das

Filtrat wird anschließend am Rotationsverdampfer evaporiert. Der erhaltene Rückstand wird sofort weiterverwendet.

Eigenschaften: gelbes Öl

Ausbeute: 3.75 g (0.015 mol, 88% der Theorie)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , TMS; δ in ppm): 1.36 (m, 4H); 1.56 (m, 4H) ; 1.93 (s, 3H); 3.27 (t, 2H); 4.24 (t, 2H); 5.30 (m, 1H); 5.67 (m, 1H)

6.1.4 Synthese des 6-Azido-1-hexanols ^[16]

In einem 250 ml Rundkolben bestückt mit einem Magnetrührer, mischt man 9.09 g (0.055 mol) 6-Bromo-1-hexanol und 5.36 g (0.09 mol) Natriumazid in 100 ml Dimethylformamid. Nach Rühren der Reaktionsmischung über Nacht bei 70°C wird der abgekühlte Ansatz auf 200 ml Wasser gegeben und 3-mal mit 100 ml Diethylether extrahiert. Die Etherphase wird über Na_2SO_4 getrocknet, gefiltert und evaporiert.

Ausbeute: 7.7g (0.053 mol, 96% der Theorie)

6.1.5 Synthese des 6-Azido-1-hexyl-tosylats ^[16]

7.7 g (0.053 mol) 6-Azido-1-hexanol werden in 20 ml Dichlormethan gelöst und mit 6.1 g (0.06 mol) Triethylamin versetzt. Dann gibt man langsam bei 0°C unter Rühren 11.4 g (0.06 mol) p-Toluolsulfonsäurechlorid zu. Anschließend wird die Reaktionsmischung über einen Zeitraum von 3h langsam auf Raumtemperatur aufgetaut und 3-mal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, gefiltert und am Rotationsverdampfer evaporiert. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie gereinigt.

Säulendurchmesser: 4 cm

Säulenhöhe: 20-25 cm

Laufmittel: Petrolether /Ethylacetat (5:1)

Anfärbemittel: Uv

R_f-Wert: 0.5

Eigenschaften: leicht gelbes Öl

Ausbeute: 3.61 g (0.012 mol, 22% der Theorie)

¹H-NMR (CD₃OD, TMS; δ in ppm): 3.38 (t, 2H); 3.61 (t, 2H); 8.13 (s, 1H)

6.1.6 Synthese des N-Hydroxyethylformamids

In einem 250 ml Rundkolben werden 60 ml (1 mol) Ethanolamin und 60 ml (1mol) Ameisensäuremethylester zusammengegeben. Der Kolben wird mit einem Stopfen verschlossen, der mit einer Überdruckklammer gesichert ist. Die Reaktionsmischung wird über Nacht auf 70°C erhitzt. Mittels Dünnschichtchromatographie wird der Umsatz überprüft. Nach vollständiger Umsetzung der Edukte wird das entstandene Methanol abrotiert und der Rückstand an der Ölpumpe getrocknet.

Eigenschaften: leicht gelbe Flüssigkeit

Ausbeute: 83.79 g (0.94 mol, 94% der Theorie)

¹H-NMR (CDCl₃, TMS; δ in ppm): 1.31 (m, 4H); 1.52 (m, 2H); 1.63 (m, 2H); 2.42 (s, 3H); 3.20 (t, 2H); 3.99 (t, 2H); 7.32 (d, 2H); 7.77 (d, 2H)

6.1.7 Synthese des N-(β-Chlorethylformamid)s^[17]

In einem 500 ml Dreihalsrundkolben mit Magnetrührer und Rückflusskühler werden 123 g (1.38 mol) N-(β-Hydroxyethylformamid) in 131.6 ml Dimethylformamid vorgelegt. Diese Lösung werden bei 0°C unter Schutzgasatmosphäre 164 g (1.38 mol) Thionylchlorid zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird die Reaktionsmischung für 45 min auf 45°C erwärmt. Anschließend wird das Dimethylformamid abdestilliert und der Rückstand wird durch eine Destillation weiter aufgereinigt.

Druck: 12 mbar

Siedepunkt: 110°C

Eigenschaften: farblose Flüssigkeit

Ausbeute: 59.39 g (0.55 mol; 40% der Theorie)

6.1.8 Ringschluss des N-(β -Chlorethylformamid)s zum 2-Oxazolin^[17]

Zu 122.75 g einer 50%igen Kaliumhydroxidlösung werden bei 10°C langsam 37.55 g (0.35 mol) N-(β -Chlorethylformamid) zugetropft. Anschließend wird die Reaktionsmischung noch 10-15 min bei Raumtemperatur gerührt bevor bei 12 mbar das Rohprodukt in eine Kühlfalle destilliert wird. Es werden 18.43 g (0.26 mol) Rohprodukt erhalten, die durch Zugabe von Kaliumhydroxid von noch vorhandenem Wasser befreit werden. Dazu wird das Rohprodukt im Eisbad gekühlt. Dann werden langsam und portionsweise 8.6 g Kaliumhydroxid zugegeben. Die Mischung wird bei 2500 rpm 5 min zentrifugiert. Dabei bilden sich zwei Phasen, die obere Phase wird weiter verwendet, die untere wird verworfen. Die obere Phase wird filtriert und durch Destillation weiter aufgereinigt.

Druck: 74 mbar

Siedepunkt: 30°C

Eigenschaften: farblose Flüssigkeit (aminartiger Geruch)

Ausbeute: 7.39 g (0.1 mol; 30% der Theorie)

¹H-NMR (CDCl₃, TMS; δ in ppm): 3.80 (t, 2H); 4.25 (t, 2H); 6.91 (s, 1H)

6.1.9 Lebende kationische ringöffnende Polymerisation von 2-Isopropyl-2-oxazolin

In einen am Vakuum gut ausgeheizten Schlenkkolben, versehen mit einem Magnetrührer, werden 8.82 g (0.0779 mol) 2-Isopropyl-2-oxazolin, zuvor in 14 ml Acetonitril gelöst und 0.5806 g (0.0031 mol) p-Toluolsulfonsäuremethylester, gelöst in 1 ml Acetonitril, gegeben.

Der Schlenkkolben wird mit einem Glasstopfen verschlossen und durch 2 Freeze-pumpzyklen von Sauerstoff befreit. Nach Durchführen des zweiten Zyklus wird der Polymerisationskolben mit Argon geflutet und unter Rühren bei 80°C für 48h im Ölbad temperiert. Anschließend terminiert man die Polymerisation durch Zugabe von 1.160 g (0.00624 mol) Mono-Boc-Piperazin. Das Piperazin wird in 1 ml Acetonitril vorgelöst und dann der abgekühlten Polymerlösung zugefügt. Diese wird dann nochmals über Nacht bei 80°C ins Ölbad gestellt. Danach rotiert man das Acetonitril am Rotationsverdampfer ab. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie aufgereinigt.

Säulendurchmesser: 4 cm

Säulenhöhe: 20 cm

Laufmittel: Acetonitril /Methanol (70:30)

Anfärbemittel: Ninhydrin

R_f-Wert: 0.78

Eigenschaften: amorpher Feststoff mit gelblicher Farbe

Ausbeute: 6.09 g (74% der Theorie)

¹H-NMR (CD₃OD, TMS; δ in ppm): 1.11 (m, Protonen der Isopropylseitenkette); 1.46 (s, 9H Boc-Schutzgruppe); 3.53 und 3.65 (m, Protonen der Hauptkette)

6.1.10 Abspaltung der terminalen Boc-Schutzgruppe zur Herstellung eines Amino-endfunktionalisierten Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)s

In einem 100 ml Rundkolben werden 11.39 g (0.0036 mol) des Polymers in 50 ml Dichlormethan gelöst. Über ein Septum werden mit der Spritze langsam 15 ml Trifluoressigsäure zugegeben, so dass man eine 30%ige (v/v) Lösung erhält. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur wird mittels Kälte-destillation das Lösungsmittel und die Trifluoressigsäure entfernt. Anschließend wird die trockene Probe in 40 ml Methanol gelöst und über Nacht auf 4 g Anionentauscher gegeben. Dann wird der Anionentauscher abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Methanol wird am

Rotationsverdampfer evaporiert und das Polymer dann an der Ölpumpe vollständig getrocknet. Mittels $^1\text{H-NMR}$ wird überprüft ob das Entschützen erfolgreich war (Protonen der Boc-Schutzgruppe sind nicht mehr sichtbar).

Eigenschaften: amorpher Feststoff mit gelblicher Farbe

Ausbeute: 10.8 g (0.0035 mol, 97% der Theorie)

6.1.11 Synthese des Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)makromonomers

Das Makromonomer wurde entsprechend der Reaktion von K. Fischer und C.D. Eisenbach dargestellt.^[159]

In einem mit Argon gespülten 50 ml Dreihalsrundkolben, ausgestattet mit einem Innenthermometer, Septum, Argonballon und einem Rührfisch, werden 5 g (0.0016 mol) des entschützten Polymers in 10 ml trockenem Dichlormethan gelöst und in einer Ethanol Stickstoffmischung auf ca. -70°C gekühlt. Über eine Spritze werden simultan 0.8 g (0.0032 mol) 6-Methacrylamid-1-hexylchloroformiat in 2 ml trockenem Dichlormethan, sowie 0.3 g (0.0034 mol) Pyridin zugegeben. Danach wird die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht bei Raumtemperatur unter Argon und Lichtausschluss gerührt. Am nächsten Morgen ist die Lösung leicht trüb geworden. Dies ist auf das entstandene Pyridinhydrochlorid zurückzuführen. Nun wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer evaporiert und der Rückstand wird durch eine Flashchromatographie aufgereinigt.

Säulendurchmesser: 4 cm

Säulenhöhe: 17-20 cm

Laufmittel: erst Dichlormethan /Ethylacetat (1:1) um das überschüssige 6-Methacrylamid-1-hexylchloroformiat sowie Pyridin abzutrennen, dann Methanol um das Makromonomer von der Säule zu eluieren

Anfärbemittel: Uv und KMnO_4

R_f -Wert: 0.76 (6-Methacrylamid-1-hexylchloroformiat); 0.84 (Makromonomer)

Eigenschaften: amorpher Feststoff mit gelblicher Farbe

Ausbeute: 4.15 g (0.0013 mol, 81% der Theorie)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , TMS; δ in ppm): 1.12 (m, Protonen der Isopropylseitenkette); 3.53 und 3.65 (m, Protonen der Hauptkette); 5.35 (s, 1H); 5.67 (s, 1H)

6.1.12 Lebende kationische ringöffnende Polymerisation von 2-Oxazolinen mit Azid-funktionalisiertem Initiator

Die Polymerisationen erfolgen analog zu der lebenden kationischen ringöffnenden Polymerisation von 2-Isopropylloxazolin mit p-Toluolsulfonsäuremethylester als Initiator (6.1.8). Nur wird in diesem Fall das 6-Azido-1-hexyl-tosylat (6.1.5) als Initiator verwendet.

Angaben für 2-Isopropyl-2-oxazolin als Monomer:

Säulendurchmesser: 4 cm

Säulenhöhe: 20 cm

Laufmittel: Acetonitril /Methanol (70:30)

Anfärbemittel: Ninhydrin

R_f -Wert: 0.78

Eigenschaften: amorpher Feststoff mit gelblicher Farbe

Ausbeute: 78% der Theorie

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , TMS; δ in ppm): 1.11 (m, Protonen der Isopropylseitenkette); 1.46 (s, 9H Boc-Schutzgruppe); 3.53 und 3.65 (m, Protonen der Hauptkette)

Angaben für 2-Ethyl-2-oxazolin als Monomer:

Säulendurchmesser: 4 cm

Säulenhöhe: 20 cm

Laufmittel: Dichlormethan /Methanol (70:30)

Anfärbemittel: Ninhydrin, Dragendorff Reagenz

R_f-Wert: 0.85

Eigenschaften: amorpher Feststoff mit gelblicher Farbe

Ausbeute: 37% der Theorie

¹H-NMR (CDCl₃, TMS; δ in ppm): 1.11 (m, Protonen der Ethylseitenkette); 1.46 (s, 9H Boc-Schutzgruppe); 3.51 (m, Protonen der Hauptkette)

6.1.13 Synthese eines Azid-funktionalisierten Poly(2-ethyl-block-2-isopropyl-2-oxazolin)s via lebender kationsich ringöffnender Polymerisation

In einen gut ausgeheizten Schlenkkolben, versehen mit einem Magnetrührer, werden 6.57 g (0.0663 mol) 2-Ethyl-2-oxazolin, zuvor in 9 ml Acetonitril gelöst und 0.6594 g (0.00221 mol) 6-Azido-1-hexyl-tosylat, gelöst in 1 ml Acetonitril, gegeben. Der Schlenkkolben wird mit einem Glasstopfen verschlossen und durch 2 Freeze-pump-zyklen von Sauerstoff befreit. Nach Durchführen des zweiten Zyklus wird der Polymerisationskolben mit Argon geflutet und unter Rühren bei 60°C für 72h im Ölbad temperiert. Anschließend wird mittels Dünnschichtchromatographie (DC) auf noch vorhandenes 2-Ethyl-2-oxazolin geprüft. Da kein 2-Ethyl-2-oxazolin nachgewiesen werden konnte, werden nun 5 g (0.0442 mol) 2-Isopropyl-2-oxazolin zugegeben und weitere 48h bei 60°C im Ölbad temperiert. Danach wird nochmals mittel DC auf Monomerrückstände geprüft. Da keine 2-Isopropyl-2-oxazolintreste vorhanden sind, wird die Polymerisation durch Zugabe von 1.233 g (0.00663 mol) Mono-Boc-Piperazin terminiert. Das Piperazin wird in 1 ml Acetonitril vorgelöst und dann der abgekühlten Polymerlösung zugefügt. Diese wird dann für 2h bei 60°C im Ölbad inkubiert. Danach evaporiert man das Acetonitril am Rotationsverdampfer. Der Rückstand wird durch Flashchromatographie auf gereinigt.

Säulendurchmesser: 4 cm

Säulenhöhe: 20 cm

Laufmittel: Dichlormethan /Methanol (70:30)

Anfärbemittel: Ninhydrin, Dragendorff Reagenz

R_f-Wert: 0.27

Eigenschaften: amorpher Feststoff mit gelblicher Farbe

Ausbeute: 6.78 g (59% der Theorie)

¹H-NMR (CDCl₃, TMS; δ in ppm): 1.11 (m, Protonen der Ethyl- und Isopropylseitenkette); 1.46 (s, 9H Boc-Schutzgruppe); 2.77 und 3.03 (m, 1H aus Isopropylseitenkette); 3.51 (m, Protonen der Hauptkette)

6.1.14 Abspaltung der terminalen Boc-Schutzgruppe der in 6.1.9 und 6.1.10 dargestellten Poly(2-oxazolin)e zur Herstellung eines Aminoendfunktionalisierten Polymers

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe erfolgt nach der gleichen Vorgehensweise wie in Abschnitte 6.1.7 beschrieben. Die Ausbeuten sind mit denen in 6.1.7 vergleichbar. Mittels ¹H-NMR wird auf noch vorhandene Protonen der Boc-Schutzgruppe geprüft.

6.1.15 Synthese der Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)makromonomere

In einem mit Argon gespülten 50 ml Dreihalsrundkolben, ausgestattet mit einem Innenthermometer, Septum, Argonballon und einem Rührfisch, werden zwischen 0.003 und 0.005 mol des entschützten Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)s in 6-10 ml trockenem Dichlormethan gelöst und in einer Ethanol Stickstoffmischung auf ca. -70°C gekühlt. Über zwei Spritzen werden simultan ein dreifacher Überschuss (zwischen 0.009 und 0.015 mol) 6-Methacrylamid-1-hexylchloroformiat in 1-2 ml trockenem Dichlormethan, sowie zwischen 0.009 und 0.015 mol Pyridin zugegeben. Danach wird die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht bei Raumtemperatur unter Argon und Lichtausschluss gerührt. Am nächsten Morgen ist die Lösung leicht trüb geworden. Dies ist auf das entstandene Pyridinhydrochlorid zurückzuführen. Nun wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer evaporiert und der Rückstand wird durch Dialyse (Ausschlussgrenze 1000g/mol) gegen Methanol aufgereinigt.

Angaben für 2-Isopropyl-2-oxazolin als Monomer:

Eigenschaften: amorpher Feststoff mit gelblicher Farbe

Ausbeute: 64% der Theorie

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , TMS; δ in ppm): 1.11 (m, Protonen der Isopropylseitenkette); 3.51 und 3.65 (m, Protonen der Hauptkette); 5.35 (s, 1H); 5.67 (s, 1H)

Angaben für 2-Ethyl-2-oxazolin als Monomer:

Eigenschaften: amorpher Feststoff mit gelblicher Farbe

Ausbeute: 65% der Theorie

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , TMS; δ in ppm): 1.11 (m, Protonen der Isopropylseitenkette); e); 3.51 und 3.65 (m, Protonen der Hauptkette); 5.35 (s, 1H); 5.67 (s, 1H)

Angaben für 2-Ethylloxazolin und 2-Isopropylloxazolin als Monomere:

Eigenschaften: amorpher Feststoff mit gelblicher Farbe

Ausbeute: 58% der Theorie

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , TMS; δ in ppm): 1.11 (m, Protonen der Isopropylseitenkette); 2.78 und 3.03 (m, 1H aus Isopropylseitenkette); 3.51 (m, Protonen der Hauptkette); 5.35 (s, 1H); 5.67 (s, 1H)

6.1.16 Radikalische Polymerisation der Poly(2-oxazolin)makromonomere

Ein gut gereinigtes 10 ml Spitzkölbchen wird mit 0.8 g bis 1 g des zu polymerisierenden Makromonomers gefüllt. Der Feststoff wird an der Ölpumpe entgast, dazu wird 15 min Vakuum gezogen, dann wird mit Argon belüftet und dann wieder Vakuum gezogen. Dies wird 3-mal wiederholt. In der Zwischenzeit wird eine wässrige Lösung des Initiators 2,2'-

Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochlorid angesetzt. Es werden 0.5 bis 1 mol % des Initiators verwendet. *Tabelle 6.1.1* zeigt die exakten Polymerisationsansätze und die Ausbeuten für die verschiedenen Makromonomere. Nach dem der Feststoff entgast wurde, wird die Initiatorlösung durch 3 Freeze-pump-zyklen von Sauerstoff befreit und am Ende mit Argon gespült. 1 ml der Initiatorlösung, die 0.5-1 mol% Initiator enthält, wird zu dem entgasten Makromonomer gegeben und zum lösen 2h auf den Schüttler gestellt. Anschließend wird die Mischung durch einen letzten Freeze-pump-zyklus von Sauerstoff befreit und mit Argon geflutet. Der Polymerisationskolben wird dann für 24 h bei 62-64°C ins Ölbad gehängt. Das feste Polymer wird dann in Methanol gelöst und getrocknet, dazu wird erst das Methanol evaporiert und dann durch Gefriertrocknung das Wasser entfernt. Mittels Amicon Zentrifugenfilter mit einer Ausschlussgrenze von 10 000 g/mol -50 000 g/mol werden die Polymere fraktioniert.

Tabelle 6.1.1: Übersicht über die Polymerisationsansätze der Makromonomere

Probe	Initatormenge / mol %	Makromonomer / g	Ausbeute / g
PiPrOx-30	0.5	1	0.7
N ₃ -PEtOx-b- PiPrOx-60	1	0.8114	0.6
N ₃ -PiPrOx-40	1	0.8124	0.6
N ₃ -PEtOx33	0.5	1	0.8
PEtOx-co-PForOx- 33	1	0.81	0.3

6.1.17 Synthese eines Azid-funktionalisierten Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin) via lebender kationischer ringöffnender Polymerisation

Die Polymerisation wird analog zu der in 6.1.8 beschriebenen Polymerisation durchgeführt. Als Initiator werden 1.2 g (0.004 mol) 6-Azido-1-hexyl-tosylat verwendet. Das Verhältnis 2-Ethyl-2-oxazolin zu unsubstituiertem 2-Oxazolin beträgt 70 mol% zu 30 mol%, so dass 8.32 g (0.084 mol) 2-Ethyl-2-oxazolin und 2.56 g (0.032 mol) 2-Oxazolin in 26 ml Acetonitril verwendet wurden. Nach 48h polymerisierten bei 75°C wird die Reaktion durch 5 ml

Methanol terminiert. Das Lösungsmittel wird evaporiert und der Rückstand wird gefriergetrocknet. Das erhaltene Polyoxazolin wird durch Dialyse gegen Methanol weiter aufgereinigt.

Eigenschaften: leicht gelber Feststoff

Ausbeute: 4.75 g 43% der Theorie

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , TMS; δ in ppm): 1.10 (m, Protonen der Ethylseitenkette); 2.41(m, Protonen der Ethylseitenkette), 3.51 (m, Protonen der Hauptkette); 8.02 (m, 1H der Formylseitenkette)

6.1.18 Reduktion der Azid-Gruppen des Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)s mittels Staudinger Reduktion

Es werden 1.4 g (0.0005 mol) des Polymers in 4 ml Methanol gelöst und mit 525 mg (0.002 mol) Triphenylphosphin, gelöst in einer Mischung aus 1 ml Methanol und 1 ml Tetrahydrofuran, zusammengegeben. Nach Rühren über Nacht unter Argon und Lichtausschluss werden 300 μl Wasser zugegeben und nochmals über Nacht gerührt. Das überschüssige Triphenylphosphin wird abgesaugt und das Filtrat wird, nachdem das Lösungsmittel evaporiert wurde, gefriergetrocknet. Der erhaltene Feststoff wird gegen Methanol dialysiert. (MWCO 1000 g/mol) Mittels IR-Spektroskopie wird überprüft, ob die Azid-Bande verschwunden ist.

Eigenschaften: leicht gelber Feststoff

Ausbeute: 53% der Theorie

6.1.19 Synthese eines Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)makromonomers

In einen mit Argon gespülten Kolben werden 0.7 g (0,00025 mol) NH_2 -Poly-2-oxazolin-co-2-ethyloxazolin und 0.4554 g (0.0025 mol) NHS-Methacrylsäureester in 10 ml Methanol und einem Spritzer Dichlormethan gelöst. Die Reaktion wird 24 h bei RT, Lichtausschluss und

unter Argon gerührt. Nach evaporieren des Lösungsmittels wird gegen Methanol dialysiert. (MWCO 1000 g/mol)

Eigenschaften: leicht gelber Feststoff

Ausbeute: 0.41g 56% der Theorie

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , TMS; δ in ppm): 1,10 (m, Protonen der Ethylseitenkette); 2,41(m, Protonen der Ethylseitenkette), 3,51 (m, Protonen der Hauptkette); 5,36 (s, 1H); 5,70 (s,1H), 8,02 (m, 1H der Formylseitenkette)

6.1.20 Abspaltung der Formylgruppen einer zylindrischen Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)bürste

In einem 10 ml Rundhalskolben werden 200 mg der zylindrischen Poly-2-formyloxazolin-co-2-ethylloxazolin-bürste (0.65 mmol Formyleinheiten) in 5 ml 5% iger methanolischer Salzsäurelösung gelöst und unter Lichtausschluss 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel evaporiert und die Probe aus Wasser gefriergetrocknet. Mittels $^1\text{H-NMR}$ wird überprüft ob das Entschützen erfolgreich war (Protonen der Formylgruppen sind nicht mehr sichtbar).

Ausbeute: 80%

6.1.21 Reduktion der Azid-Gruppen der Poly(2-oxazolin)bürsten mittels Tris(2-carboxyethyl)phosphin ^[18]

In einem kleinen Schlenkkolben werden unter Argon 50 mg (ca. 0.01 mmol) der gewünschten Azid-funktionalisierten Bürste, in 700 μl Wasser gelöst, mit dem 5 fachen molaren Überschuss Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) in ca. 300 μl Wasser gelöst, zusammengegeben. Die Reaktionslösung wird für 48h bei Raumtemperatur und

Lichtausschluss gerührt. Anschließend wird mittels eines Amicon Zentrifugenfilters mit einer Ausschlussgrenze von 10 000 g/mol das überschüssige TCEP abgetrennt.

Ausbeute: 42% der Theorie

6.1.22 Farbstoffmarkierung der Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten mit Hilfe von kupferfreier Click Chemie

1 mg (1.1 μmol) DBCO-PEG4-Carboxyrhodamine 110 werden in 2 ml DMF gelöst. Dann werden jeweils 50 mg der Azid-funktionalisierten Bürste mit so viel Farbstofflösung versetzt, dass ungefähr 2 Farbstoffe pro Bürste klicken (siehe Tabelle 6.1.2). Die Reaktionsmischungen werden für 48h unter Lichtausschluss gerührt. Danach wird der freie Farbstoff über Amicon Zentrifugenfilter mit einem Ausschluss von 10 000 g/mol abgetrennt.

Ausbeute: 50% der Theorie

Tabelle 6.1.2: Reaktionsansätze der Farbstoffmarkierungen der verschiedenen Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten

Probe	DMF-Farbstoff /ml	Farbstoff/ μmol	Azid-Gruppen/ μmol	Zugabe H_2O
N ₃ -PEtOx-b-iPrOx-60	0.3	0.17	8.3	2.1
N ₃ -PiPrOx-25	0.4	0.22	16	4.1
N ₃ -PEtOx33	1	0.55	14	3

6.2 Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel

Tabelle 6.2.1 zeigt eine Auflistung der verwendeten Chemikalien, Lösungsmittel sowie zur Aufreinigung verwendete Materialien, die zur Synthese der in 6.1 beschriebenen Verbindungen und Polymere benötigt werden.

Tabelle 6.2. 1: Auflistung der verwendeten Materialien

Chemikalien	Firma	Bestellnummer	Weiterführende Aufreinigung	Verwendungszweck
Acetonitril	Arcros	326810010	keine	Lösungsmittel für lebende kationische ringöffnende Polymerisation
Amberlyst A-26 (OH) Ion exchange	Sigma-Aldrich	542571	keine	Ionenaustausch nach Abspalten der Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure
Ameisensäuremethylester	Sigma-Aldrich	M46837	keine	Herstellung N-Hydroxyethylformamid
1-Amino-6-hexanol	Sigma-Aldrich	A56353	keine	Herstellung 6-Methacrylamid-1-hexanol
2,2'-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochlorid	Wasko	017-21332	keine	Initiator für radikalische Polymerisation der Makromomere
1-Boc-piperazin	Sigma-Aldrich	343536	keine	Abbruchreagenz für lebende kationische ringöffnende Polymerisation
6-Bromo-1-hexanol	Sigma-Aldrich	186481	keine	Herstellung von 6-Azido-1-hexanol
DBCO-PEG4-Carboxyrhodamine 110	Jena Bioscience	CLK-A-127-2	keine	Farbstoff zur Markierung der Azid-funktionalisierten Polymerbürsten
Dichlormethan	Sigma-Aldrich	32222	keine	Lösungsmittel
Dimethylformamid	Acros	326870010	keine	Lösungsmittel
Ethanolamin	Sigma-Aldrich	11,016-7	keine	Herstellung N-Hydroxyethylformamid
Ethylacetat	Sigma-Aldrich	33211	keine	Lösungsmittel
2-Ethylloxazolin	Sigma-Aldrich	137456	Destillation über CaH ₂	Monomer

6 Material und Methoden

2-Isopropylloxazolin	TCI Europe	I0642	Destillation über CaH ₂	Monomer
Kaliumhydroxid	Sigma-Aldrich	484016	keine	Ringschluss von N-β-Chlorethylformamid)
Kieselgel 60	Merk	115111	keine	Flashchromatographie
Methacrylsäurechlorid	Sigma-Aldrich	64120	Destillation über CuCl ₂	Herstellung von N-hydroxysuccinimidmethacrylsäureester
Methanol	Sigma-Aldrich	32213	keine	Lösungsmittel
Methanol	Merk	1060020500	keine	Lösungsmittel für SLS und DLS von Bürsten
p-Methyltosylat	Sigma-Aldrich	89800	Destillation	Initiator für lebende kationische ringöffnende Polymerisation
Natriumazid	Sigma-Aldrich	19,993	keine	Herstellung von 6-Azido-1-hexanol
N-Hydroxysuccinimid	Sigma-Aldrich	130672	keine	Herstellung von N-hydroxysuccinimidmethacrylsäureester
Platinumdioxid	Sigma-Aldrich	459925	keine	Katalysator für die Hydrierung
Pyridin	Sigma-Aldrich	270970	keine	Herstellung der Makromonomere
Thionylchlorid	Sigma-Aldrich	230464	keine	Reduktion der Azid-Gruppen des Poly(2-formyl-2-oxazolin-co-2-ethylloxazolin)s
p-Toluolsulfonsäurechlorid	Sigma-Aldrich	240877	keine	Herstellung von 6-Azido-1-hexyl-tosylat
Tris(2-carboxyethyl)phosphin	Sigma-Aldrich		keine	Reduktion der Azid-funktionalisierten Poly(2-oxazolin)bürsten
Triethylamin	Sigma-Aldrich	T0886	Destillation	Herstellung von N-hydroxysuccinimidmethacrylsäureester und 6-Azido-1-hexyl-tosylat
Triphenylphosphin	Sigma-Aldrich		keine	Reduktion
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich	302031	keine	Abspalten der Boc-Schutzgruppe
Triphosgen	Sigma-Aldrich	15217	Umkristallisieren mit Hexan	Herstellung 6-Methacrylamid-1-hexylchloroformiat
Dialysemembranen	Carl Roth			Dialyse der Makromonomer und deren Vorstufen
Amicon Centrifugenfilter	Millipore			Fraktionierung der Bürsten

6.3 Verwendete Geräte

6.3.1 GPC-Messungen

Die in dieser Arbeit gezeigten GPC-Chromatogramme wurden in DMF + 1 g/l LiBr bei einer Temperatur von 333 K gemessen. Als Säulenmaterial wurde vernetztes Polystyrol (MZ-Analysentechnik; MZ-SDplus; 5 mm Material 300 x 8) verwendet. Die Porengrößen der Säulen betragen 10, 10², 10³ nm für den Oligomersäulensatz oder 10⁴, 10⁵, 10⁶ und 10⁷ nm für den Polymersäulensatz. Die Flussrate war bei allen Messungen konstant bei einem Wert von 1 ml/min. Zur Signaldetektion wurde ein RI-Detektor der Firma Waters (2414) eingesetzt. Als Pumpe wurde das Modell L-7110 der Firma Hitachi verwendet. Ebenfalls von der Firma Waters ist der verwendete Degasser (Modell AF). Zu Eichung wurden engverteilte Polystyrolstandards der Firma PSS, Mainz verwendet.

6.3.2 Statische und dynamische Lichtstreuungsmessungen

Statische Lichtstreuungsmessungen (SLS) wurden mit einem ALV-SP86 Goniometer, einem ALV-3000 Korrelator, einem Uniphase HeNe Laser (25mW Leistung bei einer Wellenlänge von $\lambda=632.8$ nm) und einem ALV/High QE ADP Avalanche Photodioden Detektionssystem durchgeführt. Ein ALV-SP125 Goniometer, ein ALV-5000 Korrelator und ein Spectra Physics 2060 Argonionen Laser (500 mW Leistung bei einer Wellenlänge von $\lambda= 514,5$ nm) wurde für dynamische Lichtstreuexperimente (DLS) verwendet. Dabei wird die Streuintensität in zwei Signale (50/50) geteilt und jedes wird durch einen Photomultiplier detektiert. Die beiden Signale werden kreuzkorreliert um das Grundrauschen zu minimieren.

Üblicherweise werden die Lösungen von 30 bis 150° in 5° Schritten (SLS) oder in 15° oder 20° Schritten (DLS) gemessen. Die Auswertung der Statikmessungen erfolgt nach Zimm um das Gewichtsmittel der molaren Masse M_w , den Trägheitsradius R_g und den zweiten Viralkoeffizienten A_2 zu bestimmen. Die Korrelationsfunktionen zeigten einen monomodalen Abfall und wurden biexponentiell gefittet, wobei der erste Cumulant Γ erhalten wurde. Das z-Mittel des Diffusionskoeffizienten D_z wurde durch Extrapolation von Γ/q^2 für $q=0$ erhalten.

Unter Verwendung des Stokes Gesetz wird das inverse z-Mittel des hydrodynamischen Radius $R_h = \langle 1/R_h \rangle_z^{-1}$ erhalten.

Es wurden Masslösungen mit einer Konzentration von $c = 1\text{g/l}$ vorbereitet und durch Millipore Filter mit einer Porengröße von $0.45\ \mu\text{m}$ oder $0.2\ \mu\text{m}$ filtriert. Weitere Verdünnungen wurden durch Zugabe von Lösungsmittel, gefiltert durch Millipore LG Filter mit einer Porengröße von $0.2\ \mu\text{m}$, erhalten. Die Konzentrationen wurden durch auswiegen der Küvetten erhalten.

Probenlösungen anderer Konzentrationen wurden direkt in der gewünschten Konzentration vorbereitet und durch $0,45\ \mu\text{m}$ Millipore LCR Filter filtriert.

6.3.3 NMR-Messungen

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren in dieser Arbeit wurden an einer Bruker 300 Ultra Shield Anlage gemessen. Zur Endgruppenanalyse der Makromonomere wurde an einer Bruker 400 Ultra Shield Anlage gemessen. Die Messzeit für ^{13}C -NMRs betrug 1 Stunde. Die Temperatur bei allen Messungen betrug 293K .

6.3.4 UV/Vis und-Fluoreszenzspektroskopie-Messungen

Die Trübungskurven wurden an einem Carry 100 Bio UV-Vis Spectrometer der Firma Varian bei einer Wellenlänge von $400\ \text{nm}$ und einer Heizrate von $1^\circ\text{C}\ \text{min}^{-1}$ aufgenommen. Die Konzentrationen der Proben waren konstant $c = 1\text{g/l}$. Die Messungen der Fluoreszenzspektren wurde an einem FP-6500 Spektrofluorometer (Jasco) durchgeführt. Beide Spektrometer waren mit einer externen Temperaturkontrolle ausgestattet. Vor der Aufnahme der Fluoreszenzspektren wurden die Proben auf eine Absorption von 0.09 eingestellt. Alle Messungen erfolgten in Präzisions-Küvetten der Firma Hellma aus optischem Spezialglas.

6.3.5 dn/dc-Messungen

Die Brechungsindexinkremente wurde mit einem in unserer Gruppe entwickeltem Michelson Interferometer bei einer Wellenlänge von $\lambda=632,8$ nm bestimmt.^[160]

6.3.5 MALDI-ToF Messungen

MALDI-ToF Messungen wurden mit einem Micromass ToFSpec E Mass Spectrometer im positiven Reflektronbetrieb durchgeführt. Für alle Experimente wurde 2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoesäure als Matrix verwendet. Die Polymerlösung wurde in Methanol (c= 1g/l) gelöst und mit der Matrixlösung in THF (c= 25g/l) im Verhältnis von 1/1 gemischt. Von dieser Lösung wird 1 μ l auf ein „Target“ aufgetragen. Vor jeder Messung wurde mit einem Polystyrolstandard von PSS, Mainz kalibriert.

6.3.6 AFM-Messungen

Die AFM-Messungen wurden mit einem Veeco Multimode Scanning Probe Mikroskop und einem Nanoscope IIIa Kontroller durchgeführt. Alle Aufnahmen wurden im Tapping Mode gemacht. Es wurden Olympus OMCL-AC160-W2 Cantiliver mit einer Resonanzfrequenz von 300 kHz verwendet. Für die Messungen wurden die Proben in Wasser oder einem Methanol /Methylethylketon Gemisch (1/1) gelöst und in Konzentrationen von 0.1 g/l oder 0.025 g/l auf Mica gespin coated.

6.3.7 FCS-Messungen

Die Fluoreszenz-Korrelations Spektroskopie Messungen wurden am Max-Planck-Institut für Polymerforschung in der Gruppe von Koynov mit einem kommerziellen FCS-Aufbau (Zeiss) durchgeführt. Die Fluorophore wurden mit einem Argon Laser (CVI Melles Griot) angeregt. Dabei wurde mit einer Laserleistung von 4% gemessen (Gesamtlaserleistung: 8 mW). Die Detektion der Emission erfolgte mit einer Avalanche Photodiode hinter einem geeigneten

Filter (Langpassfilter 488 nm). Das konvokale Beobachtungsvolumen wurde mit Alexa Fluor 488 in Wasser kalibriert. Die Lösungen wurden auf einer Konzentration von ≈ 2 nmol/ml verdünnt.

6.3.8 IR-Messungen

Die IR-Spektren wurden an einem Nicolet iS10 FT-IR Spektrometer der Firma Thermo Scientific mittels einer ATR-Einheit in einem Wellenzahlbereich von 4000 cm^{-1} bis 500 cm^{-1} gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software „OMNIC“.

7 Anhang

Im Folgenden werden noch zusätzliche Daten und Ergebnisse aufgeführt, die in der Arbeit nicht gezeigt wurden.

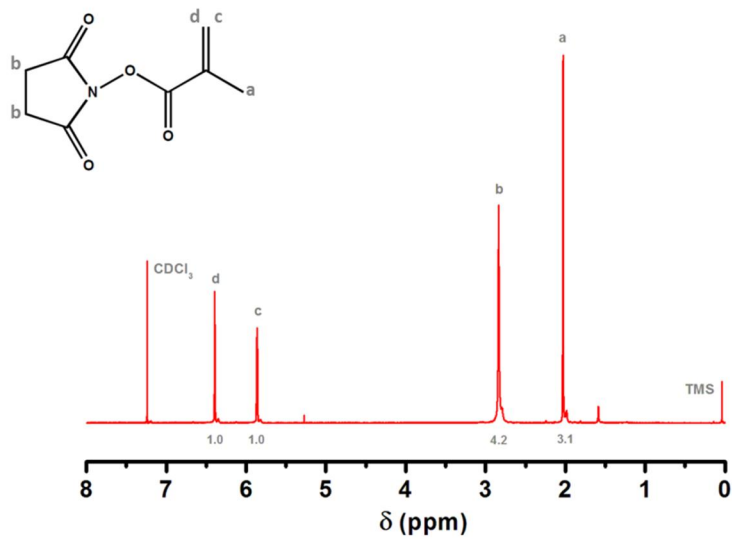


Abbildung 7.1: $^1\text{H-NMR}$ des *N*-Hydroxysuccinimidmethacrylsäureesters (300 MHz, $T=293$ K, LM: CDCl_3)

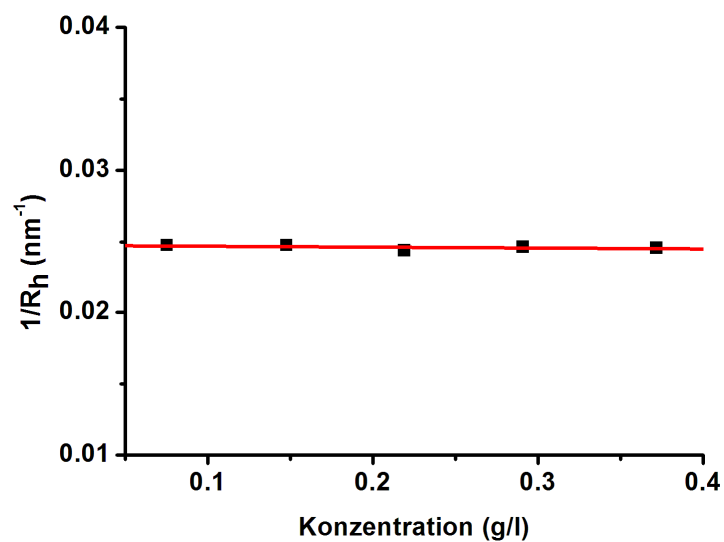


Abbildung 7.2: Reziproker hydrodynamischer Radius der N_3 -Poly(2-ethyl-2-oxazolin)bürste in Abhängigkeit der Konzentration; in Methanol bei 293 K zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte)

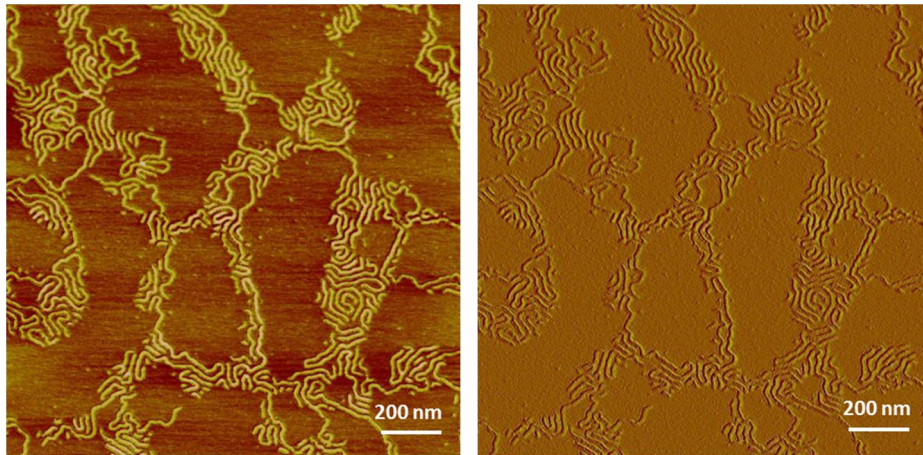


Abbildung 7.3: Trockene AFM-Aufnahme der Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste nach spin coating aus Methanol/Methylethylketon (1/1) auf Mica; $c_{\text{Probe}} = 0.1 \text{ g/l}$; links: Höhenbild; rechts: Amplitudenbild

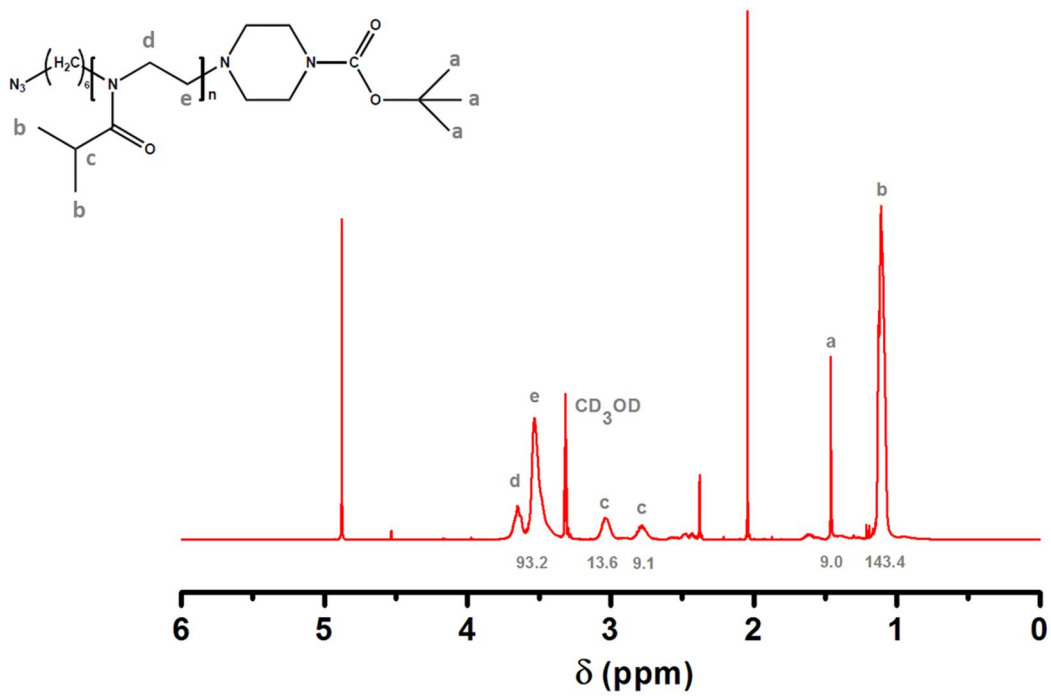


Abbildung 7.4: $^1\text{H-NMR}$ des Boc-geschützten N_3 -Poly(2-isopropyl-2-oxazolin) (400 MHz, $T=293 \text{ K}$, LM: CD_3O)

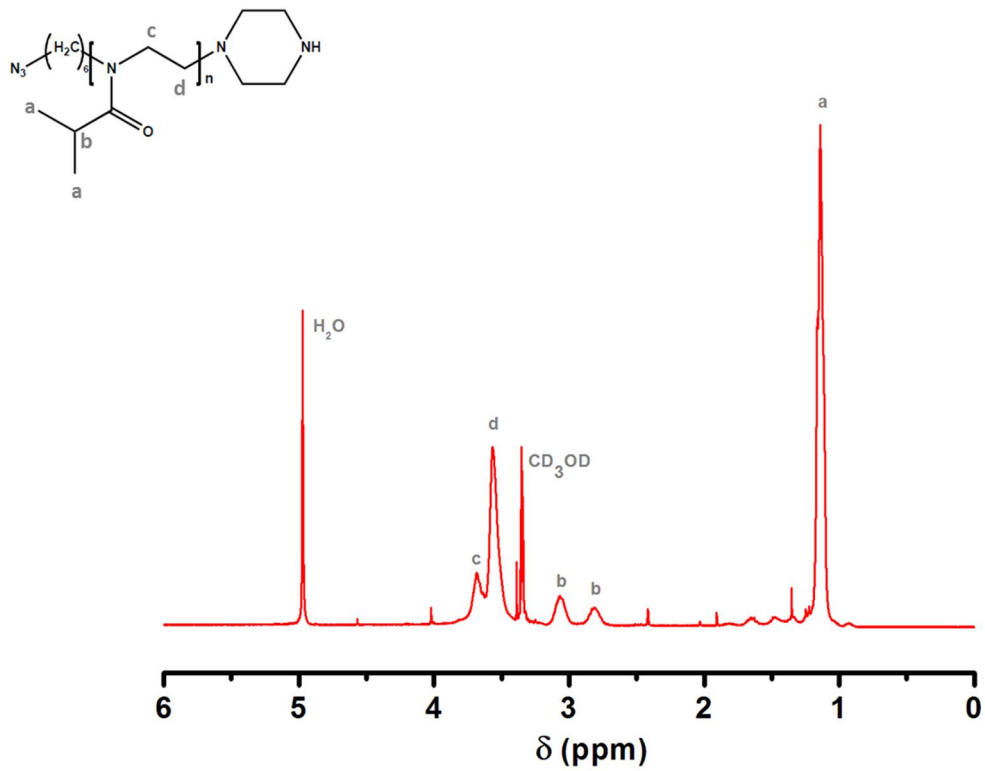


Abbildung 7.5: $^1\text{H-NMR}$ N_3 -Poly(2-isopropyl-2-oxazolin) nach abspalten der Boc-Schutzgruppe (400 MHz, $T=293$ K, LM: CD_3O)

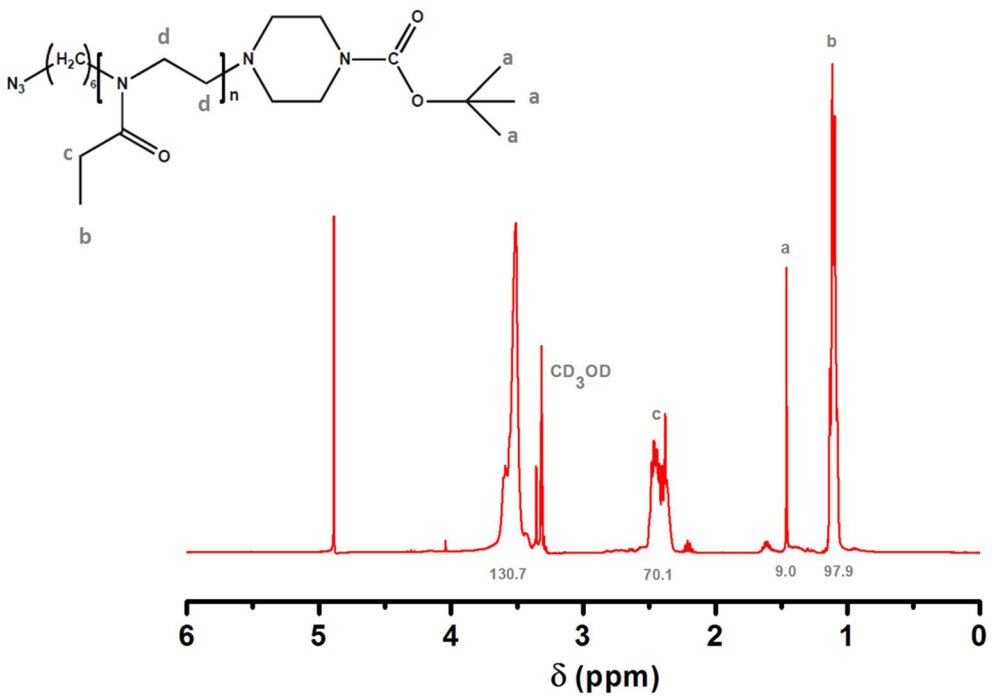


Abbildung 7.6: $^1\text{H-NMR}$ des Boc-geschützten N_3 -Poly(2-ethyl-2-oxazolin) (400 MHz, $T=293$ K, LM: CD_3O)

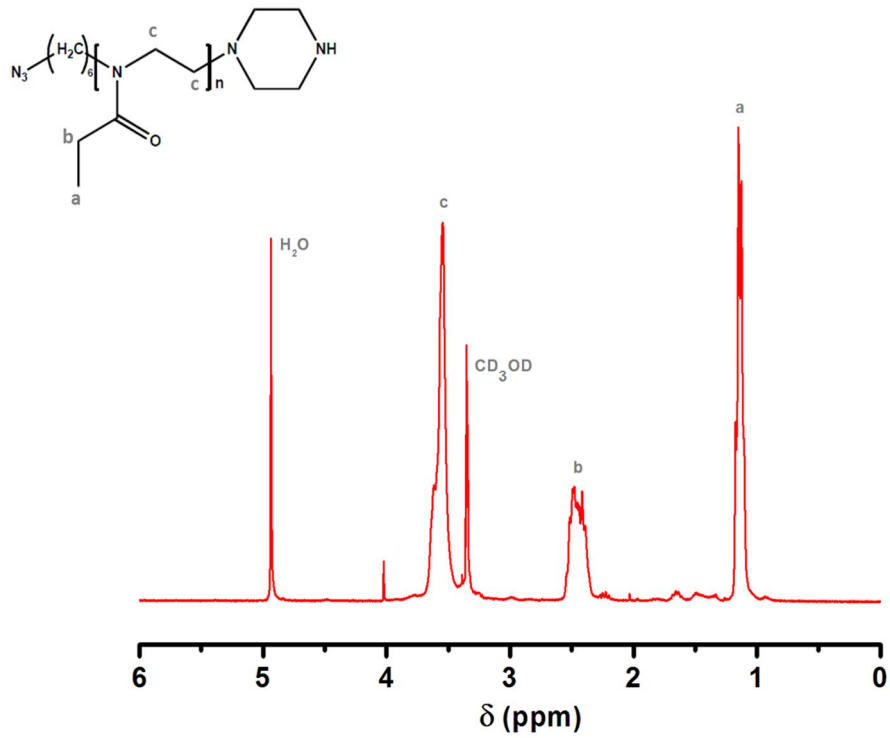


Abbildung 7.7: $^1\text{H-NMR}$ N_3 -Poly(2-ethyl-2-oxazolin) nach abspalten der Boc-Schutzgruppe (400 MHz, $T=293$ K, LM: CD_3O)

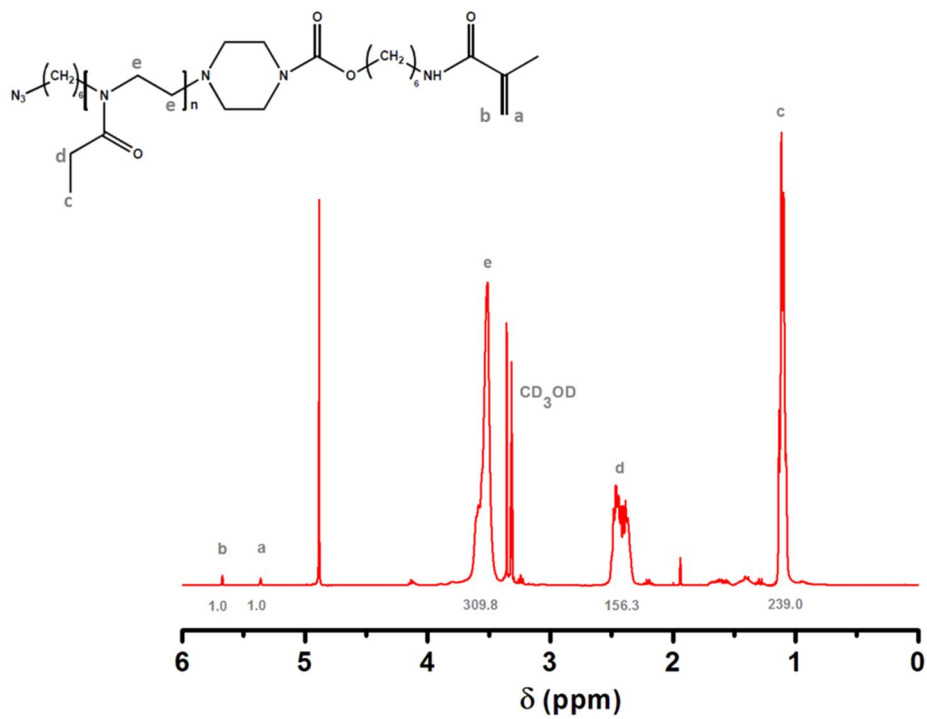


Abbildung 7.8: $^1\text{H-NMR}$ des N_3 -Poly(2-ethyl-2-oxazolin)makromonomers (400 MHz, $T=293$ K, LM: CD_3O)

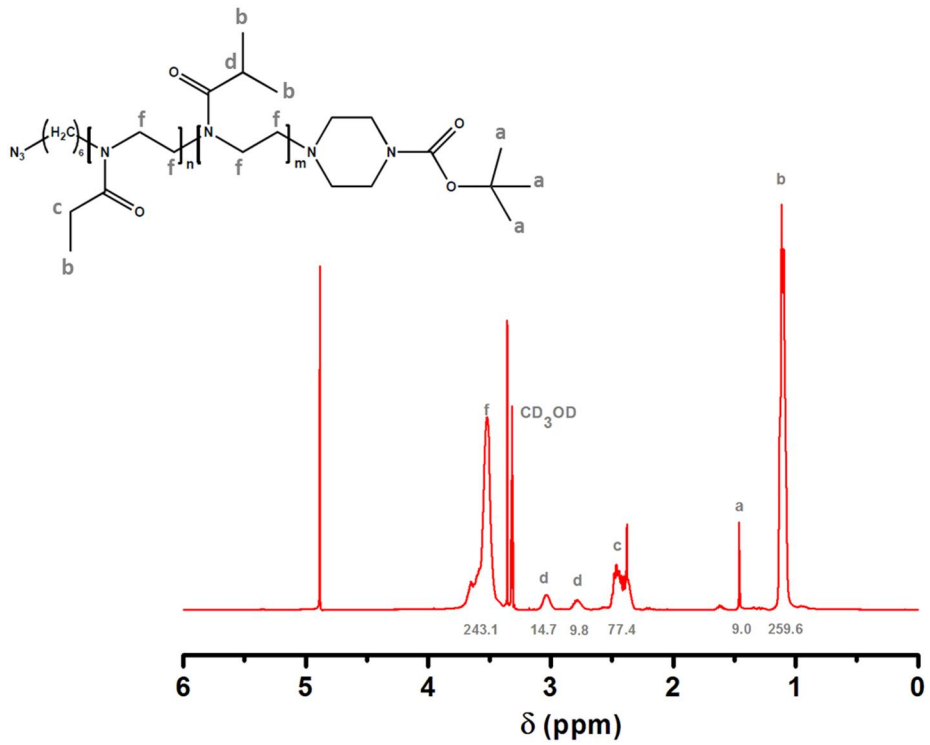


Abbildung 7.9: $^1\text{H-NMR}$ des Boc-geschützten N_3 -Poly(2-ethyl-block-2-isopropyl-2-oxazolin) (400 mHz, $T=293\text{ K}$, LM: CD_3O)

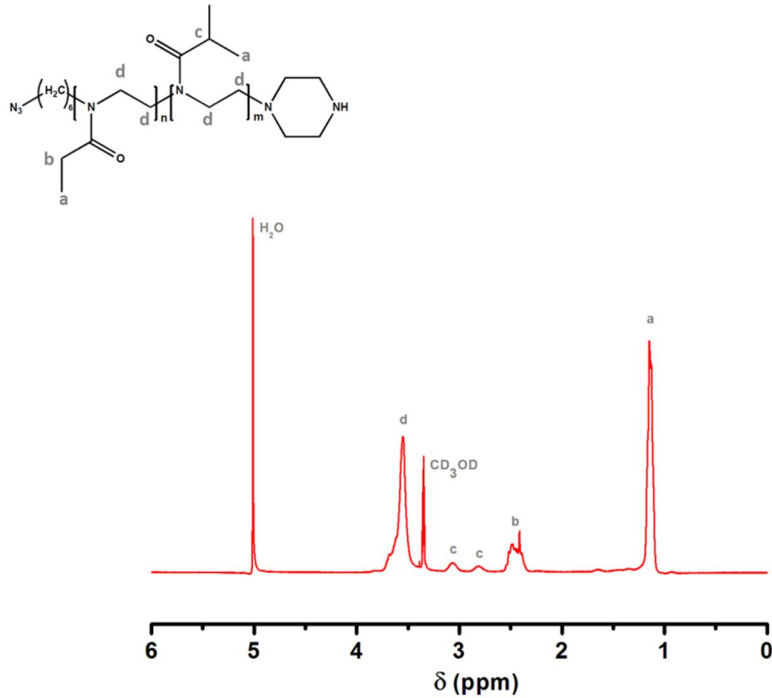


Abbildung 7.10: $^1\text{H-NMR}$ N_3 -Poly(2-ethyl-block-2-isopropyl-2-oxazolin) nach abspalten der Boc-Schutzgruppe (400 mHz, $T=293\text{ K}$, LM: CD_3O)

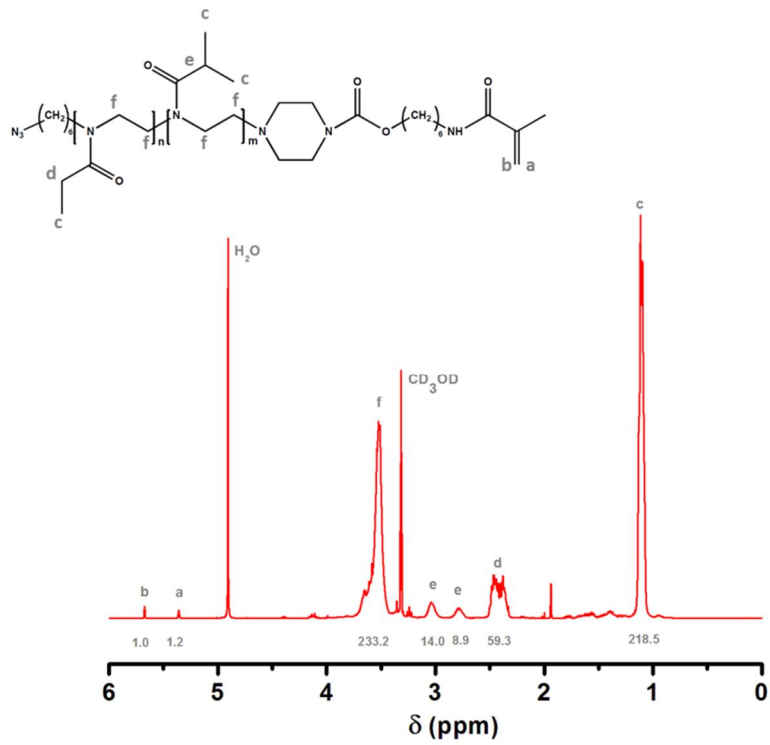


Abbildung 7. 11: $^1\text{H-NMR}$ des N_3 -Poly(2-ethyl-2-isopropyl-2-oxazolin)makromonomers (400 MHz, $T=293\text{ K}$, LM: CD_3O)

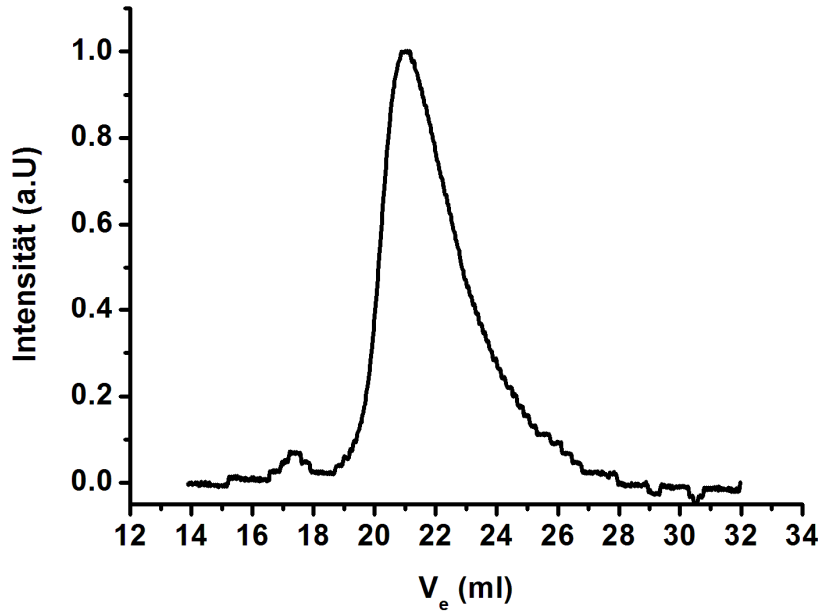


Abbildung 7.12: Gelpermeationschromatogramm des Azid-funktionalisierten Poly(2-ethyl-2-oxazolin)-makromonomers in DMF (LiBr 1 g/l, $T= 333\text{ K}$)

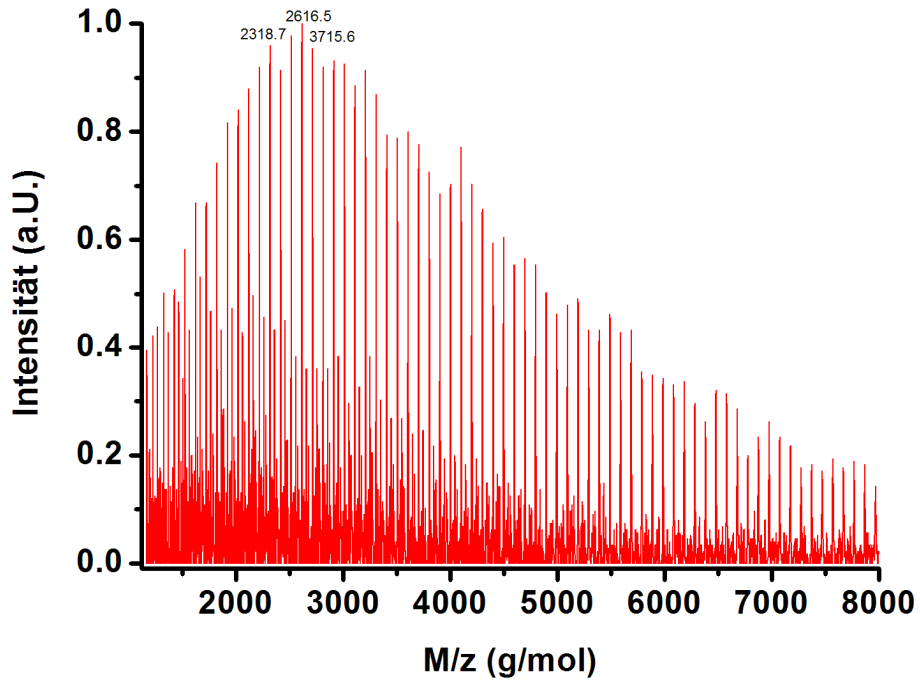


Abbildung 7.13: MALDI-ToF Spektrum des Azid-funktionalisierten Poly(2-ethyl-2-oxazolin)makromonomers

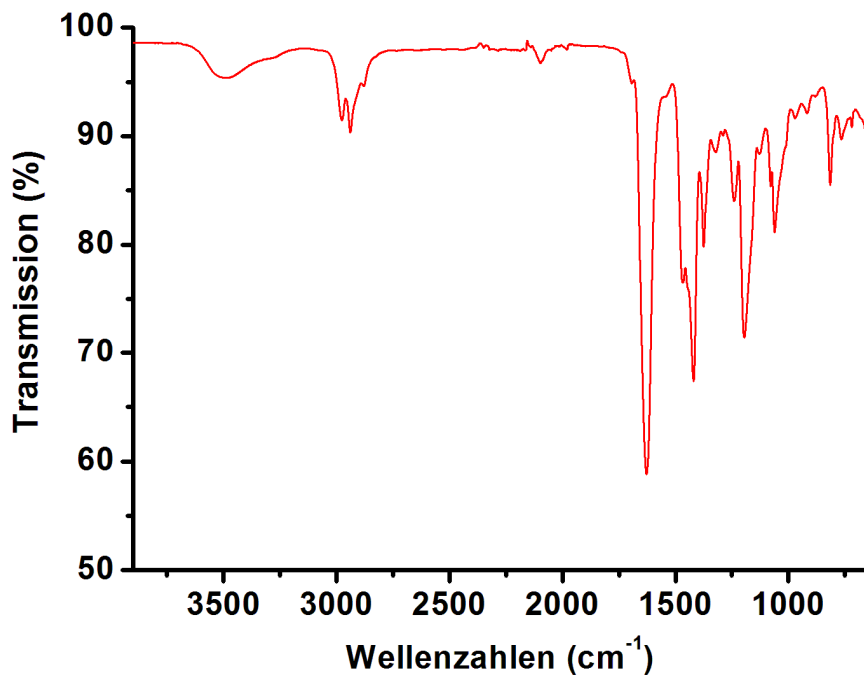


Abbildung 7.14: IR-Spektrum des Azid-funktionalisierten Poly(2-ethyl-2-oxazolin)makromonomers

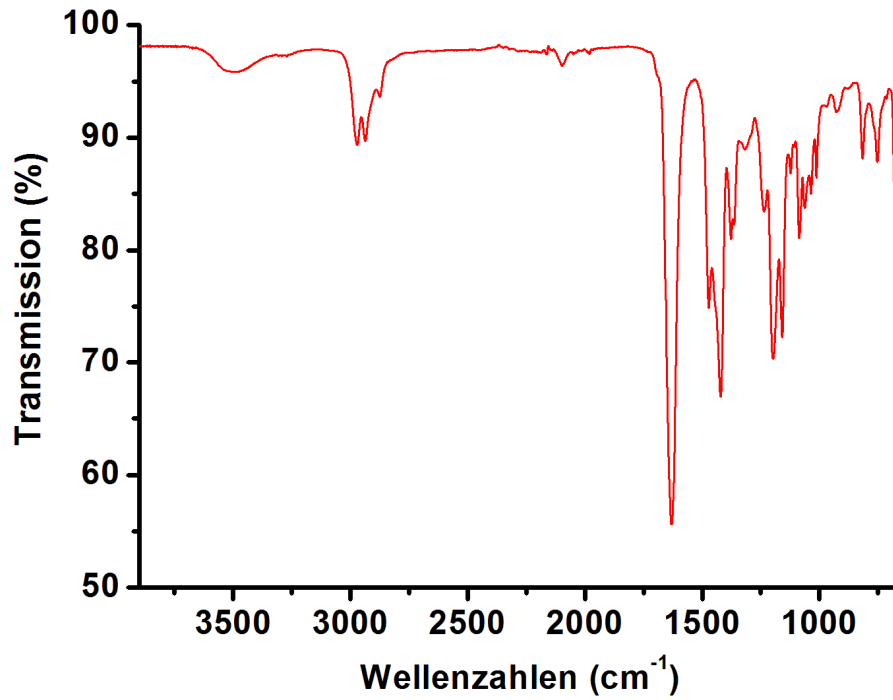


Abbildung 7.15: IR-Spektrum des Azid-funktionalisierten Boc-geschützten Poly(2-ethyl-block-2-isopropyl-2-oxazolin)

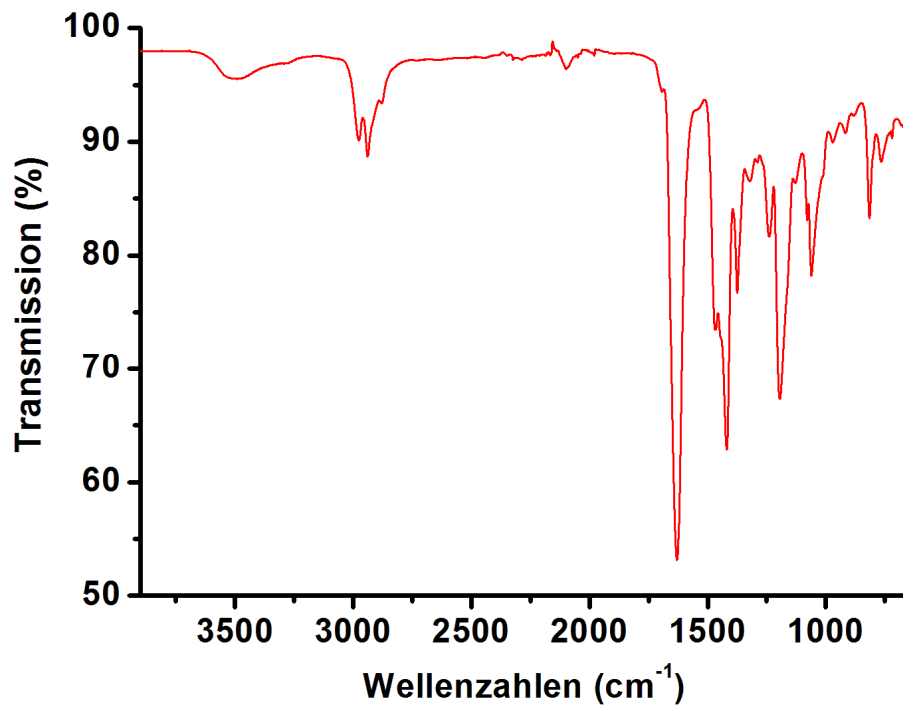


Abbildung 7.16: IR-Spektrum der N₃-Poly(2-ethyl-2-oxazolin)bürste

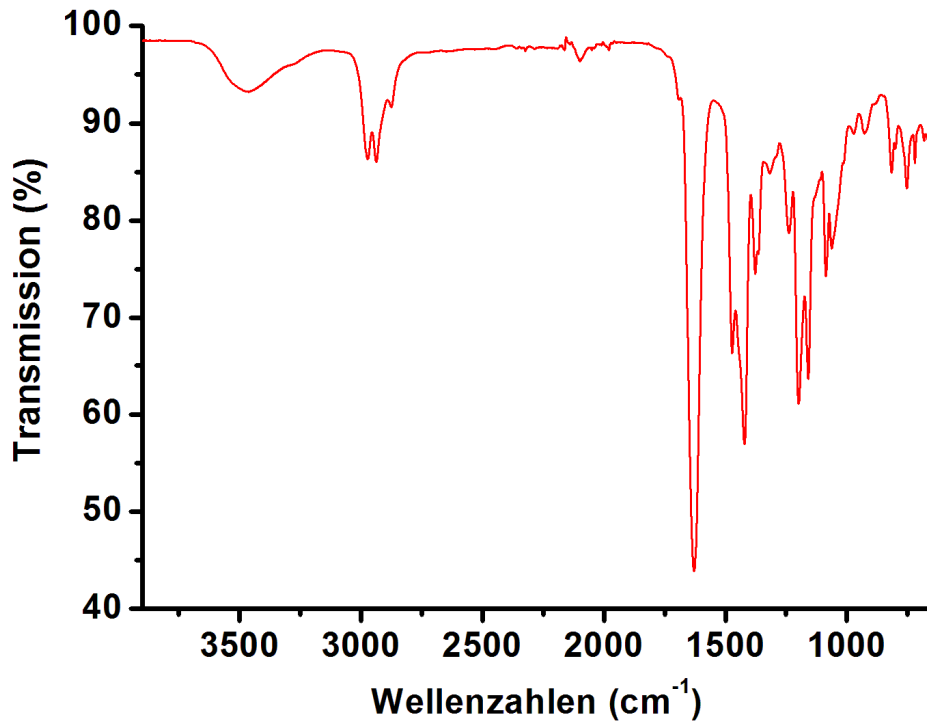


Abbildung 7.17: IR-Spektrum der N₃-Poly(2-ethyl-block-2-isopropyl-2-oxazolin)bürste

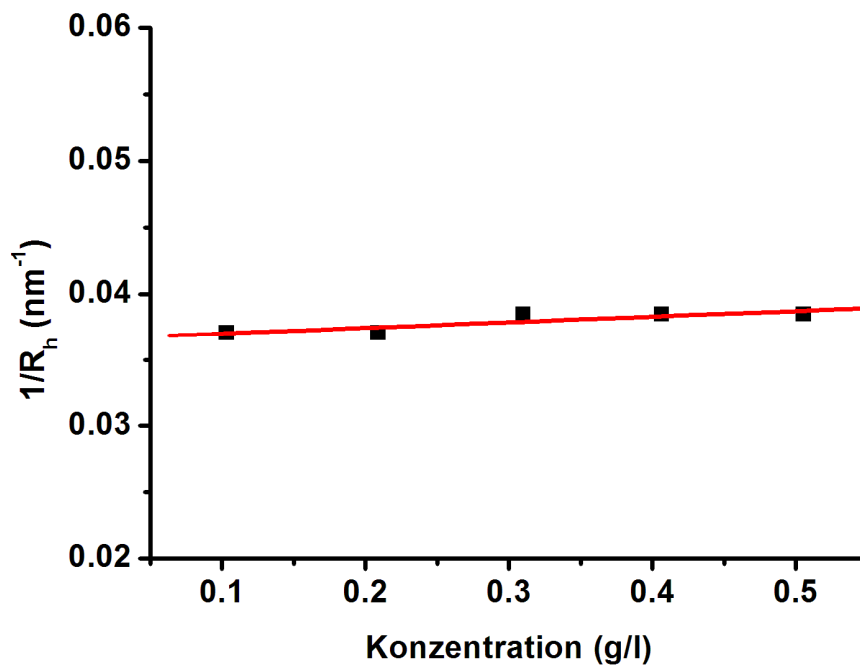


Abbildung 7.18: Reziproker hydrodynamischer Radius der N₃-Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste in Abhängigkeit der Konzentration; in Methanol bei 293 K zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte)

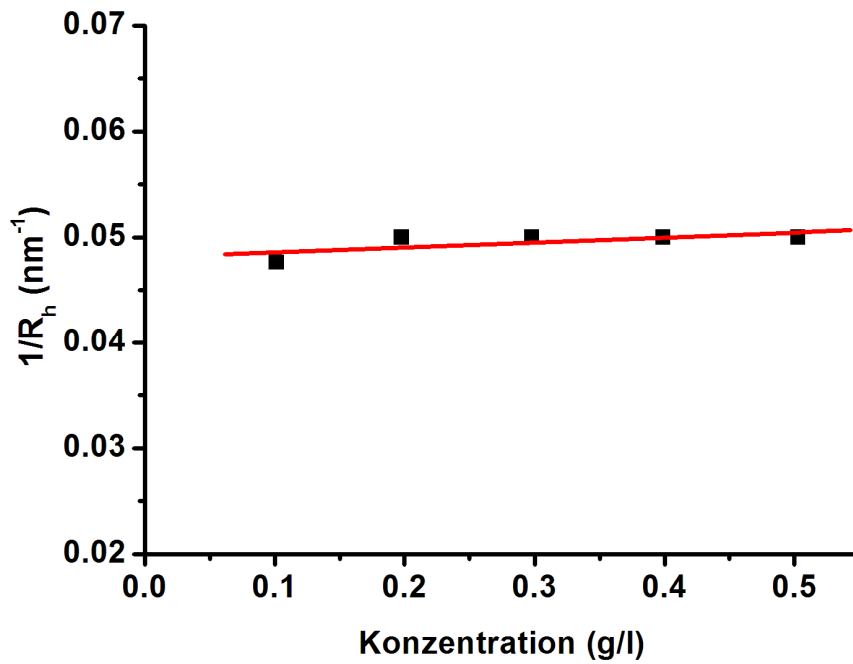


Abbildung 7.19: Reziproker hydrodynamischer Radius der N_3 -Poly(2-ethyl-2-oxazolin)bürste in Abhängigkeit der Konzentration; in Methanol bei 293 K zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte)

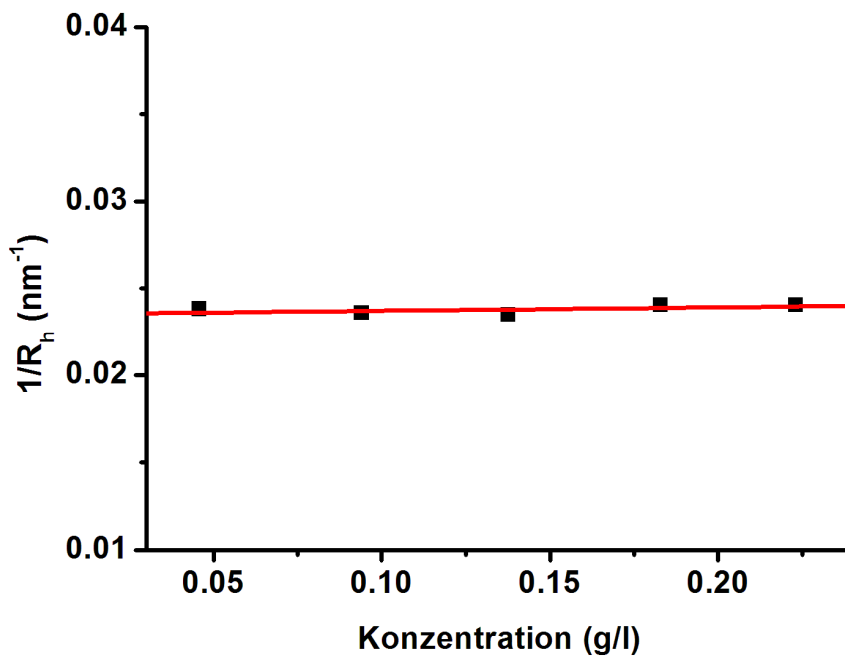


Abbildung 7.20: Reziproker hydrodynamischer Radius der N_3 -Poly(2-ethyl-block-2-isopropyl-2-oxazolin)bürste in Abhängigkeit der Konzentration; in Methanol bei 293 K zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte)

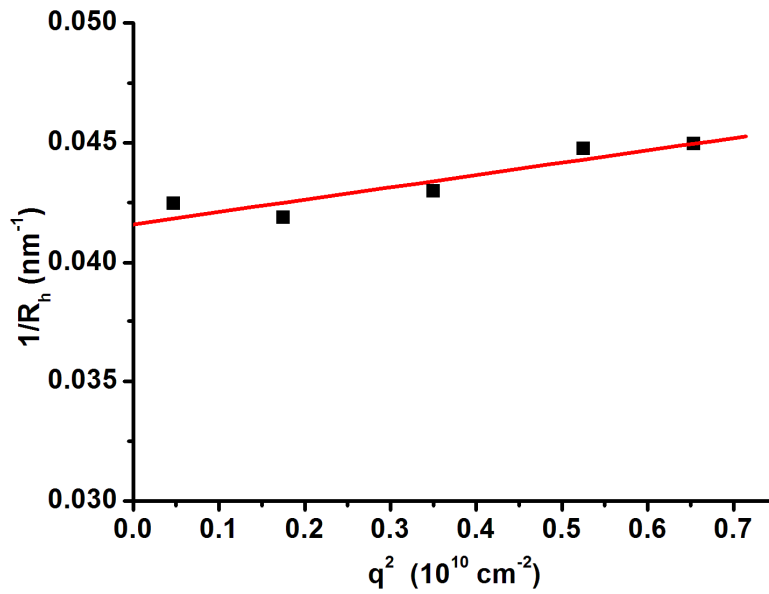


Abbildung 7.21: DLS der N_3 -Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste in Wasser bei 293 K zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte); $c=1 \text{ g/l}$; $\eta=0.99257 \text{ cp}$; $R_h=24 \text{ nm}$; Salz: Natriumchlorid ($c=152 \text{ mM}$)

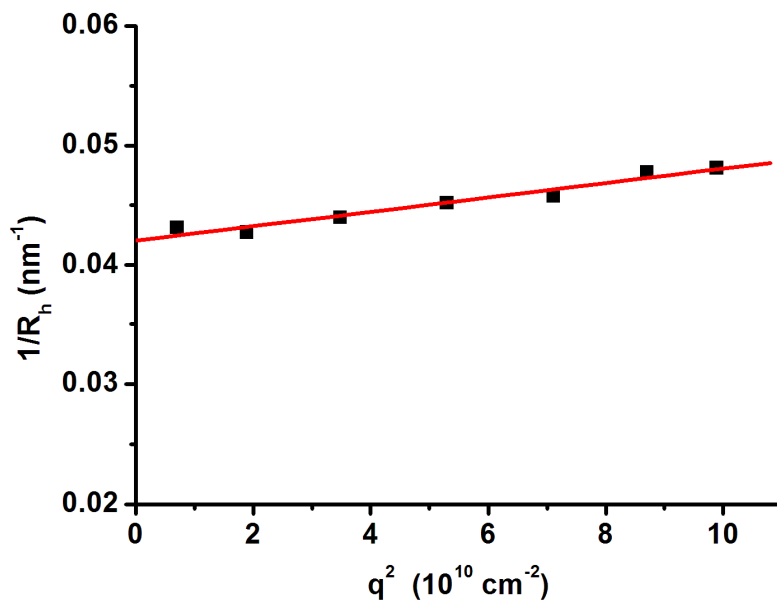


Abbildung 7.22: DLS der N_3 -Poly(2-ethyl-2-oxazolin)bürste in Wasser bei 293 K zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte); $c=1 \text{ g/l}$; $\eta=0.99257 \text{ cp}$; $R_h=24 \text{ nm}$; Salz: Natriumchlorid ($c=152 \text{ mM}$)

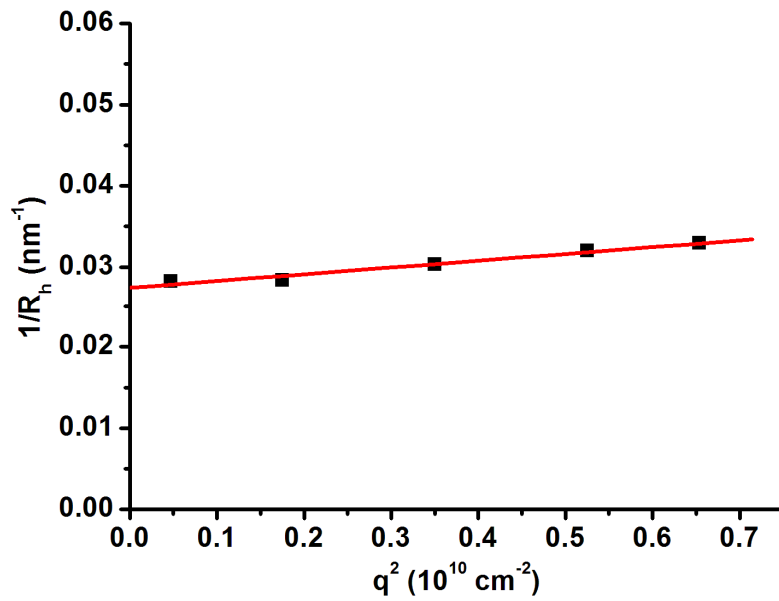


Abbildung 7.23: DLS der N_3 -Poly(2-ethyl-block-2-isopropyl-2-oxazolin)bürste in Wasser bei 293 K zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte); $c=1 \text{ g/l}$; $\eta=0.99257 \text{ cp}$; $R_h=36.4 \text{ nm}$; Salz: Natriumchlorid ($c=152 \text{ mM}$)

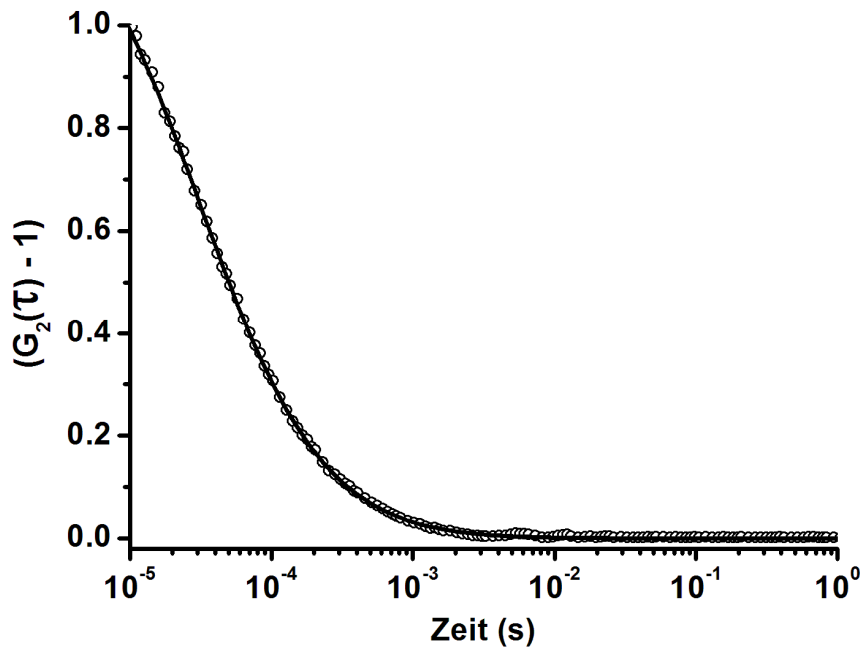


Abbildung 7.24: FCS Autokorrelationsfunktion der Mischung aus freiem unfunktionalisiertem Farbstoff und der N_3 -PiPrOx-Bürste in H_2O , $T=295.15 \text{ K}$, $\eta=0.9581$

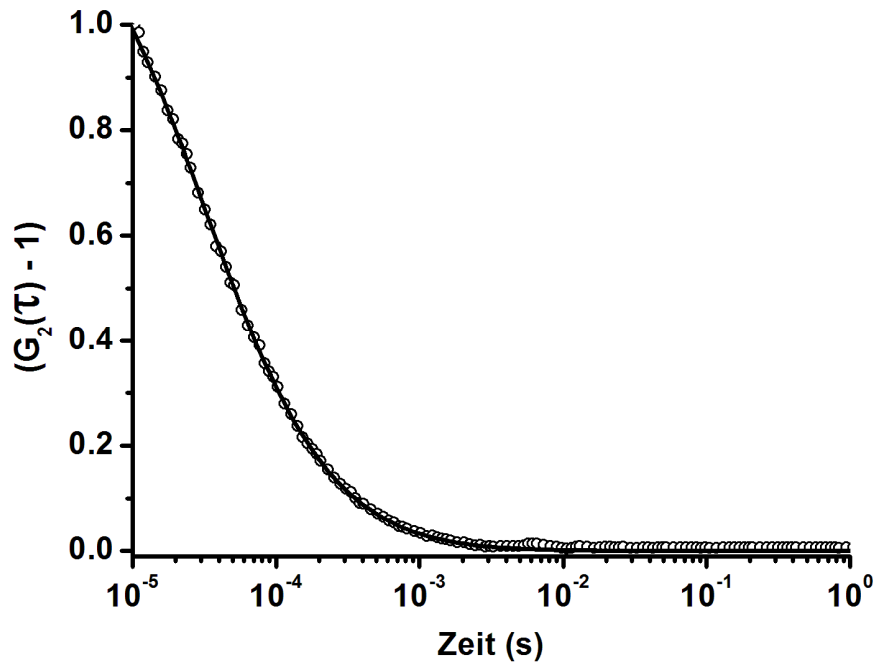


Abbildung 7.25: FCS Autokorrelationsfunktion der Mischung aus freiem unfunktionalisiertem Farbstoff und der N_3 -PEtOx-Bürste in H_2O , $T = 295.15$ K, $\eta = 0.9581$

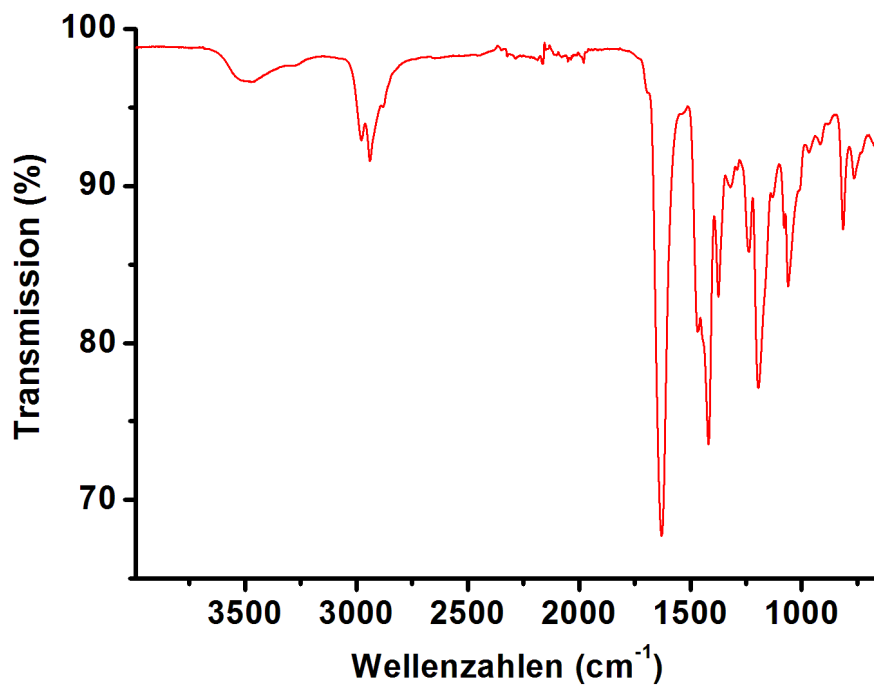


Abbildung 7.26: IR-Spektrum der NH_2 -Poly(2-ethyl-2-oxazlin)bürste

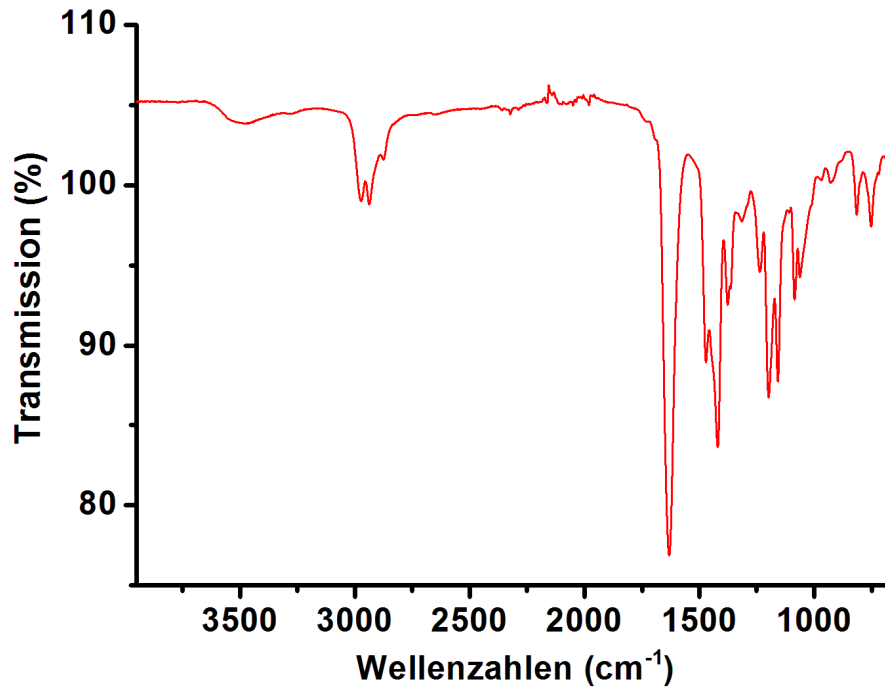


Abbildung 7.27: IR-Spektrum der NH₂-Poly(2-ethyl-block-2-isopropyl-2-oxazolin)bürste

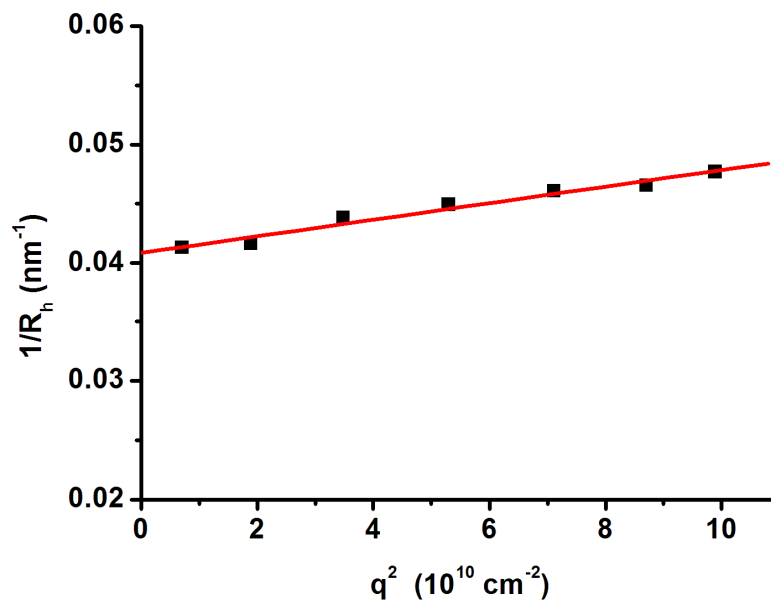


Abbildung 7. 28: DLS der NH₂-Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)bürste in Wasser bei 293 K zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte); $c=1$ g/l; $\eta=0.99257$ cp; $R_h= 24.5$ nm; Salz: Natriumchlorid ($c=152$ mM)

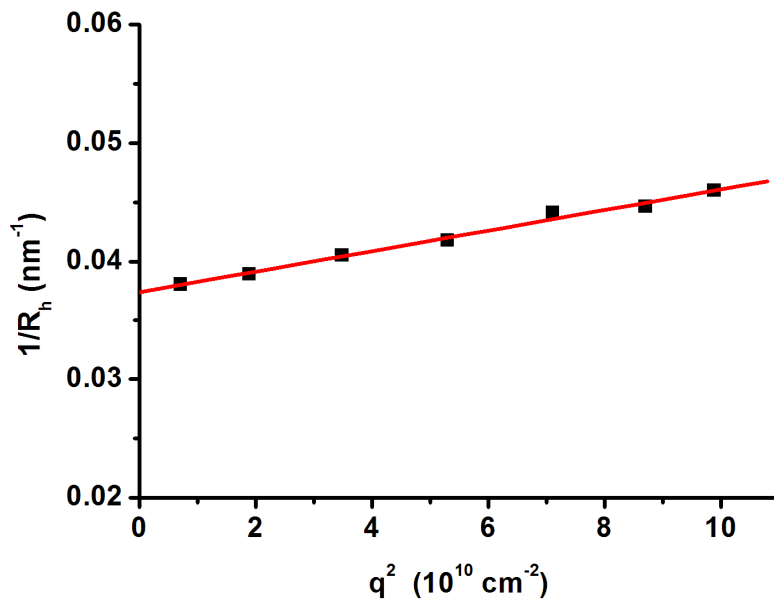


Abbildung 7.29: DLS der NH_2 -Poly(2-ethyl-2-oxazolin)bürste in Wasser bei 293 K zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte); $c=1 \text{ g/l}$; $\eta=0.99257 \text{ cp}$; $R_h=26 \text{ nm}$; Salz: Natriumchlorid ($c=152 \text{ mM}$)

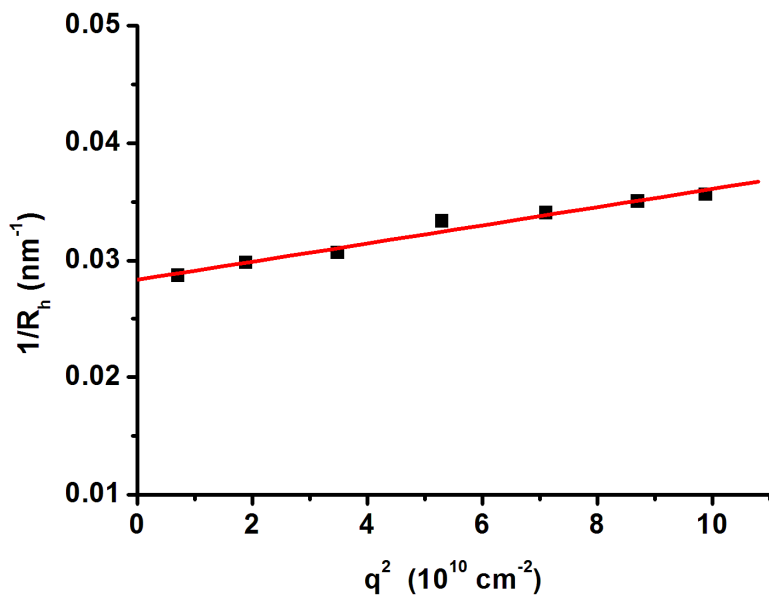


Abbildung 7.30: DLS der NH_2 -Poly(2-ethyl-block-2-isopropyl-2-oxazolin)bürste in Wasser bei 293 K zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte); $c=1 \text{ g/l}$; $\eta=0.99257 \text{ cp}$; $R_h=36 \text{ nm}$; Salz: Natriumchlorid ($c=152 \text{ mM}$)

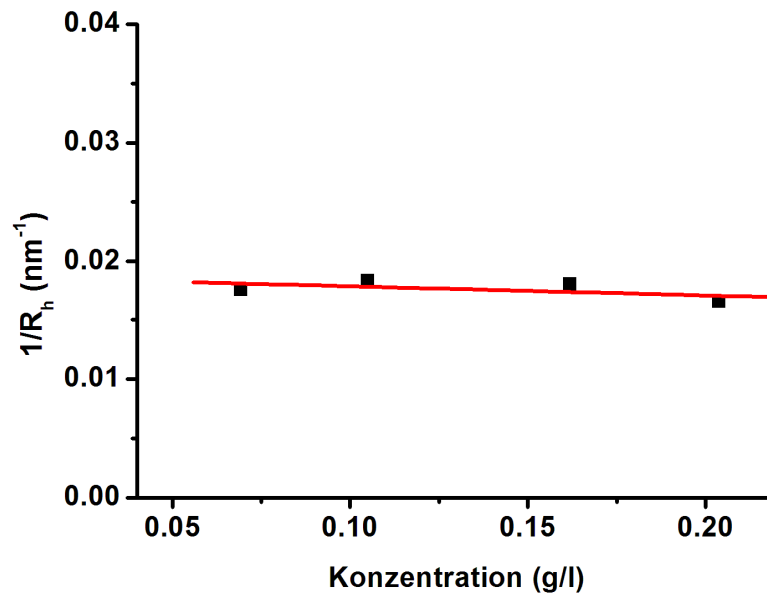


Abbildung 7.31: Reziproker hydrodynamischer Radius der Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)bürste in Abhängigkeit der Konzentration; in Methanol bei 293 K zwischen 30 und 150 Grad (20 Gradschritte)

Abkürzungsverzeichnis

A_2	2. Virialkoeffizient des osmotischen Drucks
ATRP	Atom Transfer Radical Polymerization
bmDc	bone marrow Dendritic cells
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BuOx	2-Butyl-2-oxazolin
c	Konzentration
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopie
Cu	Kupfer
DBCO	Bibenzylcyclooctyne
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EtOx	2-Ethyl-2-oxazolin
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
gw%	Gewichtsprozent
iPrOx	2-Isopropyl-2-oxazolin
LCROP	Lebende kationische ringöffnende Polymerisation
LCST	Lower Critical Solution Temperature
L_n	Zahlenmittel der Konturlänge
L_w	Gewichtsmittel der Konturlänge
l_k	Kuhnlänge
M_n	Zahlenmittel des Molekulargewichts
MeOx	2-Methyl-2-oxazolin
M_w	Gewichtsmittel des Molekulargewichts
MWCO	Molekulare Ausschlussgrenze (Molecular weight cut off)
N_2	Stickstoff
NHS	N-Hydroxysuccinimid
η	Viskosität
PBuOx	Poly(2-butyl-2-oxazolin)

Abkürzungsverzeichnis

PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PEtOx	Poly(2-ethyl-2-oxazolin)
PEtOx-c-PForOx	Poly(2-ethyl-co-2-formyl-2-oxazolin)
PEtOx-b-PiPrOx	Poly(2-ethyl-block-2-isopropyl-2-oxazolin)
PiPrOx	Poly(2-isopropyl-2-oxazolin)
PMeOx	Poly(2-methyl-2-oxazolin)
PNIPAM	Poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid)
PnPrOx	Poly(2-npropyl-2-oxazolin)
P_n	Zahlenmittel des Polymerisationsgrads
POx	Poly(2-oxazolin)
PPhOx	Poly(2-phenyl-2-oxazolin)
P_w	Gewichtsmittel des Polymerisationsgrads
R_g	Trägheitsradius
R_h	Hydrodynamischer Radius
ROMP	Ring-Opening Metathesis Polymerization
SLS	Statische Lichtstreuung
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TCEPO	Tris(2-carboxyethyl)phosphinoxid
TMS	Tetramethylsilan
T_T	Phasenübergangstemperatur (Transition Temperature)
UCST	Upper Critical Solution Temperature

Literaturverzeichnis

- [1] Y. Chen, *Macromolecules* 2012, 45, 2619–2631
- [2] M. Zhang, A. H. E. Müller, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2005, 43, 3461–3481
- [3] K. Ito, S. Kawaguchi in *Advances in Polymer Science* (Ed.: J. Roovers), Springer, Berlin, Heidelberg, 1999
- [4] K. Aoi, M. Okada, *Progress in Polymer Science* 1996, 21, 151–208
- [5] R. Luxenhofer, Y. Han, A. Schulz, J. Tong, Z. He, A. V. Kabanov, R. Jordan, *Macromolecular Rapid Communications* 2012, 33, 1613–1631
- [6] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* 2011, 44, 666–676
- [7] S. Mori, H. G. Barth, *Size exclusion chromatography*, Springer, Berlin, New York, 1999
- [8] H.-G. Elias, *Makromoleküle*, Wiley-VCH Weinheim, Chichester, 1999-2003
- [9] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme, Stuttgart, 2005
- [10] F. Lottspeich, J. W. Engels, *Bioanalytik*, Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., München, Heidelberg, 2006
- [11] W. Schaertl, *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2007
- [12] E. Breitmaier, *Vom NMR-Spektrum zur Strukturformel organischer Verbindungen*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005
- [13] H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Eine Einführung*, Wiley-VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto, 1999
- [14] S. S. Sheiko, M. Möller, *Chem. Rev.* 2001, 101, 4099–4124
- [15] S. S. Sheiko, M. da Silva, D. Shirvantiants, I. LaRue, S. Prokhorova, M. Moeller, K. Beers, K. Matyjaszewski, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 6725–6728
- [16] E. Y.-L. Kim, C. Gronewold, A. Chatterjee, C.-W. von der Lieth, C. Kliem, B. Schmauser, M. Wiessler, E. Frei, *ChemBioChem* 2005, 6, 422–431
- [17] T. Saegusa, H. Ikeda, H. Fujii, *Polymer Journal* 1971, 3, 35–39

- [18] N. Nepomniaschiy, V. Grimminger, A. Cohen, S. DiGiovanni, H. A. Lashuel, A. Brik, *Org. Lett.* 2008, 10, 5243–5246
- [19] H. Ringsdorf, *Journal of Polymer Science: Polymer Symposia* 1975, 51, 135–153
- [20] M. Barz, R. Luxenhofer, R. Zentel, M. J. Vicent, *Polym. Chem.* 2011, 2, 1900–1918
- [21] R. Duncan, *Nat Rev Drug Discov* 2003, 2, 347–360
- [22] M. A. Dobrovolskaia, D. R. Germolec, J. L. Weaver, *Nat Nano* 2009, 4, 411–414
- [23] M. A. Dobrovolskaia, S. E. McNeil, *Nat Nano* 2007, 2, 469–478
- [24] D. E. Owens III, N. A. Peppas, *International Journal of Pharmaceutics* 2006, 307, 93–102
- [25] R. Hoogenboom, *Angewandte Chemie International Edition* 2009, 48, 7978–7994
- [26] R. Hoogenboom, H. Schlaad, *Polymers* 2011, 3, 467–488
- [27] S. E. A. Gratton, P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008, 105, 11613–11618
- [28] P. Thirumurugan, D. Matosiuk, K. Jozwiak, *Chem. Rev.*, 2013
- [29] J. E. Hudak, R. M. Barfield, G. W. de Hart, P. Grob, E. Nogales, C. R. Bertozzi, D. Rabuka, *Angewandte Chemie International Edition* 2012, 51, 4161–4165
- [30] P. Goddard, L. E. Hutchinson, J. Brown, L. J. Brookman, *Journal of Controlled Release* 1989, 10, 5–16
- [31] F. C. Gaertner, R. Luxenhofer, B. Blechert, R. Jordan, M. Essler, *Journal of Controlled Release* 2007, 119, 291–300
- [32] S. Cai, K. Vijayan, D. Cheng, E. Lima, D. Discher, *Pharm Res* 2007, 24, 2099–2109
- [33] Frauke Kühn, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, 2010
- [34] H. Uyama, S. Kobayashi, *Chemistry Letters* 1992, 21, 1643–1646
- [35] K. Rausch, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, 2013
- [36] K. Rausch, A. Reuter, K. Fischer, M. Schmidt, *Biomacromolecules* 2010, 11, 2836–2839
- [37] S. S. Sheiko, B. S. Sumerlin, K. Matyjaszewski, *Progress in Polymer Science* 2008, 33, 759–785
- [38] M. Wintermantel, M. Gerle, K. Fischer, M. Schmidt, I. Wataoka, H. Urakawa, K. Kajiwarra, Y. Tsukahara, *Macromolecules* 1996, 29, 978–983
- [39] H. Xu, F. C. Sun, D. G. Shirvanyants, M. Rubinstein, D. Shabratov, K. L. Beers, K. Matyjaszewski, S. S. Sheiko, *Advanced Materials* 2007, 19, 2930–2934

- [40] T. Pakula, Y. Zhang, K. Matyjaszewski, H.-i. Lee, H. Boerner, S. Qin, G. C. Berry, *Containing: Structure and Dynamics of Complex Polymeric Materials. Commemorating Tadeusz Pakula 2006*, 47, 7198–7206
- [41] R. Djalali, S.-Y. Li, M. Schmidt, *Macromolecules* 2002, 35, 4282–4288
- [42] R. V. Iozzo, *Proteoglycans. Structure, biology, and molecular interactions*, Marcel Dekker, New York, op. 2000
- [43] N. C. Kaneider, S. Dunzendorfer, C. J. Wiedermann, *Biochemistry* 2003, 43, 237–244
- [44] J. E. Scott, *Biochemistry* 1996, 35, 8795–8799
- [45] G. D. Jay, *Connect Tissue Res* 1992, 28, 71–88
- [46] J. Seog, D. Dean, A. H. K. Plaas, S. Wong-Palms, A. J. Grodzinsky, C. Ortiz, *Macromolecules* 2002, 35, 5601–5615
- [47] K. L. Beers, S. G. Gaynor, K. Matyjaszewski, S. S. Sheiko, M. Möller, *Macromolecules* 1998, 31, 9413–9415
- [48] H. G. Börner, K. Beers, K. Matyjaszewski, S. S. Sheiko, M. Möller, *Macromolecules* 2001, 34, 4375–4383
- [49] B. Zhang, K. Fischer, M. Schmidt, *Macromolecular Chemistry and Physics* 2005, 206, 157–162
- [50] M. Sahl, S. Muth, R. Branscheid, K. Fischer, M. Schmidt, *Macromolecules* 2012, 45, 5167–5175
- [51] S. A. Jenekhe, X. L. Chen, *Science* 1999, 283, 372–375
- [52] G. Cheng, A. Böker, M. Zhang, G. Krausch, A. H. E. Müller, *Macromolecules* 2001, 34, 6883–6888
- [53] Y. Tsukahara, K. Mizuno, A. Segawa, Y. Yamashita, *Macromolecules* 1989, 22, 1546–1552
- [54] M. Gerle, K. Fischer, S. Roos, A. H. E. Müller, M. Schmidt, S. S. Sheiko, S. Prokhorova, M. Möller, *Macromolecules* 1999, 32, 2629–2637
- [55] M. Wintermantel, M. Schmidt, Y. Tsukahara, K. Kajiwara, S. Kohjiya, *Macromolecular Rapid Communications* 1994, 15, 279–284
- [56] P. Dziezok, K. Fischer, M. Schmidt, S. S. Sheiko, M. Möller, *Angewandte Chemie International Edition in English* 1997, 36, 2812–2815
- [57] D. Pantazis, I. Chalari, N. Hadjichristidis, *Macromolecules* 2003, 36, 3783–3785

- [58] S. Kanaoka, M. Sueoka, M. Sawamoto, T. Higashimura, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 1993, *31*, 2513–2521
- [59] K. Yamada, M. Miyazaki, K. Ohno, T. Fukuda, M. Minoda, *Macromolecules* 1998, *32*, 290–293
- [60] C. Cheng, E. Khoshdel, K. L. Wooley, *Macromolecules* 2005, *38*, 9455–9465
- [61] V. Heroguez, S. Breunig, Y. Gnanou, M. Fontanille, *Macromolecules* 1996, *29*, 4459–4464
- [62] A. J. Boydston, T. W. Holcombe, D. A. Unruh, J. M. J. Fréchet, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, *131*, 5388–5389
- [63] M. W. Neiser, S. Muth, U. Kolb, J. R. Harris, J. Okuda, M. Schmidt, *Angewandte Chemie International Edition* 2004, *43*, 3192–3195
- [64] M. Schappacher, C. Billaud, C. Paulo, A. Deffieux, *Macromolecular Chemistry and Physics* 1999, *200*, 2377–2386
- [65] M. Schappacher, J. Bernard, A. Deffieux, *Macromolecular Chemistry and Physics* 2003, *204*, 762–769
- [66] H. Gao, K. Matyjaszewski, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, *129*, 6633–6639
- [67] J. Bernard, M. Schappacher, P. Viville, R. Lazzaroni, A. Deffieux, *Stimuli Responsive Polymers IUPAC MACRO 2004 2005*, *46*, 6767–6776
- [68] J. Ruokolainen, J. Tanner, O. Ikkala, G. ten Brinke, E. L. Thomas, *Macromolecules* 1998, *31*, 3532–3536
- [69] O. Ikkala, J. Ruokolainen, G. ten Brinke, M. Torkkeli, R. Serimaa, *Macromolecules* 1995, *28*, 7088–7094
- [70] Y. Geng, P. Dalhaimer, S. Cai, R. Tsai, M. Tewari, T. Minko, D. E. Discher, *Nat Nano* 2007, *2*, 249–255
- [71] J. Champion, S. Mitragotri, *Pharm Res* 2009, *26*, 244–249
- [72] J. L. Perry, K. G. Reuter, M. P. Kai, K. P. Herlihy, S. W. Jones, J. C. Luft, M. Napier, J. E. Bear, J. M. DeSimone, *Nano Lett* 2012, *12*, 5304–5310
- [73] T. Kagiya, S. Narisawa, T. Maeda, K. Fukui, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters* 1966, *4*, 441–445
- [74] R. Hoogenboom, M. W. M. Fijten, U. S. Schubert, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2004, *42*, 1830–1840

- [75] R. Hoogenboom, R. M. Paulus, M. W. M. Fijten, U. S. Schubert, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2005, *43*, 1487–1497
- [76] M. Litt, A. Levy, J. Herz, *Journal of Macromolecular Science: Part A - Chemistry* 1975, *9*, 703–727
- [77] R. Luxenhofer, A. Schulz, C. Roques, S. Li, T. K. Bronich, E. V. Batrakova, R. Jordan, A. V. Kabanov, *Biomaterials* 2010, *31*, 4972–4979
- [78] N. Adams, U. S. Schubert, *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007, *59*, 1504–1520
- [79] J. Pánek, S. K. Filippov, M. Hrubý, M. Rabyk, A. Bogomolova, J. Kučka, P. Štěpánek, *Macromolecular Rapid Communications* 2012
- [80] C. Diehl, H. Schlaad, *Macromolecular Bioscience* 2009, *9*, 157–161
- [81] S. Sershen, J. West, *Type 2 diabetes - Delivery Approaches for Novel Therapeutics* 2002, *54*, 1225–1235
- [82] A. Chilkoti, M. R. Dreher, D. E. Meyer, D. Raucher, *Polymer Conjugates for Cancer Therapy* 2002, *54*, 613–630
- [83] H. Schlaad, C. Diehl, A. Gress, M. Meyer, A. L. Demirel, Y. Nur, A. Bertin, *Macromol. Rapid Commun.* 2010, *31*, 511–525
- [84] K. Otake, H. Inomata, M. Konno, S. Saito, *Macromolecules* 1990, *23*, 283–289
- [85] S. Furyk, Y. Zhang, D. Ortiz-Acosta, P. S. Cremer, D. E. Bergbreiter, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2006, *44*, 1492–1501
- [86] S. Huber, N. Hutter, R. Jordan, *Colloid Polym Sci* 2008, *286*, 1653–1661
- [87] J. Bühler, S. Muth, K. Fischer, M. Schmidt, *Macromolecular Rapid Communications* 2013, *34*, 588–594
- [88] P. Lin, C. Clash, E. M. Pearce, T. K. Kwei, M. A. Aponte, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 1988, *26*, 603–619
- [89] D. Christova, R. Velichkova, W. Loos, E. J. Goethals, F. Du Prez, *Polymer* 2003, *44*, 2255–2261
- [90] J.-S. Park, K. Kataoka, *Macromolecules* 2007, *40*, 3599–3609
- [91] H. G. Schild, *Progress in Polymer Science* 1992, *17*, 163–249
- [92] J.-S. Park, K. Kataoka, *Macromolecules* 2006, *39*, 6622–6630
- [93] S. Huber, R. Jordan, *Colloid Polym Sci* 2008, *286*, 395–402
- [94] R. Hoogenboom, H. M. L. Thijs, M. J. H. C. Jochems, B. M. van Lankvelt, M. W. M. Fijten, U. S. Schubert, *Chem. Commun.* 2008, *0*, 5758–5760

- [95] N. Zhang, S. Huber, A. Schulz, R. Luxenhofer, R. Jordan, *Macromolecules* 2009, 42, 2215–2221
- [96] R. Hoogenboom, H. M. L. Thijs, D. Wouters, S. Hoepfener, U. S. Schubert, *Soft Matter* 2008, 4, 103–107
- [97] M. J. Vicent, H. Ringsdorf, R. Duncan, *Polymer Therapeutics: Clinical Applications and Challenges for Development* 2009, 61, 1117–1120
- [98] L. Qiu, Y. Bae, *Pharmaceutical Research* 2006, 23, 1–30
- [99] C. C. Lee, J. A. MacKay, J. M. J. Frechet, F. C. Szoka, *Nat Biotech* 2005, 23, 1517–1526.
- [100] B. Chen, K. Jerger, J. M. J. Fréchet, F. C. Szoka, JR., *Proceedings of the Fourteenth International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems* 2009, 140, 203–209
- [101] W. H. Velander, R. D. Madurawe, A. Subramanian, G. Kumar, G. Sinai-Zingde, J. S. Riffle, C. L. Orthner, *Biotechnology and Bioengineering* 1992, 39, 1024–1030
- [102] a) M. Reif, R. Jordan, *Macromolecular Chemistry and Physics* 2011, 212, 1815–1824
b) Y. Shimano, K. Sato, S. Kobayashi, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 1995, 33, 2715–2723
- [103] R. Luxenhofer, M. Bezen, R. Jordan, *Macromolecular Rapid Communications* 2008, 29, 1509–1513
- [104] N. Zhang, R. Luxenhofer, R. Jordan, *Macromolecular Chemistry and Physics* 2012, 213, 973–981
- [105] R. Luxenhofer, G. Sahay, A. Schulz, D. Alakhova, T. K. Bronich, R. Jordan, A. V. Kabanov, *Journal of Controlled Release* 2011, 153, 73–82
- [106] J. Tong, M. C. Zimmerman, S. Li, X. Yi, R. Luxenhofer, R. Jordan, A. V. Kabanov, *Biomaterials* 2011, 32, 3654–3665
- [107] X. Wang, X. Li, Y. Li, Y. Zhou, C. Fan, W. Li, S. Ma, Y. Fan, Y. Huang, N. Li et al., *Acta Biomaterialia* 2011, 7, 4149–4159
- [108] J. Kronek, J. Lustoň, Z. Kroneková, E. Paulovičová, P. Farkaš, N. Petrenčíková, L. Paulovičová, I. Janigová, *J Mater Sci: Mater Med* 2010, 21, 879–886
- [109] *Encyclopedia of polymer science and engineering*, Wiley, New York, 1985
- [110] T. X. Viegas, M. D. Bentley, J. M. Harris, Z. Fang, K. Yoon, B. Dizman, R. Weimer, A. Mero, G. Pasut, F. M. Veronese, *Bioconjugate Chem* 2011, 22, 976–986

- [111] B. Pidhatika, M. Rodenstein, Y. Chen, E. Rakhmatullina, A. Mühlebach, C. Acikgöz, M. Textor, R. Konradi, *Biointerphases* 2012, 7, 1-15
- [112] L. R. Brown, *Expert Opin. Drug Deliv.* 2005, 2, 29–42
- [113] N. A. Hutter, M. Steenackers, A. Reitingner, O. A. Williams, J. A. Garrido, R. Jordan, *Soft Matter* 2011, 7, 4861–4867
- [114] J. Tong, R. Luxenhofer, X. Yi, R. Jordan, A. V. Kabanov, *Mol. Pharmaceutics* 2010, 7, 984–992
- [115] J. Tong, X. Yi, R. Luxenhofer, W. A. Banks, R. Jordan, M. C. Zimmerman, A. V. Kabanov, *Mol. Pharmaceutics* 2012, 10, 360–377
- [116] J. H. Jeong, S. H. Song, D. W. Lim, H. Lee, T. G. Park, *Journal of Controlled Release* 2001, 73, 391–399
- [117] T. von Erlach, S. Zwicker, B. Pidhatika, R. Konradi, M. Textor, H. Hall, T. Lühmann, *Biomaterials* 2011, 32, 5291–5303
- [118] S. Egli, M. G. Nussbaumer, V. Balasubramanian, M. Chami, N. Bruns, C. Palivan, W. Meier, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 4476–4483
- [119] Y. Han, Z. He, A. Schulz, T. K. Bronich, R. Jordan, R. Luxenhofer, A. V. Kabanov, *Mol. Pharmaceutics* 2012, 9, 2302–2313
- [120] N. Zhang, R. Luxenhofer, R. Jordan, *Macromolecular Chemistry and Physics* 2012, 213, 1963–1969
- [121] C. Weber, C. Remzi Becer, W. Guenther, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, *Macromolecules* 2009, 43, 160–167
- [122] C. Weber, A. Krieg, R. M. Paulus, H. M. L. Lambermont-Thijs, C. R. Becer, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, *Macromolecular Symposia* 2011, 308, 17–24
- [123] C. Weber, S. Rogers, A. Vollrath, S. Hoepfener, T. Rudolph, N. Fritz, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 2013, 51, 139–148
- [124] C. Weber, K. Babiuch, S. Rogers, I. Y. Perevyazko, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, *Polym. Chem.* 2012, 3, 2976–2985
- [125] B. Guillermin, V. Darcos, V. Lapinte, S. Monge, J. Coudane, J.-J. Robin, *Chem. Commun.* 2012, 48, 2879–2881
- [126] A. Michael, *Journal für Praktische Chemie* 1893, 48, 94–95
- [127] R. Huisgen, *Angewandte Chemie International Edition in English* 1963, 2, 565–598

- [128] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* 2002, 41, 2596–2599
- [129] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* 2002, 67, 3057–3064
- [130] H. Räder, W. Schrepp, *Acta Polymerica* 1998, 49, 272–293
- [131] B. H. Zimm, *J. Chem. Phys.* 1948, 16, 1099
- [132] N. Wiener, *Acta Mathematica* 1930, 55, 117–258
- [133] A. Khintchine, *Mathematische Annalen* 1934, 109, 604–615
- [134] M. Schmidt (Ed.) *Dynamic Light Scattering, The Method and Some Applications*, W. Brown Ed. *Simultaneous Static and Dynamic Light Scattering: Application to Polymer Structure Analysis*, Clarendon Press, Oxford, 1993
- [135] J. Siegert, *MIT Rap. Lab. Rep.* 1943, 465
- [136] M. Sahl, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, 2011
- [137] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum, New York, 1999
- [138] P. Schwille, E. Haustein, *Fluorescence Correlation Spectroscopy. An Introduction to its Concepts and Applications*
- [139] R. Rigler, E. Elson, *Fluorescence correlation spectroscopy. Theory and applications* Springer, Berlin, New York, 2001
- [140] D. Magde, E. L. Elson, W. W. Webb, *Biopolymers* 1974, 13, 29–61
- [141] K. Fischer, C. D. Eisenbach, *Makromol. Chem., Rapid Commun.* 1988, 9, 503–511
- [142] Y. Tsukahara, K. Tsutsumi, Y. Yamashita, S. Shimada, *Macromolecules* 1990, 23, 5201–5208
- [143] O. Kratky, G. Porod, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 1949, 68, 1106–1122
- [144] M. Schmidt, *Macromolecules* 1984, 17, 553–560
- [145] C. Li, N. Gunari, K. Fischer, A. Janshoff, M. Schmidt, *Angewandte Chemie* 2004, 116, 1121–1124
- [146] S. Bolisetty, C. Schneider, F. Polzer, M. Ballauff, W. Li, A. Zhang, A. D. Schlüter, *Macromolecules* 2009, 42, 7122–7128
- [147] G. L'abbe, *Chem. Rev.* 1969, 69, 345–363
- [148] R. A. Abramovitch, E. P. Kyba, *J. Am. Chem. Soc.* 1974, 96, 480–488
- [149] G. Volet, T.-X. Lav, J. Babinot, C. Amiel, *Macromolecular Chemistry and Physics* 2011, 212, 118–124

- [150] W. H. Binder, H. Gruber, *Macromolecular Chemistry and Physics* 2000, 201, 949–957
- [151] M. A. Gauthier, M. I. Gibson, H.-A. Klok, *Angewandte Chemie* 2009, 121, 50–60
- [152] W. Q. Tian, Y. A. Wang, *J. Org. Chem.* 2004, 69, 4299–4308
- [153] D. Walczyk, F. B. Bombelli, M. P. Monopoli, I. Lynch, K. A. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 5761–5768
- [154] K. Birkholz, M. Schwenkert, C. Kellner, S. Gross, G. Fey, B. Schuler-Thurner, G. Schuler, N. Schaft, J. Dörrie, *Blood* 2010, 116, 2277–2285
- [155] J. Brandrup, *Polymer Handbook*, Wiley, New York, 1999
- [156] M. A. Abdel-Rahman, B. W. Schweizer, O. Lukin, A. Zhang, A. D. Schlüter, *Macromolecular Chemistry and Physics* 2010, 211, 1538–1549
- [157] R. Geiger, W. Siedel, *Chemische Berichte* 1968, 101, 3386–3391
- [158] U. Hengartner, A. D. Batcho, J. F. Blount, W. Leimgruber, M. E. Larscheid, J. W. Scott, *J. Org. Chem.* 1979, 44, 3748–3752
- [159] G. Woeste, W. H. Meyer, G. Wegner, *Makromol. Chem.* 1993, 194, 1237–1248
- [160] A. Becker, W. Köhler, B. Müller, *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* 1995, 99, 600–608

