

Von Funktionalen Polymerbasierten Transfektionsagenzien und Enzymatischen Antikörpermodifizierungen zur Bioorthogonalen Konjugation

Dissertation
zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"
im Promotionsfach Chemie

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

Simone Beck
geboren in Mainz

Mainz, 2018

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 2014 bis Mai 2018 am Institut für Organische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Betreuung von [REDACTED] angefertigt.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „*Von Funktionalen Polymerbasierten Transfektionsagenzien und Enzymatischen Antikörpermodifizierungen zur Bioorthogonalen Konjugation*“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet. Diese Dissertation wurde weder zu sonstigen Prüfungszwecken eingesetzt noch in einer abgewandelten Form bei anderen Hochschulen eingereicht.

Mainz, Mai 2018

Simone Beck

Dekan:



1. Berichterstatter:



2. Berichterstatter:



Tag der mündlichen Prüfung: 04.06.2018

*„Grüble nicht, was möglich ist und was nicht.
Tu, was du mit deinen Kräften zustande bringst –
darauf kommt alles an.“*

Leo Tolstoi (1828-1910)

Abstract

Within the research area of nanoparticle-based tumor immune therapy, the development of polymer-based transfection vectors for efficient delivery of nucleic acids offers great potential in anti-tumor vaccination. It seems very promising to activate the body's own immune system with pDNA or mRNA vaccines to combat malignant cells of solid tumors or even metastasis. Therefore, a main topic in this thesis was the further development of poly-(L-lysine)-*block*-poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylate) block copolymers as transfection vectors for dendritic immune cells. The combination of ring-opening polymerization of *N*- ϵ -(Boc)-L-lysine *N*-carboxyanhydride and RAFT polymerization (*reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization*) of pentafluorophenyl methacrylate enabled the synthesis of p(Lys)-*b*-p(PFPMA) reactive ester precursor block copolymers. After several post-polymerization modification steps, multifunctional p(Lys)-*b*-p(HPMA) block copolymers were obtained. The complexation of negatively charged nucleic acids, such as pDNA or mRNA, was achieved by electrostatic interactions with the cationic poly(L-lysine) block. The most important advantage of using poly(HPMA) as suitable shielding block for the charged polyplex is the straightforward synthesis *via* the reactive ester approach. Besides the conversion with 2-hydroxypropylamine the introduction of many different functionalities like fluorescent dyes by sequential aminolysis of the poly(PFPMA) block shows great benefit. In order to enhance transfection efficiencies, the incorporation of an acid-labile hydrazone moiety within the p(Lys)-*b*-p(HPMA) block copolymer was evaluated. The hydrolytic cleavage of the hydrazone in the acidic endosomal compartments should facilitate the polyplex' endosomal escape and consequently contribute to improved transfection efficiencies. Furthermore, the poly(L-lysine) block of p(Lys)-*b*-p(HPMA) block copolymers was statistically modified with thiol-reactive 2-(pyridyldithio)-propionate moieties for reversible core cross-linking. In general, a disulfide cross-linking is known to improve the extracellular stability of the polyplex and in this work it was used for the additional incorporation of endosomolytic LAH4-L1 peptide as dithiol cross-linker.

With regard to a cell type-specific uptake of p(Lys)-*b*-p(HPMA)-based nanovaccines by dendritic immune cells, the attachment of DEC205 antibodies as targeting ligands onto the polyplex' surface was investigated. For this purpose, strain-promoted alkyne-azide-cycloaddition was used as bioorthogonal conjugation strategy. The synthesis of two azide-functionalized block copolymers was performed by post-polymerization modification. The resulting p(Lys)-*b*-p(HPMA)-N₃(stat) and p(Lys)-*b*-p(HPMA)-N₃(end) differ in number and position of azide moieties and were both employed for polyplex formation. DBCO-functionalization of aDEC205 was conducted by a two-step enzymatic antibody modification approach, using bacterial transglutaminase (BTG). This enzymatic strategy enables the site-specific modification at two distinct glutamine side chains within the IgG antibody and was applied for different BTG-substrates in bioorthogonal antibody conjugations.

Kurzdarstellung

Die Entwicklung polymerer Transfektionsvektoren für den Transport von Nukleinsäuren zeigt großes Potential im Bereich der Nanopartikel-basierten Tumorimmuntherapie. Dabei stellt die Bekämpfung maligner Zellen solider Tumore, aber auch von metastasierenden Tumorzellen über die Aktivierung des Immunsystems mit pDNA- bzw. mRNA-Vakzinen einen vielversprechenden Ansatz dar. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der chemischen Modifizierung von Poly-L-lysin-*block*-Poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylat) Blockcopolymeren als Transfektionsagenzien für dendritische Immunzellen (DCs). Über die Kombination von ringöffnender Polymerisation von *N*- ϵ -(Boc)-L-Lysin *N*-carboxyanhydrid und RAFT-Polymerisation (*reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization*) des Reaktivestermonomers Pentafluorphenylmethacrylat konnten P(Lys)-*b*-P(PFPMA) Vorläufer-Blockcopolymere erfolgreich hergestellt werden. Die Umsetzung zu multifunktionalen P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymeren erfolgte über verschiedene polymeranalogue Reaktionen. Der kationische Poly-L-lysin-Block ist über elektrostatische Wechselwirkungen zur Komplexierung von negativ geladenen Nukleinsäuren befähigt. Der Vorteil in der Verwendung von P(HPMA) als hydrophile Hülle zur Abschirmung der Polyplexe liegt in der Darstellung über den Reaktivesteransatz begründet. In einem einzigen Reaktionsschritt können mittels sequentieller Aminolyse des P(PFPMA)-Blocks unterschiedliche Funktionalitäten, wie z. B. Fluoreszenzfarbstoffe in die P(HPMA)-Einheit eingeführt werden. In dieser Arbeit wurde der Einbau eines säurelabilen Hydrazonlinkers innerhalb des P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymers evaluiert. Die Hydrolyse des Hydrazons im sauren Endosomenmilieu soll die endosomale Freisetzung der Polyplexe unterstützen und in Folge dessen die Transfektionseffizienz der Systeme erhöhen. Für eine reversible Kernvernetzung wurde der Poly-L-lysin-Block in P(Lys)-*b*-P(HPMA) statistisch mit thiolreaktiven 2-(Pyridyldithio)-propionat-Gruppen modifiziert. Im Allgemeinen soll die Disulfidvernetzung zu einer verbesserten extrazellulären Stabilität der Polyplexe beitragen und wurde hier für die Einführung des endosomolytisch-aktiven LAH4-L1-Peptids als Dithiol-Vernetzer genutzt. Für eine spezifische DC-Adressierung wurde die Konjugation von DBCO-modifizierten DEC205-Antikörpern als Zielstrukturen auf der Oberfläche von azidfunktionalisierten P(Lys)-*b*-P(HPMA)-basierten Polyplexen über ringgespannte Alkin-Azid-Cycloaddition umfassend untersucht. Dafür wurden zwei unterschiedliche Blockcopolymere synthetisiert: P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) und P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(end), die sich in Anzahl und Position der Azidgruppen unterscheiden. Die DBCO-Funktionalisierung von aDEC205 erfolgte über einen enzymatischen Modifizierungsprozess, der die regioselektive Einführung funktionaler Gruppen an zwei spezifischen Glutaminresten innerhalb des Antikörpers erlaubt. Somit stellt die über bakterielle Transglutaminase-vermittelte enzymatische Antikörperfunktionalisierung mit unterschiedlichen Substraten für bioorthogonale Konjugationen und deren ausführliche Charakterisierung einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit dar.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Polymerisationstechniken</i>	1
1.1.1	RAFT-Polymerisation.....	1
1.1.1.1	Reaktivesterpolymere	4
1.1.2	NCA-Polymerisation.....	5
1.2	<i>Nanopartikel-Basierte Tumorummuntherapie</i>	7
1.2.1	Anti-Tumorstimmung	9
1.2.2	Polymere Transfektionsagenzien	11
1.2.2.1	Targeting für Polymere Transfektionsagenzien.....	15
1.3	<i>Immunglobulin G – IgG-Antikörper</i>	19
1.3.1	IgG-Aufbau und Herstellungsverfahren	19
1.3.2	Künstliche Antikörperfragmente – Antikörper-Engineering.....	22
1.3.3	Antikörper als Zielstrukturen.....	23
1.3.4	Methoden zur Antikörpermodifizierung.....	25
1.3.4.1	Enzymatische Antikörpermodifizierung mit Bakterieller Transglutaminase (BTG).....	27
1.4	<i>Biokonjugation über Bioorthogonale Reaktionen</i>	29
2	Motivation und Zielsetzung	35
3	Ergebnisse und Diskussion	39
3.1	<i>Synthese von P(Lys)-b-P(HPMA) Blockcopolymeren -</i>	39
	<i>Azidfunktionalisierung</i>	39
3.1.1	Synthese des Makromolekularen Kettentransferreagenzes: Poly-L-Lysin(Boc)-CTA.....	42
3.1.2	RAFT-Polymerisation von PFPMA: P(Lys(Boc))-b-P(PFPMA).....	45
3.1.2.1	Synthese von Pentafluorphenylmethacrylat: PFPMA.....	45
3.1.2.2	RAFT-Polymerisation von PFPMA mit P(Lys(Boc))-CTA	46
3.1.3	Polymeranaloge Umsetzung zu P(Lys(Boc))-b-P(HPMA).....	50
3.1.4	Azidfunktionalisierung zu P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)-N ₃ (stat) und P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)-N ₃ (end).....	52
3.1.4.1	Synthese von P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)-N ₃ (stat)	52
3.1.4.2	Synthese von P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)-N ₃ (end).....	55
3.1.5	Boc-Entschützung der P(Lys(Boc))-b-P(HPMA) Blockcopolymeren.....	59
3.2	<i>Synthese des Hydrazon-CTAs</i>	61

3.3	<i>Kationische Blockcopolymere als Transfektionsagenzien</i>	69
3.3.1	Physikochemische Charakterisierung von pDNA- und mRNA- Polyplexen	70
3.3.1.1	Polymermodifikation mit Reaktiven Disulfiden:.....	77
	P(Lys)-co-P(Lys-PDP)-b-P(HPMA).....	77
3.3.1.2	Endosomolytisches LAH4-L1-Peptid in der Polyplexbildung	80
3.3.2	P(Lys)-b-P(HPMA) Blockcopolymere als Transfektionsagenzien	84
3.3.2.1	Transfektionsassay von pDNA-Polyplexen mit P(Lys)-b-P(HPMA) (P1) ...	84
3.3.2.2	Transfektionsassay von pDNA-Polyplexen mit P(Lys)-b-P(HPMA) (P1) / LAH4-L1 und P(Lys)-co-(P(Lys-PDP)-b-P(HPMA) (P2) / LAH4-L1-Cys.....	86
3.3.2.3	Transfektionsassay von mRNA-Polyplexen mit P(Lys)-b-P(HPMA) (P1)...	87
3.4	<i>Modifizierung von IgG-Antikörpern</i>	89
3.4.1	DBCO-Funktionalisierung von aDEC205 und IgG2a.....	93
3.4.2	TCO-Funktionalisierung von aDEC205	108
3.4.3	DFO-Funktionalisierung von aCD25.....	112
3.5	<i>Bioorthogonale Konjugationen mit aDEC205-DBCO/TCO</i>	121
3.5.1	Konjugation von aDEC205-DBCO(Lys) an Azidfunktionalisierte..... P(Lys)-b-P(HPMA) Blockcopolymere	122
3.5.1.1	SPAAC von Azid-Polyplexen und Alexa Fluor 647 DBCO.....	125
3.5.2	Konjugation von Azidfunktionalisierten Polyplexen und aDEC205-DBCO(Lys)/(NHS)	127
3.5.3	Konjugation von Zylindrischen Azid-Bürstenpolymeren und..... aDEC205-DBCO(NH ₂).....	131
3.5.4	Konjugation von Tetrazin-Mizellen und aDEC205-TCO(NH ₂)	133
4	Zusammenfassung und Ausblick	137
5	Experimentalteil	145
5.1	<i>Materialien</i>	145
5.2	<i>Mess- und Analysemethoden</i>	146
5.3	<i>Monomersynthese</i>	152
5.3.1	Pentafluorphenylmethacrylat: PFPMA.....	152
5.4	<i>Synthese Makromolekularer Kettentranferreagenzien:</i>	152
	Poly-L-Lysin(Boc)-CTA.....	152
5.4.1	4-Cyano-4-((Thiobenzoyl)-Sulfanyl)-Pentansäure-Pentafluor- phenylester: PFP-CTA	152
5.4.2	Polymerisation von N-ε-(Boc/TFA)-L-Lysin-N-Carboxyanhydrid:..... Poly-L-Lysin(Boc/TFA).....	153
5.4.3	Poly-L-Lysin(Boc)-CTA.....	154

5.5	<i>Synthese von P(Lys)-b-P(HPMA) Blockcopolymeren</i>	155
5.5.1	RAFT-Polymerisation von PFPMA:.....	155
	P(Lys(Boc))-b-P(PFPMA)	155
5.5.2	Polymeranaloge Umsetzung zu P(Lys(Boc))-b-P(HPMA).....	156
5.5.3	Azidfunktionalisierung von P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)	157
5.5.3.1	Statistische Azidfunktionalisierung zu P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)-N ₃ (stat)	157
5.5.3.2	Azidfunktionalisierung der Endgruppe zu	
	P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)-N ₃ (end).....	158
5.5.4	Entfernen der Boc-Schutzgruppe.....	159
5.6	<i>Qualitativer Nachweis der Azidengruppe in</i>	160
	P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)-N ₃ (end).....	160
5.7	<i>Synthese von P(Lys)-co-P(Lys-PDP)-b-P(HPMA)</i>	160
5.8	<i>Synthese des Hydrazon-CTAs</i>	161
5.8.1	3-(((Benzyloxy)Carbonyl)Amino)Propansäuremethylester:	161
	(Z)-β-Alanin-Methylester	161
5.8.2	3-(((Benzyloxy)Carbonyl)Amino)Propansäurehydrazid:	161
	(Z)-β-Alanin-Hydrazid	161
5.8.3	(E)-4-(2-(3-(((Benzyloxy)Carbonyl)Amino)Propanyl)Hydrazono)-	
	Pentansäure: (Z)-β-Alanin-Hydrazon	162
5.8.4	Poly-L-Lysin(TFA)-Hydrazon(Z).....	163
5.8.5	Z-Entschützung: Poly-L-Lysin(TFA)-Hydrazon.....	164
5.8.6	Poly-L-Lysin(TFA)-Hydrazon-CTA.....	164
5.9	<i>Darstellung von pDNA- und mRNA-Polyplexen</i>	165
5.9.1	Probenvorbereitung für Agarosegelelektrophorese.....	165
5.9.2	Probenvorbereitung für FCS.....	166
5.9.3	Probenvorbereitung für DLS-Messungen (Zetasizer).....	166
5.10	<i>Synthese des Dibenzocyclooctin-Linkers: DBCO-Lys</i>	168
5.10.1	Dibenzocyclooctin-Pentafluorphenylester: DBCO-PFP	168
5.10.2	Dibenzocyclooctin-N-ε-Boc-L-Lysin: DBCO-Lys(Boc).....	168
5.10.3	Dibenzocyclooctin-L-Lysin: DBCO-Lys.....	169
5.11	<i>Antikörpermodifizierungen</i>	170
5.11.1	Fluoreszenzmarkierung (AF647) der IgG-Antikörper	170
5.11.2	Enzymatische Antikörpermodifizierung	170
5.11.2.1	Deglykosylierung mit Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F).....	170
5.11.2.2	Regioselektive Antikörpermodifizierung mit Bakterieller	171
	Transglutaminase (BTG).....	171
5.11.3	Unspezifische Antikörpermodifizierung	172
5.12	<i>Bioorthogonale Konjugationen über SPAAC und IEDDA</i>	172
5.12.1	SPAAC von aDEC205 und Fluoreszenzfarbstoffen	172

5.12.2	SPAAC von aDEC205-DBCO(Lys) und	173
	P(Lys)-b-P(HPMA)-N ₃ (stat).....	173
5.12.3	SPAAC von aDEC205-DBCO(Lys) und	174
	P(Lys)-b-P(HPMA)-N ₃ (end).....	174
5.12.4	SPAAC von Azid-Polyplexen und Alexa Fluor 647 DBCO.....	174
5.12.5	SPAAC von Azid-Polyplexen und.....	174
	aDEC205-DBCO(Lys/NHS).....	174
5.12.6	SPAAC von Azid-Bürstenpolymeren und.....	175
	aDEC205-DBCO(NH ₂).....	175
5.12.7	IEDDA von Tetrazin-Mizellen und aDEC205-TCO(NH ₂).....	175
5.13	<i>Antikörper-Bindungsassay</i>	175
5.13.1	Bindungsassay von aDEC205 an BMDCs.....	175
5.13.2	Bindungsassay von aCD25 an T-Lymphozyten.....	176
5.14	<i>Radiomarkierung von aCD25-DFO mit ⁸⁹Zr und Stabilitätstest</i>	177
5.15	<i>Transfektionsstudien mit Luciferase Assay</i>	177
6	Anhang	181
6.1	<i>Literaturverzeichnis</i>	181
6.2	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	191

1 Einleitung

1 Einleitung

1.1 Polymerisationstechniken

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die kontrollierte radikalische RAFT-Polymerisation (*reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization*) zur Darstellung von funktionalen Poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylat) (P(HPMA)) Polymeren über den Reaktivesteransatz mit Pentafluorphenylmethacrylat (PFPPMA) verwendet. Die Synthese von Poly-L-lysin erfolgte über ringöffnende Polymerisation des entsprechenden α -Aminosäure *N*-Carboxyanhydrids (NCA-Polymerisation).

1.1.1 RAFT-Polymerisation

Die freie radikalische Polymerisation ist eine der am häufigsten verwendeten Methoden zur Darstellung kommerziell relevanter Polymere mit hohen Molekulargewichten.^[1,2] Der Vorteil liegt in einer großen Vielfalt an einsetzbaren Monomeren, wie z. B. (Meth)acrylate, (Meth)acrylamide, Diene und verschiedene Vinylmonomere. Weiterhin besteht eine hohe Toleranz gegenüber ungeschützten funktionalen Gruppen (COOH, OH, NR₂ und SO₃H) im Monomer oder im Lösungsmittel. Die Reaktionsbedingungen für die radikalische Polymerisation sind sehr variabel. So kann die Polymerisation in Lösung oder auch über Emulsions- oder Suspensionspolymerisation stattfinden. Die einfache Durchführbarkeit und die geringen Kosten im Vergleich zu kompetitiven Verfahren begründen die vorherrschende Position der freien radikalischen Polymerisation in der industriellen Polymersynthese.

Allerdings ist die konventionelle radikalische Polymerisation in Bezug auf die Kontrolle über die Kettenlänge, die Molekulargewichtsverteilung und die Zusammensetzung bzw. die Architektur von Copolymeren stark limitiert. Diese Einschränkungen können durch das Konzept der kontrollierten radikalischen Polymerisation (CRP) überwunden werden.^[3] Dazu gehört neben der *nitroxide-mediated radical polymerization*^[4] (NMP) und der *atom transfer radical polymerization*^[5] (ATRP) die von E. Rizzardo und S. Thang^[6] 1998 erstmals beschriebene RAFT-Polymerisation (*reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization*). Vorteile der RAFT-Polymerisation liegen bei einer großen Monomerauswahl, milden Reaktionsbedingungen mit Tieftemperaturinitiatoren und einer erleichterten Aufarbeitung, ohne, dass das Abtrennen von Metallkatalysatoren nötig ist, wie es z. B. in der ATRP der Fall ist. Der nach der Commonwealth Science & Industrial Research Organisation (CSIRO) in Australien postulierte Mechanismus der RAFT-Polymerisation ist in Abbildung 1 dargestellt.^[6]

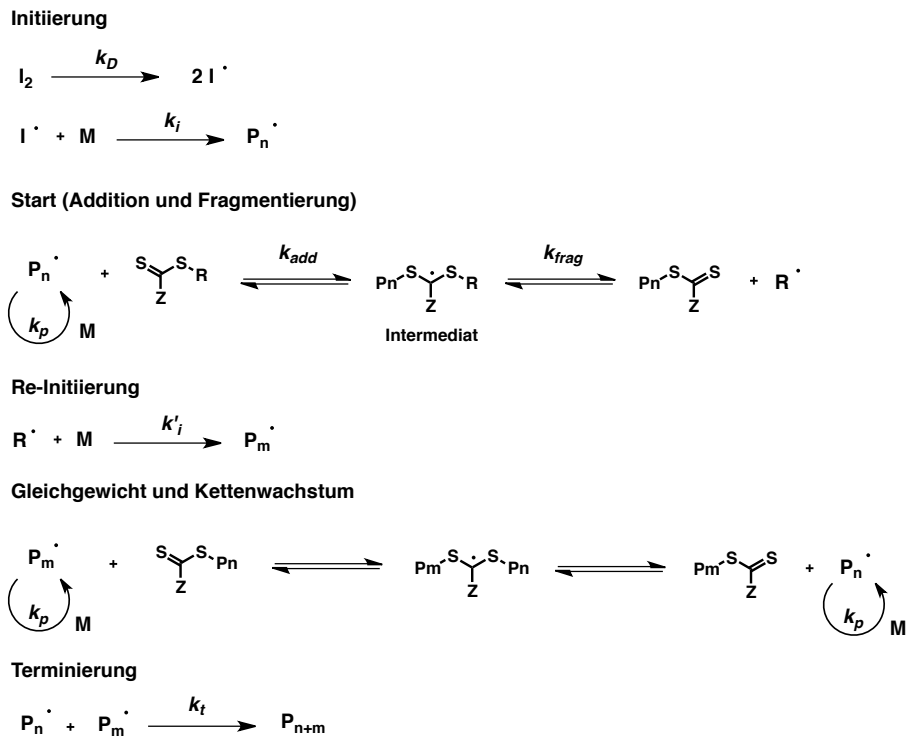


Abbildung 1. Mechanismus der RAFT-Polymerisation nach CSIRO.^[6]

Die Initiierung erfolgt über die thermische oder photolytische Spaltung von Diazoverbindungen, wie AIBN (Azobis(isobutyronitril)) oder Peroxiden, wie BPO (Dibenzoylperoxid). Das erzeugte Radikal kann durch Monomeraddition das Wachstum einer Polymerkette starten. Hierbei ist es für eine kontrollierte radikalische Polymerisation essentiell, dass der Initiierungsschritt schneller abläuft als das Kettenwachstum ($k_i > k_p$) und somit alle Ketten gleichzeitig initiiert werden und die Wachstumsgeschwindigkeit aller Polymerketten nahezu gleich ist. Dies kann durch die Thiocarbonylgruppe in den verwendeten Kettentransferreagenzien (CTAs: *chain transfer agents*) gewährleistet werden. Die Radikaladdition an den CTA ist gegenüber der Addition an eine Doppelbindung im Monomer bevorzugt. Das dabei entstehende Intermediatradikal kann entweder in den ursprünglich eingesetzten CTA fragmentieren oder in eine wachsende Polymerkette mit CTA-Endgruppe und in ein reinitiiertes Radikal ($R \cdot$) fragmentieren. Das entstehende Radikal ($R \cdot$) kann nun wieder eine neue Kette starten (Reinitiierung). Somit beruht das Kettenwachstum auf einem schnellen Gleichgewicht zwischen der dominierenden „schlafenden Spezies“ (Intermediat) und der „aktiven Spezies“, der wachsenden Radikalkette ($P_n \cdot$), wodurch ein gleichmäßiges kontrolliertes Wachstum aller Polymerketten begünstigt wird. Aufgrund der vorherrschenden niedrigen Radikalkonzentration werden Abbruchreaktionen (Kinetik 2. Ordnung), durch Radikalrekombination oder Kettenübertragungsreaktionen gegenüber der Wachstumsreaktion (Kinetik 1. Ordnung) zurückgedrängt. Somit können über den kontrollierten – quasi-lebenden – Charakter der RAFT-Polymerisation eng verteilte Polymere mit Dispersitäten $< 1,3$ erhalten werden.^[7,8]

Zu den Verbindungsklassen der Kettentransferreagenzien in der RAFT-Polymerisation mit charakteristischer Thiocarbonylgruppe zählen Dithioester, Dithiocarbamate und Xanthogenate. Die chemische Struktur der Reste R und Z besitzt einen großen Einfluss bezüglich einer erfolgreichen RAFT-Polymerisation nach den beschriebenen Kriterien. Der Rest R sollte eine gute Abgangsgruppe darstellen und eine effiziente Wirkung als reinitiiertes Radikal für das jeweilige Monomer besitzen. Diese Eigenschaften werden durch sterische Faktoren, polare Effekte und Radikalstabilität der R-Gruppe beeinflusst. Insbesondere für die RAFT-Polymerisation von Methylmethacrylat (MMA) beeinflusst der Rest R in einer Reihe von Dithiobenzoaten als Kettentransferreagenzien in entscheidendem Maße den RAFT-Mechanismus. Eine effiziente Reinitiiierung von MMA-Monomeren ist ausschließlich mit Cumyl- oder Cyanoisopropylbasierten Resten (R) möglich.^[9] Deshalb haben sich für eine erfolgreiche RAFT-Polymerisation von Pentafluorphenylmethacrylat (PFMPA), aus der Klasse der Methacrylate, die Verwendung von 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)-sulfanyl)-pentansäure und dessen Derivate, als CTAs mit Cyanoisopropylgruppe etabliert.^[10] Die Z-Gruppe im CTA sollte eine aktivierende Wirkung auf die Thiocarbonylbindung ausüben, um eine Radikaladdition zu begünstigen. Gleichzeitig darf das gebildete Radikalintermediat aber nur soweit stabilisiert werden, dass eine anschließende Fragmentierung nach dem Mechanismus in Abbildung 1 stattfinden kann, ansonsten wird die Polymerisation verlangsamt oder gar inhibiert. Die Wahl der Z-Gruppe ist auch vom jeweiligen Monomer abhängig. Deshalb eignen sich für sehr reaktive Monomere, wie z. B. Vinylacetat Dithiocarbamate oder Xanthogenate als CTAs, die über mesomere Effekte der Stickstoff- bzw. Sauerstoffheteroatome den Doppelbindungscharakter der Thiocarbonylbindung schwächen. Damit wird die Affinität der Radikaladdition reduziert und die Fragmentierung des Intermediatradikals begünstigt. Im Umkehrschluss eignen sich für weniger reaktive Monomere, wie Methacrylate beispielsweise Dithioester als Kettentransferreagenzien.

Im Allgemeinen können über RAFT-Polymerisation multifunktionale Polymere hergestellt werden; zum einen über die Wahl der jeweiligen Monomere und zum anderen sind Endgruppenfunktionalisierungen durch die Auswahl der Z- und R-Gruppen im CTA möglich.^[9] Aber auch vielfältige polymeranaloge Reaktionen der Polymerseitenkette oder der Dithioesterendgruppe sind für RAFT-Polymere bekannt.^[11-14] Darüber hinaus können mittels RAFT-Polymerisation eine Vielzahl an Copolymeren synthetisiert werden, wie z. B. statistische (*random*)-, Gradienten-, Graft- und Blockcopolymer.^[15-17] Insbesondere die Darstellung von AB-Blockcopolymeren über die reinitiierbare CTA-Gruppe und sequentieller Monomerzugabe ist von großem Interesse. Aber auch komplexere Polymerarchitekturen, wie Sternpolymere^[18] bzw. dendritische Strukturen^[19,20] sind über RAFT-Polymerisation zugänglich.

1.1.1.1 Reaktivesterpolymere

Die Verwendung polymerer Reaktivester zur Darstellung multifunktionaler Polyamide hat neben der Peptidsynthese und den Materialwissenschaften auch die Polymersynthese für die Nanomedizin in hohem Maße bereichert.

Ringsdorf und Mitarbeiter^[21] sowie Ferruti et. al^[22] publizierten 1972 die Polymerisation von *N*-Hydrosuccinimid(NHS)-(meth)acrylaten (Abbildung 2A) als reaktive Vorläufer-Polymere zur Synthese von Poly(meth)acrylamiden, die über die direkte Polymerisation der entsprechenden (Meth)arylamid-Monomere nicht zugänglich waren. Weiterhin ermöglicht die polymeranaloge Umsetzung der Reaktivester mit nukleophilen Aminen unter milden Reaktionsbedingungen die Einführung unterschiedlichster Funktionalitäten, wie Fluoreszenzfarbstoffe, Ankergruppen, Zielstrukturen, Chelatoren o. ä. unter Erhalt des Polymerisationsgrades.^[23] Der Nachteil der beschriebenen NHS-Ester-Polymere ist deren eingeschränkte Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, wie DMF und DMSO.

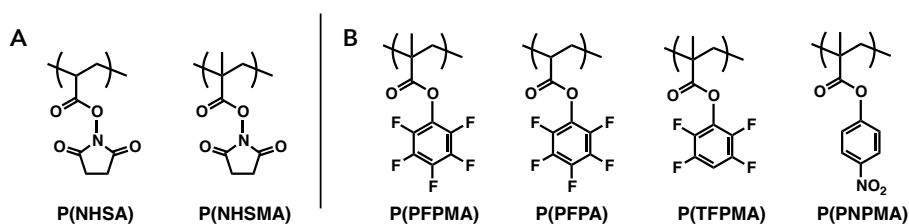


Abbildung 2. Reaktivesterpolymere. **A**) Poly(*N*-hydroxysuccinimid-(meth)acrylate). **B**) Poly(pentafluorophenyl(meth)acrylate), Poly(tetrafluorophenylmethacrylat) und Poly(*para*-nitrophenylmethacrylat).

Im Gegensatz dazu liefern die Reaktivestersysteme auf der Basis von Pentafluorphenyl(meth)acrylaten (PFP(M)A), Tetrafluorphenylmethacrylaten (TFPMA) oder *para*-Nitrophenylmethacrylaten (PNPMA) (Abbildung 2B) zum einen eine verbesserte Löslichkeit in vielen gängigen organischen Lösungsmitteln und zum anderen zeigen sie im Vergleich zu den NHS-Ester Vorläufern eine erhöhte Reaktivität.^[24] Einen weiteren Vorteil der fluorbasierten Reaktivesterpolymere bietet die mögliche analytische Charakterisierung der Polymerisation (Umsatzkontrolle) und auch der polymeranalogen Umsetzung über ¹⁹F-NMR-Spektroskopie.^[14] Neben den genannten Vorteilen der polymeren Reaktivester ist vor allem bei der Umsetzung der Poly(pentafluorphenylester) auf deren Hydrolyseempfindlichkeit zu achten. Um Nebenreaktionen dies betreffend zu vermeiden, sollte bei polymeranalogen Umsetzungen auf absolute Wasserfreiheit von Lösungsmitteln und Reagenzien geachtet werden.^[25]

Die Darstellung von P(PFPMA) über Methoden der kontrollierten radikalischen Polymerisation, wie z. B. der RAFT-Polymerisation, führt zu wohl definierten, reaktiven Vorläufer-Polymeren. Diese können erfolgreich über polymeranaloge Reaktionen zu multifunktionalen Poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylat) (P(HPMA)) Polymeren umgesetzt werden,^[14,17,26] die aufgrund ihrer biokompatiblen, hydrophilen Eigenschaften weitreichende Anwendung im Bereich der polymeren Therapeutika finden.^[27]

1.1.2 NCA-Polymerisation

Die Darstellung von Polypeptiden und Polypeptoiden aus den cyclischen *N*-Carboxyanhydriden (NCA) von α -Aminosäuren über ringöffnende Polymerisation (ROP) beruht auf der Entdeckung der Leuchs'schen Anhydride (Hermann Leuchs, 1906) und ihrer spontanen Polymerisation unter Einwirkung von Hitze.^[28] Deming und Mitarbeiter zeigten erstmals 1999 eine kontrollierte ringöffnende NCA-Polymerisation mit Übergangsmetall-basierten (Ni, Co) Initiatoren.^[29] Die lebende ringöffnende NCA-Polymerisation über den normalen Amin-Mechanismus (NAM) mit primären Amininitiatoren wurde von Schlaad und Mitarbeitern 2003^[30] beschrieben und über die Jahre weiterentwickelt (Abbildung 3).^[31,32] Durch geeignete Reaktionsbedingungen, wie niedrige Temperaturen, aprotische, absolutierte Lösungsmittel (DMF) und unter Verwendung von Reaktanden hoher Reinheit, lassen sich wohl definierte Polypeptide mit engen Molekulargewichtsverteilungen herstellen.^[33] Neben der Darstellung von Polypeptiden aus NCAs von α -Aminosäuren, können auch *N*-substituierte Glycin-*N*-Carboxyanhydride (NNCAs) über den NAM ringöffnend polymerisiert werden. Polysarkosin, das Polypeptoid der endogenen α -Aminosäure Sarkosin (*N*-Methylglycin) stellt aufgrund seiner biokompatiblen, hydrophilen und proteinabweisenden Eigenschaften^[34] eine gute Alternative zu PEG (Polyethylenglykol) als „stealth-like“ Polymer“ in der Nanomedizin dar.^[35,36]

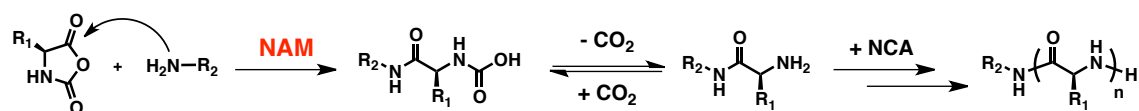


Abbildung 3. Ringöffnende Polymerisation von *N*-Carboxyanhydriden (NCA) über NAM (normaler Amin-Mechanismus).

Über sequentielle NCA-Polymerisation können mit Sarkosin-NCA und NCAs weiterer α -Aminosäuren wohl definierte Polypeptid-*block*-Polypeptoid Blockcopolymere hergestellt werden.^[35] Diese synthetischen Polypept(o)ide sind in Analogie zu natürlichen Proteinen biokompatibel, stabil in wässriger Lösung und darüber hinaus bioabbaubar bzw. metabolisierbar. Des Weiteren können über den Einsatz funktionaler Initiatoren und über polymeranaloge Modifikationen der Endgruppe α , ω -funktional-

lisierte Polymere erhalten werden. Die chemische Modifizierung der Aminosäureseitenketten ermöglicht die Einführung weiterer variabler Funktionalitäten innerhalb der pept(o)idische Blockcopolymere und machen diese zunehmend attraktiv als polymere Trägersysteme für den Wirkstofftransport in der Nanomedizin.

So führt die Selbstassemblierung von amphiphilen P(Sar)-*b*-P(Glu(OBn)) Blockcopolymeren in wässrigem Medium zur Ausbildung von Polymermizellen, die durch Einschluss hydrophober Wirkstoffe großes Potential als Drug-Delivery Systeme (DDS) aufweisen.^[35] Neben der Darstellung von polypept(o)idbasierten Vesikeln als *Imaging*-Plattform^[36], zeigen auch über NCA-Polymerisation synthetisierte zylindrische Bürstenpolymere mit Polylysinrückgrat und Polysarkosinseitenketten Anwendung als funktionale Wirkstoffträger, z. B. für den siRNA-Transport.^[37] Weiterhin finden über Ringöffnungspolymerisation hergestellte P(Sar)-*b*-P(Lys)^[38] bzw. PEG-*b*-P(Lys)^[39] Blockcopolymere mit kationischer Lysineinheit zur Komplexierung anionischer Nukleinsäuren großes Interesse als polymerbasierte Transfektionsagenzien in der Gentherapie (siehe Kapitel 1.2.2).

1.2 Nanopartikel-Basierte Tumorimmuntherapie

Das Immunsystem als körpereigenes Abwehrsystem hat die Aufgabe eingedrungene Pathogene, wie Bakterien oder Viren im Organismus zu erkennen und zu zerstören. Ein hoch komplexes System aus verschiedenen Immunzellen, Antikörpern und Immunorganen kann hochselektiv zwischen physiologischen und pathophysiologischen Situationen durch endogene oder exogene Signale unterscheiden und entsprechend reagieren.^[40] Infolgedessen ist das Immunsystem auch prinzipiell dazu befähigt, maligne Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren, was allerdings durch autoregulatorische Toleranzmechanismen unterdrückt wird.^[41,42]

Demzufolge bietet die Adressierung des Immunsystems anstelle des Tumors selbst eine attraktive, alternative Herangehensweise in der Krebstherapie.^[43] Während bei der klassischen Chemotherapie theoretisch jede einzelne Tumorzelle eliminiert werden muss, um ein Rezidiv auszuschließen, bedarf es bei der Tumorimmuntherapie einer Aktivierung von nur wenigen Tausend Zellen, um eine fundierte Anti-Tumorimmunantwort auszulösen.^[44,45] Ein bedeutender Vorteil der Tumorimmuntherapie liegt neben der Bekämpfung von malignen Zellen solider Tumore in der Adressierung von Metastasen, die in der konventionellen Tumorthherapie oft für einen mangelnden Therapieerfolg verantwortlich sind.^[42]

Die Anwendung von nanopartikulären Transportsystemen in der Tumorimmuntherapie erscheint aufgrund der vielfältigen Funktionalisierungsmöglichkeiten und des gegebenen Größenbereichs von einem bis mehreren hundert Nanometern in Analogie zu Viren oder bakteriellen Fragmenten sehr vielversprechend.^[46] Die Formulierung von Immunmodulatoren in Form von niedermolekularen Wirkstoffen, peptidbasierten bzw. mRNA-/pDNA-codierenden Antigenen oder immunstimulatorischen Oligonukleotiden in polymeren Trägersystemen kann einen effizienten und sicheren Transport gewährleisten. Der Einschluss von niedermolekularen hydrophoben Verbindungen in polymerbasierte Drug-Delivery Systeme (DDS) trägt vor allem zu einer verbesserten Löslichkeit der Wirkstoffe bei. Sensitive Moleküle, wie therapeutische Peptide und Nukleinsäuren können durch die Formulierung in funktionalen Nanopartikeln (vgl. Kapitel 1.2.2) vor enzymatischem Abbau und Aggregation mit Serumproteinen im Blutkreislauf geschützt werden. Prinzipiell verhindern die polymeren DDS aufgrund ihrer Größe eine schnelle renale Eliminierung der Wirkstoffe und führen zu verlängerten Blutzirkulationszeiten.^[47,48] Durch passive Effekte können sich die Systeme in den Lymphknoten anreichern^[49,50] und durch Anbindung von geeigneten Zielstrukturen kann eine selektive Adressierung der entsprechenden Immunzellpopulation erreicht werden (aktives Targeting, vgl. Kapitel 1.2.2.1).^[51,52]

Es besteht eine hohe strukturelle Vielfalt an nanodimensionalen Trägersystemen, die für den Wirkstofftransport unter anderem in die Tumorimmuntherapie eingesetzt werden können (siehe Abbildung 4).^[47]

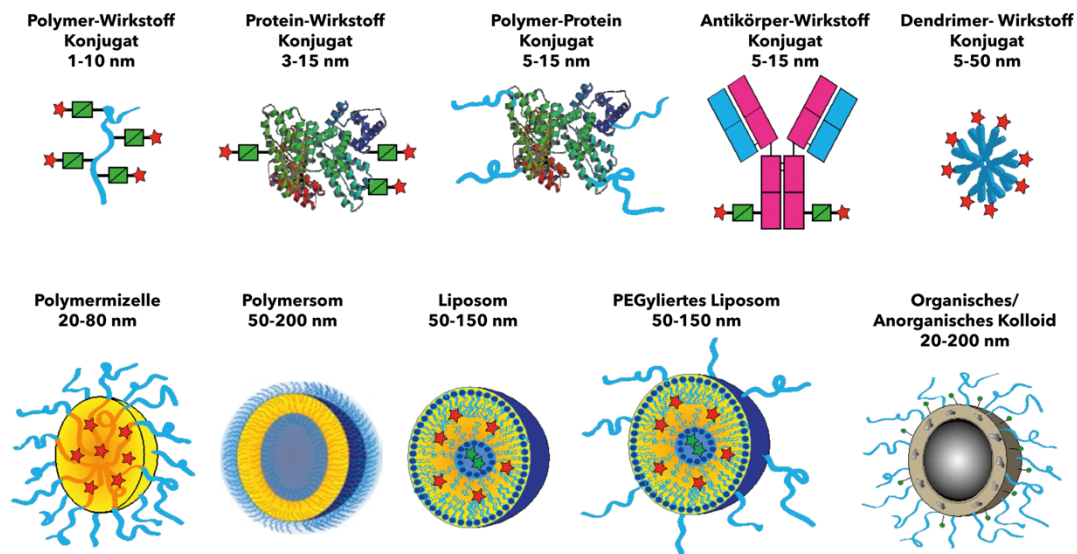


Abbildung 4. Verschiedene nanodimensionale Formulierungen mit durchschnittlichen Größen, modifiziert nach^[53].

Zum einen können Wirkstoffe kovalent an Polymere, Proteine, Antikörper oder Dendrimere angebunden werden, aber auch durch hydrophobe bzw. hydrophile Wechselwirkungen in Polymermizellen, Liposome oder kolloidale Strukturen eingelagert werden. Wie bereits erwähnt, spielt für die Tumorimmuntherapie vor allem der Transport von aktiven Biomolekülen, wie Peptiden und Nukleinsäuren mit immunmodulatorischen Eigenschaften eine wichtige Rolle.^[46,54] Die Komplexierung von sensibler pDNA und mRNA in kationischen polymerbasierten Transfektionsagenzien wird ausführlich in Kapitel 1.2.2 beschrieben.

Das Konzept der Nanopartikel-basierten Tumorimmuntherapie umfasst eine Kombination aus drei Strategien. Dies beinhaltet eine antigenspezifische Immunaktivierung (Vakzinierung), eine Aufhebung von Immuntoleranzmechanismen und die Induktion einer Tumorentzündung zur Rekrutierung von Immunzellen im Tumorgewebe. Eine erfolgreiche Therapie bei Hautkrebs (maligne Melanome) zur Aufhebung der Immuntoleranz gelang z. B. durch den Einsatz sogenannter Checkpoint-Inhibitoren. Dabei handelt es sich um monoklonale Antikörper (anti-CTLA-4: Ipilimumab® und anti-PD-1: Pembrolizumab®, Nivolumab®), die immunsuppressive T-Zell-Rezeptoren blockieren und dadurch eine tumorinduzierte T-Zell-Antwort über die Ausschüttung von Zytokinen (Interferon γ) möglich machen.^[55] Ebenfalls konnte über die Herabregulation der intrazellulären cyclischen Adenosinmonophosphat-Level (cAMP) in immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen mit Hilfe von niedermolekularen

Wirkstoffen eine CD4+ T-Zell-Aktivierung hervorgerufen werden, die über natürliche Killerzellen zur Bekämpfung von Tumorzellen führt.^[56] Großes Potential in der Immuntherapie zeigt der personalisierte T-Zell-basierte Therapieansatz des adoptiven Transfers von antigenspezifischen T-Zellen. Für die Behandlung von akuter lymphatischer Leukämie (ALL) wurden T-Zellen *ex vivo* zur Expression sogenannter chimärer Antigenrezeptoren (CARs) genetisch modifiziert. Diese CARs sind mit einem CD19-Antikörperfragment an intrazellulären T-Zell-Signaldomänen gekoppelt, wodurch sie nach der Transfusion in den Organismus zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) zellspezifisch zu CD19-exprimierenden ALL-Zellen dirigieren.^[57,58]

1.2.1 Anti-Tumorvakzinierung

Ein vielversprechender Ansatz in der Tumorimmuntherapie ist die Entwicklung Nanopartikel-basierter Vakzine (Nanovakzine) für eine spezifische Aktivierung des Immunsystems gegen den Tumor.^[43,46,59] Dies umfasst den Transport tumorassoziierter Antigene (TAA) zu antigenpräsentierenden Immunzellen, bevorzugt dendritische Zellen (DCs), die über zusätzliche Immunaktivatoren (Adjuvantien) eine T-Zell-vermittelte Anti-Tumorimmunität induzieren können.

Prinzipiell können neben peptidischen Antigenen auch DNA-basierte Vakzine verwendet werden.^[60,61] Letztere werden meist in Form von zirkulärer Plasmid-DNA (pDNA) eingesetzt und codieren für TAA. Hier besteht zusätzlich die Möglichkeit einen DC-spezifischen Fascin-Promotor^[62] in das Genkonstrukt einzuklonieren, der nach Zellaufnahme ausschließlich in DCs abgelesen werden kann und somit eine zusätzliche DC-Spezifität generiert. Weiterhin können auch immunstimulatorische CpG-reiche Sequenzen^[63] im pDNA-Vektor codiert sein. Analog zu einem Codelivery-Prozess von Peptidantigen und Adjuvans zusammen in einer nanodimensionalen Formulierung führt eine zeitgleiche Anreicherung beider Komponenten in der Zelle zu einer optimalen Immunaktivierung.

Ein weiterer Vorteil von pDNA-basierten Vakzinen ist die langfristige Persistenz des Antigens im Körper. Nach erfolgreicher Transfektion, also der Aufnahme des pDNA-Vektors in die Zelle und nachfolgender Transkription und Translation des Gens, wird das Antigen für einige Wochen kontinuierlich exprimiert, sodass die gewünschte Anti-Tumorimmunantwort ausgelöst werden kann.^[64] Somit kann pDNA-basierten Vakzinen ein großes Potential für eine erfolgreiche Aktivierung des Immunsystems in der Tumorimmuntherapie zugesprochen werden.

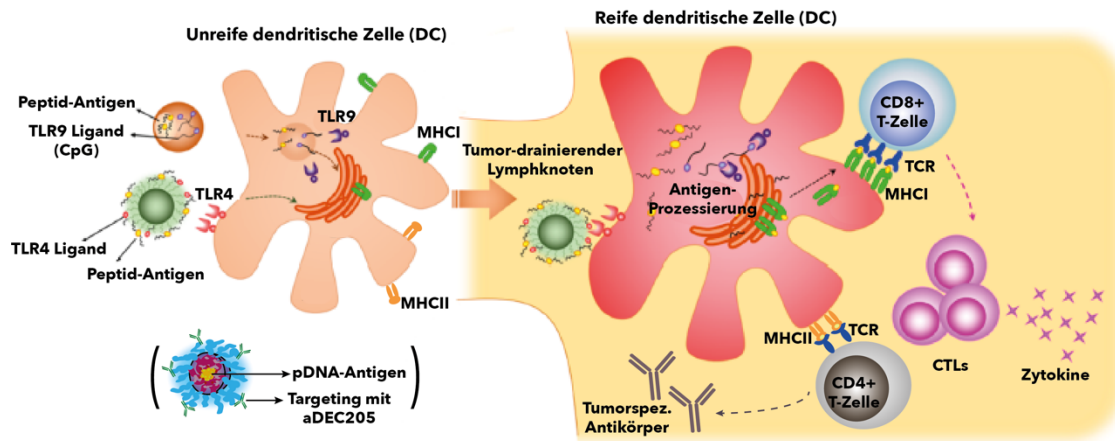


Abbildung 5. Tumorummuntherapie mit Nanopartikel-basierten Anti-Tumorstoffen, modifiziert nach^[46].

Die mechanistische Betrachtung der Nanopartikel-basierten Anti-Tumorstoffe auf zellulärer bzw. molekularer Ebene ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt. Peptidbasierte Antigene und immunstimulatorische Adjuvantien können an einen polymeren Träger konjugiert bzw. in Kern-Schale-Strukturen (vgl. Abbildung 4) eingelagert werden.^[46] Die strukturellen und funktionalen Anforderungen an polymere Transfektionsagenzien für pDNA-Vakzine werden ausführlich in Kapitel 1.2.2 beschrieben.

Eine selektive Adressierung von dendritischen Immunzellen kann über die Funktionalisierung der Nanopartikel mit Zielstrukturen, wie z. B. Mannose^{[51][65]} oder DEC205-Antikörpern^[52,66-68] erzielt werden, die selektiv an den gleichnamigen C-Typ-Lektin-Rezeptor auf CD8+ DCs binden. Die Zellaufnahme des Nanovakzins erfolgt über diffusionsgesteuerte bzw. rezeptorvermittelte Endozytose mit Transmembranrezeptoren, wie DEC205^[52] oder TLR4-Rezeptoren^[69,70] (*Toll-like receptor*). Liganden des TLR4-Rezeptors sind Lipopolysaccharide und virale und endogene Proteine, die im Allgemeinen durch die Rezeptorbindung zu einer Aktivierung des Immunsystems führen. Im Fall der pDNA-Vakzine wird das Genkonstrukt im Zellkern in Messenger-RNA transkribiert und anschließend im Zytosol in das proteinogene Antigen translatiert. Die peptidischen Antigene werden prozessiert und Antigenfragmente in sogenannten *major histocompatibility*-Komplexen (MHC) auf der DC-Oberfläche den T-Zellen präsentiert (vgl. Abbildung 5). Die neben den Antigenen transportierten Adjuvantien, wie z. B. CpG-Oligonukleotide, binden als TLR9-Liganden^[71] an die gleichnamigen intrazellulären Rezeptoren, die bevorzugt in antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden und analog zu TLR4-Liganden eine Immunaktivierung bewirken. Im Allgemeinen führt die Aufnahme des Vakzins mit zusätzlichen immunstimulatorischen Adjuvantien zu einer Reifung der dendritischen Zelle und hat eine Wanderung in tumordrainierende Lymphknoten (TDLN) zur Folge (vgl. Abbildung 5).^[72] Die Antigenfragmente werden nach dem klassischen Signalweg für exogene Antigene in MHCII-Komplexen CD4+ T-Zellen präsentiert und generieren eine antigenspezifische

Antikörperproduktion. Die gattungsübergreifende Präsentation (*cross presentation*) der Antigen-fragmente in MHCI-Komplexen für CD8+ T-Zellen, bewirkt eine Differenzierung CD8+ T-Zellen in zytotoxische T-Zellen (CTLs), die über die Freisetzung von Zytokinen eine adaptive Anti-Tumorimmunantwort auslösen können.^[73]

Zahlreiche Studien von Nanopartikel-basierten Vakzinen mit Ovalbumin als Modellantigen und TLR9-Liganden (CpG) als Adjuvantien im Melanom-Tumormodell zeigten erfolgreiche T-Zell-induzierte Anti-Tumorimmunantworten.^[46] Die Auswahl nanodimensionaler Träger ist vielfältig und beinhaltet u. a. Eisenoxidpartikel^[74], Liposome^[71], Lipid-Calciumphosphat (LCP)-Partikel und Liposom-Protamin-Hyaluronsäurepartikel,^[75] Polymermizellen auf Methacrylatbasis (Dimethylaminoethylmethacrylat, Butylmethacrylat)^[76] oder auch Polyglutaminsäurepartikel.^[77]

1.2.2 Polymere Transfektionsagenzien

Viren sind von Natur aus hocheffiziente Transportsysteme für Nukleinsäuren, wie DNA und RNA. Ihre äußere Hülle besteht aus komplexen Kapsidproteinen, die essentielle Funktionen beim Transport und der Freisetzung der Nukleinsäure in die Wirtszelle besitzen.^[78,79] Dennoch birgt die therapeutische Anwendung von rekombinanten Viren in der Gentherapie aufgrund ihrer immunogenen Wirkung ein hohes klinisches Risiko und ist daher limitiert.^[80] Somit liegt ein großer Forschungsschwerpunkt auf der Entwicklung polymerbasierter, nicht-viraler Transfektionsvektoren für Nukleinsäuren, beispielsweise als Anti-Tumorvakzine in der Immuntherapie (vgl. Kapitel 1.2.1). Die hohe chemische Flexibilität in der Darstellung solcher Systeme erlaubt die Einführung diverser Funktionalitäten, die für einen sicheren und effizienten Nukleinsäuretransport erforderlich sind (Abbildung 6).^[54,81,82]

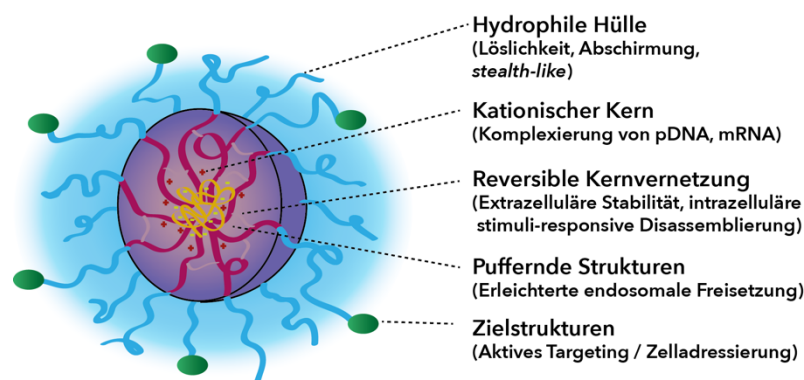


Abbildung 6. Struktureller Aufbau polymerer Transfektionsagenzien.

Einer der wichtigsten Aspekte ist der Schutz der Nukleinsäure vor hydrolytischem und enzymatischem Abbau während des Transports durch den Blutstrom bei

systemischer Gabe. Dies kann durch eine stabile Komplexierung von polyanionischer Plasmid-DNA (pDNA) bzw. Messenger-RNA (mRNA) mit kationischen Gruppen im polymeren Vektor erzielt werden. Die Ausbildung solcher Polyionenkomplexe (Polyplexe) in wässrigem Medium beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen und ist entropisch durch die Freisetzung kleiner Gegenionen begünstigt. Während der Polyplexbildung mit pDNA kommt es zu einer Konformationsänderung der rigiden, ausgedehnten pDNA zu einer globulären Form, die als DNA-Kondensation bezeichnet wird. Die überschüssige positive Ladung im Polyplex kann durch Wechselwirkungen mit negativ geladenen Bestandteilen von Zellmembranen zum einen die Zellaufnahme begünstigen und zum anderen die endosomale Freisetzung fördern. Dennoch kann die positive Ladung beim Polyplextransport durch den Blutstrom zu unspezifischen Wechselwirkungen mit Serumproteinen führen, die eine unerwünschte Dissoziation des Polyplexes oder eine Aggregation mit nachfolgender Embolisation der Gefäße bewirken können. Um dies zu umgehen, bedarf es einer hydrophilen Hülle mit „stealth-Eigenschaften“ innerhalb des polymeren Trägersystems, die die überschüssige kationische Ladung des Polyplexes nach Außen abschirmt (siehe Abbildung 6).

Einige pDNA-Vektoren auf der Basis von Blockcopolymeren, wie beispielsweise Poly-L-lysin-*b*-Polyethylenglykol^[83-85], Poly-L-lysin-*b*-Polysarkosin^[38,86] oder Poly-L-lysin-*b*-Poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylat)^[87,88] zeigten bereits großes Potential als Transfektionsagenzien. Zur Darstellung von biokompatiblen, nicht toxischen polymerbasierten Trägersystemen für Nukleinsäuren, bietet sich Polyethylenglykol (PEG)^[27,89] als etabliertes Polymer im Wirkstofftransport oder alternativ Polysarkosin (PSar)^[34] als hydrophiler, nicht-ionischer Block zur Abschirmung der Polyplexe an. Auch biokompatibles Poly(HPMA) eignet sich aufgrund seiner geringen Immunogenität^[90,91] als hydrophile Hülle und zeigte bereits vielfältige Anwendungen auf dem Gebiet des polymerbasierten Wirkstofftransports,^[92,93,48,94] unter anderem in der Anti-Tumorvaksinierung.^[95]

Als Polykation können Poly(dimethylamionoethylmethacrylat) (P(DMEAMA))^[96], Poly-/Oligoethylenimin (PEI)^[97,98] oder Polyaminosäuren, wie Poly-L-lysin (PLys)^[83], Poly-L-arginin (PArg-Derivate)^[99] und Poly-L-aspartat (PAsp-Derivate)^[54] eingesetzt werden, die über die Protonierung der jeweiligen primären, sekundären oder tertiären Amine zur pDNA-Komplexierung befähigt sind. Die allgemeine zytotoxische Wirkung von Polykationen ist vom jeweiligen Molekulargewicht bzw. von der Anzahl an positiven Ladungen pro Molekül abhängig. Somit erscheint es sinnvoll, bei der Entwicklung polymerer Transfektionsagenzien bioabbaubare kationische Strukturen, wie z. B. Polyaminosäuren (PLys, PArg) zu verwenden, die durch einen enzymatischen Abbau in Oligomere bzw. in die jeweilige endogene Aminosäure eine kumulative Toxizität bei Mehrfachgabe minimieren.

Nachdem der extrazelluläre Transport der therapeutischen Nukleinsäure durch die funktionale Kern-Schale-Struktur der beschriebenen Blockcopolymeren sichergestellt werden kann, ist der wichtigste Schritt für eine effiziente Transfektion die endosomale Freisetzung des Polyplexes bzw. der pDNA ins Zellinnere (siehe Abbildung 7).^[54] Nach erfolgreicher Zellaufnahme der Polyplexe über adsorptive Endozytose bzw. bei Verwendung von Zielstrukturen über rezeptor-vermittelte Endozytose gelangt der Partikel in einem klassischen physiologischen Prozess über endosomale Kompartimente zum enzymatischen Verdau ins Lysosom. Um den vorbestimmten lysosomalen Abbau zu umgehen, muss der Polyplex erfolgreich aus dem Endosom freigesetzt werden. Der vorherrschende pH-Gradient von pH 7,4 im Extrazellulärraum über pH 6,2-6,8 im frühen Endosom^[100] zu pH 5,0-5,5 im späten Endosom^[101] führt bei virusbasierten Vektoren zu einer Konformationsänderung einiger viraler Proteine, die über verstärkte hydrophobe Wechselwirkungen mit der Endosomenmembran eine Membranruptur oder Fusion bewirken können.^[102,103] Neben der Verwendung solcher Fusionspeptide erzielt der Einbau von endosomolytisch-aktiven Gruppen ebenfalls eine verbesserte endosomale Freisetzung der Polyplexe. Die Protonierung von pH-puffernden sekundären und tertiären Aminen im acidifizierten Endosom führt zu einer elektrostatischen Wechselwirkung mit der Endosomenmembran und löst zusammen mit dem sogenannten *Proton-Sponge-Effekt*^[104] aus. Dabei kommt es durch den Einstrom von Chlorid-Ionen und Wasser zum Anstieg des osmotischen Drucks innerhalb des Endosoms und führt schließlich zu einer Membranruptur (vgl. Abbildung 7). Beispiele für solche endosomolytisch-aktiven Gruppen mit pH-Puffer-Kapazität von Aminen mit niedrigen pKs-Werten sind PEI^[105], Polyamidoamine (PAMAM)^[106], Polyhistidin mit Imidazoleseitenkette bzw. histidinmodifizierte Strukturen^[107] oder histidinreiche Peptide, wie z. B. LAH4-L1 Peptide.^[108,109]

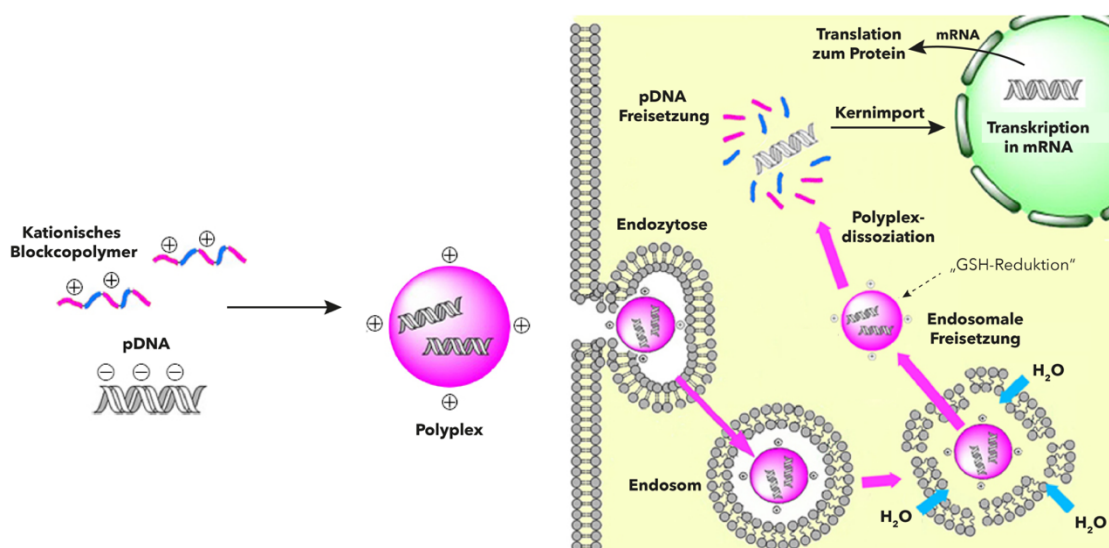


Abbildung 7. Biologische Barrieren beim (intra)zellulären Transport von pDNA-Polyplexen, modifiziert nach^[110].

Die chemische Modifizierung der polymerbasierten Vektoren mit stimuli-responsiven Gruppen bietet eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Transfektionseffizienz und zur Minimierung der Toxizität (siehe Abbildung 6).^[54] Sowohl der pH-Gradient in den endosomalen Kompartimenten, als auch das gesteigerte Reduktionspotential im Intrazellularraum durch eine 50-1000-fach höhere Glutathionkonzentration (GSH)^[111] können genutzt werden, um z. B. säurelabile Hydrazone^[112] und Acetale^[113,114] bzw. redoxaktive Disulfide^[86,88,115-118] zu spalten. Die saure Hydrolyse von Hydrazonen oder Acetalen im Endosom kann eine Disassemblierung bzw. einen partiellen Abbau des polymeren Trägers zur Folge haben, der die endosomale Freisetzung des Polyplexes bzw. der pDNA verbessern kann. Neben dem Einbau von stimuli-responsiven Gruppen zwischen kationischem und abschirmendem Segment, kann die Funktionalisierung auch über reversible Kernvernetzung erfolgen.

Zum einen führt die reversible Disulfidvernetzung im kationischen Kern zur verbesserten extrazellulären Stabilität der Polyplexe.^[119,120] Zum anderen kann eine geringere Toxizität der Systeme und eine effizientere pDNA-Freisetzung durch die GSH-vermittelte Spaltung der Disulfidgruppen im Polyplex erreicht werden, die mit einem Abbau bzw. der Dissoziation des Systems verbunden sind (vgl. Abbildung 7).^[121,122]

Nach der endosomalen Freisetzung der pDNA bzw. des Polyplexes in das Zytosol, gilt es, die nächste biologische Barriere, die Kernmembran, zu überwinden, um die Transkription der genetischen Information der pDNA in mRNA im Zellkern zu gewährleisten (vgl. Abbildung 7). Physiologische Translokationsprozesse erfolgen bei kleinen Proteinen von 2 nm bzw. bis 40 kDa über Diffusion durch die Kernporen. Größere Proteine besitzen eine Kernlokalisationssequenz (NLS) aus wenigen Aminosäuren und gelangen mit Hilfe von Transportproteinen (Importinen) in den Zellkern. Viren schleusen ihre Fremd-DNA durch Wechselwirkungen von viralen Proteinen mit solchen nukleären Transportproteinen in den Zellkern ein.

Polyplexen zwischen 100-200 nm ist der Eintritt in den Zellkern über Diffusion durch die Kernporen aufgrund ihrer Größe nicht möglich. Somit findet die nukleäre Translokation bei erfolgreicher Transfektion wahrscheinlich während der Zellteilung statt, in der die Barrierefunktion der Kernmembran vorübergehend aufgelöst wird.^[54] Einige Ansätze für einen unterstützenden Kernimport beinhalten die Funktionalisierung des polymeren Vektors mit NLS-Peptiden^[123,124] oder auch mit regulatorischen Peptiden, die an der Zellteilung beteiligt sind.^[125] Entscheidend für eine erfolgreiche Transfektion ist die Freisetzung der pDNA aus dem Polyionenkomplex, idealerweise nach dem Eintritt in den Zellkern, wenn diese nicht bereits im Zytosol stattgefunden hat (vgl. Abbildung 7). Durch Wechselwirkungen mit geladenen Biomolekülen, wie Proteinen oder mRNA im Zellkern kann die pDNA über Dissoziation des Polyplexes freigesetzt und anschließend transkribiert werden. Um den anspruchsvollen Kernimport bei pDNA-Polyplexen zu umgehen, bietet die Transfektion mit therapeutischer

mRNA^[126,127] einen alternativen Ansatz für den Gentransfer, da die Translation der mRNA direkt nach endosomaler Freisetzung im Zytosol stattfinden kann.

1.2.2.1 Targeting für Polymere Transfektionsagenzien

Im Rahmen der Tumorthherapie können sich polymerbasierte Transfektionsagenzien nach Komplexierung der Nukleinsäure aufgrund ihrer Größe zwischen 100-200 nm als nanopartikuläre Strukturen im Tumorgewebe passiv anreichern. Die allgemeine Akkumulation nanodimensionaler Therapeutika in hypervaskularisiertem Tumorgewebe wurde erstmals 1986 von Matsumura und Maeda als EPR-Effekt (*enhanced permeability and retention effect*) beschrieben.^[128,129] Wie in Abbildung 8A dargestellt, führt die schnelle, unkontrollierte Ausbildung neuer Blutgefäße, um den Tumor mit ausreichend Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen, zu fenestrierten Kapillargefäßen des Tumorendothels, die für Nanopartikel durchlässig sind. Während kleine Wirkstoffmoleküle leicht in das Tumorgewebe ein und wieder ausdiffundieren können, gelangen Partikel von einigen hundert Nanometern durch die permeablen Gefäße in das Tumorinterstitium und reichern sich dort aufgrund mangelnder Lymphdrainage an. Das Konzept des passiven Targetings über den EPR-Effekt kann eine tumorspezifische Anreicherung niedermolekularer Zytostatika über nanodimensionale Formulierungen bewirken und damit deren Zytotoxizität für umliegendes Gewebe reduzieren.^[130] Dennoch zeigten sich in der klinischen Praxis Einschränkungen für die Anreicherung nanodimensionaler Therapeutika über den EPR-Effekt. Dies liegt zum einen in der heterogenen Beschaffenheit der Tumore selbst begründet und zum anderen kann die Ausprägung des EPR-Effekts von Patient zu Patient variieren.^[130,131]

Im Vergleich zur passiven Wirkstoffanreicherung bietet das Konzept des aktiven Targetings die Möglichkeit des selektiven Wirkstofftransports für eine spezifische Adressierung eines Zielgewebes bzw. einer Zellpopulation. Die Funktionalisierung von Nanopartikeln mit geeigneten Zielstrukturen (Liganden) führt über spezifische Wechselwirkungen mit entsprechenden Oberflächenrezeptoren auf den Zielzellen zu einer zellspezifischen Aufnahme.^[130,132] Die Auswahl an geeigneten Zielstrukturen hängt direkt von verfügbaren Oberflächenrezeptoren des jeweiligen Zielgewebes ab und zeigt eine hohe strukturelle Vielfalt.

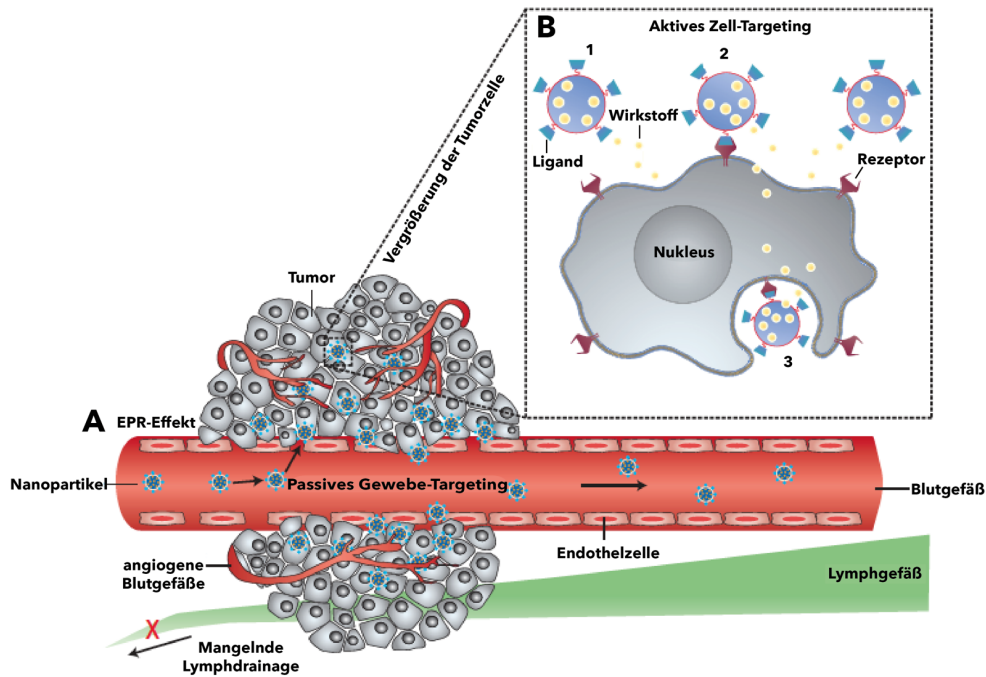


Abbildung 8. **A)** Passives Tumorgewebe-Targeting über den EPR-Effekt. **B)** Aktives Zell-Targeting über Liganden, modifiziert nach^[132].

Im Bereich der polymeren Transfektionsagenzien wurden Polyplexe mit niedermolekularen Verbindungen, wie z. B. Folsäure^[133,134] oder auch mit dem eisenbindenden Glykoprotein Transferrin^[135,136] zum Targeting von Tumorzellen modifiziert. Die Anbindung von einfachen Zuckermolekülen, wie Galaktosederivaten^[137,138] oder Laktose^[139] an DNA- und RNA-Polyplexe zeigte eine verbesserte Transfektion über aktives Leber-Targeting. Beispiele für den Einsatz von Antikörpern als Zielstrukturen in Transfektionsansätzen sind z. B. die Anbindung von anti-HER2-Antikörpern (Trastuzumab)^[140] gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER2 in der Tumor-Gen-therapie oder die Funktionalisierung von PEI-basierten Polyplexen mit anti-PECAM-Antikörper^[141] zum Targeting der Lunge.

In Abbildung 8B sind die möglichen Mechanismen der zellulären Wirkstofffreisetzung über aktives Targeting von nanodimensionalen Formulierungen im Allgemeinen dargestellt. Zum einen kann der Wirkstoff nach passiver Anreicherung des Nanopartikels in unmittelbarer Nähe der Zielzelle freigesetzt werden (1) oder durch Ligand-Rezeptor-Bindung an der Zellmembran andocken und den Wirkstoff stetig aus dem Trägersystem als extrazelluläres Depot abgeben (2). Die dritte und wichtigste Option der Wirkstofffreisetzung stellt die rezeptorvermittelte Endozytose dar (3).^[132] Eine wichtige Voraussetzung für ein erfolgreiches aktives Targeting ist eine ausreichend lange Blutzirkulationszeit der Konjugate, um eine Anreicherung im Zielgewebe für die nötige Proximität zwischen Ligand und Rezeptor zu erzeugen. Darüber hinaus sollten

die Oberflächenrezeptoren selektiv und in ausreichender Anzahl auf den Zielzellen exprimiert werden.^[130]

Das Konzept des aktiven Targetings ist vor allem für die Tumorthherapie von großem Interesse. In der Behandlung von Krebserkrankungen über klassische Chemotherapie ist die therapeutische Breite aufgrund der hohen systemischen Toxizität der Zytostatika nur sehr gering.^[142] Mit Hilfe von geeigneten Zielstrukturen, die entweder direkt an den Wirkstoff angebunden sind, wie bei Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (ADCs)^[143] (vgl. Kapitel 1.3.3), oder die auf der Oberfläche von nanodimensionalen Formulierungen konjugiert sind, kann eine zellspezifische Aufnahme durch selektive Adressierung von Tumorzellen erzielt werden. Die dadurch verminderte systemische Toxizität für umliegende Zellen ermöglicht eine Erhöhung der maximal tolerierten Dosis (MTD) des Wirkstoffs und resultiert in einem verbesserten therapeutischen Index.^[142]

Insbesondere für die Anwendung von polymeren Transfektionsagenzien in der Immuntherapie als Anti-Tumorvakzine ist eine zellspezifische Adressierung von dendritischen Immunzellen (DCs) erforderlich (vgl. Kapitel 1.2). Die Aktivierung des körpereigenen Immunsystems mit pDNA- bzw. mRNA-Vakzinen gegen spezifische Tumorantigene erfordert die selektive Transfektion von antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritische Immunzellen. Ein vielversprechender Ansatz im DC-Targeting ist die Funktionalisierung von Nanopartikeln mit dem Einfachzucker Mannose als Zielstruktur.^[51,65] Dennoch ist die Adressierung des Mannoserezeptors aufgrund der bedingten Selektivität für DCs bei systemischer Anwendung der Therapeutika limitiert. Deshalb eignen sich insbesondere zum Targeting von CD8⁺ DCs DEC205-Antikörper, die an den gleichnamigen Rezeptor auf der DC-Zelloberfläche binden (vgl. Kapitel 1.2.1).^[52,68,66,67] Im Allgemeinen bieten Antikörper und auch Antikörperfragmente aufgrund ihrer selektiven, hochaffinen Rezeptorbindung große Vorteile gegenüber anderen Zielstrukturen (vgl. Kapitel 1.3.3).^[142]

Das aktive Targeting beim Polyplex-Transport von therapeutischen Nukleinsäuren bewirkt neben einer verminderten Toxizität durch die hervorgerufene Zellselektivität ebenfalls eine gesteigerte Transfektionseffizienz durch die vereinfachte Zellaufnahme über rezeptor-vermittelte Endozytose (vgl. Abbildung 8B).^[144,145] Neben der Funktionalisierung von Transfektionsagenzien mit Zielstrukturen, bietet das Konzept des transkriptionellen Targetings eine weitere Möglichkeit die Selektivität im Transfektionsprozess zu regulieren. Dies kann durch das Einklonieren einer Promotorsequenz in das pDNA-Konstrukt erfolgen, die ausschließlich zellspezifisch abgelesen werden kann. Somit konnte bei der Vakzinierung von DCs eine Selektivität in der Transkription über den Einbau des Fascin-Gen Promotors erzielt werden.^[62]

Zusammenfassend bietet das Konzept der polymerbasierten Transfektionsagenzien eine hohe chemische Flexibilität für zahlreiche Funktionalisierungen, um einen sicheren und effizienten Transport der therapeutischen Nukleinsäure zu gewährleisten. Neben dem Schutz der sensitiven pDNA bzw. mRNA in einem Polyionenkomplex mit ladungsabschirmender Polymerhülle, können stimuli-responsive Gruppen die endosomale Freisetzung unterstützen oder auch die Polyplexdissoziation zur Freisetzung der Nukleinsäure fördern. Die Translokation von pDNA-Polyplexen in den Zellkern stellt hohe Anforderungen an das Transfektionssystem und kann durch die Anbindung von Signalmolekülen begünstigt werden. Die Modifizierung der Polyplexoberfläche mit geeigneten Zielstrukturen sorgt über das Konzept des aktiven Targetings für eine zell- bzw. gewebsspezifische Adressierung der Systeme und resultiert in verminderter Toxizität und gesteigerter Transfektionseffizienz über die rezeptorvermittelte Zellaufnahme.

1.3 Immunglobulin G – IgG-Antikörper

IgG-Antikörper dienen zur Abwehr von körperfremden Stoffen, wie Bakterien oder Viren und sind damit Teil der humoralen Immunantwort von höheren Lebewesen.^[40] Ein Erreger präsentiert besondere Strukturmerkmale (Antigene) auf seiner Oberfläche, die von B-Lymphozyten erkannt werden können und folglich eine Proliferation und Differenzierung von B-Zellen in Plasmazellen bewirken. Diese produzieren antigenspezifische Antikörper zur Opsonisierung des Antigens für eine anschließende Eliminierung des Erregers über Effektorzellen, wie natürliche Killerzellen, Makrophagen und Granulozyten.

Die hohe Flexibilität in der kommerziellen Herstellung von IgG-Antikörpern gegen nahezu jedes Antigen mit hochspezifischer Bindungsaffinität ermöglicht die vielfältige Anwendung als therapeutische Antikörper in der Immuntherapie.^[146,147] Dies beinhaltet unter anderem die Anwendung von IgG-Antikörpern bei der klassischen passiven Immunisierung (Vakzinierung) gegen Infektionskrankheiten oder z. B. bei entzündlichen Krankheitsbildern, wie rheumatoider Arthritis als TNF α -Blocker (Infliximab).^[148] Weiterhin können therapeutische Antikörper beispielsweise als Thrombozytenaggregationshemmer (Abciximab)^[149] bei Herz-Kreislaufkrankungen eingesetzt werden oder als sogenannte Checkpoint-Inhibitoren (anti-PD1-1, anti-CTLA-4)^[55] in der Krebsimmuntherapie eine Aufhebung der T-Zell-vermittelten Immunsuppression bewirken (vgl. Kapitel 1.2).

Neben der biochemischen Anwendung von IgG-Antikörpern zur Zelldepletion oder Immunfärbung, kann den Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (*antibody-drug conjugates*, ADCs) mit Antikörpern als Zielstrukturen vor allem in der Tumorthherapie großes Potential zugeschrieben werden.^[150-152] So ermöglicht die kovalente Anbindung eines zelltoxischen Zytostatikums an einen Antikörper über das Konzept des aktiven Targetings die selektive Adressierung von Tumorzellen (vgl. Kapitel 1.2.2.1).

Auch in der Diagnostik können Antikörperkonjugate in Form von radioaktiv markierten Antikörpern (Radioimmunkonjugate) mit anschließender Positronen-Emissions-Tomographie (PET),^[153] z. B. zur Überwachung von Therapieverläufen in der Tumorthherapie eingesetzt werden.

1.3.1 IgG-Aufbau und Herstellungsverfahren

In Abbildung 9A ist der charakteristische Y-förmige Aufbau eines IgG-Antikörpers dargestellt.^[154] IgG-Antikörper bestehen aus zwei identischen langen (schweren) Proteinketten von jeweils ~ 50 kDa und zwei kurzen (leichten) Ketten von jeweils ~ 25 kDa. Es besteht eine kovalente Verknüpfung über Disulfidbrücken der beiden

schweren Ketten innerhalb der Gelenkregion und jeweils zwischen schwerer und leichter Kette im Fab-Teil (*fragment, antigen binding*). Daraus ergibt sich ein typisches Molekulargewicht von ca. 150 kDa für IgG-Antikörper.

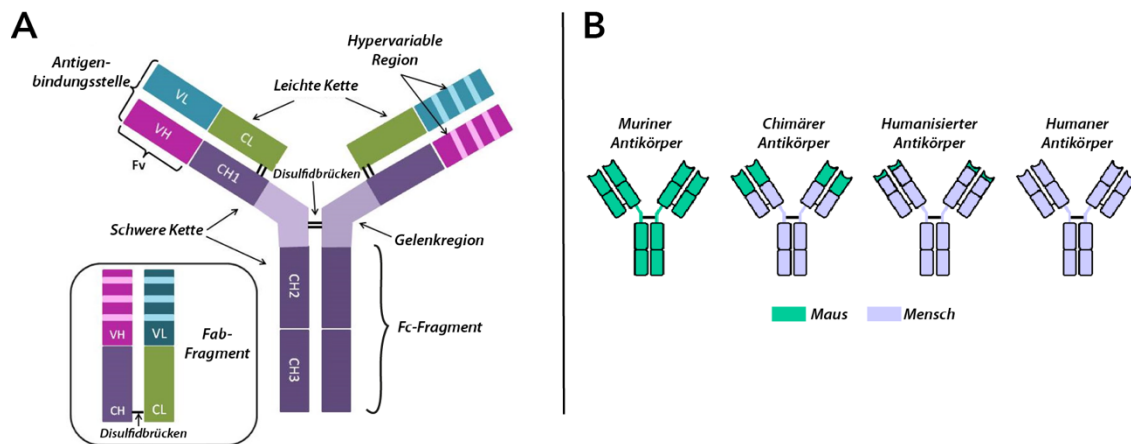


Abbildung 9. **A)** Struktureller Aufbau eines IgG-Antikörpers, modifiziert nach^[155]. **B)** Antikörperhybride, modifiziert nach^[156].

Die leichte Kette ist aus einem variablen (VL: *variable/light*) und einem konstanten Segment (CL: *constant/light*) aufgebaut, wohingegen die schwere Kette aus einem variablen (VH: *variable/heavy*) und drei konstanten Segmenten (CH1-CH3: *constant/heavy*) besteht. Die variablen Abschnitte beider Ketten (Fv: *fragment variable*) bilden die hochspezifischen Antigenbindungsstellen, die über hypervariable Regionen, die sogenannten CDRs (*complementarity-determining regions*), verfügen. Diese Hypervariabilität von 10^6 - 10^9 möglichen verschiedenen Antigenbindungsstellen beruht auf genetischen Rekombinationsprozessen.^[157] Die hochspezifische Antigen-Antikörper Reaktion basiert auf Wechselwirkungen zwischen dem Epitop des Antigens und dem Paratop des Antikörpers. Die Gelenkregion verbindet den Fab-Teil mit dem Fc-Fragment (*fragment, crystallizable*), bestehend aus CH2 und CH3, und sorgt für eine hohe Flexibilität des Antikörpers. Der Fc-Teil mit der konservierten Glykosylierungsposition am Asparaginrest 295 (N295) ist für die Bindung verschiedener Effektorproteine (FcγRIIb, FcγRIIIa, C1q und FcRn) verantwortlich, die zum Auslösen diverser Effektorfunktionen führen.^[158,159] So kommt es z. B. durch Bindung von zellgebundenem C1q-Protein zur Aktivierung der Komplementkaskade, die über CDC-Mechanismen (*complement-dependent cytotoxicity mechanisms*) zur Eliminierung von Pathogenen genutzt wird. Andererseits kann die Bindung von Fcγ-Rezeptoren im Fc-Teil zu Entzündungen über ADCC-Mechanismen (*antibody dependant cell-mediated cytotoxicity mechanisms*) der targetierten Zelle führen. Darüber hinaus wird über den Fc-Teil des Antikörpers dessen Stabilität und folglich dessen Zirkulationszeit im Blut gesteuert. Somit können im therapeutischen Kontext strukturelle Modifikationen im Fc-Teil, wie beispielsweise Änderungen am Glykosylierungsmuster, die Funktion

des IgG-Antikörpers in Bezug auf Effektorfunktionen und Zirkulationszeiten beeinflussen.^[160,161]

Die Herstellung monoklonaler Antikörper für klinische und therapeutische Zwecke gelingt über die von C. Milstein und G. Köhler im Jahre 1975 entwickelte Hybridom-Technik.^[162] Dabei werden Mäuse mit Antigenen immunisiert und die antikörperproduzierenden B-Lymphozyten aus der Milz gewonnen. Diese werden mit Myelomzellen fusioniert, wobei die Eigenschaften aus spezifischer Antikörperproduktion der B-Zellen mit unbegrenztem Wachstum der Myelomzellen vereinigt werden. Nach der Selektion geeigneter Hybridomzelllinien können diese *in vitro* oder *in vivo* zur antigenspezifischen Antikörperproduktion genutzt werden. Da murine Antikörper in der Therapie im menschlichen Organismus oft selbst eine antigene Wirkung haben können, spielt die Entwicklung von chimären, humanisierten und humanen Antikörpern über transgene, humanisierte Mäuse eine entscheidende Rolle zur Reduktion von Abwehrreaktionen (vgl. Abbildung 9B).^[163]

Eine weitere Möglichkeit zur Antikörperproduktion bietet das von G. Smith (1985) eingeführte Phagen-Display-Verfahren.^[164] Dabei werden zunächst antikörperproduzierende B-Lymphozyten isoliert und über biochemische Methoden, wie Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die Antikörpergene der variablen Regionen der leichten und schweren Kette (VL und VH) isoliert und vervielfältigt. Diese Gensegmente werden zusammen mit dem Gen für das Hüll- bzw. Fusionsprotein pIII in einem Phagemid-Vektor fusioniert und anschließend in *E. coli* Bakterien transformiert. Folglich exprimieren *E. coli* Bakterien pIII-Fusionsproteine mit scFv- oder Fab-Antikörperfragmenten, die in der inneren *E. coli* Membran verankert sind. Durch anschließende Coinfektion mit M13-Helferphagen werden durch das pIII-Hüllprotein die funktionalen Antikörperfragmente in der äußeren Membran der neugebildeten Phagen eingebaut. Somit präsentieren die rekombinanten (Bakterio-)phagen eine Bibliothek an proteinogenen Antikörperfragmenten auf ihrer Oberfläche und tragen gleichzeitig den zugehörigen genetischen Code (DNA) im Inneren. Durch die möglichen zahlreichen genetischen Rekombinationen innerhalb der VL- und VH-Regionen trägt theoretisch jeder Phage ein anderes Antikörperfragment, in Analogie zu den unterschiedlichen B-Zelllinien. In einem *Biopanning*-Prozess können durch hochspezifische Bindung der Antikörperfragmente auf der Phagenoberfläche mit Hilfe fixierter Antigenen die relevanten Phagen aus der Phagenbibliothek isoliert werden. Die über dieses Verfahren gewonnenen antigenspezifischen Antikörpergene werden dann durch rekombinante Proteinsynthese zur Antikörperherstellung genutzt.^[165]

1.3.2 Künstliche Antikörperfragmente – Antikörper-Engineering

Die modulierbare Struktur der IgG-Antikörper für eine allgemeine verbesserte therapeutische Effizienz zeigt großes Potential im Bereich der klinischen und therapeutischen Anwendung.^[166] Das Konzept des Antikörper-Engineerings bietet die Möglichkeit zur Darstellung einer Vielfalt von Antikörperfragmenten bzw. Antikörperkonstrukten (siehe Abbildung 10), die sich in der Größe und in der Anzahl und Art der Antigenbindungsstellen unterscheiden. Neben multivalenten Konstrukten, wie Triabodies (trivalent) oder Tetraabodies (tetravalent) zur Bindung mehrerer Antigene, können multispezifische Konstrukte, wie bispesifische Diabodies oder ein trispesifisches Fab₃-Fragment unterschiedliche Antigene binden.

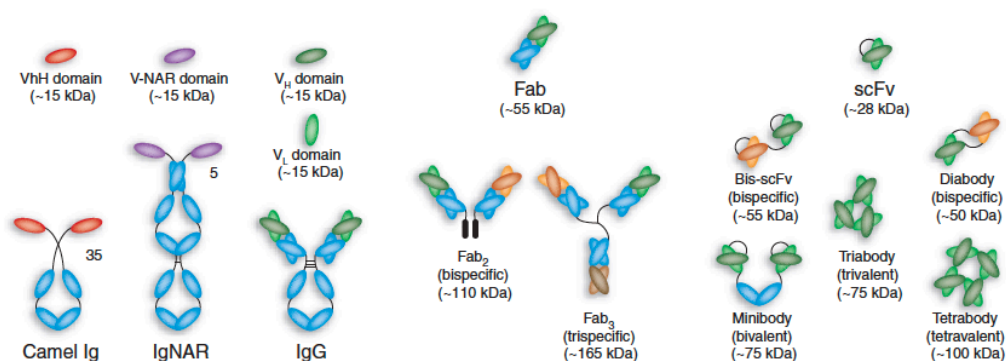


Abbildung 10. Künstliche Antikörperfragmente über Antikörper-Engineering.^[167]

Konstruierte Fab- oder scFv-Fragmente (scFv, *single chain variable fragment*) haben den Vorteil, dass durch das nicht vorhandene Fc-Fragment unerwünschte Effektorfunktionen, wie beispielsweise eine Komplementaktivierung umgangen werden können. Zusätzlich werden durch das verringerte Molekulargewicht der Antikörperfragmente von ca. 15 kDa für einzelne variable Domänen, über 28 kDa für ein scFv-Fragment zu 55-75 kDa für Fab-Fragmente oder Minibodies die pharmakokinetischen Eigenschaften beeinflusst. Intakte IgG-Antikörper mit ~ 150 kDa und Antikörperkonstrukte > 60 kDa weisen eine Blutzirkulationszeit von ca. 3 Wochen auf, was im therapeutischen Kontext mit einer höheren Bioverfügbarkeit einhergeht. Andererseits ist beispielsweise für Konjugate aus Antikörperfragmenten als Zielstrukturen und Radionukliden oder Zytostatika eine schnelle Eliminierung erwünscht, die über geringere Molekulargewichte der Antikörperfragmente erzielt werden kann. Somit können über das Konzept des Antikörper-Engineerings „maßgeschneiderte“ Antikörperfragmente für die jeweilige therapeutische Anwendung hergestellt werden.^[166,167]

1.3.3 Antikörper als Zielstrukturen

Aufgrund der hochspezifischen Bindungsaffinität zwischen Antikörper und Antigen sowie der großen Vielseitigkeit zur Darstellung unterschiedlichster Antikörperfragmente und Antikörperhybride über das Antikörper-Engineering-Verfahren (vgl. Kapitel 1.3.2), zeigen IgG-Antikörper großes Potential als Zielstrukturen in Therapie und Diagnostik.^[142,168] Die Anbindung von IgG-Antikörpern bzw. Antikörperfragmenten auf der Oberfläche von Nanopartikeln als Drug Delivery-Systeme (DDS)^[52,68,169], aber auch die direkte Konjugation mit einem Wirkstoff in Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (*antibody-drug conjugates*, ADCs)^[152] ermöglichen eine zell- bzw. gewebespezifische Aufnahme über die selektive Erkennung und Bindung bestimmter Oberflächenrezeptoren.

Wie in Kapitel 1.2.2.1 bereits erläutert, ist das Konzept des aktiven Targetings, insbesondere mit Antikörpern als Zielstrukturen, vor allem in der Tumorthherapie von großem Interesse. Nach einer passiven Anreicherung der nanodimensionalen Formulierung im Tumorgewebe über den EPR-Effekt^[128,129] kann eine zellspezifische Aufnahme durch die selektive Bindung des Antikörpers über rezeptorvermittelte Endozytose stattfinden.^[142] Die therapeutische Breite ist in der klassischen Chemotherapie aufgrund der hohen systemischen Toxizität der Zytostatika sehr gering. Die über den Antikörper vermittelte gesteigerte Tumorselektivität des toxischen Wirkstoffs ermöglicht eine Erhöhung der maximal tolerierten Dosis (MTD) und damit eine effektivere Therapie.^[142]

Der therapeutische Erfolg des aktiven Targetings von ADCs bzw. von antikörperfunktionalisierten Nanopartikeln ist von einigen Faktoren abhängig, die unter anderem in der Vielzahl an Konzepten zur chemischen Konjugation begründet liegen.^[170] Die Systeme sollten ausreichend lange Blutzirkulationszeiten aufweisen, um eine Anreicherung im Zielgewebe und damit eine räumliche Nähe zum entsprechenden Rezeptor zu gewährleisten. Insbesondere für nanopartikuläre DDS ist eine proteinabweisende Polymerhülle erforderlich (vgl. Kapitel 1.2.2), die eine Aggregation mit Proteinen des Blutserums oder anderem Biomolekülen verhindert.^[27] Bei der Wahl bzw. bei der Entwicklung des Antikörpers oder Antikörperfragments als Zielstruktur gilt es, die immunogene Wirkungen durch murine Segmente oder auch Fc-Teil induzierte immunogene Effektorfunktionen weitestgehend zu minimieren (vgl. Kapitel 1.3.1).^[143] Darüber hinaus darf die Modifikationschemie des Antikörpers zur Konjugation an den Nanopartikel bzw. an den Wirkstoff die spezifische Antigenbindung über den Fab-Teil des Antikörpers nicht beeinflussen. Die Darstellung von homogenen Antikörperkonjugaten über regioselektive Antikörpermodifizierung sowie Strategien zur bioorthogonalen Anbindung werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

Ein weiterer wichtiger Aspekt insbesondere für Antikörper-Wirkstoff-Konjugate ist die Freisetzung des kovalent gebundenen Wirkstoffs nach erfolgreicher Zellaufnahme über rezeptorvermittelte Endozytose. Dies kann über den Einbau von stimuli-responsiven Gruppen oder Linkermolekülen zwischen Antikörper und Wirkstoff begünstigt werden. Das können beispielsweise pH-sensitive Gruppen, wie Hydrazone sein oder enzymatisch spaltbare Peptidlinker (vgl. Abbildung 11).^[143]

All diese erläuterten Faktoren für IgG-Antikörper als Zielstrukturen, von selektiver Rezeptorbindung, geeigneter Modifikationschemie, unerwünschter immunogener Wirkung bis hin zur Wirkstofffreisetzung, beeinflussen die Effizienz des aktiven Targetings und sollten bei der Wahl für ein geeignetes Liganden-Rezeptor System zur Darstellung von ADCs bzw. antikörperfunktionalisierten Nanopartikeln berücksichtigt werden.

Die daraus entstehende Komplexität durch die große Variabilität an einsetzbaren Antikörperfragmenten und Modifizierungsmöglichkeiten spiegelt sich in den nur zwei zugelassenen ADCs (Adectris® und Kadcyla®) und wenigen Präparaten in Phase I-III von klinischen Studien (Stand 2014) in der Tumorthherapie wider (vgl. Abbildung 11).

Agent	Sponsor (licensee)	Status	Indication	Antigen	Cytotoxin	Linker
Adectris® (brentuximab vedotin, SGN-35)	Seattle Genetics (Millennium)	Launched	HL, ALCL	CD30	MMAE	Cleavable, Val-Cit
Kadcyla® (ado-trastuzumab emtansine, T-DM1)	Roche-Genentech (ImmunoGen)	Launched	Her2+ metastatic breast cancer	HER2	DM1	Non-cleavable, thioether
Mylotarg® (gemtuzumab ozogamicin)	Pfizer (UCB)	Withdrawn	AML	CD33	Calicheamicin	Cleavable, hydrazone (Ac-But acid)
Inotuzumab ozogamicin (CMC-544)	Pfizer (UCB)	Ph III	ALL, NHL	CD22	Calicheamicin	Cleavable, hydrazone (Ac-But acid)
RG-7596	Roche-Genentech	Ph II	DLBCL, NHL	CD79b	MMAE	Cleavable, Val-Cit
Glambatimumab vedotin CDX-011)	Celldex (Seattle Genetics)	Ph II	Advanced breast cancer, melanoma	GPNMB	MMAE	Cleavable, Val-Cit
PSMA-ADC	Progenics (Seattle Genetics)	Ph II	HRPC	PSMA	MMAE	Cleavable, Val-Cit
SAR3419	Sanofi (ImmunoGen)	Ph II	Hematologic tumors	CD19	DM4	Cleavable, disulfide
Labetuzumab-SN-38 (IMUU-130)	Immunomedics	Ph II	Metastatic CRC	CEACAM5	SN-38	Cleavable, Phe-Lys
Lorvotuzumab mertansine (IMGN901)	ImmunoGen	Ph I/II	MM, solid tumors	CD56	DM1	Cleavable, disulfide
Milatuzumab-DOX (IMMU-110)	Immunomedics	Ph I/II	MM	CD74	Doxorubicin	Cleavable, hydrazone
BT-062	Biotest AG (ImmunoGen)	Ph I	MM	CD138	DM4	Cleavable, disulfide
BAY-94-9343	Bayer Schering (ImmunoGen)	Ph I	Solid tumors	Mesothelin	DM4	Cleavable, disulfide
ASG-5ME	Astellas (Seattle Genetics)	Ph I	Solid tumors	AGS-5	MMAE	Cleavable, Val-Cit
SGN-75	Seattle Genetics	Ph I	NHL, RCC	CD70	MMAF	Non-cleavable, MC
IMGN529	ImmunoGen	Ph I	Hematologic tumors	CD37	DM1	Non-cleavable, thioether
SAR-56658	Sanofi (ImmunoGen)	Ph I	Solid tumors	D56	DM4	Cleavable, disulfide

^a Abbreviations: CEACAM5, carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 5; HRPC: hormone refractory prostate cancer; MC: maleimidocaproyl; RCC: renal cell carcinoma; SN-38, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin.

Abbildung 11. Liste von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (ADCs) in klinischen Studien: Stand 2014.^[143]

1.3.4 Methoden zur Antikörpermodifizierung

Die chemische Modifizierung von IgG-Antikörpern zur kovalenten Anbindung eines Wirkstoffs oder eines funktionalen Linkers für weiterführende Konjugationen kann in zwei prinzipiell unterschiedliche Konzepte gegliedert werden: Die unspezifische (*random*) Antikörpermodifizierung und die spezifische, regioselektive (*site-specific*) Antikörpermodifizierung (siehe Abbildung 12).^[143]

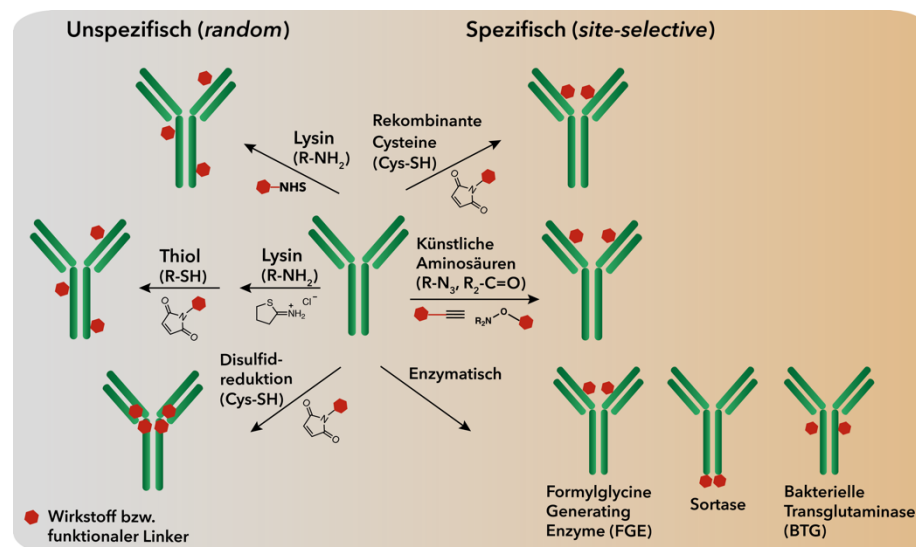


Abbildung 12. Methoden zur unspezifischen (*random*) und spezifischen (*site-selective*) Antikörpermodifizierung.

Ein klassischer Weg der unspezifischen Antikörpermodifizierung erfolgt über die ϵ -Aminogruppe von Lysinseitenketten und ermöglicht die kovalente Anbindung von *N*-Hydroxysuccinimid-(NHS) funktionalisierten Komponenten, wie z. B. Zytostatika (Mylotarg®, vgl. Abbildung 11)^[171] oder bioorthogonale Dibenzocyclooctin-(DBCO) Linker^[67] unter Ausbildung von Amidbindungen. Außerdem können Lysinseitenketten zur Reaktion mit 2-Iminothiolan (Trauts Reagenz)^[171] genutzt werden, um Thiolgruppen auf der Antikörperoberfläche zu generieren. Diese können mit einer Vielzahl an thiolreaktiven Verbindungen, wie z. B. Maleinimiden^{[172][66]} oder Vinylsulfonen^[173], modifiziert werden. Eine alternative Variante zur Darstellung von Thiolen ist die kontrollierte Reduktion von disulfidverknüpften Cysteinseitenketten innerhalb der Proteinstruktur, ohne die Disulfidbrücken der Gelenkregion des Antikörpers zu beeinflussen.^[174] Über diese Methode wurde beispielsweise das Antikörper-Wirkstoff-Konjugat Adcetris® hergestellt (vgl. Abbildung 11).

Die beschriebenen unspezifischen Modifizierungen resultieren in einer heterogenen Mischung von konjugierten Antikörperspezies mit variabler Anzahl an Wirkstoff-/Linkermolekülen pro Antikörper sowie unterschiedlichen Modifizierungspositionen. Diese Heterogenität kann sowohl Löslichkeit, Stabilität als auch die pharmako-

kinetischen Eigenschaften der Konjugate beeinflussen.^[175,176] Der klinische Erfolg von unspezifisch modifizierten ADCs (vgl. Mylotarg®, Adcetris® in Abbildung 11) ist auf optimierte, robuste Herstellungsprozesse und Strategien zur Kontrolle und Aufreinigung heterogener Konjugate zurückzuführen.^[177]

Die spezifische, regioselektive Variante der Antikörpermodifizierung führt zu homogenen Antikörperkonjugaten mit definierten Verhältnissen von Wirkstoff- bzw. Linkermolekülen pro Antikörper, die selektiv an spezifischen Aminosäurepositionen angebunden sind. Es können prinzipiell drei unterschiedliche Methoden zur regioselektiven Antikörpermodifizierung unterschieden werden (siehe Abbildung 12, rechts). Zum einen können bei der Antikörperherstellung über rekombinante Proteinsynthese Thiolgruppen an definierten Positionen eingeführt werden, entweder durch Aminosäuremutationen oder den Einbau zusätzlicher Cysteine. Diese können dann mit thiol-reaktiven Komponenten zur Darstellung homogener Konjugate umgesetzt werden.^[178] Zum anderen ermöglicht die rekombinante Antikörpersynthese den Einbau von künstlichen, nicht-natürlichen Aminosäuren mit bioorthogonalen Funktionalitäten. So konnten über genetische Codierung die nicht-natürlichen Aminosäuren *para*-Acetylphenylalanin^[179] (pAcPhe) bzw. *para*-Azidomethylphenylalanin^[180] (pAMF) in den anti-HER2-Antikörper Trastuzumab® eingebracht werden. Die bioorthogonale Reaktion mit dem Wirkstoff Auristatin F mit Alkoxyamino-Gruppe für die Umsetzung mit pAcPhe-Antikörper, bzw. mit DBCO-Funktionalität für die ringgespannte Cycloaddition mit pAMF-Antikörper, ermöglichte die Synthese homogener Antikörper-Wirkstoff-Konjugate. Einen weiteren Ansatz zur Darstellung homogener Antikörperkonjugate bieten enzymatische, posttranslationale Antikörpermodifizierungen. Bertozzi und Mitarbeiter^[181,182] verwendeten das *formylglycine generating enzyme* (FGE), das innerhalb einer bestimmten Aminosäuresequenz Cystein in Formylglycin umwandelt und damit die regioselektive Antikörpermodifikation über Aldehydgruppen ermöglicht. Eine weitere mögliche Antikörpermodifizierung erfolgt mit dem Enzym Sortase A, einer Transpeptidase, die in LPXTG-Aminosäuremotiven von Antikörpern die Threonin-Glycin-Bindung hydrolysiert und den entstandenen C-Terminus mit N-terminalen Glycinkomponenten neu verknüpft.^[183] In dieser Arbeit wurde das Konzept der enzymatischen Antikörpermodifizierung über bakterielle Transglutaminase^[184] (BTG) zur regioselektiven Modifizierung von Glutaminresten in IgGs genutzt und wird in nachfolgendem Kapitel ausführlich beschrieben.

Zusammenfassend bietet die spezifische (*site-selective*) Antikörpermodifizierung die Möglichkeit zur Darstellung homogener Konjugate mit definierten Modifikationsstellen und damit festgelegten Konjugationsverhältnissen. Diese zeigen im direkten Vergleich mit unspezifisch modifizierten Analoga verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften, wie z. B. eine erhöhte Anreicherung im Zielgewebe und damit einhergehende verbesserte therapeutische Effekte.^[179,184,185]

1.3.4.1 Enzymatische Antikörpermodifizierung mit Bakterieller Transglutaminase (BTG)

Das Konzept der regioselektiven, BTG-vermittelte Antikörpermodifizierung zur Einführung unterschiedlicher Funktionalitäten an den Glutaminresten 295 in IgG-Antikörpern beinhaltet einen zweistufigen enzymatischen Modifizierungsprozess (Abbildung 13).^[184]

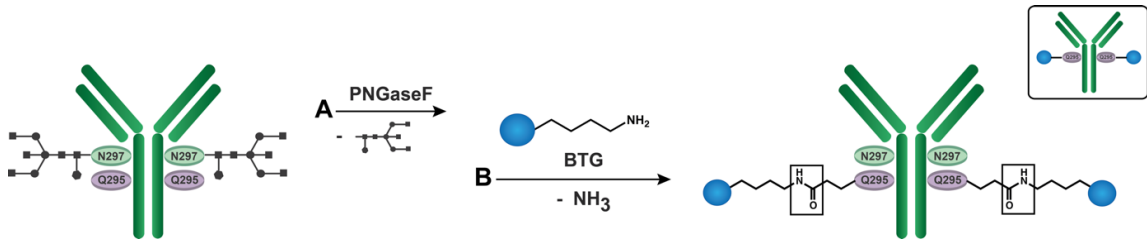


Abbildung 13. Enzymatische Modifizierung von IgG-Antikörpern. **A)** Deglykosylierung mit PNGase F. **B)** BTG-vermittelte Substratanbindung.

Der erste enzymatische Schritt beinhaltet die Abspaltung *N*-glykosidisch verknüpfter Zuckerstrukturen an den Asparaginseitenketten in Position 297 (N297) unter Verwendung des Enzyms Peptid-*N*-Glykosidase F (PNGase F) (Abbildung 13A). PNGase F ist in die Enzymklasse der Amidasen einzuordnen und spaltet zwischen dem innersten *N*-Acetylgalaktosamin (GlcNAc) und der Asparaginseitenkette von mannose-reichen Kohlenhydratstrukturen in *N*-verknüpften Glykoproteinen, wie z. B. in IgG-Antikörpern.^[186-188] Die Deglykosylierung an den Aminosäureresten N297 in beiden schweren Ketten führt zu einer erhöhten Mobilität im Bereich der Aminosäurepositionen Q295-T299 innerhalb der IgG-Antikörper und erleichtert dadurch den zweiten Schritt, vermittelt durch das Enzym bakterielle Transglutaminase (BTG) (Abbildung 13B).^[189-191] Im Allgemeinen katalysieren Transglutaminasen den Acyltransfer proteingebundener Glutaminreste auf primäre Amine. Insbesondere bei der Reaktion von γ -Glutamylgruppen und der ϵ -Aminogruppe von Lysinen kommt es unter Freisetzung von Ammoniak zur Ausbildung einer Isopeptidbindung und somit zur Verbrückung von Peptiden und Proteinen.

Die Bedingungen für die Erkennung geeigneter Glutaminseitenketten für eine Umsetzung mit BTG sind sehr streng. Dies bedeutet, dass sich der Glutaminrest in einer sehr flexiblen Region des Proteins befinden sollte und von spezifischen Aminosäuresequenzen umgeben sein muss.^[192] In vorangegangenen Arbeiten von Schibli et al.^[184] konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene monoklonale Antikörper für eine regioselektive, BTG-vermittelte Modifizierung an beiden Q295 Resten in Frage kommen. Die Auswahl an geeigneten Substraten für das Enzym bakterielle Transglutaminase ist sehr vielseitig. Somit können verschiedene Strukturen mit

primärer Aminfunktion als Lysinsurrogate BTG-vermittelt umgesetzt werden.^[184,193]
Bei der Reaktionsführung ist auf die Kaliumempfindlichkeit der BTG und auf deren pH-Optimum (~ pH 8) im leicht basischen pH-Bereich zu achten.

1.4 Biokonjugation über Bioorthogonale Reaktionen

Die Darstellung von Protein/Peptid-Polymer-Konjugaten ist in vielen Bereichen der Biotechnologie und der Nanomedizin von großem Interesse. Dies umfasst unter anderem die PEGylierung von therapeutisch relevanten Proteinen^[27,89] für eine verbesserte Stabilität und verringerte Immunogenität, die Entwicklung von Biosensoren^[194] oder auch die Anbindung von Zielstrukturen (Antikörper, Signalpeptide) an polymere Träger für den Wirkstofftransport.^[52,169,195]

Die medizinische Relevanz von homogenen Biokonjugaten und Methoden zur spezifischen, regioselektiven Proteinmodifizierung am Beispiel der IgG-Antikörper wurden ausführlich in Kapitel 1.3.4 erläutert. Dieses Kapitel befasst sich mit der chemischen Ligation von synthetischen und natürlichen Polymeren über bioorthogonale Reaktionen.^[196,197] Voraussetzungen für eine Konjugation mit einem Biomolekül ist eine chemoselektive Reaktion, die keine Nebenreaktionen aufgrund der Multifunktionalität im Protein bzw. im Polymer zulässt. Des Weiteren sind milde Reaktionsbedingungen in wässrigem Medium unter physiologischem pH-Wert (\sim pH 7) und Temperaturen von ca. 37 °C erforderlich, um die Unversehrtheit bzw. die Aktivität des Proteins bzw. des Biomoleküls zu gewährleisten. Außerdem sollte die Reaktion ausreichend schnell (innerhalb von Minuten) und mit hohen Ausbeuten ablaufen, um beispielsweise intrazelluläre Prozesse über Proteinmarkierungen visualisieren zu können, bevor Metabolisierungsprozesse eintreten.

Neben der von Bertozzi und Mitarbeitern^[198] entwickelten bioorthogonalen Staudinger Ligation für *in vivo*-Markierungsprozesse über die Reaktion von Aziden und Phosphinen hat sich das von Sharpless, Kolb und Finn^[199] 2001 geprägte Konzept der Click-Chemie für selektive Biokonjugationen mit hohen Reaktionsgeschwindigkeiten in vielen Bereichen etabliert. Dazu gehört die klassische Huisgen^[200] 1,3-dipolare Cycloaddition, die durch Sharpless und Kollegen^[199] sowie von der Gruppe um Morten Meldal^[201] zur kupferkatalysierten Cycloaddition von Alkinen und Aziden (CuAAC) weiterentwickelt wurde. Die Metallkatalyse generiert eine regioselektive Cycloaddition und drastisch gesteigerte Reaktionsraten ($k \sim 10\text{-}100\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$).^[202] Weitere energetisch begünstigte Reaktionen aus der Click-Chemie sind unter anderem Diels-Alder-Reaktionen,^[203,204] Thiol-En-Reaktionen^[205] und Oximbildungen.^[179]

Die Azidgruppe nimmt eine vorherrschende Rolle im Bereich der bioorthogonalen Reaktionen ein.^[85] Aufgrund der geringen Größe und der chemischen Inertheit gegenüber funktionalen Gruppen in Biomolekülen eignet sich diese besonders gut zur Modifizierung von Proteinen ohne Einfluss auf deren Struktur oder Funktion zu nehmen. Die intrinsisch hohe Reaktivität als 1,3-Dipol und ihre Stabilität in wässrigen Systemen zeichnen den Vorteil von Azidgruppen in Biokonjugationen aus.

Die zelltoxische Wirkung des Kupfer(I)-Katalysators in der effizienten CuAAC limitiert die Anwendung der Reaktion *in vivo*. Somit gewann das durch Bertozzi und Mitarbeiter^[206] maßgeblich geprägte Konzept der kupferfreien Click-Chemie für solche Anwendung zunehmend an Bedeutung. Die Aktivierung des Alkins für eine katalysatorfreie [3+2]-Cycloaddition mit Aziden gelang über die hervorgerufene Ringspannung von Cyclooctinen (siehe Abbildung 14). Durch Modifikationen des Cyclooctins mit elektronenziehenden Fluorsubstituenten (DIFO)^[207] in *ortho*-Position oder auch durch die von Boons und Mitarbeitern^[208] entwickelten Dibenzocyclooctine (DIBO, DIBAC) konnte die Reaktivität der ringgespannten Alkine weiter erhöht werden und führte zu gesteigerten Reaktionsraten (vgl. Tabelle 1).

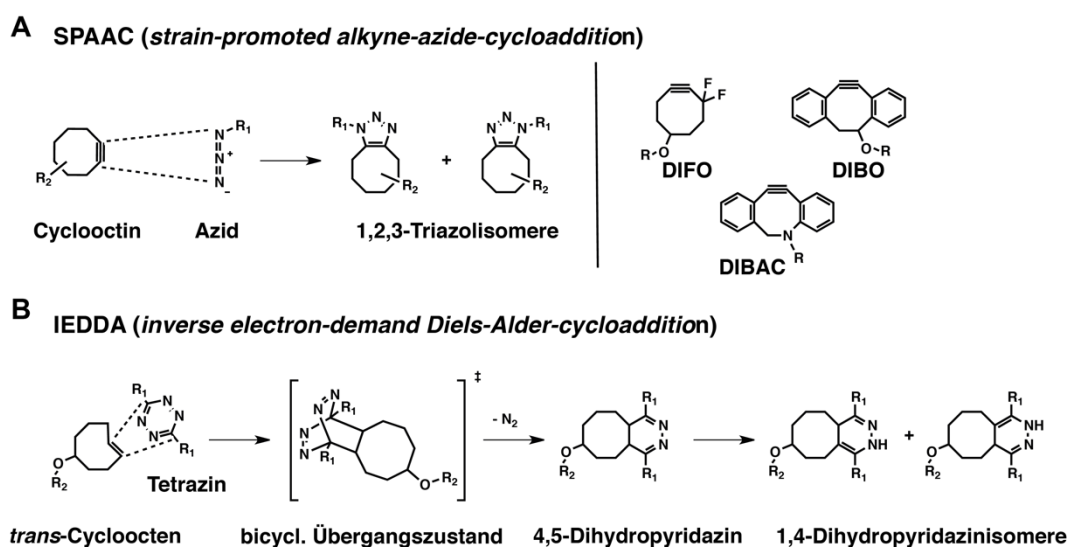


Abbildung 14. Bioorthogonale Reaktionen. **A)** SPAAC. **B)** IEDDA.

Die ringgespannte Alkin-Azid-Cycloaddition (SPAAC, *strain-promoted alkyne-azide-cycloaddition*) mit Cyclooctinderivaten verläuft ohne Metallkatalyse nicht regio-spezifisch und führt zu zwei regioisomeren 1,2,3-Triazolen (siehe Abbildung 14A). Dennoch zeigt die bioorthogonale SPAAC typische Merkmale der Click-Chemie, wie Chemoselektivität, milde Reaktionsbedingungen und schnelle Reaktionsumsätze ($k \sim 10^{-2} \cdot 1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[209] und macht diese Ligationsmethode attraktiv zur Synthese von Biokonjugaten.^[206]

Eine weitere bioorthogonale Reaktion aus dem Konzept der kupferfreien Click-Chemie ist die inverse Diels-Alder-Reaktion mit Elektronenmangel (IEDDA, *inverse electron-demand Diels-Alder-cycloaddition*) von *trans*-Cyclooctenen und 1,2,4,5-Tetrazinen (siehe Abbildung 14B).^[210,211] Umgekehrt zur normalen Diels-Alder-Reaktion erfolgt die inverse Diels-Alder-Reaktion mit Elektronenmangel zwischen elektronenarmen Dienen (Tetrazinen) und elektronenreichen Dienophilen (Olefinen).^[212] Im Fall der *trans*-Cyclooctene ist die hohe Reaktivität auf die Ringspannung innerhalb der

trans-Konformation des Achtrings zurückzuführen. Nach der Ausbildung eines bicyclischen Übergangszustandes durch Cycloaddition, erfolgt eine Retro-Diels-Alder-Reaktion unter Eliminierung von Stickstoff, die die Reaktion irreversibel macht. Es entsteht das 4,5-Dihydropyridazinderivat, das zu den 1,4-Dihydropyridazinen isomerisiert. Optional kann anschließend zum aromatischen Pyridazinderivat oxidiert werden. Die IEDDA-Cycloaddition zeichnet sich neben ihrer Chemoselektivität besonders durch ihre hohen Reaktionsraten von $k \sim 1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^[218] für Biokonjugationen von Proteinen oder auch im Bereich des *in vivo*-Pretargetings aus (vgl. Tabelle 1).^[211,214]

Tabelle 1. Geschwindigkeitskonstanten verschiedener bioorthogonaler Reaktionen.

	Geschwindigkeitskonstante k ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	Referenz
Staudinger Ligation	$\sim 10^{-3}$	[215]
SPAAC	$\sim 10^2$ -1	[209]
CuAAC	~ 10 -100	[202]
IEDDA	$\sim 1 \cdot 10^6$	[213]

2 Motivation und Zielsetzung

2 Motivation und Zielsetzung

Die Entwicklung von polymerbasierten Transfektionsagenzien als sogenannte Nanovakzine in der Tumorimmuntherapie steht im Interesse aktueller Forschung. Die Induktion einer Anti-Tumorimmunantwort mittels mRNA- bzw. pDNA-Vakzinen ermöglicht neben der Bekämpfung von malignen Zellen solider Tumore ebenfalls die Adressierung von metastasierenden Zellen, die häufig für einen ausbleibenden Therapieerfolg verantwortlich sind.

Die von K. Tappertzhofen et al.^[87] entwickelten Poly-L-lysin-*block*-Poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylat) Blockcopolymere konnten in Form von pDNA-Polyplexen bereits erfolgreich zur Transfektion von HEK-293T Zellen eingesetzt werden. Dabei dient die kationische Poly-L-lysin-Einheit zur Komplexierung der negativ geladenen Nukleinsäure und der hydrophile Poly(HPMA)-Block zur Abschirmung der Ladung des Polyionenkomplexes. In dieser Arbeit soll die hohe chemische Flexibilität in der Synthese der polymeren Transfektionsvektoren genutzt werden, um diese mit funktionalen Elementen zu modifizieren, die eine selektive pDNA/mRNA-Transfektion von dendritischen Immunzellen ermöglichen. Die allgemeine Darstellung der P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymere erfolgt über die Kombination von Ringöffnungspolymerisation von *N*- ϵ -(Boc)-L-Lysin *N*-carboxyanhydrid und RAFT-Polymerisation von Pentafluorphenylmethacrylat. Der PFPMA-Reaktivesteransatz bietet den Vorteil, dass neben der polymeranalogen Umsetzung zur Poly(HPMA)-Einheit im selben Reaktionsschritt weitere Funktionalitäten, wie z. B. Fluoreszenzfarbstoffe über sequentielle Aminolyse in das Polymer eingebracht werden können.

Zur Steigerung der Transfektionseffizienz wird der Einbau einer säurelabilen Hydrazongruppe innerhalb des P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymers evaluiert. Die pH-induzierte Hydrolyse des Hydrazons im sauren Endosomenmilieu bei pH 5-6 soll zur Abspaltung der abschirmenden Poly(HPMA)-Hülle führen und folglich über ionische Wechselwirkungen des geladenen Polyplexes mit der Endosomenmembran eine verbesserte Freisetzung ins Zytosol bewirken. In einem weiteren Projekt soll die partielle Funktionalisierung der Poly-L-lysin-Einheit mit thiolreaktiven 2-(Pyridyldithio)propionat-(PDP) Gruppen zu einer reversible Kernvernetzung der Polyplexe genutzt werden. Im Allgemeinen tragen Disulfidvernetzungen zu einer verbesserten extrazellulären Stabilität der Systeme bei und sie können aufgrund des erhöhten Reduktionspotentials im Zellinneren durch die 50-1000-fach höhere Glutathionkonzentration im Vergleich zum Extrazellulärraum reversibel gespalten werden. Die damit verbundene Disassemblierung der Polyplexe soll die Freisetzung der Nukleinsäure unterstützen und schließlich die Transfektionseffizienz steigern. In dieser Arbeit wird die Disulfidvernetzung der PDP-modifizierten P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymere über den Einsatz des endosomolytisch-aktiven LAH4-L1-Peptid als Dithiol-Vernetzer evaluiert.

Für eine spezifische Adressierung von dendritischen Immunzellen sollen die P(Lys)-*b*-P(HPMA)-basierten Nanovakzine mit DEC205-Antikörpern als Zielstrukturen modifiziert werden. Aufgrund ihrer hohen Rezeptorbindungsaffinität eignen sich Antikörper besonders gut zum aktiven Targeting. Zusätzlich ist es möglich über rezeptorvermittelte Endozytose der antikörperfunktionalisierten Polyplexe die Transfektion weiterhin positiv zu beeinflussen. Für die selektive Konjugation der DEC205-Antikörper als multifunktionale Biomakromoleküle bedarf es einer bioorthogonalen Reaktion, die chemoselektiv, mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit und unter physiologischen Bedingungen abläuft. Dafür wurde das Konzept der ringgespannten Alkin-Azid-Cycloaddition (SPAAC, *strain-promoted alkyne-azide-cycloaddition*) zwischen azidfunktionalisierten Polyplexen und dibenzocyclooctin-(DBCO) modifizierten DEC205-Antikörpern gewählt.

Auf Seite der Blockcopolymersynthese erfolgt die Azidmodifizierung über polymeranaloge Reaktionen. Zum einen werden statistisch verteilte Azidgruppen in den Poly(HPMA)-Block über Aminolyse des Reaktivesters eingebracht und zum anderen die Polymerendgruppe über Amidkupplung mit Azid modifiziert. Die Anbindung von DBCO-Gruppen an DEC205-Antikörper über einen zweistufigen enzymatischen Modifizierungsprozess mit Peptid-*N*-Glykosidase F und bakterieller Transglutaminase ermöglicht die regioselektive Funktionalisierung an zwei definierten Aminosäurepositionen (Gln295) im Fc-Teil des IgG-Antikörpers. Diese spezifische, enzymatische Antikörperfunktionalisierung bietet den Vorteil der Synthese von homogenen Konjugaten, die hinsichtlich des Einflusses auf die pharmakokinetische Eigenschaften eine wichtige Rolle spielen können. Darüber hinaus sollte die DBCO-Modifizierung im Fc-Teil des DEC205-Antikörpers dessen Rezeptorbindung über den Fab-Teil in seiner Funktion als Zielstruktur in der Adressierung von dendritischen Immunzellen nicht beeinflussen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese von P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymeren - Azidfunktionalisierung

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Synthese und Modifizierung von Poly-L-ysin-*b*-Poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylat) Blockcopolymeren (P(Lys)-*b*-P(HPMA)) über kombinierte Polymerisationstechniken von RAFT-Polymerisation (*reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization*) und Ringöffnungspolymerisation von *N*-Carboxyanhydriden.^[87] P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymere sind aufgrund ihrer chemischen und strukturellen Eigenschaften dazu befähigt als polymerbasierte Vektoren polyanionische Nukleinsäuren, wie Plasmid-DNA (pDNA) oder Messenger-RNA (mRNA) unter Ausbildung von Polyionenkomplexen (Polyplexe) einzuschließen (Abbildung 15A, vgl. Kapitel 1.2.2). Die physikochemische Charakterisierung P(Lys)-*b*-P(HPMA)-basierter pDNA- und mRNA-Polyplexe und die *in vitro*-Evaluierung zur Anwendung als polymerbasierte Transfektionsagenzien werden in Kapitel 3.2 diskutiert.

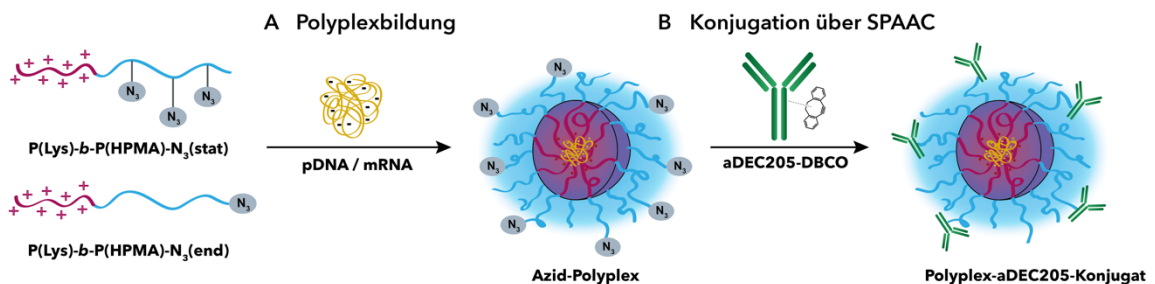


Abbildung 15. **A)** Polyplexbildung mit P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat/end). **B)** SPAAC von Azid-Polyplex und aDEC205-DBCO.

Ziel dieser Arbeit war die Funktionalisierung der P(Lys)-*b*-P(HPMA)-basierten Polyplexe mit DEC205-Antikörpern^[51,52] als Zielstrukturen für dendritische Zellen im Rahmen der Tumorimmuntherapie (vgl. Kapitel 1.2.1). In einer bioorthogonalen, ringgespannten Alkin-Azid-Cycloaddition (SPAAC, *strain-promoted alkyne-azide-cycloaddition*) sollen azidfunktionalisierte Polyplexe mit Dibenzocyclooctin-(DBCO) modifizierten DEC205-Antikörpern umgesetzt werden (Abbildung 15B). Die regioselektive Anbindung von DBCO-Gruppen an IgG-Antikörper wird in Kapitel 3.4 beschrieben.

Die Einführung bioorthogonaler Azidgruppen in den Polyplex erfolgte über unterschiedliche polymeranaloge Reaktionen innerhalb der P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymersynthese. Es wurden die azidfunktionalisierte Blockcopolymere: P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) und P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(end) hergestellt, die sich in Anzahl und Position der Azidgruppen unterscheiden (siehe Abbildung 15).

Das Reaktionsschema in Abbildung 16 gibt einen Überblick über die vollständige Synthese der P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymere mit unterschiedlichen Azidfunktionalisierungen und der optionalen Einführung von Fluoreszenzfarbstoffen.^[87,216] Im ersten Schritt (A) erfolgte die Synthese des makromolekularen Kettentransferreagenzes für die RAFT-Polymerisation. *N*- ϵ -(Boc)-L-Lysin *N*-carboxyanhydrid (Lys(Boc)-NCA) (1) wurde als cyclisches Monomer in einer Ringöffnungspolymerisation mit Neopentylamin als Amininitiator zu Poly(*N*- ϵ -(Boc)-L-lysin) (P(Lys(Boc))) (2) polymerisiert. Die Anbindung des Dithiobenzoylestere als funktionale CTA-Einheit erfolgte an die Aminoendgruppe des Poly-L-lysin-Homopolymers über die Umsetzung mit Pentafluorphenyl-4-phenylthiocarbonyl-4-cyanovaleriansäure (PFP-CTA). Anschließend wurde der makromolekulare P(Lys(Boc))-CTA (3) in einer RAFT-Polymerisation von Pentafluorphenylmethacrylat (PFPMA) mit Azobis(isobutyronitril) (AIBN) als Initiator zum Reaktivester-Blockcopolymer P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA)-CTA (4a) umgesetzt (B). In einer radikalischen Substitutionsreaktion mit 4,4-Azobis(4-cyanovaleriansäure) (ACVA) wurde die Dithioesterendgruppe am Blockcopolymer abgespalten und es resultierte P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA) (4b) mit Carboxylendgruppe. In den nachfolgenden polymeranalogen Reaktionen (C) wurde zum einen die PFPMA-Reaktivestereinheit durch Aminolyse mit 2-Hydroxypropylamin (HPA) in den hydrophilen HPMA-Block zu P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA) (4c) überführt. An dieser Stelle können optional auch Fluoreszenzfarbstoffe, wie Oregon Green 488 Cadaverin partiell über Aminolyse in das Blockcopolymer eingebracht werden (siehe Kapitel 3.1.3). Des Weiteren dienten polymeranaloge Umsetzungen zur Einführung von Azidfunktionalitäten in das P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer. Es wurden zwei unterschiedliche azidmodifizierte Blockcopolymere hergestellt, die in Anzahl und Position der Azidgruppen variieren. Zum einen wurden mehrere Azidgruppen über Aminolyse mit *O*-(2-aminoethyl)-*O'*-(2-azidoethyl)-pentaethylenglykol (NH₂-PEG₆-N₃) mit 15 mol-% statistisch in den PFPMA-Block eingeführt und anschließend mit HPA vollständig zu P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) (5a) umgesetzt. Zum anderen wurde die Carboxylendgruppe von P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA) (4c) genutzt, um eine endständige Azidgruppe am Blockcopolymer zu generieren. Dazu wurde NH₂-PEG₆-N₃ als Azidkomponente in einer Amidkupplung mit der Carboxylendgruppe am Blockcopolymer zu P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(end) (6a) umgesetzt. Das Entfernen der Boc-Schutzgruppe in den jeweiligen Blockcopolymeren erfolgte unter HCl-sauren Reaktionsbedingungen und resultierte in kationischen azidfunktionalisierten Blockcopolymeren von P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) (5b) und P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(end) (6b).

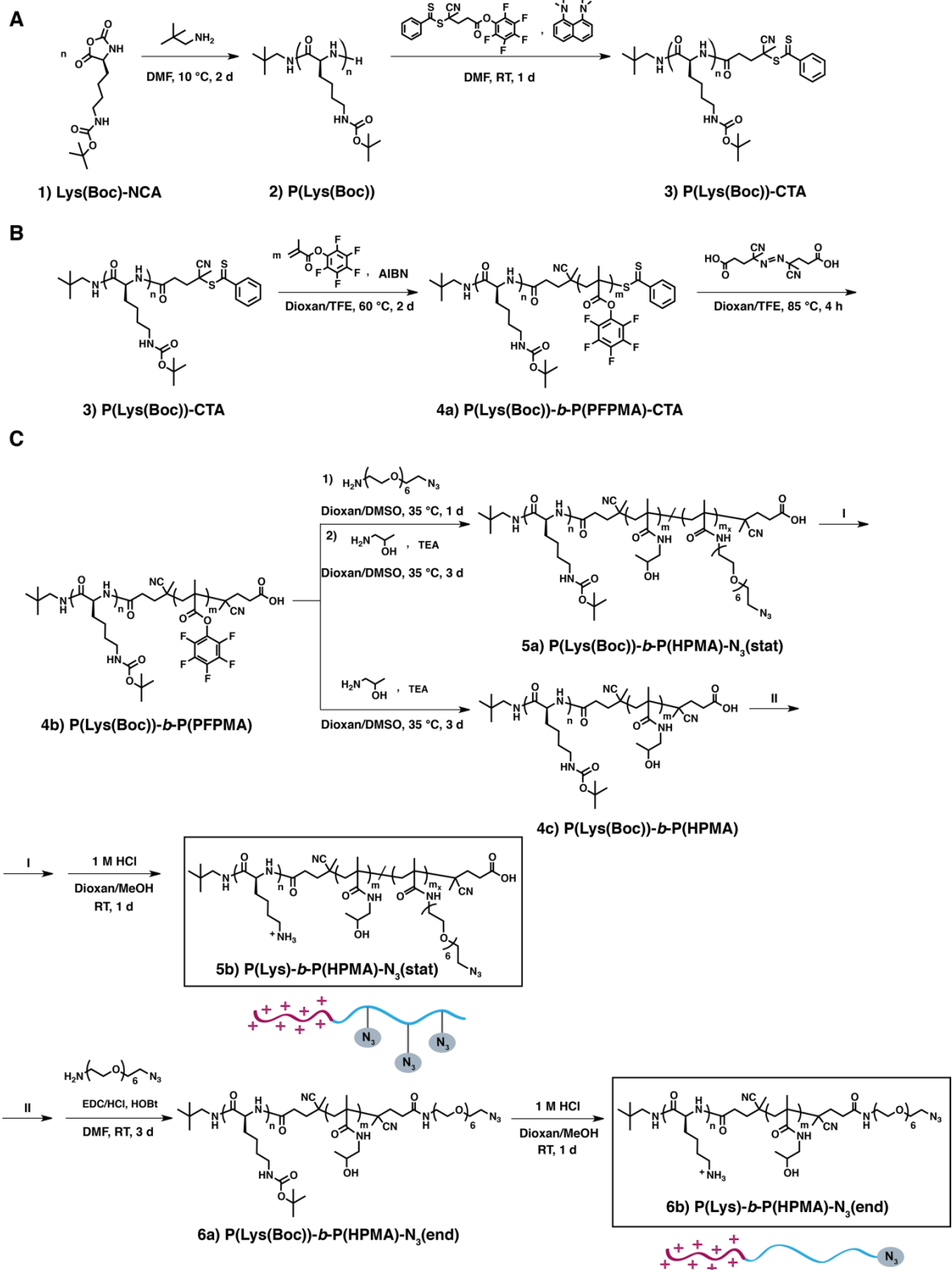


Abbildung 16. **A)** Ringöffnungspolymerisation von Lys(Boc)-NCA (1) zu P(Lys(Boc)) (2) und Umsetzung zum makromolekularen Kettentransferreagenz P(Lys(Boc))-CTA (3). **B)** RAFT-Polymerisation von PFPMA zum Reaktivester-Blockcopolymer P(Lys(Boc))-b-P(PFPMA) (4b). **C)** Diverse polymeranaloge Umsetzungen zu P(Lys(Boc))-b-P(HPMA) (4c), P(Lys)-b-P(HPMA)- N_3 (stat) (5b) und P(Lys)-b-P(HPMA)- N_3 (end) (6b).

3.1.1 Synthese des Makromolekularen Kettentransferreagenzes: Poly-L-Lysin(Boc)-CTA

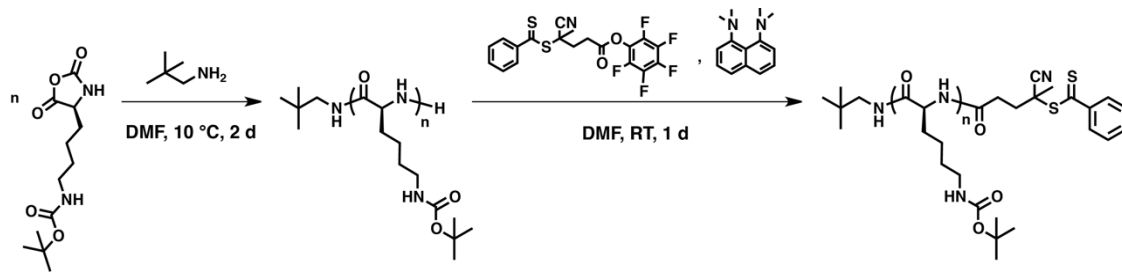


Abbildung 17. Synthese von P(Lys(Boc))-CTA.

Die allgemeine Darstellung der P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymere erfolgte über RAFT-Polymerisation des Reaktivestermonomers PFPMA mit dem makromolekularen Kettentransferreagenz P(Lys(Boc))-CTA.

Dafür wurde *N*-ε-(Boc)-L-Lysin *N*-carboxyanhydrid, das cyclische Anhydrid der Boc-geschützten Aminosäure Lysin in einer Ringöffnungspolymerisation mit Neopentylamin als Initiator polymerisiert und anschließend am Aminoterminus mit einer Dithiobenzoatgruppe zum CTA funktionalisiert (Abbildung 17).

Das Monomer *N*-ε-(Boc)-L-Lysin *N*-carboxyanhydrid wurde nach Literatur^[217] hergestellt und von der Arbeitsgruppe ██████ am Institut für Organische Chemie der JGU Mainz freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Vorarbeiten zeigten unter verschiedenen P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymeren die beste Transfektionseffizienz an HEK-293T Zellen für eine Kettenlänge von 30 Wiederholungseinheiten für den Poly-L-lysin-Block.^[87] Demzufolge wurde für die Polymerisation des Lys(Boc)-NCAs ein Polymerisationsgrad von $P_n = 30$ angestrebt und im Reaktionsansatz über die Menge an Initiator nach Gleichung 1 eingestellt.

$$P_n = \frac{[M_0]}{[I_0]} \quad (1)$$

mit M_0 als Stoffmengenkonzentration des Monomers und I_0 als Stoffmengenkonzentration des Initiators.

Der Reaktionsfortschritt wurde mittels IR-Spektroskopie über die Abnahme bzw. das vollständige Verschwinden der beiden NCA-Carbonylbanden bei 1853 cm^{-1} und 1786 cm^{-1} verfolgt. Nach 2 d (44 h) war die Umsetzung zu P(Lys(Boc)) vollständig (Abbildung 18).

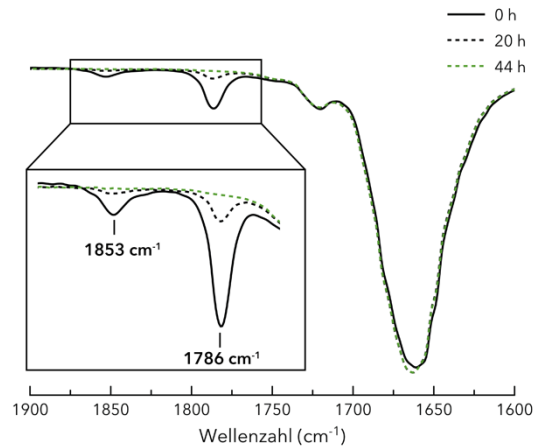


Abbildung 18. IR-Spektrum: NCA-Polymerisation von Lys(Boc)-NCA nach 0 h, 20 h und 44 h.

Mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie (Abbildung 19A) konnte über das Endgruppensignal der *tert*-Butylgruppe (B) und das Signal der Methylengruppe (A) der Wiederholungseinheit ein Polymerisationsgrad von $P_n = 33$ bestätigt werden. Dieser liegt in guter Übereinstimmung mit dem angestrebten Wert von 30 Wiederholungseinheiten und verdeutlicht damit den kontrollierten Charakter der Ringöffnungspolymerisation zur Darstellung von Polypeptiden über NCA-Polymerisation.

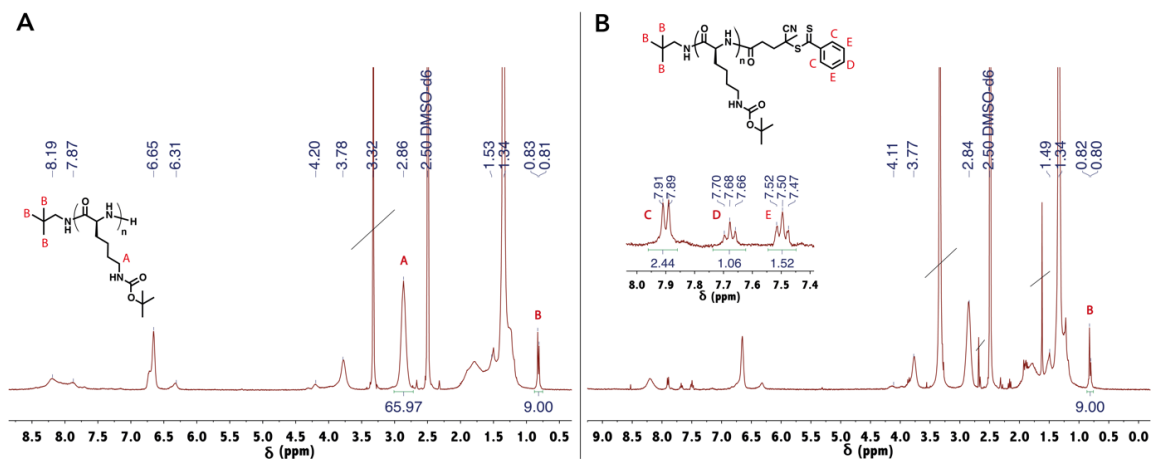


Abbildung 19. $^1\text{H-NMR}$: **A**) P(Lys(Boc)) in DMSO-d_6 . **B**) P(Lys(Boc))-CTA in DMSO-d_6 .

Zur Einführung der Dithiobenzoatgruppe wurde die Aminoendgruppe von P(Lys(Boc)) unter stark basischen Reaktionsbedingungen mit *N,N,N',N'*-Tetramethyl-1,8-Naphthalindiamin und Pentafluorphenyl-4-phenylthiocarbonyl-4-cyanovalerian-

säure umgesetzt. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abbildung 19B) bestätigt im Rahmen der Messgenauigkeit eine vollständige CTA-Endgruppenfunktionalisierung des Lysinpolymers über das Integral der *tert*-Butylgruppe (B) des Initiators und der Integrale der *ortho*- (C), *para*- (D) und *meta*- (E) Phenylprotonen im Verhältnis 2:1:2.

Tabelle 2. Charakterisierung von P(Lys(Boc)) und P(Lys(Boc))-CTA.

	$[\text{M}_0]/[\text{I}_0]$	$X_{\text{n(NMR)}}^{\text{a}}$	$M_{\text{n(NMR)}}^{\text{a}}$ (g/mol)	$M_{\text{n(GPC)}}^{\text{b}}$ (g/mol)	$\bar{D}_{\text{(GPC)}}^{\text{b}}$
P(Lys(Boc))	30	33	7654	8046	1,21
P(Lys(Boc))-CTA	-	33	7916	7590	1,24

a: $^1\text{H-NMR}$ in DMSO-d_6 . b: GPC in HFIP.

Die Charakterisierung der beiden Polymere über Gelpermeationschromatographie (GPC) in Hexafluorisopropanol (HFIP) in Abbildung 20 zeigt sowohl für P(Lys(Boc)) (gestrichelt) als auch für den P(Lys(Boc))-CTA nach der Endgruppenmodifizierung (schwarz) eine monomodale Molekulargewichtsverteilungen mit Dispersitäten von $\bar{D} = 1,21$ bzw. $\bar{D} = 1,24$. Das Signal geringer Intensität im niedermolekularen Bereich bei einem Elutionsvolumen von ca. 20 mL im Elugramm von P(Lys(Boc)) könnte der *coiled*-Konformation des Polylysins zugeordnet werden, die bei relativ geringen Kettenlängen im Bereich von $P_n \sim 30$ zusätzlich neben der α -Helix-Konformation des Polypeptids vorliegt.^[33]

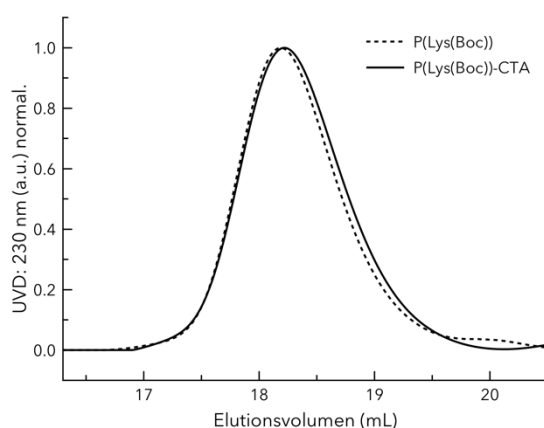


Abbildung 20. GPC in HFIP: P(Lys(Boc)) (gestrichelt) und P(Lys(Boc))-CTA (schwarz).

3.1.2 RAFT-Polymerisation von PFPMA: P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA)

3.1.2.1 Synthese von Pentafluorphenylmethacrylat: PFPMA

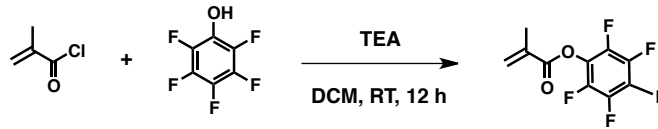


Abbildung 21. Synthese des PFPMA Monomers.

Das Reaktivestermonomer PFPMA wurde wie in Kapitel 5.3 beschrieben nach Literatur hergestellt.^[14] Methacrylsäurechlorid wurde mit Pentafluorphenol in einer basisch katalysierten nukleophilen Substitution mit Triethylamin (TEA) zu Pentafluorphenylmethacrylat umgesetzt (Abbildung 21). Die Charakterisierung über ¹H- und ¹⁹F-NMR-Spektroskopie in Abbildung 22 bestätigt über die zugeordneten Protonensignale (A-C) und Fluorsignale (D-F) eine erfolgreiche Darstellung von PFPMA.

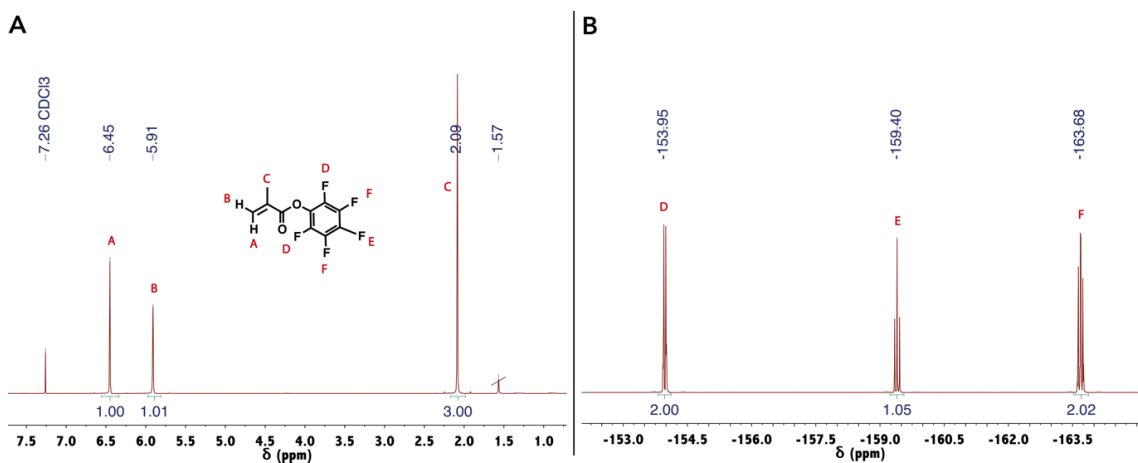


Abbildung 22. **A)** ¹H-NMR von PFPMA in CDCl₃. **B)** ¹⁹F-NMR von PFPMA in CDCl₃.

3.1.2.2 RAFT-Polymerisation von PFPMA mit P(Lys(Boc))-CTA

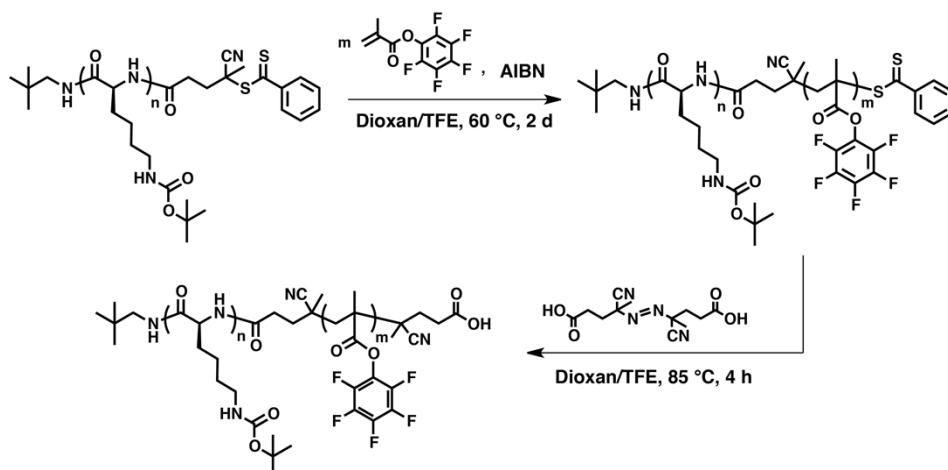


Abbildung 23. RAFT-Polymerisation von PFPMA mit P(Lys(Boc))-CTA und Entfernen der Dithioesterendgruppe.

Die Synthese des P(Lys(Boc))-b-P(PFPMA) Vorläufer-Blockcopolymers erfolgte über RAFT-Polymerisation mit dem in Kapitel 3.1.1 hergestellten makromolekularen Kettentransferreagenz P(Lys(Boc))-CTA und AIBN als Initiator (siehe Abbildung 23). In der RAFT-Polymerisation ist es notwendig mit absolutierten Lösungsmitteln zu arbeiten, da die Anwesenheit von Stabilisatoren die radikalische Polymerisation stören. Deshalb wurde z. B. für alle Aufarbeitungsschritte von P(Lys(Boc)) bzw. P(Lys(Boc))-CTA ausschließlich destillierter Diethylether verwendet. Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit des Pentafluorphenylesters ist sowohl bei der PFPMA-Polymerisation als auch bei den anschließenden polymeranalogen Reaktionen darauf zu achten, mit wasserfreien Lösungsmitteln und Reagenzien zu arbeiten.^[25] Als Lösungsmittel für die RAFT-Polymerisation wurde ein Gemisch aus abs. 1,4-Dioxan und abs. Trifluorethanol (TFE) im Verhältnis 5:1 verwendet, wobei letzteres als polar protisches Lösungsmittel die Löslichkeit von P(Lys(Boc))-CTA verbesserte.

Die Reaktionslösung aus Monomer, CTA und Initiator wurde dreimal unter Stickstoff eingefroren und am Hochvakuum entgast. Über diese sogenannten *freeze-pump-thaw*-Zyklen kann gelöster Sauerstoff, der als Diradikal die kontrollierte radikalische Polymerisation stört, aus der Reaktionslösung entfernt werden.

Für die spätere Anwendung der P(Lys(Boc))-b-P(HPMA) Blockcopolymere als polymerbasierte Vektoren zur Komplexbildung von Nukleinsäuren hat sich ein geeignetes Blocklängenverhältnis von 1:6 herausgestellt.^[87] Demnach wurde für das P(Lys(Boc))-b-P(PFPMA) Vorläufer-Polymer mit einem Poly-L-lysin-Block von ca. 30 Wiederholungseinheiten ein Polymerisationsgrad des PFPMA-Blocks von 180 Einheiten angestrebt. Unter der Annahme eines Polymerisationsumsatzes von 50 % ($p = 0,5$)

wurden unter Berücksichtigung von Gl. 2 Monomer, CTA und Initiator in einem typischen Reaktionsansatz im Verhältnis (360:1:1/3) eingesetzt (vgl. Kapitel 5.5.1).

$$P_n = \frac{p \cdot [M_0]}{[CTA_0]} \quad (2)$$

In klassischen RAFT-Polymerisationen mit niedermolekularen Kettentransferreaktionen liegt das Verhältnis von Initiator zu CTA zwischen 1:10 bis 1:5. Für eine erfolgreiche RAFT-Polymerisation von PFPMA mit P(Lys(Boc)) als makromolekularem CTA nach Abbildung 23 wurde der Initiatoranteil erhöht und die Polymerisation erfolgte bei einem Initiator zu CTA Verhältnis von 1:3.

Der Reaktionsfortschritt der RAFT-Polymerisation konnte aufgrund des fluorierten Monomers mittels ^{19}F -NMR-Spektroskopie verfolgt werden (siehe Abbildung 24). Nach zwei Tagen war kein Fortschreiten der Reaktion mehr zu detektieren und die Polymerisation wurde bei durchschnittlichen Umsätzen zwischen 30-45 % beendet. Die Fluor-Signale des Monomers treten als scharfe Signale auf (A, B und C), wohingegen die Fluor-Signale von polymerisiertem PFPMA aufgrund der erhöhten Relaxationszeiten als verbreiterte Signale auftreten (a, b und c). Die Berechnung des Umsatzes erfolgte am *para*-Fluoratom (B, b) durch das Verhältnis des Integrals (b) zum Integral aus (B+b) und bestätigte einen Umsatz von 46 %. Somit ergab sich für den PFPMA-Block nach Gleichung 2 mit $p = 0,46$ ein Polymerisationsgrad von $P_n = 165$. Demnach wurde für das P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA) Vorläufer-Polymer ein Blocklängenverhältnis von 33:165 (1:5) erhalten.

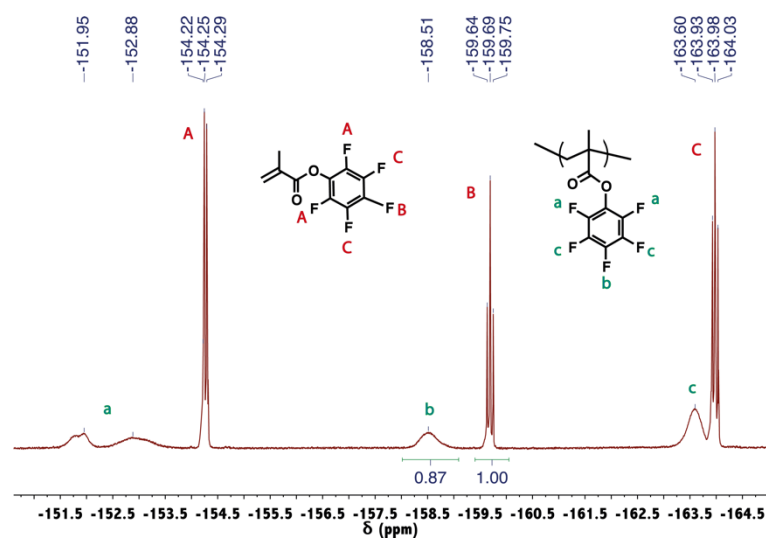


Abbildung 24. ^{19}F -NMR: Umsatz der RAFT-Polymerisation von PFPMA in CDCl_3 .

Das Entfernen der über den CTA eingeführten Dithiobenzoatgruppe des Reaktivester-Blockcopolymers erfolgte über die Umsetzung mit einem Überschuss an ACVA (4,4'-Azobis(4-cyanovaleriansäure)) als Diazoverbindung in einer radikalischen Substitutionsreaktion (siehe Abbildung 23). Dies ist notwendig, um unerwünschte Nebenreaktionen in den folgenden polymeranalogen Umsetzungen zu vermeiden, da die Dithioestereinheit für viele Nucleophile ein reaktives elektrophiles Reaktionszentrum bietet.^[218] Darüber hinaus ist eine zelltoxische Wirkung der Dithioesterendgruppe von RAFT-Polymeren bekannt.^[219] Die Umsetzung des Blockcopolymers mit ACVA als entsprechende Diazoverbindung bietet die Möglichkeit zur Einführung einer endständigen Carboxylgruppe, die in weiteren Reaktionen zur Endgruppenmodifizierung verwendet wurde (vgl. Kapitel 3.1.4.2).

Die charakteristische Rosafärbung des Reaktivester-Blockcopolymers wird durch die Dithiobenzoatgruppe hervorgerufen und kann über UV/VIS-Spektroskopie mittels der Absorptionsbanden bei 303 nm und 503 nm detektiert werden.^[220] Somit konnte das erfolgreiche Entfernen der CTA-Dithioesterendgruppe in P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA)-CTA (gestrichelt) über das Verschwinden der jeweiligen Signale bei 303 nm bzw. 503 nm für P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA) (schwarz) über UV/VIS-Spektroskopie nachgewiesen werden (Abbildung 25).

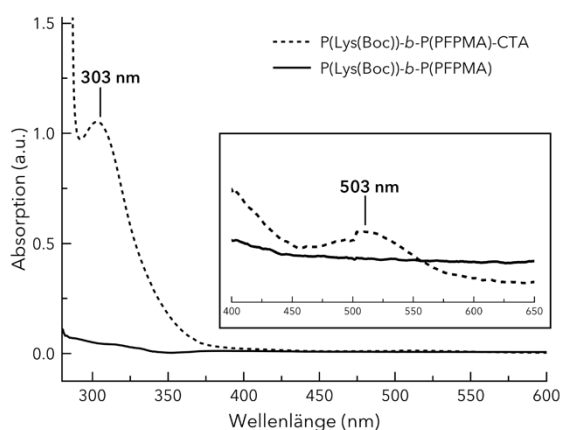


Abbildung 25. UV/VIS-Spektren von P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA)-CTA (gestrichelt) und P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA) (schwarz) in THF.

Die Reaktivester-Blockcopolymere P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA)-CTA und P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA) wurden vor und nach Entfernen der Dithiobenzoatgruppe über GPC in THF analysiert (Abbildung 26). Das Entfernen der CTA-Gruppe in der radikalischen Substitutionsreaktion mit ACVA zeigt keinen Einfluss auf die Integrität des Blockcopolymers. In beiden Fällen ergaben sich monomodale Molekulargewichtsverteilungen mit Dispersität von 1,68 bzw. 1,52.

Tabelle 3. Charakterisierung von P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA)-CTA und P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA).

	[Lys]/ [PFPMA]	$X_n(\text{Lys(Boc)})/$ $X_n(\text{PFPMA})_{(\text{NMR})}^a$	$M_{n(\text{NMR})}^a$ (g/mol)	$M_{n(\text{GPC})}^b$ (g/mol)	$\mathcal{D}_{(\text{GPC})}^b$
P(Lys(Boc))- <i>b</i> -P(PFPMA)-CTA	1:5	33:165	49 496	33 774	1,68
P(Lys(Boc))- <i>b</i> -P(PFPMA)	1:5	33:165	49 469	36109	1,52

a: Berechnet über ^{19}F -Umsatz-NMR von P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA). b: GPC in THF.

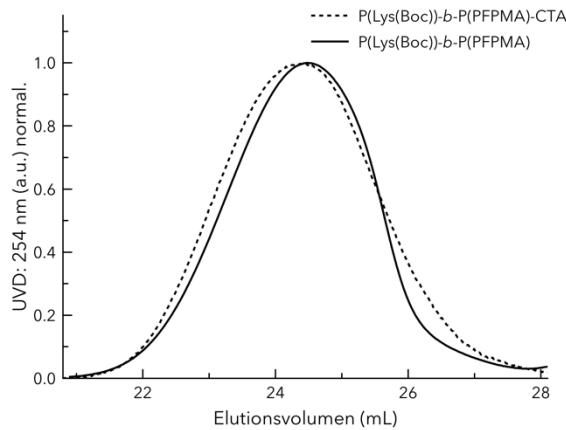


Abbildung 26. GPC in THF: P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA)-CTA (gestrichelt) und P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA) (schwarz).

Zusammenfassend konnten P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA) Blockcopolymerer über RAFT-Polymerisation des Reaktivestermonomers PFPMA mit dem polypeptidischen Kettentranferreagenz P(Lys(Boc))-CTA in einem Blocklängenverhältnis von 1:5 erfolgreich hergestellt werden. In einer radikalischen Substitutionsreaktion mit ACVA wurde die Dithiobenzoatgruppe entfernt und eine endständige Carboxylgruppe eingeführt.

In folgenden Kapiteln wird die polymeranaloge Umsetzung der PFPMA-Einheit zum hydrophilen, biokompatiblen P(HPMA) beschrieben sowie die Azidendgruppenfunktionalisierung und die statistische Azidmodifizierung innerhalb der HPMA-Einheit.

3.1.3 Polymeranaloge Umsetzung zu P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)

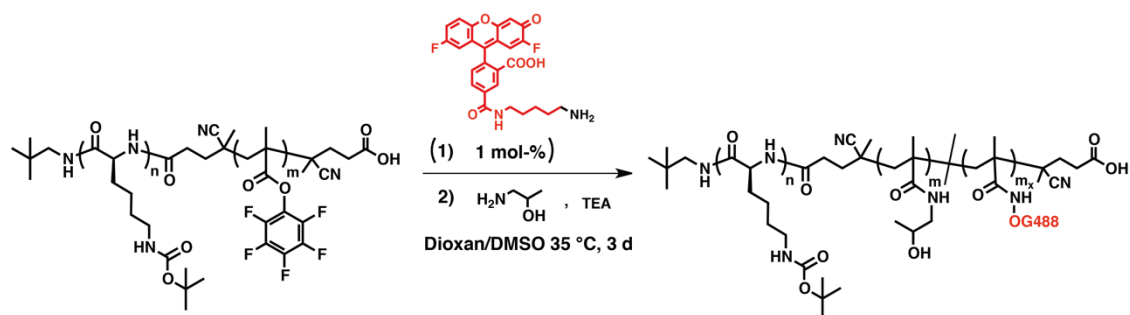


Abbildung 27. Polymeranaloge Umsetzung von P(Lys(Boc))-b-P(PFPMA) zu P(Lys(Boc))-b-P(HPMA).

Wie in Kapitel 1.1.1.1 erläutert, bietet der Reaktivesteransatz über Poly(pentafluorphenylmethacrylat) als Vorläufer-Polymer die Möglichkeit zur Synthese multifunktionaler Polyamide.^[14,25] Über Aminolyse mit 2-Hydroxypropylamin (HPA) unter basischer Katalyse mit Triethylamin wurde das P(Lys(Boc))-b-P(PFPMA) Vorläufer-Blockcopolymer zu P(Lys(Boc))-b-P(HPMA) polymeranalog umgesetzt (Abbildung 27). Optional wurde der aminfunktionalisierte Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green 488 Cadaverin (OG488), vor der Umsetzung mit HPA in Stoffmengenkonzentrationen von 0,5-1 mol-% über Aminolyse des PFP-Reaktivesters in das P(Lys(Boc))-b-P(HPMA) Blockcopolymer eingebracht (Abbildung 27, rote Struktur).

Die vollständige Umsetzung des PFPMA-Blocks wurde mittels ¹⁹F-NMR-Spektroskopie unmittelbar aus der Reaktionslösung überprüft (Abbildung 28A). Das bei der polymeranalogen Umsetzung frei werdende Pentafluorphenolat, das als Triethylamin-Salz vorliegt, kann über drei scharfe Signale der *ortho*-, *meta*- und *para*-Fluoratome (a, b und c) detektiert werden. Vergleichend mit Abbildung 24 liegen keine verbreiterten Fluor-Signale des PFPMA-Polymers mehr vor und bestätigen somit eine vollständige Umsetzung des polymeren Reaktivesters. Des Weiteren haben sich auch die chemischen Verschiebungen der Fluoratome im PFPMA-Monomer (Abbildung 24) von -154 ppm (*ortho*-F), -159 ppm (*para*-F) und -163 ppm (*meta*-F) im Vergleich zum Pentafluorphenolat mit -169 ppm (*ortho*-F), -170 ppm (*meta*-F) und -185 ppm (*para*-F) deutlich verändert.

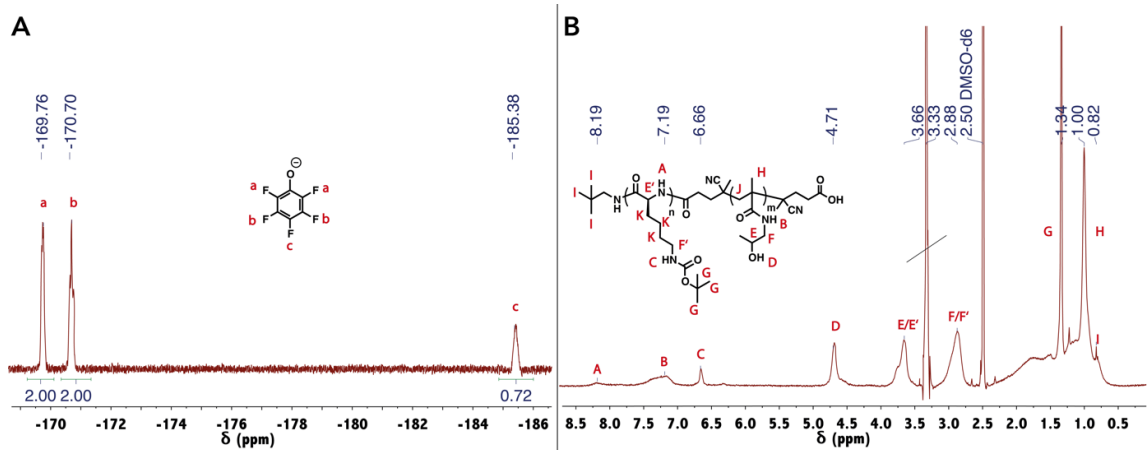


Abbildung 28. **A)** ^{19}F -NMR: Umsatzkontrolle der polymeranalogen Umsetzung in DMSO-d_6 . **B)** ^1H -NMR von $\text{P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)}$ in DMSO-d_6 .

Abbildung 28B zeigt das ^1H -NMR-Spektrum des gefällten $\text{P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)}$ Blockcopolymer. Im Allgemeinen ist die Berechnung des Blocklängenverhältnisses bzw. des Molekulargewichtes anhand des ^1H -NMR-Spektrums nicht möglich, da sich einige charakteristische Protonensignale beider Blöcke überlagern (siehe Signal E/E' und F/F'). Die Signale (A-D) entsprechen Amid- bzw. Hydroxylprotonen und eignen sich aufgrund ihrer oft verbreiterten Signalform weniger gut. Auch das Endgruppensignal der *tert*-Butylgruppe des Poly-L-lysin-Blocks (I: 0,82 ppm) liegt unter dem verbreiterten Signal zwischen 0,8-2,3 ppm der Protonen des HPMA-Polymerückgrats (H, J) und den Methylengruppen (K) der Polylysinseitenkette. Deshalb wurde das Molekulargewicht des $\text{P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)}$ Blockcopolymer über das Blocklängenverhältnis von 1:5 (Abbildung 24, Tabelle 3) des Vorläufer-Blockcopolymer $\text{P(Lys(Boc))-b-P(PFPMA)}$ mit dem Molekulargewicht der HPMA-Wiederholungseinheit berechnet ($M_n = 31\,517\text{ g/mol}$; vgl. Tabelle 4).

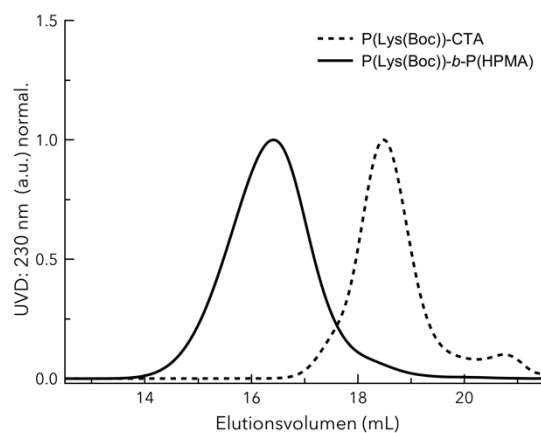


Abbildung 29. GPC in HFIP: P(Lys(Boc))-CTA (gestrichelt) und $\text{P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)}$ (schwarz).

Hexafluorisopropanol stellt sowohl für Polypeptide, wie Polylysin, als auch für HPMA-basierte Polymere ein gutes Lösungsmittel dar. Abbildung 29 zeigt die Charakterisierung des P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA) Blockcopolymers über Gelpermeationschromatographie in HFIP. Das Elugramm von P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA) (schwarz) mit einem Maximum bei 16,4 mL ist im Vergleich zum P(Lys(Boc))-CTA (gestrichelt) bei 18,5 mL deutlich zu geringeren Elutionsvolumina verschoben. Dies geht mit einer Zunahme des Molekulargewichtes einher und bestätigt die erfolgreiche Blockcopolymerisation von P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA) über RAFT-Polymerisation von PFPMA mit P(Lys(Boc)) als makromolekularem Kettentransferreagenz und anschließender polymeranaloger Umsetzung. Für das P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer zeigt sich eine monomodale Molekulargewichtsverteilung mit einer Dispersität von 1,41.

3.1.4 Azidfunktionalisierung zu P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) und P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(end)

Die bioorthogonale Konjugation von Polyplexen aus P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA) und DBCO-funktionalisierten DEC205-Antikörpern über SPAAC nach dem Schema in Abbildung 15 erfordert die Einführung von Azidgruppen in die P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA) Blockcopolymeren. Es wurden zwei azidfunktionalisierte Blockcopolymeren über unterschiedliche polymeranaloge Reaktionen hergestellt, die sich in Anzahl und Position der Azidgruppen unterscheiden.

3.1.4.1 Synthese von P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(stat)

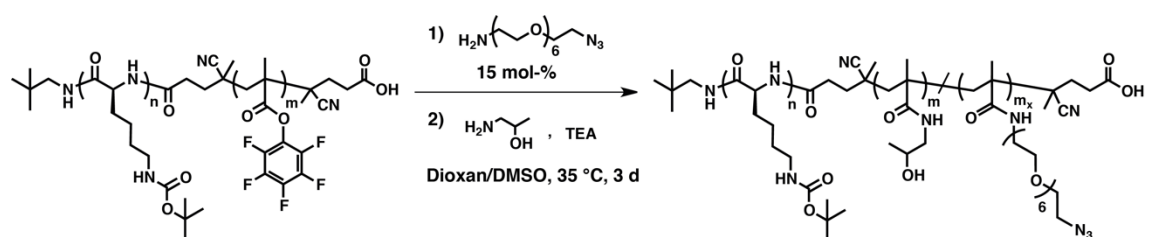


Abbildung 30. Polymeranaloge Umsetzung von P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA) zu P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(stat).

Der PFPMA Reaktivesteransatz wurde entsprechend Abbildung 30 zur Einführung von statistisch verteilten Azidgruppen in den P(HPMA)-Block über Aminolyse verwendet. Dafür wurde das P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA) Vorläufer-Blockcopolymer vor der Umsetzung mit HPA mit 15 mol-%, bezogen auf die PFPMA Reaktivestereinheiten, mit NH₂-PEG₆-N₃ (O-(2-aminoethyl)-O'-(2-azidoethyl)-pentaethylenglykol) umgesetzt. Die sechs Polyethylenglykoleinheiten innerhalb der verwendeten Verbindung sollen als

hydrophiler, flexibler Linker eine gute Zugänglichkeit der Azidgruppen sowohl im Blockcopolymer als auch im Polyplex für nachfolgende Konjugationsreaktionen über SPAAC ermöglichen.

Die erfolgreiche Azidfunktionalisierung des resultierenden P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) Blockcopolymers konnte qualitativ über IR-Spektroskopie nachgewiesen werden (Abbildung 31). Das Spektrum des P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) Blockcopolymers (schwarz) weist im Vergleich zum Spektrum des unfunktionalisierten Blockcopolymers eine zusätzliche Bande bei einer Wellenzahl von ca. 2100 cm⁻¹ auf, die der N₃-Valenzschwingung zuzuordnen ist ($\nu = 2160\text{-}2120\text{ cm}^{-1}$).^[221]

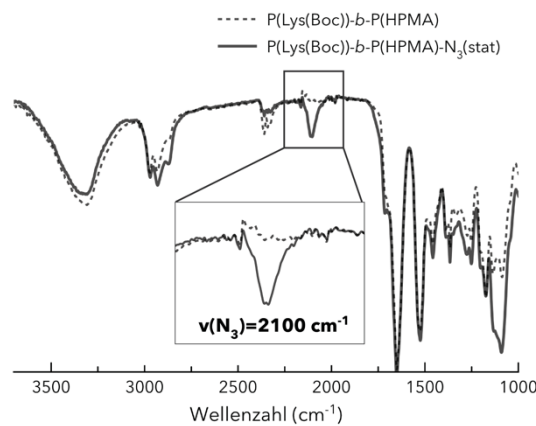


Abbildung 31. IR-Spektrum: P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA) (gestrichelt) und P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) (schwarz).

Im Vergleich zum Blockcopolymer ohne Azidmodifizierung (Abbildung 32A) zeigen die ¹H-NMR-Spektren beider azidfunktionalisierten Blockcopolymere: P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) (B) und P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(end) (C) (Kapitel 3.1.4.2) ein zusätzliches Signal bei einer chemischen Verschiebung von 3,51 ppm auf. Dieses Signal entspricht den Methylengruppen des NH₂-PEG₆-N₃-Linkers, der in beiden polymeranalogen Reaktionen zur Azidmodifizierung verwendet wurde (vgl. Abbildung 16).

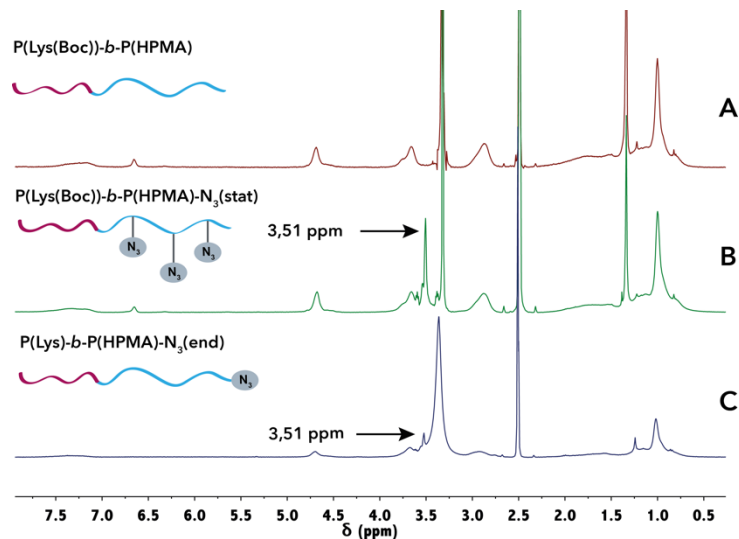
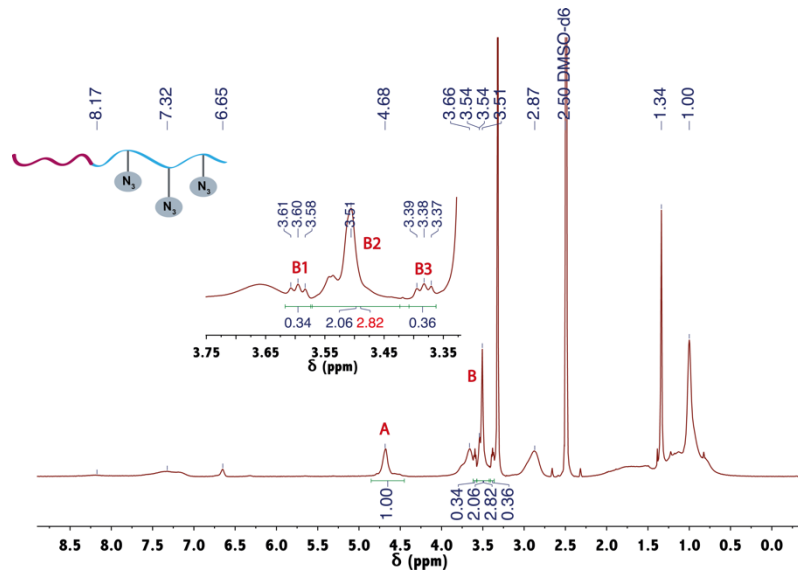
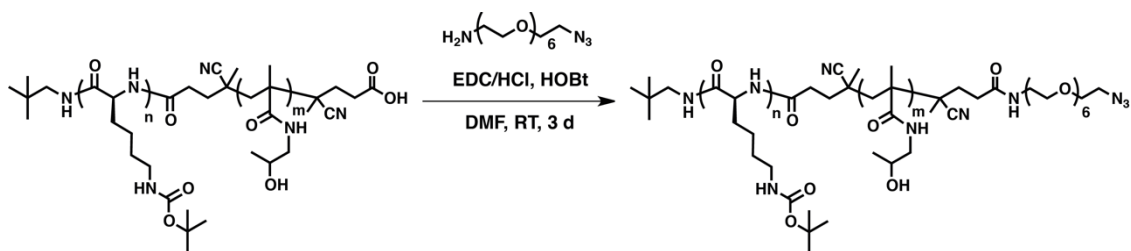


Abbildung 32. $^1\text{H-NMR}$: **A)** $\text{P(Lys(Boc))-}b\text{-P(HPMA)}$. **B)** $\text{P(Lys(Boc))-}b\text{-P(HPMA)-N}_3\text{(stat)}$. **C)** $\text{P(Lys)-}b\text{-P(HPMA)-N}_3\text{(end)}$ in DMSO-d_6 .

Bei genauerer Betrachtung des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums des statisch azidfunktionalisierten $\text{P(Lys(Boc))-}b\text{-P(HPMA)-N}_3\text{(stat)}$ Blockcopolymers in Abbildung 33 sind die Signale zwischen 3,61 ppm und 3,37 ppm (B1-B3) zwölf von vierzehn Methylengruppen des verwendeten $\text{NH}_2\text{-PEG}_6\text{-N}_3$ -Linkers zuzuordnen. Über das Verhältnis von Integral B (B1-B3) mit 2,82 für 24 Protonen zum Integral von Signal A bei 4,68 ppm, das dem Proton der Hydroxylgruppe der P(HPMA) -Einheit entspricht, lässt sich die statistische Azidfunktionalisierung mit 10,5 % im $\text{P(Lys(Boc))-}b\text{-P(HPMA)-N}_3\text{(stat)}$ Blockcopolymers quantifizieren. Bei einem Blocklängenverhältnis von 1:5 mit 165 HPMA -Wiederholungseinheiten, entspricht das einer Anzahl von ca. 17 Azidgruppen im $\text{P(Lys(Boc))-}b\text{-P(HPMA)-N}_3\text{(stat)}$ Blockcopolymer. Im Rahmen der Messgenauigkeit für das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in Abbildung 33 und der Wahl des Hydroxylgruppensignals (A) als unabhängiges Signal der P(HPMA) -Einheit, liegt der berechnete Wert von 10,5 % für die Azidfunktionalisierung in guter Annäherung mit dem angestrebten Wert von 15 %.

Abbildung 33. $^1\text{H-NMR}$: P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)- $\text{N}_3(\text{stat})$ in DMSO-d_6 .

3.1.4.2 Synthese von P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)- $\text{N}_3(\text{end})$

Abbildung 34. Azidendgruppenfunktionalisierung von P(Lys(Boc))-b-P(HPMA) zu P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)- $\text{N}_3(\text{end})$.

Nach der polymeranalogen Umsetzung zu P(Lys(Boc))-b-P(HPMA) wurde die endständige Carboxylgruppe am P(HPMA)-Block über einer Amidkupplung zur Anbindung einer Azidgruppe genutzt. Dabei diente der bifunktionale Linker $\text{NH}_2\text{-PEG}_6\text{-N}_3$ als Aminkomponente, der ebenfalls in der statistischen Azidmodifizierung zum Einsatz kam. In einer klassischen Amidkupplung wurde über das Kupplungsreagenz 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid (EDC) die Carboxylgruppe aktiviert und mit 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) *in situ* ein Reaktivester gebildet, der anschließend in einer nukleophilen Substitution mit dem $\text{NH}_2\text{-PEG}_6\text{-N}_3$ -Amin umgesetzt wurde (Abbildung 34).

Der qualitative Nachweis der Azidgruppe über IR-Spektroskopie, in Analogie zu P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)- $\text{N}_3(\text{stat})$ (Abbildung 31) war für das P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)- $\text{N}_3(\text{end})$ Blockcopolymer nicht möglich. Dies ist wahrscheinlich auf die geringe Anzahl

von nur einer Azidfunktionalität innerhalb des Blockcopolymers zurückzuführen. Aus diesem Grund erfolgte der Nachweis der endständigen Azidgruppe über die Reaktion mit einem DBCO-funktionalisierten Fluoreszenzfarbstoff (Texas Red) und anschließender Charakterisierung über GPC mit UV-Detektion bei unterschiedlichen Wellenlängen (Abbildung 35).

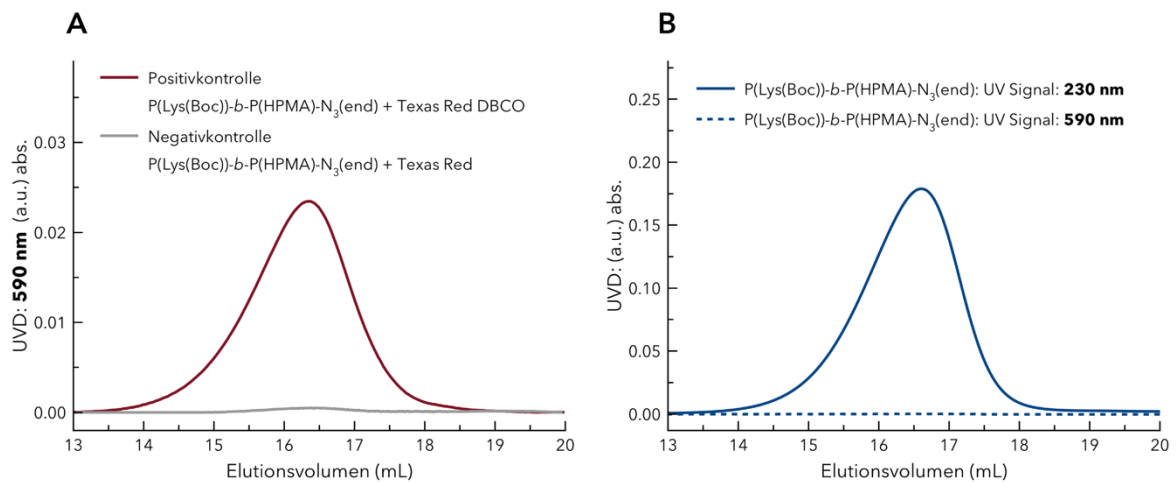


Abbildung 35. GPC in HFIP: **A**) UVD (590 nm): Positivkontrolle: P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)₃(end) mit Texas Red DBCO (rot), Negativkontrolle: P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)₃(end) mit Texas Red (grau). **B**) P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)-N₃(end) bei 230 nm (blau) und bei 590 nm (blau gestrichelt).

In einem ersten Schritt wurde über die Reaktion der Aminogruppe des Fluoreszenzfarbstoffs Texas Red Cadaverin mit Dibenzocyclooctin-PEG₄-N-Hydroxysuccinimidylester (DBCO-PEG₄-NHS) eine DBCO-Funktionalität eingeführt. Dieser DBCO-modifizierte Farbstoff wurde anschließend mit P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)-N₃(end) in einer SPAAC zur Reaktion gebracht. In einer Negativkontrolle wurde das P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)-N₃(end) Blockcopolymer unter den gleichen Reaktionsbedingungen mit Texas Red Cadaverin ohne DBCO-Gruppe umgesetzt. Zur Abtrennung von freiem, nicht umgesetzten Farbstoff wurden beide Ansätze über Dialyse aufgereinigt, lyophilisiert und über GPC in HFIP charakterisiert.

Abbildung 35A zeigt für die Umsetzung von P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)-N₃(end) und Texas Red DBCO (rot) eine Absorption des Blockcopolymers über UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 590 nm, die charakteristisch für den Anregungsbereich von Texas Red ist ($\alpha_{\max} = 596 \text{ nm}$). Somit konnte eine erfolgreiche SPAAC zwischen beiden Komponenten bestätigt werden und liefert rückschließend einen qualitativen Nachweis der Azidgruppenmodifizierung von P(Lys(Boc))-b-P(HPMA) nach Abbildung 34. Das Spektrum der Negativkontrolle (grau) zeigt bei 590 nm keine Absorption im Bereich des Blockcopolymers und schließt damit eine unspezifische Anlagerung des Farbstoffs, z. B. über ionische Wechselwirkungen aus.

Abbildung 35B zeigt für das P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(end) Blockcopolymer selbst ein Absorptionsmaximum bei einem Elutionsvolumen von 16,5 mL über UV-Detektion bei 230 nm (blau). Diese ist auf die charakteristische Absorption der Amidgruppen im Blockcopolymer zurückzuführen. Hingegen tritt bei einer Wellenlänge von 590 nm für das Blockcopolymer selbst keine Absorption auf (blau gestrichelt), die den qualitativen Nachweis der Azidgruppe durch Anbindung von Texas Red DBCO über UV-Detektion bei 590 nm in Abbildung 35A möglich machte.

Neben dem qualitativen Nachweis der Azidgruppe von P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(end) über die SPAAC-Reaktion mit Texas Red DBCO erfolgte eine quantitative Analytik über ¹H-NMR-Spektroskopie. Wie in Abbildung 36 dargestellt, zeigt sich auch im ¹H-NMR-Spektrum von P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(end) ein Signal bei 3,52 ppm (B) der Methylengruppen des verwendeten Azidlinkers NH₂-PEG₆-N₃. Eine Quantifizierung der endständigen Azidfunktionalisierung anhand dieses Signals analog zu P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) in Abbildung 33 ist aufgrund der geringen Signalintensität und der partiellen Überlagerung mit dem breiten Wassersignal bei 3,36 ppm sehr ungenau. Somit stellt die Berechnung eines Funktionalisierungsgrades von ca. 7 % im P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(end) Blockcopolymer nur eine grobe Näherung dar.

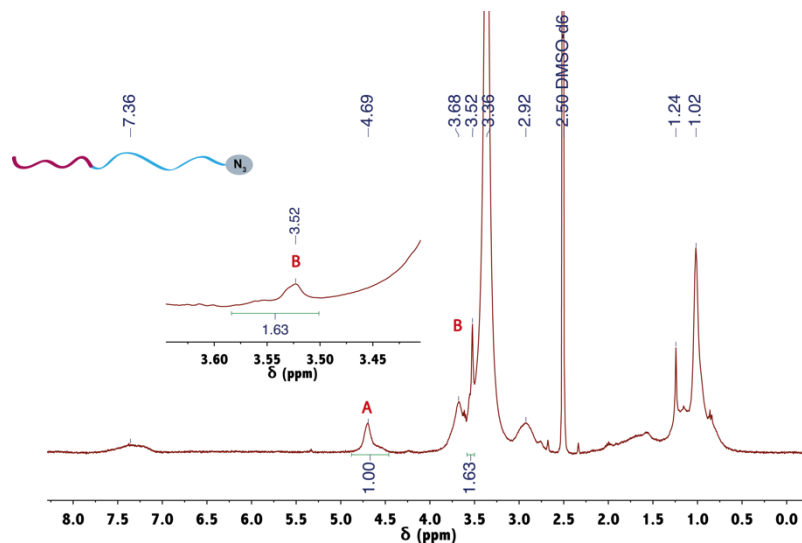


Abbildung 36. ¹H-NMR: P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(end) in DMSO-d₆.

Unter Berücksichtigung der über ¹H-NMR-Spektroskopie ermittelten Azidfunktionalisierungsgrade und über das Blocklängenverhältnis von 1:5 wurden für die Blockcopolymere P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) und P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(end) Molekulargewichte von 36 197 g/mol bzw. 31 540 g/mol erhalten (Tabelle 4).

Tabelle 4. Charakterisierung von P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA), P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) und P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(end).

	[Lys]/ [HPMA] ^a	X _n (Lys(Boc))/ X _n (HPMA) _(NMR) ^a	M _n (NMR) ^a (g/mol)	M _n (GPC) ^b (g/mol)	Đ _(GPC) ^b
P(Lys(Boc))- <i>b</i> -P(HPMA)	1:5	33:165	31 517	44 675	1,41
P(Lys(Boc))- <i>b</i> -P(HPMA)-N ₃ (stat)	1:5	33:165	36 197*	51 165	1,53
P(Lys(Boc))- <i>b</i> -P(HPMA)-N ₃ (end)	1:5	33:165	31 540**	48 579	1,58

a: Berechnet über ¹⁹F-Umsatz-NMR von P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA). b: GPC in HFIP.

*/** Berechnung unter Berücksichtigung der Azidfunktionalisierung (*10,5 % im P(HPMA)-Block und 7 % Endgruppe).

Die Charakterisierung der azidfunktionalisierten Blockcopolymeren P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) (rosa) und P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(end) (violett) über GPC in HFIP in Abbildung 37 bestätigt monomodale Molekulargewichtsverteilungen mit Polydispersitäten von 1,53 bzw. 1,58 (vgl. Tabelle 4). Beide azidfunktionalisierten Blockcopolymeren wurden ebenfalls mit OG488 über den Reaktivesteransatz fluoreszenzmarkiert (vgl. Abbildung 27).

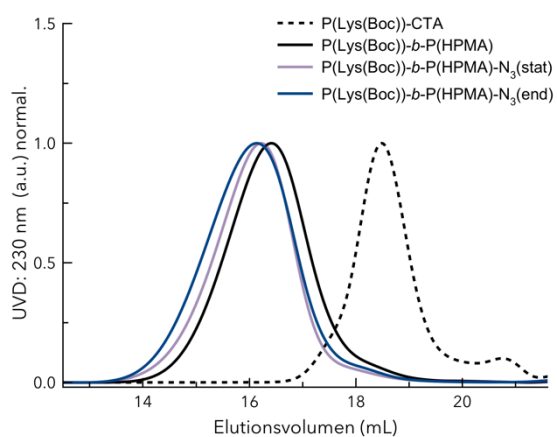


Abbildung 37. GPC in HFIP: P(Lys(Boc))-CTA (gestrichelt), P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA) (schwarz), P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) (rosa) und P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(end) (violett).

3.1.5 Boc-Entschützung der P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA) Blockcopolymeren

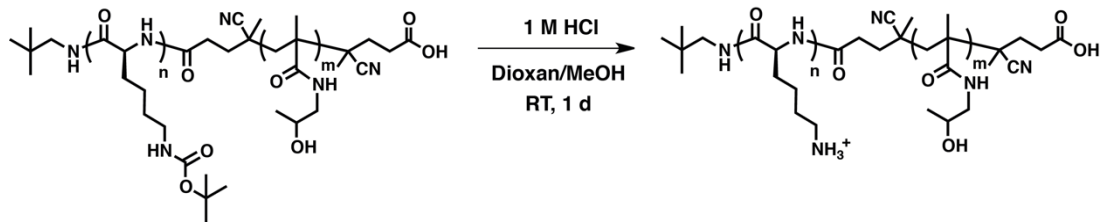


Abbildung 38. Boc-Entschützung von P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA) zu P(Lys)-*b*-P(HPMA).

Der abschließende Schritt in der Synthese der P(Lys)-*b*-P(HPMA) Polymere ist das Entfernen der Boc-Schutzgruppe im Poly-L-lysin-Block zur Generierung kationischer Blockcopolymeren. Die Entschützung erfolgte unter HCl-sauren Reaktionsbedingungen unter Freisetzung von CO₂ und Isobuten (Abbildung 38). Analog dazu wurden auch die azidfunktionalisierten Blockcopolymeren P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) und P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(end) entschützt (vgl. Abbildung 16, 5b und 6b).

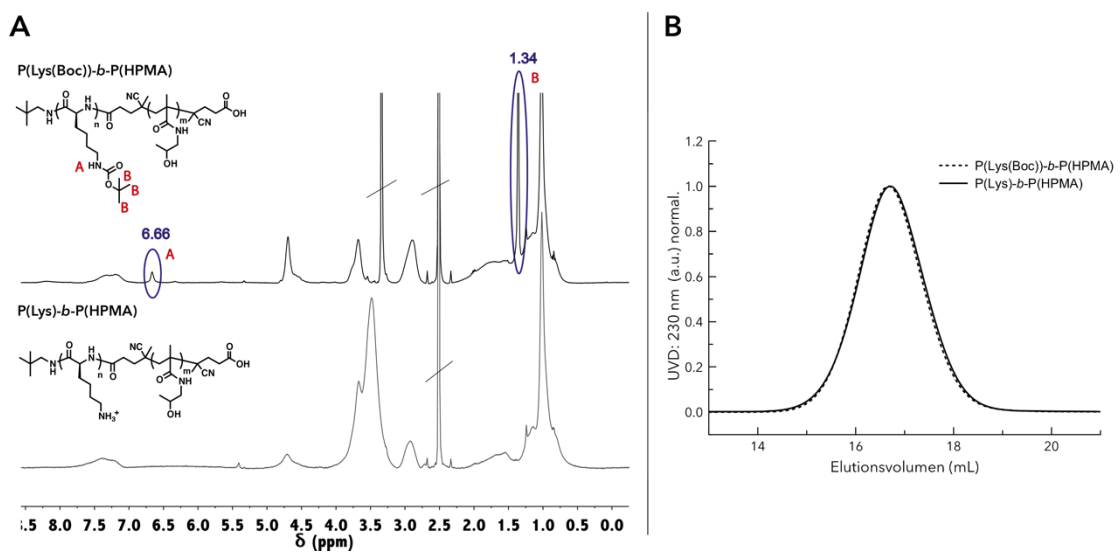


Abbildung 39. **A)** ¹H-NMR: P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA) (oben) und P(Lys)-*b*-P(HPMA) (unten) in DMSO-*d*₆. **B)** GPC in HFIP: P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA) (gestrichelt) und P(Lys)-*b*-P(HPMA) (schwarz).

Das Entfernen der Boc-Schutzgruppe wurde über ¹H-NMR-Spektroskopie nachgewiesen. Abbildung 39A zeigt am Beispiel von P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA) (oben) eine erfolgreiche Boc-Entschützung durch das Verschwinden der Protonensignale (A) bei 6,66 ppm der Amidgruppe sowie der *tert*-Butylgruppe (B) bei 1,34 ppm zu P(Lys)-*b*-P(HPMA) (unten) an. Das GPC-Elugramm in Abbildung 39B bestätigt ebenfalls am Beispiel von P(Lys)-*b*-P(HPMA) den Erhalt der Integrität der Blockcopolymeren nach der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe unter sauren Reaktionsbedingungen.

Die berechneten Molekulargewichte der entschützten Blockcopolymere: P(Lys)-*b*-P(HPMA), P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) und P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(end) sowie die über GPC ermittelten Molekulargewichte und Dispersitäten sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5. Charakterisierung von P(Lys)-*b*-P(HPMA), P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) und P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(end).

	[Lys]/ [HPMA] ^a	X _n (Lys)/ X _n (HPMA) _(NMR) ^a	M _{n(NMR)} ^a (g/mol)	M _{n(GPC)} ^b (g/mol)	D _(GPC) ^b
P(Lys)- <i>b</i> -P(HPMA)	1:5	33:165	28 094	31 618	1,42
P(Lys)- <i>b</i> -P(HPMA)- N ₃ (stat)	1:5	33:165	32 861*	44 853	1,51
P(Lys)- <i>b</i> -P(HPMA)- N ₃ (end)	1:5	33:165	28 123**	34 371	1,58

a: Berechnet über ¹⁹F-Umsatz-NMR von P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA). b: GPC in HFIP.

*/** Berechnung unter Berücksichtigung der Azidfunktionalisierung (*10,5 % im P(HPMA)-Block und 7 % Endgruppe).

Zusammenfassend wurden über kombinierte Polymerisationstechniken von NCA- und RAFT-Polymerisation mit anschließenden polymeranalogen Umsetzungen P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymere mit einem Blocklängenverhältnis von 1:5 (33:165) erfolgreich hergestellt. Die statistische Azidfunktionalisierung in P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) wurde qualitativ über IR-Spektroskopie nachgewiesen und über ¹H-NMR-Spektroskopie mit 10,5 % (~17 Azidgruppen pro Blockcopolymer) quantifiziert. Der Nachweis der endständigen Azidgruppe in P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(end) erfolgte über die Reaktion mit einem DBCO-modifizierten Fluoreszenzfarbstoff und wurde mittels GPC charakterisiert. In grober Näherung konnte im ¹H-NMR-Spektrum ein Funktionalisierungsgrad von ca. 7% bestimmt werden.

Die Molekulargewichte zwischen 28 000 und 33 000 g/mol für die Blockcopolymere P(Lys)-*b*-P(HPMA), P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) und P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(end) in Tabelle 5 wurden über NMR-Spektroskopie (¹H-NMR von P(Lys(Boc))); vgl. Abbildung 19 A und ¹⁹F-Umsatz-NMR von PFPMA-Polymerisation; vgl. Abbildung 24) unter Einbezug aller polymeranalogen Reaktionen berechnet. Die Charakterisierung der P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymere über GPC ergab monomodale Molekulargewichtsverteilungen mit Dispersitäten zwischen 1,4 und 1,6.

3.2 Synthese des Hydrazon-CTAs

In einem Nebenprojekt wurde die Synthese eines hydrazonfunktionalisierten Poly-L-lysin-CTAs evaluiert (siehe Abbildung 40). Der Einbau einer säurelabilen Hydrazongruppe zwischen dem kationischen Poly-L-lysin-Block und der hydrophilen Poly(HPMA)-Einheit soll die endosomale Freisetzung des Polyplexes begünstigen und damit die Transfektionseffizienz des Systems steigern (vgl. Kapitel 1.2.2). Hydrazone sind unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4) stabil und können bei pH-Werten zwischen 5-6, wie sie in den endosomalen Kompartimenten vorherrschen, gespalten werden^[112]. Die pH-induzierte Hydrolyse des Hydrazons soll eine Abspaltung der hydrophilen P(HPMA)-Hülle bewirken und über elektrostatische Wechselwirkungen des kationischen Polyplexes mit der negativ geladenen Endosomenmembran die Freisetzung ins Zytosol unterstützen.

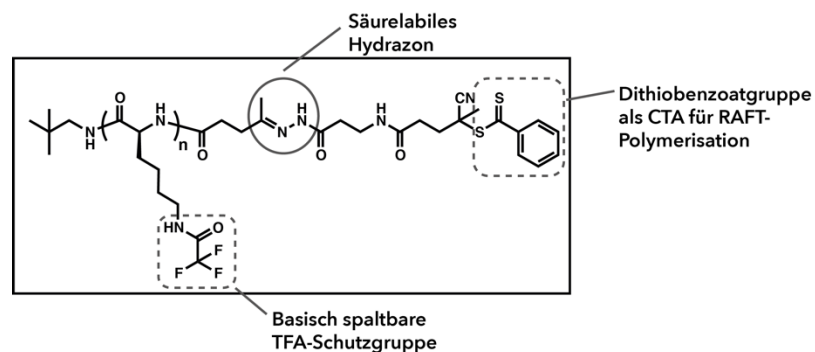


Abbildung 40. P(Lys(TFA))-hydrazon-CTA.

Neben der säurespaltbaren Hydrazongruppe, sollte der pH-sensitive Polylysin-CTA mit einer funktionalen Gruppe zur RAFT-Polymerisation, hier der Dithiobenzoatgruppe, ausgestattet werden (Abbildung 40). Die im letzten Syntheseschritt bei der Blockcopolymersynthese durchgeführte Boc-Entschützung der Polylysineinheit (vgl. Abbildung 16) unter sauren Reaktionsbedingungen ist für P(Lys)-*b*-P(HPMA) mit säurelabiler Hydrazongruppe nicht möglich. Deshalb wurde Poly-L-lysin mit Trifluoroacetat-(TFA) Schutzgruppe der ϵ -Aminoseitenkette über NCA-Polymerisation hergestellt, wobei die TFA-Entschützung unter milden basischen Reaktionsbedingungen erfolgen kann.^[38]

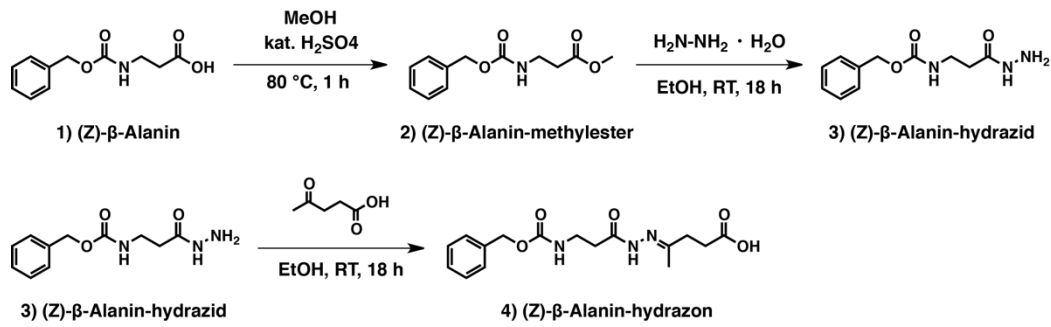


Abbildung 41. Synthese des Hydrazon-Linkers (Z)-β-Alanin-hydrazon.

Abbildung 41 zeigt das Syntheschema zur Darstellung des Hydrazon-Linkers (Z)-β-Alanin-hydrazon (4) zur nachfolgenden Anbindung an die endständige Amino-Gruppe von P(Lys(TFA)). Zur Aktivierung der Carbonylgruppe wurde im ersten Schritt die Carboxylgruppe von (Z)-β-Alanin (1) in einer säurekatalysierten Veresterung mit Methanol zu (Z)-β-Alanin-methylester (2) umgesetzt. Die anschließende Reaktion von (2) mit 64 %-iger Hydrazinlösung in Ethanol führte in moderaten Ausbeuten zu (Z)-β-Alanin-hydrazid (3) (Y = 64 %). Die Hydrazonbildung von Hydrazid (3) und 4-Oxo-pentansäure (Lävulinsäure) als Carbonylkomponente erfolgte in Ethanol unter milden Reaktionsbedingungen in Ausbeuten von 67 %.

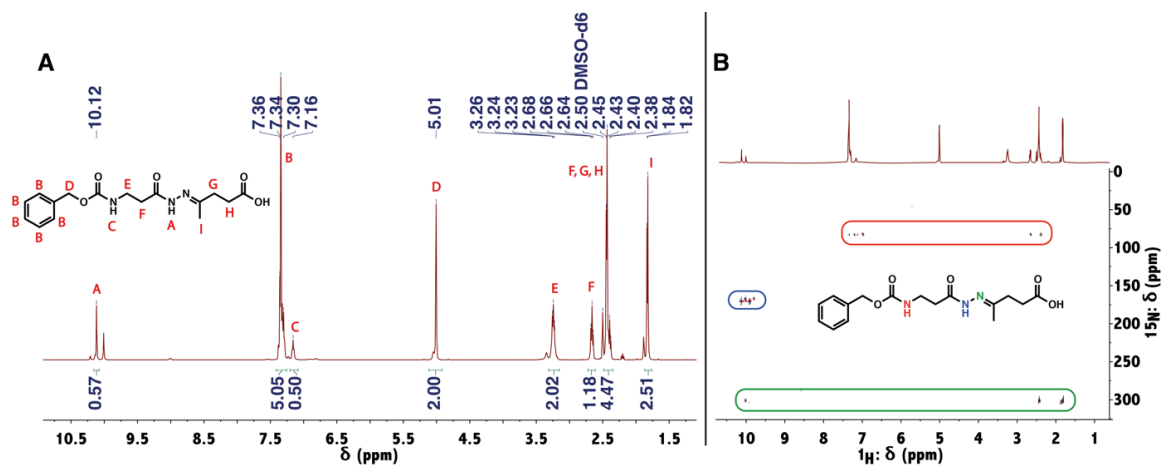


Abbildung 42. **A**) $^1\text{H-NMR}$: (Z)-β-Alanin-hydrazon in DMSO-d_6 . **B**) $^{15}\text{N}/^1\text{H-NMR}$ (HMBC): (Z)-β-Alanin-hydrazon in DMSO-d_6 .

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in Abbildung 42A bestätigt die erfolgreiche Synthese des niedermolekularen (Z)-β-Alanin-hydravons über die zugeordneten Protonensignale (A-I). Die Aufspaltung des Signals (I) der Methylgruppe weist darauf hin, dass sowohl *E*- als auch *Z*-Isomer der Verbindung vorliegen. Über die weitere Charakterisierung mittels 2D-NMR-Spektroskopie in einem $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HMBC (*heteronuclear multiple bond correlation*) Experiment (Abbildung 42B) konnten drei Signale der unterschiedlichen

Stickstoffatome innerhalb des Moleküls detektiert werden. Die rot markierten Signale bei einer Verschiebung von ca. 80 ppm (^{15}N - δ) entsprechen dem Stickstoffatom der NH-Gruppierung des Carbamats (rot/ ^1H -NMR: Signal C). Die blau markierten Signale bei ca. 170 ppm (^{15}N - δ) sind aufgrund ihrer Wechselwirkung mit dem Protonensignal (A) (^1H - δ) bei ~ 10 ppm eindeutig dem Stickstoffatom der NH-Gruppe neben dem Hydrazon zuzuordnen. In grün sind die am weitesten tieffeldverschobenen Signale des doppelbindigen Hydrazon-Stickstoffs bei einer chemischen Verschiebung von ca. 300 ppm dargestellt. Es besteht eine Wechselwirkung zum Wasserstoffkern (A) der benachbarten NH-Gruppe und zu den Wasserstoffkernen der Methylgruppe (I).

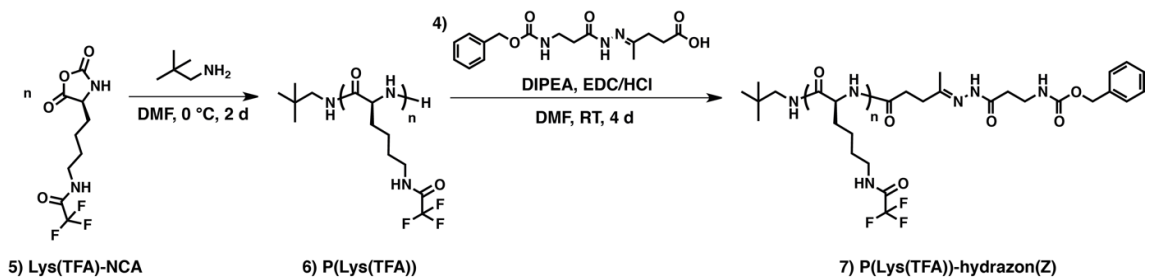


Abbildung 43. Synthese von P(Lys(TFA)) (6) über Ringöffnungspolymerisation von Lys(TFA)-NCA (5) und Anbindung von (Z)- β -Alanin-hydrazon (4) zu P(Lys(TFA))-hydrazon(Z) (7).

Die Synthese von P(Lys(TFA)) (6) erfolgte über Ringöffnungspolymerisation von *N*- ϵ -Trifluoracetyl-L-lysin-*N*-carboxyanhydrid (5) mit Neopentylamin als Initiator (Abbildung 43).^[38] Über ^1H -NMR-Spektroskopie konnte ein Polymerisationsgrad von $P_n = 35$ ermittelt werden, der gut mit dem angestrebten Wert von 30 Wiederholungseinheiten übereinstimmt. Die über GPC in HFIP bestimmte Dispersität von 1,14 bestätigt die Darstellung eines engverteilten Poly-L-lysin(TFA) Polymers (vgl. Kapitel 3.1.1).

Das Monomer *N*- ϵ -(TFA)-L-Lysin *N*-carboxyanhydrid wurden nach Literatur^[38] hergestellt und von der Arbeitsgruppe ■ am Institut für Organische Chemie der JGU Mainz freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Anbindung des (Z)- β -Alanin-hydrazons (4) erfolgte in einer EDC-vermittelten Amidkupplung über die freie Carboxylgruppe an die endständige Aminogruppe von P(Lys(TFA)) (6) (Abbildung 43). Mittels ^1H -NMR-Spektroskopie konnte über die Signale der Z-Schutzgruppe bei 7,34 ppm für die aromatischen Protonen bzw. 5,01 ppm für die Benzyl-CH₂ Gruppe in Relation zum *tert*-Butylsignal der Polymerendgruppe ein Funktionalisierungsgrad zwischen 65 – 75 % berechnet werden (siehe Abbildung 46B). Nach säulenchromatographischer Aufarbeitung zur Abtrennung von nicht umgesetzten Polylysin mit Aminendgruppenfunktionalität wurde P(Lys(TFA))-hydrazon(Z) (7) in Ausbeuten von 53 % erhalten.

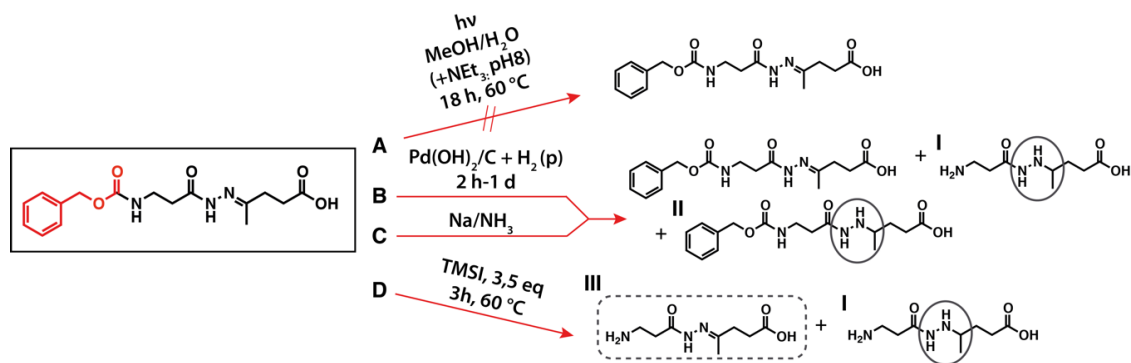


Abbildung 44. Experimente zur Z-Entschützung an niedermolekularem (Z)- β -Alanin-hydrazon.

Geeignete Reaktionsbedingungen zum Entfernen der Z-Schutzgruppe wurden zunächst am niedermolekularen (Z)- β -Alanin-hydrazon evaluiert (siehe Abbildung 44). In der Literatur wird die Entschützung von *N*-Benzyloxycarbonyl-(Z) Schutzgruppen unter milden Reaktionsbedingungen an niedermolekularen Verbindungen über photolytische Spaltung mit UV-Licht beschrieben.^[222-224] In Ansatz A wurde (Z)- β -Alanin-hydrazon für 18 h bei 60 °C mit einer 500 W Hg-Dampflampe belichtet. Um eine saure Hydrolyse des Hydrazons im Wasser-Methanol Gemisch zu vermeiden, wurde die Reaktionslösung mit Triethylamin auf pH 8 eingestellt. Ohne weitere Aufarbeitung wurde eine Probe der Reaktionslösung über ¹H-NMR-Spektroskopie charakterisiert. Entgegen den Erwartungen zeigte sich jedoch keine Verschiebung der benzylichen Methylengruppe von 5,01 ppm (vgl. Abbildung 42A) zu ~ 4,5 - 4,6 für den entstehenden Benzylalkohol, was auf eine erfolglose Z-Entschützung hinweist. Die Analytik über Massenspektrometrie (ESI-MS) bestätigte über den detektierten Molekülpeak von 358,17 m/z ([M+Na]⁺) (vgl. Kapitel 5.8.3) die nicht umgesetzte Ausgangsverbindung (Z)- β -Alanin-hydrazon. Folglich ist eine photolytische Entschützung der *N*-Benzyloxycarbonylgruppe für das synthetisierte (Z)- β -Alanin-hydrazon nicht geeignet.

Eine Z-Entschützung unter reduktiven Bedingungen mit Pearlman-Katalysator (Pd(OH)₂/C) und Wasserstoff (Reaktion B) über eine Hydrierblase führte bei variablen Äquivalenten des Katalysators (0,4 eq bis 1 eq) und Reaktionszeiten von 2 h bis 1 d ebenfalls zu keiner erfolgreichen Abspaltung der Z-Schutzgruppe. Über katalytische Hydrierung mit (Pd(OH)₂/C) unter Druck (~ 5 bar) konnte eine 82 %-ige Z-Entschützung über ¹H-NMR-Spektroskopie über die Verschiebung der benzylichen Methylengruppe von 5,13 ppm zu 4,31 ppm ermittelt werden. Dennoch belegte das ESI-Massenspektrum neben einer erfolgreichen Abspaltung der Z-Schutzgruppe eine Hydrierung der Hydrazon-Doppelbindung in Verbindung (I), Abbildung 44. Weiterhin konnte auch Verbindung (II) mit Z-Schutzgruppe und reduzierter Hydrazongruppe detektiert werden.

Die Umsetzung des (Z)- β -Alanin-hydrazons in einer Birch Reduktion^[225] (Reaktion C) mit äquimolaren Mengen des Reduktionsmittels Natrium resultierte zwar in einer Z-Entschützung von (48 %), zeigte aber im ESI-Massenspektrum ebenfalls die Verbindungen (I) und (II) mit reduzierter Hydrazongruppe auf. Zusammenfassend ergab sich für die reduktiven Z-Entschützungsversuche mit Wasserstoff und Pd(OH)₂/C Katalysator (B) sowie mit Natrium und kondensiertem Ammoniak (Birch Reduktion C) eine bevorzugte Reduktion der Hydrazongruppe gegenüber der reduktiven Spaltung der *N*-Benzyloxycarbonylgruppe. Damit ist über die reduktive Reaktionsführung (B, C) eine selektive Z-Entschützung auszuschließen.

Der Reaktionsansatz (D) stellt eine alternative Methode der Z-Entschützung mit Trimethylsilyliodid (TMSI) dar.^[226,227] (Z)- β -Alanin-hydrazon wurde mit 3,5 eq TMSI in abs. DMF umgesetzt. Die Umsatzkontrolle nach 3 h über ¹H-NMR-Spektroskopie ergab eine vollständige Z-Entschützung über die Verschiebung der benzylichen Methylengruppe von 5,01 ppm zu 4,58 ppm im entstandenen Benzylidiodid. Nach anschließender Hydrolyse des Trimethylsilylethers mit Methanol (pH 8 mit NEt₃) wurde die Reaktionslösung über ESI-Massenspektrometrie charakterisiert. Neben dem schwachen Signal bei 226,22 m/z ([M+2+Na]⁺) für die Z-entschützte, reduzierte Form in Verbindung (I), zeigte sich ebenfalls ein Signal von 224,21 m/z ([M+Na]⁺), das dem Molekülpeak des zwitterionischen Z-entschützten β -Alanin-hydrazon (III) entspricht. Somit war über die Reaktionsführung in (D) mit TMSI prinzipiell eine Abspaltung der Z-Schutzgruppe unter Erhalt der Hydrazongruppe für niedermolekulares (Z)- β -Alanin-hydrazon möglich. Daraufhin wurde die Z-Entschützung am polymeren P(Lys(TFA))-hydrazon(Z) (7) analog mit TMSI durchgeführt (siehe Abbildung 45A). Die vollständige Entschützung konnte mittels ¹H-NMR-Spektroskopie (Abbildung 46C) über das Verschwinden der charakteristischen Signale der *N*-Benzyloxycarbonylgruppe bei 7,34 ppm und 5,01 ppm bestätigt werden.

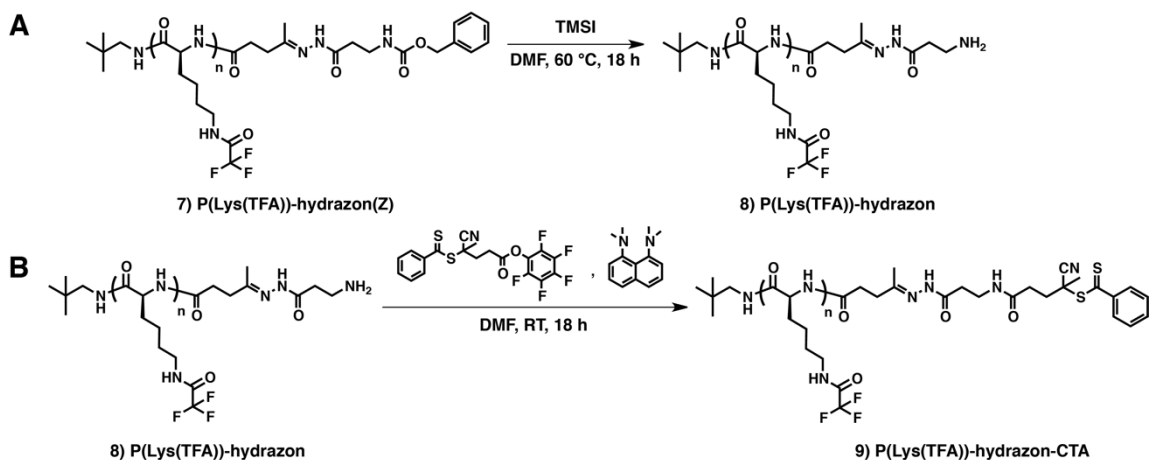


Abbildung 45. **A**) Entschützung von P(Lys(TFA))-hydrazon(Z) (7) mit TMSI zu P(Lys(TFA))-hydrazon (8). **B**) Umsetzung mit PFP-CTA zu P(Lys(TFA))-hydrazon-CTA (9).

Die anschließende Funktionalisierung mit der Dithiobenzoatgruppe als RAFT-Reagenz erfolgte über die Umsetzung der endständige Aminogruppe des entschützten P(Lys(TFA))-hydrazons (8) mit dem Reaktivester PFP-CTA (Abbildung 45B). Die erfolgreiche Anbindung der CTA-Einheit konnte im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in Abbildung 46D über die Signale der aromatischen Protonen der Dithiobenzoatgruppe bei einer chemischen Verschiebung zwischen 7,91-7,48 ppm mit einem Integralverhältnis von 2:1:2 bestätigt werden.

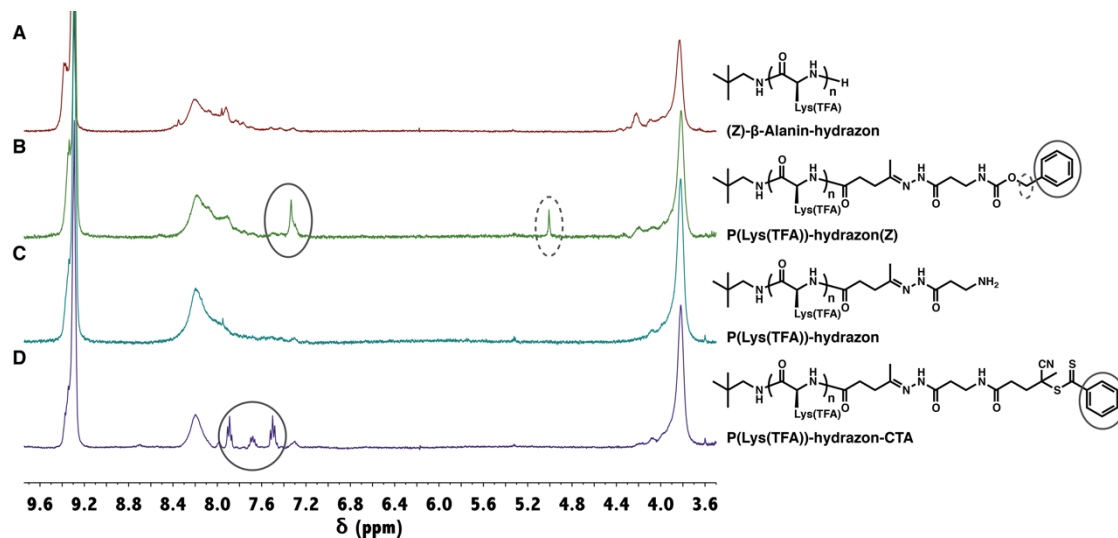


Abbildung 46. Ausschnitt der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren in DMSO-d_6 : **A**) P(Lys(TFA)). **B**) P(Lys(TFA))-hydrazon(Z). **C**) P(Lys(TFA))-hydrazon. **D**) P(Lys(TFA))-hydrazon-CTA.

Allerdings konnten über $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie keine separaten Signale der Hydrazongruppe unter den verbreiterten Signalen des Polylysins detektiert werden und auch ein $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -HMBC-Experiment (vgl. Abbildung 42B) von P(Lys(TFA))-hydrazon-CTA (9) gab keinen Aufschluss über die Integrität des Hydrazons nach der Z-Entschützung mit TMSI und anschließender CTA-Anbindung. Deshalb wurde eine Hydrolyse in HCl -saurem Methanol (inkl. 20 % Wasser) über Dialyse durchgeführt (MWCO 3500 g/mol). Die Spaltung des säurelabilen Hydrazons im P(Lys(TFA))-hydrazon-CTA (9) sollte über den Verlust der Rosafärbung des Polymers sowie des Verschwindens der aromatischen CTA-Signale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nachzuweisen sein. Dennoch zeigten sich sowohl für die Dialyse bei pH 5 als auch bei pH 1 nach Aufarbeitung des Dialyserückstandes im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum die charakteristischen Protonensignale der Dithiobenzoatgruppe (vgl. Abbildung 46D). Auch nach zusätzlichem Fällen in Diethylether, um die Abtrennung von niedermolekularen Spaltprodukten sicherzustellen, behielt das Polymer seine Rosafärbung und das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum blieb weiterhin unverändert.

Dies lässt darauf schließen, dass die Hydrazongruppe im vermeintlich hergestellten P(Lys(TFA))-hydrazon-CTA (9) in Abbildung 45B in reduzierter Form mit hydrierter Doppelbindung als Hydrazid-Derivat vorliegt und folglich nicht unter sauren Bedingungen gespalten werden konnte.

Rückschließend ist davon auszugehen, dass die Z-Entschützung mit TMSI an P(Lys(TFA))-hydrazon(Z) (7) zu einer Reduktion der Hydrazongruppe geführt hat. Der eingesetzte Überschuss von 75 eq TMSI für eine vollständige Z-Entschützung der Polymerendgruppe ist auf die zusätzlichen 70 (2x35) Carbonyleinheiten im Polylysinrückgrat des Polyamids und der TFA-Schutzgruppe zurückzuführen. Aufgrund der Affinität von Silizium zum elektronenreichen Sauerstoff koordiniert TMSI an den zusätzlichen Carbonylgruppen im P(Lys(TFA))-hydrazon(Z). Dieser erhebliche Überschuss an TMSI im Vergleich zur Z-Entschützung des niedermolekularen Hydrazons (3,5 eq) in Abbildung 44D liefert eine mögliche Erklärung der zusätzlichen Reduktion des Hydrazons. Somit hat die Umsetzung von P(Lys(TFA))-hydrazon(Z) mit TMSI als Lewis-Säure im aprotischen Lösungsmittel DMF keine Spaltung, jedoch aber eine Reduktion des Hydrazons bewirkt. Die erfolgreiche Anbindung des CTAs an die endständige entschützte Aminogruppe des modifizierten Poly-L-lysins (vgl. Abbildung 46D) schließt eine Hydrazonspaltung bei der Z-Entschützung mit TMSI und anschließender Hydrolyse in Methanol aus.

Zusammenfassend konnte der niedermolekulare Hydrazon-Linker (Z)- β -Alaninhydrazon (4) erfolgreich hergestellt werden und über Amidkupplung an den Aminoternus von P(Lys(TFA)) angebunden werden (vgl. Abbildung 43). Dennoch war eine selektive Entschützung der *N*-Benzyloxycarbonylgruppe mit TMSI am Polymerkettenende nicht möglich, ohne gleichzeitig eine Reduktion der Hydrazongruppe zu bewirken. Somit wurde nach Anbindung der CTA-Endgruppe in Abbildung 45B nicht wie vorgesehen P(Lys(TFA))-hydrazon-CTA (9) erhalten, sondern dessen reduzierte Form P(Lys(TFA))-hydrazid-CTA, wie in Abbildung 47 dargestellt.

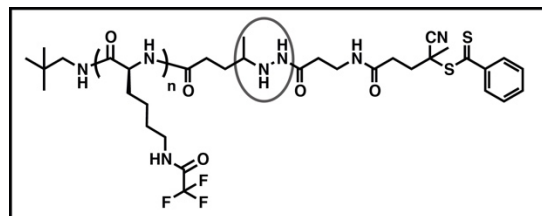


Abbildung 47. P(Lys(TFA))-hydrazid-CTA.

Das synthetisierte makromolekulare Kettentransferreagenz ist prinzipiell durch die Anbindung der Dithiobenzoatendgruppe zur RAFT-Polymerisation befähigt. Dennoch wurde aber aufgrund des Verlustes der säurelabilen Hydrazongruppe auf die Darstellung eines stimuli-responsiven P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymers verzichtet (vgl. Kapitel 3.1.2.2 und 3.1.3).

In Bezug auf die in diesem Kapitel vorgestellte Syntheseroute für einen makromolekularen Poly-L-lysin-CTA mit säurelabiler Hydrazongruppe darf die Schutzgruppe der Aminofunktion des niedermolekularen Hydrazon-Linkers weder unter sauren, oder basischen, noch unter reduktiven Reaktionsbedingungen entfernt werden, ohne dass eine Reduktion bzw. Hydrolyse des Hydrazons erfolgen kann. Deshalb könnten klassische photolytisch spaltbare (Di)(nitrobenzyl)oxycarbonyl- ((D)NBOC) oder 6-Nitroveratroyloxycarbonyl- (NVCO) Schutzgruppen als Carbamate des entsprechenden Amins eine Alternative zur Z-Schutzgruppe bieten.^[228]

3.3 Kationische Blockcopolymere als Transfektionsagenzien

Die in Kapitel 3.1 synthetisierten P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymere sollen Anwendung als polymerbasierte Transfektionsagenzien für therapeutische Nukleinsäuren in Form von pDNA bzw. mRNA finden. Im Rahmen der Tumormimmuntherapie soll über die Vakzinierung dendritischer Immunzellen mit pDNA- bzw. mRNA-codierender Tumorantigene eine Antitumorantwort induziert werden (vgl. Kapitel 1.2.1).

In Vorarbeiten konnte bereits eine erfolgreiche Transfektion von HEK-293T Zellen mittels P(Lys)-*b*-P(HPMA)-basierter Blockcopolymere als pDNA-Polyplexe gezeigt werden.^[87] In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Modifikationen am Transfektionssystem evaluiert, um diese für eine Transfektion von dendritischen Immunzellen einsetzen zu können. Dazu gehörte zum einen der Einbau bzw. die Vernetzung mit dem endosomolytisch-aktiven LAH4-L1-Peptid, das die endosomale Freisetzung der Polyplexe unterstützen soll (vgl. Kapitel 1.2.2).^[108,109] Zum anderen wurde die Anbindung von DEC205-Antikörpern als Zielstrukturen für DCs auf der Polyplexoberfläche untersucht (vgl. Kapitel 3.5.2). Diese sollen eine zellspezifische Aufnahme der Polyplexe generieren und dadurch zu erhöhten Transfektionseffizienz in den Zielzellen beitragen.^[51,52] Darüber hinaus wurde neben pDNA-Polyplexen auch die Ausbildung von Polyionenkomplexen mit P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymeren und sensitiver mRNA evaluiert. Der Vorteil von mRNA als therapeutische Nukleinsäure ist eine direkte Translation der genetischen Information nach endosomaler Freisetzung im Zytosol. Im Fall von pDNA ist dafür eine zusätzliche Translokation in den Zellkern erforderlich (vgl. Kapitel 1.2.2).



Abbildung 48. Polyplexbildung von P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer und pDNA/mRNA.

Die treibende Kraft zur Ausbildung von Polyplexen basiert auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem kationischen Blockcopolymer und dem negativ geladenen Polyphosphatrückgrat der Nukleinsäure (siehe Abbildung 48) und ist entropisch durch die Freisetzung kleiner Gegenionen begünstigt. Die ϵ -Aminogruppe der Polylysinseitenkette liegt unter physiologischen Bedingungen protoniert vor ($pK_s = 10,28$)^[229] und eignet sich damit als polykationische Einheit zur Komplexbildung der Nukleinsäure. Der hydrophile, nicht ionische P(HPMA)-Block dient zur Abschir-

mung der überschüssigen Ladung des Polyionenkomplexes und soll bei therapeutischer Gabe unspezifische Wechselwirkungen mit Zellmembranen oder Proteinen des Blutserum verhindern (vgl. Kapitel 1.2.2).

3.3.1 Physikochemische Charakterisierung von pDNA- und mRNA-Polyplexen

Das Komplexierungsverhalten des unter Kapitel 3.1 synthetisierten P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymers (P1) wurde über Agarosegelelektrophorese mit UV-Detektion von GelRed als Nukleinsäure-Interkalator charakterisiert (vgl. Kapitel 5.2). Um das geeignete Verhältnis von Blockcopolymer und Nukleinsäure zu ermitteln, wurden beide Komponenten in unterschiedlichen N/P Verhältnissen komplexiert. Dieses Verhältnis beschreibt die Anzahl von Stickstoffen (N) der ϵ -Aminogruppe im Polylysinblock zur Anzahl von Phosphatgruppen (P) der Nukleinsäure. Zur Anwendung in der Transfektion sollte die Nukleinsäure vollständig im Polyplex eingeschlossen vorliegen.

Agarosegelelektrophorese von P(Lys)-*b*-P(HPMA) (P1) und pDNA (pGL3-Basic)

Zur Bildung der pDNA-Polyplexe wurde der pGL3-Basic-Vektor mit 4818 bp verwendet. Über das berechnete Molekulargewicht des pGL3-Basic-Vektors aus den mittleren Molekulargewichten der Nukleotide und der Anzahl der Basenpaare (bp), liefert 1 μg pDNA $3,07 \cdot 10^{-9}$ mol Phosphat. Die eingesetzte Menge von 0,16 μg pDNA pro Komplexierungsansatz entspricht einer Stoffmenge von $4,91 \cdot 10^{-10}$ mol Phosphat (für P = 1). Die jeweiligen Mengen an P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer (P1) für unterschiedliche N/P Verhältnisse sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6. Polyplexbildung bei verschiedenen N/P Verhältnissen mit P(Lys)-*b*-P(HPMA) (P1) und pGL3-Basic.

N/P	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
n(P) in (mol) für P = 1	$4,91 \cdot 10^{-10}$	$4,91 \cdot 10^{-10}$	$4,91 \cdot 10^{-10}$	$4,91 \cdot 10^{-10}$	$4,91 \cdot 10^{-10}$	$4,91 \cdot 10^{-10}$	$4,91 \cdot 10^{-10}$	$4,91 \cdot 10^{-10}$	$4,91 \cdot 10^{-10}$	$4,91 \cdot 10^{-10}$
n(N) in (mol)	$4,91 \cdot 10^{-10}$	$9,82 \cdot 10^{-10}$	$1,47 \cdot 10^{-9}$	$1,96 \cdot 10^{-9}$	$2,46 \cdot 10^{-9}$	$2,95 \cdot 10^{-9}$	$3,44 \cdot 10^{-9}$	$3,93 \cdot 10^{-9}$	$4,42 \cdot 10^{-9}$	$4,91 \cdot 10^{-9}$
n(P1)* in (mol)	$1,49 \cdot 10^{-11}$	$2,98 \cdot 10^{-11}$	$4,47 \cdot 10^{-11}$	$5,95 \cdot 10^{-11}$	$7,44 \cdot 10^{-11}$	$8,93 \cdot 10^{-11}$	$1,04 \cdot 10^{-10}$	$1,19 \cdot 10^{-10}$	$1,34 \cdot 10^{-10}$	$1,49 \cdot 10^{-10}$
m(P1)** in (μg)	0,42	0,84	1,26	1,67	2,09	2,51	2,93	3,35	3,76	4,18

* P1: P(Lys)₃₃-*b*-P(HPMA)₁₆₅: mit 33 Wiederholungseinheiten des Polylysin-Blocks

** P1: P(Lys)₃₃-*b*-P(HPMA)₁₆₅: mit Mn ~ 28100 g/mol (vgl. Tabelle 5)

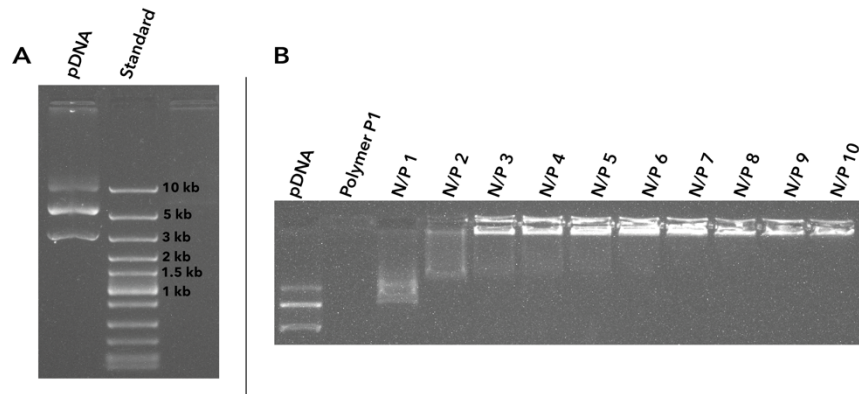


Abbildung 49. Agarosegelelektrophorese: **A)** pGL3-Basic (pDNA). **B)** Komplexierung von P(Lys)-b-P(HPMA) (P1) und pGL3-Basic (pDNA) bei N/P 1-10.

Abbildung 49A zeigt den aufgetragenen pGL3-Basic-Vektor in einem 0,5 %-igen Agarosegel. Die Aufspaltung der pDNA in drei separate Banden ist auf die unterschiedlichen Konformationen der Nukleinsäure zurückzuführen. Die oberste Bande entspricht der *nicked-circled* Konformation, der entspannten zirkulären Form, die oft bei Einzelstrangbruch vorliegt. Die mittlere intensive Bande bei ca. 5 kb ist der linearen Konformation zuzuordnen und stimmt gut mit der angegebenen Größe von 4818 bp des pGL3-Basic Vektors überein. Die unterste Bande entspricht der *supercoiled* Konformation der pDNA.^[230] Das Komplexierungsverhalten mit P(Lys)-b-P(HPMA) Blockcopolymer (P1) bei N/P Verhältnissen von 1-10 ist in Abbildung 49B dargestellt. Bei N/P 1 und N/P 2 konnte im Agarosegel freie pDNA detektiert werden und bestätigt für diese N/P Verhältnisse eine zu geringe Menge an Blockcopolymer für eine vollständige Komplexierung von pGL3-Basic. Ab N/P 3 sind nur noch schwache Ausläufer der pDNA zu sehen und ab N/P 7 kann eindeutig von einer vollständigen Komplexierung ausgegangen werden.

Agarosegelelektrophorese von P(Lys)-b-P(HPMA) (P1) und mRNA (Firefly Luciferase mRNA)

Die Bildung von mRNA-Polyplexen und die anschließende Charakterisierung über Agarosegelelektrophorese erfolgte mit Firefly Luciferase mRNA mit einer Größe von 1921 Nukleotiden (Basen). Die eingesetzte Menge von 1 μg mRNA pro Komplexierungsansatz entspricht einer Stoffmenge von $2,95 \cdot 10^{-9}$ mol Phosphat (für P = 1). Die ca. 6-fach höhere Menge an mRNA im Vergleich zur pDNA-Komplexierung in Abbildung 49 (0,16 μg) ist auf eine ausreichende Detektionsgrenze der mRNA im Agarosegel zurückzuführen. Möglicherweise ist die Interkalation des Gel Red Farbstoffs in doppelsträngige DNA-Moleküle effizienter als in einzelsträngige mRNA Moleküle. Die jeweiligen Mengen an P(Lys)-b-P(HPMA) Blockcopolymer (P1) für unterschiedliche N/P Verhältnisse sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7. Polyplexbildung bei verschiedenen N/P Verhältnissen mit P(Lys)-*b*-P(HPMA) (P1) und Firefly Luciferase mRNA.

N/P	1	2	3	4	5	6	10
n(P) in (mol) für P = 1	$2,95 \cdot 10^{-9}$	$2,95 \cdot 10^{-9}$	$2,95 \cdot 10^{-9}$	$2,95 \cdot 10^{-9}$	$2,95 \cdot 10^{-9}$	$2,95 \cdot 10^{-9}$	$2,95 \cdot 10^{-9}$
n(N) in (mol)	$2,95 \cdot 10^{-9}$	$5,89 \cdot 10^{-9}$	$8,84 \cdot 10^{-9}$	$1,18 \cdot 10^{-8}$	$1,47 \cdot 10^{-8}$	$1,77 \cdot 10^{-8}$	$2,95 \cdot 10^{-8}$
n(P1)* in (mol)	$8,93 \cdot 10^{-11}$	$1,79 \cdot 10^{-10}$	$2,68 \cdot 10^{-10}$	$3,57 \cdot 10^{-10}$	$4,46 \cdot 10^{-10}$	$5,36 \cdot 10^{-10}$	$8,93 \cdot 10^{-10}$
m(P1)** in (μ g)	2,51	5,02	7,53	10,03	12,54	15,05	25,09

* P1: P(Lys)₃₃-*b*-P(HPMA)₁₆₅: mit 33 Wiederholungseinheiten des Polylysin-Blocks

** P1: P(Lys)₃₃-*b*-P(HPMA)₁₆₅: mit Mn ~ 28100 g/mol (vgl. Tabelle 5)

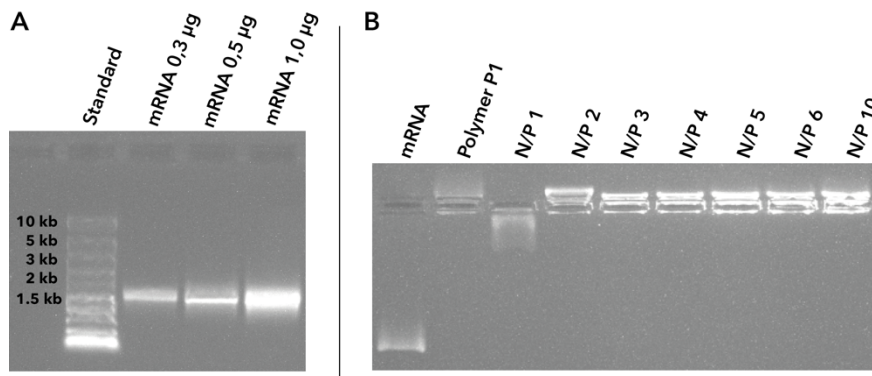


Abbildung 50. Agarosegelelektrophorese: **A)** Firefly Luciferase mRNA. **B)** Komplexbildung von P(Lys)-*b*-P(HPMA) (P1) und Firefly Luciferase mRNA bei N/P 1-6 und 10.

In Abbildung 50A ist die Auftrennung der Firefly Luciferase mRNA in Konzentrationen von 0,3 µg, 0,5 µg und 1,0 µg in einem 0,5 %-igen Agarosegel dargestellt. Im Vergleich zur Plasmid-DNA in Abbildung 49B ist für die entsprechende mRNA lediglich eine Bande zwischen 1,5 und 2,0 kb zu sehen, die gut mit dem angegebenen Größenbereich von 1921 Nukleotiden (Basen) übereinstimmt. Das Elektrophoresemuster für die Komplexbildung von mRNA mit P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer (P1) bei verschiedenen N/P Verhältnissen in Abbildung 50B zeigt bereits bei N/P 2 eine vollständige Komplexbildung. Bei N/P 1 ist noch ein Herausschleichen der mRNA im Agarosegel zu beobachten.

Unter Berücksichtigung der gegebenen UV-Detektion, der Vernetzungsdichte der Agarosegele und der Genauigkeit der über Stammlösungen angesetzten Komplexbildungen (Tabelle 6 und Tabelle 7) ist das Komplexbildungsverhalten des P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer (P1) mit pDNA (pGL3-Basic-Vektor) und mRNA (Firefly Luciferase) im Bereich zwischen N/P 2 bis N/P 3 vergleichbar (Abbildung 49B und Abbildung 50B). Aufgrund der berechneten Verhältnisse von positiv geladenen Stickstoff im Poly-L-lysin-Block (N) des P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer zu der Anzahl

an negativ geladenen Phosphatresten der jeweiligen Nukleinsäure sollte sich das resultierende N/P Verhältnis für eine vollständige Komplexierung nicht unterscheiden. Ein Trend zur effizienteren mRNA-Komplexierung (N/P 2) im Vergleich zur pDNA-Komplexierung (N/P 3-7) mit weniger Bedarf an Blockcopolymer könnte in den strukturellen Unterschieden zwischen flexibler einzelsträngiger mRNA und rigider doppelsträngigen Plasmid-DNA begründet liegen.

Charakterisierung von pDNA- und mRNA-Polyplexen über FCS

Die gebildeten Polyplexe aus P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer und der entsprechenden Nukleinsäure wurden mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) hinsichtlich ihrer Größe charakterisiert. Als fluoreszenzmarkierte Spezies diente das in Kapitel 3.1.3 synthetisierte OG488-markierte Blockcopolymer P(Lys)-*b*-P(HPMA)_{OG488}. Die Herstellung der pDNA-Polyplexe mit pGL3-Basic (4818 bp) erfolgte bei einem Verhältnis von N/P 7, bei welchem im Agarosegel (Abbildung 49B) eine vollständige Komplexierung der Nukleinsäure detektiert wurde.

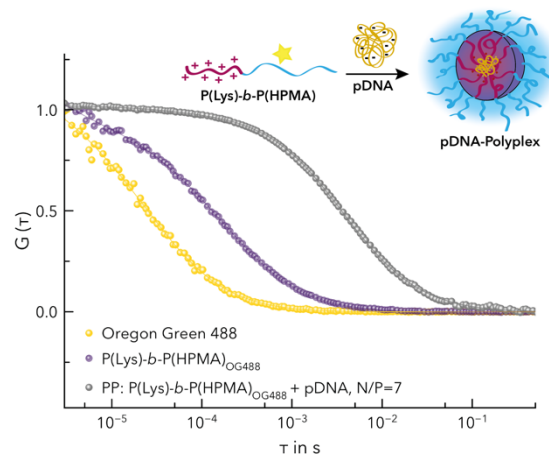


Abbildung 51. FCS: pDNA-Polyplexe (PP) mit pGL3-Basic. OG488 (gelb) mit $R_h = 0,56$ nm, P(Lys)-*b*-P(HPMA)_{OG488} (violett) mit $R_h = 4,3$ nm und PP aus P(Lys)-*b*-P(HPMA)_{OG488} und pDNA (N/P 7) (grau) mit $R_h = 49$ nm.

Diese sowie alle folgenden FCS-Messungen in dieser Arbeit wurden in Kooperation mit [REDACTED] unter der Betreuung von [REDACTED] (AG [REDACTED]) am Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz (MPIP) durchgeführt.

Die FCS-Messung in Abbildung 51 zeigt für das P(Lys)-*b*-P(HPMA)_{OG488} Blockcopolymer (violett) einen hydrodynamischen Radius von $R_h = 4,3$ nm. Nach der Komplexbildung mit pGL3-Basic konnte eine fluoreszierende Spezies von $R_h = 49$ nm detektiert werden (grau), die aufgrund der Größenzunahme eine erfolgreiche Polyplexbildung mit pDNA bestätigt. Der Größenbereich von $R_h \sim 50$ nm für pDNA-Polyplexe mit

P(Lys)-*b*-P(HPMA)_{OG488} Blockcopolymeren liegt in guter Übereinstimmung mit literaturbekannten Werten von $R_h = 58 \text{ nm}$.^[87]

Weiterhin war es über FCS möglich verschiedene fluoreszierende Spezies unterschiedlicher Größe mit ihrem prozentualen Anteil innerhalb der Probe zu bestimmen. So konnte für die pDNA-Polyplexprobe in Abbildung 51 neben dem gebildeten Polyionenkomples mit $R_h = 49 \text{ nm}$ mit einem Anteil von 69 %, ebenfalls freies Blockcopolymer mit 15 % und freier Farbstoff (OG488) mit 16 % detektiert werden (Tabelle 8). Dieses Ergebnis spiegelt das Komplexierungsverhalten von P(Lys)-*b*-P(HPMA) mit pGL3-Basic in Abbildung 49B wider, wobei bei N/P 7 von einem vollständigen Einschluss der pDNA im Polyplex ausgegangen werden kann, aber die Komplexierung bereits bei N/P 3-4 beginnt. Dies erklärt den überschüssigen Anteil von 15 % freiem Blockcopolymer, der nicht an der Komplexierung beteiligt ist.

Die über FCS charakterisierten mRNA-Polyplexe bei unterschiedlichen N/P Verhältnissen (Abbildung 52) wurden mit dem Luciferase mRNA-Vektor iVT Luc L2m2 mit einer Größe von 2135 Nukleotiden gebildet. Dieser mRNA Vektor ist mit Firefly Luciferase mRNA von 1921 Nukleotiden, die in der Agarosegelelektrophorese (Abbildung 50B) verwendet wurde, vergleichbar.

Bei einem Verhältnis von N/P 2, bei dem im Agarosegel eine vollständige Komplexierung angezeigt wurde, ergab sich für den gebildeten mRNA-Polyplex einen hydrodynamischen Radius von $R_h = 25 \text{ nm}$ (siehe Abbildung 52A, grau). Somit konnte in der FCS über die detektierte Größenzunahme die Bildung eines mRNA-Polyionenkomples aus dem kationischen P(Lys)-*b*-P(HPMA)_{OG488} Blockcopolymer (violett) mit $R_h = 6,5 \text{ nm}$ bestätigt werden.

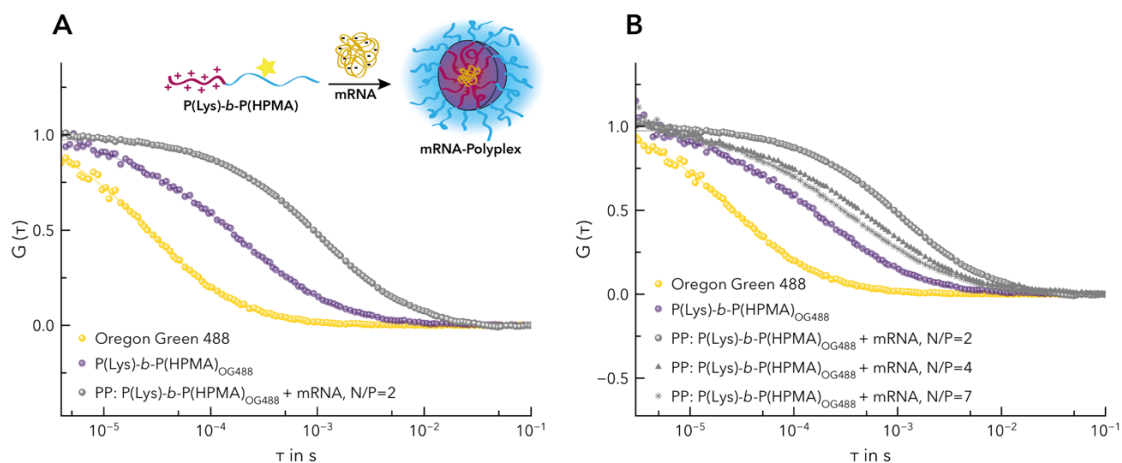


Abbildung 52. FCS: mRNA-Polyplexe (PP) mit iVT Luc L2m2 mRNA. **A)** OG488 (gelb) mit $R_h = 0,58 \text{ nm}$, P(Lys)-*b*-P(HPMA)_{OG488} (violett) mit $R_h = 6,5 \text{ nm}$ und PP aus P(Lys)-*b*-P(HPMA)_{OG488} und mRNA (N/P 2) (grau) mit $R_h = 25 \text{ nm}$. **B)** OG488 (gelb) mit $R_h = 0,58 \text{ nm}$, P(Lys)-*b*-P(HPMA)_{OG488} (violett) mit $R_h = 6,5 \text{ nm}$, PP aus P(Lys)-*b*-P(HPMA)_{OG488} und mRNA (N/P 2) (graue Punkte) mit $R_h = 25 \text{ nm}$, PP aus P(Lys)-*b*-P(HPMA)_{OG488} und mRNA (N/P 4) (graue Dreiecke) mit $R_h = 23 \text{ nm}$, PP aus P(Lys)-*b*-P(HPMA)_{OG488} und mRNA (N/P 7) (graue Sterne) mit $R_h = 26 \text{ nm}$.

Für die gebildeten mRNA-Polyplexe bei größeren N/P Verhältnissen von N/P 4 (graue Dreiecke) und N/P 7 (graue Sterne) in Abbildung 52B konnten hydrodynamische Radien von 23 nm bzw. 26 nm detektiert werden. Analog zur FCS-Charakterisierung der pDNA-Polyplexe, wurde auch hier die Zusammensetzung der unterschiedlichen fluoreszierenden Spezies innerhalb der mRNA-Polyplexproben näher analysiert. So zeigt sich in Abbildung 52B für die Korrelationskurve des mRNA-Polyplexes mit N/P 2 (graue Punkte) mit einem hydrodynamischen Radius von $R_h = 25$ nm eine deutliche Verschiebung zur Korrelationskurve des Blockcopolymers (violett; $R_h = 6,5$ nm). Hingegen zeigen die mRNA-Polyplexe bei Verhältnissen von N/P 4 (graue Dreiecke) und N/P 7 (graue Sterne), die im gleichen Größenbereich liegen, einen deutlich geringeren Abstand. Dies ist auf die jeweiligen prozentualen Anteile der gebildeten Polyplexe innerhalb der Probe zurückzuführen (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8. FCS-Charakterisierung der pDNA- und mRNA-Polyplexe.

Polyplex(PP)-Probe	OG488 (%)	P(Lys)- <i>b</i> -P(HPMA) _{OG488} (%)	Polyplex (%)	R_h (Polyplex) (nm)
pDNA-PP N/P 7	16	15	69	49
mRNA-PP N/P 2 (graue Punkte)	5	-	95	25
mRNA-PP N/P 4 (graue Dreiecke)	17	24	59	23
mRNA-PP N/P 7 (graue Sterne)	16	51	33	26

In der Probe bei N/P 2 mit der größten Verschiebung der Korrelationskurve zum Blockcopolymer liegt der Anteil an mRNA-Polyplex mit $R_h = 25$ nm bei 95 %. Der restliche Anteil von 5 % ist freiem Farbstoff, der aus der Blockcopolymerprobe resultiert, zuzuordnen. Bei den Komplexierungsansätzen N/P 4 und N/P 7 konnte entsprechend freies Blockcopolymer in steigendem Anteil von 24 % bzw. 51 % nachgewiesen werden, der nicht an der Komplexierung der Nukleinsäure beteiligt ist. Die daraus resultierenden verminderten Anteile der mRNA-Polyplex Spezies im Bereich von $R_h \sim 25$ nm (59 % und 33 %) spiegeln sich im abweichenden Verlauf der Korrelationskurven in Abbildung 52B wider.

Diese Resultate stehen im Zusammenhang mit dem über Agarosegelelektrophorese gezeigtem Komplexierungsverhalten von P(Lys)-*b*-P(HPMA) mit mRNA (siehe Abbildung 50B). Bei N/P 2 ist die Nukleinsäure bereits vollständig komplexiert und die eingesetzte Menge an Blockcopolymer ist vollständig an der Komplexbildung beteiligt. Bei N/P Verhältnissen > 2 konnte der Anteil an freiem P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer, das nicht an der mRNA-Komplexierung beteiligt ist, über FCS quantifiziert werden.

Zusammenfassend konnte über FCS die Größe der gebildeten Polyplexe aus P(Lys)-*b*-P(HPMA)_{OG488} Blockcopolymer und entsprechender Nukleinsäure bestimmt werden. Für die mRNA-Polyplexe ergab sich ein hydrodynamischer Radius von

$R_h \sim 25$ nm, wohingegen pDNA-Polyplexe nahezu die doppelte Größe mit $R_h = 49$ nm aufwiesen. Dieser deutliche Größenunterschied ist hauptsächlich auf die Größe der verwendeten Nukleinsäuren zurückzuführen. So ist der pGL3-Basic-Vektor mit 9636 Basen (4818 bp) 4,5-mal größer als der iVT Luc L2m2 mRNA-Vektor mit 2135 Basen. Darüber hinaus könnte die flexiblere Struktur der einzelsträngigen mRNA im Vergleich zur rigiden, doppelsträngigen Plasmid-DNA möglicherweise zu kompakteren Polyplexen mit kleineren hydrodynamischen Radien führen. Dies bedarf einer Polyplex-Charakterisierung mit mRNA und pDNA gleicher Größe (Basen), die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt wurde.

Charakterisierung von pDNA-Polyplexen über DLS (Zetasizer)

Weiterhin wurden die mit P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer (P1) gebildeten pDNA-Polyplexe über dynamische Lichtstreuung (Zetasizer) analysiert (Ansätze; siehe Tabelle 17, Kapitel 5.9.3). Die DLS-Messung der pDNA-Polyplexe in Abbildung 53 zeigt für die freie pDNA (pGL3-Basic) einen hydrodynamischen Durchmesser von $D_h = 259$ nm (orange) mit einer Dispersität von 0,294 (siehe Tabelle 9). Nach der Komplexierung mit P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer (P1) bei unterschiedlichen Verhältnissen von N/P 2, 4 und 7 ergaben sich für die resultierenden Polyplexe Größen im Bereich von $D_h \sim 100$ nm und Dispersitäten zwischen 0,083-0,222 (siehe Tabelle 9).

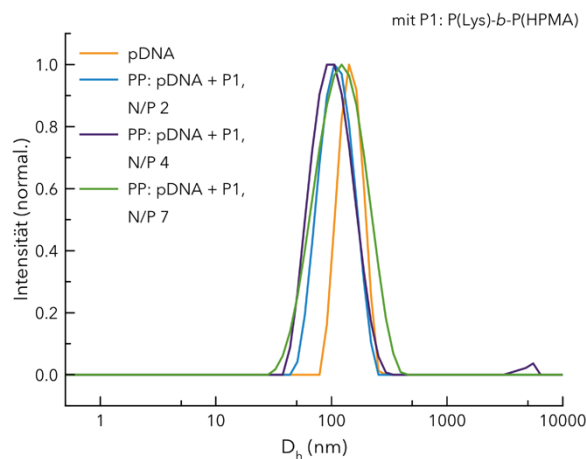


Abbildung 53. DLS: pDNA-Polyplexe (PP) mit pGL3-Basic. pDNA (orange) mit $D_h = 259$ nm, PP aus P1 und pDNA (N/P 2) (blau) mit $D_h = 104$ nm, PP aus P1 und pDNA (N/P 4) (violett) mit $D_h = 95$ nm und PP aus P1 und pDNA (N/P 7) (grün) mit $D_h = 102$ nm.

Die verringerte Größe der gebildeten pDNA-Polyplexe im Bereich von $D_h \sim 100$ nm im Vergleich zur freien pDNA mit $D_h = 259$ nm ist auf die in Kapitel 1.2.2 beschriebene Kondensation der Nukleinsäure während der Polyplexbildung zurückzuführen. Die Komplexierung mit kationischem Blockcopolymer bewirkt eine Konfor-

mationsänderung der ausgedehnten pDNA zu einer globulären, kondensierten Form und spiegelt sich in kleineren hydrodynamischen Durchmessern wider. Ein Größenunterschied der pDNA-Polyplexe innerhalb der variierenden N/P Verhältnisse (N/P 2, 4, 7) ist im Rahmen der Messgenauigkeit nicht auszumachen. Dennoch lässt sich mit steigendem N/P Verhältnis eine Erhöhung der Polydispersität (PDI) feststellen (siehe Tabelle 9). Dies ist auf den überschüssigen Anteil an Blockcopolymer zurückzuführen, der bei höheren N/P Verhältnissen nicht mehr an der Komplexierung der pDNA beteiligt ist und schließlich zu uneinheitlicheren Polyplexen mit erhöhten Dispersitäten führt.

Die über DLS bestimmten Größen der pDNA-Polyplexe im Bereich von $D_h \sim 100$ nm liegen in guter Übereinstimmung mit dem über FCS ermittelten hydrodynamischen Radius des pDNA-Polyplexes von $R_h \sim 50$ nm in Abbildung 51.

Tabelle 9. Charakterisierung der pDNA-Polyplexe.

	D_h (nm)	PDI
pDNA	259 ± 33	0,294
PP: pDNA + P1, N/P 2	104 ± 37	0,083
PP: pDNA + P1, N/P 4	95 ± 42	0,176
PP: pDNA + P1, N/P 7	102 ± 62	0,222

Zusammenfassend ermöglichte die Charakterisierung über FCS die Detektion der Polyplexbildung mit fluoreszenzmarkiertem P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer ($R_h \sim 4-6$ nm) über die Größenzunahme zu Strukturen von $R_h = 25$ nm für mRNA-Polyplexe und $R_h = 49$ nm für pDNA-Polyplexe. Die Charakterisierung der pDNA-Polyplexe über DLS resultierte in guter Übereinstimmung mit den FCS-Daten in Größen von $D_h \sim 100$ nm und ermöglichte zusätzlich über die Größenbestimmung der freien Nukleinsäure die Darstellung der pDNA-Kondensation während der Polyplexbildung.

3.3.1.1 Polymermodifikation mit Reaktiven Disulfiden:

P(Lys)-co-P(Lys-PDP)-*b*-P(HPMA)

Eine reversible Kernvernetzung der Polyplexe, z. B. über reduktiv spaltbare Disulfide, soll für eine verbesserte extrazelluläre Stabilität der Polyplexe sorgen und ermöglicht darüber hinaus die Einführung endosomolytisch-aktiver Gruppen über einen entsprechenden Vernetzer (vgl. Kapitel 1.2.2). Blockcopolymere mit thiolreaktiven 2-(Pyridyldithio)-propionat-(PDP) Gruppen wurden bereits erfolgreich zur oxidativen Disulfidvernetzung in der Polyplexbildung verwendet.^[86,231] Die stimuli-responsiven Disulfidgruppen können nach der endosomalen Freisetzung im Zytosol reduktiv

gespalten werden und unterstützen die Disassemblierung des Polyplexes, die zu verbesserten Transfektionseffizienz beitragen kann (vgl. Kapitel 1.2.2).

Der Einbau von 2-(Pyridyldithio)-propionat-(PDP) Gruppen^[231] in den Poly-L-Lysin-Block des P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymers soll zur späteren Vernetzung mit dem thiolreaktiven, endosomolytisch aktiven LAH4-L1-Cys-Peptid genutzt werden (siehe Kapitel 3.3.1.2). Zur partiellen, statistischen Modifizierung der entschützten Polylysinseitenketten mit reaktiven Disulfiden wurde das unter Kapitel 3.1 synthetisierte P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer unter basischen Reaktionsbedingungen mit 40 mol-% Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP) in Bezug auf 33 Lysin-Wiederholungseinheiten zu P(Lys)-*co*-P(Lys-PDP)-*b*-P(HPMA) umgesetzt (Abbildung 54).

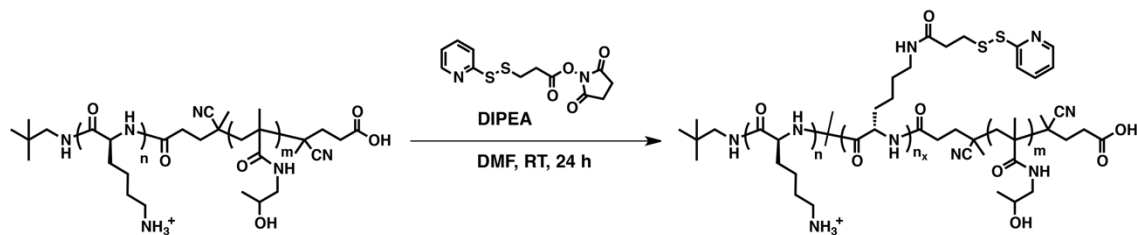


Abbildung 54. Synthese von P(Lys)-*co*-P(Lys-PDP)-*b*-P(HPMA).

Der analytische Nachweis der erfolgreichen PDP-Modifizierung erfolgte über ¹H-NMR-Spektroskopie und Diffusions-NMR (DOSY: *diffusion-ordered spectroscopy*) (Abbildung 55).

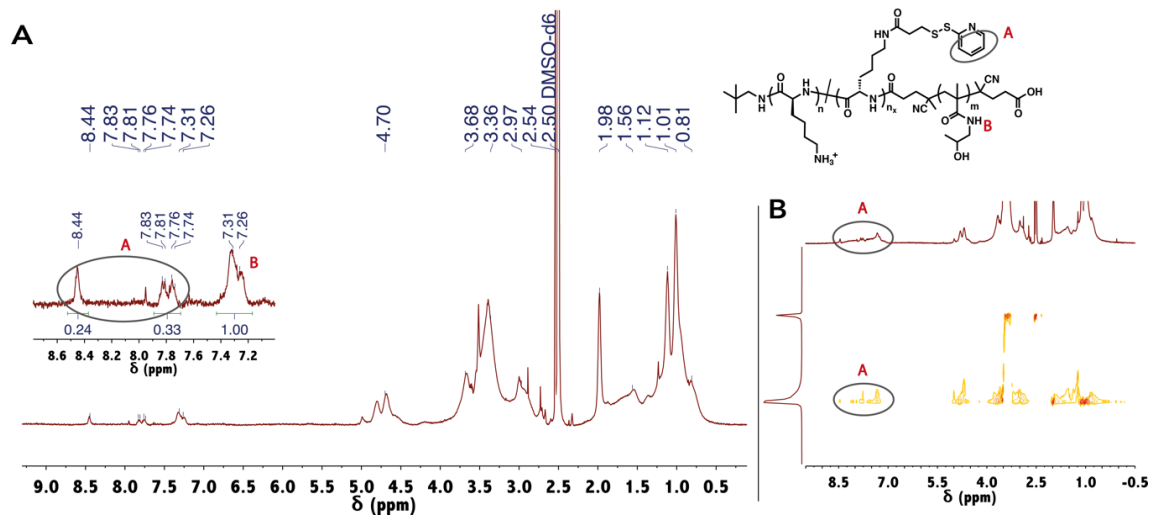


Abbildung 55. **A)** ¹H-NMR von P(Lys)-*co*-P(Lys-PDP)-*b*-P(HPMA) in DMSO-*d*₆. **B)** DOSY von P(Lys)-*co*-P(Lys-PDP)-*b*-P(HPMA) in DMSO-*d*₆.

Die zusätzlich auftretenden Signale im ¹H-NMR-Spektrum (Abbildung 55A) bei einer chemischen Verschiebung zwischen 8,44-7,74 ppm (A) neben den typischen Signalen des P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymers (vgl. Kapitel 3.1.3 und 3.1.5) sind

den aromatischen Pyridylprotonen der PDP-Modifizierung zuzuordnen. Eine Quantifizierung des PDP-Einbaus in den Polylysinblock war aufgrund der geringen Signalintensitäten (A) mit dem Protonensignal (B) der HPMA-Einheit nicht sinnvoll. Das Diffusions-NMR in Abbildung 55B bestätigt die kovalente Anbindung der PDP-Gruppen im P(Lys)-co-P(Lys-PDP)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer. Das Diffusionssignal des Polymers auf der y-Achse schließt neben den charakteristischen ^1H -Signalen von P(Lys)-*b*-P(HPMA) auch die aromatischen Pyridylprotonen (A) der PDP-Modifizierung ein.

Agarosegelelektrophorese von P(Lys)-co-P(Lys-PDP)-*b*-P(HPMA) (P2) und pGL3-Basic (pDNA)

Nach der PDP-Modifizierung im P(Lys)-co-P(Lys-PDP)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer (P2) stehen für die Komplexierung von pDNA weniger positive Ladungen der Polylysingruppen zur Verfügung. Um das Komplexierungsverhalten von P2 bei der Polyplexbildung mit pDNA zu untersuchen, wurde eine Agarosegelelektrophorese bei verschiedenen N/P Verhältnissen durchgeführt (Abbildung 56A).

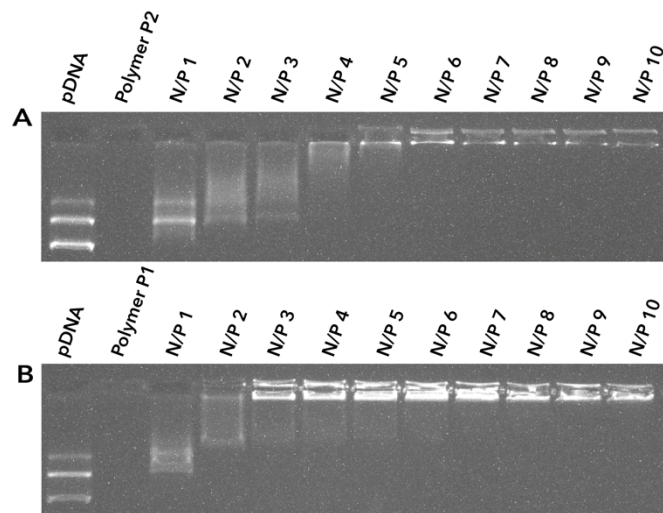


Abbildung 56. Agarosegelelektrophorese mit pGL3-Basic bei N/P 1-10. **A)** Mit P(Lys)-co-P(Lys-PDP)-*b*-P(HPMA) (P2). **B)** Mit P(Lys)-*b*-P(HPMA) (P1).

Vergleichend mit dem unmodifizierten P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer (P1) in Abbildung 56B startet die Komplexierung für das PDP-modifizierte Blockcopolymer (P2) mit weniger kationischen Lysinseitenketten bei höheren N/P Verhältnissen. Während in Abbildung 56B bei N/P 3 nur noch schwache Ausläufer der pDNA im Gel zu erkennen sind, liegt bei der Komplexierung mit P(Lys)-co-P(Lys-PDP)-*b*-P(HPMA) bei N/P 3 noch freie pDNA vor und die Komplexierung beginnt erst bei N/P Verhältnissen zwischen 4-5.

Folglich macht sich der Einbau der reaktiven Disulfide auch im anfänglichen Komplexierungsverhalten der P(Lys)-co-P(Lys-PDP)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymeren bemerk-

bar. Dennoch kann letztlich für beide Blockcopolymere P1 und P2 bei N/P Verhältnissen zwischen 6-7 von einer vollständigen pDNA-Komplexierung ausgegangen werden.

3.3.1.2 Endosomolytisches LAH4-L1-Peptid in der Polyplexbildung

In dieser Arbeit wurden die reaktiven PDP-Disulfidgruppen im P(Lys)-co-P(Lys-PDP)-b-P(HPMA) Blockcopolymer (vgl. Kapitel 3.3.1.1) zur reversiblen Vernetzung mit dem endosomolytischen Peptid LAH4-L1^[108,109] umgesetzt. Durch die Modifikation mit terminalen Cysteinen in LAH4-L1-Cys wurde das Peptid als funktionaler Dithiol-Vernetzer verwendet (Aminosäuresequenz von LAH4-L1-Cys : KKCLLAHALHLLALLALHLAHALKKC mit K: Lysin, A: Alanin, C: Cystein, L: Leucin und H: Histidin). Histidinreiche LAH4-Peptide als solche, werden aufgrund ihrer pDNA-komplexierenden Eigenschaften über Lysinseitenketten (K) als Transfektionsagenzien eingesetzt.^[108]

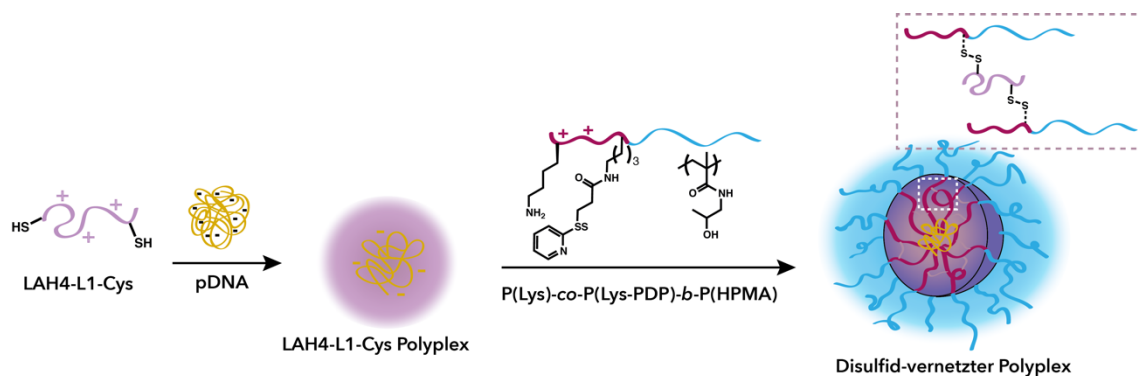


Abbildung 57. Reversible Disulfidvernetzung von PDP-Polyplexen mit LAH4-L1-Cys.

In Abbildung 57 ist das Schema zur Darstellung LAH4-L1-Cys-vernetzter pDNA-Polyplexe mit P(Lys)-co-P(Lys-PDP)-b-P(HPMA) Blockcopolymer (P2) dargestellt. Im ersten Schritt wurde das LAH4-L1-Cys-Peptid bei N/P 1 mit pDNA (pGL3-Basic) bei 4 °C vorkomplexiert. Die verringerte Temperatur soll ein vorzeitiges Oxidieren der Thiolgruppen unterbinden. Anschließend wurde das PDP-modifizierte P(Lys)-b-P(HPMA) Blockcopolymer (P2) zur vollständigen Komplexbildung in entsprechenden N/P Verhältnissen zugegeben und der Disulfidvernetzung für einige Stunden bei 4 °C, dann bei Raumtemperatur Zeit gegeben.

Unter Berücksichtigung der vier kationischen Lysineinheiten (K) wurde das Komplexbildungsverhalten von LAH4-L1-Cys mit pDNA (pGL3-Basic) bei N/P 0,5 bis N/P 4 über Agarosegelelektrophorese analysiert (Abbildung 58). Durch den Überschuss an negativer Ladung zeigte sich für N/P 0,5 wie erwartet noch freie pDNA, während bei

N/P 1 bereits ein Start der Komplexierung zu beobachten ist. Ab einem Verhältnis von N/P 2 kann von einer vollständigen pDNA-Komplexierung durch LAH4-L1-Cys ausgegangen werden.

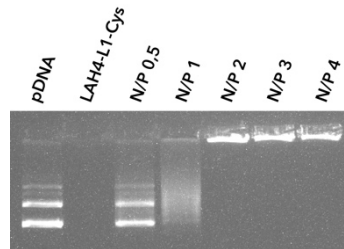


Abbildung 58. Agarosegelelektrophorese von LAH4-L1-Cys mit pGL3-Basic bei N/P 0,5-4.

Somit wurde für die Vorkomplexierung der pDNA mit dem LAH4-L1-Cys-Peptid nach dem Schema in Abbildung 57 ein Verhältnis von N/P 1 gewählt, um die Komplexierung anschließend durch die Zugabe des P(Lys)-co-P(Lys-PDP)-b-P(HPMA) Blockcopolymer (P2) unter Disulfidvernetzung zu vervollständigen.

Charakterisierung von pDNA-Polyplexen (PP) mit LAH4-L1 über DLS (Zetasizer)

Neben den disulfidvernetzten pDNA-Polyplexen mit Cystein-terminalem LAH4-L1-Peptid (LAH4-L1-Cys) und P(Lys)-co-P(Lys-PDP)-b-P(HPMA) Blockcopolymer (P2) wurden auf gleiche Weise pDNA-Polyplexe mit unmodifiziertem LAH4-L1-Peptid (Aminosäuresequenz: KKALLAHALHLLALLALHHLAHLKKA) und P(Lys)-b-P(HPMA) Blockcopolymer (P1) hergestellt. Letztere dienen als Vergleichsprobe für den in Kapitel 3.3.2.2 durchgeführten Transfektionsassay in Bezug auf den Einfluss der kovalenten Disulfidvernetzung des endosomolytisch-aktiven LAH4-L1-Peptids.

Beide unterschiedlichen LAH4-L1-modifizierten pDNA-Polyplexe wurden vergleichend über DLS (Zetasizer) charakterisiert (Ansätze, siehe Tabelle 18, Kapitel 5.9.3). Abbildung 59A zeigt die nicht vernetzten pDNA-Polyplexe mit LAH4-L1-Peptid und P(Lys)-b-P(HPMA) Blockcopolymer (P1). Analog zu den LAH4-L1-Cys vernetzten Polyplexen erfolgte eine Vorkomplexierung von pDNA und LAH4-L1-Peptid bei N/P 1 und anschließend wurde Blockcopolymer P1 zur vollständigen Komplexierung bei N/P 4 und 7 zugegeben. In Abbildung 59B sind entsprechend die vernetzten pDNA-Polyplexe mit LAH4-L1-Cys-Peptid und P(Lys)-co-P(Lys-PDP)-b-P(HPMA) (P2) in analoger Weise dargestellt.

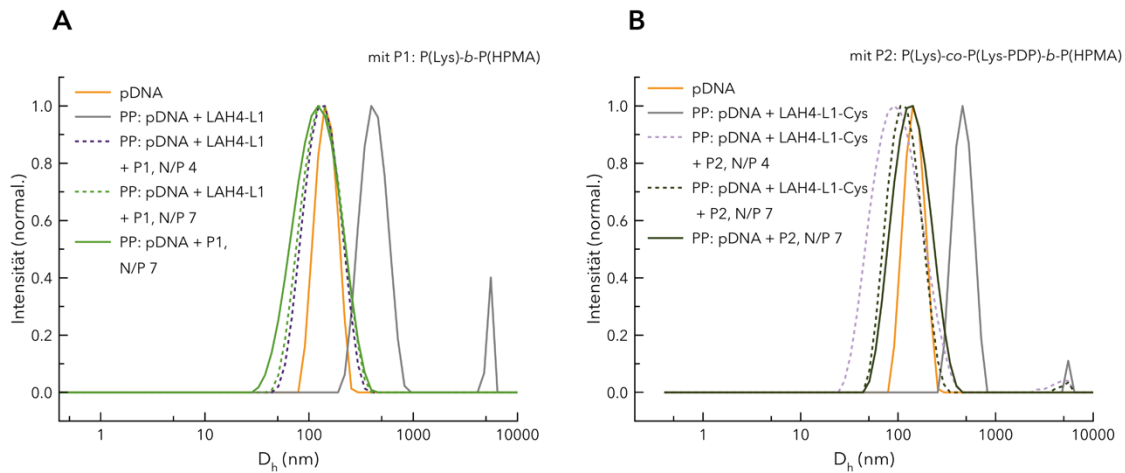


Abbildung 59. DLS **A**) pDNA-Polyplexe (PP) mit P1 und LAH4-L1. pDNA (orange) mit $D_h = 259$ nm, PP aus LAH4-L1 und pDNA (grau) mit $D_h = 740$ nm, PP aus P1 + LAH4-L1 und pDNA (N/P 4) (violett gestrichelt) mit $D_h = 121$ nm, PP aus P1 + LAH4-L1 und pDNA (N/P 7) (grün gestrichelt) mit $D_h = 116$ nm, PP aus P1 und pDNA (N/P 7) (blau) mit $D_h = 102$ nm. **B**) pDNA-Polyplexe (PP) mit P2 und LAH4-L1-Cys. pDNA (orange) mit $D_h = 259$ nm, PP aus LAH4-L1-Cys und pDNA (grau) mit $D_h = 704$ nm, PP aus P2 + LAH4-L1-Cys und pDNA (N/P 4) (rosa gestrichelt) mit $D_h = 86$ nm, PP aus P2 + LAH4-L1-Cys und pDNA (N/P 7) (dunkelgrün gestrichelt) mit $D_h = 108$ nm, PP aus P2 und pDNA (N/P 7) (dunkelgrün) mit $D_h = 122$ nm.

Die DLS-Messungen in Abbildung 59A/B zeigen für die freie pDNA (pGL3-Basic) einen hydrodynamischen Durchmesser von $D_h = 259$ nm (orange). Bei der Polyplexbildung von pDNA und dem jeweiligen Peptid (LAH4-L1 (A) / LAH4-L1-Cys (B)) als alleiniges Transfektionsagens bei einem Gewichtsverhältnis von 1:10^[108] wurden in beiden Fällen große Strukturen im Bereich von $D_h \sim 700$ nm detektiert (grau, Abbildung 59A/B). Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass die endosomolytischen LAH4-L1-Peptide als solche, keine Kondensation der pDNA bewirken im Gegensatz zu den pDNA-Polyplexen mit P(Lys)-b-P(HPMA) Blockcopolymeren (vgl. Abbildung 53). Dies ist möglicherweise auf die geringe Dichte an positiven Ladungen von jeweils nur vier Lysin-(K) Einheiten innerhalb der Peptidsequenz zurückzuführen, im Unterschied zu der hohen Ladungsdichte von 33 aufeinanderfolgenden Lysineinheiten im P(Lys)-b-P(HPMA) Blockcopolymer. Somit ergaben sich aus den DLS-Messungen für pDNA-Polyplexe mit LAH4-L1 / LAH4-L1-Cys ohne Blockcopolymer polydisperse Polyplexstrukturen (PDI $\sim 0,3$; vgl. Tabelle 10) im Bereich von $D_h \sim 700$ nm.

Im Vergleich dazu resultierten für die nicht-vernetzten Polyplexe aus pDNA, LAH4-L1-Peptid und zusätzlichem P(Lys)-b-P(HPMA) (P1) Blockcopolymer (Abbildung 59A) wesentlich kleinere Strukturen von $D_h \sim 120$ nm (violett und grün gestrichelt) für N/P 4 und 7, die im ähnlichen Größenbereich der reinen pDNA-P1 Polyplexe (ohne LAH4-L1) von $D_h = 102$ nm (grün) liegen. Somit bewirkte die nachträgliche Komplexierung mit P1 des vorgeformten pDNA-LAH4-L1 Polyplexes eine Kondensation der Nukleinsäure und führte zu kleineren Strukturen mit geringerer Dispersität (0,134 und 0,171; vgl. Tabelle 10).

Abbildung 59B zeigt die disulfidvernetzten Polyplexe aus pDNA, LAH4-L1-Cys und P2. Nach der Vorkomplexierung von pDNA und LAH4-L1-Cys konnten nach Zugabe von P2 Polyplexe mit Größen von $D_h = 86$ nm (rosa gestrichelt) für N/P 4 und $D_h = 108$ nm (dunkelgrün gestrichelt) für N/P 7 detektiert werden. Somit wurde analog zu den Polyplexen in Abbildung 59A durch die zusätzliche Komplexierung mit P2 eine pDNA-Kondensation im Polyplex mit LAH4-L1-Cys und P2 mit deutlich kleineren hydrodynamischen Durchmessern erzielt. Darüber hinaus hat sich die Größe der mit LAH4-L1-Cys-vernetzten Polyplexe (B) von $D_h = 86$ nm (N/P 4) (rosa gestrichelt) bzw. $D_h = 108$ nm (N/P 7) (dunkelgrün gestrichelt) im Vergleich zum Polyplex aus pDNA und P2 (dunkelgrün) mit $D_h = 122$ nm im Rahmen der Messgenauigkeit um ca. 20 - 30 % verringert (vgl. Tabelle 10). Dies könnte auf die kovalente Disulfidvernetzung zwischen LAH4-L1-Cys und P(Lys)-co-P(Lys-PDP)-b-P(HPMA) Blockcopolymers (P2) hindeuten, die die Größe der vernetzten Polyplexe im Vergleich zu nicht-vernetzten Systemen verringert.

Tabelle 10. Charakterisierung der pDNA-Polyplexe mit LAH4-L1 und LAH4-L1-Cys (DLS).

	D_h (nm)	PDI
pDNA	259±33	0,294
PP: pDNA + LAH4-L1	740±154	0,289
PP: pDNA + LAH4-L1 + P1, N/P 4	121±52	0,134
PP: pDNA + LAH4-L1 + P1, N/P 7	116±58	0,171
PP: pDNA + P1, N/P 7	102±62	0,222
pDNA	259±33	0,294
PP: pDNA + LAH4-L1-Cys	704±159	0,327
PP: pDNA + LAH4-L1-Cys + P1, N/P 4	86±62	0,240
PP: pDNA + LAH4-L1-Cys + P1, N/P 7	108±45	0,186
PP: pDNA + P2, N/P 7	122±63	0,177

3.3.2 P(Lys)-b-P(HPMA) Blockcopolymer als Transfektionsagenzien

Nach physikochemischer Charakterisierung der unterschiedlichen pDNA- und mRNA-Polyplexe basierend auf P(Lys)-b-P(HPMA) Blockcopolymeren (Kapitel 3.3.1) wurde die Transfektionseffizienz dieser Systeme an verschiedenen Zelllinien untersucht.

3.3.2.1 Transfektionsassay von pDNA-Polyplexen mit P(Lys)-b-P(HPMA) (P1)

Das in Kapitel 3.1 synthetisierte P(Lys)-b-P(HPMA) Blockcopolymer wurden mit einem funktionalen pDNA-Vektor (pGL3-Control), der für das Enzym Luciferase codiert, bei verschiedenen Verhältnissen von N/P 4, 7 und 10 komplexiert (vgl. Kapitel 5.15). Bei erfolgreicher Transfektion dieses Reportergens in die Zelle und anschließender Proteinexpression katalysiert das Enzym Luciferase die oxidative Umsetzung von D-Luciferin zu Oxyluciferin unter Erzeugung von Biolumineszenz.^[232] Diese kann hochspezifisch mit einem Luminometer bei einer Wellenlänge von 560 nm (Firefly *Photinus pyralis*) detektiert werden und dient zur Quantifizierung der Transfektionseffizienz.

Abbildung 60A zeigt den durchgeführten Transfektionsassay an HEK-293T Zellen (HEK: *human embryonic kidney*). Diese langjährig erforschte, einfach handhabbare Modellzelllinie ist für Transfektionsversuche aufgrund ihrer hohen Zellteilungsrate gut geeignet.^[233]

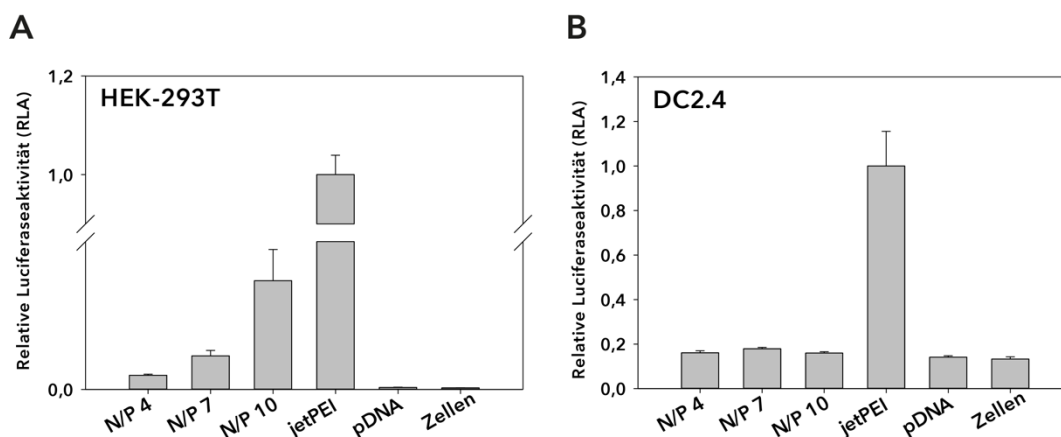


Abbildung 60. Biolumineszenz: Transfektionseffizienz von pDNA-Polyplexen mit P(Lys)-b-P(HPMA) (P1) bei N/P 4, 7 und 10. **A**) Transfektion an HEK-293T Zellen. **B**) Transfektion an DC2.4 Zellen.

Alle in diesem Kapitel beschriebenen Transfektionsversuche wurden von [REDACTED] unter der Betreuung von [REDACTED] an der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Für pDNA-Polyplexe mit P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer (P1) in Abbildung 60A konnte eine erfolgreiche Transfektion von HEK-293T Zellen erzielt werden. Als Positivkontrolle wurde der Goldstandard JetPEI, ein lineares Polyethylen-imin verwendet. In Relation zur Negativkontrolle, der nicht komplexierten, nackten pDNA, zeigt sich eine deutliche Steigerung der gemessenen Luciferaseaktivität der pDNA-Polyplexe. Innerhalb der analysierten Polyplexproben ist eine Zunahme der Transfektionseffizienz bei steigenden N/P Verhältnissen von N/P 4 zu N/P 10 auszumachen. Dies ist auf den überschüssigen Anteil von kationischem Blockcopolymer, das nicht an der Nukleinsäure-Komplexierung beteiligt ist, zurückzuführen. Ionische Wechselwirkungen mit der Endosomenmembran begünstigen die Freisetzung des Polyplexes und führen gleichzeitig zur verbesserten Transfektionseffizienz (vgl. Kapitel 1.2.2).

Im Hinblick auf eine Transfektion von dendritischen Immunzellen (vgl. Kapitel 1.2.1) wurde ein Transfektionsassay an der murinen Modellzelllinie DC2.4 durchgeführt. Diese modifizierte Zelllinie weist klassische Charakteristika von natürlichen dendritischen Zellen auf und ist darüber hinaus in der Lage sich zu teilen, wohingegen natürliche DCs *de novo* aus dem Knochenmark synthetisiert werden.^[233] Die im Vergleich zu HEK-293T Zellen wesentlich geringere Zellteilungsrate, erhöht den Schwierigkeitsgrad einer erfolgreichen Transfektion von DC2.4 Zellen.

Der durchgeführte Transfektionsassay von pDNA-Polyplexen mit P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer (P1) als Transfektionsagens an DC2.4 Zellen in Abbildung 60B zeigt keinen Erfolg. Die gemessene Luciferaseaktivität der Polyplexe bei verschiedenen N/P Verhältnissen unterscheidet sich nicht von der Negativkontrolle der nackten pDNA. Eine mögliche Begründung der ausbleibenden Transfektion kann zum einen die erwähnte verminderte Zellteilungsrate der DC2.4 Zellen gegenüber der HEK-293T Zelllinie sein. Dies erfordert eine alternative Translokation der pDNA aus dem Zytosol in den Zellkern, z. B. über Diffusion durch die Kernporen (vgl. Kapitel 1.2.2). Andererseits sind DCs weitestgehend im unreifen Zustand (immature DC) in der Lage über Endozytoserezeptoren Moleküle (Antigene) aufzunehmen.^[40] Bei fortschreitender Zellreifung, die zum einen durch zu häufiges Passagieren der DCs oder auch durch Endotoxine hervorgerufen werden kann, kommt es neben der Expression von co-stimulatorischen Oberflächenmolekülen auch zur Herabregulation der Endozytoserezeptoren auf der Zelloberfläche. Somit könnte die fortgeschrittene Reifung der DC2.4 Zellen eine mögliche Ursache für die unzureichende Aufnahme der Polyplexe sein und die daraus resultierende ausbleibende Transfektion erklären.

3.3.2.2 Transfektionsassay von pDNA-Polyplexen mit P(Lys)-b-P(HPMA) (P1)/ LAH4-L1 und P(Lys)-co-(P(Lys-PDP)-b-P(HPMA) (P2) / LAH4-L1-Cys

Eine weitere mögliche Ursache der ausbleibenden Transfektion der DC2.4 Zellen mit Polyplexen aus P(Lys)-b-P(HPMA) in Abbildung 60B könnte in einer unzureichenden endosomalen Freisetzung der Polyplexe begründet liegen. Deshalb wurden die in Kapitel 3.3.1.2 charakterisierten Polyplexe, die zusätzlich endosomolytisches LAH4-L1-Peptid enthalten, in einem Transfektionsassay auf eine verbesserte Transfektionseffizienz hin untersucht (Abbildung 61).

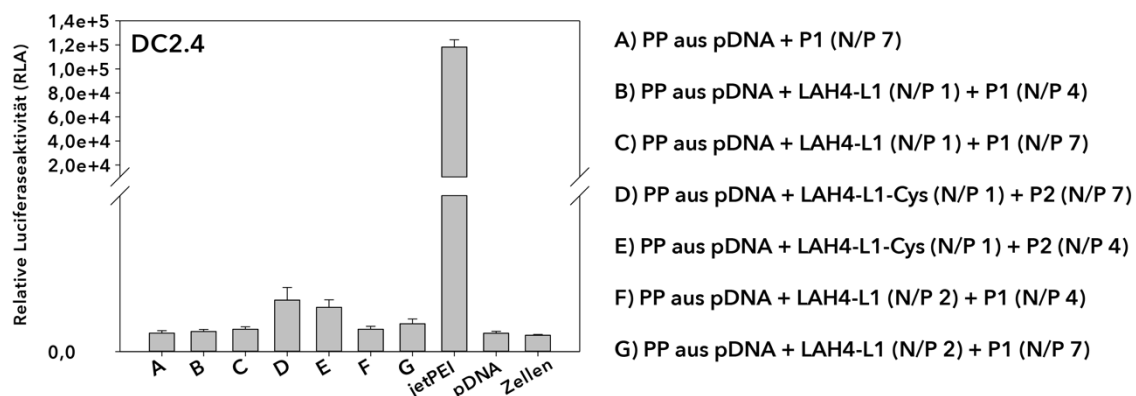


Abbildung 61. Biolumineszenz: Transfektionseffizienz an DC2.4 Zellen von pDNA-Polyplexen mit P(Lys)-b-P(HPMA) (P1) / LAH4-L1 bzw. P(Lys)-co-P(Lys-PDP)-b-P(HPMA) (P2) / LAH4-L1-Cys.

Es wurden sowohl die nicht-vernetzten Polyplexe aus P1 und vorkomplexiertem LAH4-L1-Peptid verwendet (B, C, F, G), als auch die disulfidvernetzten Polyplexe aus P2 und vorkomplexiertem LAH4-L1-Cys (D, E). Dennoch konnte für die Ansätze B-G in Bezug auf die Negativkontrolle der nackten pDNA keine signifikante Steigerung der Transfektionseffizienz durch das endosomolytisch-aktive LAH4-L1 Peptid nachgewiesen werden. Auch die Erhöhung des LAH4-L1-Anteils bei der Vorkomplexierung von LAH4-L1 mit pDNA bei N/P 2 statt N/P 1 in den Ansätzen F und G übte keinen signifikanten Einfluss auf die Transfektionseffizienz aus. Allerdings zeigt sich für die Ansätze D und E, die mit dem vernetzenden LAH4-L1-Cys-Peptid und dem P(Lys)-co-P(Lys-PDP)-b-P(HPMA) (P2) Blockcopolymer hergestellt wurden eine in Bezug auf die Negativkontrolle (nackte pDNA) leicht erhöhte Luciferaseaktivität (2-fach). Dies könnte auf einen positiven Effekt der kovalent vernetzten Polyplexe mit endosomolytischen LAH4-L1 hindeuten.

3.3.2.3 Transfektionsassay von mRNA-Polyplexen mit P(Lys)-*b*-P(HPMA) (P1)

Die in Kapitel 3.3.1) charakterisierten mRNA-Polyplexe mit Firefly Luciferase mRNA und P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer (P1) wurden ebenfalls auf ihr Transfektionsvermögen in einem Luciferase Assay evaluiert. In Abbildung 62 sind die relativen Luciferaseaktivitäten der Transfektionsversuche der mRNA-Polyplexe bei variablen N/P Verhältnissen zwischen N/P 2 und N/P 10 mit Blockcopolymer P1 an HEK-293T-Zellen (A) und BMDCs (*bone marrow-derived dendritic cells*) (B) dargestellt. Als Positivkontrolle diente in beiden Assays DOTAP (1,2-Di-9Z-octadecenoyl)-3-trimethylammoniumpropan-Methylsulfat) als etabliertes liposomales Transfektionsagens. Für beide Zelllinien konnte keine erfolgreiche Transfektion mit mRNA-Polyplexen nachgewiesen werden. Die gemessenen Luciferaseaktivitäten der Polyplexe bei N/P Verhältnissen von 2 bis 10 unterscheiden sich nicht von der Negativkontrolle der freien mRNA.

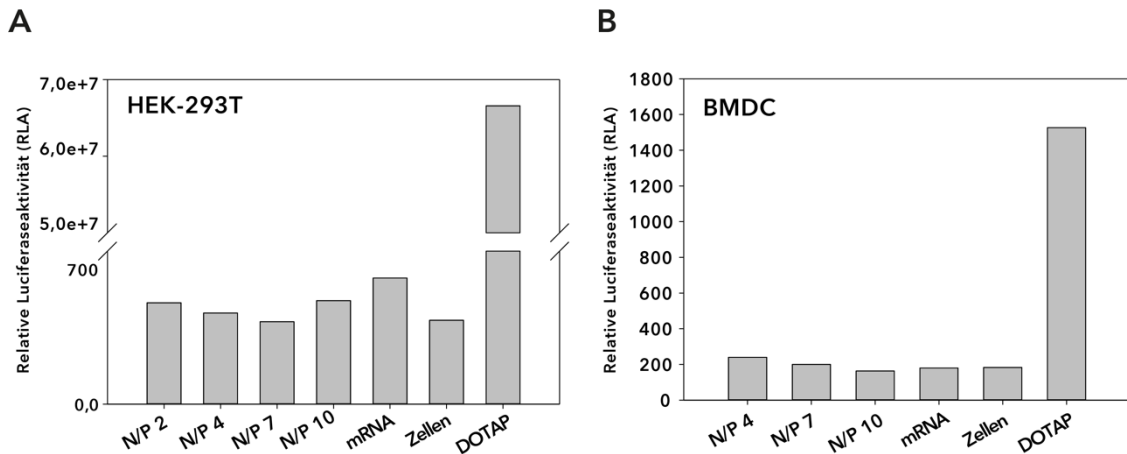


Abbildung 62. Biolumineszenz: Transfektionseffizienz von mRNA-Polyplexen mit P(Lys)-*b*-P(HPMA) (P1) bei N/P 2-10. **A)** Transfektion an HEK-293T Zellen. **B)** Transfektion an BMDCs.

Wie in der Einleitung in Kapitel 1.2.2 beschrieben, bietet das Konzept der mRNA-Transfektion den Vorteil, dass die Translation des Gens in das entsprechende Protein direkt nach der endosomalen Freisetzung im Zytosol stattfinden kann und nicht wie im Fall der pDNA-Polyplexe eine Translokation in den Zellkern erfordert. Dennoch konnte keine Transfektion mit mRNA-Polyplexen an HEK-293T-Zellen (Abbildung 62A) bestätigt werden, während der Transfektionsassay mit pDNA in Abbildung 60A, der zusätzlich einen Kernimport der Nukleinsäure voraussetzt, erfolgreich war. Die ausbleibende mRNA-Transfektion lässt jedoch nicht auf einen vorzeitigen enzymatischen Abbau der sensitiven Nukleinsäure über RNAsen schließen, da die Kontrolle mit DOTAP erfolgreich war. Somit könnte die mangelnde Expression von Luciferase in den in Abbildung 62 durchgeführten Transfektionsversuchen möglicherweise auf eine ausbleibende Freisetzung der mRNA aus dem P(Lys)-*b*-P(HPMA)-

Polyplex hindeuten. Die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der einzelsträngigen mRNA und dem kationischen Blockcopolymer könnten im Vergleich zur rigiden, doppelsträngigen Plasmid-DNA aufgrund der wesentlich flexibleren Struktur und geringeren Größe der mRNA stärker ausgeprägt sein. Dies würde die endosomale Freisetzung der mRNA bzw. die Polyplexdissoziation im Allgemeinen erschweren oder gar verhindern und die negativen Transfektionsexperimente erklären. Auch die Verwendung von mRNA-Polyplexen bei hohen N/P Verhältnissen (N/P 10) für eine begünstigte endosomale Freisetzung durch zusätzliches Polykation (vgl. Abbildung 60A) erbrachte keine Wirkung und unterstützt die These der unzureichenden mRNA-Freisetzung aus dem Polyplex.

Zusammenfassend führte die Ausbildung von pDNA-Polyplexen mit P(Lys)-*b*-P(HPMA) zur erfolgreichen Transfektion von HEK-293T-Zellen. Die zusätzliche reversible Vernetzung der polymerbasierten Transfektionssysteme mit endosomolytisch aktivem LAH4-L1-Peptid blieb ohne signifikante Erhöhung der Transfektionseffizienz für die DC2.4 Zelllinie mit geringer Zellteilungsrate. Weitere Möglichkeiten die Transfektionseffizienz der Systeme für eine Transfektion von sensitiven dendritischen Zellen zu verbessern, bieten die zahlreichen, in Kapitel 1.2.2 beschriebenen Ansätze zur chemischen Modifikation mit alternativen pH-puffernden Gruppen, wie z.B. Histidinen für eine effektivere endosomale Freisetzung der Nukleinsäure oder z. B. die Konjugation von Signalsequenzen für einen Peptid-vermittelten Kernimport.

Der negative Transfektionsassay an HEK-293T-Zellen mit mRNA-Polyplexen könnte auf eine unzureichende Freisetzung der Nukleinsäure aus dem Polyplex zurückzuführen sein. Eine nähere Charakterisierung der mRNA-Transfektion mittels konfokaler Mikroskopie mit fluoreszenzmarkierter mRNA und fluoreszenzmarkiertem mit P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer könnte zur Aufklärung der ausbleibenden Transfektion beitragen.

3.4 Modifizierung von IgG-Antikörpern

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die IgG-Antikörper aDEC205, IgG2a und aCD25 über eine enzymatische Modifizierungsmethode mit bakterieller Transglutaminase (BTG)^[184] regioselektiv mit unterschiedlichen Funktionalitäten ausgestattet (Abbildung 63). Der erste enzymatische Schritt (A) beinhaltet die Abspaltung *N*-glykosidisch verknüpfter Zuckerstrukturen an den Asparaginseitenketten in Position 297 (N297) unter Verwendung des Enzyms Peptid-*N*-Glykosidase F (PNGase F). Die Anbindung von funktionalen Linkermolekülen erfolgte spezifisch im Fc-Teil der Antikörper an zwei definierten Glutaminresten (Q295) in den schweren Ketten des IgG-Antikörpers (B). Diese regioselektive Modifizierung basiert auf einem BTG-vermittelten Acylgruppen-transfer von Glutaminresten im IgG-Antikörper auf primäre Aminosubstrate, wodurch unter Austritt von Ammoniak eine kovalente Isopeptidbindung gebildet wird (vgl. Kapitel 1.3.4.1). Der Vorteil der enzymatischen Antikörpermodifizierung gegenüber der unspezifischen (*random*) Funktionalisierung (vgl. Kapitel 1.3.4) ist die Synthese homogener Antikörperkonjugate aufgrund der definierten Modifizierungspositionen an Q295. Weiterhin sollte die Rezeptorbindung über den Fab-Teil des Antikörpers durch die chemische Modifizierung im Fc-Teil nicht beeinflusst werden.

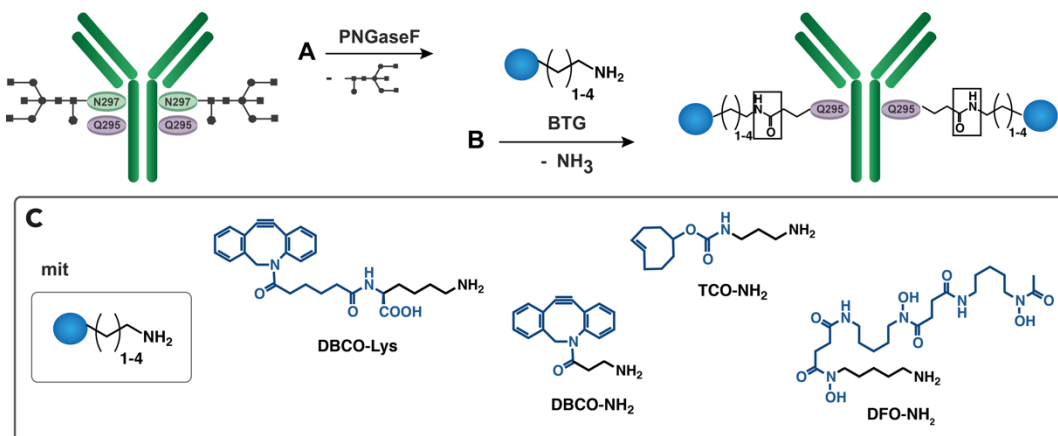


Abbildung 63. Enzymatische Antikörpermodifizierung. **A)** Deglykosylierung mit PNGase F. **B)** BTG-vermittelte Modifizierung mit unterschiedlichen primären Aminen.

Abbildung 63C zeigt die zur enzymatischen Antikörpermodifizierung verwendeten funktionalen BTG-Substrate mit primärer Aminogruppe und variierender Alkylkette. Je nach Anwendung unterscheidet sich ihre funktionale Einheit.

Für eine Adressierung von dendritischen Immunzellen im Rahmen der Tumormimmuntherapie (vgl. Kapitel 1.2) wurde der IgG-Antikörper aDEC205^[51,52] über die in Abbildung 63 dargestellte enzymatische Methode mit Dibenzocyclooctin-(DBCO) und *trans*-Cycloocten-(TCO) Gruppen funktionalisiert. Hierzu wurden die kommerziell erworbenen Verbindungen DBCO-NH₂ und TCO-NH₂ als BTG-Substrate eingesetzt.

Darüber hinaus wurde DBCO-Lys als Lysinsurrogat zur verbesserten enzymatischen Erkennung in einer dreistufigen Synthese hergestellt (Abbildung 64).^[216]

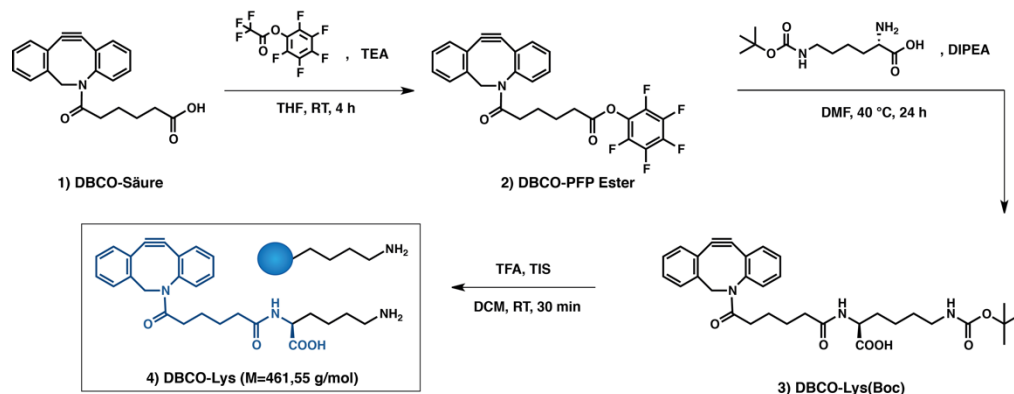
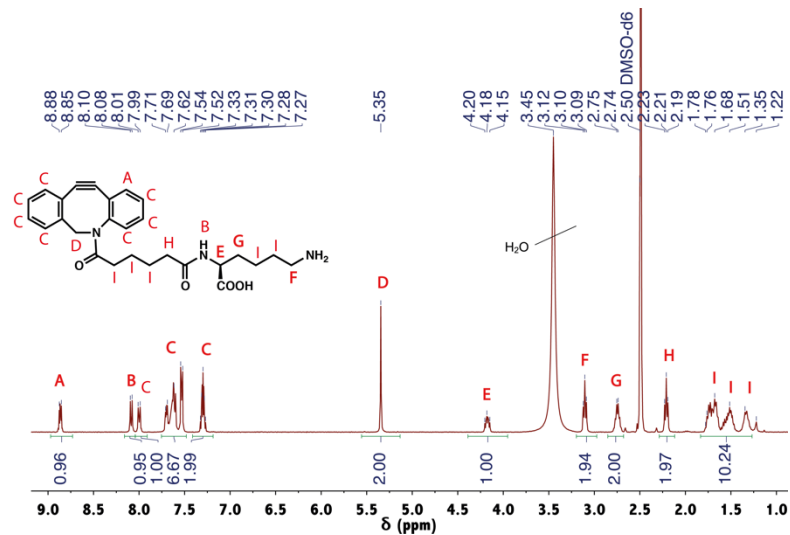


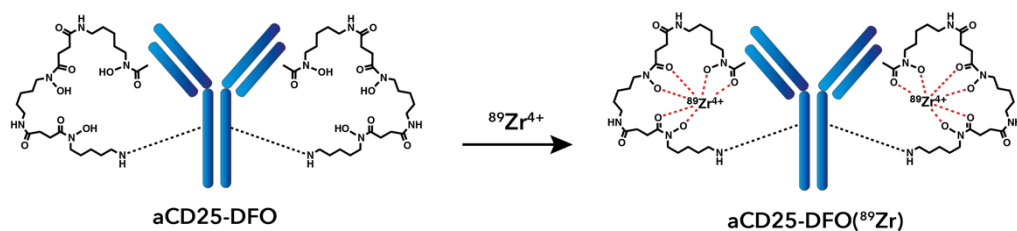
Abbildung 64. Synthese von DBCO-Lys.

Ausgehend von DBCO-Säure (1) wurde in einer Umesterung mit Pentafluorphenyltrifluoroacetat die Carboxylgruppe als Pentafluorphenylester aktiviert und DBCO-PFP Ester (2) erhalten. Anschließend erfolgte ein nukleophiler Angriff der α -Aminogruppe von *N*- ϵ -Boc-L-Lysin auf den Reaktivester und wurde unter Ausbildung einer Amidbindung kovalent angebunden. DBCO-Lys(Boc) (3) wurde unter sauren Reaktionsbedingungen mit Trifluoressigsäure (TFA) in Dichlormethan entschützt. Um mögliche Nebenreaktionen zu vermeiden, wurde Triisopropylsilan (TIS) hinzugefügt, das als *Scavenger* für das bei der Boc-Entschützung entstehende Tritylkation diente.^[234] Nach Aufarbeitung über HPLC konnte DBCO-Lys (4) mit einer Gesamtausbeute von 35 % über drei Synthesestufen erhalten werden. Die erfolgreiche Synthese von DBCO-Lys konnte über die Zuordnung der Protonensignale (A-I) im ¹H-NMR-Spektrum in Abbildung 65 bestätigt werden. DBCO-Lys wurde als BTG-Substrat für die enzymatische Antikörperfunktionalisierung von aDEC205 in Kapitel 3.4.1 eingesetzt.

Abbildung 65. $^1\text{H-NMR}$ von DBCO-Lys in DMSO-d_6 .

Der enzymatisch modifizierte DEC205-Antikörper mit regioselektiv eingeführten DBCO- bzw. TCO-Gruppen wurde zur bioorthogonale Konjugation über SPAAC (*strain-promoted alkyne-azide-cycloaddition*) und IEDDA-Cycloaddition (*inverse electron-demand Diels-Alder-cycloaddition*) mit azid- bzw. tetrazinfunktionalisierte Polymere und Nanopartikel verwendet (siehe Kapitel 3.5).

In einem Nebenprojekt wurde der IgG-Antikörper aCD25 ebenfalls BTG-vermittelt mit Deferoxamin (DFO) über den kommerziell erworbenen Linker DFO-NH₂ modifiziert (vgl. Abbildung 63). In der Radiomarkierung von IgG-Antikörpern dient Deferoxamin als Chelator zur Komplexbildung von Radionuklidmetallen, wie z. B. ^{89}Zr (Abbildung 66).^[153] Anschließend soll eine Immunstimulation durch die Bindung dieses Radioimmunkonjugats an aktivierte T-Lymphozyten über Positronen-Emissionstomographie (PET) nachgewiesen werden.

Abbildung 66. DFO-Modifizierung von aCD25 und Radiomarkierung mit ^{89}Zr .

Für einige Experimente in dieser Arbeit wurden als Vergleichskontrolle zu den regioselektiv modifizierten Antikörpern nach Abbildung 63 zusätzlich die entsprechenden unspezifisch modifizierten Antikörper hergestellt. Wie im Schema in Abbildung 67A dargestellt, wurde aDEC205 über die primären Amine der Lysinseitenketten an der Proteinoberfläche mit dem *N*-Hydrosuccinimid-(NHS) Ester von

DBCO-PEG₄-NHS über klassische Reaktivesterchemie unspezifisch mit DBCO-Gruppen funktionalisiert. Die Umsetzung von aCD25 mit dem aminreaktiven Isothiocyanat-(NCS) Linker des Deferoxamins (DFO-NCS) führte analog über die Lysinseitenketten des IgGs zur unspezifischen Modifizierung (Abbildung 67B).

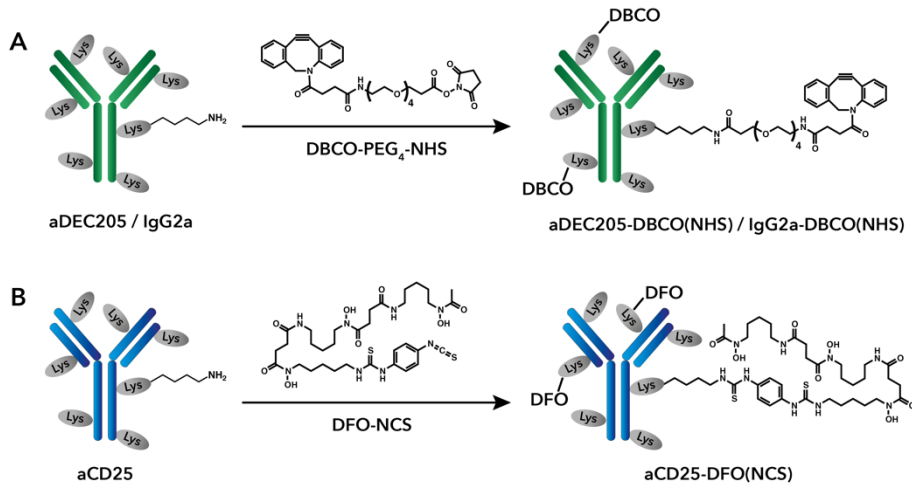


Abbildung 67. Unspezifische Antikörpermodifizierung. **A**) aDEC205-DBCO(NHS). **B**) aCD25-DFO(NCS).

Tabelle 11 zeigt zur Übersicht die in den nachfolgenden Kapiteln durchgeführten Kombinationen der spezifischen enzymatischen Antikörpermodifizierungen (Abbildung 63) und der unspezifischen Funktionalisierungen (Abbildung 67).

Tabelle 11. Antikörpermodifizierungen.

	aDEC205	IgG2a	aCD25
DBCO-Lys*	✓	✓	-
DBCO-NH ₂ *	✓	✓	-
DBCO-NHS**	✓	✓	-
TCO-NH ₂ *	✓	-	-
DFO-NH ₂ *	-	-	✓
DFO-NCS**	-	-	✓

* enzymatisch (BTG-vermittelt)

** unspezifisch (NHS- bzw. NCS-Chemie)

3.4.1 DBCO-Funktionalisierung von aDEC205 und IgG2a

Dieses Kapitel umfasst die enzymatische DBCO-Funktionalisierung von aDEC205 und dessen Isotyp IgG2a mit PNGase F und BTG nach dem Schema in Abbildung 63. Als BTG-Substrate wurden DBCO-Lys^[216] und DBCO-NH₂ verwendet. Alle DBCO-modifizierten Antikörper wurden sowohl mit als auch ohne Alexa Fluor 647-Fluoreszenzmarkierung hergestellt. Dafür wurden die jeweiligen nativen Antikörper vor den enzymatischen Reaktionen mit Alexa Fluor 647 NHS Ester umgesetzt. Die kovalente Anbindung des Farbstoffs erfolgte unspezifisch über die Oberflächenlysine des Antikörpers.

Charakterisierung über UV/VIS-Spektroskopie

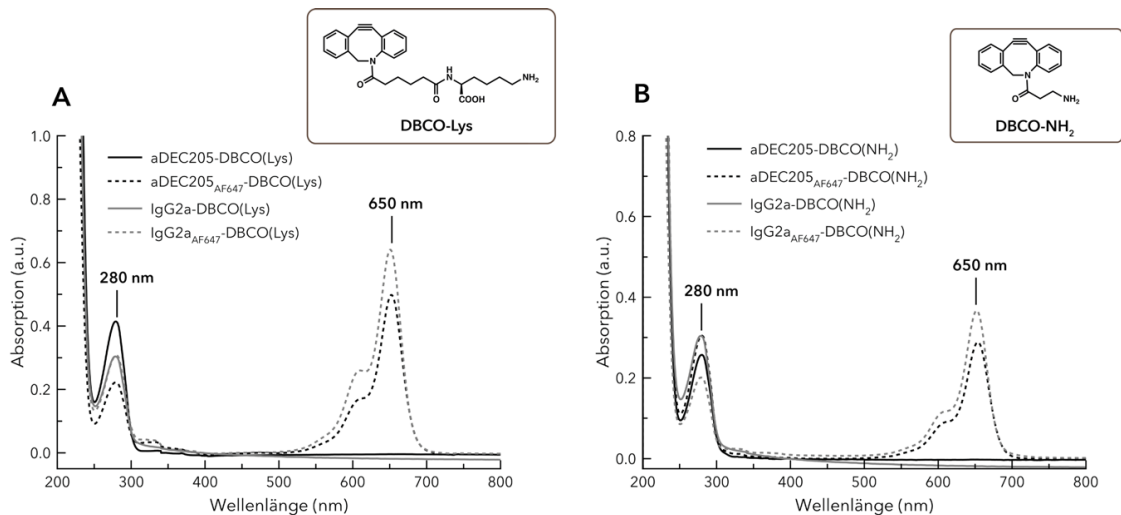


Abbildung 68. UV/VIS-Spektren von aDEC205-DBCO (schwarz), aDEC205_{AF647}-DBCO (schwarz gestrichelt), IgG2a-DBCO (grau) und IgG2a_{AF647}-DBCO (grau gestrichelt). **A)** DBCO-Lys. **B)** DBCO-NH₂.

Abbildung 68 zeigt die UV/VIS-Spektren der enzymatisch DBCO-funktionalisierten Antikörper über unterschiedliche BTG-Substrate (A: DBCO-Lys, B: DBCO-NH₂). Die jeweiligen Ansätze ohne Fluoreszenzmarkierung für aDEC205-DBCO (schwarz) und IgG2a-DBCO (grau) weisen eine für IgG-Antikörper charakteristische Absorptionsbande bei 280 nm auf. Für die entsprechenden AF647-markierten Ansätze (schwarz/grau gestrichelt) wurde neben der 280 nm Bande eine zusätzliche Absorption bei ca. 650 nm detektiert, die dem AF647-Fluoreszenzfarbstoff zuzuordnen ist.

Über das gemessene Absorptionsmaximum bei 280 nm und unter Anwendung des Lambert-Beer-Gesetzes^[235,236] in Gleichung 3 konnte unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung die vorliegende Antikörperkonzentration der unterschiedlichen Ansätze ermittelt werden (siehe Tabelle 12).

$$E_{\alpha} = \log_{10} \cdot \left(\frac{I_0}{I_1} \right) = \varepsilon_{\alpha} \cdot c \cdot d \quad (3)$$

E_{α} : Extinktion (Absorbanz) bei einer Wellenlänge α

I_0 : Intensität des einfallenden Lichts

I_1 : Intensität des transmittierten Lichts

ε_{α} : dekadische Extinktionskoeffizient bei einer Wellenlänge α

c : Stoffmengenkonzentration

d : Schichtdicke der Küvette

Zur Quantifizierung der Farbstoffanbindung pro Antikörper wurde Gleichung 4 verwendet:

$$\frac{n(AF647)}{n(IgG)} = \frac{E_{650} \cdot \varepsilon_{\alpha}(IgG)}{\varepsilon_{\alpha}(AF647) \cdot (E_{280} - (E_{650} \cdot 0,03))} \quad (4)$$

Mit $\varepsilon_{\alpha}(IgG) = 203\,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ für den Extinktionskoeffizienten des Antikörpers^[237], $\varepsilon_{\alpha}(AF647) = 239\,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ für den Extinktionskoeffizienten von AF647^[238] und 0,03 als Korrekturfaktor, der den Beitrag des Farbstoffs zur Absorption bei 280 nm berücksichtigt. Die Berechnungen aus Gleichung 4 ergaben für alle DBCO-funktionalisierten Antikörperproben eine durchschnittliche Anbindung von 1-2 Fluoreszenzfarbstoffmolekülen pro IgG-Antikörper (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12. Konzentrationen DBCO-funktionalisierter Antikörper und Quantifizierung von AF647 pro Antikörper.

	E_{280}	Verdünnung	c ($\mu\text{mol/L}$)	E_{650}	AF647/IgG
aDEC205-DBCO(Lys)	0,4143	1	2,04	-	-
aDEC205 _{AF647} -DBCO(Lys)	0,2223	5	5,48	0,4982	2,0 (2)*
IgG2a-DBCO(Lys)	0,3041	5	7,49	-	-
IgG2a _{AF647} -DBCO(Lys)	0,3074	1	1,51	0,6409	1,8 (2)*
aDEC205-DBCO(NH ₂)	0,2572	5	6,34	-	-
aDEC205 _{AF647} -DBCO(NH ₂)	0,3048	5	7,51	0,2887	0,8 (1)*
IgG2a-DBCO(NH ₂)	0,3042	5	7,49	-	-
IgG2a _{AF647} -DBCO(NH ₂)	0,2011	10	9,90	0,3670	1,6 (2)*

* Die Werte für AF647-Moleküle pro Antikörper wurden sinngemäß ganzzahlig gerundet.

Aufarbeitung Enzymatisch DBCO-Modifizierter Antikörper - SDS-PAGE Analytik

Die Aufarbeitung der modifizierten Antikörperproben stellte sich in vielerlei Hinsicht als anspruchsvoll heraus. Aus der Reaktionslösung mussten sowohl die verwendeten Enzyme PNGase F und BTG entfernt werden, als auch der eingesetzte Überschuss an DBCO-Lys bzw. DBCO-NH₂ (80 eq) und AF647-Fluoreszenzfarbstoff (10 eq). Die Abtrennung erfolgte über Spinfiltration mit Zentrifugenfilter mit einer Ausschlussgrenze (MWCO: *molecular weight cut-off*) von 100 kDa. Nach den ersten beiden Modifikationsschritten (AF647-Markierung und Deglykosylierung) wurde jeweils in drei bis fünf Zentrifugationsschritten mit jeweils 0,5-1 mL PBS überschüssiger Farbstoff und PNGase F herausgewaschen. Nach der finalen BTG-vermittelten Umsetzung mit DBCO-Lys/NH₂ wurde die Reaktionslösung in weiteren fünf bis zehn Waschschritten aufgearbeitet.

Die vollständige Abtrennung von überschüssigem AF647-Farbstoff ($M \approx 1250$ g/mol) ist essentiell, um eine möglichst genaue Bestimmung des Farbstoff pro Antikörper Verhältnisses nach Gleichung 4 über UV/VIS-Spektroskopie durchführen zu können. Weiterhin ist es für nachfolgende FCS-Messungen wichtig, dass die eingesetzten modifizierten Antikörper weitestgehend frei von ungebundenem Farbstoff sind. Das Abtrennen des freien AF647-Farbstoffs aus der Reaktionslösung konnte über UV/VIS-Spektroskopie der Filtrate mit dem abnehmenden Signal bei 650 nm verfolgt werden. Der Nachweis für ein vollständiges Entfernen des überschüssigen BTG-Substrates (DBCO-Lys/NH₂) war aufgrund zu geringer Konzentrationen über UV/VIS-Spektroskopie nicht möglich.

Zur Detektion der vollständigen Abtrennung der eingesetzten Enzyme PNGase F und BTG wurde jeweils eine SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) durchgeführt (Abbildung 69).^[216]

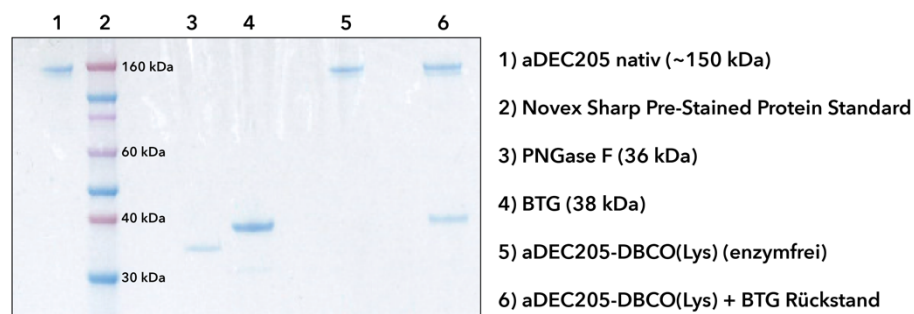


Abbildung 69. SDS-PAGE DBCO-funktionalisierter DEC205-Antikörper.

Spalte 1 zeigt den nativen unmodifizierten DEC205-Antikörper mit einem Molekulargewicht von ca. 150 kDa. Spalte 3 und 4 detektieren die jeweiligen Enzyme PNGase F (36 kDa) und BTG (38 kDa). Am Beispiel der Modifizierung von aDEC205

mit DBCO-Lys ist in Spalte 5 ausschließlich eine Bande zu sehen, die vergleichend mit Spalte 1 dem modifizierten aDEC205 zuzuordnen ist. Dies bestätigt neben der erfolgreichen Abtrennung beider Enzyme weiterhin eine intakte Proteinstruktur des Antikörpers und schließt eine Proteolyse während des enzymatischen Modifizierungsprozesses aus. Spalte 6 zeigt eine aDEC205-DBCO(Lys) Probe mit BTG-Rückständen, die zur vollständigen Entfernung des Enzyms weiteren Waschschritten unterzogen wurde.

Neben der Aufarbeitung der Antikörperproben über Spinfiltration eignete sich auch die präparative Größenausschlusschromatographie (SEC) mit PBS als Elutionsmittel zum Abtrennen der Enzyme und des DBCO-Linkers. Abbildung 70A zeigt die Elugramme der einzeln vermessenen Komponenten von nativem DEC205-Antikörper (grün) bei einem Elutionsmaximum von 43,1 mL (1) und der beiden Enzyme entsprechend dem geringeren Molekulargewicht bei größeren Elutionsvolumina von 48,8 mL (2) für BTG (grau) und 50,5 mL (3) für PNGase F (schwarz).

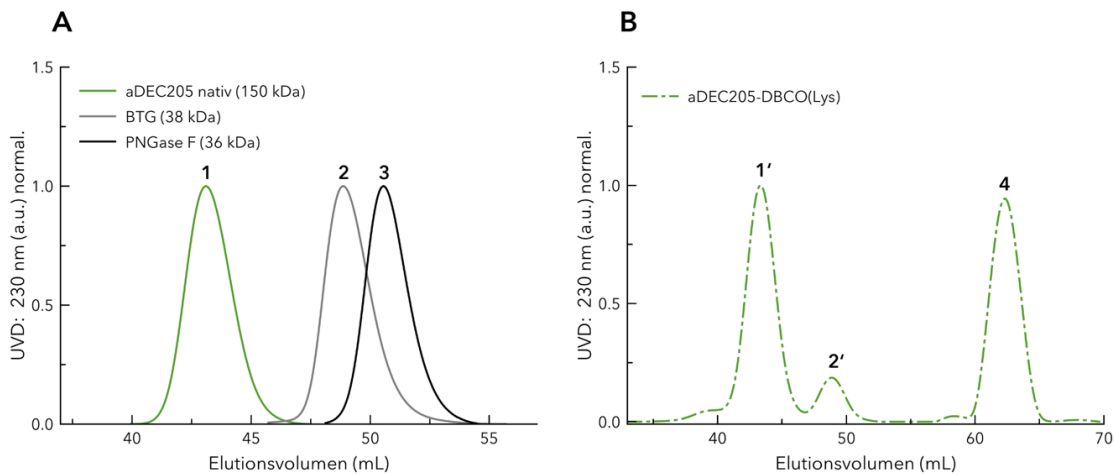


Abbildung 70. SEC in PBS: **A)** aDEC205 nativ (grün), PNGase F (grau) und BTG (schwarz). **B)** aDEC205-DBCO(Lys) Reaktionslösung.

In Abbildung 70B ist das Elugramm der über SEC aufgearbeiteten enzymatisch modifizierten aDEC205-DBCO(Lys) Probe dargestellt. Signal (1') bei 43,3 mL entspricht dem modifizierten DEC205-DBCO(Lys)-Antikörper, dessen Fraktion gut von Signal (2') bei 48,9 mL der nicht umgesetzten BTG abgetrennt werden konnte. Weiterhin kann das Signal bei einem Elutionsvolumen von 63,7 mL (4) überschüssigem niedermolekularem DBCO-Lys zugeordnet werden, das über SEC nachweislich aus der Reaktionslösung abgetrennt werden konnte. PNGase F wurde aufgrund der geringen Konzentrationen nicht als separates Signal im Elugramm in Abbildung 70B detektiert. Kleine Mengen könnten potentiell mit Signal (2') überlagern.

Somit konnten über Größenausschlusschromatographie sowohl die verwendeten Enzyme als auch überschüssiges BTG-Substrat aus der Reaktionslösung entfernt werden. Dennoch wurde die Aufarbeitung der nachfolgenden Antikörperansätze ausschließlich über Spinfiltration durchgeführt, da der Ausbeuteverlust bei der SEC-

Methode mit anschließender Aufkonzentrierung der gesammelten Fraktionen deutlich höher war.

Charakterisierung Enzymatisch DBCO-Modifizierter Antikörper über DLS und FCS

Der Einfluss der enzymatischen DBCO-Funktionalisierung auf die Struktur bzw. die Größe der IgG-Antikörper wurde mittels dynamischer Mehrwinkel-Lichtstreuung (DLS) sowie Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) für die fluoreszenzmarkierten Antikörperproben analysiert.^[216] Die DLS-Messung in Abbildung 71A zeigt nahezu identische Autokorrelationsfunktionen für den nativen aDEC205 (rot) und den DBCO-modifizierten aDEC205-DBCO(Lys) (schwarz). Für den unfunktionalisierten aDEC205 ergibt sich ein hydrodynamischer Radius von $R_h = 5,3 \text{ nm}$ (C). Im Rahmen der Messgenauigkeit ist nach der enzymatischen Modifizierung keine signifikante Größenänderung für aDEC205-DBCO(Lys) (B) mit $R_h = 5,6 \text{ nm}$ auszumachen.

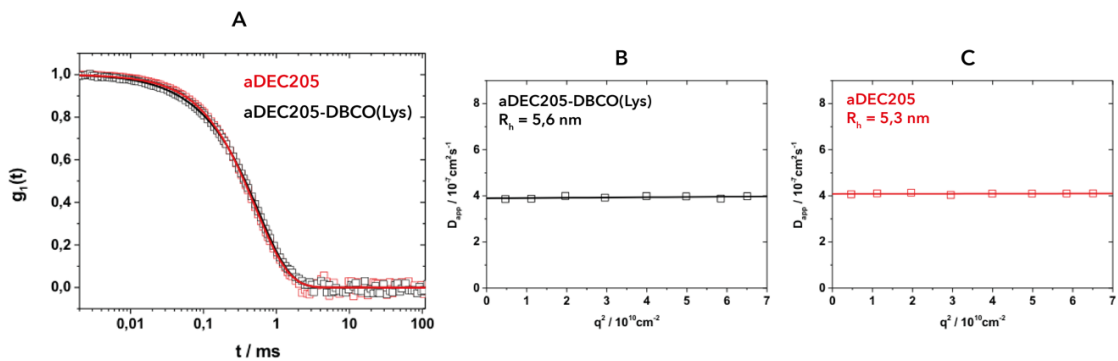


Abbildung 71. DLS: **A)** Autokorrelationsfunktion von aDEC205 (rot) und aDEC205-DBCO(Lys) (schwarz). **B)** Mehrwinkel DLS: aDEC205-DBCO(Lys) ($R_h = 5,6 \text{ nm}$). **C)** Mehrwinkel DLS: aDEC205 ($R_h = 5,3 \text{ nm}$).

Die DLS-Messung wurde von [REDACTED] unter der Betreuung von [REDACTED] und [REDACTED] am Institut für Physikalische Chemie der JGU Mainz durchgeführt.

Mittels FCS wurden alle vier Kombinationen von DBCO-modifiziertem aDEC205 bzw. IgG2a mit DBCO-Lys (Abbildung 72A) und DBCO-NH₂ (Abbildung 72B) charakterisiert. In beiden Spektren ist im Rahmen der Messgenauigkeit keine signifikante Änderung im hydrodynamischen Radius zwischen nativem AF647-markierten Antikörpern (grüne bzw. orange Dreiecke) und den enzymatisch DBCO-modifizierten Antikörpern (grüne bzw. orange Punkte) zu detektieren. Übereinstimmend mit den DLS-Messungen in Abbildung 71 liegen die hydrodynamischen Radien der Antikörper zwischen 5 und 6 nm.

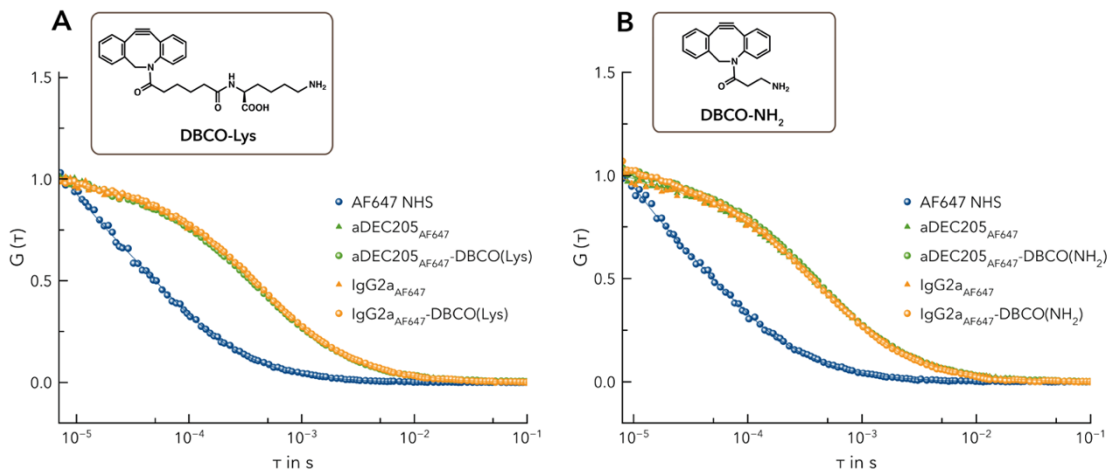


Abbildung 72. FCS: **A)** AF647 NHS (blau) mit $R_h = 0,76$ nm, aDEC205_{AF647} (grüne Dreiecke) mit $R_h = 6,0$ nm, aDEC205_{AF647}-DBCO(Lys) (grüne Punkte) mit $R_h = 6,2$ nm, IgG2a_{AF647} (orange Dreiecke) mit $R_h = 6,2$ nm, IgG2a_{AF647}-DBCO(Lys) (orange Punkte) mit $R_h = 6,0$ nm. **B)** AF647 NHS (blau) mit $R_h = 0,75$ nm, aDEC205_{AF647} (grüne Dreiecke) mit $R_h = 6,0$ nm, aDEC205_{AF647}-DBCO(NH₂) (grüne Punkte) mit $R_h = 6,0$ nm, IgG2a_{AF647} (orange Dreiecke) mit $R_h = 6,2$ nm, IgG2a_{AF647}-DBCO(NH₂) (orange Punkte) mit $R_h = 5,6$ nm.

Nachweis der DBCO-Funktionalisierung über HR-Massenspektrometrie

Die eigentliche funktionale Charakterisierung der Deglykosylierung und der anschließenden DBCO-Anbindung an den IgG-Antikörper erfolgte mittels hochauflösender Massenspektrometrie (HR-MS) am Beispiel von aDEC205-DBCO(Lys).^[216] Die Antikörperproben wurden wie in Kapitel 5.2 beschrieben, sorgfältig über Spinfiltration mit 0,2 %-iger wässriger Ameisensäure gewaschen. Zur massenspektrometrischen Detektion von Proteinen, insbesondere von hochmolekularen IgG-Antikörpern mit ca. 150 kDa, ist es notwendig, jegliche Salze aus der Probe zu entfernen.^[237] Dies beinhaltet zunächst den Lösungsmittelaustausch von PBS auf Wasser. Die sauren Bedingungen während der Entsalzungsprozedur mit 0,2 %-iger Ameisensäure sind notwendig, um interne Salze, die sich an den Aminosäureseitenketten von Hydroxyl- bzw. Carboxylgruppen mit Natrium- oder Kaliumionen gebildet haben können, zu entfernen. Deshalb wurden die Antikörperproben direkt vor der Messung einer aufwendigen Entsalzung unterzogen. Dabei wurden die Ansätze in mindestens 15 Waschschrritten mit 0,2 %-iger Ameisensäure über Spinfiltration gewaschen, wobei das Filtrvolumen jeweils von ca. 0,5 mL auf 0,1 mL reduziert wurde. Neben der Entsalzung der Antikörperprobe bewirken die sauren Bedingungen außerdem eine Proteindenaturierung, wodurch über die Auflösung der Tertiärstruktur des Antikörpers ein höherer Protonierungsgrad während der HR-MS-Messung möglich wird.

Es ist wichtig zu erwähnen, dass die Antikörper als vollständiges Protein, das heißt mit einem Molekulargewicht von ca. 150 kDa, ionisiert und massenspektrometrisch analysiert wurden. Es hat kein vorangegangener Proteinverdau mit Proteasen, wie Pepsin^[239] oder Papain^[240] stattgefunden, der den IgG-Antikörper in Antikörperfragmente mit geringeren Molekulargewichten spaltet.

Im ESI-Modus wurden die Signale in einem Massenbereich zwischen 2000 und 3500 Da und entsprechender Ladungsverteilung detektiert. Dies entspricht einem Protonierungsgrad von 40 bis 70 Ladungen pro Antikörper.

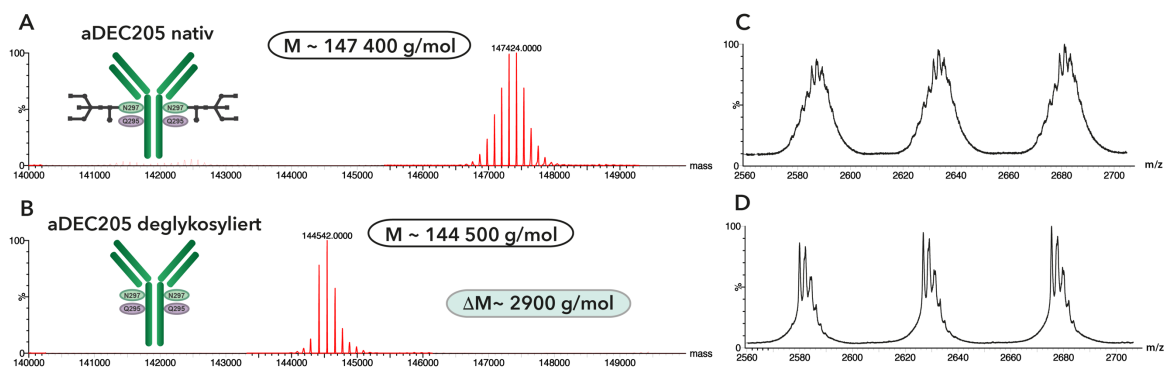


Abbildung 73. Massenspektren (dekonvolviert): **A)** aDEC205 nativ. **B)** aDEC205 deglykosyliert. Massenspektren (m/z). **C)** aDEC205 nativ. **D)** aDEC205 deglykosyliert.

Alle Messungen der hochauflösenden Massenspektrometrie in dieser Arbeit wurden in Kooperation mit [REDACTED] am Max-Planck-Institut für Polymerforschung Mainz (MPIP) durchgeführt.

Abbildung 73A zeigt das dekonvolvierte Massenspektrum des nativen aDEC205 mit einer Masse von 147 400 g/mol. Die Antikörperprobe nach der Umsetzung mit PNGase F (Abbildung 73B) wurde mit einer Masse von 144 500 g/mol detektiert, was auf eine erfolgreiche Deglykosylierung von aDEC205 schließen lässt. Die Massendifferenz von ca. 2900 g/mol liegt in guter Übereinstimmung mit dem Massenanteil von 2–3 % an Zuckerstrukturen an Asn297-Resten in IgG-Antikörpern (~ 150 kDa).^[237]

Weiterhin ist ein Unterschied in der Signalform zwischen dem nativen aDEC205 (Abbildung 73C) und der deglykosylierten Spezies (Abbildung 73D) auszumachen. Das Signal des deglykosylierten aDEC205 (D) zeigt eine viel höhere Auflösung, was auf die verminderte chemische Heterogenität durch einen verminderten Deglykosylierungsgrad zurückzuführen ist. Somit weist die Probe des deglykosylierten Antikörpers (D) im Vergleich zur nativen Form (C) eine intrinsisch einheitlichere Struktur auf, aufgrund der Abspaltung von posttranslational angefügten Zuckerstrukturen.

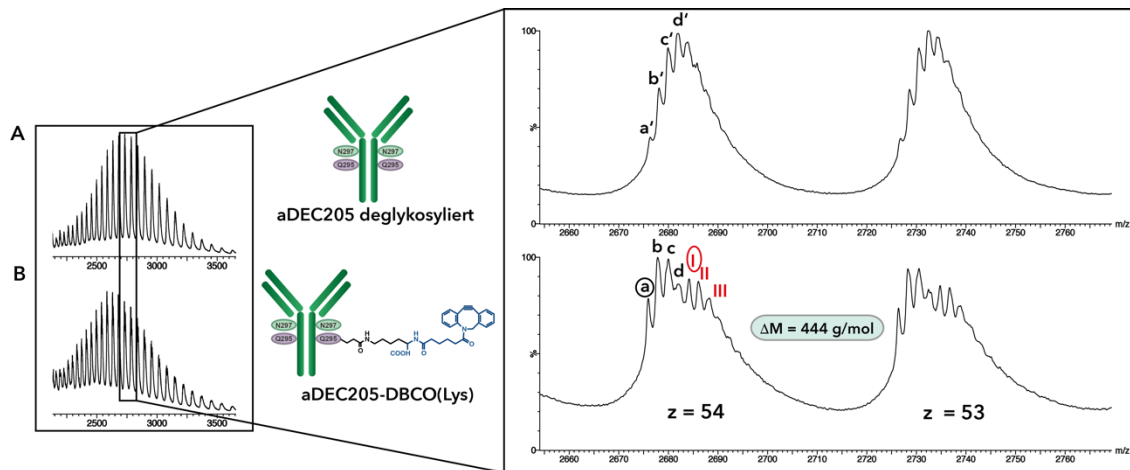


Abbildung 74. Massenspektrum (m/z): **A**) aDEC205 deglykosyliert. **B**) aDEC205-DBCO(Lys).

Neben dem Nachweis der erfolgreichen Deglykosylierung des DEC205-Antikörpers, konnte auch die DBCO-Funktionalisierung mittel HR-MS nachgewiesen werden. Abbildung 74 zeigt jeweils einen Ausschnitt des Massenspektrums des deglykosylierten aDEC205 (oben) und nach der BTG-vermittelten Umsetzung mit DBCO-Lys (unten). Bei genauerer Betrachtung des Signals mit einem Ladungszustand von $z = 54$ für die Probe mit DBCO-Funktionalisierung (unten links) stimmen die ersten drei bis vier Signale (a-d) exakt mit den Signalen (a'-d') in der deglykosylierten Probe (oben links) überein. Weiterhin geht eine zusätzliche Signalsequenz (I, II, III) innerhalb des Signals von aDEC205-DBCO(Lys) (unten links) hervor, die im Spektrum der deglykosylierten Probe nicht auftritt. Diese kann auf Grundlage nachstehender Berechnungen einer aDEC205 Spezies zugeordnet werden, die genau mit einem DBCO-Lys Molekül modifiziert ist.

Vergleicht man das Signal (a) mit einem Wert für $m/z = 2675,9407$, das der Sequenz des deglykosylierten aDEC205 entspricht, mit dem ersten Signal (I) der neu auftretenden Signalsequenz ($m/z = 2684,1660$), so lässt sich unter Berücksichtigung des Ladungszustands von $z = 54$ eine Massendifferenz von 444 g/mol berechnen. Diese Massenzunahme von 444 g/mol bestätigt die kovalente Anbindung von einem DBCO-Lys-Molekül mit $M = 461 \text{ g/mol}$ (siehe Abbildung 64) unter Freisetzung von einem Molekül Ammoniak ($M = 17 \text{ g/mol}$) bei der enzymatischen Transglutaminase-reaktion (Abbildung 63).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die enzymatische Modifizierung von DEC205-Antikörpern mit DBCO-Lys über HR-MS eindeutig nachgewiesen werden konnte. Dennoch weist die beschriebenen Signalform auf eine unvollständige Umsetzung hin, da neben einfach DBCO-funktionalisiertem aDEC205 auch noch unmodifizierter, deglykosylierter Antikörper vorliegt. Dennoch ist zu betonen, dass mittels HR-MS ein Massenunterschied von 444 g/mol in höchster Präzision innerhalb eines hochmolekularen Proteins von $147\,400 \text{ g/mol}$ detektiert werden konnte und somit die

enzymatische Modifizierung von aDEC205 zumindest mit einem DBCO-Molekül bestätigt. Das Massenspektrum in Abbildung 74 bietet aufgrund der geringen chemischen Auflösung des Signals keinen direkten Hinweis auf eine zweifach-DBCO-modifizierte aDEC205 Spezies, die aber grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden kann.

Nachweis der DBCO-Funktionalisierung über UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS-Spektroskopie bietet prinzipiell eine alternative Analysemethode zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von DBCO-Einheiten pro IgG-Antikörper.^[216,241] Über die charakteristische Absorption der DBCO-Gruppe bei 309 nm kann durch Anwendung des Lambert-Beer-Gesetzes, mit $\epsilon_{\alpha}(\text{DBCO}) = 12\,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ für den Extinktionskoeffizienten des DBCO-Linkers das Verhältnis von DBCO pro IgG-Antikörper ermittelt werden. Zur Berechnung wurde Gleichung 5 verwendet:

$$\frac{n(\text{DBCO})}{n(\text{IgG})} = \frac{E_{309} \cdot \epsilon_{\alpha}(\text{IgG})}{\epsilon_{\alpha}(\text{DBCO}) \cdot (E_{280} - (E_{309} \cdot 1,089))} \quad (5)$$

Mit 1,089 als Korrekturfaktor für den Beitrag der DBCO-Gruppe zur Absorption bei 280 nm.

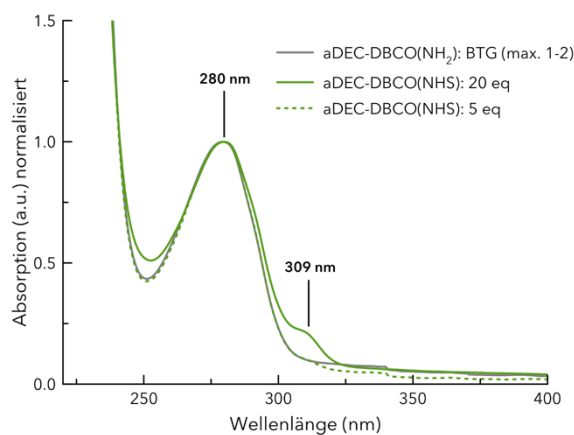


Abbildung 75. UV/VIS-Spektroskopie: aDEC205-DBCO(NH₂) (grau), aDEC205-DBCO(NHS) 20 eq (grün) und aDEC205-DBCO(NHS) 5 eq (grün gestrichelt).

Das UV/VIS-Spektrum in Abbildung 75 zeigt für die Probe der BTG-vermittelten Modifizierung von aDEC205 mit DBCO-NH₂ (grau) lediglich eine Absorptionsbande bei 280 nm, die charakteristisch für den IgG-Antikörper ist. Es konnte keine zusätzliche Bande bei 309 nm detektiert werden, die eine qualitative bzw. quantitative Aussage der DBCO-Modifizierung ermöglichte. Vergleichend wurden DBCO-funktionalisierte aDEC205-Proben über unspezifische Antikörpermodifizierung (Abbildung 67) mit DBCO-PEG₄-NHS-Ester hergestellt. Diese Methode erlaubt einen höheren Funktionalisierungsgrad der Antikörper über Oberflächenlysine im Vergleich zur enzymatischen

Methode, in der die maximale Anbindung auf zwei DBCO-Molekülen pro Antikörper beschränkt ist. aDEC205 wurde in einer typischen Reaktion einmal mit 20 eq (Abbildung 75, grün) und einmal mit 5 eq (grün gestrichelt) DBCO-PEG₄-NHS-Ester umgesetzt und mittels UV/VIS-Spektroskopie analysiert. Die unspezifisch DBCO-modifizierte aDEC205 Probe mit 5 eq (grün gestrichelt) zeigt analog zur Probe der enzymatischen Modifizierung (grau) keine Absorptionsbande bei 309 nm. Das Spektrum der Probe des aDEC205-DBCO mit 20 eq des Linkers (grün) weist hingegen neben der Absorptionsbande bei 280 nm zusätzlich eine Bande bei 309 nm für die DBCO-Einheit auf. Über Gleichung 5 konnte ein Verhältnis von 4,9 DBCO-Gruppen pro IgG-Antikörper berechnet werden. Somit wurden unter Verwendung von 20 eq DBCO-PEG₄-NHS-Ester ca. fünf funktionale DBCO-Gruppen an aDEC205 angebunden.

Daraus lässt sich schließen, dass bei der Verwendung von 5 eq, durchschnittlich weniger als fünf DBCO-Moleküle pro Antikörper angebunden werden, die aufgrund zu geringer Konzentration jedoch nicht über UV/VIS-Spektroskopie nachzuweisen sind. Diese konzentrationsabhängige Detektion DBCO-funktionalisierter Antikörper liefert eine Erklärung für die fehlende Absorptionsbande bei 309 nm für den enzymatisch DBCO-modifizierten aDEC205 (grau) mit einem maximalen Funktionalisierungsgrad von 1-2 DBCO-Gruppen.

SPAAC von aDEC205-DBCO(Lys/NH₂) mit 5/6-Carboxyrhodamin 110-PEG₃-Azid

Die über enzymatische Antikörpermodifizierung eingeführten DBCO-Gruppen am DEC205-Antikörper sollen zur Konjugation mit azidfunktionalisierten nanopartikulären Trägersystemen über ringgespannte Alkin-Azid Cycloaddition (SPAAC) verwendet werden (vgl. Kapitel 3.5).

In diesem Kapitel wurden die über BTG-vermittelte Modifizierung hergestellten Antikörper aDEC205-DBCO(Lys)^[216] und aDEC205-DBCO(NH₂) in einer SPAAC mit dem azidfunktionalisierten Fluoreszenzfarbstoff 5/6-Carboxyrhodamin 110-PEG₃-Azid umgesetzt und anschließend über FCS charakterisiert. Diese Experimente dienen zum einen als qualitativer Nachweis der DBCO-Modifizierung und zum anderen konnte in diesem Schritt bereits die Zugänglichkeit der enzymatisch eingeführten DBCO-Gruppen an Gln295 innerhalb des aDEC205 für SPAAC-Reaktionen analysiert werden.

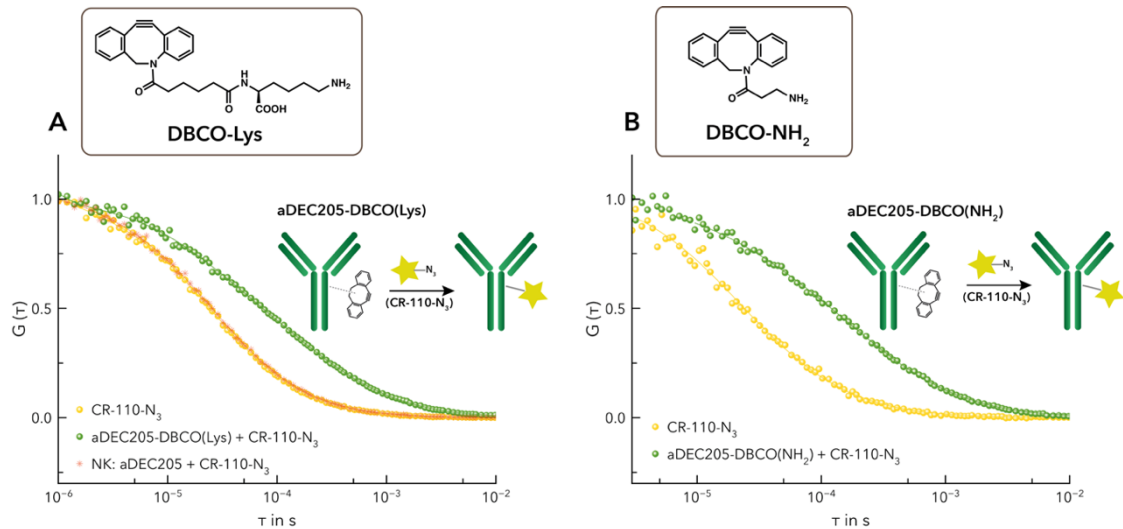


Abbildung 76. FCS: **A)** SPAAC von aDEC205-DBCO(Lys) und CR-110-N₃. CR-110-N₃ (gelb) mit $R_h = 0,56$ nm, Konjugat von aDEC205-DBCO(Lys) und CR-110-N₃ (grün) mit $R_h = 5,8$ nm (49 %), Negativkontrolle: aDEC205 nativ und CR-110-N₃ (rot) mit $R_h = 0,58$ nm. **B)** SPAAC von aDEC205-DBCO(NH₂) und CR-110-N₃. CR-110-N₃ (gelb) mit $R_h = 0,56$ nm, Konjugat von aDEC205-DBCO(NH₂) und CR-110-N₃ (grün) mit $R_h = 5,8$ nm (67 %).

Die FCS-Messungen in Abbildung 76 bestätigen eine erfolgreiche SPAAC sowohl für aDEC205-DBCO(Lys) (A) als auch für aDEC205-DBCO(NH₂) (B) mit dem Azid-Fluoreszenzfarbstoff 5/6-Carboxyrhodamin 110-PEG₃-Azid. Der freie Farbstoff (gelb) konnte mit einem hydrodynamischen Radius von $R_h = 0,56$ nm detektiert werden. Nach der Umsetzung des jeweiligen DBCO-funktionalisierten aDEC205 mit 5/6-Carboxyrhodamin 110-PEG₃-Azid wurde in der FCS in beiden Fällen eine fluoreszierende Spezies mit $R_h = 5,8$ nm gemessen (grün). Diese kann dem jeweiligen Konjugat aus aDEC205 und Fluoreszenzfarbstoff nach erfolgreicher SPAAC zugeordnet werden. Die Größe des Konjugats liegt in guter Übereinstimmung mit den hydrodynamischen Radien, der über FCS bzw. DLS ermittelten Antikörperproben zwischen 5-6 nm (vgl. Abbildung 71 und Abbildung 72). Am Beispiel von aDEC205-DBCO(Lys) (Abbildung 76A) wurde zusätzlich eine Negativkontrolle (NK) durchgeführt. Dabei wurde nativer aDEC205 ohne DBCO-Gruppe unter den gleichen Reaktionsbedingungen mit CR-110-N₃ umgesetzt, um eine Anlagerung des Fluoreszenzfarbstoffs an den Antikörper über unspezifische ionische oder hydrophobe Wechselwirkungen auszuschließen. Nach der Aufarbeitung über Spinfiltration ergab sich für die Negativkontrolle in der FCS-Messung eine Größe von $R_h = 0,58$ nm (rot), die, wie auch der Verlauf der Korrelationskurve bestätigt, dem freien CR-110-N₃-Farbstoff entspricht. Somit konnte die kovalente Anbindung von CR-110-N₃ an aDEC205-DBCO(Lys) (grün) über SPAAC bestätigt werden.

Der unterschiedliche Verlauf der Korrelationskurven der Antikörper-Farbstoff Konjugate (grün) in Abbildung 76A/B bzw. der Abstand zur Korrelationskurve des reinen Farbstoffs (gelb) ist auf den jeweiligen prozentualen Anteil der gemessenen Fraktion zurückzuführen. So liegt das Konjugat in (A) zu 49 % vor, wohingegen das Konjugat in (B) mit einem größeren Abstand zur Korrelationskurve von CR-110-N₃ mit 67 % vertreten ist. Es ist wichtig zu erwähnen, dass diese Werte nicht den jeweiligen Umsätzen der SPAAC entsprechen. Der korrespondierende Anteil von 51 % (in A) und 33 % (in B) kann überschüssigem Fluoreszenzfarbstoff innerhalb der Probe zugeordnet werden, der trotz mehrmaligem Waschen über Spinfiltration nicht vollständig abgetrennt werden konnte.

Eine Quantifizierung von angebondenen Farbstoffmolekülen pro Antikörper und somit rückschließend eine Quantifizierung der eingeführten DBCO-Gruppen pro aDEC205 war in diesem Fall über FCS nicht möglich. Für das Verhältnis der gemessenen Fluoreszenzintensitäten von CR-110-N₃-Farbstoff zu Antikörper-Farbstoff-Konjugat konnten Werte von 0,95 (A) und 1,02 (B) berechnet werden. Diese erscheinen für eine mittlere DBCO-Anbindung von einem Molekül pro Antikörper bei einem maximalen DBCO-Funktionalisierungsgrad von 1-2 über die enzymatische Methode sinnvoll. Dennoch verfälscht der Anteil an freiem Farbstoff (A: 51 % und B: 33 %) das Ergebnis der gemessenen Fluoreszenzintensität der Probe und liegt für einen möglichen Funktionalisierungsgrad von 0, der in der FCS nicht zu detektieren ist, 1 oder 2, im Mittel immer bei ca. 1 durch den Anteil an freiem Farbstoff.

Neben dem qualitativen Nachweis der erfolgreichen DBCO-Modifizierung an DEC205-Antikörpern über SPAAC mit CR-110-N₃ in Abbildung 76, bestätigte dieses Experiment auch gleichzeitig die Zugänglichkeit der regioselektiv eingeführten DBCO-Gruppe(n) an Gln295-Seitenketten für niedermolekulare Azid-Fluoreszenzfarbstoffe. Dennoch ist zu betonen, dass alle in dieser Arbeit beschriebenen SPAAC-Reaktion mit enzymatisch modifizierten Antikörpern ausschließlich über Gefrier- und Auftauzyklen (*freeze-thaw cycles*) erfolgreich waren. Versuche zur Umsetzung bei Raumtemperatur oder physiologischen Bedingungen (37 °C) blieben erfolglos. Bei der *freeze-thaw*-Methode wird die wässrige Reaktionslösung mehrmaligen Einfrier- und Auftauprozessen unterzogen. Während des langsamen Einfrierens bei -18 °C kommt es zum Ausfrieren des Wassers innerhalb der Probe. Dies führt zum gleichzeitigen Aufkonzentrieren der Reaktanden, was die Reaktionswahrscheinlichkeit beider Komponenten und somit die Konjugationsumsätze erhöht. Diese eher unkonventionelle Technik wurde bereits für die Verknüpfung von großen Bio(makromolekülen), unter anderem für die Konjugation von sensitiver siRNA mit Polymeren über SPAAC verwendet.^[242] Die ausschließlich erfolgreiche Umsetzung der enzymatisch, regioselektiv modifizierten DEC205-Antikörpern mit niedermolekularen Fluoreszenzfarbstoffen über Gefrier- und Auftauzyklen und die ausbleibende Reaktion bei Raumtem-

peratur bzw. 37 °C, lässt auf eine geringe Reaktionsrate der bioorthogonalen Konjugation von aDEC205-DBCO(Lys) und aDEC205-DBCO(NH₂) schließen. Dies könnte zum einen auf den geringen Funktionalisierungsgrad von maximal 1-2 DBCO-Molekülen pro Antikörper zurückzuführen sein oder auch potentiell in einer sterischen Hinderung der funktionalen Gruppe an Gln295 innerhalb der Proteinstruktur begründet liegen.

Zusammenfassend bietet die SPAAC-Reaktion von aDEC205-DBCO(Lys/NH₂) mit azidfunktionalisiertem Fluoreszenzfarbstoff und anschließender Charakterisierung über FCS neben der HR-MS (vgl. Abbildung 74) eine gute Möglichkeit für einen qualitativer Nachweis der BTG-vermittelten enzymatischen Antikörpermodifizierung mit DBCO-Lys bzw. DBCO-NH₂.

Bindungsassay DBCO-Modifizierter Antikörper

Im Rahmen der Tumorimmuntherapie soll aDEC205 als Zielstruktur für die gezielte Adressierung von dendritischen Zellen (DCs) auf die Oberfläche von Nanopartikeln gebunden werden.^[51,52] Die für die Konjugation über SPAAC gewählte enzymatische, regioselektive DBCO-Funktionalisierung im Fc-Teil des Antikörpers sollte die spezifische DEC205-Rezeptorbindung über den Fab-Teil nicht beeinflussen.

In nachfolgendem Assay wurde das Bindungsverhalten des enzymatisch modifizierten aDEC205_{AF647}-DBCO(NH₂) (Abbildung 77A) an BMDCs (*bone marrow-derived dendritic cells*) analysiert. Zum Vergleich wurde ebenfalls eine aDEC205 Probe mitgeführt, die über den DBCO-NHS-Linker unspezifisch modifiziert wurde: aDEC205_{AF647}-DBCO(NHS) (Abbildung 77B). Diese beiden chemisch modifizierten Antikörperproben wurden dem kommerziell erworbenen unmodifizierten AF647-markierten DEC205-Antikörper (Abbildung 77C) gegenübergestellt. Für alle drei aDEC205-Proben (A, B und C) wurde jeweils die korrespondierende IgG2a-Isotypkontrolle parallel mitgeführt.

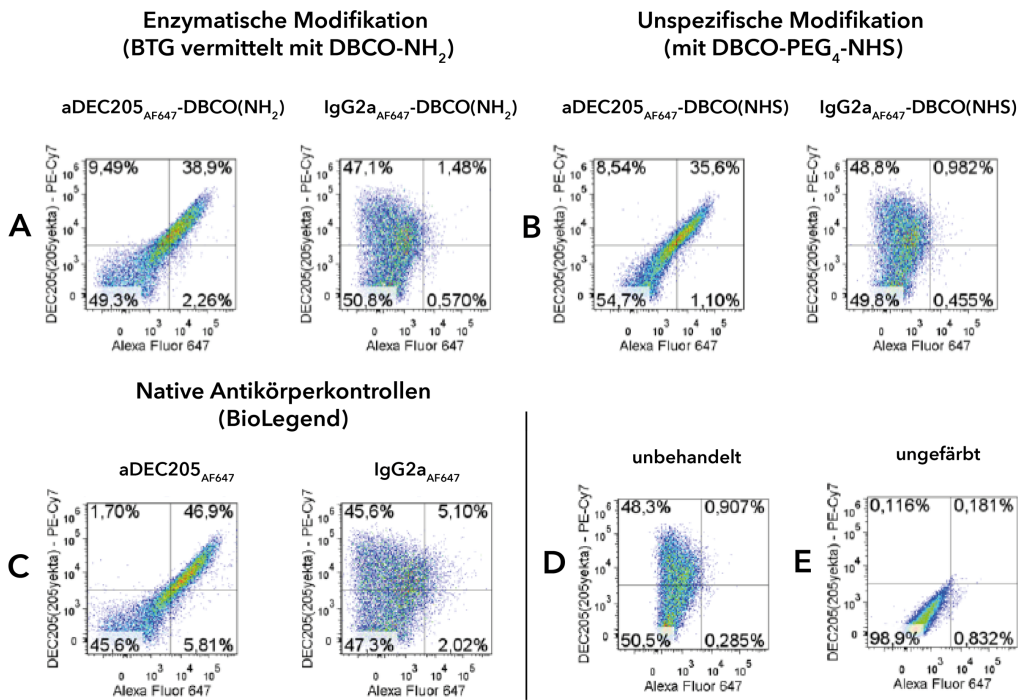


Abbildung 77. Bindungsassay von aDEC205-DBCO an BMDCs: **A)** aDEC205_{AF647}-DBCO(NH₂) und IgG2a_{AF647}-DBCO(NH₂). **B)** aDEC205_{AF647}-DBCO(NHS) und IgG2a_{AF647}-DBCO(NHS). **C)** aDEC205_{AF647} und IgG2a_{AF647}. **D)** Unbehandelte Kontrolle: ohne Antikörperprobe, mit aDEC205(yekt)a-PE-Cy7 Gegenfärbung. **E)** Ungefärbte Kontrolle (nur Zellen).

Der zelluläre Assay in Abbildung 77 wurde von [REDACTED] unter der Betreuung von [REDACTED] an der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

In einem typischen Experiment wurden die unterschiedlichen AF647-markierten Antikörperproben (A-C) für 20 min bei 4 °C mit BMDCs inkubiert. Eine Gegenfärbung mit aDEC205(yekt)a-PE-Cy7, der im Vergleich zu aDEC205 ein anderes Epitop des DEC205 Rezeptors bindet, ermöglichte die Quantifizierung von gebundenem aDEC205 der Proben an DEC205-rezeptorpositiven DCs über FACS-(*fluorescence-activated cell sorting*) Analyse. Des Weiteren wurden die Proben mit einem CD11c-Antikörper inkubiert, um nachfolgend Aussagen für die CD11c⁺ DC-Population treffen zu können. Bei CD11c handelt es sich um einen Oberflächenrezeptor, der mit dem DEC205 Rezeptor coexprimiert wird.^[243]

In Abbildung 77A/B zeigt sich mit einem Anteil von 38,9 % (A) und 35,5 % (B) für DEC205-positive DCs, die den jeweiligen modifizierten DEC205-Antikörper gebunden haben, kein merklicher Unterschied im Bindungsverhalten aufgrund der unterschiedlichen chemischen Modifizierung. Auch im Vergleich zur nativen aDEC205 Kontrolle (C) mit einem Anteil von ca. 47 % Antikörperbindung ist nur eine moderate Abweichung der Bindungseffizienz von nativem unmodifiziertem (C) zu chemisch DBCO-funktionalisiertem aDEC205 (A, B) auszumachen. Die entsprechenden IgG2a Isotypkontrollen (A, B und C) zeigen wie erwartet keine bzw. nur eine geringe unspezifische

Bindung an DEC205-rezeptorpositive Zellen (Q2: A: IgG2a_{AF647}-DBCO(NH₂): 1,48 %, B: IgG2a_{AF647}-DBCO(NHS): 0,98 % und C: IgG2a_{AF647}: 5,1 %). Als Kontrollen diente ein Ansatz ohne Probe nur mit PE-Cy7-DEC205yektin Gegenfärbung (unbehandelt, Abbildung 77D) und ein Ansatz ohne Probe und ohne Gegenfärbung (ungefärbt, Abbildung 77E).

Abschließend lässt sich festhalten, dass die unterschiedliche Art der chemischen DBCO-Modifizierung; ob regioselektiv an Q295-Reste oder unspezifisch an Lysinseitenketten, keinen Einfluss auf die Bindungseffizienz des aDEC205 ausübt. Vergleichend zu unmodifizierten DEC205-Antikörpern sind für die DBCO-modifizierten Proben nur moderate Abweichungen auszumachen und eignen sich somit als potentielle Zielstrukturen zum Targeting von DCs.

Fazit: Enzymatische Antikörperfunktionalisierung mit DBCO-Lys und DBCO-NH₂

Beide zur BTG-vermittelten DBCO-Funktionalisierung von aDEC205 und IgG2a verwendeten Substrate: DBCO-Lys und DBCO-NH₂ zeigten Erfolg in der enzymatischen Antikörpermodifizierung nach Abbildung 63. Sowohl der synthetisierte DBCO-Lys-Linker als direktes Lysinurrogat mit vier Methylengruppen zwischen primärem Amin und DBCO-Einheit als auch der kommerziell erworbene DBCO-NH₂-Linker mit nur zwei Methylengruppen konnten mittels bakterieller Transglutaminase an aDEC205 und dessen Isotyp IgG2a angebunden werden (Q295). Dies zeigt die hohe Flexibilität der BTG in Bezug auf die Umsetzung von unterschiedlichen primären Aminsubstraten. Eine Aussage über die Modifizierungseffizienz zwischen DBCO-Lys und DBCO-NH₂ konnte in der FCS über die Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffs (CR-110-N₃) nicht getroffen werden.

Dennoch ist anzumerken, dass bei der Verwendung von DBCO-Lys im Verlauf der BTG-vermittelten Reaktion nach längerer Reaktionsdauer (> 12 h) eine partielle Präzipitation durch Aggregatbildung beobachtet werden konnte. Der gebildete Feststoff wurde über die anschließende Aufarbeitung mittels Spinfiltration abgetrennt und führte zu einer verminderten Ausbeute an modifiziertem Antikörper. Bei Verwendung von DBCO-NH₂ trat keine Präzipitation auf. Weitere Konjugationsansätze über SPAAC von enzymatisch modifizierten DEC205-DBCO(Lys/NH₂)-Antikörpern an azidfunktionalisierte Polymere und Nanopartikel sind in Kapitel 3.5 beschrieben.

3.4.2 TCO-Funktionalisierung von aDEC205

Das Konzept der enzymatischen Antikörpermodifizierung über PNGase F und BTG nach Abbildung 63 wurde in einem weiteren Projekt zur Einführung von *trans*-Cycloocten-(TCO) Funktionalitäten an aDEC205 genutzt. Dafür wurde der kommerziell erworbenen TCO-NH₂-Linker als BTG-Substrat verwendet. Die IEDDA-Cycloaddition (*inverse electron-demand Diels-Alder-cycloaddition*) von *trans*-Cyclooctenen und Tetrazinen bietet aufgrund ihrer schnellen Reaktionskinetik von 10⁶ M⁻¹ s⁻¹ im Vergleich zur SPAAC mit 10⁻² M⁻¹ s⁻¹ eine alternative Reaktion der kupferfreien Click-Chemie zur bioorthogonalen Konjugation. (vgl. Kapitel 1.4).^[212]

Analog zur Synthese der DBCO-funktionalisierten Antikörper, wurde der TCO-modifizierte aDEC205 sowohl mit als auch ohne AF647-Fluoreszenzmarkierung (AF647 NHS) hergestellt. Auch hier erfolgte die kovalente Anbindung des Farbstoffs über die Oberflächenlysine des Antikörpers.

Charakterisierung über UV/VIS-Spektroskopie

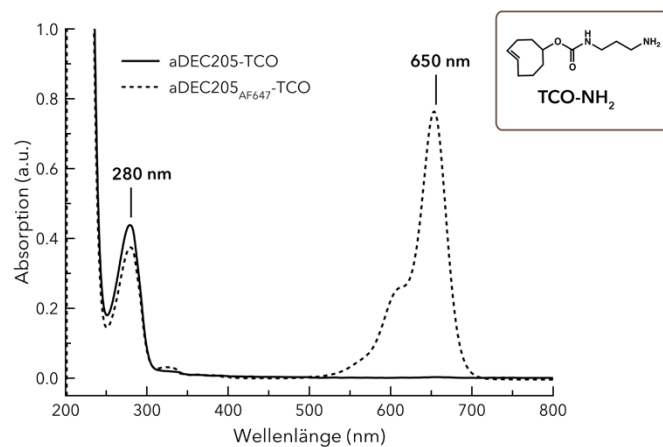


Abbildung 78. UV/VIS-Spektren von aDEC205-TCO (schwarz) und aDEC205_{AF647}-TCO (gestrichelt).

Abbildung 78 zeigt das UV/VIS-Spektrum von aDEC205-TCO (schwarz) mit einer Absorptionsbande bei 280 nm, charakteristisch für den IgG-Antikörper. Die Probe von aDEC205_{AF647}-TCO (gestrichelt) weist neben der 280 nm Bande wie erwartet eine Absorptionsbande bei 650 nm für den AF647-Fluoreszenzfarbstoff auf. Analog zu Kapitel 3.4.1 konnte über das gemessene Absorptionsmaximum bei 280 nm und Anwendung des Lambert-Beer-Gesetzes (vgl. Gleichung 3) unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung die Antikörperkonzentration sowie die Farbstoffanbindung pro DEC205-Antikörper ermittelt werden.

Tabelle 13 zeigt die berechneten Werte für aDEC205-TCO und aDEC205_{AF647}-TCO. Ähnlich zu den DBCO-funktionalisierten Antikörperproben (vgl. Tabelle 12) wurden für aDEC205_{AF647}-TCO im Mittel zwei Farbstoffmoleküle pro aDEC205 angebunden.

Tabelle 13. Konzentrationen TCO-funktionalisierter DEC205-Antikörper und Quantifizierung von AF647 pro Antikörper.

	E ₂₈₀	Verdünnung	c (µmol/L)	E ₆₅₀	AF647/IgG
aDEC205-TCO	0,4385	4	8,64	-	-
aDEC205 _{AF647} -TCO	0,3745	5	9,22	0,7596	1,8 (2)*

* Die Werte für AF647-Moleküle pro Antikörper wurden sinngemäß ganzzahlig gerundet.

Aufarbeitung Enzymatisch TCO-Modifizierter Antikörper - SDS-PAGE Analytik

Die Aufarbeitung der TCO-modifizierten aDEC205 Proben erfolgte ausschließlich über Spinfiltration (Zentrifugenfilter, MWCO 100 kDa) mit PBS. Über SDS-PAGE (Abbildung 79) konnte die erfolgreiche Abtrennung der eingesetzten Enzyme PNGase F und BTG sowie eine intakte Proteinstruktur der Antikörper nach der enzymatischen Modifizierung nachgewiesen werden.

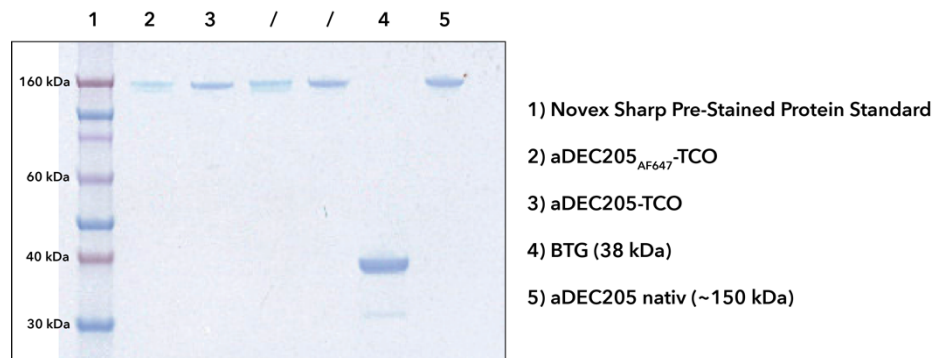


Abbildung 79. SDS-PAGE TCO-funktionalisierter DEC205-Antikörper.

Die TCO-modifizierten Antikörper aDEC205_{AF647}-TCO (Spalte 2) und aDEC205-TCO (Spalte 3) zeigen im SDS-Gel jeweils eine einzelne Proteinbande im Bereich von 150 kDa, die wie erwartet im Größenbereich des nativen aDEC205 (Spalte 5) liegt. Im Molekulargewichtsbereich der verwendeten Enzyme zwischen 30-40 kDa wurden für die Antikörperproben (Spalte 2 und 3) keine Banden detektiert.

Charakterisierung Enzymatisch TCO-Modifizierter Antikörper über FCS

Der Einfluss der enzymatischen TCO-Funktionalisierung auf die Struktur bzw. die Größe des DEC205-Antikörpers wurde mittels FCS charakterisiert. Aus der FCS-Messung in Abbildung 80 ergab sich für den nativen AF647-markierten aDEC205 (grüne Dreiecke) eine Größe von $R_h = 6,0$ nm, die sich im Rahmen der Messgenauigkeit vom hydrodynamischen Radius der TCO-funktionalisierten Probe aDEC205_{AF647}-TCO mit $R_h = 6,0$ nm nicht unterscheidet. Somit zeigt sich für die BTG-vermittelten Anbindung des TCO-NH₂-Linkers an aDEC205 keine Größenveränderung des Antikörpers.

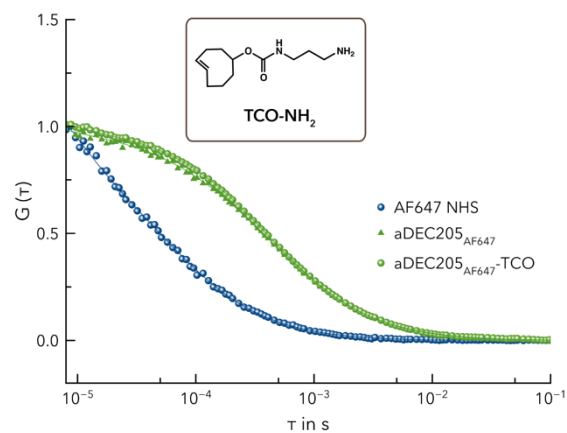


Abbildung 80. FCS: AF647 NHS (blau) mit $R_h = 0,76$ nm, aDEC205_{AF647} (grüne Dreiecke) mit $R_h = 6,0$ nm und aDEC205_{AF647}-TCO (grüne Punkte) mit $R_h = 6,0$ nm.

IEDDA-Cycloaddition von aDEC205-TCO mit 6-Methyl-Tetrazin-5-FAM

In Analogie zum Nachweis der DBCO-Funktionalisierung (Kapitel 3.4.1) wurde der funktionale Nachweis der TCO-Modifizierung von aDEC205 über die Umsetzung mit einem Tetrazin-(Tz) Fluoreszenzfarbstoff über IEDDA-Cycloaddition erbracht. Dafür wurde aDEC205-TCO mit 6-Methyl-Tetrazin-5-FAM (Tz-FAM) über Gefrier- und Auftauzyklen umgesetzt und anschließend über FCS charakterisiert.

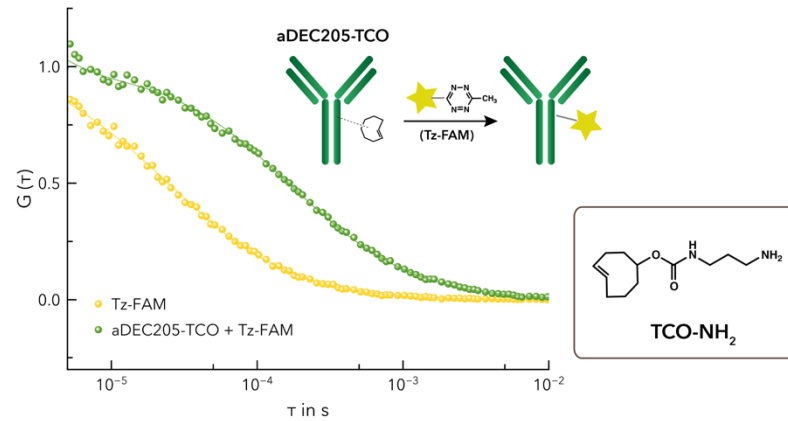


Abbildung 81. FCS: IEDDA-Cycloaddition von aDEC205-TCO und Tz-FAM. Tz-FAM (gelb) mit $R_h = 0,54$ nm, Konjugat von aDEC205-TCO und Tz-FAM (grün) mit $R_h = 4,5$ nm.

Die FCS-Messungen in Abbildung 81 bestätigen eine erfolgreiche Konjugation von aDEC205-TCO und tetrazinfunktionalisiertem Fluoreszenzfarbstoff. Der freie Farbstoff Tz-FAM (gelb) weist einen hydrodynamischen Radius von $R_h = 0,54$ nm auf. Nach der Umsetzung von TCO-funktionalisiertem aDEC205 und Tz-FAM konnte eine fluoreszierende Spezies von $R_h = 4,5$ nm detektiert werden, die eine kovalente Konjugation beider Komponenten über IEDDA-Cycloaddition bestätigt. Die hier gemessene Antikörperspezies von 4,5 nm weicht etwas vom typischen Größenbereich der Antikörper zwischen 5-6 nm ab, kann aber eindeutig über die Größenzunahme im Vergleich zum niedermolekularen Farbstoff als Antikörperspezies identifiziert werden.

Zusammenfassend diente dieses Experiment zum einen dem qualitativen Nachweis der TCO-Modifizierung am DEC205-Antikörper und zum anderen konnte die Zugänglichkeit der enzymatisch eingeführten TCO-Gruppe an Gln295 innerhalb des aDEC205 für IEDDA-Cycloadditionen für niedermolekulare Tetrazin-Fluoreszenzfarbstoffe bestätigt werden.

Fazit: Enzymatische Antikörperfunktionalisierung mit TCO-NH₂

Der kommerziell erworbene TCO-NH₂-Linker konnte erfolgreich in der enzymatischen Modifizierung von DEC205-Antikörpern verwendet werden. TCO-NH₂ wurde mit drei Methylengruppen zwischen primärem Amin und TCO-Einheit als BTG-Substrat erkannt und umgesetzt, was die hohe Flexibilität des Enzyms in der Erkennung eines geeigneten Substrates widerspiegelt. Die Zugänglichkeit der eingeführten TCO-Funktionalität konnte erfolgreich durch die Reaktion mit einem tetrazinfunktionalisierten Fluoreszenzfarbstoff (Tz-FAM) nachgewiesen werden. Weitere Experimente zur Konjugation TCO-funktionalisierter DEC205-Antikörper an tetrazinfunktionalisierte Polymernizellen über IEDDA-Cycloaddition werden in Kapitel 3.5.4 beschrieben.

3.4.3 DFO-Funktionalisierung von aCD25

In einem Nebenprojekt wurde die enzymatische Antikörpermodifizierung über PNGase F und BTG in Abbildung 63 auf die Anbindung von Deferoxamin (DFO-NH₂) (*N'*-(5-(Acetyl-hydroxyl-amino)-pentyl)-*N*-(5-(3-(5-aminopentyl-hydroxyl-carbamoyl)-propanoylamino)-pentyl)-*N*-hydroxy-butandiamid) angewendet.^[184] Bei dieser Verbindung handelt es sich um einen Chelator, der aufgrund seiner komplexbildenden Eigenschaften in der Radiochemie als Chelator für ⁸⁹Zr zur Radiomarkierung von monoklonalen Antikörpern und anschließendem PET-(Positronen-Emissions-Tomographie) Imaging bekannt ist (vgl. Abbildung 66).^[153,244]

Für die enzymatische Modifizierung mit Deferoxamin wurde der IgG-Antikörper aCD25 verwendet, der an Oberflächenrezeptoren aktivierter T-Lymphozyten bindet.^[195,245] Nach Radiomarkierung von aCD25-DFO mit ⁸⁹Zr bietet sich die Möglichkeit über PET eine Immunstimulation, z. B. durch vorangehende Vakzinierung zu visualisieren. Die DFO-Modifizierung von aCD25 wurde enzymatisch mit DFO-NH₂ als BTG-Substrat durchgerührt. Für die Radiomarkierung mit ⁸⁹Zr wurde vergleichend eine CD25-DFO-Antikörperprobe über unspezifische Modifizierung der Lysinseitenketten hergestellt (vgl. Abbildung 67). Für diese Umsetzung wurde das aminreaktive Isothiocyanat des Deferoxamins (DFO-NCS) verwendet.^[244]

Analog zu den enzymatischen Antikörpermodifizierungen in Kapiteln 3.4.1 und 3.4.2 wurde aCD25-DFO sowohl mit als auch ohne AF647-Markierung hergestellt und über UV/VIS-Spektroskopie charakterisiert.

Charakterisierung über UV/VIS-Spektroskopie

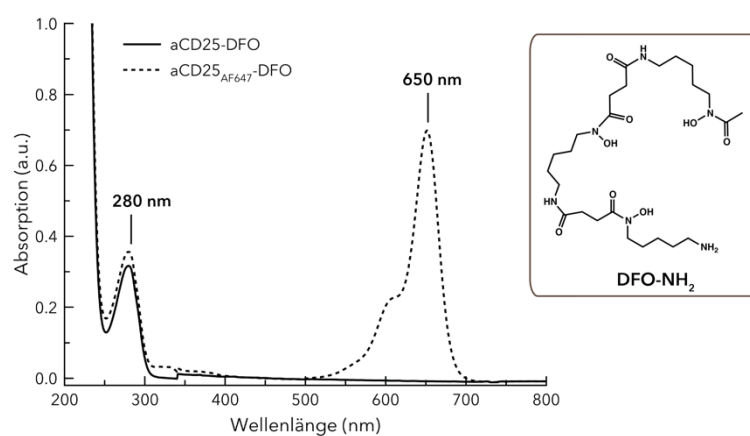


Abbildung 82. UV/VIS-Spektren von aCD25-DFO (schwarz) und aCD25_{AF647}-DFO (gestrichelt).

In Abbildung 82 ist das UV/VIS-Spektrum des enzymatisch modifizierten aCD25-DFO mit einem Absorptionsmaximum bei 280 nm für den IgG-Antikörper dargestellt (schwarz). Das Spektrum der AF647-markierten Probe aCD25_{AF647}-DFO (gestrichelt) zeigt wie erwartet neben der 280 nm Bande eine zusätzliche Bande bei 650 nm für den AF647-Fluoreszenzfarbstoff.

Tabelle 14. Konzentrationen DFO-funktionalisierter CD25-Antikörper und Quantifizierung von AF647 pro Antikörper.

	E ₂₈₀	Verdünnung	c (µmol/L)	E ₆₅₀	AF647/IgG
aCD25-DFO	0,3169	4	6,24	-	-
aCD25 _{AF647} -DFO	0,3564	1	1,76	0,6980	1,8 (2)*

* Die Werte für AF647-Moleküle pro Antikörper wurden sinngemäß ganzzahlig gerundet.

Über das gemessene Absorptionsmaximum bei 280 nm konnte über das Lambert-Beer Gesetz (vgl. Gleichung 3) und unter Berücksichtigung der Verdünnung die Antikörperkonzentration der jeweiligen Ansätze bestimmt werden (siehe Tabelle 14). Für die AF647-Markierung von aDEC205_{AF647}-DFO ergab sich eine mittlere Anbindung von zwei Farbstoffmoleküle pro Antikörper.

Aufarbeitung Enzymatisch DFO-Modifizierter Antikörper - SDS-PAGE Analytik

Die Aufarbeitung der DFO-modifizierten aCD25-Proben erfolgte analog zu den TCO-modifizierten Antikörpern ausschließlich über Spinfiltration durch Waschen mit PBS. Mittels SDS-Gelelektrophorese (Abbildung 83) konnte die erfolgreiche Abtrennung der eingesetzten Enzyme PNGase F und BTG sowie eine intakte Proteinstruktur der Antikörper nach der enzymatischen Modifizierung detektiert werden.

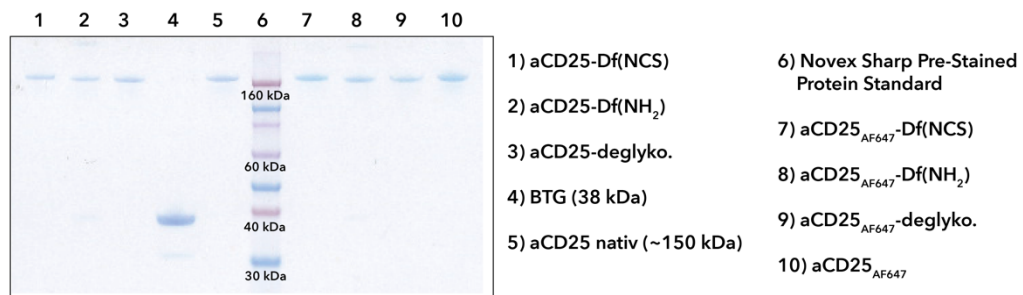


Abbildung 83. SDS-PAGE DFO-funktionalisierter CD25-Antikörper.

Neben den enzymatisch DFO-funktionalisierten aCD25-Proben in Spalte 2 und 8, zeigte sich auch für die unspezifisch modifizierten Antikörper über DFO-NCS in Spalte 1 und 7 jeweils eine einzelne Bande bei ca. 150 kDa, die den modifizierten Antikörpern entspricht. Für die enzymatischen Ansätze in Spalte 2, 3 und 8 wurden keine Enzymrückstände im Bereich zwischen 30 und 40 kDa detektiert.

Charakterisierung Enzymatisch DFO-Modifizierter Antikörper über FCS

Der Einfluss der enzymatischen DFO-Funktionalisierung auf die Struktur bzw. die Größe des CD25-Antikörpers wurde analog zu den Kapiteln zuvor mittels FCS charakterisiert. Aus der FCS-Messung in Abbildung 84 ergab sich für den unmodifizierten aCD25_{AF647} (grüne Dreiecke) einen hydrodynamischen Radius von $R_h = 6,4$ nm und entsprechend nach der DFO-Modifizierung konnte für aCD25_{AF647}-DFO (grüne Punkte) eine Größe von $R_h = 6,6$ nm detektiert werden.

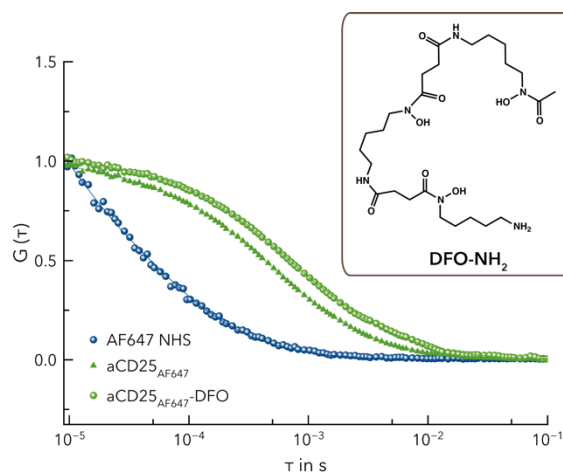


Abbildung 84. FCS: AF647 NHS (blau) mit $R_h = 0,76$ nm, aCD25_{AF647} (grüne Dreiecke) mit $R_h = 6,4$ nm und aCD25_{AF647}-DFO (grüne Punkte) mit $R_h = 6,6$ nm.

Trotz des geringen Größenunterschieds von $R_h = 6,4$ nm und $R_h = 6,6$ nm der beiden Antikörperansätze, zeigt sich ein abweichender Verlauf der Korrelationskurven. Dieser ist auf den relativ hohen Anteil an freiem Farbstoff für aCD25_{AF647} von 49 % zurückzuführen und führt zu einem weniger großen Abstand zur Korrelationskurve des freien AF647-Farbstoffs (blau). Dennoch liegen beide ermittelten hydrodynamischen Radien im charakteristischen Größenbereich der IgG-Antikörper zwischen 5-6 nm und es zeigt sich im Rahmen der Messgenauigkeit keine signifikante Größenänderung durch die BTG-vermittelte Anbindung von DFO-NH₂ an aCD25.

Bindungsassay DFO-Modifizierter Antikörper

Wie auch für den DBCO-modifizierten aDEC205 (Kapitel 3.4.1, Abbildung 77) wurde für den enzymatisch DFO-funktionalisierten CD25-Antikörper ein Bindungsassay an CD4+ T-Helferzellen durchgeführt, um eine Einschränkung in der Bindung des Antikörpers an den Rezeptor durch die chemische Modifizierung auszuschließen. Dafür wurden die AF647-markierten Proben der enzymatisch modifizierten Antikörper (aCD25_{AF647}-deglyko. und aCD25_{AF647}-DFO(NH₂)) vergleichend mit unspezifisch modifiziertem aCD25_{AF647}-DFO(NCS) sowie auch nicht-modifiziertem aCD25 auf das Bindungsverhalten an CD4+T-Helferzellen untersucht (Abbildung 85).

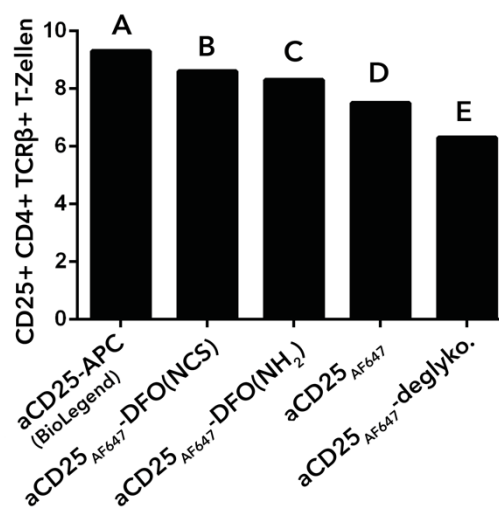


Abbildung 85. Bindungsassay von aCD25-DFO an CD25⁺-T-Zellen. A: aCD25-APC (BioLegend). B: aCD25_{AF647}-DFO(NCS). C: aCD25_{AF647}-DFO(NH₂). D: aCD25_{AF647}. E: aCD25_{AF647}-deglyko.

Der zelluläre Assay in Abbildung 85 wurde von [REDACTED] unter der Betreuung von [REDACTED] am Institut für Immunologie der JGU Mainz durchgeführt.

In einem typischen Experiment wurden die unterschiedlichen AF647-markierten Antikörperproben (Abbildung 85A-E) in einer Konzentration von 0,25 µg/mL für 20 min bei 4 °C mit murinen CD4+ T-Helferzellen aus der Milz inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen zur Darstellung der CD4+ Zellen mit anti-CD4 (1:400) und anti-TCRβ (1:400) gefärbt. Das Balkendiagramm in Abbildung 85 zeigt die Anzahl an CD25+ T-Helferzellen, die mit den unterschiedlichen CD25-Antikörperproben detektiert worden sind. Anhand der ermittelten Anzahl an CD25+ Zellen lässt sich die Bindung der CD25-Antikörper beurteilen. So kann zwischen dem enzymatisch DFO-modifizierten aCD25 (C) und dem unspezifisch über DFO-NCS-funktionalisierten Antikörper (B) kein signifikanter Unterschied in der Bindungseffizienz an CD25+ Zellen ausgemacht werden. Im Vergleich sind für die nicht-modifizierten aCD25 Proben (A) und (D) sowie die deglykosylierte Vorstufe (E) nur moderate Abweichungen im

Bindungsverhalten zu detektieren. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Funktionalisierung von aCD25 mit DFO sowohl für die BTG-vermittelte als auch für die unspezifische Anbindung keinen Einfluss auf die Rezeptoraffinität darstellt.

Radiomarkierung DFO-Modifizierter CD25-Antikörper mit ^{89}Zr

Der funktionale Nachweis der enzymatischen DFO-Modifizierung des CD25-Antikörpers (aCD25-DFO(NH₂)) erfolgte über die Radiomarkierung mit ^{89}Zr , in der DFO als Komplexbildner für das Radionuklid agiert. Als Vergleichsprobe wurde der unspezifisch DFO-funktionalisierte aCD25 mitgeführt (aCD25-DFO(NCS)). In einem typischen Experiment wurden jeweils 350 µg der beiden Antikörperproben mit ^{89}Zr (ca. 5 MBq) markiert. Nach der Aufarbeitung über PD10 Gelfiltration wurden beide Ansätze der markierten CD25-Antikörper über Radio-DC und -HPLC mit Detektion der Radioaktivität analysiert.

Abbildung 86 zeigt das HPLC-Elugramm der unterschiedlichen DFO-funktionalisierten CD25-Antikörper nach der Markierung mit ^{89}Zr : aCD25-DFO(NH₂)- ^{89}Zr (schwarz) und aCD25-DFO(NCS)- ^{89}Zr (rot). Basierend auf den jeweiligen Signalen bei einer Elutionszeit von ca. 8 min, die charakteristisch für den Größenbereich des Antikörpers ist, kann zunächst für beide Ansätze qualitativ eine erfolgreiche Markierung nachgewiesen werden. Die auftretende Schulter in beiden Kurven bei einer Elutionszeit von ca. 6-7 min könnte auf mögliche Aggregate innerhalb der Antikörperproben hinweisen. Eine vergleichende Aussage über die Effizienz beider Markierungen lässt sich anhand der detektierten Aktivitäten im HPLC-Elugramm nicht treffen, da diese konzentrationsabhängig von der aufgetragenen Menge an markiertem Antikörper ist.

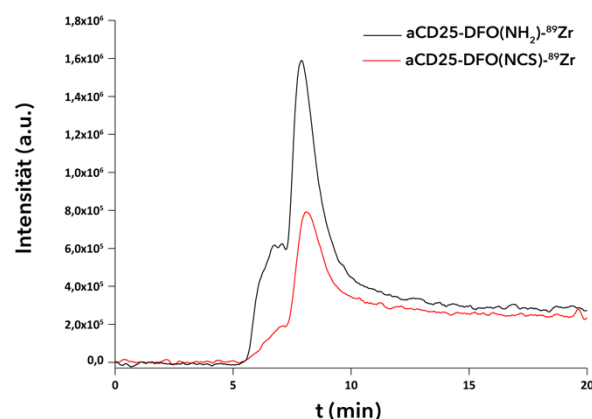


Abbildung 86. Radio-HPLC Elugramm in PBS (pH 7) von aCD25-DFO(NH₂)- ^{89}Zr (schwarz) und aCD25-DFO(NCS)- ^{89}Zr (rot).

Die radioaktive Markierung mit ^{89}Zr in Abbildung 86 sowie der Stabilitätstest in Abbildung 88 wurden von [REDACTED] unter der Betreuung von [REDACTED] am Institut für Kernchemie an der JGU Mainz durchgeführt.

Das zugehörige kinetische Profil der ^{89}Zr Markierung beider aCD25-DFO-Proben ist in Abbildung 87 dargestellt. Die radiochemische Ausbeute (RCA, Y-Achse) wurden jeweils nach 30, 60 und 90 min detektiert. Für den enzymatisch DFO-modifizierten aCD25 (schwarz) zeigt sich nach 20 min eine RCA von ca. 20 %, die im erwarteten Bereich für die ^{89}Zr -Markierung von IgG-Antikörpern mit Deferoxamin als Chelator liegt.^[153] Das kinetische Profil der Radiomarkierung steigt stetig an und erfährt nach 90 min einen Wert von 55 %. Es kann keine Aussage über die maximale Markierungseffizienz für aCD25-DFO(NH_2)- ^{89}Zr getroffen werden, da für diese Kinetik keine weiteren Messwerte nach 90 min aufgenommen wurden.

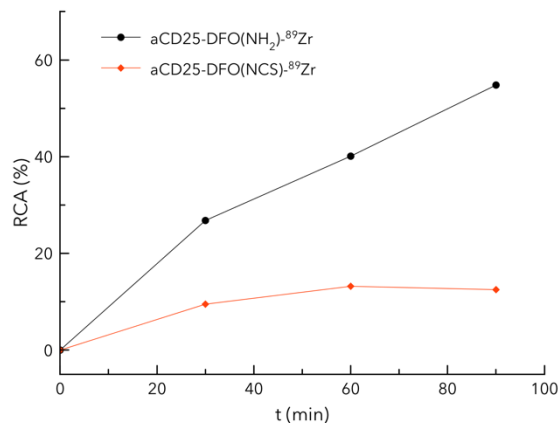


Abbildung 87. Radiochemische Ausbeuten (RCY) der ^{89}Zr -Markierung von aCD25-DFO(NH_2)- ^{89}Zr (schwarz) und aCD25-DFO(NCS)- ^{89}Zr (rot).

Hingegen zeigt sich für aCD25-DFO(NCS)- ^{89}Zr (rot) im Gesamten eine deutlich geringere radiochemische Ausbeute. Nach 20 min wurde ein Wert von ca. 8 % erreicht und nach etwa 50 min stellt sich eine Sättigung bei ca. 13 % ein. Somit resultiert aus den kinetischen Profilen in Abbildung 87 für den enzymatisch DFO-modifizierten CD25-Antikörper eine schnellere und effizientere Markierung mit ^{89}Zr im Vergleich zur unspezifisch DFO-funktionalisierten Kontrolle (aCD25-DFO(NCS)). In Bezug auf die Anzahl an Chelatormolekülen pro Antikörper, die für eine Komplexierung mit ^{89}Zr zur Verfügung stehen, wäre für aCD25-DFO(NCS) mit einem potentiell höheren Funktionalisierungsgrad (Einsatz von 10 eq DFO-NCS) im Vergleich zu aCD25-DFO(NH_2) mit maximal 1-2 DFO-Molekülen eine ähnliche Kinetik der ^{89}Zr -Markierung zu erwarten gewesen. Möglicherweise ist die effizientere Markierung von aCD25-DFO(NH_2)- ^{89}Zr auf eine bessere Zugänglichkeit des Chelators durch die regioselektive Anbindung über die enzymatischen Antikörpermodifizierung zurückzuführen.

Zusammenfassend konnte über die Markierung mit ^{89}Zr eine erfolgreiche DFO-Modifizierung von aCD25 sowohl mittels unspezifischer Anbindung des Deferoxamins über Isothiocyanatgruppen als auch über die enzymatische, BTG-vermittelte regioselektive Antikörpermodifizierung mit DFO- NH_2 nachgewiesen werden.

Stabilitätstest der Radioimmunkonjugate in Phosphatpuffer und Humanem Serum

Weiterhin wurden Stabilitätstests der beiden unterschiedlichen Konjugate aus ^{89}Zr -markierten CD25-Antikörper durch Inkubation in PBS und humanem Serum (HS) durchgeführt und nach jeweils ein, zwei und drei Tagen mittels Radio-DC analysiert (Abbildung 88).

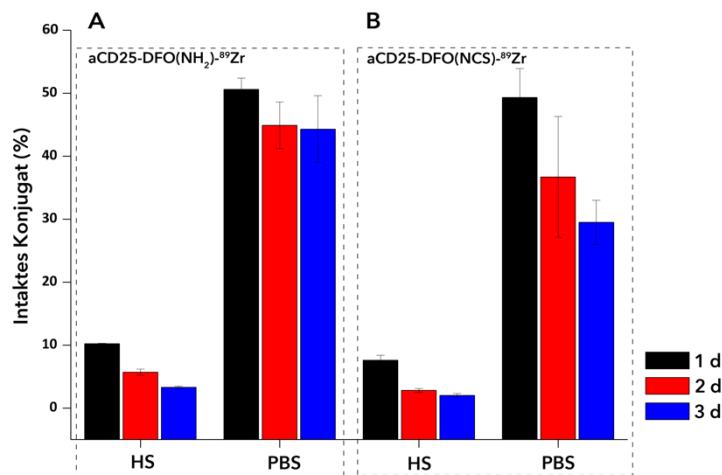


Abbildung 88. Stabilitätstest der Konjugate in HS und PBS nach 1 d (schwarz), 2 d (rot) und 3 d (blau). **A)** aCD25-DFO(NH₂)-⁸⁹Zr. **B)** aCD25-DFO(NCS)-⁸⁹Zr.

Im Hinblick auf die Stabilitäten der radioaktiv markierten Konjugate in PBS zeigt sich sowohl für aCD25-DFO(NH₂)-⁸⁹Zr als auch für aCD25-DFO(NCS)-⁸⁹Zr (Abbildung 88) nach 1 d (schwarze Balken; PBS) bereits ein Wert von 50 % und nicht wie erwartet ein Ausgangswert von nahezu 100 %. Dies könnte auf eine nicht stabile Komplexierung des Radionuklids mit dem DFO-Chelator am Antikörper hindeuten. Die Wahrscheinlichkeit für eine unzureichende Abtrennung eines Komplexes aus freiem Chelator und ⁸⁹Zr, die eine verfälschte Dissoziation des Konjugats auf der Radio-TLC anzeigen würde, kann aufgrund der Aufarbeitung über Größenausschlusschromatographie (PD10 Filtration) und HPLC jedoch ausgeschlossen werden.

Für den enzymatisch DFO-modifizierte CD25-Antikörper (A) zeigt sich im Vergleich zur unspezifisch modifizierten Antikörperprobe (B) eine höhere Stabilität in PBS durch eine Abnahme an intaktem Konjugat um nur ca. 10 % nach 2 d bzw. 3 d. Bei aCD25-DFO(NCS)-⁸⁹Zr ist nach 2 d eine Abnahme um ca. 25 % und nach 3 d um weitere 20 % zu beobachten. Die Stabilitäten beider Radioimmunkonjugate fallen nach 1 d in humanem Serum mit ca. 10 % an intaktem Konjugat im Vergleich zur Studie in PBS (ca. 50%) deutlich geringer aus. Die Abnahme an intaktem Konjugat liegt für den enzymatisch DFO-modifizierte aCD25 mit komplexiertem ⁸⁹Zr im Bereich von ca. 30-40 % nach 2 und 3 d und für aCD25-DFO(NCS)-⁸⁹Zr entsprechend bei ca. 60-70 %. Die allgemein geringere Stabilität der ⁸⁹Zr-markierten CD25-DFO-Antikörper in

humanem Serum im Vergleich zu PBS könnte möglicherweise auf Wechselwirkungen der Radioimmunkonjugate mit Serumbestandteilen, wie Proteinen zurückzuführen sein, die eine Dissoziation von Radionuklid (^{89}Zr) und Chelator (DFO) bewirken. Im Allgemeinen sollte die Stabilität der ^{89}Zr -markierten Antikörper nach 7 d, das entspricht ca. zwei Halbwertszeiten von ^{89}Zr ($t_{1/2} = 78,4 \text{ h}$)^[153], nicht mehr als 10 % abnehmen, um diese in *in vivo*-Experimenten sinnvoll einsetzen zu können.

Zusammenfassend zeigten sowohl die enzymatisch DFO-modifizierten CD25-Antikörper als auch die Vergleichsprobe mit unspezifisch angebundenem DFO nach der Markierung mit ^{89}Zr unzureichende Stabilitäten der Konjugate in humanem Serum, weshalb auf eine *in vivo*-Anwendung zum Targeting von aktivierten T-Lymphozyten mit anschließender Visualisierung über PET verzichtet wurde.

Fazit: Enzymatische Antikörperfunktionalisierung mit DFO-NH₂

Neben der klassischen DFO-Funktionalisierung von IgG-Antikörpern in der Radioimmuntherapie über die Isothiocyanatgruppe mit DFO-NCS bietet die enzymatische Antikörpermodifizierung nach Abbildung 63 eine alternative Methode zur Einführung des Chelators. Auch hier konnte der Linker mit fünf Methylengruppen zwischen primären Amin und DFO-Einheit als BTG-Substrat erkannt und umgesetzt werden. Die grundlegende Möglichkeit der Radiomarkierung mit ^{89}Zr über das enzymatisch angebundenes DFO als Chelator konnte durch gezeigte Experimente bestätigt werden. Die Ursache der mangelnden Stabilität der Radioimmunkonjugate wurde nicht weiter analysiert.

3.5 Bioorthogonale Konjugationen mit aDEC205-DBCO/TCO

In den Kapiteln 3.4.1 und 3.4.2 erfolgte die Darstellung und Charakterisierung enzymatisch modifizierter DEC205-Antikörper. Mittels bakterieller Transglutaminase wurden die verschiedenen funktionalen Linker: DBCO-Lys, DBCO-NH₂ und TCO-NH₂ regioselektiv an den Aminosäureseitenketten Gln295 im Fc-Teil des Antikörpers angebunden. Der funktionale Nachweis der jeweiligen Antikörpermodifizierung wurde u. a. über die kovalente Anbindung von azid- bzw. tetrazinfunktionalisierten Fluoreszenzfarbstoffen und anschließender FCS-Analytik erbracht.

In diesem Kapitel soll die Konjugation des DEC205-Antikörpers über die enzymatisch eingebrachten DBCO- bzw. TCO-Funktionalitäten in bioorthogonalen Reaktionen mit azid- bzw. tetrazinfunktionalisierten Blockcopolymeren, Polyplexen, Bürstenpolymere und Polymermizellen untersucht werden (vgl. Abbildung 89). Die Konjugation beider makromolekularer Komponenten findet über das in Kapitel 1.4 beschriebene Konzept der kupferfreien Click-Chemie statt. Die bioorthogonale Reaktion für das DBCO/Azid-System basiert auf der ringgespannten Alkin-Azid-Cycloaddition (SPAAC). Die Reaktion zwischen *trans*-Cyclooctenen und Tetrazinen wird als inverse Diels-Alder-Cycloaddition mit Elektronenmangel (IEDDA, *inverse electron-demand Diels-Alder-cycloaddition*) beschrieben (vgl. Kapitel 1.4).

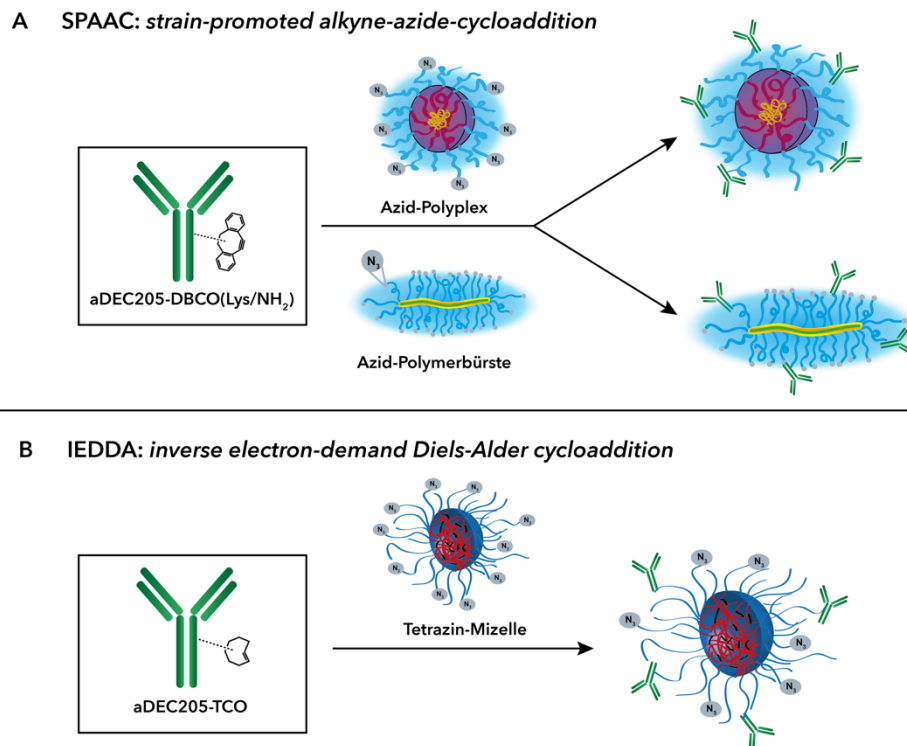


Abbildung 89. Bioorthogonale Konjugation von modifizierten DEC205-Antikörper und Nanopartikeln. **A)** SPAAC (*strain-promoted alkyne-azide-cycloaddition*). **B)** IEDDA-Cycloaddition (*inverse electron-demand Diels-Alder-cycloaddition*).

3.5.1 Konjugation von aDEC205-DBCO(Lys) an Azidfunktionalisierte P(Lys)-b-P(HPMA) Blockcopolymere

Die in Kapitel 3.1.4 synthetisierten P(Lys)-b-P(HPMA) Blockcopolymere wurden für die Konjugation mit DBCO-funktionalisiertem DEC205-Antikörper mit Azidgruppen modifiziert.^[216] In diesem Kapitel wurden die beiden azidfunktionalisierten Blockcopolymere P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(stat) und P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(end), optional mit und ohne Oregon Green 488-Markierung, in SPAAC-Konjugationen mit aDEC205_(AF647)-DBCO(Lys) umgesetzt und anschließend über FCS analysiert.

Abbildung 90A zeigt die FCS-Messung der SPAAC-Reaktion des P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(stat) Blockcopolymers und dem AF647-markierten aDEC205_{AF647}-DBCO(Lys). Eine Größenzunahme des hydrodynamischen Radius von $R_h = 6,0$ nm (grün) für den modifizierten Antikörper (aDEC205_{AF647}-DBCO(Lys)) zu $R_h = 10,0$ nm (grau) für das Konjugat aus Blockcopolymer und Antikörper bestätigt eine erfolgreiche Anbindung über SPAAC.^[216]

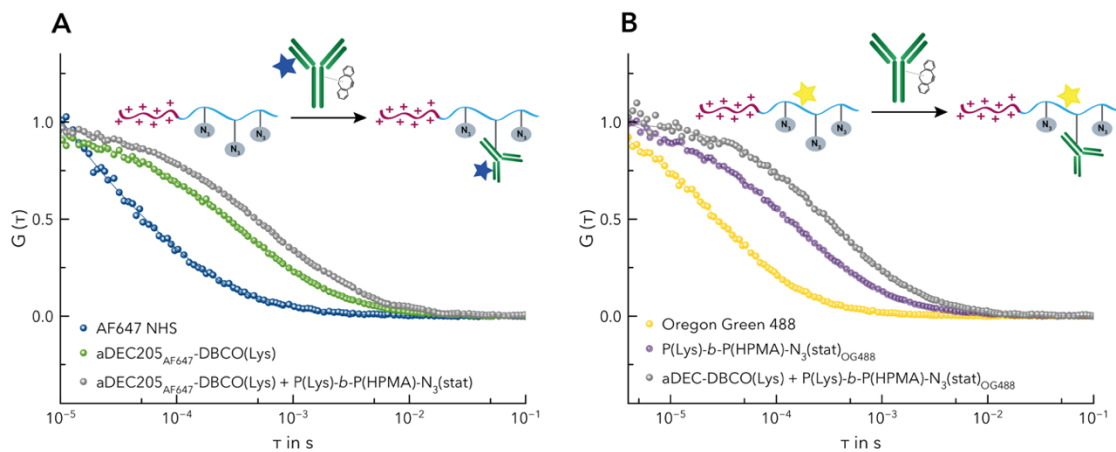


Abbildung 90. FCS: **A**) SPAAC von aDEC205_{AF647}-DBCO(Lys) und P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(stat): AF647 NHS (blau) mit $R_h = 0,76$ nm, aDEC205_{AF647}-DBCO(Lys) (grün) mit $R_h = 6,0$ nm, Konjugat von aDEC205_{AF647}-DBCO(Lys) und P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(stat) (grau) mit $R_h = 10,0$ nm (78 %). **B**) SPAAC von aDEC205-DBCO(Lys) und P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(stat)_{OG488}: OG488 Cadaverin (gelb) mit $R_h = 0,58$ nm, P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(stat)_{OG488} (violett) mit $R_h = 4,3$ nm, Konjugat von aDEC205-DBCO(Lys) und P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(stat)_{OG488} (grau) mit $R_h = 10,7$ nm (40 %).

Ein vergleichbares Ergebnis wurde auch für die Umsetzung von P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(stat)_{OG488} und aDEC205-DBCO(Lys) erzielt, wobei hier das Blockcopolymer die fluoreszenzmarkierte Spezies darstellt (Abbildung 90B). Es zeigt sich eine Größenzunahme von $R_h = 4,3$ nm für P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(stat)_{OG488} (violett) zu $R_h = 10,7$ nm für das Polymer-Antikörper Konjugat (grau), das im gleichen Größenbereich zum Konjugat aus Abbildung 90A liegt.

Um eine kovalente Bindung zwischen Antikörper und Blockcopolymer über SPAAC zu bestätigen und gleichzeitig eine Anlagerung beider Komponenten über unspezifische ionische oder *van-der-Waals* Wechselwirkungen auszuschließen, wurde eine Negativkontrolle (NK) durchgeführt. Dafür wurde nicht-modifizierter AF647-markierter DEC205 ohne DBCO-Gruppe unter denselben Reaktionsbedingungen mit P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) Blockcopolymer umgesetzt und mittels FCS charakterisiert (Abbildung 91).

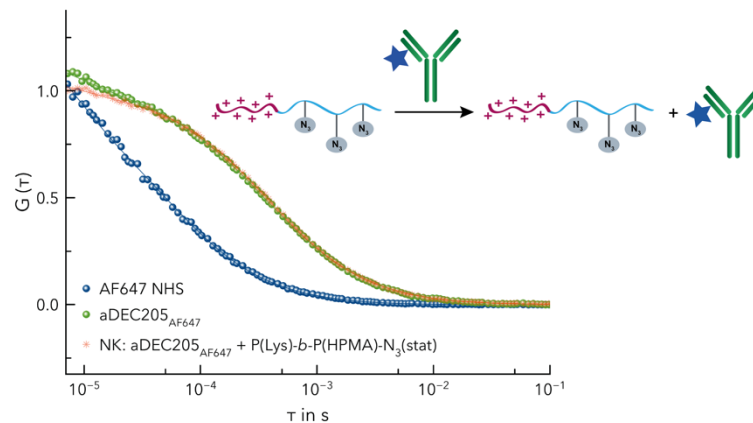


Abbildung 91. FCS: Umsetzung von aDEC205_{AF647} und P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat): AF647 NHS (blau) mit $R_h = 0,76$ nm, aDEC205_{AF647} (grün) mit $R_h = 5,5$ nm, Reaktion von aDEC205_{AF647} und P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) (rot) mit $R_h = 5,2$ nm.

Für die Umsetzung beider Komponenten konnte kein Konjugat in einem Größenbereich von $R_h \sim 10$ nm detektiert werden, sondern es zeigte sich für die Negativkontrolle ein hydrodynamischer Radius von $R_h = 5,2$ nm (rot), der mit der Größe des DEC205-Antikörpers selbst mit $R_h = 5,5$ nm (grün) nahezu übereinstimmt. Dieses Experiment bestätigt die kovalente Konjugation von P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat)_(OG488) und enzymatisch modifiziertem aDEC205_(AF647)-DBCO(Lys) über SPAAC in Abbildung 90.

Beide in Abbildung 90 dargestellten SPAAC-Reaktionen zwischen Blockcopolymer und enzymatisch modifiziertem aDEC205 waren analog zur Umsetzung mit niedermolekularem Azid-Fluoreszenzfarbstoff (vgl. Kapitel 3.4.1) nur über das Konzept der Gefrier- und Auftauzyklen erfolgreich und zeigten keine Reaktion bei analoger Durchführung des Experiments bei 37 °C in Lösung. Trotz dieser anspruchsvollen Reaktionsbedingungen konnte die Zugänglichkeit der regioselektiv eingeführten DBCO-Gruppen am DEC205-Antikörper für Azidgruppen innerhalb des P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) Blockcopolymers über die erfolgreiche SPAAC nachgewiesen werden.

Zur Darstellung homogener Polymer-Antikörper-Konjugate eignen sich Polymere mit endständiger Funktionalität zur Anbindung an den regioselektiv modifizierten DEC205-Antikörper. Demzufolge wurde das P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(end) Blockcopolymer mit aDEC205_{AF647}-DBCO(Lys) in einer SPPAC unter den gleichen Reaktionsbedingungen umgesetzt und über FCS analysiert (Abbildung 92). Jedoch konnte für diese Reaktion kein Polymer-Antikörper-Konjugat im erwarteten Größenbereich von $R_h \sim 10$ nm detektiert werden (vgl. Abbildung 90). Neben dem AF647-markierten aDEC205-DBCO(Lys) mit $R_h = 6,0$ nm (grün) zeigte sich für die Reaktionslösung der SPAAC nach Aufarbeitung über Spinfiltration lediglich eine fluoreszierende Spezies von $R_h = 7,5$ nm (grau). Diese liegt im Größenbereich des Antikörpers und belegt eine ausbleibende Konjugation zwischen azidendgruppenfunktionalisiertem Blockcopolymer und aDEC205-DBCO(Lys).^[216]

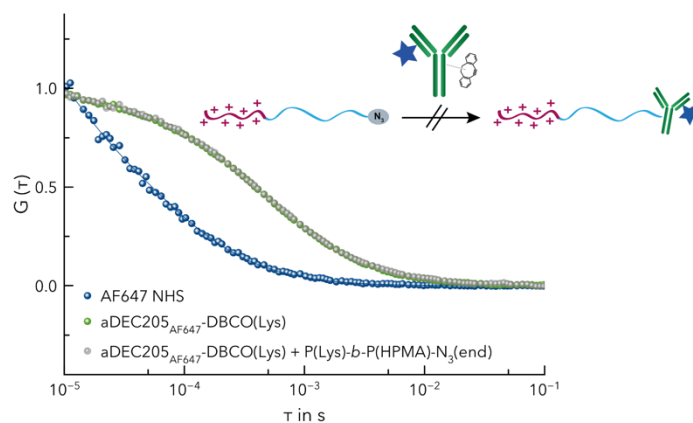


Abbildung 92. FCS: SPAAC von aDEC205_{AF647}-DBCO(Lys) und P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(end): AF647 NHS (blau) mit $R_h = 0,76$ nm, aDEC205_{AF647}-DBCO(Lys) (grün) mit $R_h = 6,0$ nm, Reaktion von aDEC205_{AF647}-DBCO(Lys) und P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(end) (grau) mit $R_h = 7,5$ nm.

Die mangelnde Umsetzung des P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(end) Blockcopolymers mit aDEC205-DBCO(Lys) in Abbildung 92 ist auf die geringe Konzentration der bioorthogonalen Gruppen in beiden makromolekularen Komponenten zurückzuführen. Zum einen weist das Azidendgruppenpolymer im Vergleich zu (Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) mit mehreren Azidgruppen einen wesentlich geringeren Funktionalisierungsgrad von maximal einer Azidgruppe pro Polymerkette auf. Zum anderen könnte die endständige Azidgruppe in P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(end) aufgrund der hohen Kettenflexibilität in wässriger Lösung innerhalb der Knäuelkonformation des Blockcopolymers für die Reaktion mit aDEC205-DBCO(Lys) nicht zugänglich sein. Somit trägt auch die Azidkomponente, in diesem Fall das Blockcopolymer, in Anzahl und Erreichbarkeit der funktionalen Gruppen in entscheidendem Maße zu einer erfolgreichen bioorthogonalen SPAAC mit enzymatisch DBCO-modifiziertem aDEC205 bei.

3.5.1.1 SPAAC von Azid-Polyplexen und Alexa Fluor 647 DBCO

Nach erfolgreicher Anbindung des regioselektiv DBCO-modifizierten aDEC205 an P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) Blockcopolymeren über SPAAC (Abbildung 90) soll vor der angestrebten Konjugation der DEC205-Antikörper auf die Oberfläche von azidfunktionalisierten Polyplexen nach dem Schema in Abbildung 89A, die Zugänglichkeit der Azidgruppen innerhalb dieser Strukturen untersucht werden. Dafür wurden Polyplexe mit pDNA (pGL3-Basic) und den jeweiligen azidfunktionalisierten Blockcopolymeren P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) und P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(end) gebildet (vgl. Kapitel 3.3) und mit niedermolekularem AF647 DBCO-Fluoreszenzfarbstoff in einer SPAAC umgesetzt.

Abbildung 93 zeigt die Umsetzung von pDNA-Polyplexen aus P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) Blockcopolymer und AF647 DBCO-Fluoreszenzfarbstoff zum einen über Gefrier- und Auftauzyklen (*freeze-thaw*) (A) und zum anderen bei 37 °C (B) mit anschließender Charakterisierung über FCS.

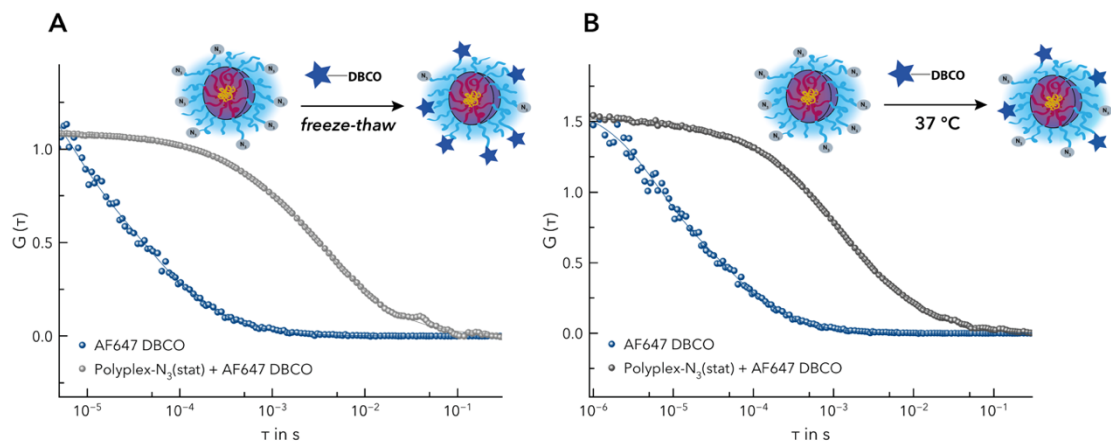


Abbildung 93. FCS: SPAAC von pDNA-Polyplexen aus P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) und AF647 DBCO. **A)** Reaktion über *freeze-thaw*-Zyklen: AF647 DBCO (blau) mit $R_h = 0,75$ nm, SPAAC von Polyplex und AF647 DBCO (hellgrau) mit $R_h = 52$ nm (97 %). **B)** Reaktion bei 37 °C: AF647 DBCO (blau) mit $R_h = 0,75$ nm, SPAAC von Polyplex und AF647 DBCO (dunkelgrau) mit $R_h = 50$ nm (90 %).

In beiden Fällen zeigte sich eine erfolgreiche bioorthogonale Konjugation über SPAAC von azidfunktionalisierten pDNA-Polyplexen und niedermolekularem AF647 DBCO-Farbstoff mit einer detektierten fluoreszierenden Spezies von $R_h = 52$ nm (A, hellgrau) bzw. $R_h = 50$ nm (B, dunkelgrau) im Vergleich zu AF647 DBCO mit $R_h = 0,75$ nm (blau).^[216]

Die auf ionischen Wechselwirkungen basierende Polyplexstruktur war während der Aufarbeitung der Ansätze über Spinfiltration stabil und ermöglichte somit eine nahezu vollständige Abtrennung des überschüssigen AF647 DBCO-Farbstoffs. Dies zeigt sich in einem Anteil von 97 % (A) bzw. 90 % (B) für den jeweiligen detektierten AF647-markierten Polyplex in den FCS-Messungen in Abbildung 93.

Über die erfolgreiche Anbindung von DBCO-funktionalisiertem Fluoreszenzfarbstoff an pDNA-Polyplexe aus P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(stat) konnte eine ausreichende Anzahl und eine gute Zugänglichkeit der Azidgruppen auf der Oberfläche der Polyplexe für niedermolekulare Fluoreszenzfarbstoffe bestätigt werden. Außerdem ist hervorzuheben, dass die bioorthogonale SPAAC sowohl über die *freeze-thaw*-Methode als auch bei 37 °C zu einer erfolgreichen Konjugation von Polyplex und Fluoreszenzfarbstoff führte. Die FCS bietet die Möglichkeit über das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von AF647-markiertem pDNA-Polyplex zu AF647 DBCO-Farbstoff eine quantitative Aussage über die Effizienz der Farbstoffanbindung über SPAAC zu treffen. Für den Reaktionsansatz über Gefrier- und Auftauzyklen (Abbildung 93A) zeigte sich mit 30 Farbstoffen pro Polyplex ein dreimal höherer Umsatz im Vergleich zur Reaktion bei 37 °C (Abbildung 93B) mit 9 Farbstoffen pro Polyplex. Dies entspricht den Erwartungen für eine gesteigerte Reaktionsrate über die *freeze-thaw*-Methode.

Im Gegensatz zur erfolgreichen SPAAC von azidfunktionalisierten pDNA-Polyplexen mit P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(stat) Blockcopolymer (Abbildung 93) konnte in der Umsetzung von Polyplexen aus azidendgruppenfunktionalisiertem Blockcopolymer (P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(end)) keine Konjugation mit dem niedermolekularem AF647 DBCO-Fluoreszenzfarbstoff nachgewiesen werden, weder über Gefrier- und Auftauzyklen noch bei der Reaktionsführung bei 37 °C.^[216]

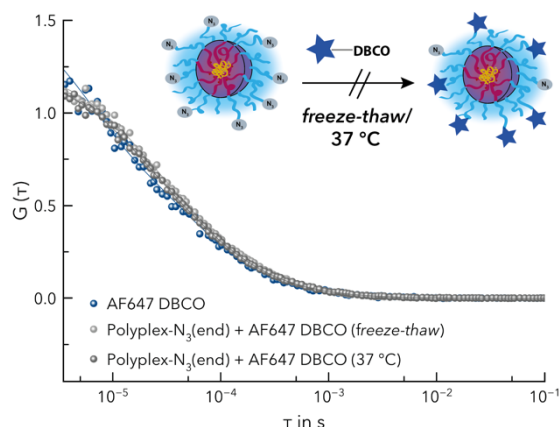


Abbildung 94. FCS: SPAAC von pDNA-Polyplexen aus P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(end) und AF647 DBCO. AF647 DBCO (blau) mit $R_h = 0,75$ nm, Reaktion von Polyplex und AF647 DBCO über *freeze-thaw*-Zyklen: (hellgrau) mit $R_h = 0,78$ nm. Reaktion von Polyplex und AF647 DBCO bei 37 °C: (dunkelgrau) mit $R_h = 0,76$ nm.

Die in Abbildung 94 dargestellten FCS-Messungen zeigen keine fluoreszierende Spezies im erwarteten Größenbereich von $R_h \sim 50$ nm (vgl. Abbildung 93). Die Korrelationskurven für die Reaktion über Gefrier- und Auftauzyklen (A, hellgrau) und für die Reaktion bei 37 °C (B, dunkelgrau) überlagern mit der Korrelationskurve des AF647 DBCO-Farbstoffs von $R_h = 0,75$ nm. Die mögliche Ursache für eine erfolglose AF647 DBCO-Anbindung an pDNA-Polyplexe aus P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(end) Blockcopolymer, liegt wahrscheinlich, analog der gescheiterten Umsetzung des Blockcopolymer mit aDEC205-DBCO (Abbildung 92), am geringen Azid-Funktionsgrad und der Zugänglichkeit der Azidgruppen im Blockcopolymer bzw. im Polyplex begründet.

3.5.2 Konjugation von Azidfunktionalisierten Polyplexen und aDEC205-DBCO(Lys)/(NHS)

In diesem Kapitel wurde die bioorthogonale Konjugation von azidfunktionalisierten pDNA-Polyplexen und DBCO-modifizierten DEC205-Antikörpern analysiert (siehe Abbildung 89A). Basierend auf den Ergebnissen in Kapitel 3.5.1.1 wurden die pDNA-Polyplexe für nachfolgende SPAAC-Konjugationen ausschließlich mit P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) Blockcopolymer gebildet.

Ein Überblick über die durchgeführten Experimente zur Ermittlung der geeigneten Reaktionsbedingungen zur Anbindung von DEC205-Antikörpern auf die Oberfläche der Azid-Polyplexe ist in Tabelle 15 gegeben. Neben den regioselektiv, enzymatisch modifizierten DEC205-Antikörpern mit DBCO-Lys und DBCO-NH₂ (A1-B4) wurden auch unspezifisch DBCO-modifizierte DEC205-Antikörper verwendet (aDEC205-DBCO(NHS)) (C1-C3)). Es wurde stets der funktionalisierte Antikörper (aDEC205_{AF647}-DBCO(Lys/NH₂/NHS)) als fluoreszenzmarkierte Spezies eingesetzt, um die erwartete Größenzunahme von Antikörper ($R_h \sim 5-6$ nm) zu Polyplex-Antikörper-Konjugat ($R_h \sim 50$ nm) in der FCS eindeutig bestimmen zu können. Weiterhin unterscheiden sich die zahlreichen Versuche in Tabelle 15 in den gegebenen Reaktionsbedingungen (*freeze-thaw*-Zyklen oder 37 °C) und im molaren Verhältnis von Azid-Polyplex zu DEC205-DBCO-Antikörper.

Tabelle 15. Reaktionsansätze zur Konjugation von Azid-Polyplex und aDEC205_{AF647}-DBCO.

Ansatz	aDEC205 _{AF647} - DBCO(X)	Äquiv.*	Methode	FCS Analytik
A1	DBCO-Lys	10	<i>freeze-thaw</i>	-
A2	DBCO-Lys	50	<i>freeze-thaw</i>	-
A3	DBCO-Lys	100	<i>freeze-thaw</i>	R _h = 52 nm (5 %)
A4	DBCO-Lys	50	37 °C	-
A5	DBCO-Lys	100	37 °C	-
B1	DBCO-NH ₂	10	<i>freeze-thaw</i>	-
B2	DBCO-NH ₂	100	<i>freeze-thaw</i>	-
B3	DBCO-NH ₂	10	37 °C	-
B4	DBCO-NH ₂	100	37 °C	-
C1	DBCO-NHS	10	37 °C	-
C2	DBCO-NHS	50	37 °C	-
C3	DBCO-NHS	100	37 °C	R _h = 45 nm (13 %)

A/B: enzymatisch, regioselektiv modifizierter aDEC205_{AF647}-DBCO.

C: unspezifisch modifizierter aDEC205_{AF647}-DBCO.

* Äquivalente an aDEC205_{AF647}-DBCO bezogen auf 1 Äquivalent Polyplex (pDNA/Polyplex = 1)^[246]

Die Ergebnisse aus Tabelle 15 zeigen, dass sowohl für die enzymatisch DBCO-modifizierten Antikörper (A1-B4) als auch für den unspezifisch DBCO-funktionalisierten aDEC205 ein Überschuss von mindestens 100 Äquivalenten in Bezug auf den Polyplex nötig war, um eine Umsetzung über SPAAC zu erzielen (A3 und C3). Ein geringerer Einsatz von 10 oder 50 Äquivalenten führte zu keiner detektierbaren Reaktion über FCS. Weiterhin ist zu betonen, dass die enzymatisch modifizierten Antikörper ausschließlich über Gefrier- und Auftauzyklen zur Reaktion gebracht werden konnten, eine Umsetzung bei 37 °C blieb erfolglos (vgl. A4, A5, B3, B4). Im Gegensatz dazu konnten der unspezifisch DBCO-markierte DEC205-Antikörper (C3) bei 37 °C an den Polyplex angebunden werden.

Die FCS-Messungen in Abbildung 95 belegen eine erfolgreiche SPAAC zwischen Azid-Polyplexen und DBCO-funktionalisierten DEC205-Antikörpern. In Abbildung 95A wurde der enzymatisch DBCO-modifizierte aDEC205_{AF647}-DBCO(Lys) über Gefrier- und Auftauzyklen angebunden (vgl. Tabelle 15, A3), während in Abbildung 95B der unspezifisch DBCO-modifizierte aDEC205_{AF647}-DBCO(NHS) bei 37 °C erfolgreich zur Reaktion gebracht wurde (vgl. Tabelle 15, C3).

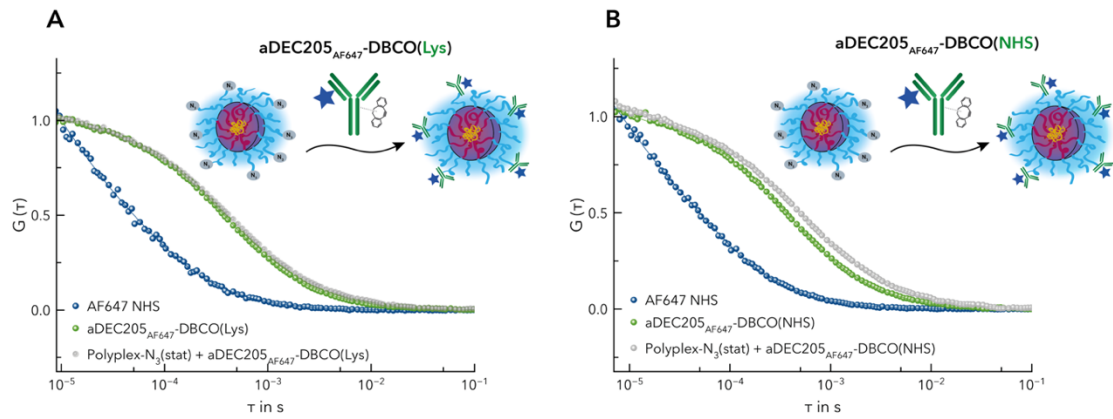


Abbildung 95. FCS: SPAAC von Azid-Polyplexen aus P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(stat) und aDEC205_{AF647}-DBCO. **A)** Reaktion mit aDEC205_{AF647}-DBCO(Lys) über *freeze-thaw*-Zyklen: AF647 NHS (blau) mit $R_h = 0,76$ nm, aDEC205_{AF647}-DBCO(Lys) (grün) mit $R_h = 5,5$ nm, Konjugat von Azid-Polyplex und aDEC205_{AF647}-DBCO(Lys) (grau) mit $R_h = 52$ nm (5 %). **B)** Reaktion mit aDEC205_{AF647}-DBCO(NHS) bei 37 °C: AF647 NHS (blau) mit $R_h = 0,76$ nm, aDEC205_{AF647}-DBCO(NHS) (grün) mit $R_h = 5,6$ nm, Konjugat von Azid-Polyplex und aDEC205_{AF647}-DBCO(NHS) (grau) mit $R_h = 45$ nm (13 %).

Die resultierenden Korrelationskurven für die Polyplex-Antikörper-Konjugate (grau) mit einem hydrodynamischen Radius von $R_h = 52$ nm (A) und $R_h = 45$ nm (B) entsprechen dem erwarteten Größenbereich der Polyplexe von ca. 50 nm (vgl. Abbildung 51 und Abbildung 93). Diese detektierten fluoreszierenden Spezies unterscheiden sich deutlich von der Größe der eingesetzten AF647-markierten DBCO-Antikörper mit $R_h = 5,5$ nm für aDEC205_{AF647}-DBCO(Lys) und $R_h = 5,6$ nm für aDEC205_{AF647}-DBCO(NHS) und bestätigen eine erfolgreiche Konjugation beider makromolekularer Komponenten über SPAAC. Allgemein ist festzuhalten, dass sich der hydrodynamische Radius des Polyplexes bei Anbindung der DEC205-Antikörper nicht signifikant ändert bzw. vergrößert.

Dennoch zeigt sich in beiden Fällen trotz der beschriebenen Größenunterschiede keine deutliche Verschiebung der Korrelationskurven von aDEC205_{AF647}-DBCO(Lys/NHS) (grün) zum Polyplex-Antikörper-Konjugat (grau). Dies ist auf den geringen prozentualen Anteil des jeweiligen Konjugats von 5 % (in Abbildung 95A) bzw. 13 % (Abbildung 95B) zurückzuführen. Über den ermittelten Anteil an Polyplex-Antikörper-Konjugat lässt sich jedoch keine Aussage über den Umsatz der Reaktion treffen, da in beiden Fällen die Reaktionslösung der SPPAC Ansätze ohne Abtrennung des eingesetzten Überschusses von 100 Äquivalenten aDEC205_{AF647}-DBCO(Lys/NHS) über FCS analysiert wurde. Eine nachträgliche Abtrennung an überschüssigem Antikörper über Größenausschlusschromatographie blieb für die kleinen Reaktionsansätze der positiven Konjugationsansätze erfolglos (vgl. Kapitel 5.12.5).

Im Allgemeinen stellte sich das Ermitteln der geeigneten Reaktionsbedingungen zur Konjugation von Polyplex und Antikörper als sehr anspruchsvoll heraus. Wie in Kapitel 5.12.5 beschrieben, wurden die Reaktionen in 6-7 Gefrier- und Auftauzyklen durchgeführt. Beim Erhöhen der Anzahl der Gefrierzyklen auf ca. 10-14, um den Reaktionsumsatz weiter zu steigern, konnten in der FCS fluoreszierende Fragmente im Größenbereich von 2-3 nm detektiert werden, die auf eine Zersetzung des Antikörpers ($R_h \sim 6$ nm) hinwiesen. Wurde die Reaktionszeit bei der Konjugation bei 37 °C von 1 d auf 3-4 d verlängert, konnte in der FCS die Bildung von Aggregaten beobachtet werden (Spezies im Bereich von $R_h = 100-200$ nm).

Zusammenfassend konnte die Zugänglichkeit und moderate Reaktivität der Azidgruppen im Polyplex sowie der DBCO-Gruppen im DEC205-Antikörper im Einzelnen über SPAAC-Reaktionen mit niedermolekularen Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 76 und Abbildung 93). Auch die Darstellung von Polyplex-Antikörper-Konjugaten über bioorthogonale SPAAC von Azid-Polyplexen mit unterschiedlichen DBCO-funktionalisierten DEC205-Antikörpern war in eingeschränkter Form über FCS zu detektieren (Abbildung 95). Die geringe Reaktivität bei der Umsetzung beider makromolekularen Komponenten ist möglicherweise auch auf das geringe Diffusionsvermögen des Polyplexes mit einem hydrodynamischen Radius von ca. 50 nm zurückzuführen. Deshalb konnte durch ein erhöhtes Verhältniss der kleineren Antikörperspezies ($R_h \sim 6$ nm) in Relation zum Polyplex eine Reaktion der beiden Makromoleküle erwirkt werden (vgl. Tabelle 15). Da auch die Reaktion von unspezifisch DBCO-modifiziertem aDEC205 (Abbildung 95B) nicht maßgeblich effizienter war im Vergleich zu den regioselektiv enzymatisch modifizierten Antikörpern (Abbildung 95A), kann der geringe Umsatz bei der Konjugation mit Azid-Polyplexen nicht nur von der Anzahl an DBCO-Gruppen und deren Zugänglichkeit im Antikörper begründet sein.

Das angestrebte Konzept der bioorthogonalen SPAAC zwischen azidfunktionalisierten Polyplexen und regioselektiv DBCO-modifizierten DEC205-Antikörpern zur Ausstattung der Polyplexe mit Zielstrukturen für dendritische Zellen, konnte prinzipiell nachgewiesen werden. Dennoch erwies sich diese Methode aufgrund der nötigen Überschüsse an aufwendig synthetisiertem aDEC205-DBCO sowie der geringen Umsätze und mangelnder Reproduzierbarkeit als limitiert zur breiteren Anwendung, insbesondere für weitere *in vitro*-Charakterisierungen.

3.5.3 Konjugation von Zylindrischen Azid-Bürstenpolymeren und aDEC205-DBCO(NH₂)

Neben der Konjugation der enzymatisch DBCO-funktionalisierten DEC205-Antikörper an Azid-Polyplexe, erfolgte ebenfalls eine Anbindung an azidfunktionalisierte, zylindrische Bürstenpolymere (vgl. Abbildung 89A). Die polypept(o)idischen Bürstenpolymere bestehen aus einem Poly-L-lysin-Rückgrat und Polysarkosinseitenketten.

Die zylindrischen P(Lys)-P(Sar) Bürstenpolymere wurden von [REDACTED] unter der Betreuung von [REDACTED] und [REDACTED] am Institut für Physikalische Chemie der JGU Mainz synthetisiert und freundlicherweise bereitgestellt.

Der in Kapitel 3.4.1 enzymatisch modifizierte aDEC205-DBCO(NH₂) mit AF647-Markierung wurde in einem Überschuss von 50 Äquivalenten mit Azid-Bürstenpolymer unter Gefrier- und Auftauzyklen zur Reaktion gebracht. Die FCS-Messung in Abbildung 96 zeigt für den DEC205_{AF647}-DBCO(NH₂)-Antikörper (grün) eine charakteristische Größe von $R_h = 5,9$ nm und nach der Umsetzung mit azidfunktionalisiertem Bürstenpolymer konnte eine fluoreszierende Spezies von $R_h = 19$ nm (grau) detektiert werden. Diese Größenzunahme bestätigt eine erfolgreiche bioorthogonale Anbindung über SPAAC von Azid-Bürstenpolymer und enzymatisch modifiziertem aDEC205_{AF647}-DBCO(NH₂).

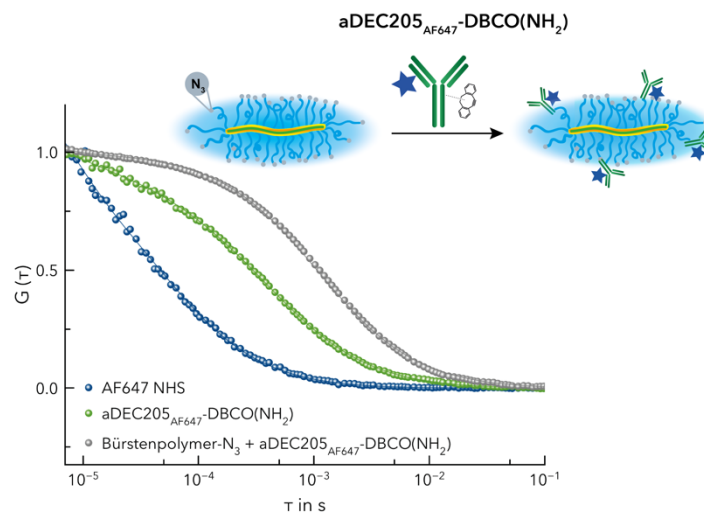


Abbildung 96. FCS: SPAAC von zylindrischem Azid-Bürstenpolymer und aDEC205_{AF647}-DBCO(NH₂). AF647 NHS (blau) mit $R_h = 0,76$ nm, aDEC205_{AF647}-DBCO(NH₂) (grün) mit $R_h = 5,9$ nm, Konjugat von Azid-Bürstenpolymer und aDEC205_{AF647}-DBCO(NH₂) (grau) mit $R_h = 19,2$ nm.

Die resultierende Größe von 19 nm für das Konjugat liegt im Rahmen der Messgenauigkeit in guter Übereinstimmung mit dem Radius des zylindrischen Bürstenpolymers von $R_h = 22$ nm, der über DLS und FCS bestimmt wurde (hier nicht gezeigt).

Vergleichend mit den Polyplex-Antikörper-Konjugaten aus Kapitel 3.5.2 in Abbildung 95, ist auch für das Konjugat aus Bürstenpolymer und aDEC205 keine Größenzunahme durch die Antikörperanbindung auszumachen. Die hydrodynamischen Radien der Konjugate entsprechen weitestgehend der Größe der polymerbasierten Nanopartikel selbst. Im Unterschied zu den FCS-Messungen der Polyplex-Antikörper-Konjugate in Abbildung 95 zeigt die Korrelationskurve des Konjugats aus zylindrischem Bürstenpolymer und aDEC205 (grau) in Abbildung 96 eine deutliche Verschiebung zur Korrelationskurve des Antikörpers (grün). Dies ist auf die erfolgreiche Abtrennung des überschüssigen DEC205_{AF647}-DBCO(NH₂)-Antikörpers mittels Größenausschlusschromatographie zurückzuführen. In Folge dessen wurde über FCS der aufgearbeiteten Reaktionslösung ausschließlich eine Komponente von $R_h = 19$ nm für das Konjugat gemessen; freier Antikörper wurde nicht detektiert. Dies erlaubte auch eine entsprechende Quantifizierung der angebotenen Antikörper pro Bürstenpolymer über das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten. Somit ergab sich ein Wert von 3,8 DEC205-Antikörpern pro Bürstenpolymer.

Wie auch für alle anderen SPAAC-Konjugationsreaktionen, in denen enzymatisch modifizierte Antikörper beteiligt waren, fand die Umsetzung zwischen azidfunktionalisiertem, zylindrischem Bürstenpolymer und enzymatisch modifiziertem aDEC205-DBCO(NH₂) ausschließlich über Gefrier- und Auftauzyklen statt. Für die erfolgreiche bioorthogonale Reaktion war ebenfalls ein hoher Überschuss von 50 Äquivalenten an aDEC205_{AF647}-DBCO(NH₂) notwendig, gegenüber dem Einsatz von 100 Äquivalenten bei der Konjugation der Polyplexe (Kapitel 3.5.2). Nicht umgesetzter Antikörper konnte aufgrund einer entsprechenden Ansatzgröße von 83 µg Bürstenpolymer und 600 µg Antikörper (vgl. Kapitel 5.12.6) erfolgreich über Größenausschlusschromatographie vom Konjugat abgetrennt werden.

Ein möglicher Vorteil des zylindrischen Bürstenpolymers ($R_h \sim 20$ nm) bei der SPAAC mit enzymatisch modifiziertem DBCO-Antikörper im Vergleich zum Polyplex ($R_h \sim 50$ nm) als nanopartikuläre Azidkomponente, könnte die geringere Größe und das damit einhergehende höhere Diffusionsvermögen sein. Weiterhin bietet das Bürstenpolymer aufgrund der Azidendgruppenfunktionalisierung der Polysarkosinseitenkette eine hohe Anzahl an Azidgruppen, die für eine SPAAC zur Verfügung stehen. Aufgrund der kompakteren Architektur des Bürstenpolymers im Unterschied zur diffusen Struktur der pDNA-Polyplexe, könnten die Azidgruppen auf der Bürstenoberfläche für den enzymatisch DBCO-modifizierten aDEC205 besser zugänglich sein.

Zusammenfassend konnten azidfunktionalisierte, zylindrische Bürstenpolymere basierend auf Poly-L-lysin und Polysarkosin als nanopartikuläre Träger zur bioorthogonalen SPPAC mit regioselektiv modifizierten DEC205-DBCO-Antikörpern genutzt werden. Dennoch ist eine breitere Anwendung dieser Systeme aufgrund der nötigen hohen Überschüsse an aufwendig synthetisiertem aDEC205_{AF647}-DBCO(NH₂) limitiert.

3.5.4 Konjugation von Tetrazin-Mizellen und aDEC205-TCO(NH₂)

Der in Kapitel 3.4.2 über BTG-vermittelte Modifizierung hergestellte TCO-funktionalisierte DEC205-Antikörper zeigte bereits eine erfolgreiche Anbindung von tetrazinfunktionalisiertem Fluoreszenzfarbstoff in der charakteristischen bioorthogonalen IEDDA-Cycloaddition (vgl. Abbildung 81). Fortführend wurde die Konjugation des DEC205_{AF647}-TCO-Antikörpers an kernvernetzten Polymermizellen basierend auf Poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylat)-*b*-Poly(hymecromonmethacrylat-co-laurylmethacrylat) Blockcopolymeren (P(HPMA)-*b*-P(HCMA-co-LMA))^[247] mit statistisch verteilten Tetrazingruppen im P(HPMA)-Block analysiert (vgl. Abbildung 89C).

Die P(HPMA)-*b*-P(HCMA-co-LMA)-basierten Polymermizellen wurden von [REDACTED] unter der Betreuung von [REDACTED] am Institut für Organische Chemie der JGU Mainz synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Das tetrazinfunktionalisierte amphiphile P(HPMA)-*b*-P(HCMA-co-LMA)-Tz(stat) Blockcopolymer wurde über Dialyse gegen Wasser in Mizellen überführt und mittels photochemischer Reaktion über die HCMA-Gruppen vernetzt.^[247] Anschließend wurde der AF647-markierte enzymatisch modifizierte aDEC205_{AF647}-TCO als fluoreszenzmarkierte Spezies mit den vorgeformten tetrazinfunktionalisierten Polymermizellen in einer IEDDA-Cycloaddition über Gefrier- und Auftauzyklen umgesetzt.

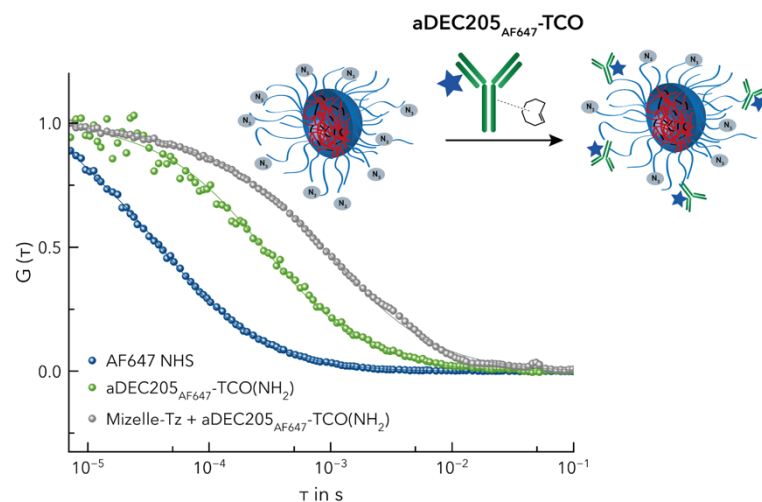


Abbildung 97. FCS: Konjugation von Tetrazin-Mizelle und aDEC205_{AF647}-TCO. AF647 NHS (blau) mit $R_h = 0,76$ nm, aDEC205_{AF647}-TCO (grün) mit $R_h = 5,0$ nm, Konjugat von Tetrazin-Mizelle und aDEC205_{AF647}-TCO (grau) mit $R_h = 19$ nm (90 %).

Die FCS-Messung in Abbildung 97 zeigt eine erfolgreiche bioorthogonale IEDDA-Reaktion von tetrazinfunktionalisierter Mizelle und TCO-modifiziertem aDEC205. Für das Konjugat konnte eine fluoreszierende Spezies mit einem hydro-

dynamischen Radius von $R_h = 19$ nm (grau) detektiert werden, die sich deutlich in der Größe von aDEC205_{AF647}-TCO mit $R_h = 5,0$ nm (grün) unterscheidet. Das Konjugat mit $R_h = 19$ nm liegt in guter Übereinstimmung mit dem über DLS gemessenen Durchmesser der vorgeformten Mizelle von 41 nm ($R_h = 20,5$ nm) (hier nicht gezeigt). In Analogie zu den SPAAC-Konjugationen von Azid-Polyplex bzw. Azid-Bürstenpolymer mit aDEC205-DBCO (Kapitel 3.5.2 und 3.5.3), konnte auch für die Antikörperanbindung von aDEC205-TCO an die Polymermizelle keine Größenzunahme detektiert werden.

Der deutliche Abstand der Korrelationskurve des Mizellen-Antikörper Konjugats (grau) zur Korrelationskurve von aDEC205_{AF647}-TCO (grün) ist dem prozentualen Anteil von 90 % an detektiertem Konjugat zuzuschreiben. Die verbleibenden 10% sind nicht umgesetztem freien Antikörper zuzuschreiben. Im Unterschied zur SPAAC-Konjugation von Azid-Bürstenpolymer und aDEC205_{AF647}-DBCO in Abbildung 96, hat für die IEDDA-Cycloaddition von Tetrazin-Mizelle und aDEC205_{AF647}-TCO keine Aufarbeitung zur Abtrennung von freiem Antikörper stattgefunden. Aufgrund des geringen Anteils an aDEC205_{AF647}-TCO in der Reaktionslösung konnte über FCS aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten eine Anbindung von 2,9 DEC205-Antikörpern pro Polymermizelle berechnet werden. Dieses Ergebnis ist mit der Anbindung von 3,8 DEC205-Antikörpern pro Bürstenpolymer (Kapitel 3.5.3) bei ähnlicher Größe des nanopartikulären Trägers gut vergleichbar.

Zusammenfassend zeigt sich für die IEDDA-Cycloaddition zwischen tetrazinfunktionalisierten Polymermizellen aus P(HPMA)-*b*-P(HCMA-co-LMA) Blockcopolymer und enzymatisch modifiziertem aDEC205_{AF647}-TCO und anschließender FCS-Analytik ein sehr guter Reaktionsumsatz. Trotz des eingesetzten Überschusses an funktionalisiertem Antikörper und ohne Aufarbeitung der IEDDA-Reaktionslösung, konnte in der FCS nur ein geringer Anteil von 10% an nicht-gebundenem aDEC205_{AF647}-TCO detektiert werden. Dies belegt eine gute Zugänglichkeit der Tetrazingruppen auf der Oberfläche der Polymermizelle für die regioselektiv TCO-modifizierten Antikörper.

Über eine potentiell effizientere BTG-vermittelte TCO-Funktionalisierung gegenüber der DBCO-Modifizierung an aDEC205 kann nach den Charakterisierungen in Kapitel 3.4.1 und 3.4.2 keine Aussage getroffen werden. Auch der hydrodynamische Radius der Polymermizelle liegt im ähnlichen Größenbereich zum zylindrischen Bürstenpolymer ($R_h \sim 20$ nm) und kann aufgrund der Größe nicht ausschlaggebend sein. Somit sind die vergleichsweise besseren Reaktionsumsätze der Mizellen-Antikörper Konjugation neben der Konjugation von Azid-Polyplex und Azid-Bürstenpolymer mit enzymatisch DBCO-funktionalisiertem aDEC205 auf die ausnahmslos höheren Reaktionsgeschwindigkeiten (Faktor 10^3) für die bioorthogonale IEDDA-Cycloaddition zwischen *trans*-Cyclooctenen und Tetrazinen im Vergleich zur SPAAC zurückzuführen (IEDDA: $k \sim 10^6$ M⁻¹ s⁻¹ und SPAAC: $k \sim 10^{-2}$ M⁻¹ s⁻¹; vgl. Kapitel 1.4).

4 Zusammenfassung und Ausblick

4 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Funktionalisierung von P(Lys)-*b*-P(HPMA)-Blockcopolymeren als polymerbasierte Transfektionsagenzien für die selektive Transfektion von dendritischen Immunzellen im Rahmen der Anti-Tumorvaksinierung. Dies beinhaltete zum einen die Einführung funktionaler Elemente, die die endosomale Freisetzung unterstützen und damit die Transfektionseffizienz steigern sollen und zum anderen die Modifizierung der Polyplexe mit DEC205-Antikörpern als Zielstrukturen für eine selektive DC-Adressierung. Die bioorthogonale Konjugation von DBCO-funktionalisierten DEC205-Antikörpern an Polyplexe mit Azidgruppenmodifizierung erfolgte über ringgespannten Alkin-Azid-Cycloaddition (SPAAC) und wurde im Detail mittels FCS-Analytik charakterisiert.

Über die Kombination von NCA- und RAFT-Polymerisation mit anschließenden polymeranalogen Umsetzungen wurden P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymere mit einem Blocklängenverhältnis von 1:5 (33:165) erfolgreich hergestellt. Die RAFT-Polymerisation des Reaktivestermonomers PFPMA mit dem makromolekularen Kettentransferreagenz P(Lys(Boc))-CTA ermöglichte die Synthese des P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA) Vorläufer-Blockcopolymeren. Der Poly(PFPMA)-Block wurde über Aminolyse mit 2-Hydroxypropylamin zur hydrophilen Poly(HPMA)-Einheit umgesetzt. Darüber hinaus wurde der Reaktivesteransatz genutzt, um mittels polymeranaloger Reaktionen optional den Fluoreszenzfarbstoff Oregon Green 488 Cadaverin oder auch statistisch verteilte Azidgruppen über den Linker NH₂-PEG₆-N₃ in den Poly(HPMA)-Block einzuführen. Die statistische Azidfunktionalisierung im P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) Blockcopolymer konnte qualitativ über IR-Spektroskopie nachgewiesen werden und durch ¹H-NMR-Spektroskopie ein Funktionalisierungsgrad von 10,5 % (~17 Azidgruppen pro Blockcopolymer) bestimmt werden. Das azidendgruppenfunktionalisierte Blockcopolymer P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(end) wurde in einer Amidkupplung der polymeren Carboxylendgruppe mit niedermolekularem NH₂-PEG₆-N₃ hergestellt. Der qualitative Nachweis der endständigen Azidgruppe in P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(end) erfolgte über die Anbindung eines DBCO-modifizierten Fluoreszenzfarbstoffs. In grober Näherung wurde über ¹H-NMR-Spektroskopie ein Funktionalisierungsgrad von ca. 7% bestimmt. Die synthetisierten Blockcopolymere P(Lys)-*b*-P(HPMA), P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) und P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(end) mit Molekulargewichten zwischen 28 000 und 33 000 g/mol zeigten monomodale Molekulargewichtsverteilungen mit Dispersitäten zwischen 1,4 und 1,6 über GPC in HFIP.

Die physikochemische Charakterisierung der gebildeten Polyplexe basierend auf P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymeren mit pDNA und mRNA erfolgte über Agarosegelelektrophorese. Für mRNA-Polyplexe zeigte sich ein Komplexierungsstart bei N/P 2, während die Komplexierung der pDNA-Polyplexe erst bei N/P 4 begann. Das

unterschiedliche Komplexierungsverhalten liegt in der Struktur der Nukleinsäuren begründet, sodass die Komplexierung der flexiblen, einzelsträngigen mRNA bei kleineren N/P Verhältnissen beginnt im Vergleich zur rigiden, doppelsträngigen pDNA. Die Charakterisierung der pDNA-Polyplexe über DLS und FCS ergab in guter Übereinstimmung eine Größe im Bereich von $R_h = 50$ nm. Entsprechend der geringen Größe bezüglich der Anzahl an Nukleotiden (pDNA: 9636 Basen; mRNA: 2135 Basen) konnte mittels FCS für die gebildeten mRNA-Polyplexe ein geringerer hydrodynamischer Radius von $R_h = 25$ nm detektiert werden. In weiteren Experimenten könnte der Einfluss der strukturellen Unterschiede von mRNA und pDNA unter Verwendung von Nukleinsäuren mit gleicher Nukleotidanzahl in Bezug auf die Größe der gebildeten Polyplexe näher untersucht werden.

Zur Steigerung der Transfektionseffizienz wurde die chemische Modifizierung der P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymere mit einer säurespaltbaren Hydrazongruppe über die Synthese eines makromolekularen Hydrazon-CTAs evaluiert. Sowohl die erfolgreiche Synthese des niedermolekularen (Z)- β -Alanin-hydrazons als auch die weitere Modifizierung zur Darstellung eines makromolekularen Polylysin-CTAs konnten über $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Jedoch zeigten Experimente zur sauren Hydrolyse des Hydrazons, dass die Synthese nicht unter Erhalt der funktionalen Hydrazoneinheit stattfand. Somit wurde die Darstellung des säurelabilen P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymers mit dem hergestellten Hydrazid-CTA, ohne pH-sensitive Gruppe, nicht weiter verfolgt. Die partielle Modifizierung des Poly-L-lysin-Blocks mit 2-(Pyridyldithio)-propionat-Gruppen im P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer zur reversiblen Disulfidvernetzung konnte über ^1H -NMR-Spektroskopie qualitativ nachgewiesen werden. Das resultierende P(Lys)-*co*-P(Lys-PDP)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer wurde mit dem endosomolytisch aktiven LAH4-L1-Cys-Peptid als Dithiolvernetzer umgesetzt und die resultierenden pDNA-Polyplexe über DLS charakterisiert. In Analogie zu den nicht vernetzten Systemen konnten für die disulfidvernetzten Polyplexe mit LAH4-L1-Peptid eine Größe im Bereich von $D_h = 80$ -110 nm detektiert werden.

Die Transfektionseffizienz von P(Lys)-*b*-P(HPMA) (P1) und P(Lys)-*co*-P(Lys-PDP)-*b*-P(HPMA) (P2) wurde über Biolumineszenzmessungen mit Luciferase-codierender mRNA bzw. pDNA an verschiedenen Zelllinien evaluiert. Wie das Experiment an HEK-293T Zellen bestätigte, können P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymere erfolgreich als polymere Transfektionsagenzien eingesetzt werden. Dennoch konnte über die Vernetzung mit endosomolytisch-aktivem LAH4-L1-Peptid von pDNA-Polyplexen mit P2 keine signifikante Erhöhung der Transfektionseffizienz an der DC2.4 Zelllinie detektiert werden. Auch die Transfektion mit mRNA-Polyplexen, bei der es keiner Translokation der Nukleinsäure in den Zellkern bedarf, konnte weder für BMDCs noch für HEK-293T Zellen erreicht werden, was möglicherweise in der unzureichenden Freisetzung der mRNA aus dem Polyplex begründet ist. Eine Visualisierung über konfokale

Mikroskopie mit fluoreszenzmarkierten Komponenten könnte zur Aufklärung beitragen. Bestätigt sich die ausbleibende Transfektion aufgrund der mangelnden Freisetzung der mRNA, könnte der Einfluss der Anzahl an kationischen Ladungen über den Polymerisationsgrad des Lysinblocks untersucht werden. Hinsichtlich einer erfolgreichen DC-Transfektion könnte alternativ die chemische Modifizierung der P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymere mit pH-puffernden Gruppen, wie Histidinen, oder aber die Konjugation von Signalsequenzen für einen unterstützten Kernimport evaluiert werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der zweistufigen enzymatischen Antikörpermodifizierung zur regioselektiven Einführung von unterschiedlichen funktionalen Linkern. Nach der vorangehenden Deglykosylierung mit PNGase F wurde der IgG-Antikörper aDEC205 mittels bakterieller Transglutaminase (BTG) mit den Substraten DBCO-Lys, DBCO-NH₂ und TCO-NH₂ umgesetzt. In einem Nebenprojekt wurde der CD25-Antikörper zum Targeting von aktivierten T-Lymphozyten mit Deferoxamin (DFO-NH₂), einem Chelator für Radionuklidmetalle, enzymatisch modifiziert. Die Deglykosylierung von aDEC205 und die Anbindung des DBCO-Lys Linkers konnten über hochauflösende Massenspektrometrie in höchster Präzision nachgewiesen werden. Weitere funktionale Nachweise der Antikörpermodifizierung mit DBCO- bzw. TCO-Gruppen wurden über die Konjugation mit entsprechenden azid- bzw. tetrazin-funktionalisierten Fluoreszenzfarbstoffen und anschließender Charakterisierung über FCS erbracht. Die Anbindung des DFO-Chelators an aCD25 wurde über die Radiomarkierung mit ⁸⁹Zr bestätigt. Nach der Aufarbeitung über Spinfiltration konnte für alle regioselektiv modifizierten Antikörper eine erfolgreiche Abtrennung der Enzyme sowie eine intakte Antikörperstruktur über SDS-PAGE nachgewiesen werden. Die Charakterisierung über DLS und FCS zeigte sowohl für die nativen als auch für modifizierten Antikörper einen Größenbereich von R_h ~ 5-6 nm. In zellulären Bindungsassays konnte am Beispiel von aDEC205-DBCO(NH₂) und aCD25-DFO(NH₂) gezeigt werden, dass die regioselektive Einführung der funktionalen Gruppen keinen Einfluss auf die Rezeptorbindungsaffinität der Antikörper darstellt. Aufgrund der geringen Stabilitäten der Radioimmunkonjugate von ⁸⁹Zr-markierten CD25-DFO-Antikörpern in humanem Serum, wurde auf das *in vivo*-Experiment mit anschließender PET-Bildgebung verzichtet.

Die Zugänglichkeit der enzymatisch eingeführten DBCO- bzw. TCO-Gruppen in aDEC205 für eine SPAAC bzw. IEDDA-Cycloaddition konnte über bioorthogonale Konjugation mit niedermolekularen Azid- bzw. Tetrazin-Fluoreszenzfarbstoffen mittels Gefrier- und Auftauzyklen bestätigt werden. Hinsichtlich der Anbindung von aDEC205-DBCO auf azidfunktionalisierte Polyplexstrukturen wurde die SPAAC vorerst an P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) und P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(end) Blockcopolymeren untersucht. Eine erfolgreiche Anbindung von aDEC205-DBCO an P(Lys)-*b*-P(HPMA)-

$N_3(\text{stat})$ konnte über FCS mit $R_h = 10$ nm für das Konjugat nachgewiesen werden, wohingegen keine Reaktion mit dem azidengruppenfunktionalisiertem Blockcopolymer aufgrund des geringen Azid-Funktionalisierungsgrades stattfand. Die Azidgruppen auf der Polyplexoberfläche mit $P(\text{Lys})\text{-}b\text{-}P(\text{HPMA})\text{-}N_3(\text{stat})$ konnten mit einem niedermolekularen DBCO-Fluoreszenzfarbstoff in einer SPAAC umgesetzt werden, was als Voraussetzung für die Anbindbarkeit von aDEC205-DBCO gewertet wurde. Eine gesteigerte Komplexität trat bei der SPAAC-Konjugation zwischen den beiden makromolekularen Komponenten von enzymatisch DBCO-modifiziertem aDEC205 und azidfunktionalisiertem Polyplex mit einem hydrodynamischen Radius von etwa 50 nm auf. Nach 6-7 Gefrier- und Auftauzyklen und einem Überschuss von 100 Äquivalenten des Antikörpers konnte prinzipiell eine bioorthogonale Reaktion über FCS nachgewiesen werden. Dennoch erwies sich das Konzept aufgrund der notwendigen Überschüsse an aufwendig synthetisiertem aDEC205-DBCO sowie der geringen Umsätze und mangelnden Reproduzierbarkeit als stark limitiert für eine breite Anwendung, insbesondere im Hinblick auf weitere *in vitro*-Charakterisierungen.

Um die SPAAC der enzymatisch modifizierten DEC205-Antikörper an weiteren nanopartikulären Systemen zu untersuchen, wurde aDEC205-DBCO in 50-fachem Überschuss mit zylindrischen Azid-Bürstenpolymeren über Gefrier- und Auftauzyklen umgesetzt. Nach der Abtrennung von nicht umgesetzten aDEC205-DBCO konnte mittels FCS eine erfolgreiche Anbindung von durchschnittlich 3-4 Antikörpern pro Bürstenpolymer nachgewiesen werden. Der Vorteil der Konjugation der Bürstenpolymere gegenüber den Polyplexen könnte zum einen deren geringere Größe ($R_h \sim 20$ nm) und das damit verbundene erhöhte Diffusionsvermögen sein. Zum anderen könnte auch die chemische Architektur der Bürstenpolymere eine bessere Zugänglichkeit der Azidgruppen gewähren. Eine effizientere Umsetzung von zwei Makromolekülen konnte in der bioorthogonalen IEDDA-Reaktion von enzymatisch TCO-modifiziertem aDEC205 mit tetrazinfunktionalisierten Polymermizellen erreicht werden. Ebenfalls über die *freeze-thaw*-Methode konnten im Mittel 3 Antikörper pro Mizelle ($R_h \sim 20$ nm) angebunden werden. Der gesteigerte Reaktionsumsatz ist auf die hohe Reaktionsgeschwindigkeit der IEDDA-Konjugation zurückzuführen, die um den Faktor 10^8 höher liegen kann als für SPAAC-Reaktionen.

Prinzipiell zeigte sich für die enzymatische Antikörpermodifizierung eine große Vielfalt an möglichen Substraten, die über BTG erfolgreich angebunden werden konnten. Ein Mehrwert für das synthetisierte DBCO-Lys gegenüber dem kommerziell erworbenen DBCO-NH₂ konnte in diversen SPAAC-Reaktionen nicht festgestellt werden. Alle erfolgreichen bioorthogonalen Reaktionen der enzymatisch modifizierten Antikörper waren ausschließlich über Gefrier- und Auftauzyklen möglich und weisen auf eine bedingte Zugänglichkeit der maximal 1-2 funktionale Gruppen innerhalb des IgGs hin. Weiterhin stellt sich auch die konzeptionelle Frage der *freeze-thaw*-Methode zur Konjugation von sensitiven Biomolekülen, wie Nukleinsäuren oder Proteinen.

Aufgrund der deutlich gesteigerten Reaktionsumsätze für die IEDDA-Cycloaddition erscheint dieses Konjugationskonzept für die Antikörperfunktionalisierung auf Polyplexe sehr sinnvoll. Weiterhin könnte die allgemeine Komplexität der Konjugation von Nanopartikeln mit Antikörpern als Zielstrukturen, neben der Strategie über bioorthogonale Reaktionen, auch durch die Verwendung von scFv- oder Fab-Antikörperfragmenten mit geringerer Größe und höherer Flexibilität minimiert werden.

5 Experimententeil

5 Experimentalteil

5.1 Materialien

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von Sigma-Aldrich (Merck) und Acros Organics bezogen und sofern nicht anders vermerkt, ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt. Technische Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert; alle anderen Lösungsmittel wiesen den Reinheitsgrad *pro analysis* (p. a.) auf. Tetrahydrofuran und 1,4-Dioxan wurden bei Bedarf über Natrium frisch destilliert, Dichlormethan entsprechend über CaH_2 . Dimethylformamid wurde von Acros Organics bezogen, über BaO getrocknet und unter Vakuum auf vorgetrocknetes Molsieb (3 Å) fraktioniert destilliert. Diethylether wurde vor Gebrauch über Destillation von Stabilisator befreit. Neopentylamin von TCI Europe wurde vor Gebrauch über NaOH getrocknet und anschließend fraktioniert destilliert. 2-Hydroxypropylamin wurde vor Verwendung frisch destilliert. Die geschützte Aminosäure *N*- ϵ -Boc-L-Lysin wurde von ORPEGEN (Heidelberg, Deutschland) erworben. Das Kupplungsreagenz 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid wurde von Carbolution Chemicals (St. Ingberg, Deutschland) verwendet. *p*-SCN-Bn-Deferoxamin wurde von Macrocyclics (Plano, Texas) bezogen. DBCO-PEG₄-NHS-Ester wurde von Jena Bioscience erworben. Succinimidy 3-(2-Pyridyldithio)Propionat (SPDP) wurde von Toronto Research Chemicals (TRC) (Toronto, Kanada) bezogen. Die Fluoreszenzfarbstoffe Oregon Green 488 Cadaverin, Alexa Fluor 647 NHS Ester, Alexa Fluor 647 DIBO Alkin sowie Texas Red Cadaverin wurden von Invitrogen (Carlsbad, USA) bezogen. 5/6-Carboxyrhodamin 110-PEG₃-Azid und 6-Methyl-Tetrazin-5-FAM stammen von Jena Bioscience (Jena, Deutschland). Die monoklonalen Antikörper aDEC205 und die entsprechende Isotypkontrolle IgG2a wurden von Bio X Cell (West Lebanon, USA) erworben. Der PC61 Klon (aCD25) wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe [REDACTED] (Institut für Immunologie, Mainz) bereitgestellt. Peptid-*N*-Glykosidase F und der Fast DNA Ladder wurden von New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) bezogen und bakterielle Transglutaminase von Zedira (Darmstadt, Deutschland). Folgende Nukleinsäuren wurden zur Polyplexbildung verwendet: pDNA (pGL3-Basic (4818 bp) und pGL3-Control (5256 bp) von Promega GmbH (Mannheim, Deutschland) sowie mRNA (Firefly Luciferase mRNA (1921 Basen) von TriLink BioTechnologies (San Diego, CA) und iVT Luc L2m2 mRNA (2135 Basen) von BioNTech AG (Mainz, Deutschland). Coomassie® Brilliantblau R-250 zur Färbung der SDS-Gele wurde von neoLab (Heidelberg, Deutschland) erworben. GelRed™ zum Färben der Agarosegele wurde von WWR erworben. Die Peptide LAH4-L1 sowie LAH4-L1-Cys wurden von Peptide Specialty Laboratories GmbH (PSL) (Heidelberg, Deutschland) hergestellt. Amicon® Ultra 0,5 mL und 2 mL Zentrifugenfilter mit einer Membrangröße von 100K (100 000 Da) wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Spectra/Por® 3 Dialyseschläuche von

Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) wurden in verschiedenen Membrangrößen verwendet (MWCO 1000 g/mol, 3500 g/mol und 14000 g/mol).

5.2 Mess- und Analysemethoden

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die Messung von ^1H -, ^{13}C - und ^{19}F -NMR-Spektren erfolgte an einem Bruker Avance II 400 (400 MHz) Spektrometer. 2D Spektren (COSY, HSQC, HMBC und DOSY) wurden an einem Bruker Avance III HD 400 (400 MHz) gemessen. Zur Auswertung der NMR-Spektren diente die Software MestReNova 10.0 der Firma Mestrelab Research Lab S.L. Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur und die chemische Verschiebung δ wurde in ppm angegeben. Als interne Referenz diente die literaturbekannte chemische Verschiebung der deuterierten Lösungsmittelsignale.^[248]

Gelpermeationschromatographie (GPC)

PPFMA-Reaktivesterpolymere wurden mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) in THF charakterisiert. Die Messungen wurden an einer modular aufgebauten Anlage der Firma Jasco durchgeführt, bestehend aus HPLC-Pumpe PU1580, Autosampler AS1555, UV-Detektor UV1575 und Brechungsindex-Detektor RI1530. Als Säulenmaterial diente hochvernetztes Polystyrol mit einer Porengröße von 10^2 , 10^4 und 10^6 Å. Zur Kalibration wurden Polystyrolstandards der Firma Polymer Standards Services (PSS) eingesetzt. Die Polymerproben wurden in einer Konzentration von ca. 2 mg/mL aufgetragen und bei Raumtemperatur mit einer Flussrate von 1 mL/min in THF vermessen. Als interner Standard diente Toluol.

Die Analyse von HPMa- und Lysinpolymeren erfolgte über GPC in Hexafluoroisopropanol (HFIP) mit einem Zusatz von Kaliumtrifluoressigsäure (3 g/L). Polymerproben wurden mit einer Konzentration von ca. 1,5 g/L bei einer Flussrate von 0,8 mL/min bei 40 °C vermessen und über einen RI-Detektor (G1362A RID) der Firma Jasco sowie einen UV-Detektor (UV-2075 Plus) der Firma Jasco detektiert. Die Säulen enthielten modifiziertes Kieselgel (PEG-Säulen) mit einer Partikelgröße von 7 μm und einer Porengröße von jeweils 100 und 1000 Å. Die Kalibration erfolgte mit PMMA-Standards der Firma PSS und als interner Standard diente ebenfalls Toluol. Zur Steuerung der Anlage und zur Auswertung der Messdaten wurde die Software WinGPC UniChrome 8.00 (PSS) verwendet.

Präparative Größenausschlusschromatographie (Wasser-SEC)

Die chromatographische Aufarbeitung der modifizierten Antikörperproben (Kapitel 3.4.1) erfolgte über eine Sephacryl S-100 HR (HIPrep 16/60) Säule von GE Helthcare. Des Weiteren bestand die Anlage aus einer PU-2086 Plus Pumpe von Jasco, einem UV-Detektor (UV-2077 Plus von Jasco) sowie einem RI-Detektor (RI-2031 Plus von Jasco). Als Elutionsmittel wurde PBS (pH 7,4) verwendet und die Flussrate betrug 0,5 mL/min. Die Aufnahme und Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software ChromPass von Jasco (Version 1.8.6.1).

Die chromatographische Aufarbeitung des Antikörper-Bürstenkonjugats (Kapitel 5.12.6) erfolgte über einer Sepharose 4 FF XK 16/70 Säule von GE Helthcare. Die Anlage bestand aus einer L-2310 LaChrom Elite Pumpe von Hitachi und einem UV-Detektor 2487 von Waters. Als Elutionsmittel wurde PBS (pH 7,4) mit einer Flussrate von 0,5 mL/min verwendet. Die Aufnahme und Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software Chromatographica.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Aufarbeitung von Dibenzocyclooctin-L-lysin (DBCO-Lys) erfolgte über eine semipräparative Luna C18(2) 10micro Säule von Phenomenex an einem LC-4000 HPLC System der Firma Jasco. Die Anlage bestand aus einer PU-4086 Pumpe (Jasco) und einem MD-4015 UV-Detektor (250 nm) (Jasco). Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit der Software JascoChromNAV 2.00.02. Als Elutionsmittel diente ein Gemisch aus Wasser und Acetonitril. Es wurde folgender Gradient gefahren: Start: Wasser/Acetonitril 80:20; 50:50 (0-30 min); 0:100 (30-35 min), 0:100 (35-50 min). Die Probe wurde in drei Ansätzen ($c = 50$ mg/mL) in Methanol zu jeweils 1 mL bei einer Flussrate von 10 mL/min chromatographisch aufgearbeitet. Die gesammelten Fraktionen bei einer Elutionszeit zwischen 22-25 min wurden vereinigt, Acetonitril am Rotationsverdampfer entfernt und die wässrige Probe lyophilisiert.

UV/VIS-Spektroskopie

Für die Aufnahme von UV/VIS-Spektren wurde ein V-630 Spektrometer der Firma JASCO verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der Software Spectra Manager 2.04. Zur Messung wurden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Antikörper Proben wurden in PBS (pH 7,4) vermessen, Polymerproben entsprechend in THF.

FT-IR-Spektroskopie

Infrarotmessungen wurden an einem FT/IR-4100 Spektrometer (Jasco Corporation) durchgeführt. Dieses ist mit einem ATR-Proben Tisch (MIRacle™, Pike Technologies) ausgestattet. Zur Auswertung wurde die Software Spectra Manager™ II (Jasco Corporation) verwendet.

Massenspektrometrie (MS)

Massenspektren mit Elektrospray-Ionisation (ESI-MS) wurden an einem Agilent 6545 QTOF-MS Spektrometer der Firma Agilent Technologies gemessen. Die Probenkonzentration betrug ca. 0,1 g/L in Lösungsmittelgemischen aus Methanol/Acetonitril und Wasser.

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Analytik der Antikörperproben erfolgte über SDS-PAGE. Hierfür wurden NuPAGE™ 4 - 12 % Bis Tris Proteingele, 20x Bolt™ MES SDS Laufpuffer und 4x LDS Probenpuffer von Thermo Fisher Scientific verwendet. Größenordnung der Proteinbanden erfolgte über den Proteinstandard Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard, ebenfalls von Thermo Fisher Scientific, der jeweils mit 10 µL auf jedes Gel aufgetragen wurde. Jeweils 1 µg Proteinprobe wurde auf ein Gesamtvolumen von 7,5 µL mit PBS aufgefüllt und jeweils mit 2,5 µL LDS Probenpuffer versetzt. Ein Gesamtprobenvolumen von 10 µL wurde jeweils auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese verlief bei 200 V für 30-40 min in einem Mini Gel Tank (XCell Sure Lock™ Mini von Thermo Fisher Scientific).

Agarose-Gelelektrophorese

Das Komplexierungsverhalten der kationischen P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymere mit anionischen Nukleinsäuren (pDNA, mRNA) wurde mit Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Dazu wurde ein 0,5 %-iges Agarosegel (0,8 g Agarose, 160 mL 1x TBE-Puffer) hergestellt, das zusätzlich 32 µL (0,02 vol-%) des Nukleinsäure-Interkalators GelRed enthielt. Die Proben wurden, wie unter Kapitel 5.9.1 beschrieben, vorbereitet und in einem Gesamtvolumen von 25 µL in die Geltasche aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 20-30 min bei 120 V durchgeführt. Anschließend erfolgte UV-Detektion bei 312 nm mit einem UST-20M-8E Bio View Transilluminator von Biostep.

Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS)

Hochaufgelöste Massenspektrometrie wurde in Kooperation mit [REDACTED] am Max-Planck-Institut für Polymerforschung (MPIP) Mainz durchgeführt.

Die Messung hochaufgelöster Massenspektren der Antikörperproben wurde an einem SYNAPT G2-Si Massenspektrometer (Waters Corp., Manchester, U.K.) mit Elektrospray-Ionisation (ESI) durchgeführt. Die generelle Kalibrierung erfolgte mit Clustern aus rotem Phosphor über Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) in einem Massenbereich von 100 - 10000 m/z. Während der Messung im ESI-Modus diente das MH^+ Signal von Leucin Enkephalin (556,2771 m/z) als Referenz (*lock mass*). Die Antikörpermessungen wurden bei einer Kapillarspannung von 3 kV, einer Knusspannung von 140 V und einem Quellenoffset von 100 V durchgeführt. Die Ionenquelle wurde mit einer Temperatur von 120 °C betrieben. Die Auswertung der erhaltenen Messdaten erfolgte mit der Software MassLynx V4.1. der Firma Waters. Die Dekonvolution der Daten wurde durch manuelle Zuordnung der unterschiedlichen Ladungszustände nach vorhergehender Baselinekorrektur, Glättung und Centroidierung der Spektren vorgenommen.

Jeweils 200 µg der unterschiedlichen DEC205-Antikörperproben (aDEC205 nativ, aDEC205 deglykosyliert und aDEC205-DBCO(Lys)) wurden über Spinfiltration (Amicon Ultra Zentrifugenfilter, 0,5 mL, MWCO 100K) mit 0,2 %-iger Ameisensäure in MP-Wasser gewaschen. Dieser Entsalzungsprozess wurde insgesamt 15-mal wiederholt, wobei das Filtrervolumen jeweils von 0,5 mL auf ca. 0,1 mL reduziert wurde. Die Antikörperproben wurden jeweils in einem Volumen von ca. 50 µL aus dem Filter zurückgewonnen und anschließend mit 50 µL eines Gemischs aus Acetonitril/Wasser (1:1) versetzt und für ca. 5 min im Ultraschallbad homogenisiert. Die Auftragung der Probe erfolgte über eine Spritzenpumpe bei einer Flussrate von 5 µL/min. Alle Lösungsmittel zur Probenvorbereitung wurden mit hohem Reinheitsgrad (LC/MS grade) eingesetzt: Acetonitril von Fluka (Ultra Chromasolv), Wasser von AppliChem sowie Ameisensäure von Fisher Scientific.

Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie (FCS)

FCS-Messungen fanden in Kooperation mit [REDACTED] (Betreuer [REDACTED], AG [REDACTED]) am Max-Planck-Institut für Polymerforschung (MPIP) Mainz statt.

Die Messungen wurden an einem kommerziellen FCS-Aufbau der Firma Zeiss durchgeführt. Dieser bestand aus einem ConfoCor 2-Modul und einem inversen Mikroskop (Axiovert 200), ausgestattet mit einem Zeiss C-Apochromat 40/1.2W Wasserimmersionsobjektiv. Die Anregung von Alexa Fluor 647-markierten Verbindungen erfolgte mit einem 633 nm Helium-Neon-Laser. Die Fluoreszenz wurde nach der Passage durch einen Langpass-Emissionsfilter (LP650) mittels einer Avalanche-Photodiode detektiert. Im Fall von Oregon Green 488- bzw. Carboxyrhodamin-110-N₃-

markierten Proben wurde die 488 nm-Laserlinie eines Argon-Ionen-Lasers verwendet sowie ein Langpass-Emissionsfilter (LP505) in den Messaufbau integriert. Als Probenkammern dienen Acht-Well-Polystyrolkammerdeckgläser der Firma Laboratory-Tek, Nalge Nunc International. Für jede Probe wurde eine Messreihe von zehn Messungen à zehn Sekunden durchgeführt. Die aufgenommenen zeitabhängigen Fluoreszenz-Intensitätsfluktuationen, die durch die Diffusion der fluoreszierenden Spezies durch das konfokale Observationsvolumen hervorgerufen werden, können über eine gemittelte Autokorrelationsfunktion dargestellt werden:

$$G(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta I(t) \cdot \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}$$

Theoretisch gilt für ein Ensemble an m verschiedenen, frei diffundierenden fluoreszierenden Spezies folgende analytische Form der Autokorrelationsfunktion:^[249]

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \sum_{i=1}^m \frac{f_i}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D,i}}\right) \cdot \sqrt{1 + \frac{\tau}{S^2 \cdot \tau_{D,i}}}}$$

Dabei ist N die gemittelte Anzahl an diffundierenden fluoreszierenden Teilchen im Observationsvolumen, $\tau_{D,i}$ entspricht der Diffusionszeit der i -ten Spezies, f_i ist der Anteil der Komponente i und S entspricht dem Strukturparameter, der definiert ist über $S = \frac{z_0}{r_0}$. Dabei beziehen sich z_0 und r_0 entsprechend auf die axiale und radiale Dimension des Konfokalvolumens. Weiterhin steht die Diffusionszeit $\tau_{D,i}$ in direktem Zusammenhang mit dem Diffusionskoeffizienten D_i über

$$D_i = \frac{r_0^2}{4 \cdot \tau_{D,i}}$$

Somit kann über den Fit der experimentell ermittelten Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ die Diffusionszeit und somit der Diffusionskoeffizient der fluoreszenzmarkierten Spezies bestimmt werden. Unter der Annahme, dass es sich um sphärische Partikel handelt, kann letztlich über das Stokes-Einstein-Gesetz der hydrodynamische Radius der Verbindung berechnet werden.

$$R_h = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D}$$

Dabei entspricht T der absoluten Temperatur, k_B der Boltzmann-Konstante und η der (dynamischen) Viskosität des verwendeten Lösungsmittels. Da der Wert für r_0 (radiale Dimension des Konfokalvolumens) vom optischen FCS-Aufbau abhängt, muss vor jeder Messung mit dem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff mit bekanntem Diffusionskoeffizienten als Referenzstandard kalibriert werden. Für die Anregung mit der 488 nm-Linie des Argon-Ionen-Lasers wurde Alexa Fluor 488 verwendet und

entsprechend für die 633 nm-Anregung des Helium-Neon-Lasers Alexa Fluor 647. Alle fluoreszenzmarkierten Antikörperproben wurden in PBS (pH 7,4) in einem Konzentrationsbereich von $c \sim 10^{-8}$ - 10^{-9} mol/L gemessen. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte entsprechend der Beschreibung in den jeweiligen Kapiteln über Amicon-Spinfiltration.

Dynamische Mehrwinkel-Lichtstreuung (DLS)

Dynamische Mehrwinkel-Lichtstreuung wurde in Kooperation mit [REDACTED] (AG [REDACTED]) am Institut für Physikalische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz gemessen.

Der instrumentelle Aufbau der DLS-Anlage bestand aus einem einphasigen He/Ne-Laser mit einer Leistung von 25 mW bei $\lambda = 632,8$ nm, einem ALV-CGS 8F SLS/DLS 5022F Goniometer mit acht gleichzeitig arbeitenden ALV 7004 Korrelatoren und acht QEAPD Avalanche-Photodioden zur Detektion. Alle Messungen wurden bei 20 °C durchgeführt. Die Proben wurden staubfrei über 0,2 μm Pall GHP Filter in zylindrische Quarzküvetten von Hellma filtriert, die zuvor mit destilliertem Aceton gereinigt wurden. Die über die Messung erhaltene Korrelationsfunktion der Partikel wurde biexponentiell gefittet. Der z-gemittelte Diffusionskoeffizient D_z wurde über Extrapolation des apparenten Diffusionskoeffizienten D_{app} für q (Streuvektor) = 0 erhalten. Unter Verwendung des Stokes-Einstein Gesetzes ergibt sich aus dem inversen z-Mittel der hydrodynamische Radius

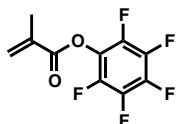
$$R_h = \langle R_h^{-1} \rangle_z^{-1}.$$

Dynamische Lichtstreuung (DLS) (Zetasizer)

Dynamische Lichtstreuung (DLS) wurde an einem Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) bei einem Winkel von 173° bei 25 °C gemessen. Das Gerät ist ausgestattet mit einem He/Ne-Laser für eine Anregung der Probe bei 633 nm. Zur Größenbestimmung wurden Einmalküvetten aus Polystyrol oder Polymethylmethacrylat (VWR, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die kumulierten Größen (hydrodynamische Durchmesser D_h), Polydispersitätsindex (PDI) und Größenverteilungshistogramme wurden basierend auf der Autokorrelationsfunktion der Proben über die Software berechnet. Die Vorbereitung der Polyplexproben erfolgte wie unter Kapitel 5.9.3 beschrieben.

5.3 Monomersynthese

5.3.1 Pentafluorphenylmethacrylat: PFPMA



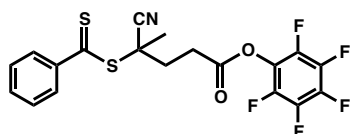
Die Synthese von PFPMA erfolgte nach Literatur.^[14] In einem Dreihalskolben wurden 19,87 g Pentafluorphenol (108 mmol; 1 eq) in 200 mL abs. DCM gelöst und mit 16,5 mL Triethylamin (119 mmol; 1,1 eq) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Argon geflutet und auf ca. 0 °C abgekühlt. Anschließend wurden 12,38 g Methacrylsäurechlorid (119 mmol; 1,1 eq) langsam zugetropft und die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde dreimal mit destilliertem Wasser extrahiert, die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde am Hochvakuum destilliert und 21,56 g Pentafluorphenylmethacrylat bei 27 °C (1,5·10⁻² mbar) als farblose Flüssigkeit erhalten (85,5 mmol, 79 %). Zusätzlich wurde säulenchromatographisch (SiO₂, 100 % Petrolether) aufgearbeitet (R_f = 0,39; Y = 69 %).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6,45 (s, 1H, C=CH₂-*trans*); 5,91 (s, 1H, C=CH₂-*cis*); 2,09 (s, 3H, -CH₃).

¹⁹F-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -153,95 (d, 2F, *o*-ArF); -159,40 (t, 1F, *p*-ArF); -163,68 (dd, 2F, *m*-ArF).

5.4 Synthese Makromolekularer Kettentransferreagenzien: Poly-L-Lysin(Boc)-CTA

5.4.1 4-Cyano-4-((Thiobenzoyl)-Sulfanyl)-Pentansäure-Pentafluorphenylester: PFP-CTA



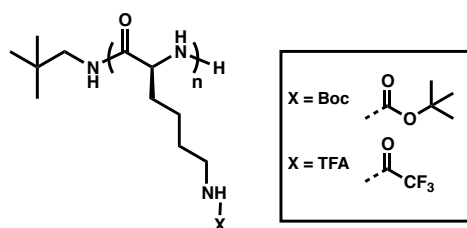
Die Synthese des PFP-CTAs erfolgte nach Literatur.^[250] In einem Rundkolben wurden 1,74 g 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)-sulfanyl)-pentansäure (Säure-CTA) (6,25 mmol; 1 eq) in 50 mL abs. THF gelöst. Unter Argonatmosphäre wurden 1,73 mL Triethylamin (1,25 mmol; 2 eq) sowie 3,5 g Pentafluorphenyltrifluoacetat (1,25 mmol; 2 eq)

zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 50 mL Dichlormethan aufgenommen. Die organische Phase wurde dreimal mit destilliertem Wasser extrahiert, über MgSO_4 getrocknet und das Lösemittel nahezu vollständig verdampft. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , Petrol ether/Ethylacetat 15:1) aufgearbeitet. Lösemittelrückstände wurden am Hochvakuum entfernt und es wurden 2,17 g PFP-CTA als rot-pinkfarbener Feststoff erhalten ($R_f = 0,25$; $Y = 88\%$).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7,94 (d, 2H, *m*-ArH); 7,59 (t, 1H, *p*-ArH); 7,41 (t, 2H, *o*-ArH); 2,52-3,09 (m, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 1,99 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -153,67 (d, 2F, *o*-ArF); -158,39 (t, 1F, *p*-ArF); -162,99 (dd, 2F, *m*-ArF).

5.4.2 Polymerisation von *N*- ϵ -(Boc/TFA)-L-Lysin-*N*-Carboxyanhydrid: Poly-L-Lysin(Boc/TFA)



Die Synthese von Poly(*N*- ϵ -*tert*-butyloxycarbonyl-L-lysine): $\text{P}(\text{Lys}(\text{Boc}))$ ^[217] und Poly(*N*- ϵ -trifluoracetyl-L-lysine): $\text{P}(\text{Lys}(\text{TFA}))$ ^[38] aus den entsprechenden NCA-(*N*-Carboxyanhydrid) Monomeren erfolgte nach Literatur und wurde an manchen Stellen leicht abgewandelt. In einer typischen Reaktion wurden in einen unter Vakuum ausgeheizten Schlenkkolben mit Rührfisch unter Stickstoffgegenstrom 1,1347 g *N*- ϵ -*tert*-Butyloxycarbonyl(Boc)-L-lysine-*N*-carboxyanhydrid (Lys(Boc)-NCA) (4,17 mmol) eingewogen und für weitere 30 min am Hochvakuum getrocknet. Durch Zugabe von 10 mL abs. DMF unter Stickstoffgegenstrom wurde der NCA in Lösung gebracht. In einem separaten Schnappdeckelglas wurde eine Stammlösung des Initiators Neopentylamin in abs. DMF angesetzt ($c = 0,139$ mol/L). 1 mL dieser Lösung (12,1 mg bzw. 16,3 μL ; 0,139 mmol Neopentylamin) wurden direkt unter Stickstoffgegenstrom über eine Spritzenkanüle zur Monomerlösung gegeben. Die Polymerisation erfolgte im Kryostaten bei 10 °C. Der zur Schlenklinie geöffnete Kolben ermöglichte das Austreten von entstehendem CO_2 und verhinderte gleichzeitig das Eindringen von Verschmutzungen. Die Reaktionskontrolle erfolgte über IR-Spektroskopie, wobei die Abnahme bzw. das vollständige Verschwinden der beiden NCA-Carbonylbanden bei 1853 cm^{-1} und 1786 cm^{-1} detektiert wurde. Nach 2 d war der Umsatz vollständig und

die Polymerlösung wurde in kaltem destilliertem Diethylether gefällt und bei 4500 rpm bei 4 °C für ca. 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Rückstand zwei weitere Male in Diethylether unter Ultraschall resuspendiert und anschließend zentrifugiert. Zum Schluss wurde der Rückstand vorsichtig durch Luftstrom getrocknet, in wenig Methanol aufgenommen und in MP-Wasser gefällt und lyophilisiert. P(Lys(Boc)) wurde als farbloser Feststoff erhalten (717 mg; Y = 75 %).

Poly(*N*- ϵ -*tert*-butyloxycarbonyl-L-lysin):P(Lys(Boc))

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 8,23-7,90 (br, (1nH), -NH-CO-CH-); 6,67-6,33 (br, (1nH), -NH-CO-O-C(CH₃)₃); 4,21-3,80 (br, (1nH), -CO-CH-NH-); 2,86 (br, (2nH), -CH₂-NH-CO-C(CH₃)₃); 1,78-1,36 (br, (15nH), -CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH- und -NH-CO-O-C(CH₃)₃); 0,83-0,81 (9H, -CH₂-C(CH₃)₃).

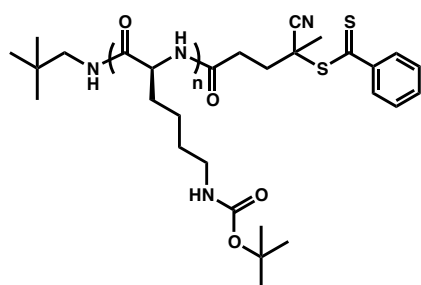
In Analogie wurde Poly(*N*- ϵ -trifluoracetyl-L-lysin) aus *N*- ϵ -Trifluoracetyl-L-lysin-*N*-carboxyanhydrid hergestellt. Abweichend wurde die Polymerisation bei einer Temperatur von 0 °C durchgeführt.

Poly(*N*- ϵ -trifluoracetyl-L-lysin): P(Lys(TFA))

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 9,34-9,30 (br, (1nH), -NH-CO-CF₃); 8,35-7,76 (br, (1nH), -NH-CH-CO-); 4,21-3,83 (br, (1nH), -CO-CH-NH-); 3,13 (br, (2nH), -CH₂-NH-COCF₃); 1,87-1,32 (br, (6nH), -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-COCF₃); 0,83 (9H, -CH₂-C(CH₃)₃).

¹⁹F-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = -75,85 (CF₃).

5.4.3 Poly-L-Lysin(Boc)-CTA



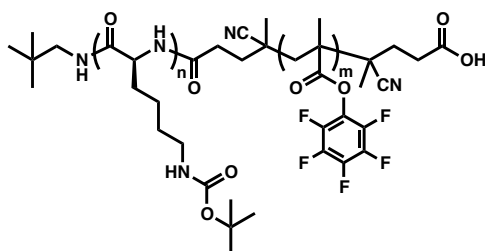
Die Synthese des Poly-L-lysin(Boc)-CTAs erfolgte nach Literatur^{[87][216]}. In einem mit Argon geflutetem Rundkolben wurden 500 mg ($7,98 \cdot 10^{-5}$ mol; 1 eq) P(Lys(Boc)) vorgelegt und mit 5 mL abs. NMP in Lösung gebracht. In einem separaten Kolben wurden 71,1 mg ($1,60 \cdot 10^{-4}$ mol; 2 eq) PFP-CTA (siehe Kapitel 5.4.1) sowie 67,9 mg ($3,19 \cdot 10^{-4}$ mol; 4 eq) *N,N,N',N'*-Tetramethyl-1,8-Naphthalindiamin in 1,5 mL abs. NMP gelöst und unter Argongegenstrom über eine Spritzenkanüle zur Polymerlösung getropft. Die Reaktion erfolgte unter Rühren bei Raumtemperatur über Nacht. Im

nächsten Schritt wurde das Lösemittel am Hochvakuum entfernt und der Rückstand in wenig TFE aufgenommen. Zur Abtrennung des Überschusses an PFP-CTA wurde in kaltem, destilliertem Diethylether gefällt. Der etherische Überstand wurde verworfen, das Präzipitat in wenig TFE aufgenommen und säulenchromatographisch (SiO_2 , Ethylacetat/Methanol 10:1 (50 mL); 1:1 (30 mL); 1:2 (30 mL)) aufgearbeitet. Alle rosafarbenen Fraktionen wurden vereint und die Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in wenig TFE aufgenommen und in MP-Wasser gefällt und lyophilisiert. 381,2 mg P(Lys(Boc))-CTA wurde als rosafarbener Feststoff erhalten ($5,84 \cdot 10^{-5}$ mol; $Y = 73 \%$).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 8,22 (br, (1nH), -NH-CO-CH-); 7,93 (d, 2H, *o*-ArH); 7,70 (t, 1H, *p*-ArH); 7,51 (t, 2H, *m*-ArH); 6,67-6,33 (br, (1nH), -NH-CO-O-C(CH_3)₃); 4,16-3,78 (br, (1nH), -CO-CH-NH-); 2,87 (br, (2nH), -CH₂-NH-CO-C(CH_3)₃); 1,93-1,25 (br, (15nH), -CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂- und -NH-CO-O-C(CH_3)₃); 0,84 (9H, -CH₂-C(CH_3)₃).

5.5 Synthese von P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymeren

5.5.1 RAFT-Polymerisation von PFPMA: P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA)



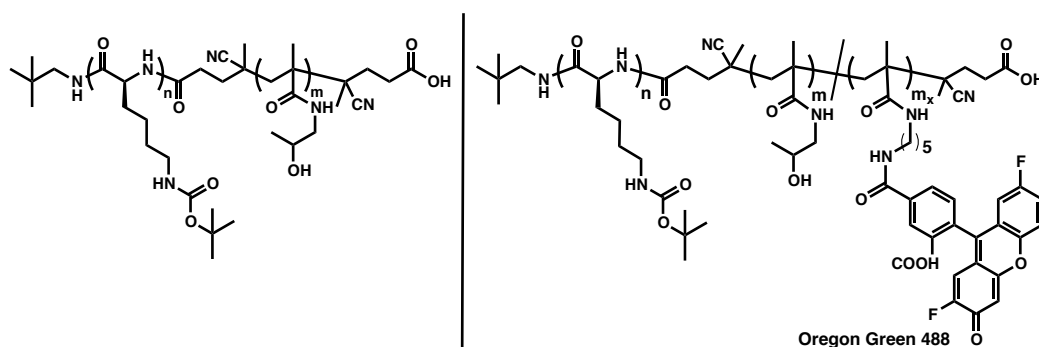
Die Synthese des P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA) Vorläufer-Blockcopolymeren mit anschließender Entfernung der Dithiobenzoatendgruppe erfolgte nach Literatur.^[216] In einem typischen Polymerisationsansatz wurden 42,3 mg ($5,51 \cdot 10^{-6}$ mol, 1 eq) P(Lys(Boc))-CTA in einem Schlenkkolben vorgelegt und mit 0,8 mL TFE und 4 mL abs. Dioxan in Lösung gebracht. 500 mg ($1,98 \cdot 10^{-3}$ mol, 360 eq) Pentafluorphenylmethacrylat (PFPMA Monomer) und 0,301 mg ($1,83 \cdot 10^{-6}$ mol, 1/3 eq) des Initiators Azobisisobutyronitril (AIBN) wurden über eine Stammlösung in abs. Dioxan unter Stickstoffgegenstrom hinzugefügt. Nach drei *freeze-pump-thaw*-Zyklen zum Entgasen wurde die Polymerisation für 2 d bei 60 °C durchgeführt und der Umsatz über $^{19}\text{F-NMR}$ -Spektroskopie ermittelt. Die Reaktionslösung wurde dreimal in *n*-Hexan gefällt und bei 4 °C für 10-15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das

Präzipitat in einer Mischung aus TFE/Dioxan (1:8) gelöst. Anschließend wurde der Rückstand bei 40 °C unter Vakuum getrocknet und es wurden 184 mg ($3,79 \cdot 10^{-6}$ mol) P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA)-CTA mit Dithioesterendgruppe als rosafarbener Feststoff erhalten.

Zur Entfernung der Dithiobenzoatgruppe wurden 150 mg ($3,09 \cdot 10^{-6}$ mol) P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA)-CTA in einer 1:8 Mischung aus TFE und Dioxan mit einem Überschuss von 22 mg ($3,73 \cdot 10^{-5}$ mol, 25 eq) 4,4'-Azobis(4-cyanovaleriansäure) ACVA umgesetzt. Die Reaktion erfolgte bei 85 °C für 4 h. Anschließend wurde die Polymerlösung drei Mal in einem Gemisch aus n-Hexan/Diethylether (2:1) gefällt und das Präzipitat bei 40 °C im Vakuum getrocknet. Es wurden 120 mg ($2,48 \cdot 10^{-6}$ mol, 80 %) P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA) als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): [ppm] = 8,21 (br, (1nH), -NH-CH-CO-); 5,15 (br, (1nH), -NH-CO-O-C(CH₃)₃); 3,84 (br, (1nH), -CO-CH-NH-); 3,08 (br, (2nH), -CH₂-NH-CO-O-C(CH₃)₃); 2,40-1,91 (br, (2mH), -CH₂-C-CH₃); 1,61-1,27 (br, (15nH) -CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH- und -NH-CO-O-C(CH₃)₃, (3mH) -CH₂-C-CH₃); 0,88 (9H, -CH₂-C(CH₃)₃).

5.5.2 Polymeranaloge Umsetzung zu P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)



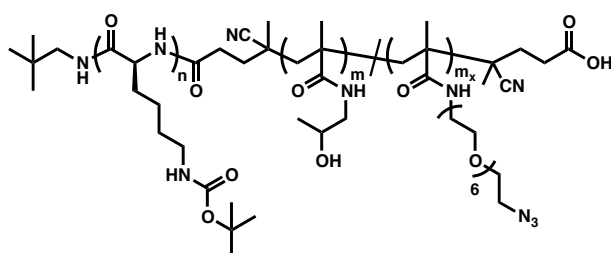
Die Synthese des P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer wurde der Literatur entnommen.^[216] Optional wurde eine Fluoreszenzmarkierung mit Oregon Green 488 Cadaverin des P(HPMA)-Blocks vorgenommen.^[216] 50 mg ($1,03 \cdot 10^{-6}$ mol, 1 eq) des P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA) Reaktivester-Blockcopolymer wurden in einen mit Stickstoff gefluteten Schlenk Kolben vorgelegt und in einer Mischung aus 2 mL abs. Dioxan und 0,5 mL abs. DMSO in Lösung gebracht. Unter Stickstoffgegenstrom wurden 60,1 µL Triethylamin ($4,34 \cdot 10^{-4}$ mol, 421 eq) hinzugefügt. Zur Herstellung fluoreszenzmarkierter Blockcopolymer wurden 0,83 mg OG488 Cadaverin ($1,67 \cdot 10^{-6}$ mol, 1 mol-% des PFPMA-Blocks) in einer Stammlösung in abs. DMSO ($c = 2,5$ g/L) zugegeben und bei 35 °C für 4 - 5 h zur Reaktion gebracht. Anschließend wurden 26 µL ($3,34 \cdot 10^{-4}$ mol, 324 eq) 2-Hydroxypropylamin (HPA) zugesetzt und die Reaktionslösung für 2 d bei 35 °C gerührt. Um einen vollständigen Umsatz des PFPMA-Reaktivesterblocks zu

sicherzustellen, wurde nach einem Tag mit zusätzlichen 26 μL ($3,34 \cdot 10^{-4}$ mol, 324 eq) HPA abgesättigt. Die Umsatzkontrolle erfolgte über ^{19}F -NMR-Spektroskopie. Anschließend wurde die Reaktionslösung in kaltem destilliertem Diethylether gefällt und für 10-15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in DMSO aufgenommen, gegen MP-Wasser dialysiert (MWCO 14000 g/mol) und anschließend lyophilisiert. Es wurden 20,5 mg (77 %) P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA) als farbloser Feststoff (bzw. orangefarbener Feststoff bei OG488-Markierung) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): [ppm] = 8,34-8,08 (br, (1nH), -NH-CH-CO-); 7,58-6,98 (br, (1mH), -CO-NH-CH₂-); 6,76-6,51 (br, (1nH), -NH-CO-O-C(CH₃)₃); 4,71 (br, (1mH), -CH₂-OH); 3,66 (br, (1mH/1nH), CH₃-CH-CH₂-/-CO-CH-NH-); 2,88 (br, (2nH/2mH), -CH₂-NH-CO-O-C(CH₃)₃/-CO-NH-CH₂-); 1,34 (9H, -NH-CO-O-C(CH₃)₃); 1,00 (br, (3mH), CH₃-C-CO-NH-); 2,22-0,65 (br, (6nH), -CH-CH₂- CH₂- CH₂- CH₂-NH-) und (2mH), CH₃-C-CH₂-).

5.5.3 Azidfunktionalisierung von P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)

5.5.3.1 Statistische Azidfunktionalisierung zu P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(stat)

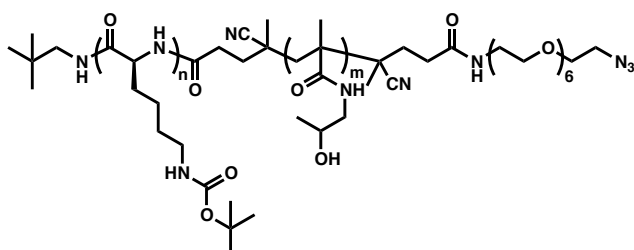


Die Synthese von P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) und der entsprechend OG488-markierten Blockcopolymeren P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(stat)_{OG488} erfolgte nach Literatur.^[216] 50 mg ($1,03 \cdot 10^{-6}$ mol, 1 eq) P(Lys(Boc))-*b*-P(PFPMA) wurden in einen mit Stickstoff gefluteten Schlenkkolben vorgelegt und in einer Mischung aus 2 mL abs. Dioxan und 0,5 mL abs. DMSO in Lösung gebracht. Unter Stickstoffgegenstrom wurden 60,1 μL Triethylamin ($4,34 \cdot 10^{-4}$ mol, 421 eq) hinzugefügt. Zur Herstellung fluoreszenzmarkierter Blockcopolymeren wurden 0,83 mg OG488 Cadaverin ($1,67 \cdot 10^{-6}$ mol, 1 mol-% der PFPMA-Wiederholungseinheiten) in einer Stammlösung in abs. DMSO ($c = 2,5$ g/L) zugegeben und bei 35 °C für 4-5 h zur Reaktion gebracht. Anschließend wurden 8,78 mg ($2,51 \cdot 10^{-6}$ mol, 15 mol-% der PFPMA-Wiederholungseinheiten) NH₂-PEG₆-N₃ in einer Stammlösung in abs. DMSO hinzugefügt und bei 35 °C über Nacht (ca. 12-15 h) gerührt. Zum Schluss wurde die Reaktionslösung mit 26 μL ($3,34 \cdot 10^{-4}$ mol, 324 eq) HPA versetzt und nach einem Tag mit der gleichen Menge ein weiteres Mal gequenchet (vgl. Kapitel 5.5.2). Die vollständige Umsetzung des

PPF-Reaktivesterblocks durch Aminolyse mit HPA konnte nach 2 d bei 35 °C über ^{19}F -NMR-Spektroskopie bestätigt werden. Die Reaktionslösung wurde in kaltem destilliertem Diethylether gefällt und für 10-15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in DMSO aufgenommen, gegen MP-Wasser dialysiert (MWCO 14000 g/mol) und anschließend lyophilisiert. Es wurden 20,5 mg (77 %) P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)-N₃(stat) als farbloser Feststoff (bzw. orangefarbener Feststoff bei OG488-Markierung) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-*d*₆): [ppm] = 8,35-8,01 (br, (1nH), -NH-CH-CO-); 7,33-7,19 (br, (1mH), -CO-NH-CH₂-); 6,65-6,31 (br, (1nH), -NH-CO-O-C(CH₃)₃); 4,68 (br, (1mH), -CH₂-OH); 3,66 (br, (1mH), CH₃-CH-CH₂-); 3,59 (br, (2m_xH), -NH-CH₂-CH₂-O-); 3,51 (br, (20m_xH), -NH-CH₂-CH₂-O-(CH₂-CH₂-O)₅-CH₂-CH₂-N₃); 3,38 (br, (2m_xH), N₃-CH₂-CH₂-O-); 2,87 (br, (2nH/2mH), -CH₂-NH-CO-O-C(CH₃)₃/-CO-NH-CH₂-); 1,34 (9H, -NH-CO-O-C(CH₃)₃); 1,00 (br, (3mH), CH₃-C-CO-NH-); 2,14-0,67 (br, (6nH), -CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH- und (2mH), CH₃-C-CH₂-).

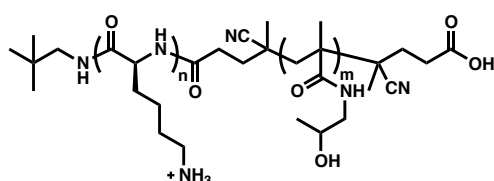
5.5.3.2 Azidfunktionalisierung der Endgruppe zu P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)-N₃(end)



30 mg ($0,98 \cdot 10^{-6}$ mol, 1 eq) des unter Kapitel 5.5.2 gebildeten Blockcopolymers P(Lys(Boc))-b-P(HPMA) mit Carboxylendgruppe wurden in 4 mL abs. DMF unter Stickstoffatmosphäre gelöst und unter Eiskühlung auf 0 °C abgekühlt. Dann wurden 2,7 μL ($19,6 \cdot 10^{-6}$ mol, 20 eq) Triethylamin sowie 3,77 mg ($19,6 \cdot 10^{-6}$ mol, 20 eq) EDC·HCl in einer Stammlösung in abs. DMF unter Stickstoffgegenstrom zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 30 min bei 0 °C wurden 2,65 mg ($19,6 \cdot 10^{-6}$ mol, 20 eq) HOBt in einer DMF-Stammlösung zur Reaktionslösung hinzugefügt. Nach weiteren 30 min bei 0 °C erfolgte die Zugabe von 6,88 mg ($19,6 \cdot 10^{-6}$ mol, 20 eq) NH₂-PEG₆-N₃ und die Reaktion wurde für 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Schließlich wurde über Dialyse (MWCO 3500 g/mol) gegen wässrige 5 %-ige Zitronensäure, gesättigte Natriumhydrogencarbonat Lösung und letztlich gegen MP-Wasser aufgereinigt. Nach Lyophilisierung wurden 21,6 mg (72 %) P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)-N₃(end) als farbloser Feststoff (bzw. orangefarbener Feststoff bei OG488-Markierung) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): [ppm] = 8,35-8,01 (br, (1nH), -NH-CH-CO-); 7,33-7,19 (br, (1mH), -CO-NH-CH₂-); 6,65-6,31 (br, (1nH), -NH-CO-O-C(CH₃)₃); 4,68 (br, (1mH), -CH₂-OH); 3,66 (br, (1mH), CH₃-CH-CH₂-); 3,59 (br, (2m_xH), -NH-CH₂-CH₂-O-); 3,51 (br, (20m_xH), -NH-CH₂-CH₂-O-(CH₂-CH₂-O)₅-CH₂-CH₂-N₃); 3,38 (br, (2m_xH), N₃-CH₂-CH₂-O-); 2,87 (br, (2nH/2mH), -CH₂-NH-CO-O-C(CH₃)₃/-CO-NH-CH₂-); 1,34 (9H, -NH-CO-O-C(CH₃)₃); 1,00 (br, (3mH), CH₃-C-CO-NH-); 2,14-0,67 (br, (6nH), -CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH- und (2mH), CH₃-C-CH₂-).

5.5.4 Entfernen der Boc-Schutzgruppe



Für die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe in den OG488-markierten und nicht-markierten P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA), P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) und P(Lys(Boc))-*b*-P(HPMA)-N₃(end) Blockcopolymeren wurde nach Literatur verfahren.^[216] Jeweils ca. 15 mg der oben genannten Blockcopolymeren wurden in 1M HCl in 2 mL Dioxan/MeOH gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösungsmittel wurden am Rotationsverdampfer entfernt. Danach wurde dreimal mit Toluol und anschließend dreimal mit DCM azeotrop destilliert. Der Rückstand wurde in DMSO gelöst und gegen MP-Wasser dialysiert (MWCO 3500 g/mol). Nach Lyophilisierung wurden ca. 10,5 g (~ 65 %) des entsprechenden entschützten Blockcopolymeren als farblos (bzw. orangefarbener Feststoff bei OG488-Markierung) erhalten.

P(Lys)-*b*-P(HPMA)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): [ppm] = 7,40 (br, (1mH), -NH-CH-CO-); 4,68 (br, (1mH), -CH₂-OH); 3,67 (br, (1mH), CH₃-CH-CH₂-); 2,92 (br, (2nH/2mH), -CH₂-NH-CO-O-C(CH₃)₃/-CO-NH-CH₂-); 1,02 (br, (3mH), CH₃-C-CO-NH-); 2,04-0,57 (br, (6nH), -CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH- und (2mH), CH₃-C-CH₂-).

P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(stat) und P(Lys)-*b*-P(HPMA)-N₃(end)

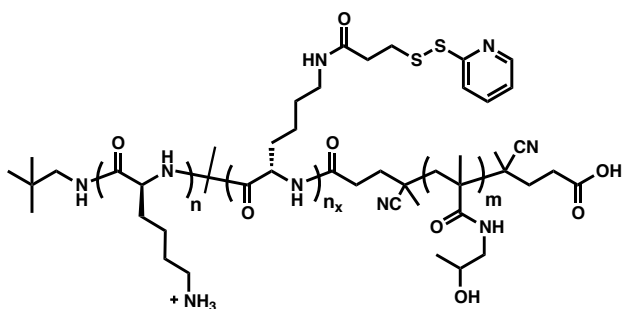
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): [ppm] = 8,33-8,00 (br, (1nH), -NH-CH-CO-), 7,65-7,10 (br, (1mH), -CO-NH-CH₂-), 4,70 (br, (1mH), (-CH-OH), 3,67-3,37 (br, (1mH), CH₃-CH-CH₂- und (14m_xH), -NH-CH₂-CH₂-O- und -NH-CH₂-CH₂-O-(CH₂-CH₂-O)₅-CH₂-CH₂-N₃ und N₃-CH₂-CH₂-O-), 2,92 (br, (2nH/2mH), -CH₂-NH-CO-O-C(CH₃)₃/-CO-NH-CH₂-), 2,01-0,84 (br, (3mH), CH₃-C-CO-NH- und (6nH) -CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-) und (2mH) CH₃-C-CH₂-).

5.6 Qualitativer Nachweis der Azidendgruppe in P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)-N₃(end)

Positivkontrolle: In einem Eppendorfgefäß wurden 31,8 µg ($7,20 \cdot 10^{-8}$ mol, 1 eq) Dibenzocyclooctin-PEG₄-N-hydroxysuccinimidylester (DBCO-PEG₄-NHS) in einer Stammlösung in DMSO ($c = 10$ g/L) mit 49,9 µg ($7,20 \cdot 10^{-8}$ mol, 1 eq) Texas Red Cadaverin in DMSO ($c = 2,5$ g/L) unter Lichtausschluss über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurden 2,2 mg P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)-N₃(end) in einer DMSO-Lösung hinzugefügt und für 3 d unter Lichtausschluss gerührt.

Negativkontrolle: In einem Eppendorfgefäß wurden 49,9 µg ($7,20 \cdot 10^{-8}$ mol, 1 eq) des unmodifizierten Fluoreszenzfarbstoffs Texas Red Cadaverin in einer DMSO Stammlösung ($c = 2,5$ g/L) mit 2,2 mg P(Lys(Boc))-b-P(HPMA)-N₃(end) unter denselben Reaktionsbedingungen umgesetzt. Beide Ansätze wurden 3 d über Dialyse gegen MP-Wasser/Methanol (1:1) (MWCO 3500 g/mol) aufgereinigt.

5.7 Synthese von P(Lys)-co-P(Lys-PDP)-b-P(HPMA)

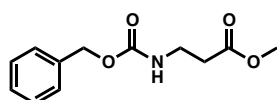


10 mg entschütztes P(Lys)-b-P(HPMA) Blockcopolymer (siehe Kapitel 5.5.4) mit einem Blocklängenverhältnis von 1:5 (33:165) ($1,17 \cdot 10^{-5}$ mol Lysineeinheiten, 1 eq) wurden in 0,5 mL abs. DMF in einem Schlenkkolben vorgelegt und mit Argon geflutet. Anschließend wurden 2 µL *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) ($1,17 \cdot 10^{-5}$ mol, 1 eq) zugesetzt. In einem separaten Kolben wurden 2,45 mg Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat (SPDP) ($7,83 \cdot 10^{-6}$ mol, 0,4 eq und unter Berücksichtigung von 40 % hydrolysiertem NHS Ester im Edukt) in 0,5 mL abs. DMF gelöst und unter Argon gegenstrom zur Polymerlösung gegeben. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur unter Rühren für 24 h. Danach wurde die Polymerlösung zweimal in kaltem Diethylether gefällt und das Präzipitat in DMSO aufgenommen. Nach anschließender Dialyse (MWCO 3500 g/mol) gegen MP-Wasser und Lyophilisierung wurden 11,4 mg (quant.) P(Lys)-co-P(Lys-PDP)-b-P(HPMA) als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): [ppm] = 8,44-7,74 ($4n_xH$, Pyridyl- H); 7,31 (br, (1mH), -NH-CH-CO-); 4,70 (br, (1mH), -CH₂-OH); 3,67 (br, (1mH), CH₃-CH-CH₂-); 2,97 (br, (2nH/2mH), -CH₂-NH-CO-O-C(CH₃)₃-CO-NH-CH₂-); 1,01 (br, (3mH), CH₃-C-CO-NH-); 1,98-0,81 (br, (6nH), -CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH- und (2mH), CH₃-C-CH₂-).

5.8 Synthese des Hydrazon-CTAs

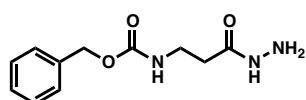
5.8.1 3-(((Benzyloxy)Carbonyl)Amino)Propansäuremethylester: (Z)- β -Alanin-Methylester



Die Synthese von (Z)- β -Alanin-methylester erfolgte nach Literatur.^[251] In einem 100 mL Dreihalskolben wurden unter Stickstoffgegenstrom 5,0 g (22,40 mmol, 1 eq) (Z)- β -Alanin in 50 mL (1,23 mol, 55 eq) abs. Methanol vorgelegt und mit 0,24 mL (4,48 mmol, 0,2 eq) konz. H₂SO₄ versetzt. Die Reaktion wurde unter Argonatmosphäre für ca. 1h unter Rückfluss erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung (DC-Kontrolle in CHCl₃/MeOH (4:1)) wurde die Reaktionslösung am Rotationsverdampfer bis auf ca. 20 mL eingeeengt. Der methanolische Rückstand wurde mit wenig MP-H₂O versetzt und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend dreimal mit MP-H₂O extrahiert und über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. 5,1 g (21,5 mmol, 96 %) (Z)- β -Alanin-methylester wurden als gelbes Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7,35 (m, 5H, ArH); 5,30 (s,(br), 1H, -NH-); 5,09 (s, 2H, -CH₂-O-); 3,68 (s, 3H, -O-CH₃); 3,47 (q, 2H, -NH-CH₂-); 2,55 (t, 2H, -CH₂-COO-).

5.8.2 3-(((Benzyloxy)Carbonyl)Amino)Propansäurehydrazid: (Z)- β -Alanin-Hydrazid



Die Darstellung des (Z)- β -Alanin-hydrazids erfolgte nach Literatur.^[251] In einem 100 mL Dreihalskolben wurden 1,64 mL (33,72 mmol, 4 eq) Hydrazinhydrat (64 %-ige Lsg.) in 20 mL Ethanol vorgelegt. Über einen Tropftrichter wurden 2,0 g (Z)- β -Alanin-methylester (8,43 mmol, 1 eq) gelöst in 20 mL Ethanol unter Stickstoffgegenstrom

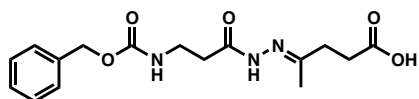
langsam über 20 min zugetropft. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Die entstandene Suspension wurde für weitere 30 min unter Rückfluss erhitzt, wobei der Niederschlag wieder in Lösung geht. Nach Einengen der Reaktionslösung unter Stickstoffstrom wurde kalt abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 8 mL 1N HCl durch Zugabe von 1,5 g Natriumacetat in Lösung gebracht und nach leichtem Erwärmen fiel ein farbloser Niederschlag aus. Nach kurzem Stehen (10 min) bei Raumtemperatur wurde der Niederschlag abzentrifugiert.

Zusätzlich wurde das wässrige Dekantat mit dem ethanolischen-Dekantat der Reaktionslösung vereint und über Nacht bei 4 °C gekühlt. Der ausgefallene Niederschlag wurde mit Ethanol unter Hitze in Lösung gebracht und anschließend in der Kälte (4 °C) auskristallisiert (2-3 Tage). Nach Trocknen am Hochvakuum wurden insgesamt 1,29 g (5,44 mmol, 65 %) (Z)-β-Alanin-hydrazid als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, MeOD): δ [ppm] = 7,32 (m, 5H, ArH); 5,05 (s, 2H, -CH₂-O-); 3,38 (t, 2H, -NH-CH₂-); 2,34 (t, 2H, -CH₂-COO-).

ESI-MS: [m/z] = 260,09 [M+Na]⁺, (ber. 260,11); C₁₁H₁₅N₃O₃ (237,11 g/mol).

5.8.3 (E)-4-(2-(3-(((Benzyloxy)Carbonyl)Amino)Propanyl)Hydrazono)Pentansäure: (Z)-β-Alanin-Hydrazon



Die Synthese des (Z)-β-Alanin-hydrazons erfolgte nach Literatur^[252] und wurde entsprechend für das Edukt Hydrazid (Kapitel 5.8.2) modifiziert. In einem 100 mL Dreihalskolben wurden 2,0 g (8,43 mmol, 1 eq) (Z)-β-Alanin-hydrazid in 40 mL Ethanol vorgelegt. 0,95 mL (9,27 mmol, 1,1 eq) 4-Oxo-pentansäure (Lävulinsäure) wurden separat in 10 mL Ethanol gelöst und der Reaktion zugefügt. Nach ca. 20 min unter Rühren bei Raumtemperatur gingen alle Reaktanden in Lösung. Die Reaktion wurde unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Der farblose Niederschlag wurde über eine G4-Fritte filtriert und mit wenig kaltem Ethanol gewaschen. Nach Trocknen am Hochvakuum wurden 1,9 g (5,67 mmol, 67 %) (Z)-β-Alanin-hydrazon als farbloser Feststoff erhalten.

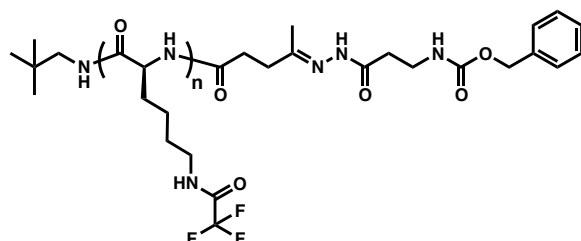
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 10,12 (s, 1H, -NH-N-); 7,34 (m, 5H, ArH); 7,16 (s, 1H, -NH-CH₂-); 5,01 (s, 2H, -CH₂-O-); 3,24 (t, 2H, -NH-CH₂-); 2,66 (t, 1H, -NH-CH₂-CH₂-); 2,45-2,38 (m, 5H, -NH-CH₂-CH₂- und -CH₂-CH₂-COOH); 1,84-1,82 (m, 3H, -N=C-CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 174,00 (-C=O-NH-N-); 166,62 (-CH₂-COOH); 155,99 (-C=O-O-CH₂-); 150,98 (-C=N-); 137,23 (-Ar-C-CH₂-); 128,69 und 127,73 (5C, Ar-C); 65,19 (-CH₂-O-); 37,08 (-NH-CH₂-); 34,34 (-NH-CH₂-CH₂-); 33,05 (-CH₂-CH₂-COOH); 29,84 (-CH₂-CH₂-COOH); 16,78 (-N=C-CH₃).

¹⁵N-NMR (40 MHz, (HMBC), DMSO-d₆): δ [ppm] = 310-301 (-N=C); 175-169 (-NH-N-); 84-82 (-O-CO-NH-).

ESI-MS: [m/z] = 358,16 [M+Na]⁺, (ber. 358,15); 693,33 [2M+Na], (ber. 693,30); C₁₆H₂₁N₃O₅ (335,15 g/mol).

5.8.4 Poly-L-Lysin(TFA)-Hydrazon(Z)

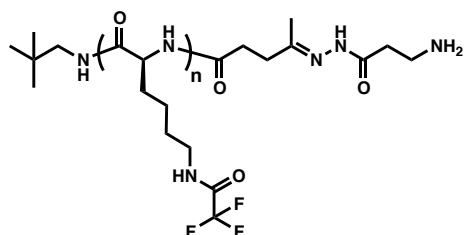


In einem Schlenkkolben wurden unter Stickstoffgegenstrom 700 mg ($8,82 \cdot 10^{-5}$ mol, 1 eq) P(Lys(TFA)) (vgl. Kapitel 5.4.2) in 4 mL abs. DMF in Lösung gebracht und mit 75 μ L ($4,41 \cdot 10^{-4}$ mol, 5 eq) DIPEA versetzt. Separat wurden 148 mg ($4,41 \cdot 10^{-4}$ mol, 5 eq) (Z)- β -Alanin-hydrazon in 1 mL abs. DMF gelöst und 75 μ L ($4,41 \cdot 10^{-4}$ mol, 5 eq) DIPEA sowie 85 mg ($4,41 \cdot 10^{-4}$ mol, 5 eq) EDC·HCl hinzugegeben. Die Reaktivesterbildung erfolgte unter Rühren für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Lösung der aktivierten Säure der Polymerlösung unter Stickstoffgegenstrom zugefügt. Die Reaktion erfolgte unter Rühren bei Raumtemperatur für 4 d. Die Reaktionslösung wurde mit MeOH versetzt und gegen MeOH (MWCO 1000 g/mol) dialysiert. Der methanolische Rückstand wurde am Rotationsverdampfer eingengt, in MP-H₂O gefällt und lyophilisiert. Zur Abtrennung von unfunktionalisiertem Polylysin wurde zusätzlich säulenchromatographisch (bas. Aluminiumoxid, 100 % DMF) aufgearbeitet. Das Lösemittel wurde am Hochvakuum abdestilliert und der DMF-Rückstand in Diethylether gefällt. Der Rückstand wurde in wenig Methanol aufgenommen, in MP-H₂O gefällt und anschließend lyophilisiert. 370 mg (53 %) funktionalisiertes Poly-L-lysin wurden als farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 9,28 (br, (1nH), -NH-CO-CF₃); 8,35-7,82 (br, (1nH), -NH-CH-CO-); 7,34 (5H, ArH); 5,01 (2H, -CH₂-O-); 4,23-3,73 (br, (1nH), -CO-CH-NH-); 3,12 (br, (2nH), -CH₂-NH-CO-CF₃); 2,02-1,18 (br, (6nH), -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-CO-CF₃); 0,82 (9H, -CH₂-C(CH₃)₃).

¹⁹F-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = -75,85 (CF₃).

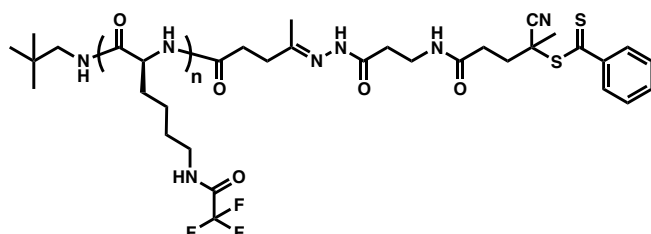
5.8.5 Z-Entschützung: Poly-L-Lysin(TFA)-Hydrazon



Die Z-Entschützung mit Trimethylsilyliodid (TMSI) erfolgte nach Literatur und wurde der Reaktion angepasst. In einem Schlenkcolben wurden unter Stickstoffgegenstrom 365 mg ($4,41 \cdot 10^{-5}$ mol, 1 eq) P(Lys(TFA))-hydrazon(Z) in 5 mL abs. DMF in Lösung gebracht. Unter langsamen Zutropfen wurden 0,47 mL ($3,31 \cdot 10^{-3}$ mol, 75 eq) Trimethylsilyliodid (TMSI) hinzugefügt und die Reaktionslösung wurde unter Argonatmosphäre für 18 h bei 60 °C gerührt. Nach vollständiger Umsetzung (Reaktionskontrolle über $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie) wurde die Reaktionslösung 2- bis 3-mal in Diethylether gefällt. Der Rückstand wurde in ca. 40 mL MeOH (mit NEt_3 auf pH 8 eingestellt) aufgenommen und für 3-4 h Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der bräunliche Rückstand in wenig DMF aufgenommen und weitere 5- bis 6-mal extrahiert bis das Präzipitat nahezu farblos ist. Zum Schluss wurde gegen MeOH (pH 8) dialysiert (MWCO 1000 g/mol), in MP- H_2O gefällt und anschließend lyophilisiert. Es wurden 176 mg (48 %) entschütztes Poly-L-lysin(TFA)-hydrazon als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 9,29 (br, (1nH), $-\text{NH-CO-CF}_3$); 8,36-7,89 (br, (1nH), $-\text{NH-CH-CO-}$); 4,13-3,73 (br, (1nH), $-\text{CO-CH-NH-}$); 3,12 (br, (2nH), $-\text{CH}_2-\text{NH-CO-CF}_3$); 2,09-1,16 (br, (6nH), $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH-CO-CF}_3$); 0,83 (9H, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_3$).
 $^{19}\text{F-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = -75,85 (CF_3).

5.8.6 Poly-L-Lysin(TFA)-Hydrazon-CTA



Die CTA-Funktionalisierung von P(Lys(TFA))-hydrazon erfolgte in einem Testansatz in Analogie zur P(Lys(Boc))-CTA Synthese in Kapitel 5.4.3 und wurde leicht modifiziert. In einem mit Argon geflutetem Rundkolben wurden 36 mg ($4,43 \cdot 10^{-6}$ mol; 1 eq)

P(Lys(TFA))-hydrazon vorgelegt und mit 0,3 mL abs. NMP in Lösung gebracht. In einem separaten Kolben wurden über Stammlösung in abs. NMP 3,94 mg ($8,85 \cdot 10^{-6}$ mol; 2 eq) PFP-CTA (siehe Kapitel 5.4.1) ($c = 28$ g/L) sowie 3,76 mg ($1,77 \cdot 10^{-5}$ mol; 4 eq) *N,N,N',N'*-Tetramethyl-1,8-Naphthalindiamin ($c = 38$ g/L) gelöst. Diese Lösung wurde unter Argongegenstrom über eine Spritzenkanüle zur Polymerlösung getropft. Die Reaktion erfolgte unter Rühren bei Raumtemperatur über Nacht. Im nächsten Schritt wurde das Lösemittel am Hochvakuum entfernt und der Rückstand in 350 μ L abs. DMF aufgenommen. Zur Abtrennung des Überschusses an PFP-CTA wurde in kaltem, destilliertem Diethylether gefällt. Der etherische Überstand wurde verworfen, das Präzipitat in wenig Methanol aufgenommen und gegen MeOH dialysiert (MWCO 1000 g/mol), in MP-H₂O gefällt und anschließend lyophilisiert. Es wurden 22 mg (61 %) Poly-L-lysin(TFA)-hydrazon-CTA als rosafarbener Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 9,28 (br, (1nH), -NH-CO-CF₃); 8,34-7,87 (br, (1nH), -NH-CH-CO-); 7,91-7,87 (m, 2H, *o*-ArH); 7,70-7,65 (m, 1H, *p*-ArH); 7,50-7,48 (m, 2H, *m*-ArH); 4,15-3,73 (br, (1nH), -CO-CH-NH-); 3,12 (br, (2nH), -CH₂-NH-COCF₃); 2,04-1,17 (br, (6nH), -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH-COCF₃); 0,83 (9H, -CH₂-C(CH₃)₃).

¹⁹F-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = -75,85 (CF₃).

5.9 Darstellung von pDNA- und mRNA-Polyplexen

5.9.1 Probenvorbereitung für Agarosegelelektrophorese

In einem Eppendorfgefäß wurden für jeden Ansatz des jeweiligen N/P Verhältnisses 0,16 μ g pDNA (pGL3-Basic Vektor mit 4818 bp) bzw. 1,0 μ g Firefly Luciferase mRNA (1921 Basen) in einer Stammlösung in MP-Wasser vorgelegt ($c(\text{pGL3}) \sim 0,04\text{--}0,07$ g/L und $c(\text{Firefly mRNA}) = 1$ g/L). Anschließend wurde mit der jeweiligen Menge an TRIS Puffer auf ein Gesamtvolumen von 20 μ L (abzüglich des Volumens an Blockcopolymer) aufgefüllt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde für das jeweilige N/P Verhältnis die entsprechende Menge an P(Lys)-*b*-P(HPMA) Blockcopolymer (vgl. Tabelle 6 und Tabelle 7) in einer Stammlösung ($c = 1$ g/L bzw. 0,1 g/L) in TRIS Puffer zugegeben. Dies erfolgte in einer horizontalen Position des Eppendorfgefäßes, sodass die Polymerlösung an die Wand des Gefäßes pipettiert wurde. Erst durch anschließendes Vortexen für ca. 10 s in einer aufrechten Position des *Eppendorf* Gefäßes, kam es zum Durchmischen von pDNA und Blockcopolymer. Die Polyplexbildung erfolgte durch Stehen für ca. 2 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden weitere 5 μ L Auftragspuffer (60 % Glycerin in MP-Wasser) zu jeder Probe hinzugefügt. Somit ergab sich ein Gesamtvolumen von 25 μ L. Die Agarosegelelektrophorese wurde wie unter Kapitel 5.2 beschrieben, durchgeführt.

5.9.2 Probenvorbereitung für FCS

In einem Eppendorfgefäß wurde jeweils 1 µg der Nukleinsäure (pDNA: pGL3-Basic (4818 bp) bzw. mRNA: iVT Luc L2m2 (2135 Basen)) in einer Stammlösung in MP-Wasser vorgelegt. Anschließend wurde mit der jeweiligen Menge an TRIS Puffer auf ein Gesamtvolumen von 40 µL (abzüglich des Volumens an Blockcopolymer) aufgefüllt und die Lösung kurz abzentrifugiert. Unter der gleichen Vorgehensweise wie in Kapitel 5.9.1 beschrieben, wurde die entsprechende Menge an OG488-markiertem P(Lys)-*b*-P(HPMA)_{OG488} Blockcopolymer in einer Stammlösung (c = 1 g/L) in TRIS Puffer für das jeweilige N/P Verhältnis zugegeben (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16. Ansätze von mRNA- und pDNA-Polyplexen für FCS.

	m (P1 _{OG488}) in (µg) N/P 2	m (P1 _{OG488}) in (µg) N/P 4	m (P1 _{OG488}) in (µg) N/P 7
pDNA-Polyplex (1 µg pDNA)	5,23	10,46	18,30
mRNA-Polyplex (1 µg mRNA)	5,02	10,03	17,56

mit P1_{OG488}: P(Lys)-*b*-P(HPMA)_{OG488}.

Die Polyplexbildung erfolgte durch Stehen für ca. 2 h bei Raumtemperatur. Die Proben wurden in der FCS in ca. 100 bis 1000-facher Verdünnung (TRIS Puffer) vermessen.

5.9.3 Probenvorbereitung für DLS-Messungen (Zetasizer)

Die Einzelmessung von pGL3-Basic wurde in 10 mM NaCl-Lösung durchgeführt (c ~ 5·10⁻³ bis 2·10⁻² g/L), alle Messungen der Polyplexproben erfolgten in MP-Wasser. Die Bildung der Polyplexe fand in einem Gesamtvolumen zwischen 40 bis 60 µl statt und wurde direkt vor der DLS-Messung auf ein Volumen von 200 µL mit MP-H₂O aufgefüllt.

Für die Präparation der unterschiedlichen pDNA-Polyplexe (mit und ohne LAH4-L1/-Cys) in Kapitel 3.3.1 wurde jeweils 1 µg bzw. 2 µg pDNA (pGL3-Basic mit 4818 bp) aus einer Stammlösung in MP-Wasser vorgelegt. Das Pipettierverfahren für das Blockcopolymer bzw. für das LAH4-L1 Peptid entspricht der beschriebenen Vorgehensweise in Kapitel 5.9.1. Die Mengen an Blockcopolymer (P1: P(Lys)-*b*-P(HPMA) bzw. P2: P(Lys)-*co*-P(Lys-PDP)-*b*-P(HPMA)) sowie LAH4-L1/-Cys-Peptid für die jeweiligen N/P Verhältnisse sind Tabelle 17 und Tabelle 18 zu entnehmen.

Die Polyplexbildung erfolgte durch Stehen für ca. 2-3 h bei Raumtemperatur. Für die Ansätze aus Tabelle 18 erfolgte die Vorkomplexierung mit LAH4-L1-Cys für ca. 30 min bei 4 °C mit anschließender Zugabe von P1 bzw. P2 und Stehen bei Raumtemperatur über Nacht.

Tabelle 17. Ansätze von pDNA-Polyplexen für DLS-Messung (Zetasizer).

	m (P1) in (µg) N/P 2	m (P1) in (µg) N/P 4	m (P1) in (µg) N/P 7
pDNA-Polyplex (1 µg pDNA)	5,23	10,46	18,30

mit P1: P(Lys)-b-P(HPMA).

Tabelle 18. Ansätze von pDNA-Polyplexen mit P1/P2 und LAH4-L1/LAH4-L1-Cys für DLS-Messung (Zetasizer).

	m (P1) in (µg) N/P 4	m (P1) in (µg) N/P 7	m ^a (LAH4-L1) in (µg)	m (P2) in (µg) N/P 4	m (P2) in (µg) N/P 7	m ^b (LAH4-L1-Cys) in (µg)
pDNA-Polyplex* mit LAH4-L1	-	-	20**	-	-	-
pDNA-Polyplex* mit LAH4-L1	-	36,60	4,23***	-	-	-
pDNA-Polyplex* mit LAH4-L1	20,91	-	4,23***	-	-	-
pDNA-Polyplex* mit LAH4-L1-Cys	-	-	-	-	-	20**
pDNA-Polyplex* mit LAH4-L1-Cys	-	-	-	-	36,60	4,37***
pDNA-Polyplex* mit LAH4-L1-Cys	-	-	-	20,91	-	4,37***

mit P1: P(Lys)-b-P(HPMA) und P2: P(Lys)-co-P(Lys-PDP)-b-P(HPMA).

* Polyplex mit 2,0 µg pDNA

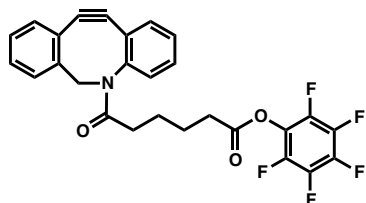
** Polyplex aus LAH4-L1 und pDNA im Verhältnis 10:1 (gew.-%)^[108]

*** N/P Verhältnis von LAH4-L1 Peptid zu pDNA (N/P 1)

a: M(LAH4-L1 = 2779,50 g/mol), b: M(LAH4-L1-Cys = 2843,62 g/mol)

5.10 Synthese des Dibenzocyclooctin-Linkers: DBCO-Lys

5.10.1 Dibenzocyclooctin-Pentafluorphenylester: DBCO-PFP

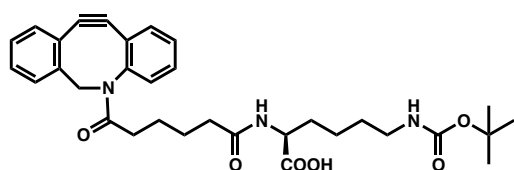


In einem Zweihalsrundkolben wurden 190 mg (0,57 mmol, 1 eq) DBCO-Säure in 12 mL abs. THF vorgelegt und mit Argon geflutet. Anschließend wurden unter Argon gegenstrom 0,16 mL (1,14 mmol, 2 eq) Triethylamin und 0,20 mL (1,14 mmol, 2 eq) Pentafluorphenyl-trifluoacetat über eine Spritzenkanüle durch ein Septum langsam zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständiger Umsetzung (DC Kontrolle) wurde THF am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in DCM aufgenommen. Die organische Phase wurde zweimal mit MP-Wasser und einmal mit Brine extrahiert. Anschließendes Trocknen über MgSO_4 und Einengen unter Vakuum ergab ein braunes viskoses Öl. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , Cyclohexan/Ethylacetat (4:1)) aufgearbeitet und Dibenzocyclooctin-pentafluorphenylester als gelbes Öl erhalten (270 mg, 0,54 mmol, 95 %).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7,71 (d, 1H, ArH); 7,44-7,23 (m, 7H, ArH); 5,18 (d, 1H, cyclooctinyl- CH_2); 3,69 (d, 1H, cyclooctinyl- CH_2); 2,45 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{COO}-$); 2,30-2,23 (m, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{N}$); 1,98-1,91 (m, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{N}$); 1,57-1,48 (m, 4H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -153,89 (d, 2F, o-ArF); -159,39 (t, 1F, p-ArF); -163,60 (d, 2F, m-ArF).

5.10.2 Dibenzocyclooctin-N- ϵ -Boc-L-Lysin: DBCO-Lys(Boc)



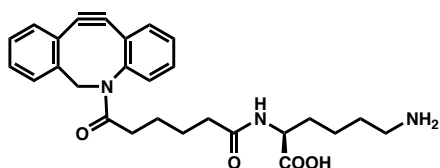
In einem Schlenkkolben wurden 250 mg (0,50 mmol, 1 eq) DBCO-PFP in 10 mL abs. DMF unter Argonatmosphäre in Lösung gebracht. 123 mg N- ϵ -Boc-L-Lysin

(0,50 mmol, 1 eq) und 174 μL DIPEA (1,00 mmol, 2 eq) wurden separat in wenig abs. DMF gelöst und anschließend über eine Spritzenkanüle unter Argongegenstrom langsam zur DBCO-PFP Reaktionslösung getropft. Das Reaktionsgemisch wurde für 24 h bei 40 °C gerührt. DMF wurde am Hochvakuum entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Dann wurde die organische Phase einmal mit 5 %-iger Zitronensäure und dreimal mit Brine extrahiert, über MgSO_4 getrocknet und letztendlich das Lösemittel unter Vakuum verdampft. Zur weiteren Aufreinigung wurde säulenchromatographisch (SiO_2 , Chloroform/Methanol/Wasser (100:10:1)) aufgearbeitet und 194 mg (0,35 mmol, 69 %) DBCO-Lys(Boc) als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7,68 (d, 1H, ArH); 7,41-7,16 (m, 7H, ArH); 6,69 (m, 1H, -NH-CO-); 5,17 (d, 1H, cyclooctinyl- CH_2); 4,42 (s, 1H, -NH-CH-COOH); 3,69 (d, 1H, cyclooctinyl- CH_2); 3,09 (s, 2H, - CH_2 -NH-COOC(CH_3)); 2,31-1,25 (m, 14H, -N-CO- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - und -CH- CH_2 - CH_2 - CH_2 -); 1,43 (s, 9H, -C(CH_3)).

ESI-MS: [m/z] = 600,24 [$\text{M}+\text{K}$]⁺, (ber. 600,38); 584,29 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺, (ber. 584,27); 526,31 [$\text{M}+\text{H}$]⁺, (ber. 562,29); $\text{C}_{32}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_6$ (561,67 g/mol).

5.10.3 Dibenzocyclooctin-L-Lysin: DBCO-Lys



In einem Zweihalsrundkolben wurden 180 mg (0,32 mmol) DBCO-Lys(Boc) in 1 mL abs. DCM unter Argonatmosphäre vorgelegt. Nach Zugabe von 0,1 mL Triisopropylsilan (5 vol-%) und 1 mL Trifluoressigsäure wurde die Reaktionslösung für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde dreimal mit Toluol azeotrop destilliert und weitere dreimal mit DCM. Das Rohprodukt wurde mittels HPLC (Wasser/Acetonitril Start: 95:5, 0:100 in 60 min)) aufgearbeitet und es wurden 79,9 mg (0,17 mmol, 54 %) DBCO-Lys als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 8,88-8,86 (m, 1H, ArH); 8,10 (d, 1H, -NH-CO-); 8,01-7,99 (m, 1H, ArH); 7,71-7,52 (m, 4H, ArH); 7,33-7,27 (m, 2H, ArH); 5,35 (s, 2H, cyclooctinyl- CH_2 -); 4,20-4,15 (m, 1H, -NH-CH-COOH); 3,10 (t, 2H, - CH_2 - NH_2); 2,75 (q, 2H, - CH_2 -CH-COOH); 2,21 (t, 2H, - CH_2 -CO-NH-); 1,78-1,22 (m, 10H, -N-CO- CH_2 - CH_2 - CH_2 - und $\text{H}_2\text{N-CH}_2$ - CH_2 -).

ESI-MS: [m/z] = 462,23 [$\text{M}+\text{H}$]⁺, (ber. 462,24); $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4$ (461,55 g/mol).

5.11 Antikörpermodifizierungen

5.11.1 Fluoreszenzmarkierung (AF647) der IgG-Antikörper

Die IgG-Antikörper aDEC205, IgG2a und aCD25 wurden mit Alexa Fluor 647 NHS-Ester fluoreszenzmarkiert. In einem Eppendorfgefäß wurden 2 mg ($1,33 \cdot 10^{-8}$ mol, 1 eq) des IgG-Antikörpers (PBS, pH 7,4, $c \sim 2$ g/L) vorgelegt und mit 167 µg ($1,33 \cdot 10^{-7}$ mol, 10 eq) Alexa Fluor 647 NHS-Ester aus einer Stammlösung in abs. DMSO ($c = 4$ g/L, 42 µL) versetzt. Der pH-Wert der Reaktionslösung wurde mittels einer wässrigen 1M NaHCO₃ Lösung auf pH 8-9 eingestellt und die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 2-4 h unter konstantem Schütteln. Anschließend wurde der Überschuss an freiem Fluoreszenzfarbstoff über Spinfiltration in fünf Waschschritten à 1 mL PBS abgetrennt (Amicon Ultra 2 mL Zentrifugenfilter, MWCO 100K). Die Ausbeute der AF647-markierten IgG-Antikörper (aDEC205_{AF647}, IgG2a_{AF647} und aCD25_{AF647}) betrug zwischen 90-95 % und wurde mit Hilfe von UV/VIS-Spektroskopie ermittelt.

5.11.2 Enzymatische Antikörpermodifizierung

Die nachstehenden Versuche zur regioselektiven enzymatischen Modifizierung von IgG-Antikörpern (aDEC205, IgG2a und aCD25) mit unterschiedlichen Linkermolekülen (DBCO-Lys, DBCO-NH₂, TCO-NH₂ und DFO-NH₂) über bakterielle Transglutaminase (BTG) wurde der Literatur entnommen und entsprechend modifiziert.^[184,253]

5.11.2.1 Deglykosylierung mit Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F)

Zu einer Lösung von 2 mg nativem IgG-Antikörper ($c \sim 1$ g/L, PBS, pH 7,4) wurden 2000 U PNGase F ($c = 500\,000$ U/mL) hinzugefügt und unter konstantem Schütteln bei 37 °C für 4 h zur Reaktion gebracht. Zur Abtrennung des Enzyms PNGase F wurde über Spinfiltration (Amicon Ultra 2 mL Zentrifugenfilter, MWCO 100K) in fünf Waschschritten à 1 mL mit kalium-freien PBS Puffer (pH 8) aufgereinigt. Nach dem gleichen Protokoll erfolgte auch die Deglykosylierung der vorab AF647-markierten IgG-Antikörper. Die Ausbeute der (AF647-markierten) deglykosylierten IgG-Antikörper (aDEC205_(AF647)-dg, IgG2a_(AF647)-dg und aCD25_(AF647)-dg) betrug zwischen 70-80 % und wurde mit Hilfe von UV/VIS-Spektroskopie bestimmt.

5.11.2.2 Regioselektive Antikörpermodifizierung mit Bakterieller Transglutaminase (BTG)

Tabelle 19 zeigt die durchgeführten enzymatischen Modifizierungen an verschiedenen IgG-Antikörpern mit unterschiedlichen aminfunktionalisierten Linkermolekülen:

Tabelle 19. Enzymatische Antikörpermodifizierungen.

	DBCO-Lys	DBCO-NH ₂	TCO-NH ₂	DFO-NH ₂
M (g/mol)	461,55	276,33	226,32	656,79
m (µg)	246	147	121	350
aDEC205	✓	✓	✓	-
IgG2a	✓	-	-	-
aCD25	-	-	-	✓

In einer typischen Reaktion wurden in einem Eppendorfgefäß 1 mg ($6,67 \cdot 10^{-9}$ mol, 1 eq) des deglykosylierten IgG-Antikörpers ($c \sim 1$ mg/mL in kaliumfreien PBS, pH 8) vorgelegt und mit 6 U BTG versetzt. Anschließend wurden 80 eq ($5,33 \cdot 10^{-7}$ mol) des jeweiligen aminfunktionalisierten BTG-Substrats (siehe Tabelle 19) über eine Stammlösung in DMSO ($c \sim 6$ mg/ml) hinzugefügt. Es ist darauf zu achten, dass der prozentuale DMSO Anteil in der Reaktionslösung einen Wert von 5 % nicht überschreitet. Vor dem Starten der enzymatischen Reaktion wurde der pH-Wert der Reaktionslösung mittels pH-Elektrode kontrolliert und bei Bedarf mit 1M NaHCO₃-Lösung auf pH 8,0-8,3 eingestellt. Die Reaktion wurde unter konstantem Schütteln bei 37 °C für 12-24 h durchgeführt. Der Überschuss an jeweiligem Substrat sowie verwendete bakterielle Transglutaminase wurden über Spinfiltration (Amicon Ultra 2 mL Zentrifugenfilter, MWCO 100K) in fünf bis zehn Waschschritten à 1 mL PBS (pH 7,4) abgetrennt. Analog wurde auch mit den vorab AF647-markierten deglykosylierten IgG-Antikörpern verfahren.

Je nach Reaktionsdauer, Reaktionsvolumen und insbesondere bei der Verwendung des DBCO-Lys-Linkers kam es während der BTG Reaktion zu einer partiellen Präzipitation. Ausgefallener Feststoff wurde bei der aufarbeitenden Spinfiltration abgetrennt. Somit variierten die Ausbeuten der jeweiligen (AF647-markierten) enzymatisch modifizierten IgG-Antikörper (aDEC205_(AF647)-DBCO(Lys), aDEC205_(AF647)-DBCO(NH₂), aDEC205_(AF647)-TCO(NH₂), IgG2a_(AF647)-DBCO(Lys) und aCD25_(AF647)-DFO(NH₂)) zwischen 35-70 % (Bestimmung über UV/VIS-Spektroskopie).

5.11.3 Unspezifische Antikörpermodifizierung

Tabelle 20 zeigt die durchgeführten unspezifischen Modifizierungen an verschiedenen IgG-Antikörpern mit unterschiedlichen aminreaktiven Linkermolekülen.

Tabelle 20. Unspezifische Antikörpermodifizierungen.

	DBCO-PEG ₄ -NHS	DFO-NCS
M (g/mol)	649,69	752,94
10 eq: m (µg)	87	100
20 eq: m (µg)	174	-
aDEC205	✓	-
IgG2a	✓	-
aCD25	-	✓

In einer typischen Reaktion wurden in einem Eppendorfgemäß 2 mg ($1,33 \cdot 10^{-8}$ mol, 1 eq) des nativen IgG-Antikörpers ($c \sim 1$ g/L, PBS, pH 7,4) vorgelegt und der pH-Wert mittels einer wässrigen 1M NaHCO₃-Lösung auf pH 8-9 eingestellt. Anschließend wurden 10 eq ($1,33 \cdot 10^{-7}$ mol) bzw. 20 eq ($2,67 \cdot 10^{-7}$ mol) des entsprechenden aminreaktiven Linkers (DBCO-PEG₄-NHS bzw. DFO-NCS) aus einer Stammlösung in DMSO ($c \sim 6$ mg/ml) hinzugefügt (siehe Tabelle 20). Es ist darauf zu achten, dass der prozentuale DMSO Anteil in der Reaktionslösung einen Wert von 5 % nicht überschreitet. Die Reaktion wurde unter konstantem Schütteln bei 37 °C für 4-12 h durchgeführt. Nicht umgesetzter Linker wurde über Spinfiltration (Amicon Ultra 2 mL Zentrifugenfilter, MWCO 100K) in fünf Waschsritten à 1 mL PBS (pH 7,4) abgetrennt. Analog wurde auch mit den vorab AF647-markierten IgG-Antikörpern verfahren. Die Ausbeute der (AF647-markierten) unspezifisch modifizierten IgG-Antikörper aDEC205_(AF647)-DBCO(NHS), IgG2a_(AF647)-DBCO(NHS) und aCD25_(AF647)-DFO(NCS) betrug zwischen 80-90 % und wurde mittels UV/VIS-Spektroskopie bestimmt.

5.12 Bioorthogonale Konjugationen über SPAAC und IEDDA

5.12.1 SPAAC von aDEC205 und Fluoreszenzfarbstoffen

Jeweils 40 µg ($2,67 \cdot 10^{-10}$ mol, 1 eq) ($c \sim 1$ g/L, PBS, pH 7,4) der enzymatisch modifizierter DEC205-Antikörper aDEC205-DBCO(Lys), aDEC205-DBCO(NH₂) und aDEC205-TCO(NH₂) wurden in einem Eppendorfgemäß vorgelegt und mit PBS zu einem Gesamtvolumen von ~ 65 µL aufgefüllt. Anschließend wurden jeweils 10 eq ($2,67 \cdot 10^{-9}$ mol) des Azid-funktionalisierten Fluoreszenzfarbstoffs: 5/6-Carboxyrhodamin-110-N₃ (CR-110-N₃) bzw. 10 eq des Fluoreszenzfarbstoffs mit Tetrazinfunktionalität: 6-Methyl-Tetrazin-5-FAM (Tz-FAM) über eine Stammlösung in DMSO ($c = 2$ g/L) hinzugefügt (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21. SPAAC von aDEC205 und Fluoreszenzfarbstoffen.

	CR-110-N ₃	Tz-FAM
M (g/mol)	574,59	559,53
m (µg)	1,53	1,49
aDEC205-DBCO(Lys)	✓	-
aDEC205-DBCO(NH ₂)	✓	-
aDEC205-TCO(NH ₂)	-	✓

Die Reaktion wurde über Gefrier- und Auftauzyklen (*freeze-thaw cycles*) durchgeführt. Diese Methode beinhaltet das Einfrieren der Probe über mehrere Stunden bei -18 °C und das anschließende Auftauen für ca. 30 min bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht. Dieser Prozess wurde insgesamt fünf- bis siebenmal wiederholt. Die Aufarbeitung zur Abtrennung von überschüssigem Fluoreszenzfarbstoff erfolgte über Spinfiltration (Amicon Ultra 0,5 mL Zentrifugenfilter, MWCO 100K) in 15 Waschschritten mit jeweils 250 µL PBS (pH 7,4). Die durchgeführte Negativkontrolle am Beispiel von nativem aDEC205 mit CR-110-N₃ wurde unter den gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt.

5.12.2 SPAAC von aDEC205-DBCO(Lys) und P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(stat)

40 µg ($2,67 \cdot 10^{-10}$ mol, 15 eq) ($c \sim 0,5$ g/L, PBS, pH 7,4) des enzymatisch modifizierten AF647-markierten DEC205-Antikörpers: aDEC205_{AF647}-DBCO(Lys) wurden in einem Eppendorfgefäß mit 0,57 µg ($1,78 \cdot 10^{-11}$ mol, 1 eq) des kationischen Blockcopolymer P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(stat) ($c = 1$ g/L, in PBS) versetzt. Die Reaktion wurde in sechs Gefrier- und Auftauzyklen *freeze-thaw*-Zyklen durch Einfrieren der Proben über mehrere Stunden bei -18 °C und anschließendem Auftauen für ca. 30 min bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht durchgeführt. In Analogie zu oben genannten Reaktionsbedingungen wurde fluoreszenzmarkiertes Blockcopolymer P(Lys)-b-P(HPMA)_(OG488)-N₃(stat) mit aDEC205-DBCO(Lys) zur Reaktion gebracht sowie eine Negativkontrolle von aDEC205_{AF647} ohne DBCO-Funktionalisierung mit P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(stat) durchgeführt.

Die Aufarbeitung zur Abtrennung von nicht umgesetzten Blockcopolymer erfolgte über Spinfiltration (Amicon Ultra 0,5 mL Zentrifugenfilter, MWCO 100K) in 5-10 Waschschrritten mit jeweils 250 µL PBS (pH 7,4).

5.12.3 SPAAC von aDEC205-DBCO(Lys) und P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(end)

40 µg ($2,67 \cdot 10^{-10}$ mol, 1 eq) ($c \sim 0,5$ g/L, PBS, pH 7,4) des enzymatisch modifizierten AF647-markierten DEC205-Antikörpers: aDEC205_{AF647}-DBCO(Lys) wurden in einem Eppendorfgefäß mit 7,5 µg ($2,67 \cdot 10^{-10}$ mol, 1 eq) des kationischen Blockcopolymers P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(end) ($c = 1$ g/L, in PBS) versetzt. Reaktion und Aufarbeitung wurden analog zu Kapitel 5.12.2 durchgeführt.

5.12.4 SPAAC von Azid-Polyplexen und Alexa Fluor 647 DBCO

In einem ersten Schritt wurden Polyplexe aus pDNA (pGL3-Basic) und beiden azidfunktionalisierten Blockcopolymeren P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(stat) und P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(end) gebildet. Dafür wurde 1 µg pDNA ($c = 0,24$ g/L in MP-H₂O) in einem Eppendorfgefäß vorgelegt und mit weiteren 25 µL MP-H₂O versetzt. In einer horizontalen Position des Eppendorfgefäßes wurden 10,8 µg ($c = 1$ g/L in TRIS Puffer, N/P 4) des jeweiligen Blockcopolymers an die Wand des Reaktionsgefäßes pipettiert. Erst durch anschließendes Vortexen für ca. 10 s in einer aufrechten Position des Eppendorfgefäßes kam es zum Durchmischen von pDNA und Blockcopolymer. Die Polyplexbildung erfolgte durch Stehen für ca. 2 h bei Raumtemperatur.

Danach wurden jeweils 2,7 µg Alexa Fluor 647 DBCO (5 eq bezogen auf die eingesetzte Menge an Blockcopolymer) aus einer Stammlösung in DMSO ($c = 0,75$ g/L) zu den Polyplexproben gegeben. Sowohl der Ansatz mit P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(stat) als auch mit P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(end) wurde jeweils als Duplikat angesetzt. Eine Probe wurde bei 37 °C für 1 d unter konstantem Schütteln gehalten, die andere Probe wurde über sechs Gefrier- und Auftauzyklen zur Reaktion zu bringen.

Die Aufarbeitung zur Abtrennung von nicht umgesetzten Fluoreszenzfarbstoff erfolgte über Spinfiltration (Amicon Ultra 0,5 mL Zentrifugenfilter, MWCO 100K) in fünf Waschschritten mit jeweils 250 µL PBS (pH 7,4).

5.12.5 SPAAC von Azid-Polyplexen und aDEC205-DBCO(Lys/NHS)

Die Bildung der Polyplexe aus 1 µg pDNA (pGL3-Basic, $3,18 \cdot 10^{-13}$ mol,) gelöst in MP-Wasser ($c = 0,24$ g/L) und 10,8 µg P(Lys)-b-P(HPMA)-N₃(stat) ($c = 1$ g/L in TRIS-Puffer, N/P 4) erfolgte wie in Kapitel 5.12.4 beschrieben. Anschließend wurden 5 µg von aDEC205_{AF647}-DBCO(NH₂) bzw. aDEC205_{AF647}-DBCO(NHS) ($3,18 \cdot 10^{-11}$ mol, PBS pH 7,4, $c \sim 0,5$ g/L) zur Polyplexprobe gegeben. Dies entspricht einem 100-fachen Überschuss an DBCO-modifiziertem aDEC205 bezogen auf ein Molekül Polyplex, unter der Annahme, dass ein pDNA Molekül innerhalb des Polyplexes vorliegt.^[246] Der

Ansatz mit enzymatisch modifiziertem aDEC205_{AF647}-DBCO(NH₂) wurde über sieben Gefrier- und Auftauzyklen zur Reaktion gebracht. Die Reaktion mit aDEC205_{AF647}-DBCO(NHS) hingegen wurde für 1 d bei 37 °C unter konstantem Schütteln betrieben.

5.12.6 SPAAC von Azid-Bürstenpolymeren und aDEC205-DBCO(NH₂)

600 µg aDEC205_{AF647}-DBCO(NH₂) ($4,0 \cdot 10^{-9}$ mol, 50 eq) in PBS ($c = 6,3$ g/L) wurden in einem Eppendorfgefäß vorgelegt und mit 83,2 µg P(Lys)-P(Sar)-Azid-Bürstenpolymer ($8,0 \cdot 10^{-11}$ mol, 1 eq) gelöst in PBS ($c = 2,73$ g/L) versetzt. Die Reaktion erfolgte in sechs Gefrier- und Auftauzyklen. Anschließend wurde über SEC mit PBS überschüssiger Antikörper abgetrennt. (Säule: Sepharose 4 FF XK 16/70 von GE Helthcare, Flussrate 0,5 mL/min, UV-Detektion (230 nm)).

5.12.7 IEDDA von Tetrazin-Mizellen und aDEC205-TCO(NH₂)

In einem Eppendorfgefäß wurden 680 µg aDEC205_{AF647}-TCO(NH₂) ($4,53 \cdot 10^{-9}$ mol, 1 eq) in PBS ($c = 10,5$ g/L) vorgelegt. Dazu wurden in grober Näherung 100 µg tetrazinfunktionalisiertes P(HPMA)-*b*-P(HCMA-co-LMA) Blockcopolymer^[247] ($4,53 \cdot 10^{-9}$ mol, 1 eq) in MP-H₂O ($c \sim 1$ g/L), das zuvor über Dialyse und photochemischer Reaktion zu vernetzten Mizellen umgesetzt wurde, hinzugefügt. Die Reaktion erfolgte in sechs Gefrier- und Auftauzyklen.

5.13 Antikörper-Bindungsassay

5.13.1 Bindungsassay von aDEC205 an BMDCs

Der Bindungsassay von DEC205-Antikörpern wurde von [REDACTED] (Betreuer [REDACTED]) an der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Knochenmarkszellen der Maus (C57BL/6) (2×10^5) wurden in 10 cm Petrischalen (10 mL) (Greiner Bio-One), Frickenhausen, Deutschland) in Zellkulturmedium aus IMDM Medium mit 2 mM l-Glutamin, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin und 50 µM β-Mercaptoethanol sowie mit 5 % FCS und 10 ng/mL rekombinanter Maus GM-CSF (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät. Die Petrischalen wurden bei 37 °C im Inkubator (5 % CO₂) kultiviert. An Tag 3 und Tag 6 der Zellkultivierung wurden jeweils 5 mL Medium mit GM-CSF hinzugefügt. An Tag 7-8 wurden adhärenente Zellen für Experimente geerntet. BM-DCs ($3 \times 10^5/500$ µL) wurden in sterile FACS-

Küvetten überführt und mit 0,5 µg der jeweiligen AF647-markierten DEC205-Antikörperprobe für 20 min bei 4 °C inkubiert (5 % CO₂). Die Proben wurden zentrifugiert (300 rpm, 4 °C) und mit FACS-Puffer gewaschen (PBS, 1 % FCS). Anschließend wurden die Proben jeweils mit 0,5 µg/Probe des CD11c-Antikörpers (BV421-markiert, Klon N418) sowie mit DEC205-Antikörper (PE-Cy7-markiert, Klon 205yekta) für 20 min bei 4 °C inkubiert. Als Kontrollen diente ein Ansatz ohne Probe nur mit PE-Cy7-DEC205yekta Gegenfärbung (unbehandelt) und ein Ansatz ohne Probe und ohne Gegenfärbung (ungefärbt). Die zum Vergleich eingesetzten unmodifizierten Antikörper aDEC205-AF647 und rat IgG2a-AF647 wurden von BioLegend (San Diego, CA, USA) erworben. Die FACS-Messungen wurden an einem Attune Nxt flow cytometer von Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) durchgeführt und mit der FlowJo Software (FLOWJO, Ashland, OR, USA) ausgewertet. Zellbestandteile und Duplets wurden in der Messung aussortiert und die CD11c⁺ Zellpopulationen auf Fluoreszenz der AF647-markierten Proben analysiert.

5.13.2 Bindungsassay von aCD25 an T-Lymphozyten

Der Bindungsassay von CD25-Antikörpern wurde von [REDACTED] (Betreuer [REDACTED]) am Institut für Immunologie der JGU Mainz durchgeführt.

Aus einer C57BL/6 Wildtyp Maus wurde die Milz entnommen und über ein 45 µm Zellsieb mit einem Spritzenstempel zerrieben. Nach durchgeführter Erylyse mit Grey's Lysepuffer wurde nach mehrmaligem Waschen mit PBS die Zellzahl auf 5x10⁵ Zellen pro Probe eingestellt. In einer FACS-Analyse wurde die Anbindung chemisch DFO-modifizierter CD25-Antikörperproben an CD4⁺ Zellen getestet. Hierfür wurden die Milzzellen zusätzlich mit anti-CD4 in BV421 (1:400) und anti-TCRβ in PE (1:400) gefärbt. Die entsprechenden Antikörperproben wurden in einer Konzentration von 0,25 µg/mL zu den Zellen in PBS gegeben und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 100 µL 1xPBS für die FACS-Messung aufgenommen. Anti-CD25 in APC (PC61 Klon) von Biolegend (San Diego, CA, USA) wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Als Negativkontrollen diente eine Zellfärbung mit anti-CD4 und anti-TCRβ ohne anti-CD25. Die Messung wurde mit einem LSR II FACS-Gerät der Firma BD (Becton Dickinson) Bioscience (New Jersey, USA) durchgeführt.

5.14 Radiomarkierung von aCD25-DFO mit ^{89}Zr und Stabilitätstest

Die ^{89}Zr -Markierung der DFO-modifizierten CD25-Antikörper sowie der Stabilitätstest der Radioimmunkonjugate wurden von [REDACTED] (Betreuer [REDACTED]) am Institut für Kernchemie der JGU Mainz durchgeführt.

Für die radioaktive Markierung der CD25-DFO-Antikörper mit ^{89}Zr wurde nach Literatur verfahren.^[153] Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur in einem Volumen von 1,6 mL unter gleichmäßigem Schütteln für 90 min. Die radiochemische Ausbeute (RCA) wurde über Radio-Dünnschichtchromatographie (Radio-DC) auf Merck Silica F₂₅₄ Platten mit Citratpuffer (0,01 M, pH 4) als Laufmittel überprüft und mit Hilfe eines Radio Detektors (GABI STAR von Raytest) analysiert. Die radioaktiv-markierten Antikörperproben wurden über PD-10 Säulen (GE Healthcare, Little Chalfont, U.K.) mit 0,9 %-iger NaCl Lösung filtriert und anschließend über HPLC säulenchromatographisch analysiert. Es wurde eine HPLC-Anlage von Merck verwendet: LaChrom; Pumpe: Hitachi L7100 und UV-Detektor: L7400). Als Säule wurde eine BioSep SEC-S2000 von Phenomenex verwendet. Die Messungen wurden mit 0,05 M PBS (pH 7) als Elutionsmittel bei einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt.

Die Stabilität der Radioimmunkonjugate wurde sowohl in humanem Serum als auch in PBS durchgeführt. Die ^{89}Zr -markierten CD25-DFO-Antikörperproben wurden jeweils bei 37 °C in Aliquots von 2 µL inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten (1 d, 2 d und 3 d) über Radio-DC mit Citratpuffer als Elutionsmittel charakterisiert.

5.15 Transfektionsstudien mit Luciferase Assay

Die Transfektionsversuche wurden von [REDACTED] (Betreuung [REDACTED]) an der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Die Transfektionseffizienz von P(Lys)-*b*-P(HPMA)-basierten Blockcopolymeren wurde mit einem Firefly (*Photinus pyralis*) Luciferase Assay durchgeführt. Als Vektor der pDNA-Polyplexe diente pGL3-Control (5256 bp) von Promega (Mannheim, Deutschland) unter der Kontrolle eines SV40 Promotors und eines SV40 Enhancers. Für die mRNA-Polyplexe wurde Firefly Luciferase (1921 Basen) von TriLink BioTechnologies (San Diego, CA) verwendet. HEK-293T Zellen bzw. DC2.4 Zellen wurden 24 h vor dem Experiment geerntet und die Zellzahl auf $2 \cdot 10^5$ Zellen pro mL eingestellt. Jeweils 0,5 mL der eingestellten Zellsuspension wurden pro Well in 24-Well Platten gegeben. Für jede Polyplexprobe wurden Triplikate mit 1 µg pDNA (mRNA) pro Komplexierung angesetzt. Die Komplexierung der Nukleinsäure mit der entsprechenden Menge Polymer erfolgte unter Vortexen und anschließendem Stehen für 3 h (pDNA-Polyplexe) bzw. 30 min (mRNA-Polyplexe) bei RT. Die Positivkontrolle der pDNA-Transfektionen mit JetPEI (1,5 µL JetPEI + 1 µg DNA) und auch die Positivkontrolle der

mRNA Transfektionen mit DOTAP (16 μ L + 1 μ g mRNA) wurden für 30 min komplexiert. Alle Proben tripliziert der Polyplexe, der JetPEI bzw. DOTAP Kontrolle und der nackten pDNA bzw. mRNA wurden unter Schwenken zu den Zellen pipettiert. Die Zellen wurden bei 10 % (für DC2.4) bzw. 5 % (für HEK-293-T) CO₂ und 37 °C inkubiert. Nach 6 h der Transfektion wurde das Kulturmedium gewechselt. Nach 48 h (pDNA-Proben) bzw. 24 h (mRNA-Proben) wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit jeweils 100 μ L 1xLyse-Puffer (Promega, Heidelberg, Deutschland) lysiert. Nach 15 min wurden die Zelllysate für die Lumineszenzmessung in 96-Well Luminometer Platten überführt. Die Biolumineszenz wurde an einem Luminometer (Centro LB 960; Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) für jeweils 10 s gemessen.

6 Anhang

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

- [1] G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1133–42.
- [2] G. Moad, D. H. Solomon, *The Chemistry of Radical Polymerization*, **2005**.
- [3] W. a. Braunecker, K. Matyjaszewski, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 93–146.
- [4] C. J. Hawker, A. W. Bosman, E. Harth, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3661–3688.
- [5] K. Matyjaszewski, J. Xia, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2921–2990.
- [6] J. Chiefari, Y. K. B. Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T. P. T. Le, R. T. A. Mayadunne, G. F. Meijs, C. L. Moad, G. Moad, et al., *Macromolecules* **1998**, *31*, 5559–5562.
- [7] G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Aust. J. Chem.* **2009**, *62*, 1402–1472.
- [8] C. Boyer, V. Bulmus, T. P. Davis, V. Ladmiral, J. Liu, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5402–5436.
- [9] B. Y. K. Chong, J. Krstina, T. P. T. Le, G. Moad, A. Postma, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Macromolecules* **2003**, *60*, 2256–2272.
- [10] M. Eberhardt, P. Théato, *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, *26*, 1488–1493.
- [11] P. J. Schoenmakers, B. Klumperman, V. Lima, X. Jiang, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2005**, *43*, 959–973.
- [12] D. L. Patton, M. Mullings, T. Fulghum, R. C. Advincula, *Macromolecules* **2005**, *38*, 8597–8602.
- [13] H. Kakwere, S. Perrier, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1889–1895.
- [14] M. Eberhardt, R. Mruk, R. Zentel, P. Théato, *Eur. Polym. J.* **2005**, *41*, 1569–1575.
- [15] P. Takolpuckdee, J. Westwood, D. M. Lewis, *Macromolecules* **2004**, *37*, 2709–2717.
- [16] J. F. Quinn, R. P. Chaplin, T. P. Davis, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2002**, *40*, 2956–2966.
- [17] M. Barz, M. Tarantola, K. Fischer, M. Schmidt, R. Luxenhofer, A. Janshoff, P. Theato, R. Zentel, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 3114–8.
- [18] M. H. Stenzel, T. P. Davis, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2002**, *40*, 4498–4512.
- [19] B. Liu, A. Kazlauciusas, J. T. Guthrie, S. Perrier, *Macromolecules* **2005**, *38*, 2131–2136.
- [20] R. T. A. Mayadunne, J. Jeffery, G. Moad, E. Rizzardo, *Macromolecules* **2003**, *36*, 1505–1513.
- [21] H. G. Batz, G. Franzmann, H. Ringsdorf, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1972**, *11*, 1103–4.
- [22] P. Ferruti, A. Bettelli, A. Feré, *Polymer (Guildf)*. **1972**, *13*, 462–464.
- [23] M. A. Gauthier, M. I. Gibson, H.-A. Klok, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 48–58.
- [24] P. Theato, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2008**, *46*, 6677–6687.
- [25] N. Mohr, M. Barz, R. Forst, R. Zentel, *Macromol. Rapid Commun.* **2014**, *35*, 1522–1527.

- [26] H.-A. Klok, M. I. Gibson, E. Fröhlich, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2009**, *47*, 4332-4345.
- [27] R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 347-60.
- [28] H. Leuchs, W. Geiger, *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1908**, *41*, 1721-1726.
- [29] T. J. Deming, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2000**, *38*, 3011-3018.
- [30] I. Dimitrov, H. Schlaad, *Chem. Commun. (Camb)*. **2003**, 2944-2945.
- [31] W. Vayaboury, O. Giani, H. Cottet, A. Deratani, F. Schué, *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25*, 1221-1224.
- [32] G. J. M. Habraken, K. H. R. M. Wilsens, C. E. Koning, A. Heise, *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 1322.
- [33] D. Huesmann, A. Birke, K. Klinker, S. Türk, H. J. Räder, M. Barz, *Macromolecules* **2014**, *47*, 928-936.
- [34] E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, G. M. Whitesides, *Langmuir* **2001**, *17*, 5605-5620.
- [35] A. Birke, D. Huesmann, A. Kelsch, M. Weillbacher, J. Xie, M. Bros, T. Bopp, C. Becker, K. Landfester, M. Barz, *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 548-557.
- [36] H. Tanisaka, S. Kizaka-Kondoh, A. Makino, S. Tanaka, M. Hiraoka, S. Kimura, *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 109-117.
- [37] C. Hörtz, A. Birke, L. Kaps, S. Decker, E. Wa, K. Fischer, D. Schuppan, M. Barz, M. Schmidt, *Macromolecules* **2015**, *48*, 2074-2086.
- [38] P. Heller, A. Birke, D. Huesmann, B. Weber, K. Fischer, A. Reske-Kunz, M. Bros, M. Barz, *Macromol. Biosci.* **2014**, *14*, 1380-1395.
- [39] A. Harada, K. Kataoka, *Macromolecules* **1995**, *28*, 5294-5299.
- [40] K. M. Murphy, P. Travers, M. Walport, *Janeway Immunologie*, Springer Spektrum, **2009**.
- [41] L. Van Parijs, A. K. Abbas, *Science* **1998**, *280*, 243-248.
- [42] C. Liang, L. Xu, G. Song, Z. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 6250-6269.
- [43] J. N. Blattman, P. D. Greenberg, *Science* **2004**, *305*, 200-5.
- [44] R. S. J. Banchereau, *Nature* **1998**, *392*, 245-252.
- [45] P. J. Tacken, I. J. M. de Vries, R. Torensma, C. G. Figdor, *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 790.
- [46] K. Shao, S. Singha, X. Clemente-Casares, S. Tsai, Y. Yang, P. Santamaria, *ACS Nano* **2015**, *9*, 16-30.
- [47] R. Duncan, R. Gaspar, *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 2101-2141.
- [48] R. Duncan, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 492-501.
- [49] S. T. Reddy, A. Rehor, H. G. Schmoekel, J. A. Hubbell, M. A. Swartz, *J. Control. Release* **2006**, *112*, 26-34.
- [50] J. Van Der Vlies, E. Simeoni, V. Angeli, G. J. Randolph, S. T. Reddy, C. P. O. Neil, L. K. Lee, M. A. Swartz, J. A. Hubbell, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1159-1164.
- [51] D. Raghuvanshi, V. Mishra, M. R. Suresh, K. Kaur, *Vaccine* **2012**, *30*, 7292-7299.
- [52] J. D. Mintern, C. Percival, M. M. J. Kamphuis, W. J. Chin, F. Caruso, A. P. R. Johnston, *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2*, 940-944.
- [53] M. Talelli, M. Barz, C. J. F. Rijcken, F. Kiessling, W. E. Hennink, T. Lammers, *Nano Today* **2015**, *10*, 93-117.
- [54] K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2545-2561.
- [55] P. Sharma, J. P. Allison, *Sci. Immunol. Immunother.* **2015**, 348.

- [56] N. Bacher, V. Raker, C. Hofmann, E. Graulich, M. Schwenk, R. Baumgrass, T. Bopp, U. Zechner, L. Merten, C. Becker, et al., *Am. Assoc. Cancer Res.* **2013**, 5647-5657.
- [57] J. A. Persis, M. Pule, *Lancet* **2015**, 385, 488-490.
- [58] R. Aplenc, D. M. Barrett, N. J. Bunin, A. Chew, D. Ph, V. E. Gonzalez, Z. Zheng, S. F. Lacey, Y. D. Mahnke, J. J. Melenhorst, et al., *N. Engl. J. Med.* **2014**, 371, 1507-1517.
- [59] M. D. Joshi, W. J. Unger, G. Storm, Y. van Kooyk, E. Mastrobattista, *J. Control. Release* **2012**, 161, 25-37.
- [60] C. Condon, S. C. Watkins, C. M. Celluzzi, K. Thompson, L. D. J. Faló, *Nat. Med.* **1996**, 2, 1122-1128.
- [61] J. H. Van Den Berg, K. Oosterhuis, W. E. Hennink, G. Storm, L. J. Van Der Aa, J. F. J. Engbersen, J. B. A. G. Haanen, J. H. Beijnen, T. N. Schumacher, B. Nuijen, *J. Control. Release* **2010**, 141, 234-240.
- [62] Y. Höhn, S. Sudowe, A. B. Reske-Kunz, *Biolistic DNA Delivery*, Humana Press, Totowa, NJ, **2013**.
- [63] N. Hanagata, *Int. J. Nanomedicine* **2012**, 7, 2181-95.
- [64] H. Herweijer, G. Zhang, V. M. Subbotin, V. Budker, P. Williams, J. A. Wolff, *J. Gene Med.* **2001**, 3, 280-291.
- [65] P. Heller, N. Mohr, A. Birke, B. Weber, A. Reske-Kunz, M. Bros, M. Barz, *Macromol. Biosci.* **2015**, 15, 63-73.
- [66] K. Tappertzshofen, M. Bednarczyk, K. Koynov, M. Bros, S. Grabbe, R. Zentel, *Macromol. Biosci.* **2014**, 1-14.
- [67] J. Bühler, S. Gietzen, A. Reuter, C. Kappel, K. Fischer, S. Decker, D. Schäffel, K. Koynov, M. Bros, I. Tubbe, et al., *Chemistry* **2014**, 20, 12405-10.
- [68] S. De Koker, B. N. Lambrecht, M. A. Willart, Y. van Kooyk, J. Grooten, C. Vervaeet, J. P. Remon, B. G. De Geest, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 320-339.
- [69] V. Mata-Haro, C. Cekic, M. Martin, P. M. Chilton, C. R. Casella, T. C. Mitchell, *Science* **2007**, 316, 1628-1632.
- [70] I. D. Jung, S. K. Jeong, C. Lee, K. T. Noh, D. R. Heo, Y. K. Shin, S. J. Shin, Y. Park, *Cancer Res.* **2011**, 71, 2858-2871.
- [71] S. M. Bal, S. Hortensius, Z. Ding, W. Jiskoot, J. A. Bouwstra, *Vaccine* **2011**, 29, 1045-1052.
- [72] I. J. M. De Vries, J. E. B. Krooshoop, N. M. Scharenborg, W. J. Lesterhuis, J. S. Heleen, G. N. P. Van Muijen, S. P. Strijk, T. J. Ruers, O. C. Boerman, W. J. G. Oyen, et al., *Cancer Res.* **2003**, 2, 12-17.
- [73] J. M. den Haan, S. M. Lehar, M. J. Bevan, *J. Exp. Med.* **2000**, 192, 1685-96.
- [74] L. D. J. Faló, M. Kovacsovics-Bankowski, K. Thompson, K. L. Rock, *Nat. Med.* **1995**, 1, 649-653.
- [75] Z. Xu, Y. Wang, L. Zhang, L. Huang, *ACS Nano* **2014**, 8, 3636-3645.
- [76] J. T. Wilson, S. Keller, M. J. Manganiello, C. Cheng, C. Lee, C. Opara, A. Convertine, P. S. Stayton, *ACS Nano* **2013**, 7, 3912-3925.
- [77] T. Uto, X. Wang, K. Sato, T. Akagi, M. Akashi, E. Alerts, *J. Immunol.* **2007**, 178, 2979-2986.
- [78] W. C. Russell, *J. Gen. Virol.* **2009**, 90, 1-20.
- [79] L. K. Medina-Kauwe, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, 55, 1485-1496.
- [80] S. Nayak, R. W. Herzog, *Gene Ther.* **2010**, 17, 295-304.

- [81] E. Wagner, M. Zenke, M. Cotten, H. Beug, M. L. Birnstiel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1990**, *87*, 3410-3414.
- [82] I. Martin, C. Dohmen, C. Mas-Moruno, C. Troiber, P. Kos, D. Schaffert, U. Lächelt, M. Teixidó, M. Günther, H. Kessler, et al., *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 3258.
- [83] S. Katayose, K. Kataoka, *Bioconj. Chem.* **1997**, *8*, 702-707.
- [84] Y. Kakizawa, A. Harada, K. Kataoka, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 491-497.
- [85] E. K. Efthimiadou, C. Tapeinos, P. Bilalis, G. Kordas, *J. Nanoparticle Res.* **2011**, *13*, 6725-6736.
- [86] P. Heller, D. Hobernik, U. Lächelt, M. Schinnerer, B. Weber, M. Schmidt, E. Wagner, M. Bros, M. Barz, *J. Control. Release* **2017**, *258*, 146-160.
- [87] K. Tappertzhofen, F. Weiser, E. Montermann, A. Reske-Kunz, M. Bros, R. Zentel, *Macromol. Biosci.* **2015**, *15*, 1159-1173.
- [88] K. Tappertzhofen, S. Beck, E. Montermann, D. Huesmann, M. Barz, K. Koynov, M. Bros, R. Zentel, *Macromol. Biosci.* **2016**, *16*, 106-120.
- [89] A. Jain, S. K. Jain, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2008**, *25*, 403-47.
- [90] B. Říhová, M. Kovář, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 184-191.
- [91] K. Ulbrich, J. Strohalm, J. Kopecek, R. Duncan, *Structure* **1989**, *1*, 335-342.
- [92] J. Kopecek, P. Kopecková, T. Minko, Z. Lu, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 61-81.
- [93] J. Kopecek, P. Kopecková, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 122-49.
- [94] M. Barz, R. Luxenhofer, R. Zentel, M. J. Vicent, *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 1900.
- [95] L. Nuhn, S. Hartmann, B. Palitzsch, B. Gerlitzki, E. Schmitt, R. Zentel, H. Kunz, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52*, 10652-10656.
- [96] Y. Zhang, M. Zheng, T. Kissel, S. Agarwal, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 313-322.
- [97] M. Ogris, S. Brunner, S. Schüller, R. Kircheis, E. Wagner, *Gene Ther.* **1999**, *6*, 595-605.
- [98] H.-K. Nguyen, P. Lemieux, S. V Vinogradov, C. L. Gebhart, N. Guerin, G. Paradis, T. K. Bronich, V. Y. Alakhov, A. V Kabanov, *Gene Ther.* **2000**, *7*, 126-138.
- [99] N. Emi, S. Kidoaki, K. Yoshikawa, H. Saito, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *231*, 421-424.
- [100] M. Jovic, M. Sharma, J. Rahajeng, And, S. Caplan, *Histol Histopathol* **2010**, *25*, 99-112.
- [101] C. S. Pillay, E. Elliot, C. Dennison, *Biochem. J.* **2002**, *363*, 417-429.
- [102] D. M. Copolovici, K. Langel, E. Eriste, *ACS Nano* **2014**, *8*, 1972-1994.
- [103] Q. Chen, K. Osada, Z. Ge, S. Uchida, A. Tockary, A. Dirisala, A. Matsui, K. Toh, K. M. Takeda, X. Liu, et al., *Biomaterials* **2017**, *113*, 253-265.
- [104] A. K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, H. J. Haisma, *J. Control. Release* **2011**, *151*, 220-228.
- [105] D. Schermant, B. Demeneix, J. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 7297-7301.
- [106] C. Lin, J. F. J. Engbersen, *J. Control. Release* **2008**, *132*, 267-272.
- [107] P. Midoux, C. Pichon, J. Yaouanc, P. Jaffrès, *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 166-178.
- [108] A. J. Mason, C. Leborgne, G. Moulay, A. Martinez, O. Danos, B. Bechinger, A. Kichler, *J. Control. Release* **2007**, *118*, 95-104.

- [109] A. Kichler, A. J. Mason, B. Bechinger, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2006**, 1758, 301–307.
- [110] S. Wang, X. Tai, Z. Tian, J. Zhang, W. Yao, C. Zhang, L. Gao, Y. Zhu, Q. Gao, J. Gao, *Int. J. Nanomedicine* **2015**, 10, 4669–4690.
- [111] A. Meister, M. E. Anderson, *Ann. Rev. Biochem* **1983**, 52, 711–760.
- [112] G. F. Walker, C. Fella, J. Pelisek, J. Fahrmeir, S. Boeckle, M. Ogris, E. Wagner, *Mol. Ther.* **2005**, 11, 418–425.
- [113] N. Murthy, J. Campbell, N. Fausto, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, *J. Control. Release* **2003**, 89, 365–374.
- [114] V. Knorr, L. Allmendinger, G. F. Walker, F. F. Paintner, E. Wagner, *Bioconjug. Chem.* **2007**, 18, 1218–1225.
- [115] K. Y. Kwok, D. L. Mc Kenzie, D. L. Evers, K. G. Rice, *J. Pharm. Sci.* **1999**, 88, 996–1003.
- [116] S. Takae, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, *JACS* **2008**, 130, 6001–6009.
- [117] M. Breunig, U. Lungwitz, R. Liebl, A. Goepferich, *PNAS* **2007**, 104, 14454–14459.
- [118] H. Yu, V. Russ, E. Wagner, *Am. Assoc. Pharm. Sci.* **2009**, 11, 445–455.
- [119] K. Miyata, Y. Kakizawa, N. Nishiyama, A. Harada, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2355–2361.
- [120] D. Oupicky, R. Carlisle, L. Seymour, *Gene Ther.* **2001**, 8, 713–724.
- [121] M. A. Gosselin, W. Guo, R. J. Lee, *Bioconjug. Chem.* **2001**, 12, 989–994.
- [122] D. Oupicky, A. L. Parker, L. W. Seymour, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2001–2002.
- [123] J. D. Larsen, N. L. Ross, M. O. Sullivan, *J. Gene Med.* **2012**, 14, 580–589.
- [124] P. Collas, H. Husebye, P. Aleström, *Transgenic Res.* **1996**, 5, 451–458.
- [125] K. Remaut, N. Symens, B. Lucas, J. Demeester, S. C. De Smedt, *J. Control. Release* **2014**, 179, 1–9.
- [126] Y. Wang, H. Su, Y. Yang, Y. Hu, L. Zhang, P. Blancafort, L. Huang, *Mol. Ther.* **2013**, 21, 358–367.
- [127] L. M. Kranz, M. Diken, H. Haas, S. Kreiter, C. Loquai, K. C. Reuter, M. Meng, D. Fritz, F. Vascotto, H. Hefesha, et al., *Nature* **2016**, 534, 396–401.
- [128] Y. Matsumura, H. Maeda, A. Smancs, **1986**, 6387–6392.
- [129] J. Fang, H. Nakamura, H. Maeda, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, 63, 136–151.
- [130] T. Lammers, F. Kiessling, W. E. Hennink, G. Storm, *J. Control. Release* **2012**, 161, 175–187.
- [131] U. Prabhakar, H. Maeda, R. K. Jain, E. M. Sevick-Muraca, W. Zamboni, *Cancer Res.* **2013**, 73, 2412–2418.
- [132] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, 751–760.
- [133] K. A. Mislick, J. D. Baldeschwieler, J. F. Kayyem, T. J. Meade, *Bioconjug. Chem.* **1995**, 6, 512–515.
- [134] B. Liang, M. He, Z. Xiao, Y. Li, C. Chan, H. Kung, X. Shuai, Y. Peng, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 367, 874–880.
- [135] G. Stingl, et al., *J Mol Med* **1997**, 75, 297–299.
- [136] S. Koppu, Y. Jinn, R. Edrada-Ebel, D. R. Blatchford, L. Tetley, R. J. Tate, C. Dufès, *J. Control. Release* **2010**, 143, 215–221.

- [137] J. K. Nair, J. L. S. Willoughby, A. Chan, K. Charisse, R. Alam, Q. Wang, M. Hoekstra, P. Kandasamy, A. V Kel, S. Milstein, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 16958-16961.
- [138] D. B. Rozema, D. L. Lewis, D. H. Wakefield, S. C. Wong, J. J. Klein, P. L. Roesch, S. L. Bertin, T. W. Reppen, Q. Chu, A. V. Blokhin, et al., *Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12982-12987.
- [139] Y. H. Choi, F. Liu, J. S. Park, S. W. Kim, *Bioconjug. Chem.* **1998**, *9*, 708-718.
- [140] H. Tumors, O. Germershaus, T. Merdan, U. Bakowsky, M. Behe, T. Kissel, *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 1190-1199.
- [141] S. Li, Y. Tan, E. Viroonchatapan, B. R. Pitt, L. Huang, R. Pitt, L. Huang, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2000**, *278*, 504-511.
- [142] R. V. J. Chari, M. L. Miller, W. C. Widdison, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53*, 3796-3827.
- [143] H. L. Perez, P. M. Cardarelli, S. Deshpande, S. Gangwar, G. M. Schroeder, G. D. Vite, R. M. Borzilleri, *Drug Discov. Today* **2014**, *19*, 869-881.
- [144] U. Lächelt, E. Wagner, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 11043-11078.
- [145] J. Hoon, S. Wan, T. Gwan, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 1239-1274.
- [146] Ehrlich Paul, *Gesammelte Arbeiten Zur Immunitätsforschung.*, Verlag Von August Hirschwald, Berlin, **1904**.
- [147] S. H. E. Kaufmann, *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 705-712.
- [148] J. Le, J. Vilcek, P. Daddona, J. Ghayeb, D. Knight, S. Siegel, *United States Patent*, **1997**.
- [149] A. D. Michaels, B. Whisenant, J. MacGregor, *Clin. Cardiol.* **1998**, *21*, 134-138.
- [150] R. G. Panchal, *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 247-252.
- [151] P. J. Carter, P. D. Senter, *Cancer J.* **2008**, *14*, 154-169.
- [152] F. Kratz, I. A. Müller, C. Ryppa, A. Warnecke, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 20-53.
- [153] L. R. Perk, M. J. W. D. Vosjan, G. W. M. Visser, M. Budde, P. Jurek, G. E. Kiefer, G. A. M. S. Van Dongen, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2010**, *37*, 250-259.
- [154] W. J. Dreyer, J. C. Bennett, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1965**, *54*, 864-869.
- [155] A. Brettschneider, K. Hufnagel, "<http://archiv.aktuelle-wochenschau.de/2013/w40/w40.html>" (abgerufen 04.2018).
- [156] "https://de.wikipedia.org/wiki/Monoklonaler_Antikörper"(abgerufen 04.2018).
- [157] A. H. Lucas, *Encycl. Life Sci.* **2003**, 1-8.
- [158] F. Nimmerjahn, J. V. Ravetch, *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 34-47.
- [159] J. M. M. Caaveiro, M. Kiyoshi, K. Tsumoto, *Immunol. Rev.* **2015**, *268*, 201-221.
- [160] L. K. Hmiel, K. A. Brorson, M. T. Boyne, *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 79-94.
- [161] F. S. van de Bovenkamp, L. Hafkenscheid, T. Rispens, Y. Rombouts, *J. Immunol.* **2016**, *196*, 1435-1441.
- [162] G. Köhler, C. Milstein, *Nature* **1975**, *256*, 495-497.
- [163] M. Little, S. M. Kipriyanov, F. Le Gall, G. Moldenhauer, *Immunol. Today* **2000**, *21*, 364-70.
- [164] G. P. Smith, *Science* **1985**, *228*, 1315-7.
- [165] P. M. O'Brien, R. Aitken, *Antibody Phage Display*, Humana Press, New Jersey, **2001**.
- [166] M. Jain, N. Kamal, S. K. Batra, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 307-16.
- [167] P. Holliger, P. J. Hudson, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1126-36.

- [168] G. A. M. S. van Dongen, G. W. M. Visser, M. N. Lub-de Hooge, E. G. de Vries, L. R. Perk, *Oncologist* **2007**, *12*, 1379-1389.
- [169] S. F. M. Van Dongen, H. P. M. De Hoog, R. J. R. W. Peters, M. Nallani, R. J. M. Nolte, J. C. M. Van Hest, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6212-6274.
- [170] M. R. Gordon, M. Canakci, L. Li, J. Zhuang, B. Osborne, S. Thayumanavan, *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 2198-2215.
- [171] P. F. Bross, J. Beitz, G. Chen, Xiao Hong Chen, E. Duffy, L. Kieffer, S. Roy, R. Sridhara, A. Rahman, G. Williams, et al., *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 1490-1496.
- [172] S. O. Doronina, B. A. Mendelsohn, T. D. Bovee, C. G. Cerveny, S. C. Alley, D. L. Meyer, E. Oflazoglu, B. E. Toki, R. J. Sanderson, R. F. Zabinski, et al., *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 114-124.
- [173] M. S. Masri, M. Friedman, *J. Protein Chem.* **1988**, *7*, 49-54.
- [174] P. D. Senter, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 235-244.
- [175] C. A. Boswell, E. E. Mundo, C. Zhang, D. Bumbaca, N. R. Valle, K. R. Kozak, A. Fourie, J. Chuh, N. Koppada, O. Saad, et al., *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 1994-2004.
- [176] A. A. Wakankar, M. B. Feeney, J. Rivera, Y. Chen, M. Kim, V. K. Sharma, Y. J. Wang, *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 1588-1595.
- [177] T. Rohrer, *Chem. Today* **2012**, *30*, 1-8.
- [178] A. Lyons, D. J. King, R. J. Owens, G. T. Yarranton, A. Millican, N. R. Whittle, J. R. Adair, *Protein Eng. Des. Sel.* **1990**, *3*, 703-708.
- [179] J. Y. Axup, K. M. Bajjuri, M. Ritland, B. M. Hutchins, C. H. Kim, S. A. Kazane, R. Halder, J. S. Forsyth, A. F. Santidrian, K. Stafin, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 16101-16106.
- [180] E. S. Zimmerman, T. H. Heibeck, A. Gill, X. Li, C. J. Murray, M. R. Madlansacay, C. Tran, N. T. Uter, G. Yin, P. J. Rivers, et al., *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 351-361.
- [181] I. S. Carrico, B. L. Carlson, C. R. Bertozzi, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 321-322.
- [182] D. Rabuka, J. S. Rush, G. W. DeHart, P. Wu, C. R. Bertozzi, *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 1052-1067.
- [183] M. P. Madej, G. Coia, C. C. Williams, J. M. Caine, L. A. Pearce, R. Attwood, N. A. Bartone, O. Dolezal, R. M. Nisbet, S. D. Nuttall, et al., *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 1461-1470.
- [184] S. Jeger, K. Zimmermann, A. Blanc, J. Grünberg, M. Honer, P. Hunziker, H. Struthers, R. Schibli, *Angew. Chem. Int. Ed* **2010**, *49*, 9995-9997.
- [185] J. R. Junutula, H. Raab, S. Clark, S. Bhakta, D. D. Leipold, S. Weir, Y. Chen, M. Simpson, S. P. Tsai, M. S. Dennis, et al., *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 925-932.
- [186] F. Maley, R. B. Trimble, A. L. Tarentino, T. H. Plummer, *Anal. Biochem.* **1989**, *180*, 195-204.
- [187] V. Tretter, F. Altmann, L. März, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *199*, 647-652.
- [188] T. H. Plummer, A. L. Tarentino, *Glycobiology* **1991**, *1*, 257-263.
- [189] S. Krapp, Y. Mimura, R. Jefferis, R. Huber, P. Sonderrmann, *J. Mol. Biol.* **2003**, *325*, 979-989.
- [190] S. Matsumiya, Y. Yamaguchi, J. ichi Saito, M. Nagano, H. Sasakawa, S. Otaki, M. Satoh, K. Shitara, K. Kato, *J. Mol. Biol.* **2007**, *368*, 767-779.
- [191] M. J. Feige, S. Nath, S. R. Catharino, D. Weinfurtner, S. Steinbacher, J. Buchner, *J. Mol. Biol.* **2009**, *391*, 599-608.

- [192] A. Fontana, B. Spolaore, A. Mero, F. M. Veronese, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 13–28.
- [193] P. Dennler, A. Chiotellis, E. Fischer, D. Brégeon, C. Belmant, L. Gauthier, F. Lhospice, F. Romagne, R. Schibli, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 569–578.
- [194] Y. Takaoka, A. Ojida, I. Hamachi, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52*, 4088–4106.
- [195] A. C. Moore, A. Gallimore, S. J. Draper, K. R. Watkins, S. C. Gilbert, A. V. S. Hill, *J. Immunol.* **2005**, *175*, 7264–7273.
- [196] M. D. Best, *Biochemistry* **2009**, *48*, 6571–84.
- [197] C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chemie* **2008**, *120*, 10182–10228.
- [198] E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141–2143.
- [199] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [200] R. Huisgen, G. Mloston, E. Langhals, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6401–6402.
- [201] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [202] S. I. Presolski, V. Hong, S. H. Cho, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14570–14576.
- [203] O. Diels, K. Alder, *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1929**, *62*, 554–562.
- [204] D. Graham, A. Enright, *Curr. Org. Synth.* **2006**, *3*, 9–17.
- [205] A. Dondoni, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47*, 8995–8997.
- [206] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.
- [207] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 16793–167937.
- [208] X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 2253–5.
- [209] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666–676.
- [210] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518–13519.
- [211] N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. a Hilderbrand, *Communications* **2008**, *19*, 2297–2299.
- [212] B. L. Oliveira, Z. Guo, G. J. L. Bernardes, *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4895–4950.
- [213] I. Nikič, T. Plass, O. Schraidt, J. Szymański, J. A. G. Briggs, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53*, 2245–2249.
- [214] J. B. Haun, N. K. Devaraj, S. A. Hilderbrand, H. Lee, R. Weissleder, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 660–665.
- [215] S. S. van Berkel, M. B. van Eldijk, J. C. M. van Hest, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2011**, *50*, 8806–8827.
- [216] S. Beck, J. Schultze, H.-J. Räder, R. Holm, M. Schinnerer, M. Barz, K. Koynov, R. Zentel, *Polymers (Basel)*. **2018**, *10*, 141.
- [217] P. Heller, B. Weber, A. Birke, M. Barz, *Macromol. Rapid Commun.* **2015**, *36*, 38–44.
- [218] P. J. Roth, D. Kessler, R. Zentel, P. Theato, *Macromolecules* **2008**, *41*, 8316–8319.
- [219] D. Pissuwan, C. Boyer, K. Gunasekaran, T. P. Davis, V. Bulmus, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 412–20.
- [220] S. Perrier, P. Takolpuckdee, C. A. Mars, *Macromolecules* **2005**, *38*, 2033–2036.

- [221] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in Der Organischen Chemie*, 8. Überarb. Auflage, Georg Thieme Verlag, **2011**.
- [222] P. Barltrop, J. A. Schofield, *Tetrahedron Lett.* **1962**, 697-699.
- [223] R. Hanessian, Stephen Masse, *Carbohydr. Res.* **1977**, 54, 142-144.
- [224] V. N. Rajasekharan Pillai, *Synthesis (Stuttg.)*. **1980**, 1-26.
- [225] N. N. Jima, T. Enomoto, T. Watanabe, M. Ubukata, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, 67, 2556-2566.
- [226] M. A. Jung, M.E., Lyster, *J.C.S. Chem. Comm.* **1978**, 315-316.
- [227] S. Lott, H. Stammer, *J.C.S. Chem. Comm.* **1979**, 495-496.
- [228] C. G. Bochet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 125-142.
- [229] Eintrag Zu L-Lysin (*Römpp Online*), Georg Thieme Verlag KG, **2018**.
- [230] M. Kröger, K. Meyer-Rogge, "http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/5/bc/gentechnik/methoden.vlu/Page/vsc/de/ch/5/bc/gentechnik/methoden/gelelektrophorese/auftrennung_plasmid/auftrennung_plasmid.vscml.html" (abgerufen 04.2018).
- [231] K. Miyata, Y. Kakizawa, N. Nishiyama, A. Harada, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2355-2361.
- [232] S. J. Gould, S. Subramani, *Anal Biochem* **1988**, 175, 5-13.
- [233] H. Zur Hausen, *J Virol.* **1967**, 6, 1174-1185.
- [234] D. A. Pearson, M. Blanchette, M. Lou Baker, C. A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2739-2742.
- [235] A. Beer, in *Ann. Der Phys. Und Chemie*, **1852**, pp. 77-88.
- [236] J. H. Lambert, *Photometria Sive de Mensure et Gradibus Luminis Colorum et Umbra*, **1760**.
- [237] E. Wagner-Rousset, A. Bednarczyk, M. C. Bussat, O. Colas, N. Corvaia, C. Schaeffer, A. Van Dorsselaer, A. Beck, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, 872, 23-37.
- [238] "<http://www.thermofisher.com/de/de/home/references/molecular-probes-the-handbook/technical-notes-and-product-highlights/the-alexa-fluor-dye-series.html>" (abgerufen 04.2018).
- [239] P. H. Schur, E. L. Becker, *J. Exp. Med.* **1963**, 118, 891-904.
- [240] M. Adamczyk, J. C. Gebler, J. Wu, *J. Immunol. Methods* **2000**, 237, 95-104.
- [241] "<http://www.kerafast.com/PDF/A134.pdf>" (abgerufen 04.2018).
- [242] H. Takemoto, K. Miyata, T. Ishii, S. Hattori, S. Osawa, N. Nishiyama, K. Kataoka, *Bioconjug. Chem.* **2012**, 23, 1503-1506.
- [243] L. C. Zaba, J. Fuentes-Duculan, R. M. Steinman, J. G. Krueger, M. A. Lowes, *J. Clin. Invest.* **2007**, 117, 2517-2525.
- [244] M. J. W. D. Vosjan, L. R. Perk, G. W. M. Visser, M. Budde, P. Jurek, G. E. Kiefer, G. A. M. S. Van Dongen, *Nat. Protoc.* **2010**, 5, 739-743.
- [245] A. J. Rech, R. H. Vonderheide, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, 1174, 99-106.
- [246] P. Heller, J. Zhou, B. Weber, D. Hobernik, M. Bros, F. Schmid, M. Barz, *Small* **2017**, 13, 1-9.
- [247] S. Kramer, K. O. Kim, R. Zentel, *Macromol. Chem. Phys.* **2017**, 218, 1-9.
- [248] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7512-7515.
- [249] R. Rigler, S. Wennmalm, L. Edman, in *Fluoresc. Correl. Spectrosc.*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2001**, pp. 459-476.

- [250] F. D. Jochum, L. Zur Borg, P. J. Roth, P. Theato, *Macromolecules* **2009**, *42*, 7854-7862.
- [251] K. P. Vercruysse, D. M. Marecak, J. F. Marecek, G. D. Prestwich, *Bioconjug. Chem.* **2000**, *1802*, 686-694.
- [252] R. Vardanyan, G. Vijay, G. S. Nichol, L. Liu, I. Kumarasinghe, P. Davis, T. Vanderah, F. Porreca, J. Lai, V. J. Hruby, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5044-5053.
- [253] P. Dennler, A. Chiotellis, E. Fischer, D. Brégeon, C. Belmant, L. Gauthier, F. Lhospice, F. Romagne, R. Schibli, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 569-78.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

aCD25	CD25-Antikörper
ACVA	4,4-Azobis(4-caynovaleriansäure)
ADC	<i>antibody-drug conjugate</i>
ADCC	<i>antibody dependant cell-mediated cytotoxicity</i>
aDEC205	DEC205-Antikörper
AF647	Alexa Fluor 647
AIBN	Azobis(isobutyronitril)
ALL	akute lymphatische Leukämie
Arg(R)	Arginin
Asn(N)	Asparagin
Asp(D)	Asparaginsäure
ATRP	<i>atom transfer radical polymerization</i>
BMDC	<i>bone marrow-derived dendritic cell</i>
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
Bp	Basenpaare
BPO	(Di)benzoylperoxid
BTG	bakterielle Transglutaminase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAR	chimärer Antigenrezeptoren
CDC	<i>complement-dependent cytotoxicity</i>
CDR	<i>complementarity-determining regions</i>
CpG	Desoxycytidin-Phosphorsäure-Desoxyguanosin
CRP	<i>controlled radical polymerization</i>
CTA	<i>chain transfer agent</i>
CTL	cytotoxischer T-Lymphozyt
CuAAC	<i>copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition</i>
Cys(C)	Cystein
DBCO	Dibenzocyclooctin
DC	<i>dendritic cell</i>
DCM	Dichlormethan
DDS	<i>drug-delivery system</i>
DFO	Deferoxamin
D _h	hydrodynamischer Durchmesser
DIBAC	Dibenzoazacyclooctin
DIBO	Dibenzocyclooctin
DIFO	Difluorcyclooctin
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DLS	dynamische Lichtsreuung
DMF	Dimethylformamid

DMSO	Dimethylsulfoxid
DOSY	<i>diffusion-ordered spectroscopy</i>
DOTAP	1,2-Di-9Z-octadecenoyl)-3-trimethylammoniumpropan-Methylsulfat
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	<i>enhanced permeability and retention</i>
ESI	Elektrosprayionisation
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
FGE	<i>formylglycine generating enzyme</i>
Fv	<i>fragment variable</i>
GlcNAc	N-Acetylgalaktosamin
Gln(Q)	Glutamin
Glu(E)	Glutaminsäure
GPC	Gelpermeationschromatographie
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HFIP	Hexafluorisopropanol
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPA	2-Hydroxypropylamin
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPMA	N-(2-Hydroxypropyl)methacrylat
hr-MS	<i>high resolution mass spectrometry</i>
HS	humanes Serum
IEDDA	<i>inverse electron-demand Diels-Alder</i>
IgG	Immunglobulin G
IR	infrarot
LC	<i>liquid chromatography</i>
Lys(K)	Lysin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MDT	maximal tolerierte Dosis
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MMA	Methylmethacrylat
MP-H ₂ O	Millipore Wasser
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>

NAM	normaler Amin-Mechanismus
NCA	<i>N</i> -Carboxyanhydrid
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NK	Negativkontrolle
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NMP	<i>nitroxide-mediated radical polymerization</i>
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NNCA	<i>N</i> -substituiertes Glycin <i>N</i> -Carboxyanhydrid
OG488	Oregon Green 488
P	Poly
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDI	Polydispersitätsindex
pDNA	Plasmid-Desoxyribonukleinsäure
PDP	2-(Pyridyldithio)-propionat
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFMA	Pentafluorphenylmethacrylat
PNGase F	Peptid- <i>N</i> -Glykosidase F
PP	Polyplex
RAFT	<i>reversible addition-fragmentation chain transfer</i>
RCA	radiochemische Ausbeute
R _h	hydrodynamischer Radius
ROP	ringöffnende Polymerisation
Sar	Sarkosin
scFv	<i>single chain variable fragment</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
SPAAC	<i>strain-promoted alkyne-azide-cycloaddition</i>
SPDP	Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)-propionat
TAA	tumorassoziierte Antigene
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TCO	<i>trans</i> -Cycloocten
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoacetat
TFE	2,2,2-Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TLC	<i>thin layer chromatography</i>

TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMSI	Trimethylsilyliodid
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tz	Tetrazin
UV/VIS	<i>ultraviolet/visible</i>
Z	Benzyloxycarbony

Publikationen

“Bio reducible Poly-L-Lysine-Poly[HPMA] Block Copolymers Obtained by RAFT-Polymerization as Efficient Polyplex-Transfection Reagents” K. Tappertzhofen, S. Beck, E. Montermann, D. Huesmann, M. Barz, K. Koynov, M. Bros and R. Zentel, *Macromol. Biosci.* **2016**, *16*, 106-120.

“Site-Specific DBCO-Modification of DEC205-Antibody for Polymer Conjugation” S. Beck, J. Schultze, H.-J. Räder, R. Holm, M. Schinnerer, M. Barz, K. Koynov and R. Zentel, *Polymers (Basel)*. **2018**, *10*, 141.

Danksagung

aus Datenschutzgründen gelöscht

Danksagung

aus Datenschutzgründen gelöscht

