



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Polymersome für die medizinische Anwendung:

Vesikel basierend auf Aktivester- Blockcopolymeren und Blockcopolypeptiden als Wirkstoffträger in der Nanomedizin

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Chemie

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

Martin Scherer
geb. in Homburg
Mainz, Dezember 2015

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2012 bis Dezember 2015 am Institut für Organische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Betreuung von [REDACTED] angefertigt.

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Februar 2016

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel und zitierten Quellen verwendet habe.

Diese Dissertation wurde weder in der jetzigen, noch in einer abgewandelten Form bei einer anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinem sonstigen Prüfungszweck gedient.

Mainz, Januar 2016

Martin Scherer

Abstract

The objective of this work was the development of polymersomes based on P(PFPMA)-*b*-P(LMA) active ester polymers as well as vesicles from the block copolypept(o)id P(Glu(OBn))-*b*-P(Sar) and to evaluate their applicability as nano-sized drug delivery vehicles. Those polymers were contemplated to be versatily functionalizable and biocompatible materials as an alternative to polyethylene glycol.

Vesicle formation was achieved by aminolysis of the active ester repeating units using 2,3-dihydroxypropylamine (DHPA) to form P(DHPMA). In contrast, the aggregation of polymers based on widely-used, but less hydrophilic P(HPMA) did not yield vesicles. The polymersomes proved to be highly stable and were loaded with hydrophilic cargo by Dual Centrifugation with efficiencies as high as 35 %. Furthermore, the polymers were equipped with several types of functional groups that can play an important role in drug delivery. For example, a mannose targeting ligand was attached and a hydrolyzable monomer was copolymerized as a pH-dependent stimulus for vesicle disintegration.

Cell assays confirmed that the new type of P(DHPMA) polymers were nontoxic, with cell viabilities comparable to P(HPMA). The corresponding blockcopolymer vesicles, too, did not cause any cytotoxic effects even at high concentrations. Furthermore, no aggregation induced by protein adsorption did occur in human blood serum. Moreover, vesicles labeled with the mannose ligand displayed a significantly increased cell uptake compared to non-mannosylated polymersomes.

As for P(Glu(OBn))-*b*-P(Sar), only aggregates of micellar morphology had been reported so far. This work describes the first successful formation of vesicles from this material. They, too, were loaded with hydrophilic cargo at high efficiencies. Additionally, their potential to serve as a carrier for CpG oligonucleotides was confirmed by the activation of dendritic cells and the proliferation of T-cells.

The obtained results verify the applicability of both polymer systems to form readily functionalizable and biocompatible vesicles. They demonstrate P(DHPMA)-*b*-P(LMA) and P(Glu(OBn))-*b*-P(Sar) to be promising carriers of water-soluble drugs without requiring any substance-specific ligation chemistry.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Polymersome basierend auf dem Aktivester-Polymer P(PFPMA)-*b*-P(LMA) sowie aus dem Polypept(o)id P(Glu(OBn))-*b*-P(Sar) entwickelt und auf ihre Eignung als Wirkstoffträger in der Nanomedizin untersucht. Ziel war der Erhalt vielseitig funktionalisierbarer und biokompatibler Materialien als Alternative zu Polyethylenglycol.

Die Vesikelherstellung gelang mittels Aminolyse der Aktivester-Wiederholungseinheit durch 2,3-Dihydroxypropylamin (DHPA) zu P(DHPMA). Dagegen konnte unter Verwendung des in der biomedizinischen Forschung weit verbreiteten, jedoch schwächer hydrophilen P(HPMA) keine Vesikelbildung erreicht werden. Die Polymersome erwiesen sich als stabil und konnten mittels Dualer Zentrifugation mit hoher Effizienz um 35 % mit hydrophilen Stoffen beladen werden. Ferner konnten verschiedene, für die Anwendung als Wirkstoffträger wichtige funktionelle Gruppen eingebracht werden. Hierzu zählte unter anderem die Anbindung eines Mannose-Derivates als Ligand und die Copolymerisation eines hydrolysierbaren Monomers zur pH-induzierten Auflösung der Vesikel zwecks Wirkstofffreisetzung.

Die neuartigen P(DHPMA) Homo- und Blockcopolymere erwiesen sich in Zellversuchen als nicht-zytotoxisch; der Einfluss auf die Zellviabilität war ähnlich gering wie bei P(HPMA). Auch die entsprechenden Blockcopolymer-Vesikel zeigten selbst in hoher Konzentration keine Toxizität. Ferner trat in humanem Blutserum keine durch die Adsorption von Serumkomponenten induzierte Aggregation auf. Zudem konnte eine signifikant erhöhte Aufnahme in dendritische Zellen durch Mannose-Anbindung im Vergleich zu nicht-mannosylierten Vesikeln erzielt werden.

Aus P(Glu(OBn))-*b*-P(Sar), für das bisher nur mizellare Aggregate bekannt waren, wurden erstmals Vesikel hergestellt. Auch sie konnten in guter Effizienz mit hydrophilen Stoffen beladen werden. Zudem wurde ihre Eignung als Wirkstoffträger für CpG-Oligonukleotide zur Aktivierung dendritischer Zellen demonstriert.

Die erzielten Ergebnisse bestätigen die Eignung der beiden untersuchten Polymersysteme zur Herstellung gut funktionalisierbarer, biokompatibler Vesikel. Sie machen P(DHPMA)-*b*-P(LMA) und P(Glu(OBn))-*b*-P(Sar) zu vielversprechenden Trägern wasserlöslicher Wirkstoffe ohne eine stoffspezifische Anbindungschemie zu benötigen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Eigenschaften amphiphiler Moleküle	1
1.1.1	Überstrukturbildung	3
1.1.2	Amphiphile Polymere	7
1.2	Polymersome	10
1.2.1	Grundlegende Eigenschaften	11
1.2.2	Herstellungsmethoden	16
1.2.3	Anwendungen	17
1.3	Polymere Therapeutika	20
1.3.1	Polymere Trägersysteme in der Krebstherapie: aktives und passives Targeting	22
1.3.2	P(HPMA) in der Nanomedizin	24
1.4	Synthese funktionaler Blockcopolymere	26
1.4.1	Der RAFT-Prozess	27
1.4.2	Reaktivesterpolymere und ihre polymeranaloge Umsetzung	29
2	Motivation und Zielsetzung	33
3	Ergebnisse und Diskussion	37
3.1	Aktivester-basierte Vesikel: von P(HPMA) zu P(DHPMA)	37
3.1.1	Kolloidbildung mit P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA) Blockcopolymeren	37
3.1.1.1	Synthese von Pentafluorphenylmethacrylat (PFPMA)	39
3.1.1.2	Synthese des Kettentransferreagenz CTA1	40
3.1.1.3	Synthese von P(PFPMA)- und P(LMA) Homopolymeren mittels RAFT-Polymerisation	40
3.1.1.4	Synthese von P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA) Blockcopolymeren ausgehend von PFPMA- und LMA-Homopolymeren als Makro-CTAs	44
3.1.1.5	Entfernung der Dithiobenzoat-RAFT-Endgruppe	48
3.1.1.6	Polymeranaloge Umsetzung von P(PFPMA)- <i>b</i> -P(LMA) mit HPA	50
3.1.1.7	Versuche zur Vesikelpräparation mit P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA) Blockcopolymeren	54
3.1.2	Synthese und Charakterisierung von P(DHPMA)	61
3.1.3	Synthese und Charakterisierung von P(DHPMA)- <i>b</i> -P(LMA) Blockcopolymeren	65

3.2 Herstellung, Charakterisierung und Beladung von P(DHPMA)-<i>b</i>-P(LMA) Vesikeln	69
3.2.1 Untersuchung des Löslichkeits- und Aggregationsverhaltens	69
3.2.2 Vesikelbildung und Beladung mittels Phaseninversion.....	73
3.2.2.1 Herstellung von P(DHPMA)- <i>b</i> -P(LMA) Vesikeln mittels Phaseninversion.....	73
3.2.2.2 Beeinflussung der Vesikelgröße durch Extrusion	78
3.2.2.3 Beladung von P(DHPMA)- <i>b</i> -P(LMA) Vesikeln mit einem hydrophilen Modellfarbstoff.....	80
3.2.3 Vesikelherstellung und Beladung mittels Dualer Zentrifugation.....	81
3.2.3.1 Vesikelherstellung mittels Dualer Zentrifugation	82
3.2.3.2 Beladung der Vesikel mittels DZ.....	84
3.2.4 Stabilitätstests im Vergleich zu Lipidvesikeln	86
3.2.4.1 Vergleich des Verhaltens gegen einen osmotischen Gradienten mittels Stopped-Flow-Technik.....	86
3.2.4.2 Verkapselung von Glucoseoxidase zur Quantifizierung einer transmembranen Multienzymreaktion.....	87
3.2.4.3 Untersuchung der Stabilität gegenüber Detergenzien per DLS.....	91
3.3 Weitere Funktionalisierung	95
3.3.1 Farbstoffmarkierung und Einführung eines Mannose-Targetingliganden mittels polymeranaloger Konversion	95
3.3.2 Azid-Funktionalisierung mittels eines modifizierten Kettentransferreagenzes.....	100
3.3.3 Einbau eines säurespaltbaren Monomers zur pH-induzierten Desintegration der Vesikel	106
3.4 Versuche zur Rekonstitution des Aquaglyceroporins GlpF in Polymersom-Membranen	115
3.5 Polymervesikel aus Sarkosin-basierten Polypeptid-<i>b</i>-Polypeptoid Blockcopolymeren	123
3.5.1 Synthese von P(Glu(OBn))- <i>b</i> -P(Sar) Blockcopolymeren.....	123
3.5.2 Kolloidbildung mit P(Glu(OBn))- <i>b</i> -P(Sar) Blockcopolymeren.....	125
3.6 <i>In vitro</i> Evaluierung von P(DHPMA)-<i>b</i>-P(LMA) und P(Glu(OBn))-<i>b</i>-P(Sar) Vesikeln	133
3.6.1 Untersuchung des Einflusses von P(DHPMA) auf die Zellviabilität im Vergleich zu P(HPMA).....	133
3.6.2 Untersuchung des Aggregationsverhaltens im Blutserum per dynamischer Lichtstreuung	136
3.6.3 Studien zur gezielten Aktivierung dendritischer Zellen und T-Zell-Proliferation	139
3.6.4 Untersuchung des Einflusses der Mannose-Funktionalisierung auf die Aufnahme in dendritische Zellen.....	146

4 Zusammenfassung	151
5 Experimenteller Teil	157
5.1 Verbrauchsmaterialien und Allgemeines	157
5.2 Mess- und Charakterisierungsmethoden	161
5.3 Synthese von Kettentransferreagenzien und Monomeren	168
5.3.1 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)sulfanyl)pentansäure (CTA1)	168
5.3.1.1 Dithiobenzoessäure	168
5.3.1.2 Dithiobenzoyldisulfit.....	168
5.3.1.3 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)sulfanyl)pentansäure	169
5.3.2 1-Azido-16-cyano-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecan-16-yl- benzodithioat (CTA2)	169
5.3.3 Pentafluorphenylmethacrylat (PFPMa).....	170
5.3.4 2-(2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethylmethacrylat (DDEMA).....	171
5.4 Polymersynthesen und polymeranaloge Modifikationen	173
5.4.1 PFPMa- und LMA- Homo- und Blockcopolymere	173
5.4.2 Polymeranaloge Konversionen zur Herstellung amphiphiler Blockcopolymere.....	177
5.4.3 Synthese des Azid-funktionalisierten P(DHPMA)- <i>b</i> -P(LMA) Polymers und Farbstoffanbindung über „Click“-Chemie.....	180
5.4.4 Synthese des säurelabilen Blockcopolymers P(LMA- <i>stat</i> -DDEMA)- <i>b</i> -P(DHPMA).....	183
5.4.5 P(Glu(OBn))- <i>b</i> -P(Sar) Blockcopolymere.....	185
5.5 Vesikelpräparation und Beladung	186
5.5.1 Übersicht der Kolloidbildungsversuche mit P(HPMA)- <i>b</i> -P(LMA)	186
5.5.2 Filmrehydratisierung mittels Ultraschall	186
5.5.3 Elektroformierung	187
5.5.4 Detergenzdialyse zur Vesikelherstellung und Proteinrekonstitution.....	187
5.5.5 Phaseninversion	188
5.5.6 Duale Zentrifugation	188
5.6 Zellexperimente	190
6 Literaturverzeichnis	193
Abkürzungsverzeichnis	205
Publikationen	209
Danksagung	210

1 Einführung

1.1 Eigenschaften amphiphiler Moleküle

Die Selbstorganisation von Molekülen aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften zu Aggregaten oder größeren Überstrukturen ist ein Prinzip, ohne welches die Welt wie wir sie heute kennen und das Leben überhaupt unmöglich wäre.

Das Wort „amphiphil“ leitet sich aus dem Altgriechischen ab (amphí „auf beiden Seiten“, philos „liebend“) und bedeutet in sinngemäßer Übersetzung „beides liebend“. Es bezeichnet nach gültiger IUPAC-Terminologie Verbindungen, deren Molekülbausteine „bezüglich eines bestimmten Lösungsmittels sowohl solvophile als auch solvophobe Gruppen enthalten“.¹ Im häufigsten Fall von Wasser oder wässrigen Medien als Referenzsystem, handelt es sich dabei um polare bzw. unpolare Gruppen. Ihre zugehörigen Solvatationseigenschaften bezüglich Wasser werden als hydrophil bzw. hydrophob bezeichnet.

Amphiphile unterteilen sich hinsichtlich ihrer chemischen Struktur in sehr heterogene Verbindungsklassen. Einfache langkettige Carbonsäuren gehören aufgrund ihrer polaren Kopfgruppe und des hydrophoben aliphatischen Restes ebenso dazu wie viele Proteine oder Blockcopolymere, die aus Blöcken unterschiedlicher Hydrophilie bestehen.

Nach Small^{2,3} erfolgt eine grundsätzliche Unterteilung in Amphiphile mit ionischen und solche mit ungeladenen hydrophilen Domänen. Je nach Verhalten in wässriger Lösung kann dabei weiter unterschieden werden zwischen wasserlöslichen und unlöslichen Amphiphilen.

Die bedeutendste Eigenschaft vieler Amphiphile ist ihre Grenzflächen- und Oberflächenaktivität. Aufgrund der unterschiedlichen Polarität ihrer Domänen können sie an Grenz- bzw. Oberflächen adsorbieren und dabei die freie Grenzflächenenergie deutlich senken. Von diesem Verhalten stammt die englische Bezeichnung „surfactant“ (engl. Kunstwort für „surface active agent“, grenzflächenaktive Substanz) ab. Grenzflächenaktiv sind dabei nur solche Amphiphile, deren polare und

unpolare Anteile sich in einer ähnliche Größenordnung bewegen.⁴ Ist eine der Tendenzen viel weniger stark ausgeprägt als die andere, wie etwa bei einem wasserlöslichen Enzym mit nur kleiner hydrophober Domäne als aktivem Zentrum, resultiert keine Grenzflächenaktivität. Die häufigsten Grundtypen grenzflächenaktiver Amphiphile sind in Abb. 1 dargestellt. Hierzu zählen konventionelle Kopf/Schwanz-Amphiphile, die sowohl mit einzelnen (z.B. langkettigen Carbonsäuren), als auch mit mehreren hydrophoben Ketten (z.B. Phospholipide) vorkommen. Bolaamphiphile tragen an beiden Enden der hydrophoben Kette eine wasserlösliche Gruppe. Zu diesem Typ gehören ABA-Blockcopolymer, bei denen A den hydrophilen Teil darstellt. Hinzu kommen dimere Amphiphile, bei denen zwei hydrophobe Ketten und zwei Kopfgruppen über einen Spacer verbunden sind. Sie sind besonders stark grenzflächenaktiv.⁵ Alle diese Typen können ungeladene, kationische, anionische oder auch zwitterionische Kopfgruppen tragen.

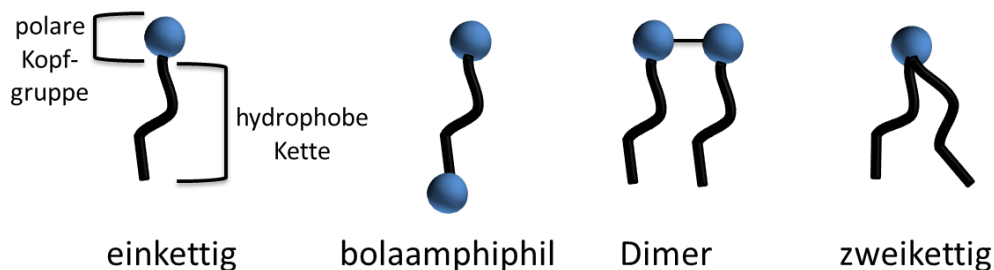


Abb. 1: Grundtypen grenzflächenaktiver Amphiphile.
 Von links nach rechts: einkettige Amphiphile, Bolaamphiphile, dimere Amphiphile, zweikettige Amphiphile.

Amphiphile entfalten ihre Wirkung, indem sie sich an einer Grenzfläche, etwa der des Systems Wasser-Luft, anlagern. Durch die lokale Störung der Wasserstoffbrückenbindungen im Bereich der Oberfläche setzen sie die Oberflächenspannung des Wassers herab.⁶ Hierbei handelt es sich um einen additiven Effekt: je höher die Konzentration, desto mehr Moleküle adsorbieren an der Grenzfläche und desto stärker wird die Oberflächenspannung herabgesetzt. Allerdings lässt sich die Oberflächenspannung nicht beliebig stark senken. Ist die maximale Belegung der Grenzfläche erreicht, so bleibt ab diesem Belegungsgrad auch bei weiterer Erhöhung der Konzentration die Oberflächenspannung konstant (siehe Abb. 2).

1.1.1 Überstrukturbildung

Wird versucht, einer maximal von grenzflächenaktiven Molekülen belegten Grenzfläche zwischen Wasser und Luft weitere Amphiphile hinzuzufügen oder übersteigt die Konzentration eines wasserlöslichen Amphiphils ein gewisses stoffspezifisches Maß, so kommt es zu einer gegenseitigen Ausrichtung der Amphiphile. Der Grund dafür ist, dass Wasser nur in sehr begrenztem Maße dazu in der Lage ist, die hydrophoben Domänen zu solvatisieren. Dies geschieht anhand der Ausbildung hydrophober Hydratationssphären unter weitgehendem Erhalt der vorliegenden Struktur an Wasserstoffbrückenbindungen.⁷ Wird dieser sehr enge Konzentrationsbereich überschritten, so stören die hydrophoben Domänen die energetisch günstige Wechselwirkung der umgebenden Wassermoleküle mit ihren Nachbarn. Dadurch werden die Amphiphile, initiiert durch die Neuausrichtung der Wassermoleküle, in eine alternative Anordnung gezwungen.⁸ Kann die Phasengrenzfläche wegen bereits vollständiger Belegung nicht weiter besetzt werden, so kommt es zur gegenseitigen Ausrichtung der Amphiphile und damit zur Bildung supramolekularer Aggregate. Für diese Aggregation hydrophober Domänen aufgrund der energetisch bevorzugten Neuausrichtung der Wassermoleküle wurde von Kauzmann der Begriff „hydrophober Effekt“ geprägt.⁹ Durch den hydrophoben Effekt werden die Amphiphile gezwungen, ihre hydrophoben Domänen zueinander auszurichten, um die freie Energie des Systems zu minimieren. Außerdem können auch elektrostatische und sterische Effekte zwischen den polaren Köpfen der Moleküle eine Rolle bei der Phasenseparation spielen.¹⁰

Die Selbstassemblierung von Amphiphilen zu größeren Molekülverbänden ist ein spontaner Prozess, der erst oberhalb einer bestimmten Konzentrationsgrenze abläuft. Sie wird als kritische Mizellbildungskonzentration (engl. *critical micelle concentration*, CMC) bezeichnet. Wie Abb. 2 entnommen werden kann, ist die CMC gleichzusetzen mit der maximalen Konzentration an vollständig solvatisierten Amphiphilen in Lösung. Die durch die Zusammenlagerung einzelner Moleküle gebildeten Assoziationskolloide sind thermodynamisch stabile, jedoch dynamische Aggregate, deren Bausteine sich stets im Gleichgewicht mit freien Molekülen der wässrigen Phase befinden.

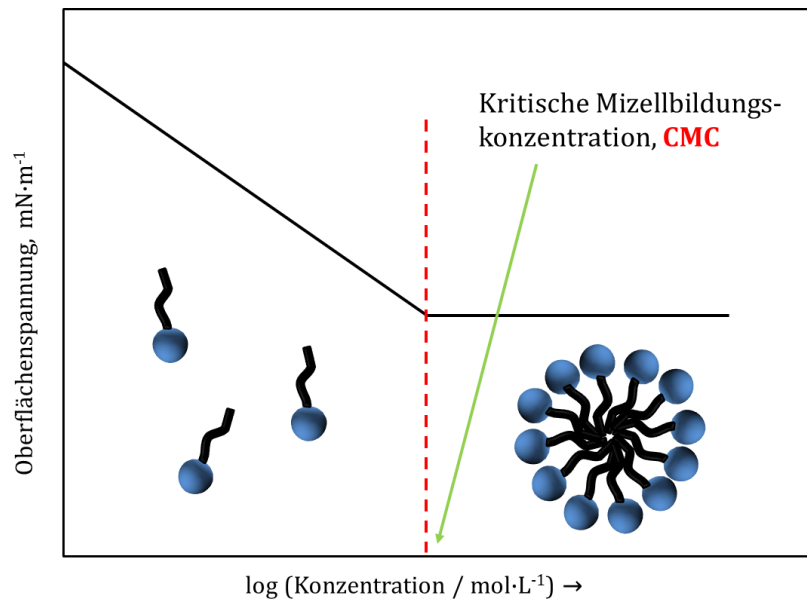


Abb. 2: Kritische Mizellbildungskonzentration.

Die Selbstassemblierung solcher amphiphiler Moleküle kann eine Vielzahl von Aggregationsformen hervorbringen. Neben der molekularen Struktur des jeweiligen Amphiphils sind bei der Bildung auch externe Parameter wie Herstellungsweise, Konzentration, Temperatur, pH-Wert oder Ionenstärke von Bedeutung.¹¹

Als Modell zur theoretischen Beschreibung der für ein Amphiphil zu erwartenden Aggregationsform hat der Packungsparameter P (in der englischsprachigen Literatur *critical packing parameter, cpp*) weite Verbreitung gefunden.^{12,13}

Der Packungsparameter beschreibt die Geometrie eines einzelnen amphiphilen Moleküls innerhalb des Aggregates anhand der effektiven Fläche a_s der hydrophilen Kopfgruppe sowie der Länge l_c und des Volumens v der hydrophoben Domäne (siehe Abb. 3).

P berechnet sich zu

$$P = \frac{v}{a_s \cdot l_c} \quad (1.1)$$

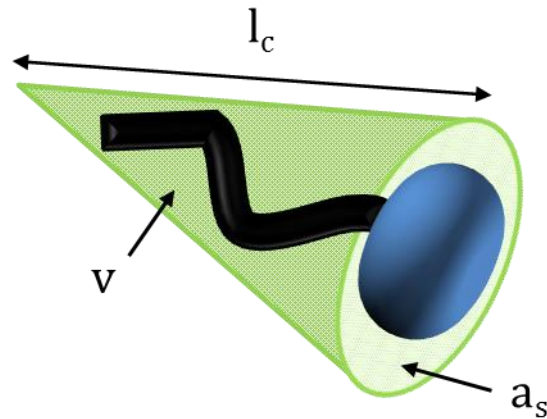


Abb. 3: Bestimmung des Packungsparameters P .

Bei einer großen polaren Kopfgruppe im Vergleich zum hydrophoben Rest ($P < \frac{1}{3}$) assemblieren die Moleküle tendenziell zu sphärischen Mizellen (siehe Abb. 4). Dabei handelt es sich um Aggregate, die eine Kern-Schale-Struktur aufweisen. Die polaren Kopfgruppen der Moleküle weisen nach außen, während die unpolaren Domänen der Moleküle nach innen zueinander gerichtet sind. Solche Aggregate werden oft von niedermolekularen einfachen Kopf/Schwanz-Lipiden oder auch AB-Blockcopolymeren mit dominantem hydrophilem Block A gebildet. Größere Verhältnisse von hydrophobem Volumen zu Kopfgruppe von ca. $\frac{1}{3} < P < \frac{1}{2}$ führen zu zylinderförmigen Strukturen. Überschreitet P das Verhältnis von $P \sim \frac{1}{2}$, so ist die Krümmung der Anordnung bereits viel weniger stark ausgeprägt als bei sphärischen Partikeln und es wird die sogenannte Bilayer-Struktur bevorzugt, bei der sich flexible Doppellagen ausbilden. Die hydrophoben Domänen zweier Amphiphile sind jeweils einander zugewandt und die hydrophilen Domänen zeigen hin zum wässrigen Medium. Im Bereich von $\frac{1}{2} < P < 1$ finden sich vielfach Vesikel, sphärisch geschlossene Doppelschichten (engl. *bilayer*), von deren Aufbau sich die Grundstruktur der biologischen Zellmembran ableitet. Erst bei P -Werten um $P = 1$ kommt es zur Ausbildung ausgedehnter lamellarer Anordnungen. Die Amphiphile haben bei diesem Wert quasi Zylindergestalt. Daher ist die parallele und planare Anordnung der Moleküle begünstigt. Eine nennenswerte Krümmung ist nicht mehr vorhanden. Lamellare Strukturen sind in der Regel sehr groß, weil nur so die energetisch ungünstige Situation an den Lamellenrändern kompensiert werden kann.

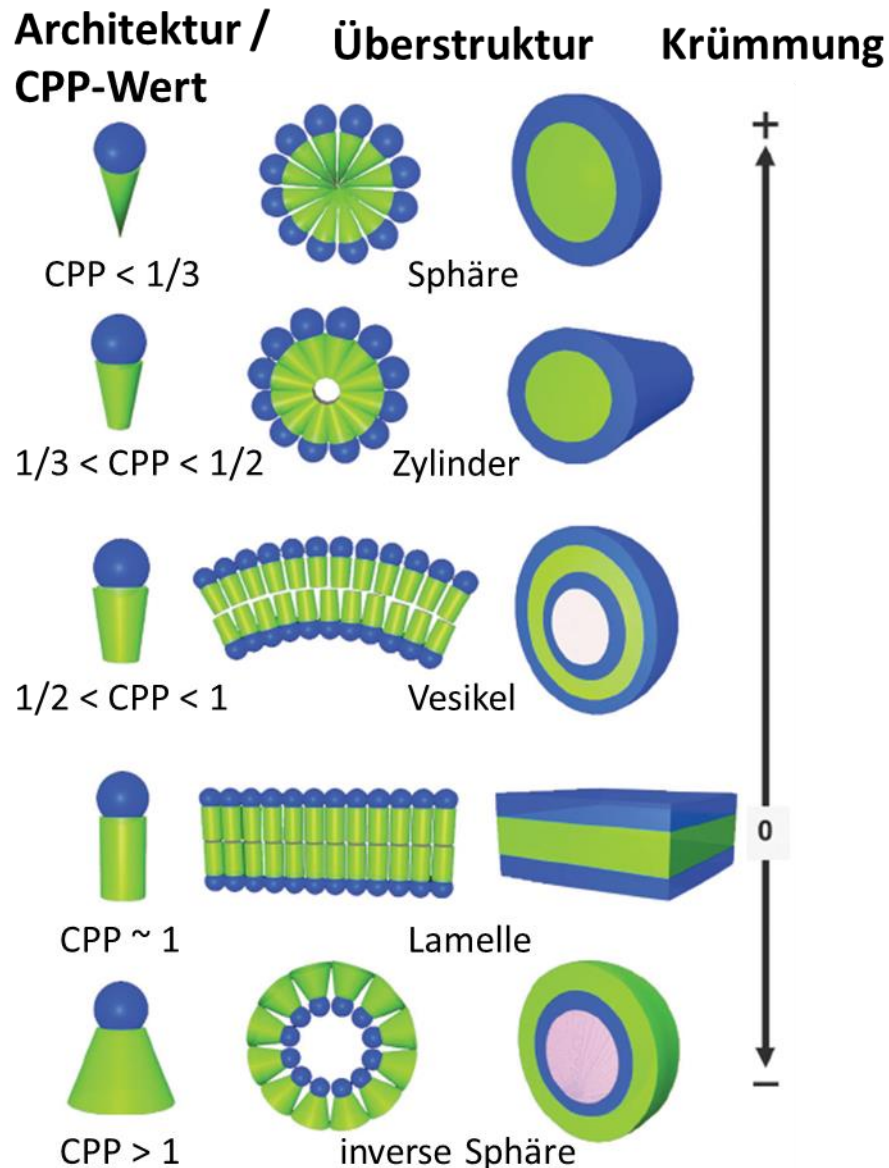


Abb. 4: Molekulare Architektur, gebildete Überstruktur und zugehörige Krümmung amphiphiler Moleküle. Modifiziert nach ¹⁴.

Wie bereits beschrieben, hängt die Assemblierung amphiphiler Moleküle von einer Vielzahl von Faktoren ab. Dies betrifft insbesondere auch die Präparationsweise. Daher kann der Packungsparameter P nur einen Richtwert für die zu erwartenden Strukturen darstellen und es werden zum Beispiel auch prolate, diskotische oder stäbchenförmige Mizellen erhalten. Insbesondere bei höheren Konzentrationen bilden Amphiphile zudem verschiedene lyotrope flüssigkristalline Phasen aus.¹¹

1.1.2 Amphiphile Polymere

Als interessante Alternative zu niedermolekularen Amphiphilen sind in den vergangenen Jahren amphiphile Polymere insbesondere im Bereich der Nanomedizin in den Fokus der Forschung gerückt.¹⁵⁻¹⁹ Sie können im wässrigen Milieu ähnliche Aggregatformen zu denen niedermolekularer Amphiphile ausbilden.²⁰ Die Aggregate polymerer Amphiphile weisen allerdings aufgrund ihres höheren Molekulargewichtes in der Regel eine deutlich höhere mechanische und kolloidale Stabilität auf.²¹

Polymere Amphiphile stellen eine sehr vielfältige Klasse von Materialien dar, die sich nicht nur hinsichtlich der verwendeten Materialien, sondern auch bezüglich deren Architektur variieren lassen. Im einfachsten Fall handelt es sich um Blockcopolymere des Typs AB, wobei einer der beiden Blöcke aus einem hydrophilen Material, der andere aus einem hydrophoben besteht. Darüber hinaus gibt es neben linearen Blockcopolymeren mit mehr als zwei Blöcken auch eine Vielzahl komplizierterer Strukturen wie Pfropf-Copolymere, dendritische und sternförmige Polymere sowie ringförmig geschlossene Amphiphile.²² Weil der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf Systemen liegt, die aus AB-Diblock-Copolymeren assemblieren, sei für Informationen zu anderen Polymerarchitekturen auf die entsprechende Literatur verwiesen.²²⁻²⁴

Analog zum Packungsparameter P bei den niedermolekularen Amphiphilen wird im Fall amphiphiler Blockcopolymere der Volumenanteil des hydrophilen Blocks zur Vorhersage der erwarteten Aggregatstruktur verwendet. Aus Gründen der Praktikabilität wird allerdings meist ersatzweise auf den hydrophilen Massenanteil f zurückgegriffen.^{25,26} Die entsprechende Gestalt bei steigenden Anteilen des hydrophilen Blocks zeigt Abb. 5.

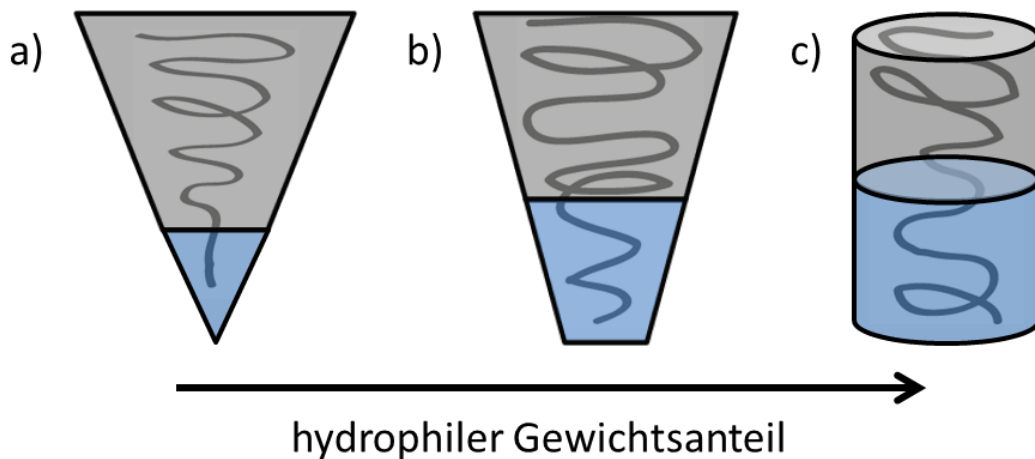


Abb. 5: Modellhafte Gestalt von Polymermolekülen bei verschiedenen Blocklängenverhältnissen. In Analogie zu den Lipiden ergeben sich mit höherem hydrophilem Gewichtsanteil a) mizellare, b) zylinderförmige oder c) vesikuläre oder lamellare Strukturen.

Wie im Fall niedermolekularer Amphiphile sind auch bei Blockcopolymeren überwiegend hydrophiler Zusammensetzung tendenziell sphärische Mizellen zu erwarten. Ihre Bildung ist außerdem wegen der im Vergleich zu anderen Aggregatformen recht einfachen Struktur kinetisch bevorzugt. Daher assemblieren oftmals auch Polymere mit höherem hydrophobem Anteil zunächst zu sphärischen Mizellen, bevor diese sich in andere Aggregatformen umlagern.²¹

Neben den auch bei niedermolekularen Amphiphilen verbreiteten Mizelltypen wie etwa zylindrischen Mizellen treten bei den Blockcopolymeren in vielen Fällen sogenannte Compound-Mizellen auf. Sie besitzen keine einfache Kern-Schale-Struktur, es handelt sich vielmehr um Aggregate inverser Mizellen von geringem Ordnungsgrad, die nach Außen von einer dünnen Schicht hydrophiler Ketten kolloidal stabilisiert werden. Bedingt durch die inverse Anordnung der Polymerketten können sie mehrere kleine wässrige Domänen enthalten und weisen in der Regel eine polydisperse Größenverteilung auf.^{27,28} Zudem kann es zum Auftreten hydrophober Domänen an der Partikeloberfläche kommen (Abb. 6).

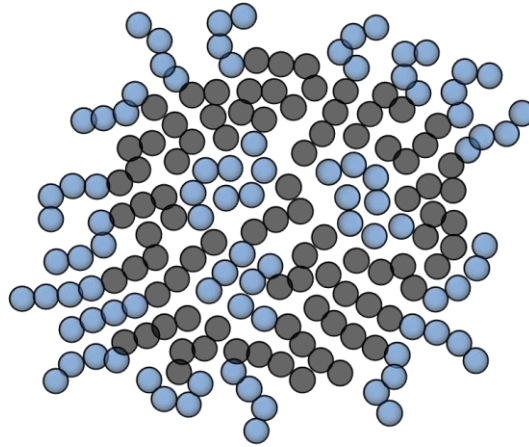


Abb. 6: Skizze Compound-Mizelle.

Vesikel bestehend aus amphiphilen Blockcopolymeren, auch als Polymersome bezeichnet, werden als Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit separat in Kapitel 1.2 behandelt.

Bei der Selbstassemblierung von Blockcopolymeren tragen drei wesentliche Faktoren zur freien Energie des Systems bei, mit denen die Morphologie der Aggregate gesteuert werden kann: der Streckungsgrad des solvophoben Blocks, seine Grenzflächenspannung zum umgebenden Lösungsmittel sowie repulsive Wechselwirkungen zwischen den solvophilen Ketten, welche die Korona bilden.^{21,29,30} Polymere Amphiphile bieten gegenüber niedermolekularen Spezies den großen Vorteil, dass sich die Aggregatform direkt über die Copolymer-Zusammensetzung steuern lässt. Eine detaillierte Betrachtung dieses Sachverhaltes liefern Zhang und Eisenberg anhand des Systems Polystyrol-*b*-Polyacrylsäure.²⁹

Die Grenzflächenspannung und die Wechselwirkung zwischen den hydrophilen Ketten sind für ein gegebenes Blockcopolymer in hohem Maße von den experimentellen Bedingungen abhängig. Sie lassen sich unter anderem durch die Konzentration des Amphiphils, die Natur des gemeinsamen Lösungsmittels und den Gehalt an selektivem Lösungsmittel steuern.

1.2 Polymersome

Polymersome sind Vesikel, die aus amphiphilen Blockcopolymeren aufgebaut sind. Im häufigsten Fall der AB-Blockcopolymeren handelt es sich dabei um eine sphärisch geschlossene Doppelschicht von Polymermolekülen. Ihre Anordnung ist strukturell analog zu den Liposomen, welche aus niedermolekularen Amphiphilen, wie zum Beispiel Phospholipiden, aufgebaut sind (siehe Abb. 4).

Seit ihrer Entdeckung durch Bangham im Jahre 1964³¹ sind Liposome Gegenstand extensiver Studien. Aufgrund ihrer attraktiven biologischen Eigenschaften haben sie insbesondere in der medizinischen Forschung weite Verbreitung gefunden. Sie sind biokompatibel und können aufgrund ihres inneren wässrigen Kompartimentes und der hydrophoben Membran sowohl hydrophile als auch hydrophobe Wirkstoffe aufnehmen. So werden diese vor degradierenden externen Bedingungen geschützt.³² Außerdem können ihre pharmakologisch relevanten Eigenschaften wie Größe, Ladung oder Oberflächenmodifizierung durch die geeignete Wahl der Herstellungsbedingungen und der Beimischung entsprechend funktionalisierter Lipidderivate gezielt beeinflusst werden.³²⁻³⁵

Phospholipidvesikel weisen allerdings aufgrund der geringen molaren Masse ihrer konstituierenden Bausteine verschiedene Nachteile auf. Dazu gehören eine hohe Austauschrate, geringe mechanische Stabilität und die relativ hohe Permeabilität der Lipidmembran sowie eine schnelle Eliminierung durch Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS).³⁶ Schon seit den 70er Jahren wurde daher an synthetischen Bilayer-Membranen geforscht, welche die Nachteile natürlicher Phospholipide überwinden sollten.

Zu diesem Zweck wurde zunächst von Regen, Czech und Singh das Konzept der *Polymerisierten Vesikel* entwickelt.³⁷ Kernpunkt ist die nachträgliche Quervernetzung zuvor gebildeter Vesikel mittels einer polymerisierbaren funktionellen Gruppe. Durch die Verwendung solcher synthetischer Amphiphile sollen bei deutlich verbesserter Stabilität und Zirkulationszeit die wesentlichen Vorteile der Vesikel erhalten bleiben. Dieses Konzept wurde zunächst mittels einer Methacrylatfunktionalisierten aliphatischen Ammoniumverbindung umgesetzt. Daraus hergestellte Vesikel wiesen eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber dem Auflösen

durch Zugabe von Ethanol auf.³⁷ Später erfolgten Weiterentwicklungen dieses Konzeptes wie etwa die Verwendung quervernetzbarer Cholesterinderivate,³⁸ welche gut mit Phospholipiden mischbar sind. Außerdem wurden Polymer-Lipid-Konjugate zur sterischen Stabilisierung von Lipidvesikeln entwickelt.³⁹ Dieses Konzept soll die Lipidvesikel sterisch von ihrer Umgebung abschirmen und so die Adsorption von Proteinen reduzieren. Es ist heute insbesondere in Form PEGylierter Lipidvesikel weit verbreitet.⁴⁰ Nachteilig ist bei der Verwendung von Polymer-Lipid-Konjugaten jedoch, dass sie aus sterischen Gründen nur in einem Umfang von ca. 10 % zugesetzt werden können. Die physikalischen Eigenschaften der Vesikel werden demnach weiterhin hauptsächlich vom verwendeten niedermolekularen Lipid bestimmt.⁴¹ Zudem besteht bei vielen Konjugaten dieses Typs eine Tendenz zur Segregation. Sie dissoziieren aus der Lipidmembran heraus und bilden eigene Mizellen.⁴²

1995 beobachtete van Hest erstmals Vesikel aus amphiphilen Polymeren. Er verglich die Morphologie von dendritischen Poly(styrol)-*dendr*-poly(propylenimin) Polymeren verschiedener Generationenzahl und stellte fest, dass PS_{30} -*dendr*-(NH₂)₈ im wässrigen Milieu zu Vesikeln aggregierte.⁴³

Die ersten Vesikel auf der Basis amphiphiler Diblockcopolymere publizierten Zhang und Eisenberg im folgenden Jahr.⁴⁴ Sie formen eine doppelschichtige Membran nach dem Vorbild von Lipidvesikeln. Dabei weisen sie aufgrund ihres wesentlich höheren Molekulargewichts und der sterischen Stabilisierung durch ihre hydrophile Korona eine sowohl kolloidal, als auch mechanisch deutlich höhere Stabilität auf. Wegen dieser Eigenschaften sind Polymervesikel seitdem Gegenstand umfangreicher Forschung, insbesondere als vielversprechende Alternative zu Lipidvesikeln für die Anwendung als Wirkstoffträger.

1.2.1 Grundlegende Eigenschaften

Bezüglich ihrer Größe werden Polymervesikel analog zu den Lipidvesikeln kategorisiert: Man unterscheidet je nach Durchmesser zwischen kleinen Vesikeln (small unilamellar vesicles, SUV), großen Vesikeln (large unilamellar vesicles, LUV) und Riesenvesikeln (giant unilamellar vesicles, GUV). Daneben finden sich multilamellare Vesikel (MLV) und sogenannte multivesikuläre Vesikel, bei denen mehrere

separate Vesikel innerhalb der Membran eines äußeren Vesikels eingeschlossen sind.

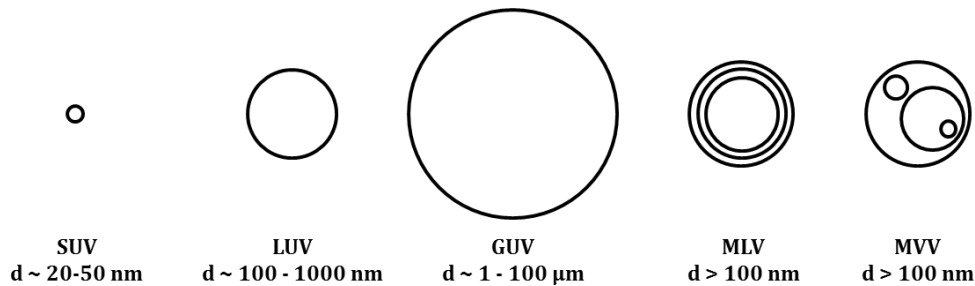


Abb. 7: Kategorisierung von Vesikeln.

Neben dem bei Lipiden gebräuchlichen Packungsparameter P hat sich bei Blockcopolymeren der hydrophile Gewichtsanteil f der Polymerketten als Parameter zur Abschätzung der Aggregatstrukturen in wässrigen Lösungsmitteln durchgesetzt.²⁵ Als Faustregel gilt, dass die Assemblierung zu Vesikeln bevorzugt auftritt, wenn

$$f = (35 \pm 10) \%$$

beträgt.^{45,46}

Dieser Wert entspricht ungefähr dem Verhältnis, welches bei vielen Phospholipiden angetroffen wird. Er darf aufgrund der Mannigfaltigkeit an verfügbaren Blockmaterialien jedoch nur als grober Richtwert gesehen werden. Die für ein bestimmtes Polymer gefundene Struktur hängt, wie auch bei den niedermolekularen Amphiphilen, stark von den konkreten experimentellen Bedingungen ab.²¹ Hinzu kommt die quasi allen synthetischen Blockcopolymeren inhärente Dispersität: Die zur Kolloidherstellung verwendete Charge des Polymers enthält Moleküle unterschiedlichen Polymerisationsgrades und damit verschiedener hydrophiler Gewichtsanteile. Daher werden in vielen Fällen statt einer einzelnen Aggregatform Gemische verschiedener Überstrukturen erhalten.

Die Entstehung von Vesikeln wird derzeit noch nicht umfassend verstanden. Für ihre Bildung aus individuellen Blockcopolymermolekülen werden aktuell aufgrund theoretischer Studien zwei verschiedene Mechanismen angenommen. Sie unterscheiden sich maßgeblich in ihrer Effizienz für den Einschluss hydrophiler Stoffe (engl. *Encapsulation Efficiency*, EE). Beide gehen von der initialen und sehr schnellen Bildung kleiner sphärischer Mizellen aus (siehe Abb. 8).

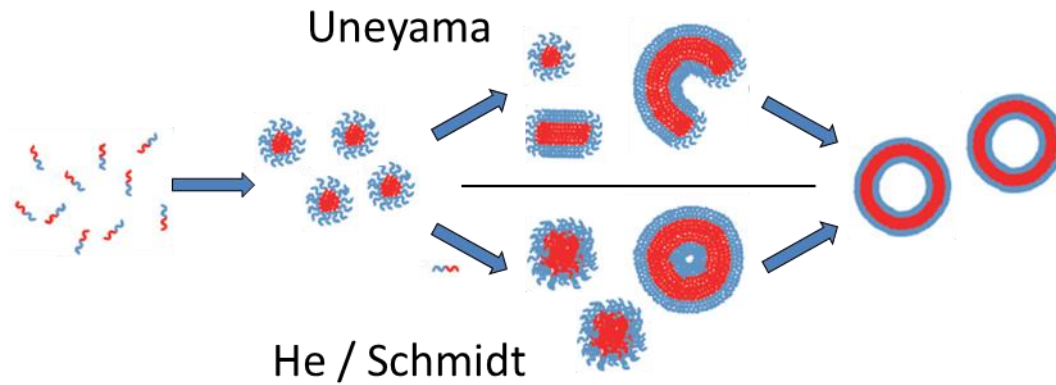


Abb. 8: Mechanismen der Vesikelbildung nach Uneyama (oben) und He / Schmidt (unten). Modifiziert nach ⁴⁷.

Nach Uneyama fusionieren die sphärischen Mizellen zu anisotropen stäbchen- und scheibenförmigen Mizellen. Diese werden schließlich so groß, dass ihre Flexibilität eine Krümmung ermöglicht.⁴⁸ Um die Grenzflächenenergie des Systems zu minimieren, schließt sich das planare Aggregat zum Vesikel.⁴⁹ Dabei kommt es zur Verkapselung von Stoffen, die im eingeschlossenen wässrigen Medium gelöst sind. He und Schmid schlagen einen Mechanismus vor, bei dem die sphärischen Mizellen durch die Aufnahme weiterer Polymerketten aus der Lösung zu Clustern geringer Ordnung anwachsen. Durch langsame interne Umordnungsprozesse und Quellen der inneren hydrophilen Domänen mittels absorbiertem Lösungsmittel kommt es schließlich zur Ausbildung von Vesikeln.⁵⁰ In diesem Prozess wird allerdings kein größeres wässriges Kompartiment verkapselt und die Einschlusseffizienz für hydrophile Stoffe ist gering.

Trotz der schwierigen Verifizierung sehr kurzlebiger Zwischenzustände in solchen Systemen gibt es für den Ablauf beider Mechanismen experimentell belegte Anhaltspunkte.⁵¹⁻⁵³ Es ist nach derzeitigem Stand also davon auszugehen, dass verschiedene Wege der Bildung von Polymervesikeln möglich sind.⁵⁴ Der Verlauf ist von den konkreten experimentellen Bedingungen abhängig.

Wie bereits beschrieben, ist der häufigste Typ von Polymeren, die zur Herstellung von Polymersomen verwendet werden, das AB-Blockcopolymer. Wie Abb. 9 zeigt, folgt auf eine Sequenz an hydrophilen Wiederholungseinheiten A eine zweite Sequenz, bestehend aus hydrophoben Einheiten B. Daneben sind auch Triblock-

Copolymere der Typen ABA, BAB und ABC anzutreffen, wobei C ebenfalls eine Sequenz hydrophiler Einheiten darstellt:

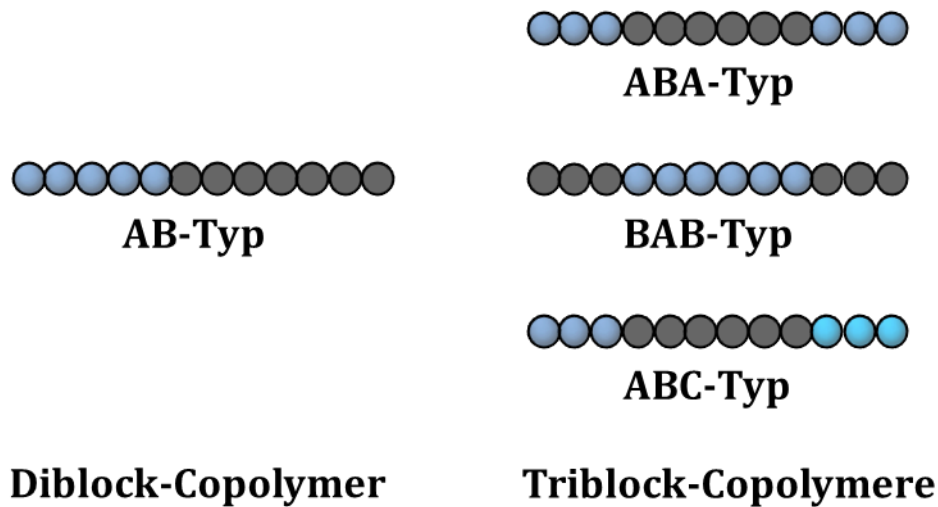


Abb. 9: Typen amphiphiler Blockcopolymeren für die Herstellung von Polymersomen.

Abb. 10 zeigt die Anordnungsmöglichkeiten der verschiedenen Typen in der Membran. Es ist ersichtlich, dass es lediglich bei den Typen AB und ABA zur Ausbildung einer Doppelschicht analog der Membran von Lipidvesikeln kommt. Triblock-Copolymere ABA orientieren sich dabei in der sogenannten U-Form, bei der gegenüberliegende B-Blöcke den hydrophoben Teil der Membran darstellen. Pro Polymermolekül tragen jeweils zwei wasserlösliche Blöcke A zur Ausbildung der hydrophilen Korona bei. Darüber hinaus können sich ABA-Blockcopolymeren auch in I-Form anordnen. Es liegt dann keine Bilayer-Anordnung vor, sondern eine sphärisch geschlossene Monoschicht. Dieser Fall tritt in Abgrenzung zur U-Form vor allem dann auf, wenn einer der beiden A-Blöcke im statistischen Mittel deutlich kürzer ist als der andere oder wenn es sich wie bei der ABC-Architektur um ein anderes hydrophiles Material handelt. In beiden Fällen stellt der kürzere Block aufgrund der Krümmung der Membran einen tendenziell größeren Anteil an der hydrophilen Domäne dar, welche zum Vesikelinneren hin gewandt ist.⁵⁵

Das hohe Molekulargewicht von Blockcopolymeren im Vergleich zu Lipiden hat außerdem einen großen Einfluss auf die CMC.

Nach

$$c_{CMC} \sim \exp\left(-\frac{n\varepsilon_h}{k_B T}\right) \quad (1.2)$$

ist die kritische Mizellbildungskonzentration von der Anzahl der Wiederholungseinheiten n und damit vom Molekulargewicht des hydrophoben Blocks abhängig. Amphiphile Blockcopolymerer neigen also im Vergleich zu Lipiden schon bei sehr niedriger Konzentration zu Aggregation. Die CMC liegt hier je nach Material und Blocklänge in einer Größenordnung um ca. $10^{-6} - 10^{-7}$ mol/L.^{63,64} Zudem ist die Austauschrate einzelner Moleküle zwischen den Aggregaten proportional zur CMC, sie ist also ebenfalls sehr gering.

Die hohe Membrandicke in Kombination mit der geringen Diffusionsfähigkeit der Polymermoleküle sowie die inhärente sterische Stabilisierung machen Polymere zu außerordentlich stabilen Aggregaten. Sie werden daher trotz ihres (im Fall von Diblock-Copolymeren) strukturanalogen Aufbaus zu Lipidvesikeln bezüglich ihrer Materialeigenschaften zunehmend mit viralen Capsiden verglichen. Diese weisen vergleichbare Molekulargewichte ihrer konstituierenden Bausteine auf sowie ähnliche Robustheit und geringe Permeabilität.^{46,65-67}

1.2.2 Herstellungsmethoden

Die Methoden zur Herstellung von Polymersomen leiten sich im Wesentlichen von den Präparationsmethoden für Lipid-basierte Vesikel ab. Aufgrund des höheren Molekulargewichts der einzelnen Bausteine ist die Vesikelbildung allerdings kinetisch deutlich erschwert und außerdem von den jeweiligen blockspezifischen Materialeigenschaften abhängig.⁶⁸ Eine grundsätzliche Unterscheidung der Herstellungsmethoden erfolgt in lösungsmittelfreie Techniken und in solche, die die Verwendung eines oder mehrerer organischer Lösungsmittel erfordern. In letzterem Fall wird das Polymer zunächst in einem guten Lösungsmittel für beide Blöcke gelöst. Gegebenenfalls muss ein Lösungsmittelgemisch verwendet werden. Anschließend wird ein selektives Lösungsmittel für den hydrophilen Block zu-

gegeben⁶⁹ - meist Wasser oder wässrige Puffersysteme. Das Ergebnis dieser als Phaseninversion bekannten Herstellungsweise ist abhängig vom Lösungsmittelgehalt und der Rate der Wasserzugabe.²¹ Nachteilig ist, dass die restlose Entfernung des organischen Lösungsmittels oftmals nur schwer zu erzielen ist, was die Anwendung im biomedizinischen Bereich einschränkt.

Die lösungsmittelfreie Herstellung erfolgt meist mittels Filmrehydratisierung. Ein dünner Film des Polymermaterials wird in Kontakt mit der wässrigen Phase gebracht. Getrieben durch den Konzentrationsgradienten zwischen den beiden zunächst reinen Polymer- bzw. Wasserphasen diffundiert Wasser in den Polymerfilm hinein, während gleichzeitig Polymermoleküle in die wässrige Phase diffundieren, wenn auch bedeutend langsamer.⁷⁰ Weil dieser Prozess je nach Polymer extrem langsam ablaufen kann, werden oft externe Energiequellen zu Hilfe genommen (Temperaturerhöhung, Ultraschall, Wechsellspannung, mechanische Durchmischung). Bedingt durch die Quellung bilden sich lyotrope lamellare Phasen aus, die sich über die Bildung verschiedener bikontinuierlicher Phasen schließlich zu Vesikeln abschnüren.^{70,71}

Bei der Filmrehydratisierung entstehen in vielen Fällen aufgrund des Bildungsmechanismus große, multilamellare Vesikel. Aus diesen können mittels nachträglicher Extrusion unilamellare und bezüglich ihrer Größenverteilung sehr homogene Vesikel gewonnen werden.⁷² Dazu wird die Vesikeldispersion oberhalb der Phasenübergangstemperatur mehrmals durch eine Membran gepresst, deren Poren kleiner als der Vesikeldurchmesser sind. Bedingt durch die dabei wirkenden Scherkräfte werden die äußeren Doppelschichten der multilamellaren Vesikel sowie großer unilamellarer Vesikel fragmentiert. Aufgrund der hohen Grenzflächenspannung bilden diese Fragmente unmittelbar wieder geschlossene vesikuläre Strukturen kleineren Durchmessers aus.^{73,74}

1.2.3 Anwendungen

Bei der Erforschung von potentiellen Anwendungen für Polymervesikel spielen die beschriebene mechanische sowie kolloidale Stabilität und die vielfältige chemische Modifizierbarkeit durch die Wahl entsprechender Blockmaterialien für den hydrophilen bzw. hydrophoben Block die wichtigste Rolle. Das derzeit bei Weitem am

intensivsten untersuchte Feld ist die biomedizinische Anwendung. Hier sind Polymersome aufgrund ihrer intrinsischen Eigenschaften und der mannigfaltigen Möglichkeiten zur Funktionalisierung Gegenstand verschiedenster Forschungsprojekte. Sie finden Anwendung als Wirkstoffträger (*drug delivery*) und zur Diagnostik sowie in der Kombination von Wirkstofftransport und Bildgebung (*theranostics*).⁷⁵ Der zweite große Forschungsbereich ist die Anwendung von Polymersomen als individuelle, kleinteilige, gegen das umgrenzende Medium abgegrenzte Reaktionsräume. Diese werden aufgrund der Größe der verwendeten Vesikel als Nanoreaktoren bezeichnet.

Hinsichtlich der Anwendung als Wirkstoffträger können Polymervesikel sowohl mit wasserlöslichen Substanzen, als auch mit hydrophoben Wirkstoffen beladen werden. So konnten beispielsweise die in der Krebstherapie verwendeten Cytostatika Doxorubicin und Paclitaxel in die Membran von Polymervesikeln eingelagert werden. Diese zeigten ähnliche Beladungseffizienzen verglichen mit anderen Trägern, waren aber deutlich stabiler.^{76,77} Neben Farbstoffen und Nanopartikeln⁷⁸ konnten auch verschiedene Typen von Membranproteinen eingelagert werden, deren Funktionalität durch die Rekonstitution in der Polymermembran erhalten blieb.^{79,80} Bezüglich der Beladung mit wasserlöslichen Wirkstoffen sind Polymersome sehr vielseitig anwendbar. Sie sind nicht auf bestimmte Strukturmerkmale des zu verkapselnden Wirkstoffes angewiesen, wie z.B. Polyplexe, die durch die elektrostatische Komplexierung negativ geladener DNA mittels eines kationischen Polymers gebildet werden.⁸¹ Zu den therapeutisch wie diagnostisch bedeutenden, bisher in Polymersomen verkapselten Substanzklassen zählen Proteine wie Hämoglobin,^{82,83} außerdem DNA,⁸⁴ siRNA,⁸⁵ radioaktiv markierte Zytostatika⁸⁶ und hydrophil funktionalisierte superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (SPION).⁸⁷ Für einen umfassenden Überblick über dieses insbesondere seit ca. zehn Jahren intensiv erforschte Feld sei auf die entsprechende Übersichtsliteratur verwiesen.⁸⁸⁻⁹⁴

Die wichtigsten Grundvoraussetzungen für den erfolgreichen Einsatz als Wirkstoffträger sind eine Anreicherung der Polymervesikel im Zielgewebe (passives und aktives Targeting, Kap. 1.3.1) sowie die kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffes durch die kaum permeable Membran hindurch. Mittels externer Stimulation kann

die hydrophobe Membrandomäne abgebaut oder hydrophilisiert werden. Dadurch kommt es zur Desintegration der Vesikel, verbunden mit der Freisetzung des verkapselten Wirkstoffes. Solche Systeme wurden bisher unter anderem unter Verwendung enzymatisch abbaubarer Polymere realisiert. Ferner wurden Polymere eingesetzt, die auf pH- oder Temperaturänderungen sowie auf Redoxpotentiale oder die Bestrahlung mit Licht reagieren.⁹⁵⁻⁹⁷ Einige wichtige Beispiele sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Stimuli-responsive Blockcopolymere für die Herstellung von Polymersomen.

Polymer	Stimulus	Polymer	Stimulus
PMPC-PDPA ⁸⁴	pH	PEG-PPS-PEG ⁶³	Oxidation
PGA-PB ⁹⁸	pH	PEG-SS-PPS ⁹⁹	Reduktion
PEG-PLA/PCL ^{100,101}	pH	PNIPAAM-PLA ¹⁰²	Temperatur
PMet-P(Leu-s-Phe) ¹⁰³	Enzym	PEG-PNIPAAM ¹⁰⁴	Temperatur
PAA-PAzoMA ¹⁰⁵	UV	PEG-PLA + Luft ¹⁰⁶	Ultraschall

Alternativ zur vollständigen Desintegration der Vesikel ist eine lokale Erhöhung der Permeabilität möglich. Dies kann chemisch erfolgen, wie zum Beispiel durch photochemisch initiierte Vernetzung von PEG-*b*-PNBOC.¹⁰⁷ Unter UV-Bestrahlung werden aus den hydrophoben Carbamaten des PNBOC-Blocks primäre Amine freigesetzt, die mit benachbarten Estergruppen Amide bilden. Hierbei wird die Membran zwar durch Vernetzung stabilisiert, verliert aber gleichzeitig lokal ihren hydrophoben Charakter und wird permeabel. Ein weiterer interessanter Ansatz ist das Quellen quervernetzter Membranen, wie von Voit und Mitarbeitern demonstriert:^{108,109} Vesikel bestehend aus PEG-*b*-PDEAEM-*stat*-PDMIEM Blockcopolymeren werden mittels UV-Bestrahlung quervernetzt. Anschließend können durch Absenken des pH-Wertes die DEAM-Wiederholungseinheiten protoniert werden, was die Membran quellen lässt und sie somit permeabel für niedermolekulare Stoffe macht.

Neben der retardierten, kontinuierlichen Freisetzung eines pharmakologisch aktiven Stoffes beim Einsatz als Wirkstoffträger ist eine derartige gezielte Permeabilisierung der Membran insbesondere bei der Konstruktion von Nanoreaktoren relevant. Hierdurch können Eduktmoleküle in das Vesikel hineindiffundieren und dort etwa mittels eines Enzyms umgesetzt werden. Die Produktmoleküle diffundieren anschließend aus dem Nanoreaktor hinaus.

Aber auch ohne vorherige Quervernetzung der Membran kann die Permeabilität von Polymersomen gesteigert werden. Der Einbau von Enzymen wie CalB Lipase¹¹⁰ oder die Rekonstitution von Membranproteinen wie OmpF,¹¹¹ LamB,¹¹² AqpZ¹¹³ oder NADH:Ubichinon Oxidoreduktase¹¹⁴ unter Erhalt ihrer natürlichen Struktur und Funktion erlauben den hochselektiven Transport durch die Polymermembran hindurch. Die Rekonstitution erfolgt in eine Membran, deren Dicke die der Lipidmembran, in welche diese Proteine üblicherweise inseriert sind, um ein Mehrfaches übersteigt. Computersimulationen lassen vermuten, dass sich die Polymerketten aufgrund ihrer Kompressibilität und intrinsischen Größendispersität kraterförmig anordnen, sodass sie die hydrophoben Domänen der viel kleineren Transmembranproteine stabilisieren (siehe Abb. 11).

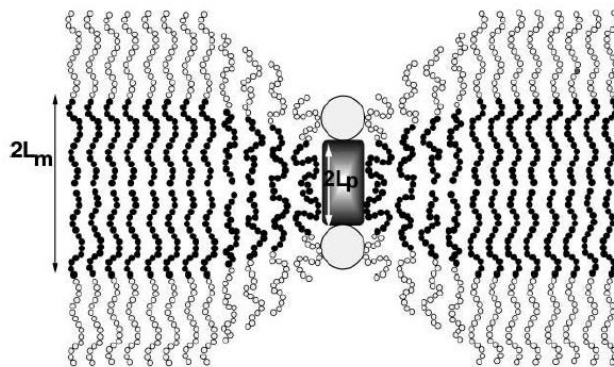


Abb. 11: Anordnung der Polymerketten bei der Insertion eines Transmembranproteins.¹¹⁵

1.3 Polymere Therapeutika

Schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts erkannte Paul Ehrlich, dass für pharmakologisch aktive Substanzen die Erreichbarkeit des angedachten Wirkungsortes eines der zentralen Hemmnisse bezüglich ihrer Wirkungsentfaltung ist. Er ersann das Konzept von Wirkstoffträgern, die „ihr Ziel wie die Freikugeln des Freischütz tref-

fen, ohne dass es einer besonderen Zielung bedarf¹¹⁶. Den Grundstein für die praktische Umsetzung einer solchen „magischen Kugel“ legte Ringsdorf Mitte der 70er Jahren mit seinem Modell der pharmakologisch aktiven Polymere:

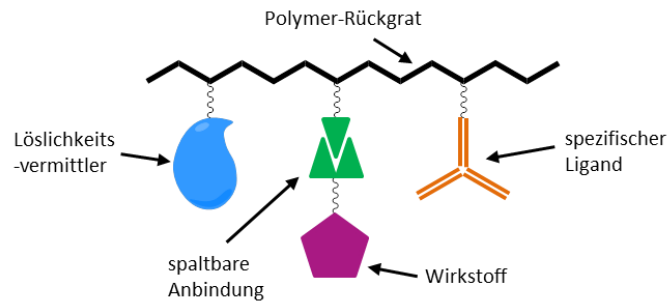


Abb. 12: Pharmakologisch aktive Polymere nach Ringsdorf.¹¹⁷

Das Konzept sieht die reversible Anbindung des Wirkstoffes an ein wasserlösliches, nicht-toxisches Polymer vor. Durch zusätzlich eingebrachte Liganden, die spezifisch an geeignete Zielstrukturen binden, soll eine verstärkte Aufnahme im Zielgewebe erfolgen.

Ringsdorf nahm damit eine ganze Reihe von Prinzipien vorweg, nach denen die heutige Forschung im Bereich polymerer Wirkstoffträger aufgebaut ist. So kann durch die Anbindung der oftmals hydrophoben Wirkstoffe an ein wasserlösliches Polymer dessen Wasserlöslichkeit gesteigert und die pharmakologische Verfügbarkeit beträchtlich gesteigert werden. Zusätzlich wird der Wirkstoff durch das Polymer vor degradierenden Einflüssen geschützt. Weiterhin kann er bei entsprechendem Molekulargewicht des Polymer-Wirkstoff-Konjugates oder des polymerbasierten Nanopartikels nur schwer über die Nieren ausgeschieden werden. Bedingt durch den Porendurchmesser des Nierenendothels von ca. 3-5 nm können größere Partikel nicht herausfiltriert werden.¹¹⁸ Dies entspricht, abhängig von den Eigenschaften des konkret betrachteten Polymers, einem Molekulargewicht von ca. 30-50 kDa.¹¹⁹ Polymerpartikel, die über dieser Schwelle liegen, weisen eine erhöhte Zirkulationszeit im Körper auf.¹²⁰

Angestoßen durch Ringsdorf hat sich in den vergangenen 40 Jahren in Bezug auf polymere Therapeutika ein breites Forschungsfeld entwickelt. Es umfasst nach Duncan^{121,122} die Klassen polymerer Wirkstoffe¹²³, Polymer-Wirkstoff-¹²⁴ und Polymer-Protein-Konjugate^{125,126} sowie polymere Mizellen¹²⁷ und Polyplexe.¹²⁸

1.3.1 Polymere Trägersysteme in der Krebstherapie: aktives und passives Targeting

Polymere Therapeutika sind insbesondere auf dem Gebiet der Krebstherapie Gegenstand intensiver Forschung. Viele Zytostatika, wie etwa Paclitaxel, besitzen einen geringen therapeutischen Index, also ein ungünstiges Verhältnis von toxischer und therapeutisch wirksamer Dosierung. Sie sind schlecht bioverfügbar und wirken außerdem systemisch. Ihre Anwendung ist also in der Regel mit vielen Nebenwirkungen verbunden.

Aufbauend auf dem Ringsdorf'schen Konzept des pharmakologisch aktiven Polymers wurden vielfältige Bemühungen unternommen, den Einsatz von Polymeren als Trägersysteme in der Krebstherapie zu optimieren.^{35,129-131}

Eine zentrale Rolle spielt dabei die gezielte Anreicherung des Wirkstoffes im Zielgewebe. Neben der verminderten renalen Ausscheidung kommt der höheren Masse bzw. dem größeren hydrodynamischen Radius von polymeren Therapeutika gegenüber niedermolekularen Wirkstoffen auch hier eine wichtige Bedeutung zu. Grund hierfür ist die Physiologie solider Tumore, die in Abb. 13 schematisch im Vergleich zu gesundem Gewebe skizziert ist.

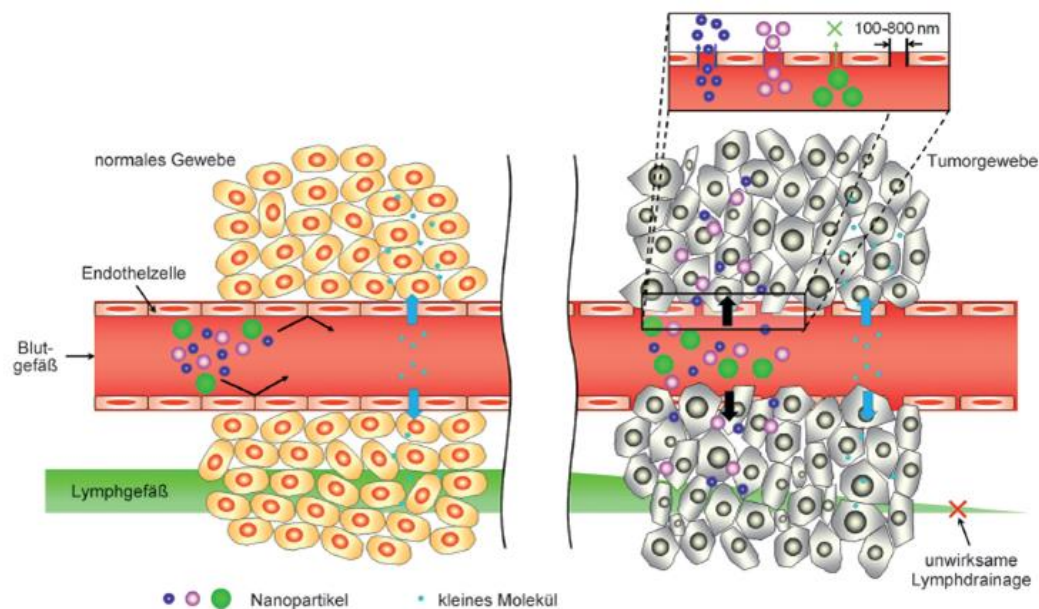


Abb. 13: Transport von Nanopartikeln verschiedener Größen und kleiner Moleküle durch normales (links) und kanzeröses (rechts) Gewebe.¹³²

Normalerweise sind die Endothelzellen der Blutgefäße durch schmale Bänder aus Membranproteinen, die sogenannten *tight junctions*, eng miteinander verknüpft. Daher ist die Endothelschicht für Nanopartikel aufgrund ihrer Größe nicht passierbar. Bei der schnellen Angiogenese in Tumoren kommt es allerdings sehr häufig zu Fehlbildungen der Endothelmembran, die zur Fenestrierung führt. Wie Abb. 13 zeigt, handelt es sich dabei um bis zu mehrere hundert Nanometer breite Lücken zwischen den Zellen, durch die Nanopartikel in das Tumorgewebe hinein diffundieren können. Weil zusätzlich auch das Lymphsystem in Tumoren fehlgebildet ist, kann keine effiziente Lymphdrainage erfolgen. Folglich kommt es in vielen Tumoren aufgrund der verstärkten Aufnahme von Nanopartikeln gegenüber normalem Gewebe bei gleichzeitig erschwerter Drainage zu einer Anreicherung. Dieser von Maeda und Mitarbeitern¹³³ erstmals beschriebene und als *enhanced permeability and retention*, EPR, bezeichnete Effekt erlaubt das passive Targeting von tumorösem Gewebe durch polymere Wirkstoffträger.³⁴ Zwar verteilen sich die wirkstoffbeladenen Polymerpartikel weiterhin im gesamten Blutkreislauf, sie reichern sich durch die erleichterte Passage der endothelialen Membran tendenziell jedoch stärker im Tumor an. Problematisch ist allerdings, dass Tumore oftmals sehr inhomogen vaskularisiert sind und eine gleichmäßige Verteilung der Nanopartikel im gesamten Tumor nicht gewährleistet ist. Zudem kann der EPR-Effekt bei noch nicht ausreichend stark vaskularisierten Neoplasien oder Metastasen nicht genutzt werden.¹³⁴

Ergänzend zum passiven Targeting kann durch die Anbindung geeigneter Liganden an den polymeren Wirkstoffträger auch aktives Targeting genutzt werden. Dabei handelt es sich um kein Konzept zur verstärkten Anreicherung im Tumor wie beim EPR-Effekt. Vielmehr wird mittels geeigneter Erkennungsstrukturen versucht, die Zellaufnahme durch rezeptorvermittelte Endozytose zu verbessern.¹³⁵ Auch wenn die vorausgehende Tumorrakkumulation durch die schlechte Vaskularisierung erschwert ist, kann auf diese Weise durch die höhere intrazelluläre Wirkstoffkonzentration die therapeutische Dosis gesenkt werden.^{136,137} Zur Funktionalisierung eignen sich Liganden, deren Rezeptoren von Tumorzellen spezifisch exprimiert werden, oder die zumindest im Vergleich zu gesundem Gewebe abnormal häufig präsentiert werden. Geeignet sind zum Beispiel Folsäure,¹³⁸ Antikörper¹³⁹

oder ihre funktionalen Domänen,¹⁴⁰ Oligonukleotide, Wachstumsfaktoren¹⁴¹ und Zuckerstrukturen wie Mannose.¹⁴²

1.3.2 P(HPMA) in der Nanomedizin

Poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamid), P(HPMA), ist eines der am längsten und intensivsten untersuchten Materialien in der Erforschung polymerer Therapeutika. Ursprünglich von Kopeček und Mitarbeitern als Plasmaexpander entwickelt,¹⁴³ wurde P(HPMA) aufgrund seiner geringen Immunogenität und systemischen Toxizität¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ früh auf seine Eignung als Bestandteil von Polymer-Wirkstoff-Konjugaten getestet. So entwickelten Duncan und Mitarbeiter in Kooperation mit Kopeček das P(HPMA)-Doxorubicin-Konjugat PK1¹⁴⁷ (siehe Abb. 14a). PK1 war das erste derartige System, welches in klinischen Studien aufgrund des EPR-Effektes eine Anreicherung in Tumoren nach intravenöser Applikation zeigte.¹⁴⁸

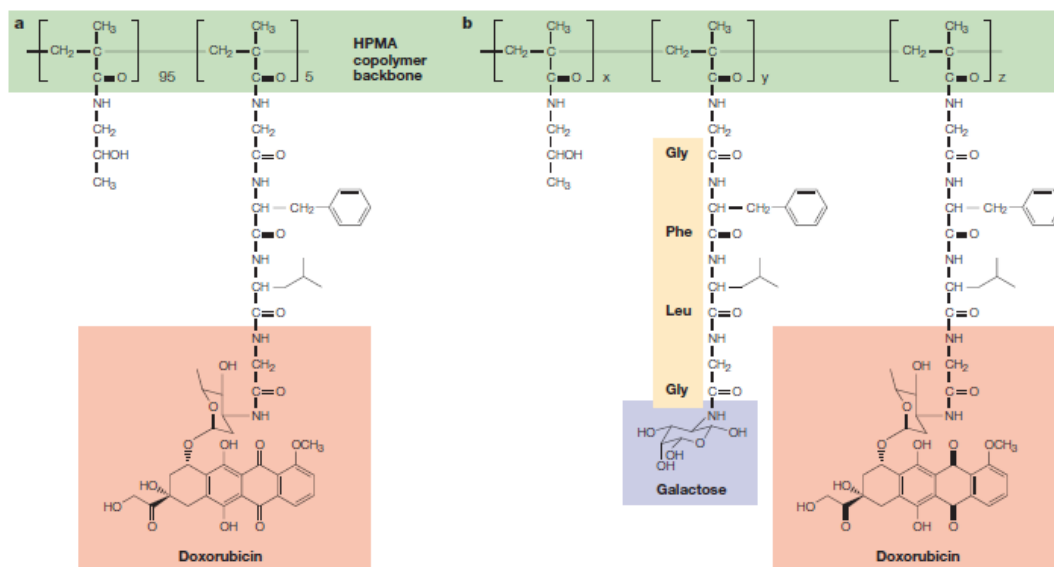


Abb. 14: Struktur von PK1 und PK2.

a) HPMA-Copolymer-Doxorubicin (PK1; FCE20868),

b) HPMA-Copolymer-Doxorubicin mit Galactosamin (PK2; FCE28069).¹²²

Abb. 14b zeigt die modifizierte Variante PK2.¹⁴⁷ Hier ist zusätzlich Glucosamin¹⁴⁹ über dieselbe Peptidsequenz Gly-Phe-Leu-Gly an das P(HPMA)-Rückgrat konjugiert. Unter Zuhilfenahme dieses Targeting-Liganden konnte mittels PK2 bei Patienten mit primären und metastasierten Lebertumoren eine Anreicherung von knapp 17 % des applizierten Wirkstoffes in der Leber erreicht werden.¹⁵⁰

In der klinischen Evaluierung befinden sich neben PK1 und PK2 derzeit außerdem P(HPMA)-Copolymer-Carboplatinate^{151,152} und -DACH-Platinate.¹⁵³⁻¹⁵⁵ Klinische Studien mit Camptothecin-¹⁵⁶ und Paclitaxel-Konjugaten¹⁵⁷ wurden dagegen wegen der zu schnellen Freisetzung im Organismus aufgrund labiler Linker in Phase I beendet.¹⁵⁸

Aber auch jenseits der Krebstherapie haben HPMA-Wirkstoff-Konjugate zunehmende Verbreitung in der medizinischen Forschung gefunden.¹⁵⁹

So werden Konjugate von P(HPMA) und Prostaglandin E1 (PGE1) auf ihre Wirksamkeit gegen Osteoporose untersucht. PGE1 regt hocheffektiv den Aufbau von Knochenmaterial an, induziert aber bei der alleinigen systemischen Gabe schwere Komplikationen. Dagegen konnte in präklinischen Experimenten ein effizienter Knochenaufbau bei guter Verträglichkeit durch die Konjugation von PGE1 zusammen mit dem Asparaginsäure-Oktamer D-Asp₈ als Targetingligand für Hydroxylapatit erreicht werden.¹⁶⁰ Darüber hinaus werden P(HPMA)-Dexamethason-Konjugate für die Behandlung der rheumatoiden Arthritis untersucht.¹⁶¹

Über diese muskuloskeletalen Erkrankungen hinaus werden mit Targeting-Liganden ausgestattete HPMA-Copolymere auf ihre Anwendbarkeit bei der Behandlung von Infektionskrankheiten wie viszerale Leishmanose¹⁶² und Hepatitis B¹⁶³ erforscht.

Die Erforschung HPMA-basierter polymerer Therapeutika beschränkt sich ferner nicht auf Polymer-Wirkstoff-Konjugate. Auch eine Vielzahl anderer Typen war und ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Hierzu zählen selbstassemblierte Nanopartikel, wie polymere Mizellen,¹⁶⁴ Polyplexe¹⁶⁵ oder durch polymere Tenside stabilisierte Kolloide.¹⁶⁶ So entwickelten beispielsweise Lundy et al. ein Trägersystem für siRNA, welches ohne elektrostatische Komplexbildung auskommt.¹⁶⁷ Durch die Anbindung Thiol-funktionalisierter siRNA an Pyridyldisulfid-Methacrylamid, das mit HPMA copolymerisiert wurde, konnte auf stark zytotoxische positiv geladene Polymere verzichtet werden. Weitere wichtige Beispiele sind statistische Copolymere aus HPMA und Laurylmethacrylat, die Hemmelmann et al.¹⁶⁸ im Tiermodell erfolgreich als Carrier für den Dopamin-Antagonisten Domperidon über die Blut-Hirn-Schranke nutzten. Das selbe Polymersystem kann nach radioaktiver Markie-

rung mit ^{18}F -Tracern für die Positronen-Emissions-Tomographie eingesetzt werden.¹⁶⁹

Insgesamt beschränkt sich die Anwendung HPMA-basierter polymerer Therapeutika jenseits der Polymer-Wirkstoff-Konjugate bisher auf *in vitro*- sowie präklinische *in vivo*-Versuche. Ein Hauptgrund dafür ist die schwierig zu klärende, bei klinischen Studien aber unabdingbare Frage nach dem genauen Schicksal von Wirkstoffträger und pharmakologisch aktiver Komponente im lebenden Objekt, also die Frage nach dem Verbleib des Materials und der Kinetik der Freisetzung. Hinzu kommen Probleme bezüglich der Reproduzierbarkeit bei der Herstellung und des Wirkstoffgehaltes.

Dies sind jedoch Fragen, die Wirkstoffträger allgemein betreffen und nicht HPMA-spezifisch sind. Können sie gelöst werden, stellen HPMA-Polymere eine in der parenteralen Anwendung gut bewährte Plattform dar¹⁵⁸ und besitzen großes Potential in der Nanomedizin.

1.4 Synthese funktionaler Blockcopolymere

Die Anforderungen der Medizin an polymerbasierte Wirkstoffträger, wie Polymersome, erfordern eine umfassende Kontrolle über die Eigenschaften der zugrundeliegenden Polymere. Neben der geringen bzw. nicht vorhandenen Toxizität und Immunogenität der Materialien betrifft dies auch die Architektur der Polymere, den Polymerisationsgrad, die Dispersität sowie die relative Größe der einzelnen Blöcke. Eine sehr gute Kontrolle über solche Parameter erlaubt die anionische Polymerisation, welche aber sehr aufwändige Arbeitsschritte (z.B. absolute Wasserfreiheit) erfordert und zudem mit vielen funktionellen Gruppen inkompatibel ist. Freie radikalische Polymerisationen dagegen sind zwar mit vielen Monomeren verträglich, bieten aber nur eine eingeschränkte Reaktionskontrolle. Auf diese Weise hergestellte Polymere weisen daher in der Regel breite Molekulargewichtsverteilungen und unheitliche Endgruppen auf. Die freie radikalische Polymerisation ist demnach für die Herstellung definierter Blockstrukturen, wie für Polymeresikel und andere Nanocarrier benötigt, nicht geeignet.

In der Herstellung definierter funktioneller Polymere haben daher kontrollierte radikalische Polymerisationstechniken (engl. *controlled reversible-deactivation radical polymerization*, RDRP¹⁷⁰) weit verbreitete Anwendung gefunden. Hierzu zählen Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP),^{171,172} Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT)¹⁷³ und Nitroxide-Mediated Polymerization (NMP).¹⁷⁴

Der zentrale Aspekt dieser Techniken besteht darin, die Kinetik der Polymerisation so zu steuern, dass Kettenabbrüche unterdrückt werden. Es gilt für die Geschwindigkeiten $v_{W/A}$ von Kettenwachstums- bzw. Abbruchreaktionen:

$$v_W = k_W [P \cdot] [M] \quad (1.3)$$

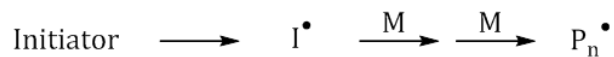
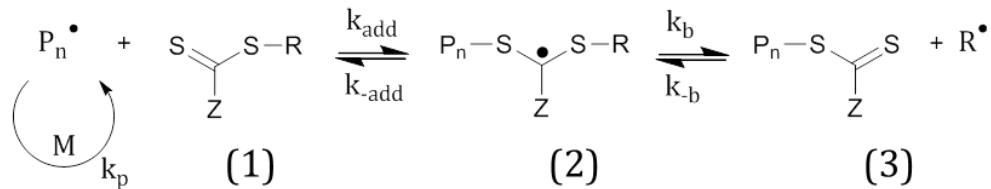
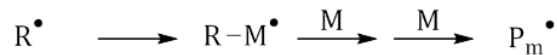
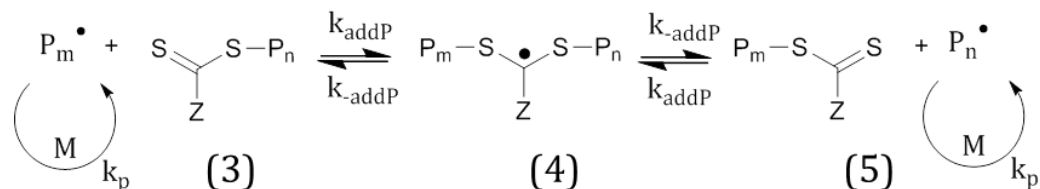
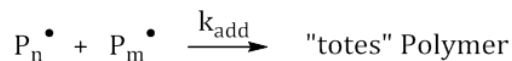
$$v_A = 2 k_A [P \cdot]^2 \quad (1.4)$$

$k_{W/A}$ bezeichnet die jeweilige Geschwindigkeitskonstante, $[P \cdot]$ die Konzentration aktiver Radikalketten und $[M]$ die Monomerkonzentration.

Weil $[P \cdot]$ in die Abbruchgeschwindigkeit quadratisch eingeht, v_W aber erster Ordnung bezüglich der Konzentration aktiver Spezies ist, werden Abbruchreaktionen durch eine Begrenzung der aktiven Ketten überproportional stark zurückgedrängt und man erhält eine engere Molekulargewichtsverteilung. Dies erreicht man durch die reversible Überführung eines Teils der aktiven Ketten in eine sogenannte „schlafende“ Spezies.

1.4.1 Der RAFT-Prozess

Für die Synthese von Polymeren für die medizinische Anwendung ist der 1998 erstmals von Moad, Rizzardo, Thang und Mitarbeitern beschriebene RAFT-Prozess¹⁷³ besonders gut geeignet. Er ist einerseits mit vielen Monomertypen (unter anderem (Meth-)acrylate und -amide sowie Styrolerivate und Vinylester) und Lösungsmitteln kompatibel. Zum anderen werden keine Übergangsmetalle benötigt, wie etwa beim ATRP-Verfahren, die sehr aufwändig entfernt werden müssen.

Initiierung:**Reversibler Kettentransfer / Propagation:****Reinitiierung:****Kettengleichgewicht / Propagation:****Terminierung:**

Schema 1: Mechanismus der RAFT-Polymerisation. Modifiziert nach ¹⁷⁵.

Der postulierte Mechanismus (siehe Schema 1) startet wie bei herkömmlichen freien radikalischen Polymerisationen mit der Bildung von Startradikalen aus einem geeigneten Initiator-molekül. Diese initiieren die Kettenbildung durch die Addition an Monomere. Entscheidend für die kinetische Kontrolle der Polymerisation ist eine Folge von Additions- und Fragmentationsgleichgewichten, verursacht durch die Zugabe einer geeigneten Thiocarbonylthioverbindung. An dieses sogenannte Kettentransferreagenz (1) (engl. *chain transfer agent*, CTA) addiert das propagierende Radikal P_n^\bullet , wodurch es zur Ausbildung der intermediären Spezies (2) kommt. Deren Zerfall sorgt für die Freisetzung eines Radikals R^\bullet , welches selbst mit Monomermolekülen neue propagierende Ketten P_m^\bullet bilden kann. In der Folge kommt es über den Übergangszustand (4) zu einem schnellen Gleichgewicht zwi-

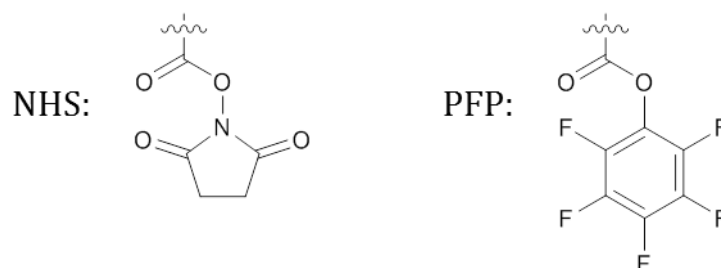
schen den propagierenden Spezies $P_n\cdot$ und $P_m\cdot$ und damit zu einer ähnlichen Wachstumswahrscheinlichkeit aller Ketten. Für den Ablauf dieses Prozesses in der gewünschten Weise ist die Reaktivität des CTAs entscheidend. So sollte die Bindung S-R leicht homolytisch spaltbar sein und $R\cdot$ muss effizient neue Kettenbildungen initiieren können. Der Substituent Z sollte durch die Aktivierung der C=S-Bindung für eine hinreichende Reaktivität der Spezies (1), (3) und (5) sorgen und gleichzeitig Spezies (2) stabilisieren.¹⁷⁶ Die stabilisierten Radikale (2) können nicht reinitiiieren und senken so die Zahl aktiver Kettenenden, wodurch Kettenabbruchreaktionen zurückgedrängt werden. In Kombination mit der ähnlichen Wachstumsgeschwindigkeit der Ketten sorgt dies für geringe Dispersitäten bezüglich des Molekulargewichts.

Zur Anwendung kommen als Z-Substituenten beispielsweise Aryl- oder Thioalkyl-Liganden, während es sich bei R oft um (CN-substituierte) Isobutylgruppen handelt.¹⁷⁷ Die im Gleichgewicht aktuell nicht propagierenden Spezies (3) und (5) werden als „schlafend“ bezeichnet. Unterbricht man eine RAFT-Polymerisation, so liegen die meisten Ketten in dieser Form vor.¹⁷⁵ Sie können als stabile Substanzen isoliert werden und als Makro-CTA genutzt werden. Auf diese Weise eröffnet RAFT die Synthese von Blockarchitekturen, was die freie radikalische Polymerisation aus bereits genannten Gründen nicht erlaubt.

1.4.2 Reaktivesterpolymere und ihre polymeranaloge Umsetzung

Die nachträgliche Modifikation von Polymeren unter Erhalt ihres Polymerisationsgrades (polymeranaloge Reaktion) zur gezielten Beeinflussung ihrer Eigenschaften ist länger bekannt als das Wissen um die Existenz der Makromoleküle selbst. Schon 1840 beobachteten Hancock und Ludersdorf die Veränderung der mechanischen Eigenschaften von Kautschuk bei der Behandlung mit Schwefel.¹⁷⁸ Die Bandbreite chemischer Reaktionen für polymeranaloge Modifikationen war lange Zeit durch die mangelnde Toleranz der verfügbaren Polymerisationstechniken gegenüber vielen funktionellen Gruppen beschränkt.¹⁷⁹ Dies änderte sich erst mit dem Aufkommen der RDRP-Verfahren. Die wichtigste Klasse von Substanzen in der Synthese funktioneller Polymere für den Einsatz als Therapeutika stellen die so-

nannten Aktivester dar. Ursprünglich in der Synthese von Peptiden eingesetzt,¹⁸⁰⁻¹⁸³ wurde das Konzept von Ringsdorf¹⁸⁴ und Ferruti¹⁸⁵ in die Polymerchemie übernommen. Durch die Verwendung elektronenziehender Substituenten können Aktivester schnell und mit hoher Ausbeute in nukleophilen Substitutionen reagieren. Dabei werden häufig Amine eingesetzt, die aufgrund ihrer hohen Nukleophilie sehr selektiv umgesetzt werden. Diese Umsetzung eröffnet vielfältige Funktionalisierungsmöglichkeiten, wie beispielsweise das Einbringen von Fluoreszenzmarkern oder Targeting-Strukturen.¹⁸⁶



Schema 2: Chemische Struktur der Aktivester-Wiederholungseinheiten NHS und PFP.

Wie von Kakuchi und Théato beschrieben, steht mittlerweile eine große Bandbreite an geeigneten Substanzen zur Verfügung.^{187,188} Neben Monomeren umfasst diese Sammlung auch Aktivester-modifizierte Kettentransfer-Reagenzien, sodass eine gezielte Endgruppenmodifikation möglich ist.¹⁸⁹ Zunehmende Bedeutung als Alternative zu den weit verbreiteten *N*-Hydroxysuccinimid-Derivaten (NHS, Schema 2) hat in den letzten Jahren die Polymerisation von Pentafluorphenyl-acrylat und -methacrylat (PFPMMA)¹⁹⁰ gefunden. Poly-PFPMMA bietet gegenüber den NHS-basierten Poly-NAS und Poly-NMAS den Vorteil einer besseren Löslichkeit in vielen organischen Lösungsmitteln kombiniert mit höherer Reaktivität.¹⁹¹

2008 wurde von Barz erstmals die polymeranaloge Umsetzung von PFPMMA-Aktivester-Polymeren mit 2-Hydroxypropylamin (HPA) zu Poly-HPMA beschrieben.¹⁹² Seither wurden vielfältige Ansätze zur Herstellung funktioneller und biokompatibler Polymere und Nanopartikel mittels des PFPMMA-Aktivester-Ansatzes präsentiert. Hierzu gehören Mizellare Strukturen für den Wirkstofftransport über die Blut-Hirn-Schranke,¹⁶⁸ ¹⁸F-markierte Polymere für PET-Untersuchungen, P(HPMA)-P(Lys)- und P(HPMA)-Antikörper-Konjugate^{193,194} sowie polymere Tenside.¹⁶⁶ Diese große Bandbreite an Funktionalisierungsmöglichkeiten bei guter Biokompatibilität macht die Kombination der beiden Konzepte Aktivesterchemie

und RAFT-Polymerisation zu einem vielversprechenden Ansatz bei der Entwicklung zukünftiger polymerer Therapeutika.

2 Motivation und Zielsetzung

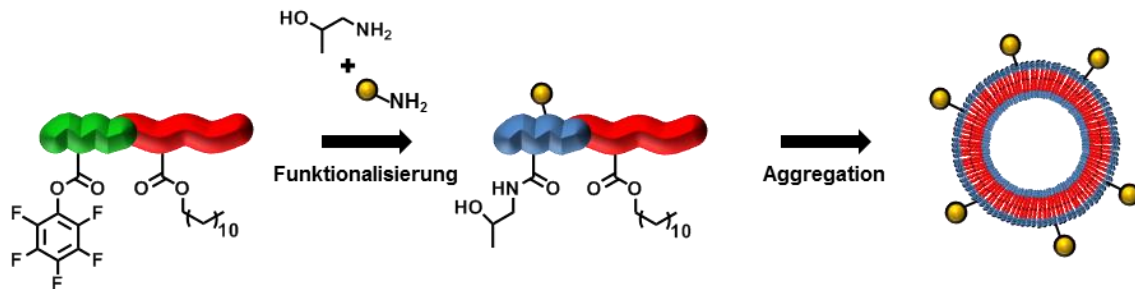
Polymersome im Nano-Größenbereich werden seit einigen Jahren hinsichtlich ihrer Eignung als Wirkstoffträger untersucht. Insbesondere eignen sie sich als Trägersystem für hydrophile Materialien. Diese können im inneren wässrigen Kompartiment der Vesikel eingeschlossen werden, ohne dass eine aufwändige stoffspezifische Anbindungschemie nötig ist.

Als hydrophiler, dem extravasikulären Medium zugewandter Block dient derzeit oftmals Polyethylenglycol (PEG). Es ist über einen breiten Molmassenbereich und in enger Größenverteilung herstellbar und kann somit präzise für die jeweilige Anwendung optimiert werden. Neben seiner guten Verfügbarkeit eignet es sich hervorragend zur kolloidalen Stabilisierung von Polymersomen und trägt zudem keine Oberflächenladungen. Aufgrund dieser Eigenschaften weisen PEGylierte Nanopartikel *in vivo* eine geringe Wechselwirkung mit Plasmaproteinen des Blutes auf und zeigen eine verlängerte Zirkulationszeit (*stealth-like effect*).¹⁹⁵

Die Verwendung von PEG als hydrophile Komponente von Polymervesikeln hat jedoch auch diverse Nachteile. Aus chemischer Sicht verbleibt für die Modifikation lediglich eine einzige Anbindungsstelle pro Molekül, die Hydroxyl-Endgruppe. Die $-CH_2-CH_2-O-$ Wiederholungseinheit ist für eine gezielte Funktionalisierung dagegen zu träge und ist gleichzeitig anfällig für die Peroxidbildung.¹⁹⁶ Außerdem kann PEG trotz seiner geringen Wechselwirkung mit biologischen Medien das Komplementsystem aktivieren.¹⁹⁷ Zudem kommt es bei der wiederholten Applizierung in vielen Fällen zu einer beschleunigten Entfernung PEGylierter Partikel aus dem Blutstrom (*accelerated blood clearance*).¹⁹⁸

Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Entwicklung von Polymervesikeln aus leicht und vielseitig funktionalisierbaren amphiphilen Blockcopolymeren hoher Biokompatibilität und die darauf aufbauende Evaluierung ihrer grundlegenden Eignung als Wirkstoffträger. Hierzu werden zwei verschiedene Ansätze verfolgt: Als erstes Projekt wird die Herstellung funktionalisierbarer Polymere für die Vesikelbildung auf der Basis von Aktivester-Präpolymeren untersucht.

Mittels der RAFT-Technik zur Synthese gut definierter Polymere von eng verteiltem Molekulargewicht sollen PFPMA-basierte Blockcopolymer mit einem hydrophoben zweiten Block hergestellt werden. In einer polymeranalogen Reaktion wird der Pentafluorphenylester mittels eines hydrophilen Amins zum entsprechenden Amid umgesetzt (Schema 3).



Schema 3: Funktionalisierung und Vesikelbildung ausgehend von PFP-Aktivesterpolymeren.

Auf diese Weise sollen wohldefinierte amphiphile Polymere erhalten werden, die bei geeignetem Blocklängenverhältnis zu Vesikeln aggregieren. Setzt man HPA für die Aminolyse ein, kann das biokompatible und in der biomedizinischen Forschung weit verbreitete P(HPMA) als hydrophiler Block erhalten werden. Gleichzeitig ist mittels der Aktivesterkonversion eine umfangreiche und einfach durchzuführende Funktionalisierungschemie möglich. Diese Methode erlaubt die multiple Funktionalisierung der Polymermoleküle. Weiterhin ist eine simultane Modifikation mit verschiedenartigen Substituenten möglich.

Die Zielsetzung für dieses Projekt umfasst die Herstellung biokompatibler Polymere über den genannten Aktivesteransatz und die Aggregation zu Vesikeln. Darüber hinaus soll die Beladung mit hydrophilen Substanzen untersucht werden, ebenso die weitere Funktionalisierung mit Strukturen, die für die Anwendung als Wirkstoffträger relevant sind. Darunter fallen beispielsweise die Farbstoffmarkierung sowie die Anbindung von Targeting-Liganden. Zudem soll das grundlegende *in vitro*-Verhalten der Vesikel evaluiert werden. Hierzu zählen die Toxizität, das Verhalten in Kontakt mit biologischen Medien und die Desintegration der Vesikel für die Freisetzung von Wirkstoffen.

Als zweites Projekt sollen Vesikel aus dem Polypeptid-*b*-Polypeptoid P(Glu(OBn))-*b*-P(Sar) hergestellt werden. Sarkosin ist eine körpereigene Aminosäure, deren Polymer wie auch PEG Widerstand gegen die Adsorption von Proteinen zeigt.¹⁹⁹⁻²⁰¹

P(Sar)-basierte Polypeptid-*b*-Polypeptoid-Polymere haben daher das Potential, die gewünschten *stealth-like* Eigenschaften mit Polymeren aus endogenen Materialien zu kombinieren.^{202,203}

P(Glu(OBn))-*b*-P(Sar) wurde als Wirkstoffträger in mizellarer Form bereits von Birke et al. untersucht.²⁰⁴ Ziel ist es, aufbauend auf diesen Ergebnissen aus demselben Material Vesikel herzustellen, die als Wirkstoffträger für den Transport hydrophiler Stoffe dienen können.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Aktivester-basierte Vesikel: von P(HPMA) zu P(DHPMA)

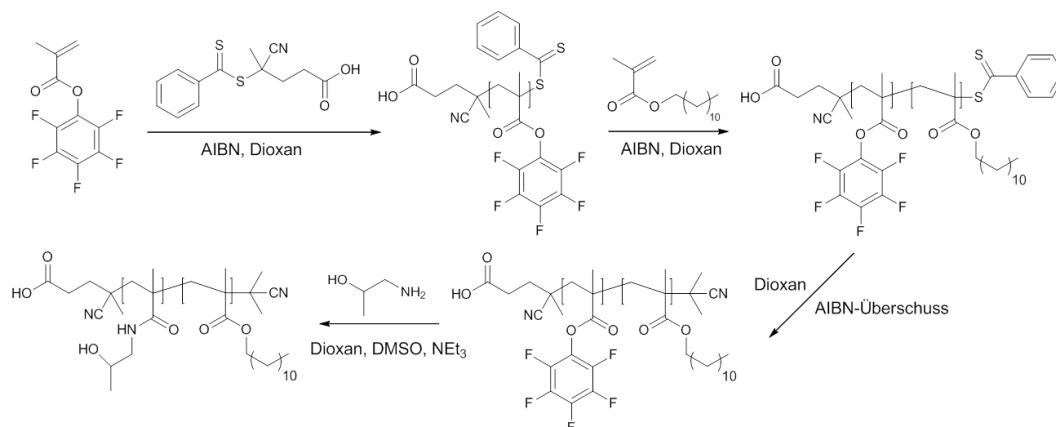
Dieses Kapitel beschreibt die Versuche, Aktivester-basierte Blockcopolymer-Vesikel mittels der Aminolyse von P(PFPMA)-*b*-P(LMA) mit 2-Hydroxypropylamin herzustellen. P(HPMA)-*b*-P(LMA) ist als biokompatibles und gut funktionalisierbares System für die Herstellung von Nanopartikeln in der biomedizinischen Anwendung bekannt. Es bildet bei geringen Anteilen des hydrophoben Blockes micellartige Compound-Strukturen aus. Durch systematische Variation der für die Kolloidbildung relevanten Parameter in Polymerarchitektur wie auch experimenteller Bedingungen wurde versucht, vesikuläre Nanopartikel mit Bilayer-Struktur zu erhalten. Poly-Laurylmethacrylat wurde hier neben der Biokompatibilität aufgrund seiner niedrigen Glasübergangstemperatur von 208 K verwendet. Diese liegt weit unterhalb der Raumtemperatur, was die Aggregation zu definierten Strukturen erleichtert.

Die Herstellung von P(HPMA)-*b*-P(LMA) Vesikeln gelang jedoch weder durch Variation der Blocklängenverhältnisse, noch durch Abänderung der Präparationsweise. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich die geringe Hydrophilie von P(HPMA). Daher wurde eine modifizierte Variante der Synthese von P(HPMA) über den PFPMA-Aktivesteransatz entwickelt, bei der ein geeignetes Amin intrinsisch höherer Wasserlöslichkeit eingesetzt wird. Auf diese Weise werden Homo- und Blockcopolymeren von Poly(2,3-Dihydroxypropylmethacrylamid), P(DHPMA), erhalten.

3.1.1 Kolloidbildung mit P(HPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymeren

Seit der erstmaligen Synthese über den Aktivester-Ansatz haben sich Nanopartikel bestehend aus P(HPMA)-*b*-P(LMA) als biokompatible und vielseitig funktionalisierbare Partikel für Wirkstofftransport und bildgebende Verfahren erwiesen.^{166,168,193,205} Die auf Arbeiten von Barz et al.¹⁹² basierende allgemeine Syn-

theseroute für die Herstellung von P(HPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymeren ist in Schema 4 dargestellt:



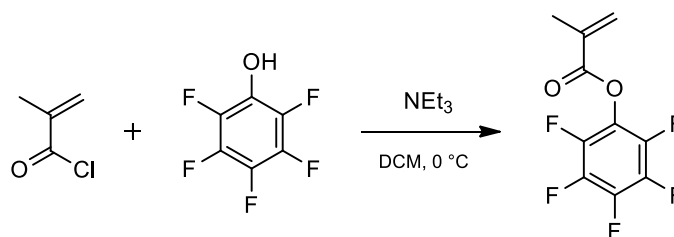
Schema 4: Syntheschema P(HPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymer.

Ausgehend vom PFPMA-Monomer wird in einer AIBN-initiierten RAFT-Polymerisation mit 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)sulfonyl)pentansäure (CTA1) als Kettentransferreagenz ein Homopolymer hergestellt, welches die noch reaktive Dithiobenzoat-Endgruppe trägt. Es kann daher als Makro-CTA für die Blockcopolymerisation mit Dodecylmethacrylat (Laurylmethacrylat, LMA) eingesetzt werden. Ein großer Vorteil dieser Synthesemethode besteht darin, dass das so erhaltene P(PFPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymer vollständig hydrophob ist und sich somit in vielen organischen Lösungsmitteln löst. Man umgeht so das Problem der Voraggregation, welches sich oftmals stellt, wenn man amphiphile Polymere durch direkte Verbindung einer hydrophoben mit einer hydrophilen Komponente erhalten will. Außerdem ist eine umfassende Charakterisierung in organischen Lösungsmitteln möglich, wie etwa die kernresonanzspektroskopische Untersuchung mittels ¹H-NMR in deuteriertem Chloroform. Als nächster Schritt erfolgt noch vor der Aminolyse die Substitution der Dithiobenzoat-Endgruppe. Dies ist erforderlich, um Nebenreaktionen wie die Dimerisierung zweier Blockcopolymer-Moleküle nach der sauerstoffbedingten Oxidation der Endgruppen zu Dithiolen zu vermeiden. Durchgeführt wird die Entfernung mittels des Verkochens in Gegenwart eines Radikalüberschusses. Setzt man dafür AIBN ein, wird eine Isobutylnitril-Endgruppe erhalten. Das nun vorliegende Precursor-Polymer kann durch Aminolyse mittels HPA in Gegenwart von Triethylamin als Hilfsbase in das fertige P(HPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymer überführt werden. Dieser Schritt erlaubt durch den Zu-

satz entsprechend funktionalisierter Amine eine einfache Funktionalisierung des finalen amphiphilen Polymers. Dessen Polymerisationsgrad und Blocklängenverhältnis bleiben dabei erhalten.

Copolymere aus HPMA und LMA liegen in wässrigen Systemen bei geringen Anteilen an LMA von maximal 5 % unimolekular gelöst vor.²⁰⁶ Darüber hinaus ist sowohl von Blockstrukturen als auch statistischen Copolymeren dieser beiden Materialien mit bis zu 20 % LMA-Gehalt bekannt, dass sie mäßig disperse Aggregate mit komplexer interner Struktur bilden,¹⁹² sogenannte Compound-Mizellen. Für die Suche nach Blockcopolymer-Zusammensetzungen wurden daher P(HPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymere mit unterschiedlichem Gehalt an LMA oberhalb dieser 20 % synthetisiert.

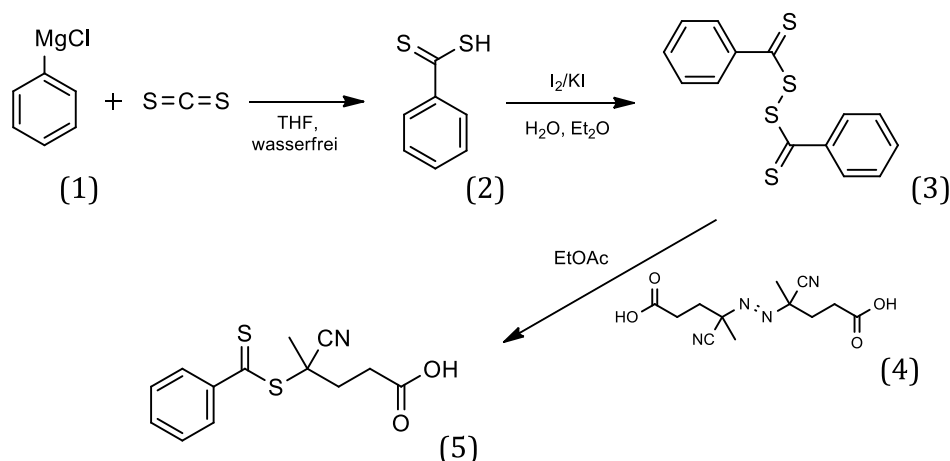
3.1.1.1 Synthese von Pentafluorphenylmethacrylat (PFPMA)



Schema 5: Synthese von Pentafluorphenylmethacrylat.

Die Synthese des PFPMA-Monomers erfolgte nach einer von Eberhardt publizierten Vorschrift.¹⁹¹ Es handelt sich um eine nach Schotten-Baumann durchgeführte nucleophile Substitution von Methacryloylchlorid mit Pentafluorphenol unter der Einwirkung von Triethylamin. Dieses fängt den freiwerdenden Chlorwasserstoff ab und verschiebt so das Reaktionsgleichgewicht in Richtung des Esters. Nach der Aufreinigung des Rohproduktes mittels Vakuumdestillation (2×10^{-2} mbar, 36 °C) konnte PFPMA als farblose Flüssigkeit erhalten werden. Die Charakterisierung erfolgte mittels ¹H- und ¹⁹F-NMR-Spektroskopie.

3.1.1.2 Synthese des Kettentransferreagenz CTA1



Schema 6: Synthese von 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)sulfonyl)pentansäure (CTA1).

Als CTA für die Synthese von PFPMA-*b*-PLMA Precursor-Polymeren wurde **CTA1** ausgewählt. Dieses Kettentransferreagenz hat sich besonders für die Polymerisation von Methacrylaten bewährt¹⁷⁷ und ist in organischen Lösungsmitteln wie THF oder 1,4-Dioxan gut löslich. Die Herstellung erfolgte in einer dreistufigen Synthese,²⁰⁷⁻²⁰⁹ ausgehend von Phenylmagnesiumchlorid (1). Dieses wurde mit Schwefelkohlenstoff unter wasserfreien Bedingungen zu Dithiobenzoessäure (2) umgesetzt. Das erhaltene viskose Öl wurde nach Extraktion aus dem Reaktionsgemisch ohne weitere Aufreinigung mit Iod nahezu quantitativ zu Dithiobenzoyldisulfid (3) oxidiert. Im letzten Reaktionsschritt erfolgte die radikalische Umsetzung mit 4,4'-Azobis(4-cyanovaleriansäure) (ACVA, (4)) zu 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)sulfonyl)pentansäure (5). Die Aufreinigung erfolgte per Kieselgelsäulenchromatographie mit Chloroform und Ethanol (20:1 v/v) als Laufmittel. Nach anschließender Lyophilisation unter Zugabe von Benzol wurde **CTA1** als rotvioletter Feststoff erhalten. Die Charakterisierung erfolgte mittels 1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie.

3.1.1.3 Synthese von P(PFPMA)- und P(LMA) Homopolymeren mittels RAFT-Polymerisation

Bei der Synthese von Polymeren eines möglichst genau definierten Polymerisationsgrades X_n kommt dem Stoffmengenverhältnis von Monomer und CTA eine entscheidende Bedeutung zu:²¹⁰

$$X_n = \frac{p' \cdot [M]_0}{p'' \cdot [CTA]_0 + 2 \cdot f \cdot p''' \cdot [I]_0} \quad (3.1)$$

Dabei bezeichnen $[M]_0$ die ursprüngliche Monomerkonzentration, $[CTA]_0$ die Konzentration des eingesetzten Kettentransferreagenzes und $[I]_0$ diejenige des Radikalstarters. Der zur Radikalkonzentration gehörende Term erhält einen Faktor $2 \cdot f$. Er repräsentiert den Zerfall des Radikalstarters in zwei Radikalfragmente sowie die zugehörige Zerfallsrate f . Außerdem bezeichnen p' , p'' und p''' die jeweils zugehörigen Umsätze. Um die Konzentration propagierender Spezies gering zu halten, wird eine Initiator-Konzentration gewählt, die nur ca. ein Zehntel der Konzentration des Kettentransferreagenzes beträgt. Hierdurch vereinfacht sich Gleichung (3.1) wegen

$$p'' \cdot [CTA]_0 \gg 2 \cdot f \cdot p''' \cdot [I]_0 \quad (3.2)$$

zu

$$X_n = \frac{p' \cdot [M]_0}{p'' \cdot [CTA]_0} = p \cdot \frac{[M]_0}{[CTA]_0} \quad (3.3)$$

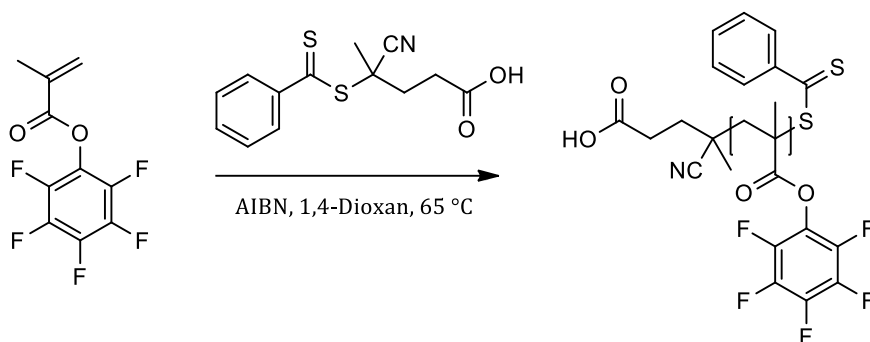
Dabei steht p für den Gesamtumsatz der Reaktion. Unter Zuhilfenahme von Gleichung (3.3) ergibt sich für das theoretisch zu erwartende mittlere Molekulargewicht des Polymers:

$$\begin{aligned} M_{theor} &= X_n \cdot M_{Monomer} + M_{CTA} \\ &= p \cdot \frac{[M]_0}{[CTA]_0} \cdot M_{Monomer} + M_{CTA} \end{aligned} \quad (3.4)$$

Die Dispersität der Molekulargewichtsverteilung ergibt sich zu

$$\mathfrak{D} = \frac{M_w}{M_n} \quad (3.5)$$

Durchgeführt wurde die Synthese von P(PFPMA) nach Schema 7:



Schema 7: Synthese der Poly-PFPMA Homopolymere H1-H10 per RAFT-Polymerisation mittels CTA1.

PFPMA und **CTA1** wurden im Schlenkkolben zusammen mit AIBN als Initiator in wasserfreiem Dioxan gelöst und drei „Freeze-Pump-Thaw“-Zyklen unterworfen. Dabei wurde der Kolbeninhalt sofort nach Vermischen der Edukte in flüssigem Stickstoff eingefroren und evakuiert. Nach ca. 20 min unter Hochvakuum wurde die Mischung auf Raumtemperatur gebracht und der Zyklus begann von vorne. Auf diese Weise wurde der Anteil gelösten Sauerstoffs im Reaktionsgemisch minimiert und eventuell vorhandene Wasserspuren konnten sublimieren. Nach beendetem drittem Zyklus wurde der Kolben ins temperierte Ölbad überführt und unter kräftigem Rühren für 17 h erhitzt. Anschließend wurde das entstandene Polymer zur Entfernung verbliebener Monomerspuren dreimal in eisgekühltem Hexan gefällt und im Vakuum getrocknet. Poly(PFPMA) wurde als rosafarbener pulveriger Feststoff erhalten. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten PFPMA-Homopolymere **H1-H10** sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Charakterisierung erfolgte mittels THF-Gelpermeationschromatographie (GPC) unter Verwendung von Polystyrolstandards zur Kalibrierung. Es resultierten monomodale Elutionskurven und enge Molekulargewichtsverteilungen von $\bar{D} = 1,2 - 1,4$. Exemplarisch zeigt Abb. 15 das Elugramm des Polymers **H2**. Zudem wurden die Polymere mittels ^1H - und ^{19}F -NMR-Spektroskopie charakterisiert.

Tabelle 2: Per RAFT-Polymerisation mittels CTA1 hergestellte Homopolymere.

Polymer	Zusammensetzung ^{a)}	M_n / g/mol ^{a)}	\bar{D} ^{a)}
H1	P(PFPMA) ₂₃	6.100	1,31
H2	P(PFPMA) ₂₇	7.000	1,36
H3	P(PFPMA) ₂₉	7.700	1,31
H4	P(PFPMA) ₃₁	8.100	1,34
H5	P(PFPMA) ₃₃	8.400	1,29
H6	P(PFPMA) ₃₄	8.900	1,31
H7	P(PFPMA) ₃₅	9.100	1,35
H8	P(PFPMA) ₄₃	11.100	1,30
H9	P(PFPMA) ₅₃	13.600	1,30
H10	P(PFPMA) ₁₆₇	42.600	1,41
H11	P(LMA) ₁₃	3.500	1,08
H12	P(LMA) ₁₈	4.800	1,08
H13	P(LMA) ₂₁	5.500	1,09
H14	P(LMA) ₂₆	6.800	1,08
H15	P(LMA) ₃₀	7.900	1,07

^{a)} bestimmt mittels THF-GPC.

Nach analoger Vorgehensweise, aber unter Verwendung von Laurylmethacrylat (LMA) als Monomer wurden zudem die P(LMA)-Homopolymere **H11-H15** hergestellt. Sie konnten durch Fällen in kaltem Methanol mit geringen Molmassen-Dispersitäten von $\bar{D} < 1,1$ als rosafarbene viskose Öle ($T_g = 208$ K) erhalten werden. **H11-H15** wurden zur Herstellung der P(PFPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymere mit geringem Anteil an PFPMA verwendet. Der Grund hierfür war, dass es sich als schwierig erwies, an relativ kurze P(PFPMA) Homopolymere LMA-Blöcke des vielfachen Polymerisationsgrades in definierter Zusammensetzung anzubringen.

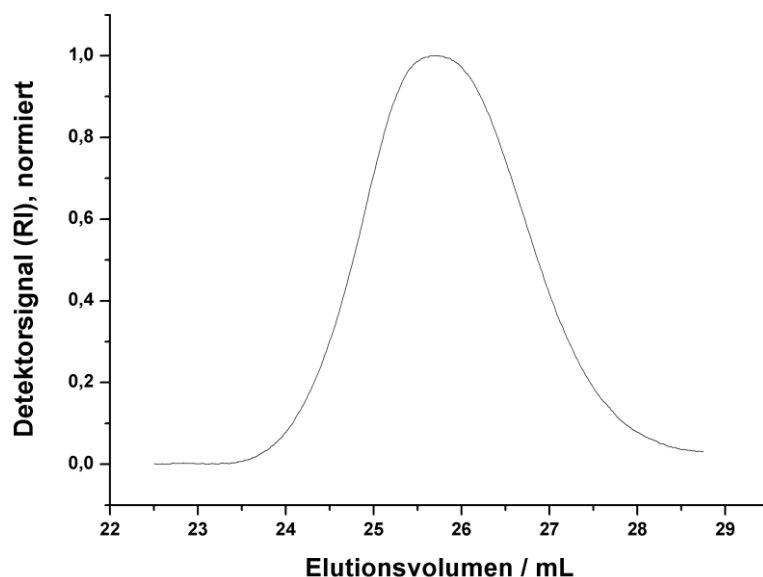
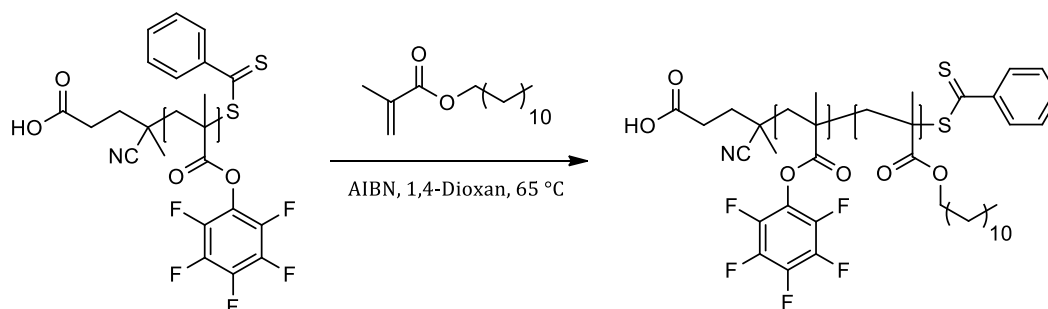


Abb. 15: Elogramm des P(PFPMA)-Homopolymers H3 (THF-GPC).

3.1.1.4 Synthese von P(PFPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymeren ausgehend von PFPMA- und LMA-Homopolymeren als Makro-CTAs



Schema 8: Synthese der Blockcopolymeren P(PFPMA)-*b*-P(LMA).

Die Homopolymere **H1-H15** trugen die Dithiobenzoat-Endgruppe des Kettentransferreagenzes **CTA1**. Sie konnten daher selbst als Makro-Kettentransferreagenz reagieren und zur Synthese von Blockcopolymeren verwendet werden. Die Vorgehensweise war analog zur Synthese der Homopolymere **H1-H15**. Zur vollständigen Umsetzung waren allerdings verlängerte Reaktionsdauern von 3 d nötig statt 17 h für die Homopolymere. Dies lag nicht an einer mangelnden Reaktivität des zweiten Monomers, was sich daran zeigte, dass sich nicht nur PFPMA, sondern - wie im Fall der Homopolymere **H11-H15** - auch LMA sehr gut mit **CTA1** in enger Molekulargewichtsverteilung polymerisieren ließ. Der Grund war vielmehr die schlechtere Zugänglichkeit der propagierenden Endgruppe. Diese wurde knäuelartig durch die Homopolymer-Kette abgeschirmt.

Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der so erhaltenen P(PFPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymeren. Sie wurden wie auch die Homopolymere in monomodaler und enger Molekulargewichtsverteilung erhalten. Synthetisiert wurden mehrere Reihen aufsteigenden Gehaltes an PFPMA von ca. $0,30 < \chi < 0,7$, die nach Aminolyse Serien ähnlichen Molekulargewichtes, aber variierenden hydrophilen Gewichtsanteils f ergeben sollten.

Tabelle 3: Synthetisierte P(PFPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymeren.

Polymer	Zusammensetzung ^{a)}	Homo-polymer	M_n ^{a)} / g/mol	\bar{D} ^{a)}	χ ^{b)} (PFPMA)
BC1	P(PFPMA) ₁₁ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₆	H14	9.500	1,12	0,295
BC2	P(PFPMA) ₁₁ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₁	H13	8.200	1,12	0,343
BC3	P(PFPMA) ₂₀ - <i>b</i> -P(LMA) ₁₈	H12	9.900	1,26	0,532
BC4	P(PFPMA) ₃₁ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₆	H4	14.600	1,20	0,548
BC5	P(PFPMA) ₃₁ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₀	H4	13.100	1,21	0,612
BC6	P(PFPMA) ₄₃ - <i>b</i> -P(LMA) ₁₁	H8	14.000	1,19	0,790
BC7	P(PFPMA) ₂₈ - <i>b</i> -P(LMA) ₃₀	H15	15.000	1,09	0,485
BC8	P(PFPMA) ₂₉ - <i>b</i> -P(LMA) ₃₂	H3	15.800	1,38	0,480
BC9	P(PFPMA) ₃₄ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₅	H6	15.300	1,17	0,576
BC10	P(PFPMA) ₄₃ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₂	H8	16.800	1,20	0,657
BC11	P(PFPMA) ₃₄ - <i>b</i> -P(LMA) ₄₆	H6	20.600	1,12	0,426
BC12	P(PFPMA) ₃₄ - <i>b</i> -P(LMA) ₃₉	H6	18.900	1,17	0,465
BC13	P(PFPMA) ₅₃ - <i>b</i> -P(LMA) ₃₉	H9	23.600	1,14	0,573
BC14	P(PFPMA) ₄₈ - <i>b</i> -P(LMA) ₃₀	H15	20.000	1,12	0,616
BC15	P(PFPMA) ₁₃ - <i>b</i> -P(LMA) ₃₀	H15	11.200	1,12	0,302
BC16	P(PFPMA) ₃₃ - <i>b</i> -P(LMA) ₅₅	H5	22.700	1,10	0,369

(Fortsetzung)

Polymer	Zusammensetzung ^{a)}	Homo-polymer	M_n ^{a)} / g/mol	\bar{D} ^{a)}	χ ^{b)} (PFPMA)
BC17	P(PFPMA) ₂₃ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₁	H1	11.500	1,23	0,474
BC18	P(PFPMA) ₃₁ - <i>b</i> -P(LMA) ₃₁	H4	16.100	1,19	0,497
BC19	P(PFPMA) ₃₃ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₈	H5	15.500	1,21	0,536
BC20	P(PFPMA) ₁₅ - <i>b</i> -P(LMA) ₁₃	H11	7.200	1,20	0,543
BC21	P(PFPMA) ₃₁ - <i>b</i> -P(LMA) ₁₆	H4	12.100	1,16	0,664
BC22	P(PFPMA) ₃₅ - <i>b</i> -P(LMA) ₁₈	H7	14.000	1,27	0,679

^{a)} bestimmt mittels THF-GPC, ^{b)} bestimmt per ¹H-NMR-Spektroskopie.

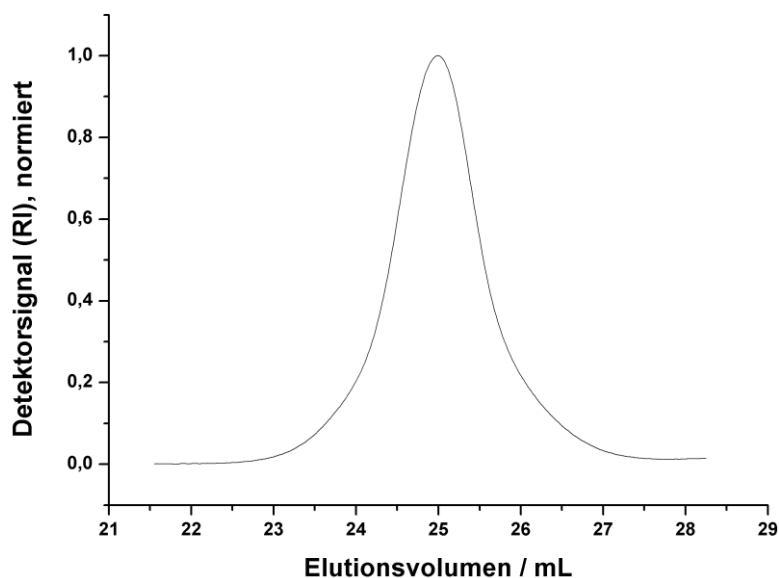


Abb. 16: Eluogramm des P(PFPMA)-*b*-P(LMA)-Blockcopolymer BC18 (THF-GPC).

Abb. 16 zeigt das THF-GPC-Eluogramm eines solchen P(PFPMA)-*b*-P(LMA)-Blockcopolymer. Um die erhaltene Blockzusammensetzung genau zu bestimmen, sind GPC-Messdaten allerdings nicht ausreichend zuverlässig. Die Analyse der Zusammensetzung erfolgte daher per ¹H-NMR-Spektroskopie.

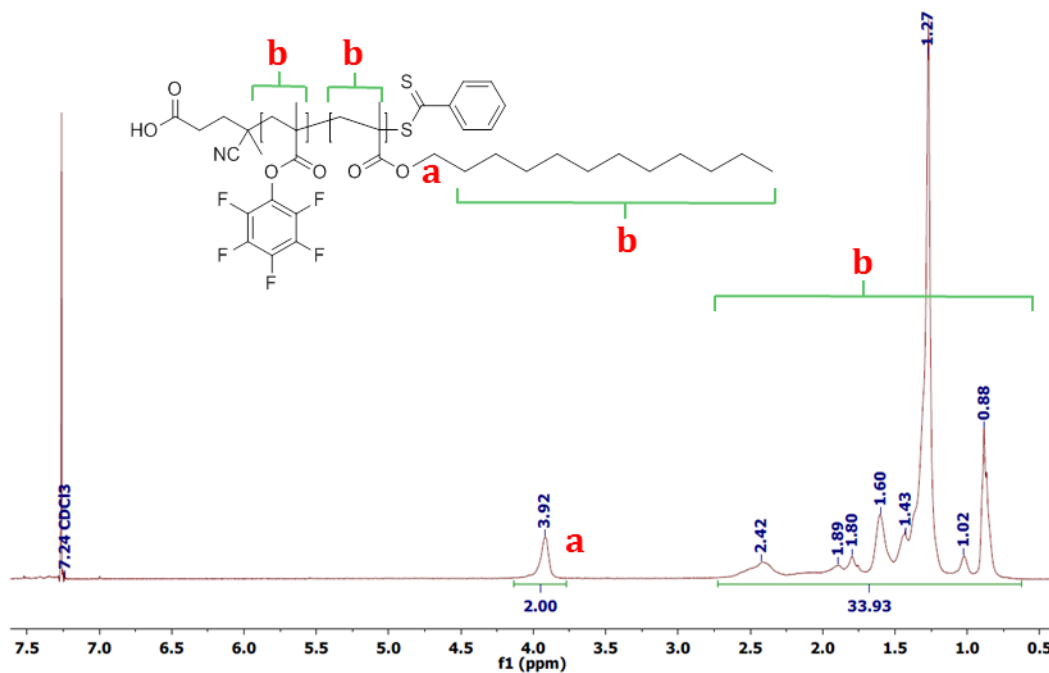


Abb. 17: Bestimmung der Blockcopolymer-Zusammensetzung von BC20 per ^1H -NMR-Spektroskopie (CDCl_3 , 400 MHz).

Das in Abb. 17 beispielhaft gezeigte ^1H -Spektrum von **BC20** weist die für Polymere typischen Signalverbreiterungen und -überlappungen auf. Diese erschweren in vielen Fällen die Bestimmung der Zusammensetzung. Beim vorliegenden System P(PFPMA)-*b*-P(LMA) kann man sich allerdings die Tieffeld-Verschiebung der Protonen der α -Methylengruppe des Dodecylrestes zunutze machen. Diese ist bedingt durch die elektronenziehenden Eigenschaften des benachbarten Sauerstoffatoms. Das Signal der besagten Methylengruppe **a** bei $\delta = 3,92$ ppm wurde für die Bestimmung des LMA-Anteils auf den entsprechenden Wert von $I = 2$ normiert und in Relation zu den übrigen Protonensignalen der Polymerkette gesetzt. Die Signale des Kettentransferreagenzes konnten bei hinreichendem Polymerisationsgrad in guter Näherung vernachlässigt werden. Die restlichen Signale gehörten zum übrigen Dodecyl-Rest sowie zum Polymerrückgrat. Vom Integral des Bereiches $\delta = 2,75 - 0,6$ ppm wurden die übrigen 28 Protonen der LMA-Wiederholungseinheit subtrahiert. Das Restintegral, welches im gezeigten Beispiel einem Wert von $I = 5,93$ entsprach, stand für die 5 Protonen der PFPMA-Wiederholungseinheit.

Es lagen also

$$\frac{5,93}{5} = 1,19$$

Wiederholungseinheiten PFPMA pro LMA-Einheit vor. Dies entsprach einem Stoffmengenanteil an PFPMA von

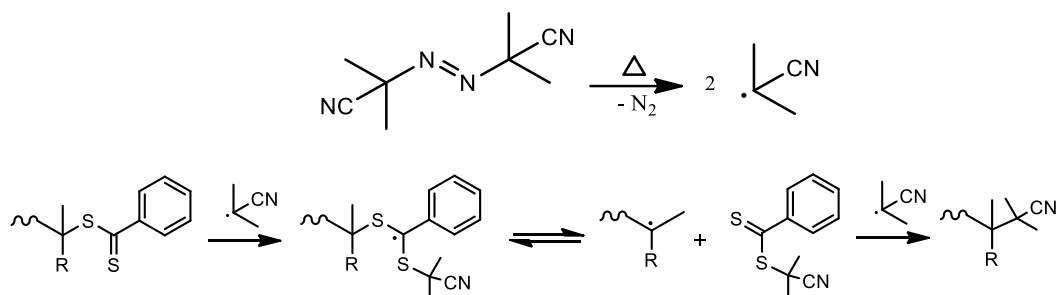
$$\frac{1,19}{1,19 + 1} = 54,3 \%$$

Weil selbst unter optimierten Messbedingungen Genauigkeiten bei der Quantifizierung der Signale von < 1 % nur schwer zu erreichen sind,²¹¹ wurden im Folgenden die per ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmten Anteile an PFPMA auf ganzzahlige Werte gerundet.

3.1.1.5 Entfernung der Dithiobenzoat-RAFT-Endgruppe

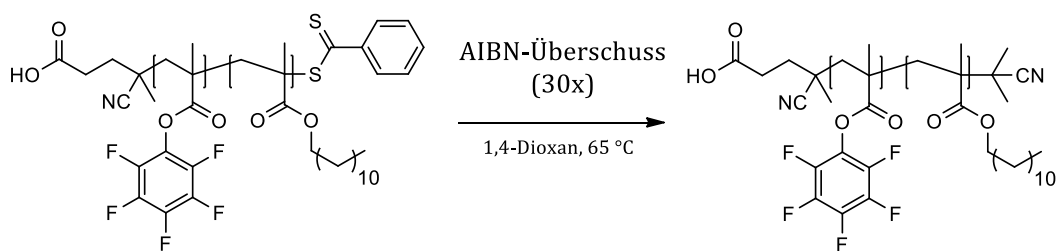
Auch die Blockcopolymere P(PFPMA)-*b*-P(LMA) trugen noch die reaktive Dithiobenzoat-Endgruppe. Diese musste jedoch vor der finalen Umsetzung der PFP-Ester entfernt werden, weil sie unter den Bedingungen der Aminolyse zu Nebenreaktionen neigen.²¹² So kann die Dithiobenzoat-Gruppe zum Thiol hydrolysiert werden, welches zur Oxidation zu Dithiolen neigt. Ferner kann eine Umesterung zu Thiolactonen eintreten. Darüber können hinaus zytotoxische Effekte auftreten, welche nachteilig für die Nutzung als Trägersystem in der Nanomedizin sind.²¹³

Die Entfernung der Dithiobenzoat-Struktur gelang über eine radikalische Endgruppenentfernung nach Perrier.²¹⁴ Dabei wird das Polymer mit einem großen Überschuss an Radikalen versetzt und es kommt nach und nach zum statistisch gesteuerten Austausch der RAFT-Endgruppe gegen Radikalfragmente.



Schema 9: Mechanismus der RAFT-Endgruppen-Substitution nach Perrier.²¹⁴

Durchgeführt wurde die Entfernung der Dithiobenzoat-Endgruppe der Polymere **BC1-BC22** gemäß Schema 10 in Gegenwart von 30 Äquivalenten AIBN als Radikalbildner. Diese Menge stellte einen 60-fachen Überschuss der Radikalspezies dar, welche beim Zerfall von AIBN entsteht. Hierdurch wurde die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Polymerketten miteinander kombinieren, minimiert.



Schema 10: Entfernen der Dithiobenzoat-Endgruppe bei den Polymeren BC.

Die erfolgreiche Umsetzung zum Isobutylnitril wurde spektroskopisch anhand des Verschwindens der charakteristischen Absorptionsbande der Dithiobenzoat-Gruppe bei $\lambda_{\text{abs}} = 310 \text{ nm}$ nachgewiesen (siehe Abb. 18). Die nun farblosen Polymere wurden erneut in Methanol gefällt und im Vakuum getrocknet.

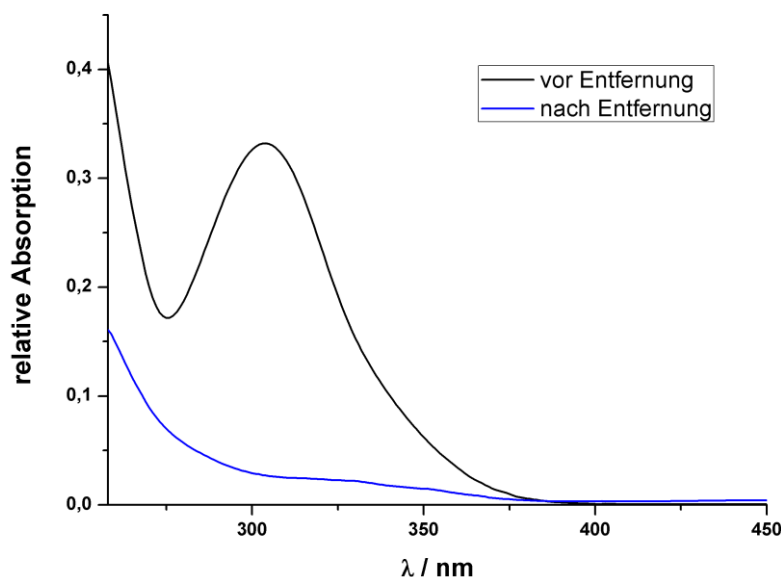
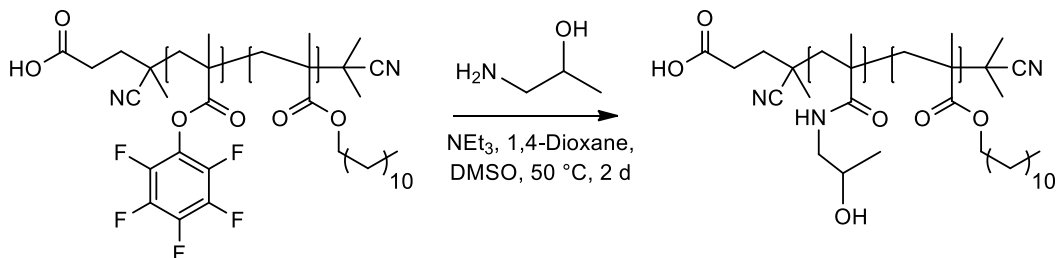


Abb. 18: UV/Vis Spektrum von $P(\text{PFPMA})\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})$ vor und nach Entfernung der Dithiobenzoat-Endgruppe mit AIBN.

Die Analyse der so modifizierten Blockcopolymeren mittels THF-GPC und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie ergab keine Hinweise auf eine Beeinflussung der Polymerketten jenseits der zu substituierenden Endgruppe.

3.1.1.6 Polymeranaloge Umsetzung von $P(\text{PFPMA})\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})$ mit HPA

Zur Herstellung amphiphiler $P(\text{HPMA})\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})$ Blockcopolymeren aus den vollständig hydrophoben **BC**-Vorläufer-Polymeren wurden diese polymeranalog mit 2-Hydroxypropylamin (HPA) umgesetzt. Wie von Eberhardt¹⁹¹ und Mohr²¹⁵ untersucht, läuft die Aminolyse unter wasserfreien Bedingungen sehr selektiv ab. Es kommt zu keiner Reaktion mit Hydroxylgruppen wie etwa der OH-Gruppe von HPA.



Schema 11: Polymeranaloge Umsetzung der Blockcopolymeren BC mit HPA.

Um eine vollständige Umsetzung aller PFP-Wiederholungseinheiten zu erzielen, musste Triethylamin als nichtnukleophile Hilfsbase zugegeben werden. Durch den

niedrigen pK_s -Wert des freigesetzten Pentafluorphenols ($pK_s = 5,5$) wäre es andernfalls zu einer Protonierung der NH_2 -Gruppe weiterer HPA-Moleküle gekommen, wodurch keine nukleophile Substitution mehr hätte stattfinden können. Der Reaktionsfortschritt wurde per ^{19}F -NMR-Spektroskopie überwacht. So zeigte das Spektrum des polymergebundenen Pentafluorphenyls charakteristisch verbreiterte Signale bei $\delta = -152,2$, $-158,0$ und $-163,3$ ppm (Abb. 19a). Die Signale des freien Pentafluorphenols dagegen erschienen bei $\delta = -171,1$, $-174,2$, und $-189,2$ ppm (Abb. 19b). Bei einer Temperatur von $50\text{ }^\circ\text{C}$ und der Zugabe von zwei Äquivalenten HPA pro PFP-Wiederholungseinheit sowie zwei weiteren Äquivalenten nach 16 h war nach 40 h eine vollständige Umsetzung zu beobachten. Nach erfolgter Umsetzung wurden die nun amphiphilen Blockcopolymere gegen MilliQ-Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert. Im ^{19}F -Spektrum waren keine Signale mehr erkennbar, was die vollständige Abtrennung des freigesetzten Pentafluorphenols bestätigte (Abb. 19c).

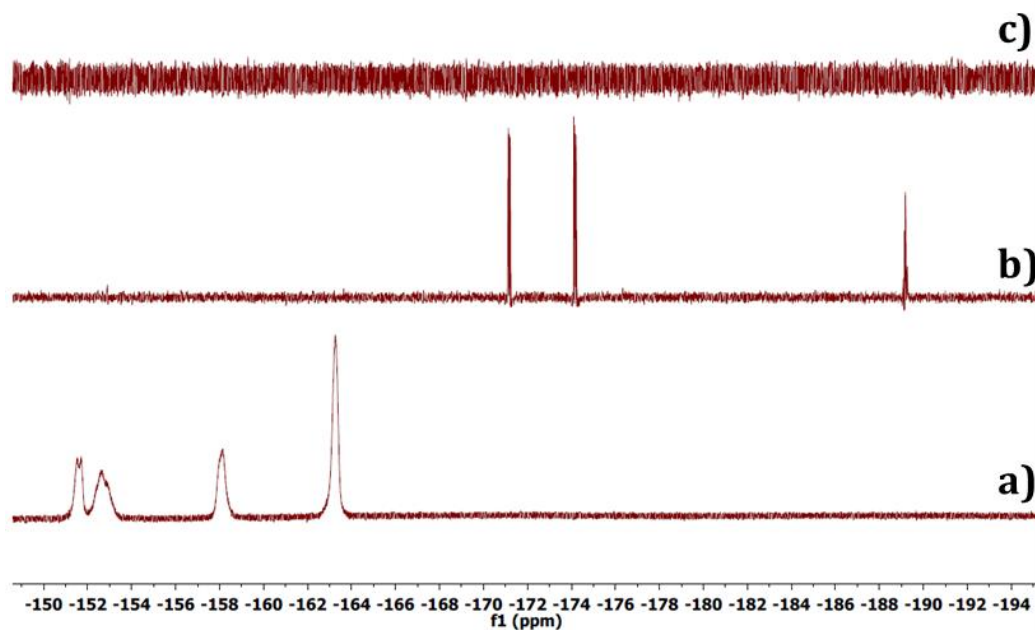


Abb. 19: Umsatz- und Aufreinigungskontrolle der polymeranalogen Umsetzung von $P(PFPMA)$ - b - $P(LMA)$ mit HPA per ^{19}F -NMR Spektroskopie.

- a) ^{19}F -Spektrum des Ausgangspolymeres,
- b) nach vollständiger Umsetzung,
- c) nach Aufreinigung per Dialyse gegen H_2O .

Aus der Umsetzung der entsprechenden Precursor-Blockcopolymere konnten die in Tabelle 4 aufgeführten $P(HPMA)$ - b - $P(LMA)$ Blockcopolymere **P1-P14** erhalten

werden. Sie wiesen bei ähnlicher mittlerer Molmasse von etwa 8000 g/mol (**P1-P7**), ca. 12.000 g/mol (**P8-P11**) und ca. 16.000 g/mol (**P12-P15**) einen steigenden Gewichtsanteil f des hydrophilen Blocks auf. Der Gewichtsanteil von P(HPMA) wurde per $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie bestimmt.

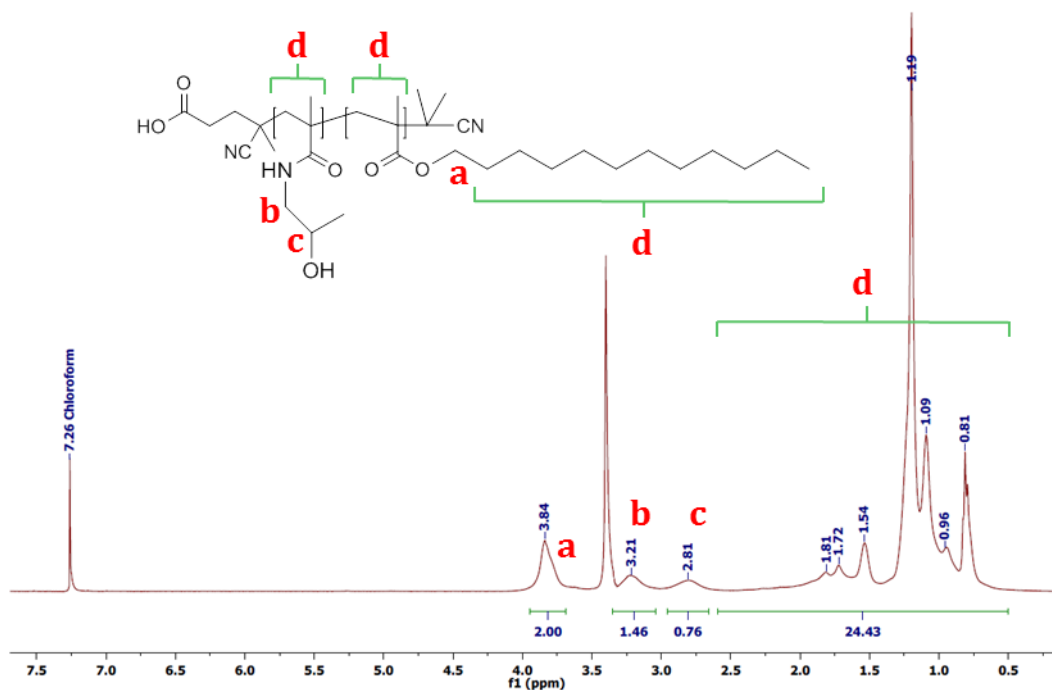


Abb. 20: Bestimmung des HPMA-Gehalts von **P12** per $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie ($\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_4$, 400 MHz).

Wie in Abb. 20 beispielhaft am $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **P12** gezeigt wird, sind hier neben der α -Methylengruppe des Laurylesters auch die Signale der Methylengruppe der HPMA-Seitenkette sowie des Protons am unmittelbar benachbarten Kohlenstoffatom vom überlappenden Hochfeldbereich separiert. Weil die beiden Methylengruppen eine identische Anzahl von Wasserstoffatomen enthalten, kann der HPMA-Stoffmengenanteil im Polymer direkt zu

$$\frac{1,46}{1,46 + 2} = 42,2 \%$$

bestimmt werden. Dies stimmt im Rahmen der Genauigkeit der Messmethode gut mit dem für das Vorläuferpolymer **BC11** bestimmten Wert überein und ergibt einen hydrophilen Massenanteil von $f = 0,293$.

Tabelle 4: Synthetisierte P(HPMA)-b-P(LMA) Blockcopolymere P1-P15.

Polymer	Zusammensetzung ^{a)}	Vorläufer	M _n ^{a)} / g/mol	hydrophiler Massenanteil f ^{b)}
P1	P(HPMA) ₁₁ -b-P(LMA) ₂₆	BC1	8.300	0,194
P2	P(HPMA) ₁₁ -b-P(LMA) ₂₁	BC2	6.900	0,236
P3	P(HPMA) ₂₃ -b-P(LMA) ₂₁	BC17	8.700	0,373
P4	P(HPMA) ₂₀ -b-P(LMA) ₁₈	BC3	7.700	0,382
P5	P(HPMA) ₃₁ -b-P(LMA) ₂₆	BC4	9.000	0,450
P6	P(HPMA) ₃₁ -b-P(LMA) ₂₀	BC5	9.600	0,553
P7	P(HPMA) ₄₃ -b-P(LMA) ₁₁	BC6	9.100	0,663
P8	P(HPMA) ₂₈ -b-P(LMA) ₃₀	BC7	12.400	0,306
P9	P(HPMA) ₂₉ -b-P(LMA) ₃₂	BC8	12.500	0,352
P10	P(HPMA) ₃₄ -b-P(LMA) ₂₅	BC9	11.300	0,428
P11	P(HPMA) ₄₃ -b-P(LMA) ₂₂	BC10	11.900	0,507
P12	P(HPMA) ₃₄ -b-P(LMA) ₄₆	BC11	16.600	0,293
P13	P(HPMA) ₃₄ -b-P(LMA) ₃₉	BC12	15.000	0,323
P14	P(HPMA) ₅₃ -b-P(LMA) ₃₉	BC13	18.400	0,370
P15	P(HPMA) ₄₈ -b-P(LMA) ₃₀	BC14	15.200	0,414

^{a)} bestimmt per THF-GPC aus den Daten des Vorläuferpolymers, ^{b)} bestimmt per ¹H-NMR-Spektroskopie.

Die hergestellten Polymere wurden zur Kolloidpräparation mittels verschiedener Phaseninversions- und Filmrehydratisierungstechniken verwendet.

3.1.1.7 Versuche zur Vesikelpräparation mit P(HPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymeren

Um aus den erhaltenen P(HPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymeren kolloidale Überstrukturen herzustellen, wurden verschiedene Varianten der Filmrehydratisierung und der Phaseninversion angewandt. Neben der nachfolgenden Auflistung inklusive kurzer Beschreibung sind die experimentellen Details und durchgeführten Versuche in Kapitel 5.5 aufgeführt.

Filmrehydratisierung mittels Ultraschall-Sonotrode

Zur Filmherstellung wurden die betreffenden Polymere in einer Mischung aus Chloroform und Methanol (8:2 v/v) gelöst. Die Lösung wurde im Schnappdeckelglas im Stickstoffstrom zu einem dünnen Film eingetrocknet und letzte Lösungsmittelspuren im Hochvakuum entfernt. Die Rehydratisierung erfolgte in PBS-Puffer durch Ultraschall-Behandlung mittels einer Sonotrode. Hierbei wurde allerdings in vielen Fällen auch nach längerer Beschallungsdauer (> 30 min) lediglich ein Zerreißen des Films in mikroskopisch kleine Partikel (Größenordnung ca. 2 – 20 µm) beobachtet. Dauerhaft kolloidal stabile Strukturen wurden dagegen in Abwandlung dieser Präparationsmethode bei der Hydratisierung von lyophilisiertem Material aufgrund dessen großer Oberfläche beobachtet.

Elektroformierung

Bei dieser Variante der Filmrehydratisierung wurde durch Eintrocknen der Polymerlösung auf Indiumzinnoxid (ITO)-beschichteten Glaträgern ein dünner Polymerfilm erhalten. Die Rehydratisierung erfolgte durch Anlegen einer Wechselspannung. Unter Einfluss des oszillierenden elektrischen Feldes können auf diese Weise sowohl für Lipide, als auch für amphiphile Blockcopolymere unilamellare Vesikel sehr enger Größenverteilung erhalten werden.^{71,216} Dies konnte für die vorliegenden Blockcopolymere allerdings nicht erreicht werden (siehe Abb. 21). Während mit 1,2-Dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DLPC) schon nach kurzer Zeit deutlich sichtbare Liposome von Durchmessern um ca. 10 µm erhalten werden konnten, sah der Film im Fall der Blockcopolymere auch nach 15 h unverändert aus. Es fanden also auch unter Einfluss des elektrischen Wechselfeldes keine nennenswerte Quellung und Diffusion der Polymere statt.

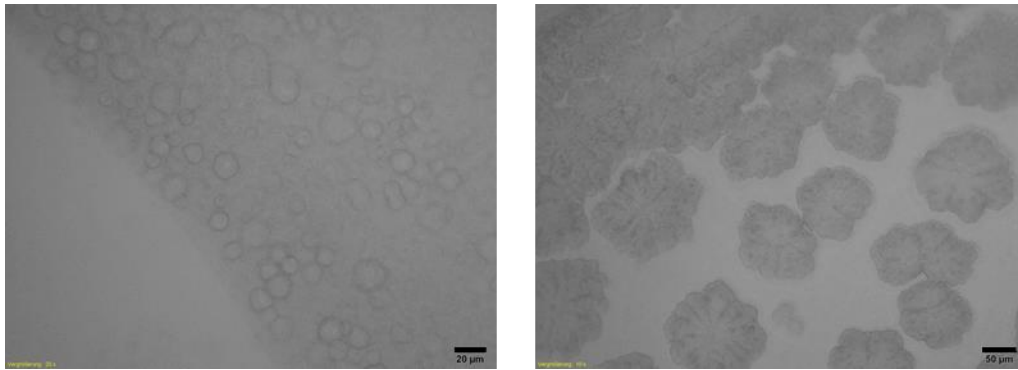


Abb. 21: Kolloidbildung durch Elektroformierung.

a) DLPC ($U = 5 \text{ V}$, $f = 10 \text{ Hz}$, $t = 2 \text{ h}$),

b) P14 ($U = 5 \text{ V}$, $f = 10 \text{ Hz}$, $t = 15 \text{ h}$); Maßstabsleiste: $20 \mu\text{m}$.

Phaseninversion

Ausgehend vom molekular gelösten Zustand (Lösung des Polymers in THF/MeOH (8:2 v/v) oder DMSO) wurde kontinuierlich der Anteil an wässrigem Puffer (PBS) erhöht und die Polymermoleküle so zur Selbstassemblierung gezwungen. Dies geschah entweder durch Dialyse der Polymerlösung gegen PBS oder durch kontrollierte Pufferzugabe mittels einer Spritzenpumpe bis zu einem Wasseranteil von 90 % und anschließender Dialyse zur Entfernung der Lösemittelreste. Außerdem wurde in Kooperation mit [REDACTED] die Aggregation im Mikromischer getestet. Hier erlaubt die Zusammenführung von Polymerlösung und wässriger Phase in einer definierten geometrischen Anordnung und bei genau einstellbarer Flussgeschwindigkeit eine größtmögliche Kontrolle über die Parameter der Assemblierung und damit auch Reproduzierbarkeit.

Detergendifalyse

Alternativ zur Aggregation aus organischen Lösungsmitteln wurde auch die Selbstassemblierung aus mizellaren Dispersionen getestet. Dabei wurde das Polymer mittels *n*-Octyl- β -D-glucopyranosid (OG) in PBS-Puffer dispergiert und der Dispersion anschließend durch Dialyse gegen PBS das Detergenz entzogen, sodass die kritische Mizellbildungskonzentration von OG unterschritten wurde und die Polymermoleküle zu Überstrukturen aggregieren mussten.

Charakterisierung der Kolloide

Die mittels der aufgeführten Methoden erhaltenen P(HPMA)-*b*-P(LMA) Kolloide wurden bezüglich ihrer Größe und Gestalt charakterisiert. Die Bestimmung der hydrodynamischen Radii erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung in wässriger Dispersion. Als schneller Vortest auf die Bildung von Vesikeln wurden die Partikel im Stopped-Flow-UV/Vis-Spektrometer bezüglich ihrer Reaktion auf einen plötzlichen hyperosmotischen Schock getestet.

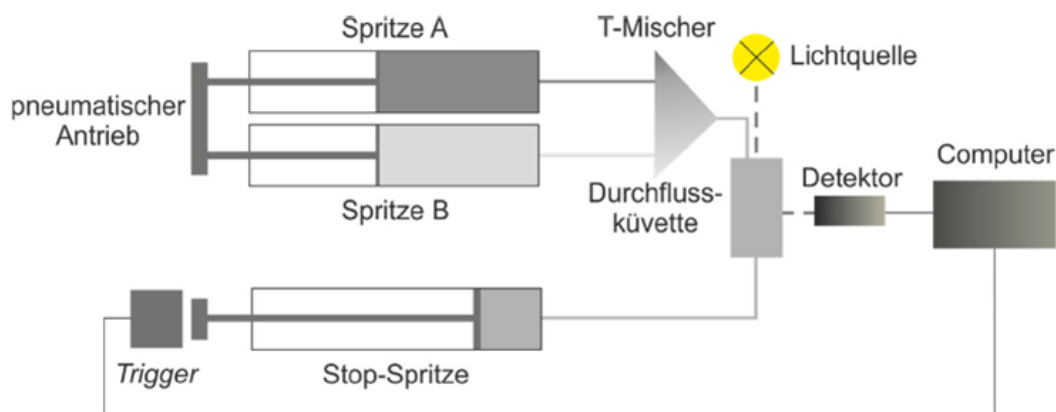


Abb. 22: Schematischer Aufbau Stopped-Flow-UV/Vis-Spektrometer.²¹⁷

Dabei wurden die Nanopartikelproben zeitgleich mit einer 600 mM Ribitol-Lösung in eine Durchflusskuvette eingespritzt und nach deren Füllung mittels einer Stop-Spritze der Schalter für die Detektion des Streulichtes betätigt. Dieses wurde per Photomultiplier bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600 \text{ nm}$ und einem Streuwinkel von 90° detektiert. Kam es im Falle von Vesikeln bedingt durch den osmotischen Gradienten zu einem Wasserausfluss, so konnte die daraus resultierende Größenänderung anhand der veränderten Streuintensität detektiert werden. Abb. 23 zeigt anhand von DPPC-Liposomen den für Vesikel erwarteten Anstieg der Streuintensität durch den osmotisch bedingten Wasserausfluss. Als Beispiel für P(HPMA)-*b*-P(LMA) Kolloide ist die Situation im Fall von **P12** dargestellt. Hier erfolgte keine Änderung der detektierten Streuintensität über die Zeit. Es trat also keine Größenänderung durch Wasserausfluss aufgrund des stark hyperosmotischen Reagenzes auf. Dies erlaubt den Rückschluss, dass kein inneres wässriges Kompartiment vorhanden war. Folglich handelte es sich nicht um Vesikel.

Diese Beobachtung traf auf alle angewandten Kombinationen aus amphiphilem HPMA-basiertem Blockcopolymer und Präparationsmethode zu.

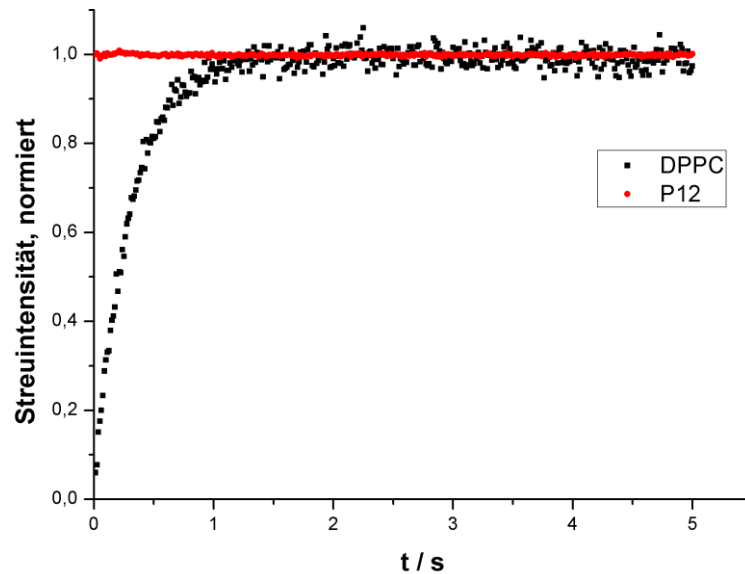


Abb. 23: Stopped-Flow-UV/Vis-Spektrometrie von DPPC (schwarz) und P12 (rot) beim Mischen mit 600 mM Ribitol, $\lambda = 600$ nm.

Außerdem wurde als weiterer indirekter Hinweis auf die Vesikelbildung versucht, den wasserlöslichen Farbstoff Sulforhodamin B als hydrophile Modellsubstanz einzuschließen. Eine erfolgreiche Verkapselung von signifikanten Anteilen des Farbstoffes deutet auf das Vorliegen eines inneren wässrigen Kompartiments hin.

Auch beim Versuch der Einlagerung von Sulforhodamin B gab es allerdings keine Anhaltspunkte für die Bildung von Vesikeln aus P(HPMA)-basierten Blockcopolymeren. Derartige Versuche wurden sowohl über Phaseninversionsmethoden als auch mittels Dualer Zentrifugation als Variante der Filmrehydratisierung (siehe Kap. 3.2.2) unternommen. Die Abtrennung des nicht verkapselten Farbstoffes erfolgte mittels Dialyse und - als Kontrolle einer etwaigen Farbstofffreisetzung durch den osmotischen Gradienten - per Aufreinigung der gebildeten Kolloide mittels Sephadex CL-2B Größenausschlusschromatographie. Analysiert wurde die Farbstoffmenge per UV/Vis-Spektrometrie über die Transmission bei einer Wellenlänge von $\lambda = 564$ nm. Daraus ergab sich die Farbstoffkonzentration und damit die vorhandene Menge nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$c = \frac{\lg\left(\frac{I_0}{I}\right)}{\varepsilon_\lambda \cdot d} \quad (3.6)$$

Die so bestimmte Menge an freiem Farbstoff entsprach in allen Fällen nahezu quantitativ der Menge an eingesetztem Farbstoff. Dies sprach als weiterer Hinweis gegen die Bildung von Vesikeln.

Neben diesen indirekten Methoden wurde die Morphologie der Kolloide per cryo-Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Außerdem wurde die Größe der Polymeraggregate per dynamischer Lichtstreuung bestimmt.

Die aus der DLS erhaltenen hydrodynamischen Radien sind in Tabelle 5 aufgeführt. Sie liegen durchgängig im Bereich $25 \text{ nm} < R_h < 70 \text{ nm}$. Dies sind typische Werte für Compound-Mizellen, die einen geringen Ordnungsgrad aufweisen und in ihrer Größe signifikant über sphärischen Mizellen liegen. Deren hydrodynamischer Radius entspricht maximal der Konturlänge L_c des Polymers, welche sich nach Gleichung (3.7) berechnet:

$$L_c = 2 \cdot n \cdot L_{C-C} \quad (3.7)$$

Dabei steht n für den Polymerisationsgrad und L_{C-C} ist die Bindungslänge einer C-C-Einfachbindung ($L_{C-C} = 0,154 \text{ nm}$). So ergibt sich beispielsweise für **P10** mit dem mittleren Polymerisationsgrad $X_n = 59$ ein Wert von $L_c = 18,2 \text{ nm}$. Für die aus **P10** per Phaseninversion hergestellte Probe wurde dagegen ein hydrodynamischer Radius von $R_h = 61 \text{ nm}$ ermittelt.

Die in Abb. 24 dargestellten cryoTEM Aufnahmen von Aggregaten verschiedener Polymerzusammensetzungen und Präparationsmethoden bestätigen die vermutete Morphologie. Es zeigten sich Partikel anisotroper Form und von inhomogenem internem Kontrast. Diese Beobachtung ist ein Ergebnis der irregulären Anordnung der einzelnen Polymerketten im Aggregat. Sie können durchaus kleine hydrophile Domänen formen, es gibt aber kein klar abgegrenztes inneres wässriges Kompartiment.

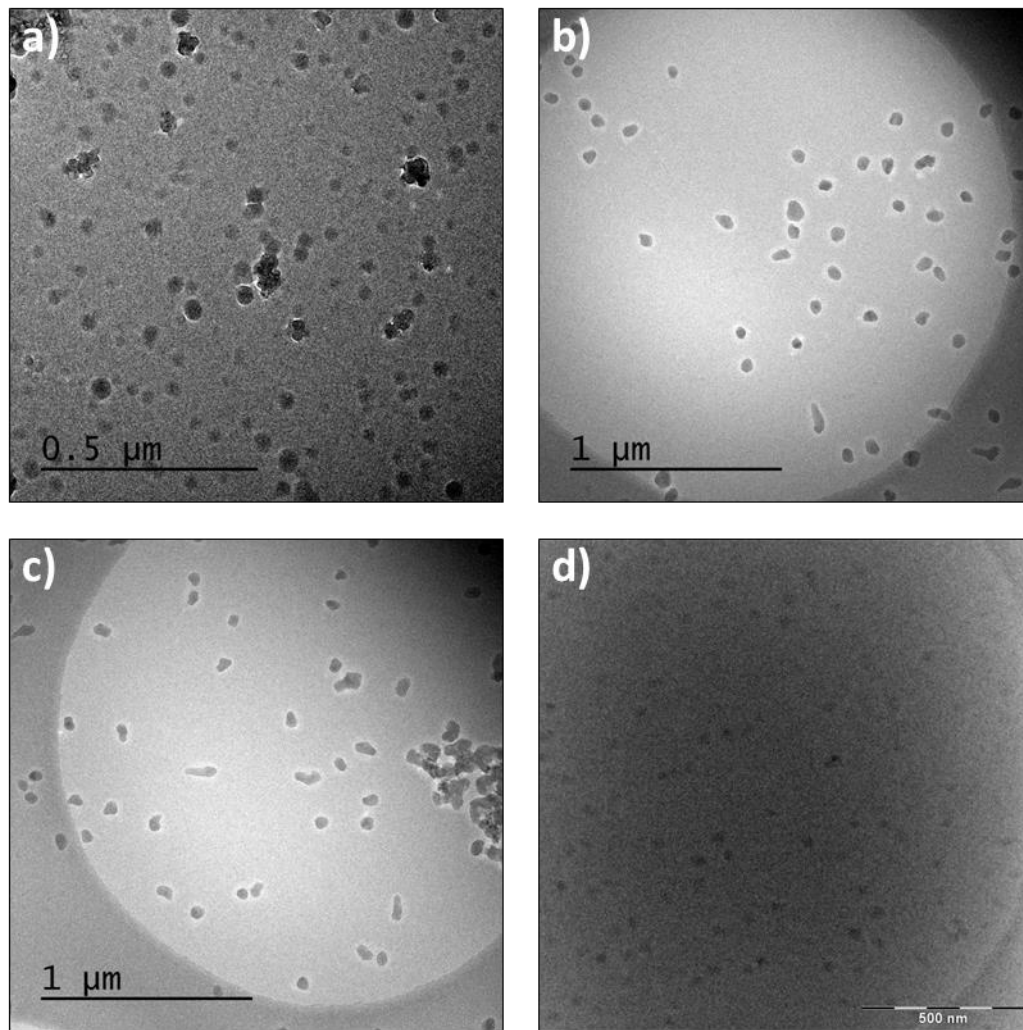


Abb. 24: cryoTEM Aufnahmen von P(HPMA)-b-P(LMA) Blockcopolymer-Aggregaten.

a) P4 (Phaseninversion THF/MeOH (8:2 v/v)),

b) P3 (Phaseninversion THF/MeOH (8:2 v/v)),

c) P2 (Micromixing, THF/H₂O),

d) P10 (Duale Zentrifugation).

Eine Zusammenstellung der Eigenschaften der untersuchten Blockcopolymer-Aggregate zeigt Tabelle 5. Hinsichtlich der Morphologie der Aggregate wurden für den gesamten untersuchten Zusammensetzungsbereich Compound-Mizell-artige Überstrukturen erhalten. Dies geschah entgegen der ursprünglichen Erwartung, dass bei niedrigeren hydrophilen Anteilen als den von Barz et al.¹⁹² untersuchten, andere Aggregatformen - insbesondere Vesikel - gefunden werden sollten.

Tabelle 5: Kolloidbildung mit P(HPMA)-b-P(LMA) Blockcopolymeren.

Polymer	M_n^{a)} / g/mol	f^{b)}	R_h^{c)} / nm	μ₂^{c)}	Morpho- logie^{d)}
P2	6.900	0,236	43	0,16	CM
P3	8.700	0,373	36	0,17	CM
P4	7.700	0,382	32	0,12	CM
P7	9.100	0,663	25	0,14	CM
P10	11.300	0,428	61	0,12	CM
P12	16.600	0,293	67	0,17	CM
P14	18.400	0,370	70	0,16	CM
P15	15.200	0,414	48	0,12	CM

^{a)} bestimmt per THF-GPC aus den Daten des Vorläuferpolymers, ^{b)} bestimmt per ¹H-NMR-Spektroskopie, ^{c)} Kolloidherstellung per Phaseninversion, ^{d)} bestimmt per cryoTEM, CM: Compound-Mizelle.

Der Hauptgrund dafür, dass keine Vesikel erhalten werden konnten, ist mutmaßlich die nur mittelstarke Wechselwirkung des hydrophilen P(HPMA) Blockes mit Wasser. Die Wechselwirkung von Polymer und Lösungsmittel wird über den mittels Lichtstreuung bestimmten zweiten Virialkoeffizienten A_2 quantifiziert. Hier weist P(HPMA) einen Wert von

$$A_2 (\text{P(HPMA)}) = 2,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-2}$$

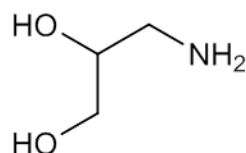
auf,²¹⁸ während der Koeffizient im Fall von Polyethylenglycol

$$A_2 (\text{PEG}) = 3,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-2}$$

beträgt.²¹⁹ Damit liegt A_2 (P(HPMA)) bei nur knapp einem Zehntel des Wertes für PEG. P(HPMA) quillt also im wässrigen Medium weniger stark als PEG. Entsprechende Blockcopolymeren mit Laurylmethacrylat als hydrophobem Block können somit schwerer die für die Vesikelbildung thermodynamisch günstige zylindrische bis leicht gekrümmte Geometrie annehmen. Dass die für Vesikel geeignete Zusammensetzung aufgrund der mittelmäßigen Wechselwirkung von P(HPMA) mit

Wasser eher im oberen Bereich des Richtintervalls von 35 ± 10 % liegen würde, war im Vorfeld erwartet worden. Jedoch konnte in den durchgeführten Experimenten auch im Bereich höherer hydrophiler Anteile keine Bildung von Vesikeln erreicht werden. Es erscheint unrealistisch, dass prinzipiell bei keiner Zusammensetzung eine geeignete Molekülgeometrie erreichbar sein sollte. Möglicherweise liegen zusätzlich zur geringen Quellfähigkeit auch kinetische Hemmnisse für die Vesikelbildung vor.

Eine Steigerung der Hydrophilie von P(HPMA) bei identischem Polymerisationsgrad ist durch die Anbindung von PEG-Aminen während der polymeranalogen Umsetzung in statistischer Mischung mit HPA denkbar. Im Hinblick auf die Einheitlichkeit und Reproduzierbarkeit des Enproduktes erschien dieses Vorhaben jedoch nur schwierig umzusetzen, zumal jede einzelne PEG-Amin-Seitenkette die Löslichkeitseigenschaften des HPMA-Blockes sehr stark beeinflusst. Als besser geeignet erschien die Vorgehensweise, die Hydrophilie jeder einzelnen Wiederholungseinheit in gleicher Weise zu erhöhen. Gleichzeitig sollten wegen der günstigen biologischen Eigenschaften von HPMA der strukturelle Aufbau und die funktionellen Gruppen der modifizierten Wiederholungseinheit möglichst wenig von HPMA abweichen. Es wurde daher das Konzept ausgearbeitet, in der polymeranalogen Umsetzung ein stärker hydrophiles Amin als HPA einzusetzen. Als geeignet dafür erschien das zweifach hydroxylierte Derivat 2,3-Dihydroxypropylamin (DHPA).

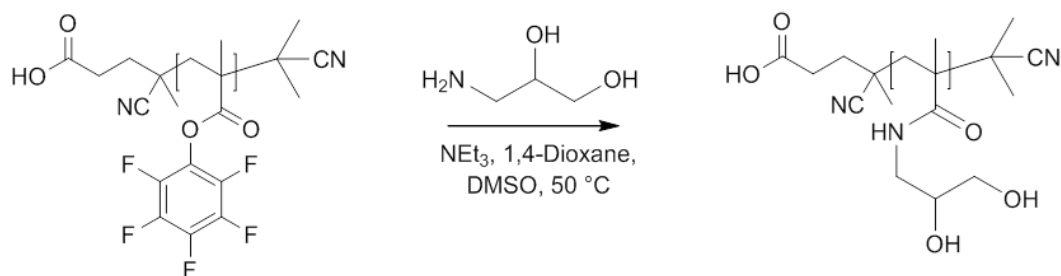


Schema 12: Strukturformel 2,3-Dihydroxypropylamin (DHPA).

3.1.2 Synthese und Charakterisierung von P(DHPMA)

Wie bereits angesprochen, enthält DHPA keine von HPA verschiedenen funktionellen Gruppen. Mohr et al. konnten zudem zeigen, dass auch bei erhöhten Temperaturen von 60 °C keine Konversion des Pentafluorphenolesters mit Aminoalkoholen erfolgt, wenn die Amin-Funktion durch eine Schutzgruppe blockiert ist.²¹⁵ Es konnte daher auch für DHPA von einer selektiven Reaktion der NH_2 -Funktion des Moleküls ausgegangen werden. Die Kinetik der Aminolyse von PFPMA mit DHPA wurde

per ^{19}F -NMR-Spektroskopie analysiert. Hierzu wurde das PFPMA-Homopolymer **H5** nach Entfernen der Dithiobenzoat-Endgruppe mittels AIBN-Verkochung (analog zum Vorgehen aus Kapitel 3.1.1.5) mit 2 Äquivalenten DHPA zum Homopolymer $\text{P}(\text{DHPMA})_{33}$ (**P16A**) umgesetzt:



Schema 13: Polymeranaloge Umsetzung von $\text{P}(\text{PFPMA})$ mit DHPA.

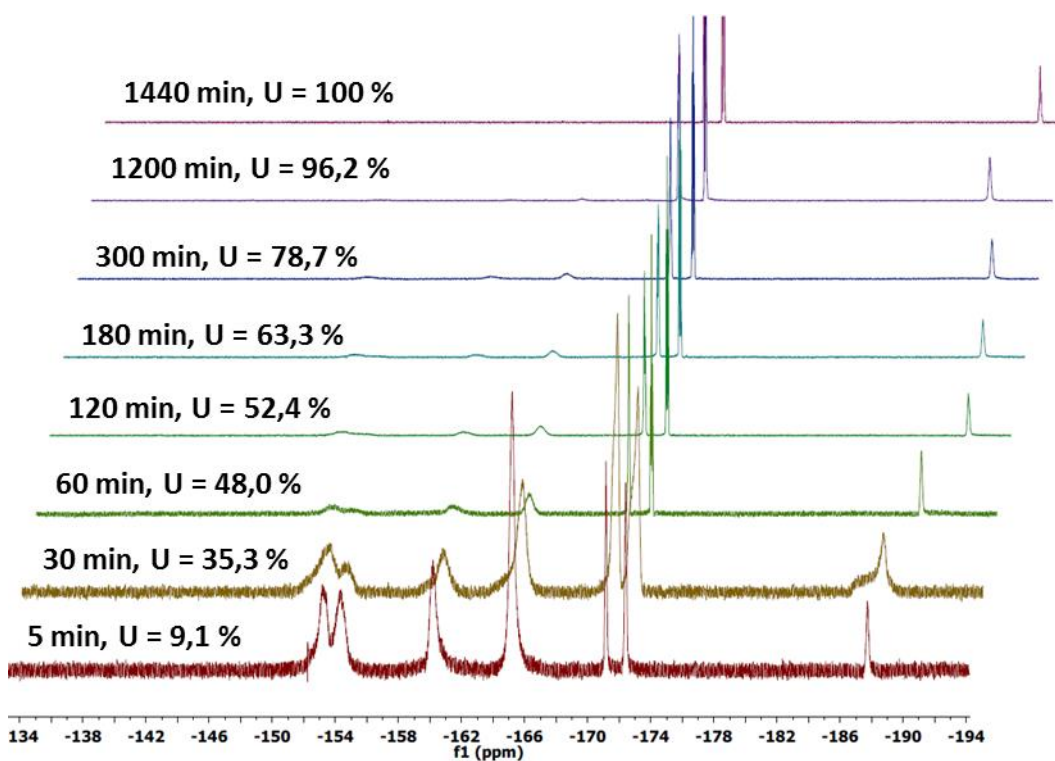


Abb. 25: Kinetische Untersuchung der polymeranalogen Umsetzung von $\text{P}(\text{PFPMA})$ mit DHPA per ^{19}F -NMR-Spektroskopie (**P16A**).

Eine vollständige Umsetzung aller PFP-Wiederholungseinheiten konnte bei $T = 50\text{ °C}$ nach 24-stündiger Reaktionsdauer erreicht werden. Dies liegt im Bereich der Werte, die für die polymeranaloge Umsetzung mit HPA berichtet werden.²¹⁵ Das ^1H -NMR-Spektrum der umgesetzten und per Dialyse gegen MilliQ-Wasser aufgereinigten Verbindung zeigt Abb. 26. Im aprotischen Lösungsmittel DMSO sind

die Signale der Wasserstoffatome am Amid-Stickstoff ($\delta = 7,39$ ppm) sowie den beiden Hydroxylgruppen ($\delta = 4,82$ ppm und $\delta = 4,60$ ppm) klar zu erkennen.

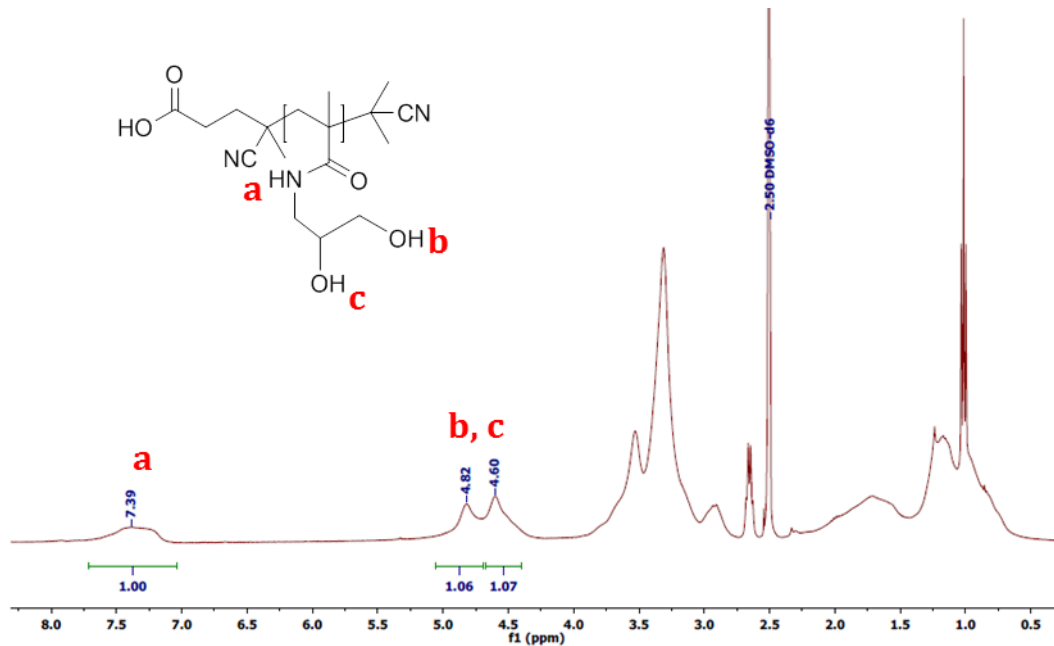


Abb. 26: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Poly(DHPMA) (P16A, DMSO- d_6 , 400 MHz).

Weil die Herstellung von P(DHPMA) über die polymeranaloge Umsetzung eines P(PFPMA)-Vorläufer-Polymers geschah, konnten identische Polymerisationsgrade und -Verteilungen wie bei der Synthese von P(HPMA) erzielt werden. Um die gewünschte stärkere Quellung des Polymers in Wasser zu quantifizieren, wurde der zweite Virialkoeffizient A_2 des Polymers in wässriger Lösung bestimmt. A_2 ist ein Maß für die thermodynamische Güte des Lösungsmittels und beschreibt die Wechselwirkung zwischen Polymer und Lösungsmittel.²²⁰ Bestimmt werden kann der Koeffizient anhand der Zimm-Gleichung für kleine Partikel ($< 10\text{nm}$):

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

Dabei ist R das Rayleigh-Verhältnis

$$R = (I_{\text{Lösung}} - I_{\text{Lösungsmittel}}) \cdot \frac{I_{\text{Standard,abs.}}}{I_{\text{Standard}}} \quad (3.9)$$

wobei I die Streuintensität der Lösung bzw. des Lösungsmittels sowie eines zusätzlichen Standards darstellt.

M_w ist das Gewichtsmittel der Molmasse des betreffenden Polymers und c die Konzentration der betreffenden Lösung.

Die optische Konstante K ergibt sich zu

$$K = \frac{4\pi^2 \cdot n_0^2}{N_A \cdot \lambda^4} \cdot \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \quad (3.10)$$

Hierbei bezeichnen N_A die Avogadro-Konstante, λ die Wellenlänge des eingestrahlten linear polarisierten Lichts und n_0 den Brechungsindex des reinen Lösungsmittels.

Das Brechungsindexinkrement dn/dc gibt die Abhängigkeit des Brechungsindex von der Konzentration der Polymerlösung im betreffenden Lösungsmittel an.

dn/dc wurde für das System P(DHPMA)/H₂O mittels eines Michelson-Interferometers bestimmt. Weil dieses Verhältnis erst ab mittleren Molekülmassen von ca. 20.000 g/mol als konstant angesehen werden kann, wurde nach dem vorangehend beschriebenen Verfahren aus dem P(PFPMA)₁₆₇ Homopolymer **H10** ein P(DHPMA)₁₆₇ Homopolymer von $M_n = 27.000$ g/mol (**P16B**) hergestellt. Die Bestimmung des Brechungsindexinkrements für eine Serie von Polymerlösungen der Konzentrationen $c = 0,15$ g/L – 3,02 g/L ergab einen Wert von

$$dn/dc = 0,1774 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}.$$

Unter Zuhilfenahme dieses Ergebnisses wurde von [REDACTED] per statischer Lichtstreu-Messung der Zimm-Plot für das System **P16B**/H₂O erstellt und ausgewertet (Abb. 27).

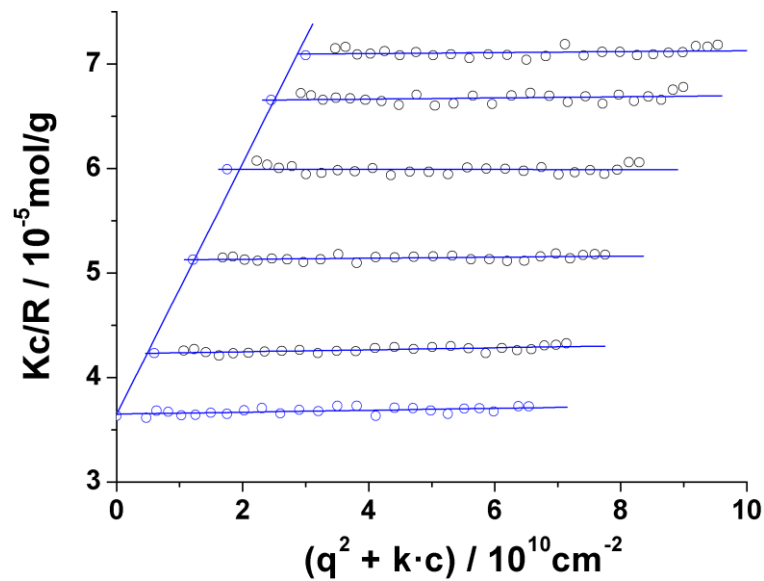


Abb. 27: Zimm-Plot P16B (633 nm, 20 °C).

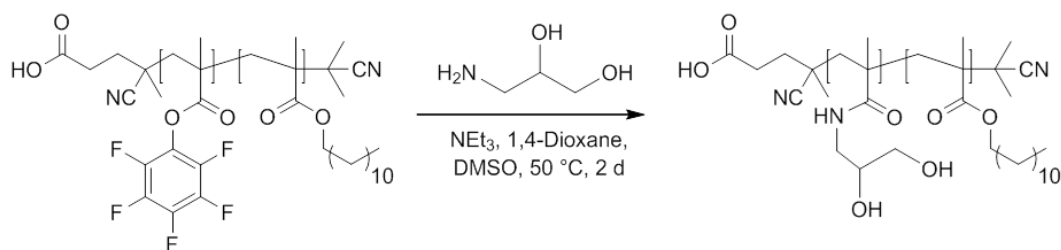
Der für den zweiten Virialkoeffizienten ermittelte Wert betrug

$$A_2 = (1,2 \cdot 10^{-3} \pm 1,08 \cdot 10^{-4}) \text{ mol} \cdot \text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-2}.$$

Dieses Ergebnis liegt beim knapp Fünffachen des literaturbekannten Wertes für P(HPMA). Das Ziel einer signifikanten Steigerung der Wechselwirkung zwischen Polymer und Lösungsmittel und damit ein besseres Quellen in wässrigen Systemen konnte also erreicht werden.

3.1.3 Synthese und Charakterisierung von P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymeren

Aufbauend auf dem Ergebnis aus Kapitel 3.1.2, der Synthese eines strukturell P(HPMA)-ähnlichen, aber stärker hydrophilen Polymers wurden P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymeren hergestellt. Dies gelang analog zur polymeranalogen Umsetzung der P(PFPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymeren (Kap. 3.1.1.6) unter identischen Bedingungen. Der einzige Unterschied war die Verwendung von DHPA statt HPA für die Aminolyse in identischer Stöchiometrie.



Schema 14: Polymeranaloge Umsetzung der P(PFPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymeren mit DHPA.

Die so hergestellten amphiphilen Blockcopolymeren sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Synthetisierte P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymeren P17-P24.

Polymer	Zusammensetzung ^{a)}	Vorläufer	M _n ^{a)} / g/mol	hydrophiler Massenanteil ^{b)}
P17	P(DHPMA) ₁₃ - <i>b</i> -P(LMA) ₃₀	BC15	10.100	0,194
P18	P(DHPMA) ₃₃ - <i>b</i> -P(LMA) ₅₅	BC16	19.600	0,269
P19	P(DHPMA) ₂₃ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₁	BC17	9.100	0,398
P20	P(DHPMA) ₃₁ - <i>b</i> -P(LMA) ₃₁	BC18	12.900	0,400
P21	P(DHPMA) ₃₃ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₈	BC19	12.200	0,415
P22	P(DHPMA) ₁₅ - <i>b</i> -P(LMA) ₁₃	BC20	5.600	0,420
P23	P(DHPMA) ₃₁ - <i>b</i> -P(LMA) ₁₆	BC21	8.900	0,554
P24	P(DHPMA) ₃₅ - <i>b</i> -P(LMA) ₁₈	BC22	10.500	0,562

^{a)} bestimmt per THF-GPC aus den Daten des Vorläuferpolymers, ^{b)} bestimmt per ¹H-NMR-Spektroskopie.

Die Bestimmung der Zusammensetzung erfolgte anhand der ¹H-NMR-Spektren der Vorläuferpolymere, da sich die jeweiligen Polymerisationsgrade bei der polymeranalogen Umsetzung nicht änderten. Ergänzend zeigt Abb. 28 ein typisches ¹³C-NMR-Spektrum der P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymeren anhand von **P20**. Es zeigt neben den stark tieffeldverschobenen Signalen der Ester- bzw. Amid-Kohlenstoffatome (C_a, δ = 177,99 ppm; C_b, δ = 177,68 ppm) im mittleren Bereich die Signale der beiden Hydroxyl-Kohlenstoffatome (C_c, δ = 77,43 ppm;

C_d , $\delta = 65,14$ ppm) und das Signal der α -Methylengruppe des Dodecyl-Esters (C_e , $\delta = 64,32$ ppm).

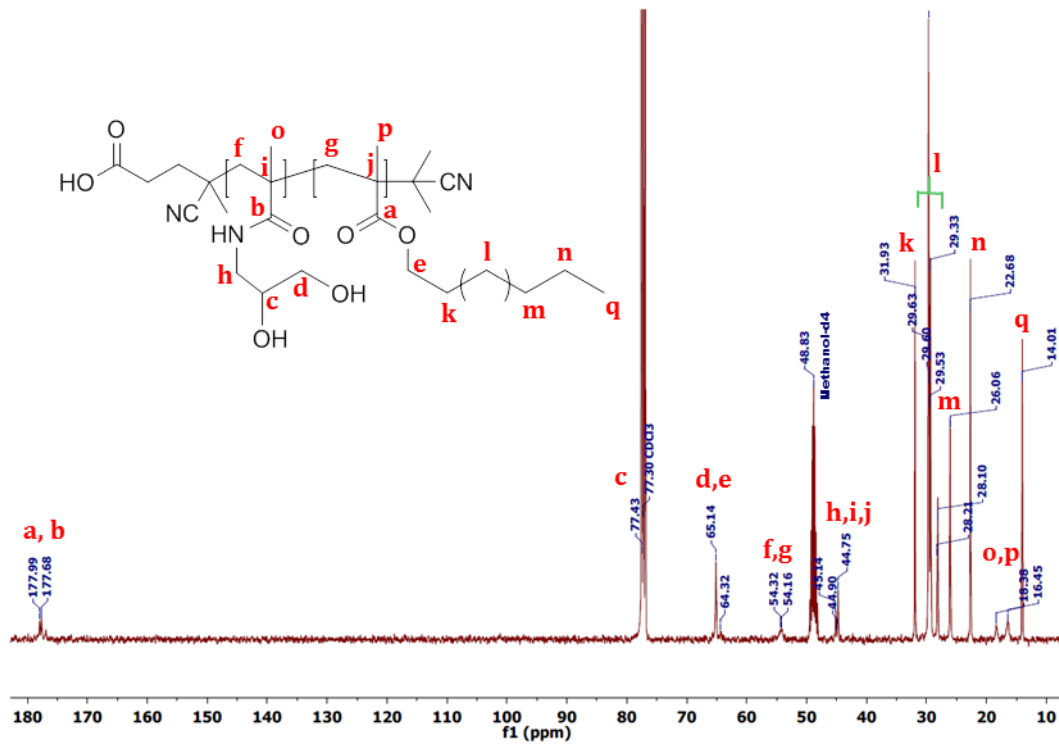


Abb. 28: Typisches ^{13}C -NMR-Spektrum von $P(\text{DHPMA})$ - b - $P(\text{LMA})$ Blockcopolymeren am Beispiel von P20 ($\text{CDCl}_3/\text{MeOH-}d_4$, 100 MHz).

3.2 Herstellung, Charakterisierung und Beladung von P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Vesikeln

Mittels der neuartigen amphiphilen Blockcopolymeren P(DHPMA)-*b*-P(LMA) wurden Polymersome hergestellt. Dies gelang zunächst per Phaseninversion. Um den Blockcopolymer-Zusammensetzungsbereich einzugrenzen, innerhalb dessen Vesikel erhalten werden können, wurde die Kolloidbildung mit Polymeren mit hydrophilen Massenanteilen von ca. 15 – 70 % untersucht. Anschließend wurde die Vesikelherstellung mittels Dualer Zentrifugation untersucht, um die potentielle Eignung dieser Methode als Prozess zur Herstellung und Beladung von Polymervesikeln zu evaluieren. Darüber hinaus wurden Tests zur Stabilität der Vesikel unternommen. Sie zeigten eine geringere Membrandurchlässigkeit und erhöhte Stabilität gegenüber Detergenzien im Vergleich zu Phospholipidvesikeln. Die Beladung der Vesikel mit einem hydrophilen Farbstoff als Modellsubstanz mittels Dualer Zentrifugation gelang mit einer Einschlusseffizienz von über 30 %, während per konventioneller Phaseninversion nur gut ein Zehntel dieses Wertes erreicht wurde.

3.2.1 Untersuchung des Löslichkeits- und Aggregationsverhaltens

Zur späteren Durchführung von Kolloidbildungsexperimenten mussten zunächst geeignete Lösungsmittel (oder Lösungsmittelgemische) zur vollständigen molekularen Solvatisierung von P(DHPMA) Homopolymeren und der P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymeren gefunden werden. Um eine Entmischung bei der Phaseninversion zu vermeiden, wurde die Auswahl auf wassermischbare Lösungsmittel beschränkt. Die Vortests wurden mit DHPMA-Homopolymer **P16A** sowie Blockcopolymer **P20** durchgeführt. Dabei wurde zunächst makroskopisch überprüft, ob das jeweilige Lösungsmittel das Polymer durch Rühren bei Raumtemperatur bei einer Konzentration von 10 mg/mL vollständig solvatisieren konnte. War dies der Fall, wurde per dynamischer Lichtstreuung überprüft, ob auch keine Aggregation in kolloidaler Größenordnung vorlag. Die Ergebnisse dieser Löslichkeitsversuche sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Löslichkeit von *P(DHPMA)* Homo- und *P(DHPMA)-b-P(LMA)* Blockcopolymeren.

Lösungsmittel	Homo- polymer ^{a)}	Block- copolymer ^{b)}
THF	×	×
1,4-Dioxan	×	×
Aceton	×	×
Ethylacetat	×	×
Dimethylsulfoxid	✓	✓
Ethanol	✓	×
Methanol	✓	×
Wasser	✓	×
Hexafluorisopropanol	✓	×
THF + 20 % MeOH	✓	✓

^{a)} *P(DHPMA)*₃₂, ^{b)} *P(DHPMA)*₃₁-*b-P(LMA)*₃₁.

Es zeigte sich, dass neben Dimethylsulfoxid ein Gemisch aus Tetrahydrofuran und Methanol (8:2 v/v) gut geeignet war, um sowohl Homo- als auch Blockcopolymer zu solvatisieren. Löslichkeitsversuche mit Blockcopolymeren anderer Zusammensetzung ergaben identische Ergebnisse, bis auf das Blockcopolymer **P17** (niedrigster DHPMA-Anteil), welches in Dimethylsulfoxid nicht löslich war.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden die kritischen Mizellbildungskonzentrationen (CMC) der Blockcopolymeren **P17**, **P19**, **P21** und **P23** bestimmt, die bei ähnlicher mittlerer Molekülmasse einen breiten Zusammensetzungsbereich überspannten. Die CMC wurde mittels Pyren-Fluoreszenzspektroskopie ermittelt. Dabei wurde die unterschiedliche Fluoreszenz des hydrophoben Aromaten Pyren in polarer und apolarer Umgebung ausgenutzt. Abb. 29 zeigt das Emissionsspektrum von Pyren in wässriger Lösung in Gegenwart von **P23** bei einer Polymerkonzentration von 10⁻¹² mol/L (schwarz) und 1 mol/L (rot). Diese Werte lagen unterhalb bzw. überhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration des Polymers, sodass

sich Pyren bei der niedrigeren Polymerkonzentration überwiegend in einer polaren, im anderen Fall jedoch in einer überwiegend apolarer Umgebung befand.

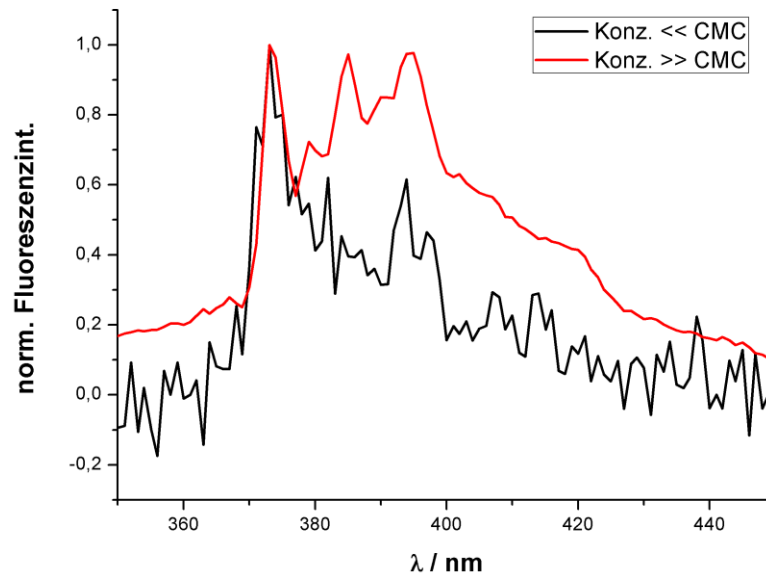


Abb. 29: Fluoreszenz-Emissionsspektrum von Pyren in polarer (schwarz) und apolarer (rot) Umgebung. $\lambda_{ex} = 333$ nm.

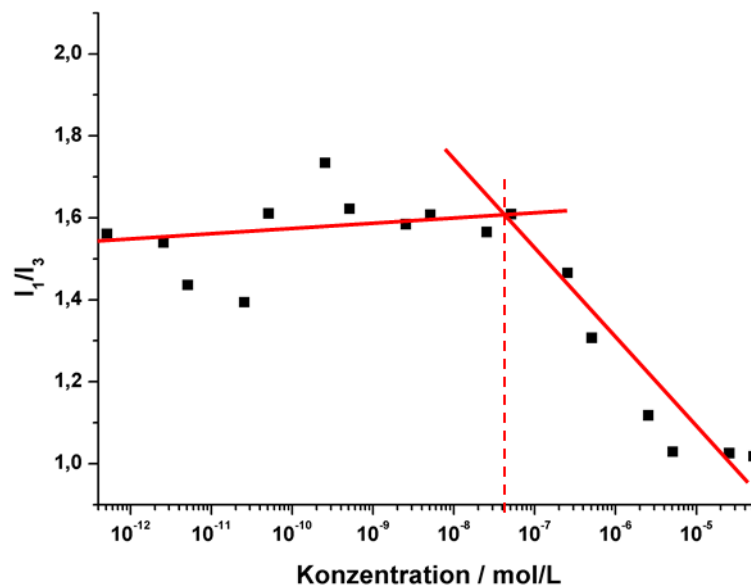


Abb. 30: Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration von P19 in PBS.

Die geänderte Polarität der Umgebung beeinflusste das Verhältnis der ersten vibronischen Bande (I_1 , $\lambda = 373$ nm) zur dritten vibronischen Bande (I_3 , $\lambda = 384$ nm). Die konzentrationsabhängige Veränderung des Verhältnisses I_1/I_3 erlaubte die Bestimmung der CMC im betreffenden Lösungsmittel.²²¹

Abb. 30 zeigt die Entwicklung des Verhältnisses I_1/I_3 bei steigender Konzentration des Polymers **P19**. Während das Verhältnis bis zu einer Größenordnung von ca. $c = 10^{-7}$ mol/L um einen Wert von $I_1/I_3 = 1,6$ schwankte, fiel es bei weiterer Erhöhung der Konzentration auf nahezu $I_1/I_3 = 1,0$ ab. Durch einen linearen Fit dieser beiden klar separierten Bereiche wurde als Schnittpunkt der beiden Geraden die kritische Mizellbildungskonzentration von **P19** in PBS zu $CMC = 4,1 \cdot 10^{-8}$ mol/L erhalten.

Tabelle 8 zeigt die für **P17**, **P19**, **P21** und **P23** ermittelten CMC-Werte.

Tabelle 8: Kritische Mizellbildungskonzentrationen der Polymere P17, P19, P21 und P21.

Polymer	Hydrophiler Anteil f	LMA-Einheiten	CMC / mol·L ⁻¹
P17	0,194	30	$1,5 \cdot 10^{-8}$
P19	0,398	21	$4,1 \cdot 10^{-8}$
P21	0,415	28	$2,2 \cdot 10^{-8}$
P23	0,554	16	$2,0 \cdot 10^{-7}$

Beim Polymer **P17** begann die Aggregation zu kolloidalen Überstrukturen bei einer Konzentration von $1,5 \cdot 10^{-8}$ mol/L. Dieser Wert liegt unterhalb der für **P19** ermittelten CMC. Zurückzuführen ist dies auf die Tatsache, dass **P17** aufgrund seines geringeren hydrophilen Massenanteils f bei ähnlicher Gesamtmasse einen größeren hydrophoben Block aufweist. Dieser konnte vom wässrigen Medium schlechter solubilisiert werden, weshalb die Aggregation früher einsetzte. Analog erklärt sich die höhere CMC von **P23**. Dieses Polymer besitzt den kürzesten hydrophoben Block und konnte daher leichter solubilisiert werden, weshalb die Überstrukturbildung erst bei einer höheren Konzentration von $2,0 \cdot 10^{-7}$ mol/L einsetzte. Dass neben dem hydrophilen Gewichtsanteil auch die absolute Länge des hydrophoben Blocks eine Rolle spielte, zeigt die für das Polymer **P21** ermittelte CMC. **P21** liegt bezüglich des hydrophilen Anteils knapp über **P19**, wies jedoch eine geringere CMC auf. Sie liegt mit $2,2 \cdot 10^{-8}$ mol/L nah an dem Wert, der für **P17** ermittelt wurde. Verständlich wird dies, wenn man die mittlere Anzahl an Wiederho-

lungseinheiten des hydrophoben LMA-Blockes betrachtet: **P21** liegt mit 28 LMA-Einheiten pro Kette näher an **P17** (30 Wiederholungseinheiten), als am kürzeren **P19** mit 21 Einheiten.

3.2.2 Vesikelbildung und Beladung mittels Phaseninversion

3.2.2.1 Herstellung von P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Vesikeln mittels Phaseninversion

Die Kolloidbildung mittels der P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymere **P17-P24** wurde per Phaseninversion analog zum Vorgehen bei den P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Polymeren (Kap. 3.1.1.7) untersucht. Ausgehend vom molekular gelösten Zustand wurde kontinuierlich der Anteil an wässrigem Puffer (PBS) erhöht und die Polymermoleküle so zur Selbstassemblierung gezwungen. Dies wurde zunächst mittels der direkten Dialyse der Polymerlösung im Dialyseschlauch gegen MilliQ-Wasser oder PBS-Puffer getestet. Jedoch hatten derartige Versuche zum Ergebnis, dass das jeweilige Polymer binnen weniger Stunden ausflockte.

Eine Bildung stabiler Kolloide konnte durch die Senkung der Wasserzugaberate erreicht werden. Dies geschah anhand der Verwendung einer Spritzenpumpe, welche zudem die Reproduzierbarkeit maßgeblich verbesserte. In einem typischen Experiment wurden ca. 2,0 mg des betreffenden Polymers in 400 μ L DMSO oder THF/MeOH (8:2 v/v) gelöst und unter Rühren bei einer Flussrate von $v = 0,225$ mL/h mit wässrigem Medium zu einem Gesamtvolumen von 4,0 mL versetzt. Auf diese Weise wurden kolloidal stabile, trübe Dispersionen des Polymers im Wasser/Lösungsmittel-Gemisch erhalten, aus dem das Lösungsmittel durch Dialyse entfernt wurde.

Zur Charakterisierung der Aggregate wurden cryoTEM- und Lichtstremessungen durchgeführt.

Zunächst wurde die Größe per dynamischer Lichtstreuung bestimmt. Die Messung bei Winkeln von 30°-150° in Schritten von jeweils 15° ergab zunächst die winkelabhängigen apparenten Diffusionskoeffizienten D_a . Aus diesen wurde per linearem Fit der reale Diffusionskoeffizient D bestimmt.

Hieraus wurde über die Stokes-Einstein-Gleichung

$$R_h = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot D} \quad (3.11)$$

der hydrodynamische Radius ermittelt. Abb. 31 zeigt beispielhaft die für Aggregate aus **P21** ermittelten Messwerte und die per biexponentiellem Fit ermittelte Autokorrelationsfunktion bei einem Winkel von 90° . Dazu ist die Auftragung der erhaltenen apparenten Diffusionskoeffizienten in Abhängigkeit des Messwinkels dargestellt.

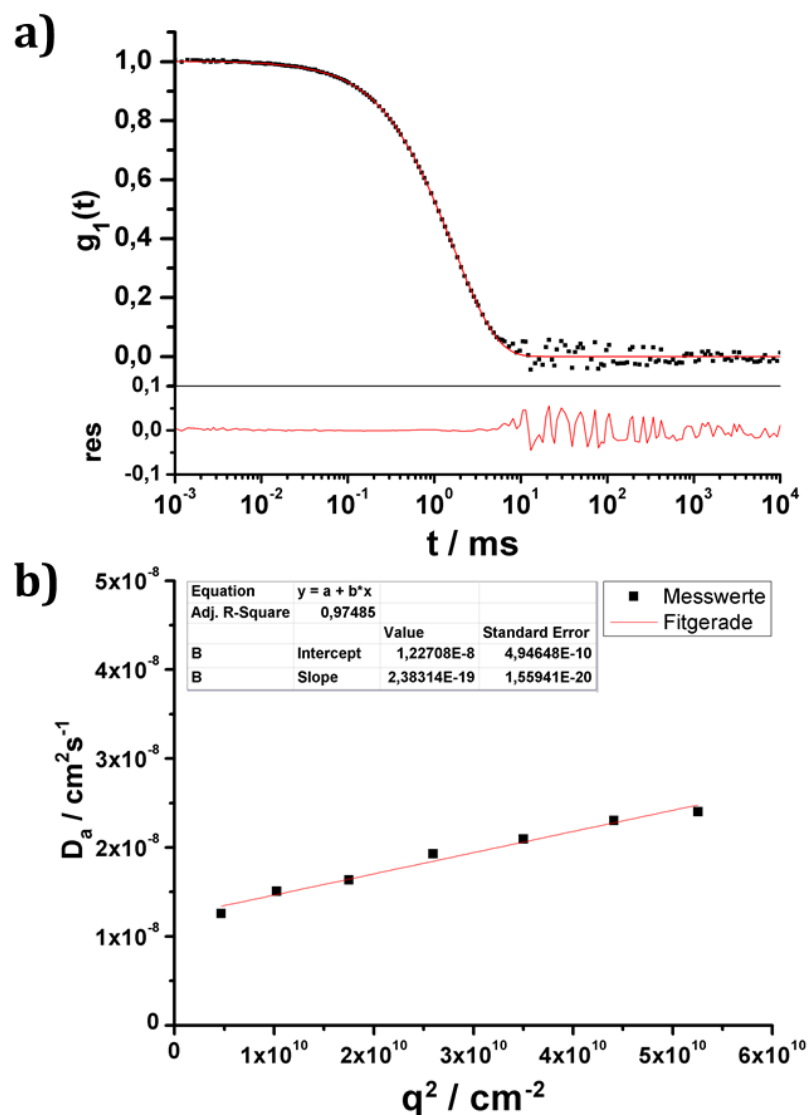


Abb. 31: Untersuchung der aus P21 gebildeten Dispersion (Phaseninversion DMSO/H₂O).
 a) Autokorrelationsfunktion (90°): Messwerte (schwarz) und biexponentieller Fit (rot).
 b) Bestimmung des realen Diffusionskoeffizienten aus den winkelabhängigen D_a .

Die so erhaltenen Messwerte sind in Tabelle 9 aufgeführt. Es fällt auf, dass die aus den Polymeren **P17** und **P24** erhaltenen Aggregate signifikant kleiner waren als die aus den übrigen P(DHPMA)-b-P(LMA) Blockcopolymeren bestehenden Kolloide. Die aus **P18-P23** hergestellten Kolloide wiesen hydrodynamische Radien um ca. $100 \text{ nm} < R_h < 175 \text{ nm}$ auf. Dagegen wurden für **P17** und **P24**, die Polymere mit dem niedrigsten bzw. höchsten Massenanteil, Werte unterhalb von 50 nm erhalten. Die Größendispersität wurde mittels des aus der dynamischen Lichtstreuung erhaltenen μ_2 -Wertes quantifiziert. μ_2 lag bei allen Proben zwischen 0,09 und 0,17, was moderaten Dispersitäten entspricht, die bei dieser Art der Vesikelherstellung intrinsisch gegeben sind.

Tabelle 9: Ergebnisse der Kolloidbildung aus den Polymeren P17-P24 per Phaseninversion.

Polymer	hydrophiler Massenanteil f	R_h^{a)} / nm	μ_2^{a)}	Morphologie^{b)}
P17	0,194	49	0,12	Compound-Mizellen
P18	0,269	113	0,17	Vesikel
P19	0,398	101	0,15	Vesikel
P20	0,400	157	0,12	Vesikel
P21	0,415	175	0,17	Vesikel
P22	0,420	98	0,16	Vesikel
P23	0,554	135	0,09	Vesikel
P24	0.562	26	0,18	Compound-Mizellen

^{a)} bestimmt per DLS, ^{b)} bestimmt per cryoTEM und SLS.

Der Nachweis der vesikulären Aggregatstruktur gelang sowohl mittels cryoTEM, als auch per statischer Lichtstreuung als Methode der Ensemble-Mittelung.

Abb. 32 zeigt cryoTEM Aufnahmen von Proben der Polymere **P17**, **P18**, **P19** und **P22**. Aus diesen Aufnahmen wird ersichtlich, dass **P17** kleine mizellartige Strukturen ohne inneres wässriges Kompartiment ausbildet. Die anderen Polymere dage-

gen aggregieren zu Vesikeln mit deutlich erkennbarer Membran, die das innere wässrige Kompartiment von der umgebenden wässrigen Phase abgrenzt. Mittels der Software *ImageJ* konnte darüber hinaus die mittlere Membrandicke ausgelesen werden (Tabelle 10).

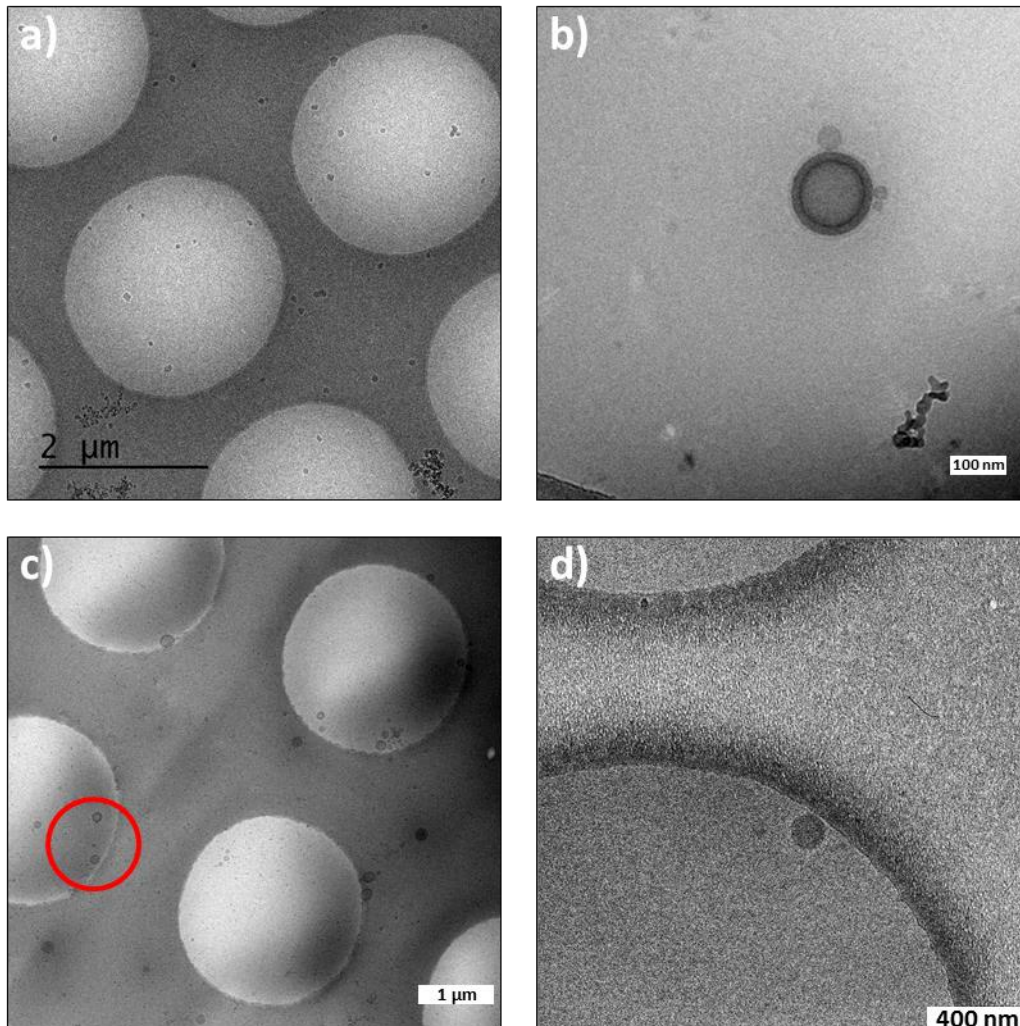


Abb. 32: cryoTEM-Aufnahmen der per Phaseninversion gebildeten Kolloide aus den Polymeren P17 (a), P18 (b), P19 (c) und P22(d).

Tabelle 10: Übersicht Membrandurchmesser.

Vesikel aus Polymer	Masse des hydrophoben Blocks / g·mol ⁻¹	Membrandicke ^{a)} / nm
P18	14.000	22,5 ± 0,8
P19	5.300	16,5 ± 0,8
P22	3.200	9,3 ± 0,5

^{a)} Mittelung über je 10 Vesikel.

Die ermittelten Membrandicken lagen zwischen 9,3 und 22,5 nm. Sie skalieren mit dem mittleren Molekulargewicht des hydrophoben Blocks der betreffenden Polymere und liegen signifikant über den Werten für Vesikel aus natürlichen Phospholipiden ($d = 3\text{-}5\text{ nm}$).

Zur zusätzlichen Verifikation der Vesikelbildung wurden von [REDACTED] statische Lichtstreuungsmessungen durchgeführt. Abb. 33 zeigt beispielhaft die Ergebnisse der Untersuchung des Aggregationsverhaltens von P18.

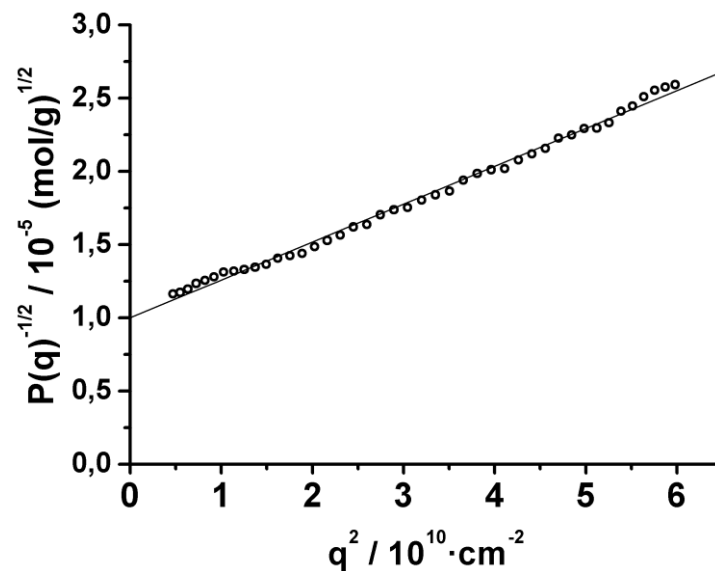


Abb. 33: Statische Lichtstreuung von Vesikeln aus P18; Berry Plot.

Die Auswertung erfolgte nach der Berry-Methode, wobei $P(q)^{-1/2}$, die inverse Wurzel des Partikelformfaktors, gegen q^2 aufgetragen wurde. Auf diese Weise wurde der Trägheitsradius zu

$$R_g = 125 \text{ nm}$$

erhalten. Zusammen mit dem zuvor per DLS erhaltenen hydrodynamischen Radius ergab sich so ein ρ -Verhältnis von

$$\rho = \frac{125 \text{ nm}}{113 \text{ nm}} = 1,10.$$

Dieser Wert ist typisch für Vesikel moderater Dispersität. Bei ideal monodispersen Kugelschalen würde ein Wert von $\rho = 1$ resultieren. Bei realen Proben weicht das Verhältnis aber in der Regel leicht davon ab. Grund hierfür sind die im Vergleich zum Durchmesser nicht vernachlässigbar geringe Membrandicke sowie die inhärente Polydispersität.

Anhand der in Tabelle 9 aufgeführten Polymere konnte gezeigt werden, dass P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymere mit einem Anteil von ca. 27 – 55 % Massenprozent P(DHPMA) zu Vesikeln aggregieren können. P(HPMA)-*b*-P(LMA) Polymere dagegen sind hierzu nicht in der Lage. Dies zeigt sich insbesondere anhand des direkten Vergleichs der beiden Polymere **P3** (P(HPMA)₂₃-*b*-P(LMA)₂₁) und **P19** (P(DHPMA)₂₃-*b*-P(LMA)₂₁). Sie wurden aus demselben Vorläufer-Polymer **BC17** hergestellt und unterschieden sich demnach nicht in der Anzahl der jeweiligen Wiederholungseinheiten. Während **P19** stabile Vesikel ausbildete, aggregierte **P3** trotz des nur minimal geringeren hydrophilen Gewichtsanteils zu Compound-Mizellen. Dies konnte auch durch einen längeren hydrophilen Block bei fast identischer LMA-Blocklänge - wie im Fall des Polymers **P6** - nicht kompensiert werden. Der Grund für das unterschiedliche Aggregationsverhalten lag demnach in der intrinsisch stärkeren Hydrophilie der DHPMA-Wiederholungseinheiten.

3.2.2.2 Beeinflussung der Vesikelgröße durch Extrusion

Wie in Tabelle 9 aufgeführt, wiesen die per Phaseninversion erhaltenen Vesikel hydrodynamische Radien von knapp 100 nm bis hin zu 175 nm auf. Dies entspricht Durchmessern von rund 200 nm bis hin zu 350 nm. Die Größe der Gefäßöffnungen in Tumoren liegt in den meisten Fällen zwar bei 100 - 800 nm,²²² eine verstärkte

Akkumulation wird aufgrund des interstitiellen Drucks aber für Partikelgrößen zwischen 30 und 200 nm gefunden.¹³² Zudem ist dieser Größenbereich zu groß für die renale Filtration, aber noch klein genug, um einer schnellen Erkennung durch das MPS und der damit verbundenen raschen Entfernung aus dem Blutkreislauf zu entkommen.

Es wurde daher versucht, die Größe der Polymervesikel nach ihrer Assemblierung per Extrusion hinsichtlich der Wirksamkeit des EPR-Effekts zu optimieren. Dazu wurden die Vesikel nach der Dialyse wiederholt durch die Poren der Polycarbonatmembran eines Mini-Extruders gepresst.

Abb. 34 zeigt die Autokorrelationsfunktion einer Probe von Vesikeln aus Polymer P23. Diese wiesen ohne Extrusion einen hydrodynamischen Radius von $R_h = 135$ nm auf mit $\mu = 0,09$. Nach 21-maliger Extrusion durch eine Membran der Porengröße $d = 100$ nm betrug der Radius nur noch $R_h = 49$ nm. Die Dispersität war zudem auf den signifikant kleineren Wert von $\mu = 0,04$ geschrumpft.

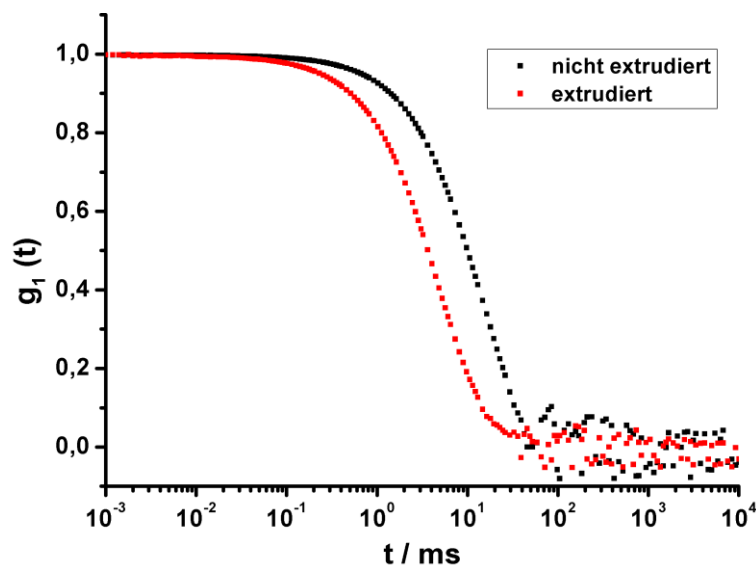


Abb. 34: Vergleich der Vesikelgröße vor und nach Extrusion per DLS, experimentell erhaltene ACF (90°).

schwarz: Vesikel aus P23 (Phaseninversion), nicht extrudiert,

rot: Vesikel aus P23 (Phaseninversion), nach Extrusion durch eine Membran der Porengröße $d = 100$ nm.

Durch die Extrusion konnte also die Größe der Vesikel gezielt beeinflusst werden und auch die Größenverteilung homogenisiert werden. Analoge Ergebnisse wurden bei der Verwendung anderer Polymere erzielt.

3.2.2.3 Beladung von P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Vesikeln mit einem hydrophilen Modellfarbstoff

Eine herkömmliche Methode zur Beladung von Vesikeln mit einem hydrophilen Cargo ist die Lösung des besagten Stoffes in der wässrigen Phase vor Vesikelbildung. Diese wird zur Polymerlösung hinzugegeben, um die Assemblierung zu Polymersomen zu induzieren (Abb. 35).

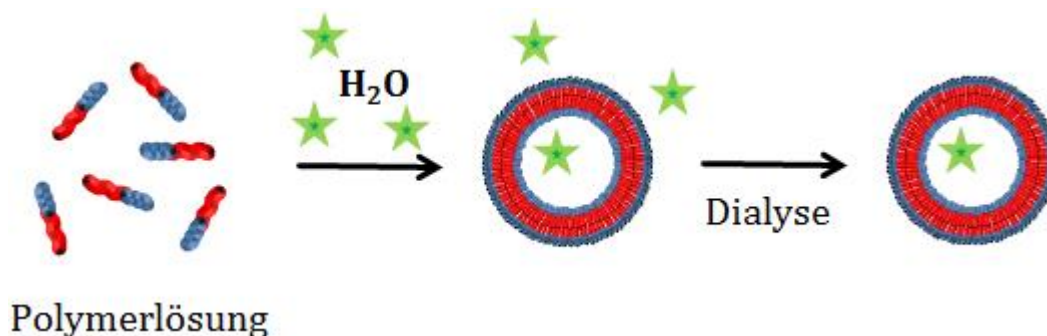


Abb. 35: Beladung von Vesikeln mit hydrophiler Fracht per Phaseninversion.

Dabei erfolgt eine statistische Verkapselung des Anteils an Cargo, welches sich in dem Bereich der wässrigen Phase befindet, der bei der Vesikelbildung von der Membran umschlossen wird. Weil dies nur ein geringer Anteil an der gesamten wässrigen Phase ist, ist die Einschlusseffizienz in der Regel recht gering. Sie liegt bei Polymervesikeln meist im niedrigen einstelligen Prozentbereich.²²³

Als hydrophile Modellsubstanz wurde der wasserlösliche Farbstoff Sulforhodamin B verwendet und per Phaseninversion in Vesikel aus **P19** eingeschlossen.

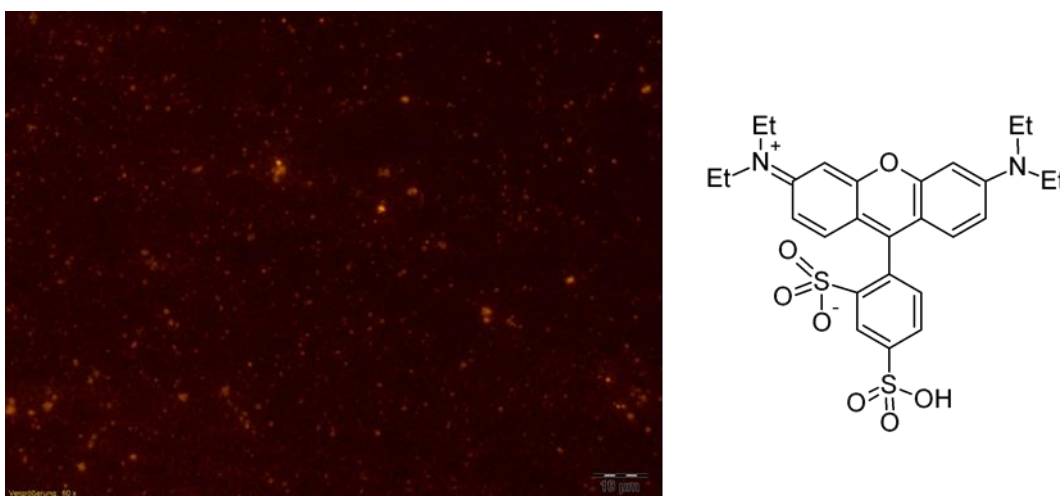


Abb. 36: Einschluss von Sulforhodamin B in Vesikel aus P19.
Links: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Größenskala: 10 μm),
Rechts: Molekülstruktur von Sulforhodamin B.

Zur Verkapselung wurde analog der Vesikelbildung in Kapitel 3.2.2.1 verfahren mit dem einzigen Unterschied, dass statt PBS eine 1 mM Lösung des Farbstoffes in PBS verwendet wurde. Die Abtrennung des nicht eingeschlossenen Farbstoffes erfolgte durch Dialyse gegen PBS-Puffer. Das abgetrennte Sulforhodamin B wurde per UV/Vis-Spektrometrie anhand der Extinktion bei $\lambda = 564$ nm quantifiziert. Die Einschlusseffizienz ergab sich nach

$$EE = \left(1 - \frac{\text{Menge an freiem Farbstoff}}{\text{Gesamtmenge}}\right) \cdot 100 \% \quad (3.12)$$

zu $EE = 3,2$ %.

Dieser Wert im niedrigen einstelligen Bereich ist typisch für die Beladung von Vesikeln mit hydrophilen Substanzen. Ursächlich hierfür ist der statistische Einschluss des Cargos zusammen mit der umgebenden wässrigen Phase.

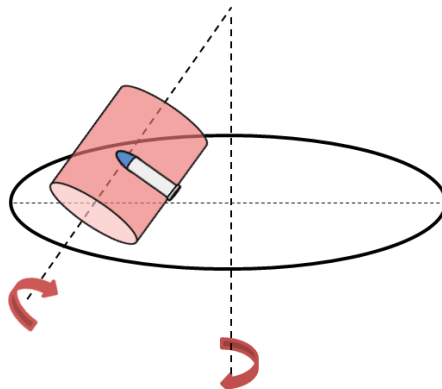
Ein weiterer Austritt von Farbstoff in das Dialysemedium nach initialer Abtrennung des nicht verkapselten Sulforhodamin B konnte spektrometrisch nicht festgestellt werden. Die hydrophile Fracht konnte also dauerhaft im Inneren des Vesikels eingeschlossen werden.

3.2.3 Vesikelherstellung und Beladung mittels Dualer Zentrifugation

Wie bereits beschrieben, besteht ein wichtiger Nachteil der Beladung von Vesikeln mittels konventioneller Phaseninversionstechniken in der geringen Einschlusseffizienz. Darüber hinaus ist diese Technik für die Präparation von Vesikeln für die biomedizinische Forschung nur eingeschränkt anwendbar wegen der Inkompatibilität vieler Wirkstoffe mit organischen Lösungsmitteln (wie z.B. die Denaturierung von Proteinen) oder toxischen Effekten durch Restspuren an Lösungsmittel.

Hier bietet sich als gangbare Alternative die Duale Zentrifugation (DZ) an, eine Variante der Filmrehydratisierung. Die DZ wurde von Massing et al. zur Präparation und Beladung von Liposomen eingeführt.²²⁴ Dabei wird zunächst ein dünner Film des betreffenden Lipids an der Wandung eines Zentrifugengefäßes hergestellt. Anschließend wird die Probe mit einer kleinen Menge der Lösung des zu verkapseln-

den Stoffes versetzt und in einer speziellen Zentrifuge zusätzlich zur normalen Zentrifugation um die eigene vertikale Achse rotiert (Schema 15).



Schema 15: Prinzip der Dualen Zentrifugation.

Durch die resultierenden Scherkräfte kommt es zu einer effizienten Durchmischung der Probe. Zusätzlich können die mechanischen Kräfte durch die Zugabe von Keramikkügelchen verstärkt werden. Indem nur eine geringe Menge an wässriger Phase verwendet wird, können mit dieser Methode hohe Einschlusseffizienzen erreicht werden. Man erhält die gebildeten Vesikel zunächst als hochviskose Gele, welche anschließend zu einer konventionellen Dispersion verdünnt werden können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Versuch unternommen, mittels Dualer Zentrifugation Polymervesikel herzustellen und zu beladen.

3.2.3.1 Vesikelherstellung mittels Dualer Zentrifugation

Zum Test der Polymersomen-Herstellung mittels DZ wurde zunächst ein dünner Film der verwendeten Polymere hergestellt. In einem typischen Ansatz wurden 4,5 mg des Polymers in 0,1 mL Chloroform/Methanol (8:2 v/v) gelöst und an der Wandung eines 0,2 mL Zentrifugengefäßes im Stickstoffstrom eingeeengt und anschließend im Vakuum getrocknet. Danach wurde der erhaltene Film für 15 min mit 8 μ L PBS-Puffer inkubiert und 47 mg Keramikkügelchen ($\varnothing = 0,3-0,4$ mm) zugegeben. Zentrifugiert wurde die Probe für 2x 16 min in einer für die DZ ausgestatteten Zentrifuge bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 2500 min^{-1} . Um die Viskosität zu verringern, wurden anschließend weitere 19,1 μ L PBS zugegeben und die Probe in zwei Zentrifugationsläufen zu je 2 min bei unveränderter Umdre-

hungsgeschwindigkeit homogenisiert. Die noch immer sehr viskose Probe wurde anschließend mit PBS-Puffer zur gewünschten Konzentration verdünnt.

Abb. 37 zeigt die Untersuchung der so hergestellten Proben am Beispiel von **P23**. Auch hier ist die vesikuläre Struktur klar erkennbar. Der per dynamischer Lichtstreuung ermittelte hydrodynamische Radius lag mit $R_h = 98$ nm etwas unter dem Wert, welcher bei der Vesikelherstellung mittels Phaseninversion für dieses Polymer erzielt wurde. Die Größenverteilung war mit $\mu = 0,12$ minimal breiter. Ähnliche Ergebnisse wurden für die anderen untersuchten Polymere erhalten.

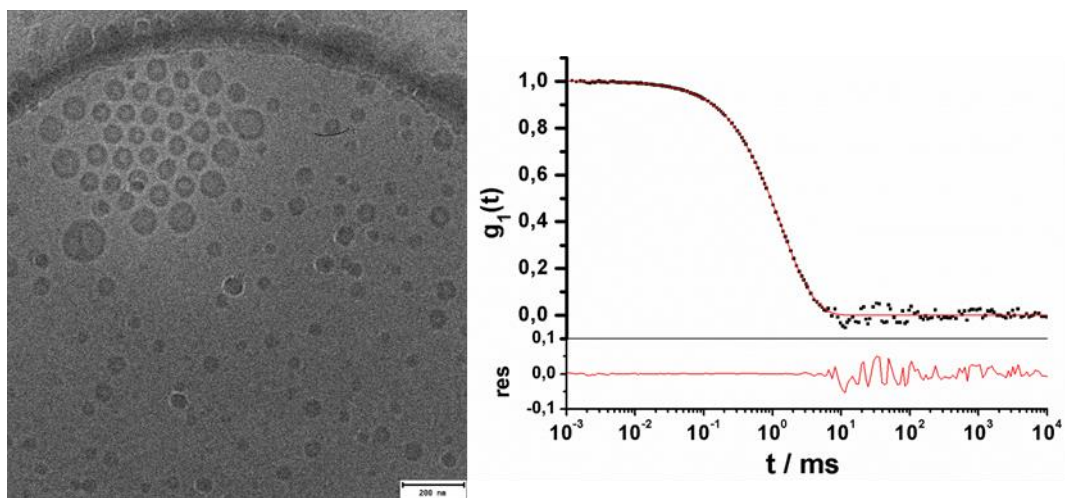


Abb. 37: Analytik der Vesikel aus P23, hergestellt per DZ in PBS.

Links: cryoTEM-Aufnahme,

Rechts: DLS, Autokorrelationsfunktion (90°).

Auch mittels Dualer Zentrifugation konnten also Polymervesikel aus P(DHPMA)-b-P(LMA) Blockcopolymeren erhalten werden.

Problematisch war bei der geschilderten Vorgehensweise jedoch die Beobachtung, dass regelmäßig signifikante Mengen des eingesetzten Polymers als Schlieren an der Gefäßwand zurückblieben. Als Grund hierfür kommt die inhomogene Filmbildung mittels der angewandten Filmpräparationsmethode in Frage.

Eine entscheidende Verbesserung konnte erzielt werden, indem statt eines eingetrockneten Polymerfilms das aus der Polymersynthese erhaltene lyophilisierte Material verwendet wurde. Dieses bietet den Vorteil einer lockeren Struktur und maximaler Oberfläche, womit eine gute Benetzung und vollständige Kolloidbildung

erreicht werden konnten. Die Eigenschaften der so hergestellten Vesikel unterschieden sich nicht von denen, welche mittels Filmmethode präpariert wurden. Allerdings konnten hierdurch Ungenauigkeiten bei der Konzentrationsbestimmung vermieden werden. In den nachfolgenden Experimenten wurde daher lediglich noch die Vorgehensweise mit lyophilisiertem Material angewandt.

3.2.3.2 Beladung der Vesikel mittels DZ

Für erste Beladungstests wurde wie bei der Vesikelherstellung mittels Phaseninversion Sulforhodamin B als hydrophile Modellsubstanz verwendet. Verfahren wurde gemäß der Vorgehensweise in Kapitel 3.2.3.1. Als einziger Unterschied wurde im ersten Zentrifugationsschritt bei identischem Massenverhältnis von Polymer und wässriger Phase statt des reinen PBS Puffers eine 1 mM Lösung von Sulforhodamin B in PBS verwendet. Der Verdünnungsschritt erfolgte erneut mit reinem PBS. Nach der Vesikelbildung wurde der freie Farbstoff mittels einer Sepharose CL-4B Chromatographiesäule abgetrennt und per UV/Vis-Spektrometrie über das Lambert-Beer'sche Gesetz quantifiziert. Die Bestimmung der Einschlusseffizienz erfolgte nach Gleichung (3.12). Wie die in Tabelle 11 aufgeführten Ergebnisse zeigen, lag die erzielte Einschlusseffizienz bei allen untersuchten Polymeren deutlich über 30 %. Es konnte also eine Steigerung des Anteils an verkapseltem Farbstoff auf die zehnfache Menge im Vergleich zur Phaseninversion erzielt werden.

Tabelle 11: Bestimmung der Einschlusseffizienz per DZ.

Vesikel aus Polymer	Einschlusseffizienz / %
P18	38,4
P19	31,6
P23	39,3

Allgemein ist die absolute Menge an verkapselbarer Substanz bei gegebener eingeschlossener Wassermenge direkt von der Konzentration der verwendeten Lösung abhängig. Natürliche Grenzen ergeben sich durch die zunehmende Viskosität der

Lösung bei steigender Konzentration und den entstehenden osmotischen Gradienten bei der Verdünnung. Ist die Konzentrationsdifferenz zu groß, kommt es zum Wassereinfluss in die Vesikel bis hin zum Aufplatzen.

Im nächsten Schritt wurde als Beispiel für den Einschluss einer biomedizinisch relevanten Substanz die Verkapselung von *kleiner eingreifender RNA* (engl. *small-interfering RNA*, siRNA) getestet. Verwendet wurde dazu eine 100 μM Lösung von siRNA funktionsloser Sequenz ($M = 12.035 \text{ g/mol}$). Die Abtrennung freier siRNA erfolgte mittels einer Sepharose CL-2B Chromatographiesäule.

Die erfolgreiche Abtrennung freier siRNA und gleichzeitig der sichere Einschluss im Inneren des Vesikels wurden mittels eines *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) überprüft (Abb. 38). Dabei wurden die Proben auf ein Agarose-Gel aufgegeben und die Wanderung im elektrischen Feld überprüft. Die Anfärbung der siRNA geschah mittels des Nukleinsäure-Interkalators GelRed™.

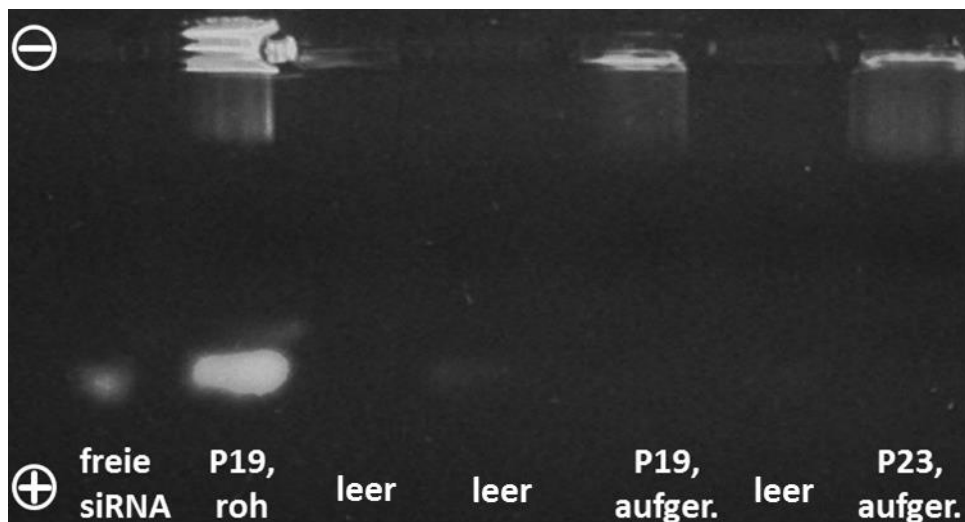


Abb. 38: *Electrophoretic Mobility Shift Assay* von siRNA-beladenen Vesikeln. Von links nach rechts: freie siRNA, beladene Vesikel aus P19 vor und nach Aufreinigung, beladene und aufgereinigte Vesikel aus P23.

Der EMSA wurde in einem Agarosegel der Massenkonzentration $\beta = 1,0 \%$ durchgeführt. Diese Konzentration resultierte nach Holmes et al. in einem mittleren Porendurchmesser von $d = 100 \text{ nm}$.²²⁵ Die Vesikel konnten das Gel nicht oder nur über eine sehr kurze Wegstrecke penetrieren, weil ihr mittlerer Durchmesser deutlich oberhalb der verwendeten Porengröße lag. Die freie siRNA dagegen wanderte aufgrund ihrer geringen Größe und negativen Nettoladung unter dem Ein-

fluss des angelegten elektrischen Feldes in Richtung des Pluspols. Diese Situation fand sich auch bei der nicht aufgereinigten Probe des Polymers **P19**. Wurde die freie siRNA dagegen abgetrennt, war keine entsprechende Bande mehr zu sehen (**P19** aufger. und **P23** aufger.). Dies bedeutet - neben der Bestätigung der vollständigen Abtrennung - dass die siRNA sicher im Inneren der Vesikel eingeschlossen war. Die negativ geladenen Moleküle konnten die Polymersome auch unter dem Einfluss des Feldgradienten nicht verlassen.

3.2.4 Stabilitätstests im Vergleich zu Lipidvesikeln

3.2.4.1 Vergleich des Verhaltens gegen einen osmotischen Gradienten mittels Stopped-Flow-Technik

Aufgrund ihrer wesentlich höheren molaren Masse und der damit einhergehenden Membrandicke sollten Polymervesikel eine wesentlich höhere Stabilität aufweisen als Lipidvesikel.

Dies wurde zunächst mittels der Stopped-Flow-UV/Vis-Spektrometrie untersucht, welche bereits in Kapitel 3.1.1.7 als indirekter Nachweis für die Vesikelbildung eingeführt wurde. Dazu wurden zunächst Vesikel mittels der Phaseninversionsmethode aus dem Lipid DLPC sowie den Polymeren **P18** ($M_n = 19.600$ g/mol) und **P21** ($M_n = 12.200$ g/mol) hergestellt. Um größenbedingte Effekte auf das Messergebnis auszuschließen, wurden die Vesikel durch eine Polycarbonat-Membran zu einer einheitlichen Größe von $d = 200$ nm extrudiert. Die Vesikel wurden jeweils zeitgleich mit einer 600 mM Ribitol-Lösung in die Durchflussküvette eingespritzt und die zeitliche Entwicklung des Streulichts detektiert. Die entsprechenden Messwerte zeigt Abb. 39. Im Fall der Lipidvesikel erreichte die Streuintensität schon nach rund 1,2 s ihren Endzustand. Dies ist gleichbedeutend mit der Einstellung eines osmotischen Gleichgewichtes. Bei Vesikeln aus **P21** dauerte es dagegen 7,3 s, bis das Signal konstant blieb. Dies lässt sich durch die deutlich geringere Permeabilität der Membran bedingt durch das signifikant höhere Molekulargewicht erklären. Die molare Masse von DLPC beträgt lediglich 621 g/mol, während das mittlere Molekulargewicht von **P21** beim knapp 20-fachen dieses Wertes liegt. Weitere 60 % schwerer ist im Mittel jedes Molekül von **P18**. Demnach war die

Permeabilität im Vergleich zu **P21** nochmals verringert. Dies zeigte sich an der Einstellung des Gleichgewichtszustandes nach erst 15,0 s.

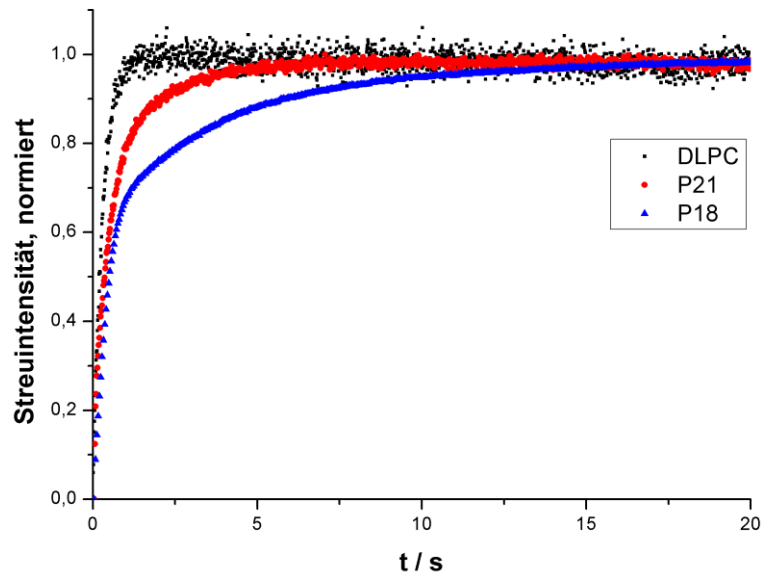


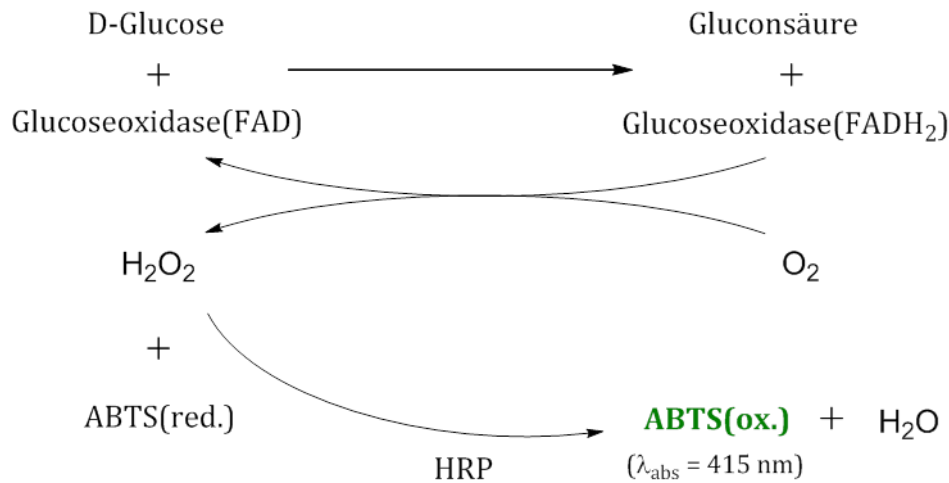
Abb. 39: Stopped-Flow-UV/Vis-Spektrometrie von Vesikeln aus DLPC (schwarz), P18 (blau) und P21 (rot) beim Mischen mit 600 mM Ribitol, $\lambda = 600$ nm.

Anhand dieser Messungen konnte gezeigt werden, dass die Permeabilität der Polymervesikel im Vergleich zu DLPC-Vesikeln deutlich geringer ist. Sie bestehen aus Molekülen signifikant höheren Molekulargewichts, was sich auch in der Membrandicke widerspiegelt (Kap. 3.2.2.1).

3.2.4.2 Verkapselung von Glucoseoxidase zur Quantifizierung einer transmembranen Multienzymreaktion

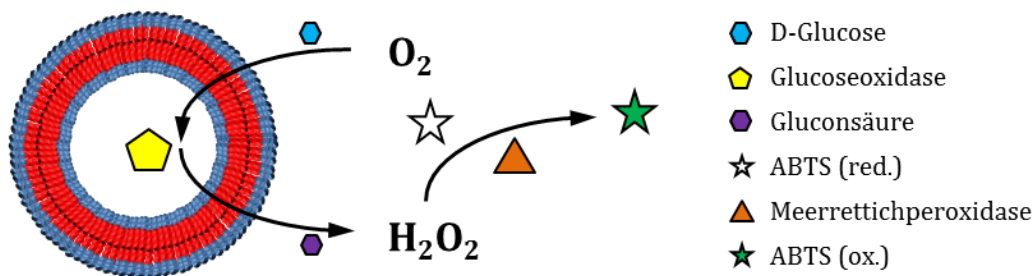
Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde ein weiteres Experiment bezüglich der Membranpermeabilität durchgeführt. Dabei wurde die Retention gegen den Abbau eines osmotischen Gradienten mit der Verkapselung eines hochmolekularen Cargos verknüpft. Der chemische Reaktionsablauf der gewählten Versuchsanordnung entsprach in seinem grundlegenden Prinzip der quantitativen Bestimmung von Glucose, wie sie beispielsweise zur Blutzuckerbestimmung angewandt werden kann. Den entsprechenden Mechanismus zeigt Schema 17. Dabei wird D-Glucose vom Enzym Glucoseoxidase (GOx) katalytisch zu Gluconsäure oxidiert, wobei das aktive FAD-Zentrum von GOx zu FADH₂ reduziert wird. Die Reoxidation erfolgt mithilfe von gelöstem Sauerstoff, wobei Wasserstoffperoxid entsteht. Dieses kann mit Hilfe eines geeigneten weiteren Enzyms, wie etwa Meerrettichperoxidase

(engl. *horseradish peroxidase*, HRP), den zugesetzten Redoxindikator 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS) von seiner reduzierten in die oxidierte Form überführen. Die Quantifizierung des Reaktionsablaufes erfolgt anhand des Farbumschlages von ABTS, dessen oxidierte Form eine markante Absorptionsbande bei $\lambda_{\text{abs}} = 415 \text{ nm}$ aufweist.



Schema 16: Reaktionsmechanismus des Glucoseoxidase-Tests.

Dieser Mechanismus wurde gemäß Schema 17 zum Test der Verkapselung von GOx in Polymer- und Lipidvesikeln eingesetzt. Im umgebenden wässrigen Medium befanden sich Glucose, HRP und das farblose, reduzierte ABTS.



Schema 17: Funktionsprinzip Glucoseoxidase-Test.

Für die hochmolekularen Enzyme GOx (120 kDa) und HRP (44 kDa) sollte es aufgrund ihrer Masse nicht möglich sein, die Membran zu passieren. Durch den osmotischen Gradienten sollten die niedermolekulare Glucose sowie der im Medium gelösten Sauerstoff aber sehr wohl im zeitlichen Verlauf des Experimentes die Membran durchdringen können und im Inneren des Vesikels von GOx umgesetzt

werden. Das austretende Produkt Wasserstoffperoxid sollte dann, katalysiert durch HRP, den Redoxindikator färben.

GOx wurde per Dualer Zentrifugation in Vesikeln aus P(DHPMA)₂₁-b-P((LMA)₁₆-stat-(DDEMA)₆) (PS, Kap. 3.3.3) sowie DPPC eingeschlossen und das nicht verkapselte Enzym mittels Sepharose-Größenausschlusschromatographie abgetrennt.

Im Folgenden wurden identische Mengen an verkapselter und nicht verkapselter GOx mit einer Lösung von D-Glucose, HRP und ABTS in PBS-Puffer versetzt und der Reaktionsverlauf anhand der Absorption bei $\lambda_{\text{abs}} = 415 \text{ nm}$ quantifiziert.

Die experimentell ermittelten Ergebnisse zeigt Abb. 40.

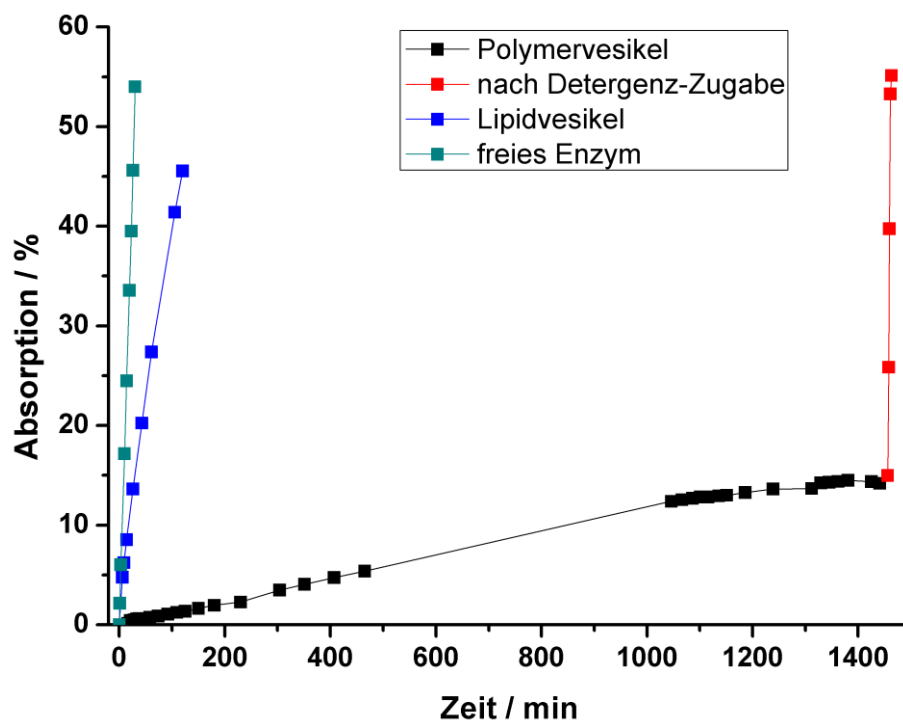


Abb. 40: Quantifizierung der Absorption ($\lambda_{\text{abs}} = 415 \text{ nm}$) GOx-haltiger Glucoselösungen.

Schwarz: GOx-beladene Polymervesikel (PS),

Rot: identische Polymervesikel-Probe nach Zugabe von Triton X-100,

Blau: GOx-beladene DPPC-Vesikel,

Grün: freie GOx,

Konzentrationen: GOx 2,5 $\mu\text{g/mL}$; D-Glucose 25,0 μM ; HRP 18,8 $\mu\text{g/mL}$; ABTS 50,0 $\mu\text{g/mL}$;

Lösungsmittel: PBS-Puffer. Gesamtvolumen: je 2,0 mL.

Im Fall der freien Glucoseoxidase war ein schneller linearer Anstieg der Absorption bei der betrachteten Wellenlänge zu verzeichnen. Dies resultierte aus der ungehinderten Zugänglichkeit des Enzyms für die in der Lösung enthaltene Glucose. Ebenfalls linear, wenn auch mit geringerer Steigung, verlief die Absorption der

Lipidvesikel-Probe. Hier wurde die Reaktionsgeschwindigkeit dadurch beschränkt, dass die Glucosemoleküle zunächst durch die hydrophobe Membran hindurch diffundieren mussten. Wesentlich langsamer verlief die Absorptionskurve allerdings im Fall der Polymervesikel. Selbst nach 24 h erreichte die Absorption hier gerade einmal eine Größenordnung, welche die Lipidvesikel schon nach gut 30 min aufwiesen. Zudem war nach ca. 20 h eine Abnahme der Steigung zu verzeichnen. Die Ursache hierfür lag mutmaßlich in der abnehmenden osmotischen Differenz durch die Verringerung der extravasikulären Glucosekonzentration. Nach rund 25 h wurden die Polymervesikel durch die Zugabe eines Tropfens Triton X-100 aufgelöst. Dies hatte einen starken Anstieg der Absorption in vergleichbarer Größenordnung zur Steigung im Fall der freien GOx zur Folge. Diese Beobachtung bestätigt die noch immer vollständig gegebene Aktivität des Enzyms sowie das Vorhandensein signifikanter Mengen an Glucose auch nach dem Abflachen der Absorptionskurve. Der einzige Grund für die Abnahme der Umsatzrate kann also wie vermutet nur in der extrem geringen Permeabilität der Polymersomenmembran bei nicht zu hohen osmotischen Differenzen liegen.

Die in diesem Experiment gemachten Beobachtungen sind von großer Bedeutung für die Beladung von Aktivester-basierten Polymervesikeln mit hydrophilen Substanzen und ihren Einsatz als Wirkstoffträger. Einerseits bestätigt die wesentlich langsamere Umsetzung der Glucose die viel geringere Permeabilität der Polymersomenmembran im Vergleich zu Lipidvesikeln. Dieser Effekt ist bei niedrigeren Konzentrationen noch wesentlich stärker ausgeprägt als bei der großen osmolaren Differenz in den Stopped-Flow-Experimenten, wo durch die Ribitolkonzentration von 600 mM der Gleichgewichtszustand auch bei den Polymervesikeln binnen weniger Sekunden erreicht wurde.

Über die Informationen bezüglich der Stabilität hinaus konnte aber auch gezeigt werden, dass die Beladung von Polymervesikeln per Dualer Zentrifugation auch mit hochmolekularen Substanzen möglich ist. Dabei blieb die enzymatische Aktivität der Glucoseoxidase trotz der auftretenden Scherkräfte erhalten. Zudem verlief auch die Abtrennung der nicht verkapselten Enzymmoleküle mittels Größenausschlusschromatographie erfolgreich, was nicht minder wichtig ist. Hätten in der Probe nicht verkapselte GOx-Moleküle vorgelegen, so wäre eine wesentlich höhere

Absorptionsrate beobachtet worden, wie das Auflösen der Vesikel mittels des Detergenz nach 25 h zeigte.

Insgesamt konnte das Ziel, einen stabilen Carrier auch für höhermolekulare Spezies herzustellen, diesen zu beladen und nicht verkapselte Fracht abzutrennen, erreicht werden.

3.2.4.3 Untersuchung der Stabilität gegenüber Detergenzien per DLS

Zusätzlich zur Stabilität gegen osmotische Gradienten wurden die Polymervesikel auch auf ihre Stabilität gegenüber Detergenzien untersucht. Hierzu wurden per Phaseninversion hergestellte Vesikeldispersionen von **P21** und DPPC mit steigenden Konzentrationen an Triton X-100 versetzt und die resultierende Mischung per dynamischer Lichtstreuung untersucht. Vor der Durchführung der Messungen wurden beide Proben durch eine Polycarbonatmembran zu einem Durchmesser von $d = 200$ nm extrudiert. Als experimentell gefundene hydrodynamische Radien der unbehandelten Vesikel wurden $R_h = 99$ nm (Polymervesikel) bzw. $R_h = 103$ nm (Lipidvesikel) gefunden. Die Konzentration wurde wegen der hohen Streuintensität auf $c = 10$ mg/L festgelegt. Nach einer ersten Messung ohne Detergenz wurden jeweils Detergenzmengen zugegeben, die einem Vielfachen der Stoffmenge der Polymermoleküle bzw. des Lipids entsprachen. Dabei wurde zur Vermeidung von Verdünnungseffekten die Konzentration der Detergenzlösung jeweils so gewählt, dass die Konzentration der Probe in der Messküvette auch nach Zugabe der höchsten Dosis an Detergenz um nicht mehr als 20 % erniedrigt wurde.

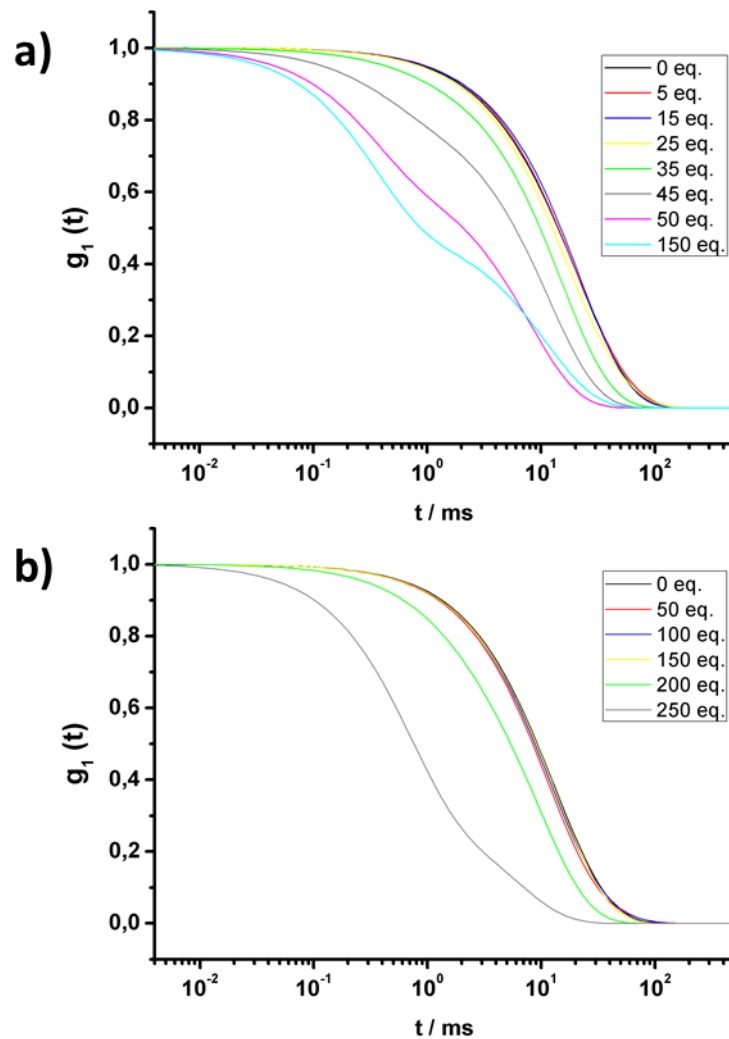


Abb. 41: Vergleich der Vesikel-Stabilität gegenüber Detergenzien per DLS.
 a) DPPC-Vesikel mit steigender Konz. an Triton X-100 (ACF-Fit, 30°),
 b) Polymersome (P21) mit steigender Konz. an Triton X-100 (ACF-Fit, 30°).

Im Fall der Lipidvesikel (Abb. 41a) war bei einem Überschuss an Detergenz bis zum ca. 25-fachen der Stoffmenge an DPPC kein wesentlicher Effekt auf die Autokorrelationsfunktion zu erkennen. Ab dem 35-fachen Überschuss konnte jedoch eine Verschiebung hin zu kleineren Strukturen beobachtet werden. Ab 45 Äquivalenten war eine bimodale Größenverteilung detektierbar, wobei auch eine starke Abnahme des Anteils der DPPC-Liposome an der Streuintensität festgestellt werden konnte. Durch die Zugabe von Triton X-100 wurden die Liposome aufgelöst und die Lipidmoleküle durch das Detergenz zu Aggregaten mizellarer Größenordnung solubilisiert.²²⁶ Die hier gefundenen Aggregate streuten aufgrund ihrer geringeren Größe ($R_h \sim 50$ nm) signifikant weniger stark als die ursprünglichen Vesikel. Bei noch höheren Verhältnissen (> 50 Äquivalente) waren die Vesikel voll-

ständig desintegriert und die Autokorrelationsfunktion wurde neben den Lipid/Detergenz-Mischmizellen auch durch die nun verhältnismäßig starke Streuintensität der Detergenzmizellen aufgrund deren hoher Konzentration geprägt. Die Konzentration an Triton X-100 überstieg bereits bei der Zugabe von 15 Äquivalenten die kritische Mizellbildungskonzentration (0,22 mM). In der Folge kam es zu einer stetigen Zunahme des Anteils dieser Spezies an der Streuintensität. Dieser konnte jedoch erst bei fortgeschrittenem Abbau der stärker streuenden Liposome detektiert werden.

Abb. 41b zeigt das analoge Experiment für Polymervesikel aus **P21** ($M_n = 12.200$ g/mol). Dabei war beim Detergenzüberschuss von 150 Äquivalenten, der die Lipidvesikel bereits vollständig aufgelöst hatte, keinerlei Einfluss auf die Autokorrelationsfunktion zu erkennen. Erst bei 200 Äquivalenten trat eine deutlich detektierbare Verschiebung auf. Bei der Zugabe weiterer 50 Äquivalente war ein schlagartige Veränderung der Autokorrelationsfunktion hin zu deutlich kleineren Strukturen ($R_h < 20$ nm) erkennbar. Es scheint also oberhalb von 150 Äquivalenten zunächst zu einem Schrumpfen der Vesikel zu kommen. Die Vesikel wiesen ursprünglich einen hydrodynamischen Radius von $R_h = 100$ nm, der sich zunächst auf $R_h = 85$ nm verringerte, bevor es schließlich zum Kollaps kam. Diese Beobachtungen stimmen gut mit dem von Discher et al. postulierten Mechanismus für die Membransolubilisierung von Polymervesikeln durch Detergenzien überein.²²⁷ Danach besetzen die Detergenzmoleküle die Grenzfläche zwischen hydrophoben und hydrophilen Domänen. Oberhalb einer bestimmten Schwellenkonzentration kann die so aufgebaute Packungsdichte und Asymmetrie der Membran durch das Diffundieren von Detergenzmolekülen durch den hydrophoben Membrankern zur inneren Grenzfläche abgebaut werden. In der Folge kommt es zum beiderseitigen Herausbrechen von gemischten Polymer-/Detergenz-Mizellen, verbunden mit einem geringfügigen Schrumpfen des Vesikels. Wird die Detergenzkonzentration weiter erhöht, kommt es zur vollständigen Desintegration.

Den Befund, dass nach Auflösen der Vesikel relativ kleine Strukturen gefunden werden, erklären Discher et al. mit einer geringen Polymer-Aggregationszahl in der Mizelle. Getrieben durch die Entropie des Systems kommt es zum Kollaps des

hydrophoben Blockes, der vom hydrophilen Block sowie dem großen Überschuss an Detergenzmolekülen solubilisiert wird. Daher liegen in jeder Polymer-/Detergenz-Mischmizelle nur wenige Polymermoleküle vor, was kleine hydrodynamische Radien zur Folge hat.

Auch dies konnte im untersuchten Fall des Systems P(DHPMA)-*b*-P(LMA)/Triton X-100 experimentell bestätigt werden. Die nach dem Auflösen der Polymersome gefundenen Strukturen waren mit Radien von weniger als 20 nm signifikant kleiner als die Mischmizellen aus DPPC und Triton X-100, welche Radien um 40-50 nm aufwiesen.

Insgesamt konnte diese Versuchsreihe die überlegene Stabilität der hergestellten Polymersome im Vergleich zu Lipidvesikeln bestätigen. Während bei gleicher Ausgangskonzentration und -größe die Lipidvesikel bei Detergenzüberschüssen von unter 50 Äquivalenten bereits solubilisiert waren, lösten sich die Polymervesikel erst jenseits von 200 Äquivalenten auf. Dies ist eine direkte Folge der größeren Membrandicke, die auf das höhere Molekulargewicht sowie die größere Flexibilität der langen Polymerketten zurückzuführen ist. Hierdurch konnte ein relativ großer Anteil an Detergenzmolekülen in die Grenzfläche eingelagert werden, ohne dass die Integrität der Membran Schaden nahm.

3.3 Weitere Funktionalisierung

Der zentrale Vorteil des Aktivester-Ansatzes bei der Synthese von biokompatiblen Polymeren für die Vesikelbildung ist die gute Funktionalisierbarkeit. Dieses Kapitel demonstriert drei verschiedene Ansätze zur Funktionalisierung der P(DHPMA)-*b*-P(LMA)-Blockcopolymere mit Strukturen, die Bedeutung für den Einsatz als Wirkstoffträger in der Nanomedizin haben: Einerseits konnte über die polymeranaloge Konversion der PFPMA-basierten Präpolymere verschiedenartige Strukturen eingeführt werden. Zunächst konnte in hoher Effizienz ein kommerziell erhältlicher Fluoreszenzfarbstoff angebunden werden. Darüber hinaus konnte ein Amin-funktionalisiertes Mannose-Derivat eingeführt werden. Dieses dient als Targeting-Ligand für die Verstärkung der Rezeptor-induzierten Zellaufnahme der Partikel. Für die Farbstoffmarkierung der Vesikel konnte über die beschriebene polymeranaloge Funktionalisierung hinaus eine Endgruppenfunktionalisierung erzielt werden. Dies wurde mittels der Verwendung eines entsprechend modifizierten Kettentransferreagenzes erreicht. Es ermöglichte die Herstellung von Polymermolekülen mit einer Azid-Funktion als reaktiver Endgruppe. Diese erlaubte die kupferfreie Anbindung eines Cycloalkin-Farbstoffes. Zudem konnte durch die Copolymerisation einer Ketalstruktur bei der Synthese des hydrophoben Blockes der Einbau eines säurespaltbaren Monomers erreicht werden. Die so funktionalisierten Polymervesikel erwiesen sich als pH-responsiv. Im Säuren kam es über den Abbau der Ketalstruktur zur Hydrophilisierung der Membran, verbunden mit einer vollständigen Desintegration der Vesikel. Dieser Mechanismus erlaubt eine gezielte Freisetzung der in den Polymersomen eingeschlossenen Fracht.

3.3.1 Farbstoffmarkierung und Einführung eines Mannose-Targetingliganden mittels polymeranaloger Konversion

Einer der zentralen Vorteile von Aktivester-basierten Vorläuferpolymeren ist ihre einfache Funktionalisierung während der polymeranalogen Konversion. Hierzu wurde der entsprechende Ligand bei der Umsetzung mit HPA zugegeben.

Dies wurde zunächst mittels des kommerziell erhältlichen Farbstoffes Oregon Green 488 Cadaverine durchgeführt. Hierzu wurde das Aktivester-Vorläuferpolymer **BC21** wie bei der polymeranalogen Umsetzung zum P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymer **P23** in Dioxan/DMSO gelöst. Vor der Zugabe der ersten Charge DHPA wurde allerdings eine Lösung von Oregon Green 488 Cadaverine in DMSO zugegeben, deren Stoffmenge an Farbstoff 0,01 Äquivalenten der Stoffmenge an PFP-Wiederholungseinheiten entsprach. Nach fünfstündigem Rühren bei 35 °C wurde gemäß des regulären Protokolls für die Aminolyse mit DHPA verfahren und in analoger Weise das Farbstoff-markierte Polymer **P23D** erhalten.

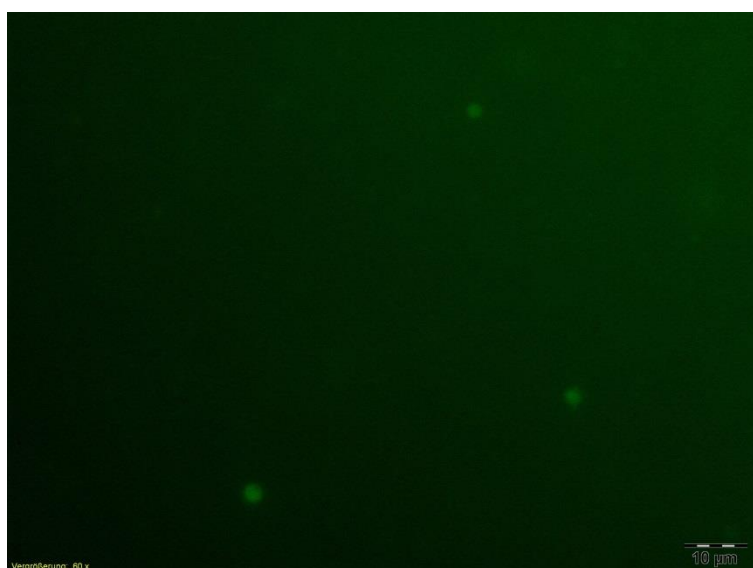


Abb. 42: Auflichtmikroskopische Abbildung Oregon Green 488-markierter Vesikel (**P23D**, Herstellung mittels Phaseninversion; Größenskala: 10 µm).

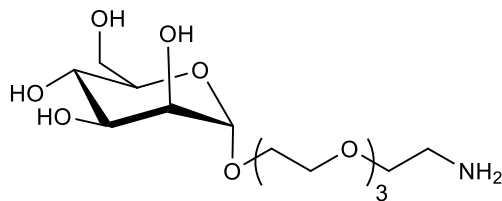
Die Quantifizierung der Anbindungseffizienz erfolgte per UV/Vis-Spektrometrie nach Abtrennung des freien Farbstoffes. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz konnte eine Anbindung von 90,7 % des eingesetzten Farbstoffes ermittelt werden.

Abb. 42 zeigt eine auflichtmikroskopische Abbildung der aus **P23D** per Phaseninversion erhaltenen Vesikel. Zu beachten ist, dass es sich um keine konfokale Aufnahme handelt. Die eingeblendete Größenskala kann daher nur sehr eingeschränkt für eine Bestimmung der Partikelgröße herangezogen werden, da auch Fluoreszenzlicht außerhalb der fokalen Schärfeebene detektiert wurde. Hinzu kommt die Diffusion der Partikel. Die reale Größe wurde per statischer Lichtstreuung untersucht und ergab mit $R_h = 135$ nm einen im Vergleich zu analog hergestellten Vesikeln aus **P23** nahezu unveränderten Wert.

Aufbauend auf der erfolgreichen Farbstoffmarkierung mittels polymeranaloger Konversion wurde auf demselben Weg eine Targeting-Struktur eingeführt.

Durch die rezeptorvermittelte Endozytose kann die Zellaufnahme von Partikeln maßgeblich gesteigert werden.¹⁴² Für die Aufnahme in dendritische Zellen oder Makrophagen als Zellen des Immunsystems ist der Mannoserezeptor eine der wichtigsten kohlenhydrat-erkennenden Proteinstrukturen. Er gehört zu den calciumabhängigen Lektinen und besitzt acht Erkennungsdomänen für mannosylierte Kohlenhydratstrukturen.

Um eine gesteigerte Aufnahme durch dendritische Zellen und Makrophagen zu erreichen, wurde daher die Anbindung einer Mannosestruktur in den hydrophilen Domänen der P(DHPMA)-*b*-P(LMA)-Blockcopolymeren untersucht. Dies geschah mit Hilfe des in Schema 18 gezeigten Mannose-Linker-Moleküls. Es handelt sich um ein Mannose-Derivat, welches an C₁ über einen hydrophilen Oligoethylenglycol-Spacer mit einer Aminfunktion ausgestattet ist.



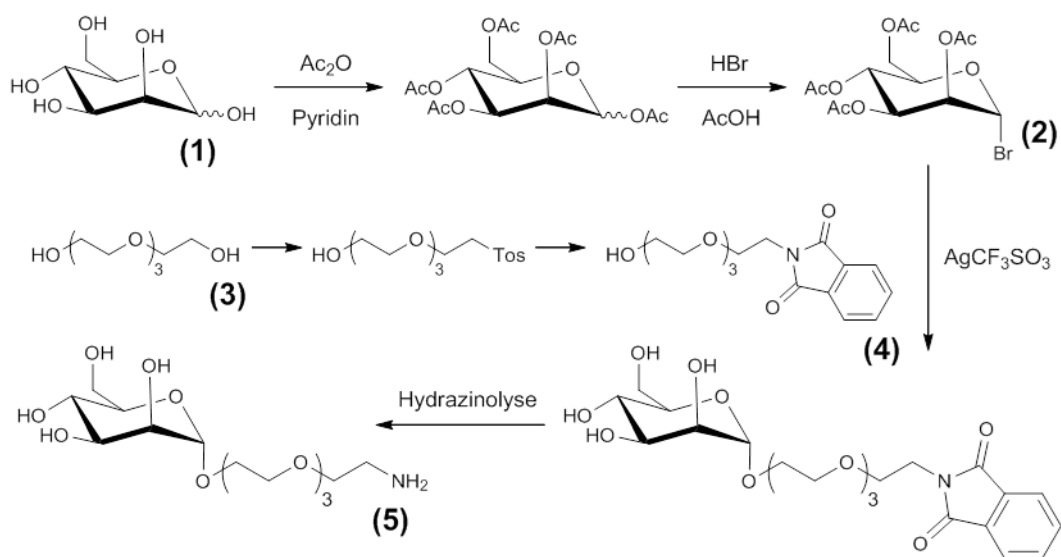
Schema 18: Molekülstruktur des verwendeten Mannose-Linkers.

Der Ansatz, die amphiphilen Polymere durch die polymeranaloge Konversion der entsprechenden PFP-Ester-Vorläuferpolymere herzustellen, eignet sich aus zwei Gründen sehr gut für dieses Vorhaben. Zum einen kann aufgrund der Selektivität der Konversion der Mannose-Linker in den DHPMA-Block eingeführt werden, ohne dass es zu Nebenreaktionen durch die freien Hydroxylgruppen des Zuckers kommt. Zum anderen ermöglicht diese Vorgehensweise eine multiple Präsentation der Zuckerstruktur gegenüber dem Rezeptor.

Die Synthese des Mannose-Linkers wurde von [REDACTED] nach Schema 19 durchgeführt:

Zunächst wurde Mannose (1) vollständig acetyliert und mittels Bromwasserstoff selektiv zum α -Anomer des Brommannans (2) umgesetzt. Parallel dazu wurde Tetraethylenglycol (3) zum Mono-Phthalimid (4) umgesetzt. Die Kopplung von (3)

und (4) unter Verwendung von Silbertrifluormethansulfonat ergab nach Hydrazinolyse den Mannose-Linker (5). Dieser konnte aufgrund der NH_2 -Gruppe direkt in der polymeranalogen PFP-Konversion eingesetzt werden.



Schema 19: Synthese des Mannose-Linkers.

Die Synthese der mannosylierten P(DHPMA)-*b*-P(LMA)-Blockcopolymer wurde entsprechend der polymeranalogen Umsetzung mit DHPA (Kap. 3.1.3) durchgeführt. Die Reaktionstemperatur betrug 50 °C. Zusätzlich zum Mannose-Linker wurden die Polymere für die spätere Quantifizierung der Zellaufnahme mit Oregon Green 488 Cadaverin markiert. Zugemischt wurde jeweils eine Menge an Mannose-Linker, die 8 mol% der PFP-Estergruppen entsprach. Weil die Reaktion der PFP-MA-Wiederholungseinheiten mit den zugesetzten Aminen ein statistischer Prozess ist, wurden die Unterschuss-Komponenten Mannose-Linker und Oregon Green jeweils als erstes zugesetzt. Das Gemisch wurde für mehrere Stunden gerührt, bevor der Überschuss an DHPA zur Vervollständigung der Konversion zugegeben wurde.

Nach der Aufarbeitung durch Dialyse gegen MilliQ-Wasser erfolgte die Bestimmung des Mannose-Gehaltes per *inverse gated* (ig) ^{13}C -NMR-Spektroskopie. Durch die Unterdrückung des Kern-Overhauser-Effektes können die erhaltenen Spektren quantitativ analysiert werden (Abb. 43). Die Auswertung erfolgte, indem das Integral des Mannose- C_1 -Atoms ($\delta = 100,2$ ppm) in Bezug zum Gesamtintegral der Carbonyl-Kohlenstoffatome ($\delta = 179,0 - 176,5$ ppm) gesetzt wurde.

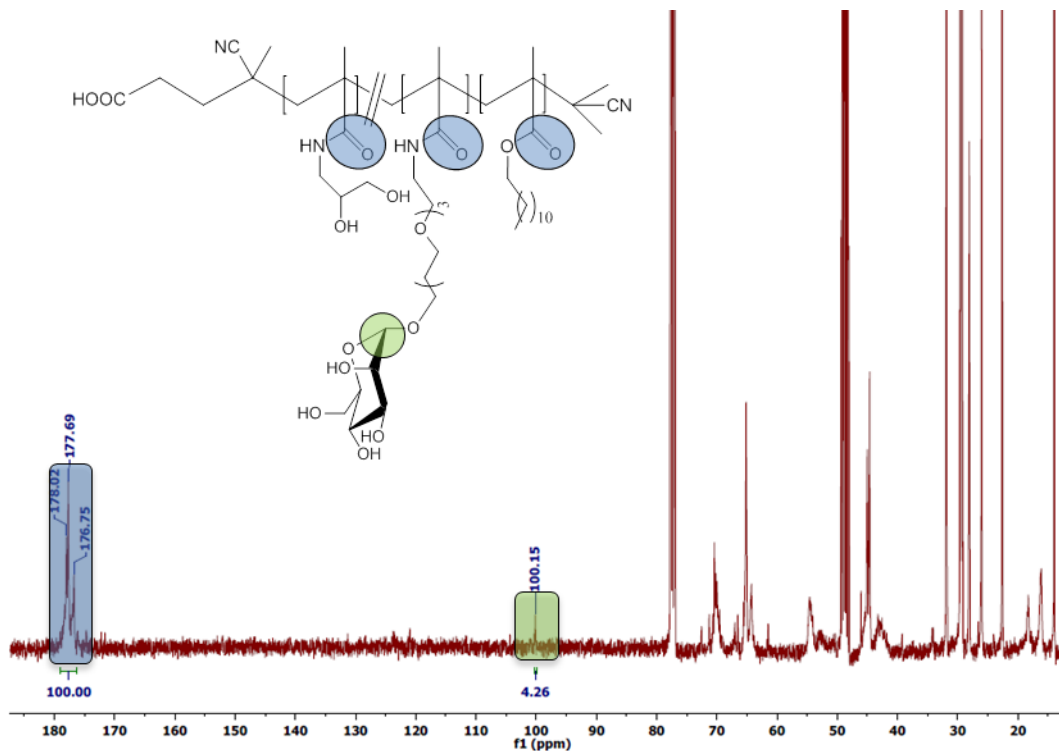


Abb. 43: Bestimmung des Mannose-Anteils per inverse gated ^{13}C -NMR-Spektroskopie (P32, DMSO-d_6 , 100 MHz).

Auf diese Weise wurde der Gesamtanteil an Mannose in Bezug auf alle Wiederholungseinheiten erhalten. Dieser Wert konnte über die Kenntnis der Stoffmengen- und Zusammensetzung des jeweiligen Vorläufer-Polymers (Tabelle 3) in den Mannosegehalt pro vormaliger PFP-Gruppe umgerechnet werden. Auf diese Weise konnte bei einer Zeitdifferenz von 8 h zwischen der Zugabe des Mannose-Linkers und von DHPA eine Mannose-Funktionalisierung von rund 3,3 % der PFPMA-Wiederholungseinheiten erreicht werden. Dies entspricht einem Umsetzungsgrad von gut 75 %. Wurde 24 h gewartet bis zur DHPA-Zugabe, konnte die eingesetzte Mannose quasi vollständig in den hydrophilen Block der Polymere eingebaut werden. Die Farbstoffmarkierung verlief in allen Fällen wie auch bei der Umsetzung ohne Mannose nahezu quantitativ.

Betrachtet man die Anzahl der Wiederholungseinheiten im hydrophilen Block der Polymere **P29** und **P31** (Tabelle 12), so fällt auf, dass angesichts einer Mannose-Funktionalisierung von 3 – 8 % rein statistisch jedes Polymermolekül nur wenige Mannoseeinheiten (< 3) trägt. Dieses Verhältnis wurde mit Bedacht gewählt, um die Eigenschaften der Polymere in Bezug auf die Kolloidbildung nicht zu stark zu

beeinflussen. Eine viel größere Anzahl von Mannosemolekülen würde sowohl die hydrophile Balance beeinflussen, als auch die Vesikelbildung sterisch erschweren.

Tabelle 12: Mannose-funktionalisierte Blockcopolymerer und nicht-mannosylierte Äquivalente.

Polymer	Zusammensetzung	Mannose pro Wdh.-Einheit ^{a)}	Mannose pro PFP ^{b)}	Vorläufer
P29	P(DHPMA- <i>stat</i> -Mann- <i>stat</i> -OG) ₃₁ - <i>b</i> -P(LMA) ₁₆	2,2 % ^{c)}	3,3 %	BC21
P30	P(DHPMA- <i>stat</i> -OG) ₃₁ - <i>b</i> -P(LMA) ₁₆	0	0	BC21
P31	P(DHPMA- <i>stat</i> -Mann- <i>stat</i> -OG) ₃₃ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₈	4,3 % ^{d)}	8,0 %	BC19
P32	P(DHPMA- <i>stat</i> -OG) ₃₃ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₈	0	0	BC19

^{a)} bestimmt per *ig*-¹³C-NMR, ^{b)} berechnet aus der Stoffmengen­zusammensetzung des Polymers, ^{c)} 8 h bis zur DHPA-Zugabe, ^{d)} 24 h bis zur DHPA-Zugabe.

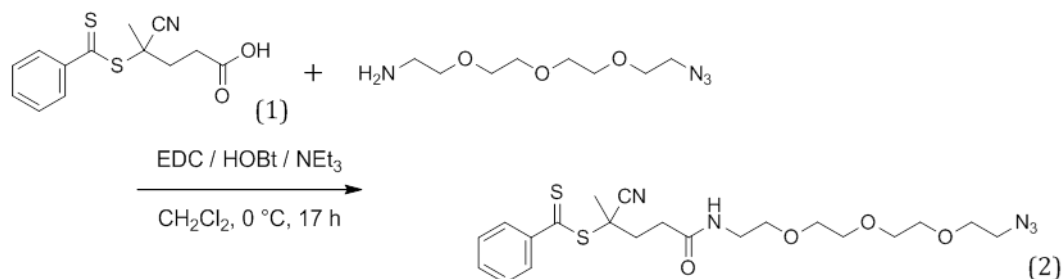
Insgesamt konnte das Ziel der einfachen Einführung eines Targeting-Liganden mit Hilfe des Mannose-Linkers erreicht werden. Die polymeranaloge Umsetzung in Kombination mit DHPA lief bei ausreichender Reaktionsdauer nahezu quantitativ ab. Sie lieferte Polymere unterschiedlichen Funktionalisierungsgrades. Kapitel 3.6.4 beschreibt die Untersuchung ihrer Aufnahme durch Zellen des Immunsystems im Vergleich zu den entsprechenden nicht-mannosehaltigen Polymeren **P30** und **P32**.

3.3.2 Azid-Funktionalisierung mittels eines modifizierten Kettentransferreagenzes

Zur weiteren Funktionalisierung der P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymerer über die Konversion des PFP-Esters hinaus wurde der Einsatz eines Azid-modifizierten Kettentransferreagenzes untersucht. Dieses Konzept erlaubt, im Gegensatz zur Aminolyse des PFP-Esters, auch eine nachträgliche Funktionalisierung nach der

polymeranalogen Umsetzung und auch nach der Herstellung von Vesikeln aus den amphiphilen Blockcopolymeren.

Hierzu wurde das Kettentransferreagenz **CTA1** nach einer von Nuhn et al. entwickelten Synthese²²⁸ mit einer Azidfunktion versehen.



Schema 20: Synthese des Azid-modifizierten Kettentransferreagenzes CTA2.

Mittels der Kopplungsreagenzien 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 1-Hydroxybenzotriazol (HOBT) wurde aus der Carbonsäurefunktion von **CTA1** (1) ein intermediärer Aktivester hergestellt. Dieser konnte durch 1-Amino-11-azido-3,6,9-trioxaundecan zum Azid-modifizierten Kettentransferreagenz **CTA2** (2) aminolysiert werden. Nach der Aufarbeitung per Kieselgel-Säulenchromatographie wurde **CTA2** als rot-violettes zähflüssiges Öl in einer Ausbeute von 67 % d. Theorie erhalten.

Das ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung ist in Abb. 44 dargestellt.

Im IR-Spektrum (Abb. 45) ist die deutlich ausgeprägte Absorptionsbande der Azid-Gruppe bei $\nu = 2099 \text{ cm}^{-1}$ zu erkennen.

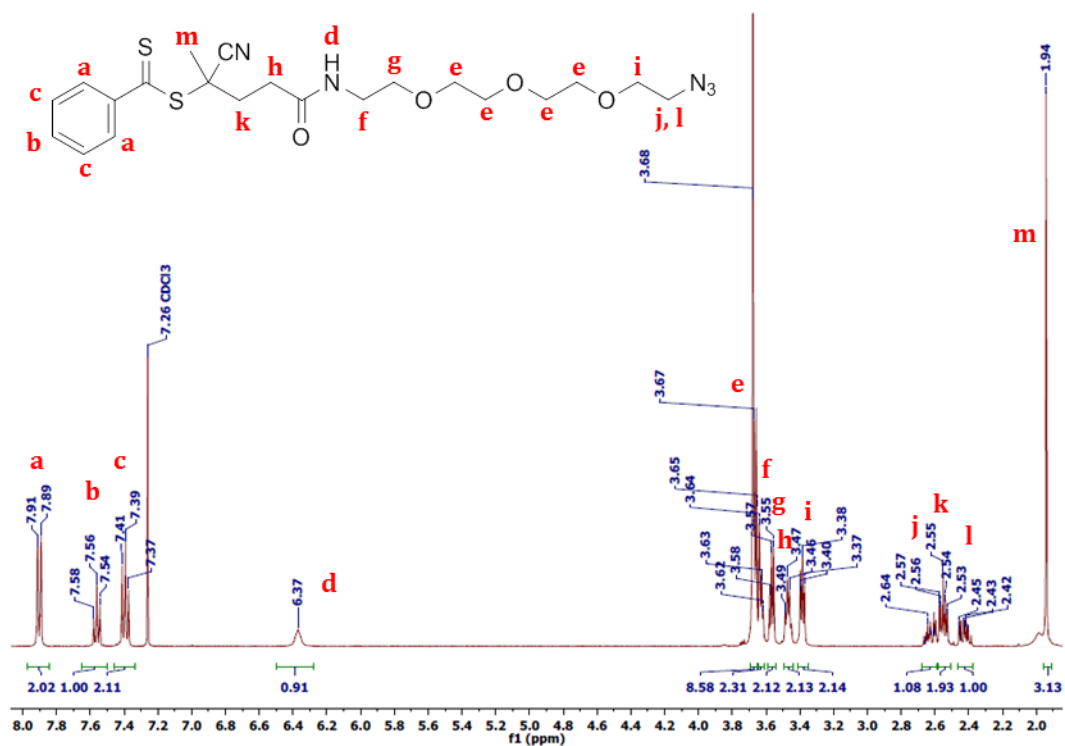


Abb. 44: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von CTA2 (CDCl₃, 400 MHz).

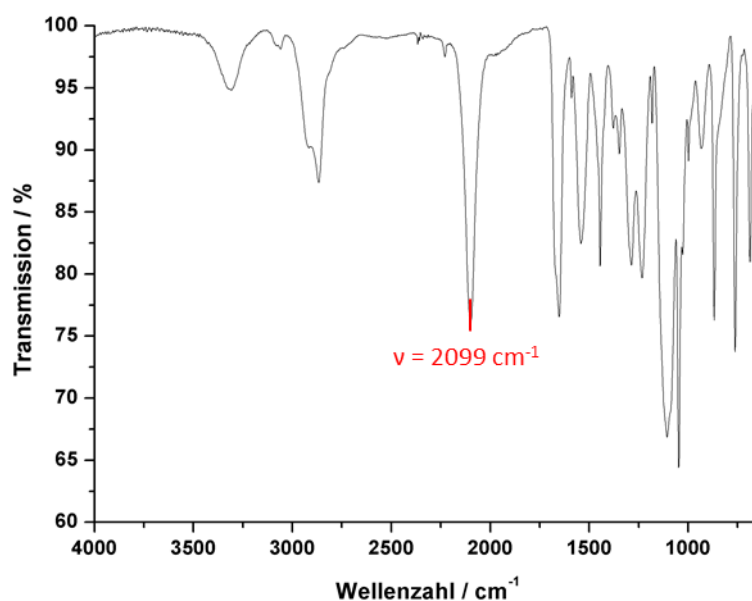


Abb. 45: IR-Spektrum von CTA2.

Für die Polymerisation von PFPMA mittels **CTA2** wurde statt AIBN 2,2'-Azobis-(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril) (AMDVN) eingesetzt. Dieser Radikalinitiator zerfällt bei niedrigeren Temperaturen als AIBN ($T_{1/2}$ (35 °C) = 6,1 h), sodass die Polymerisation bei 35 °C durchgeführt werden konnte, um die temperaturemp-

findliche Azid-Gruppe des Kettentransferreagenzes zu erhalten. Die Reaktionsdauer wurde aufgrund der niedrigeren Temperatur von 17 h auf 24 h erhöht. Die sonstige Vorgehensweise blieb im Vergleich zur Polymerisation mit **CTA1** unverändert. Auf diese Weise konnten P(PFPMA) Homopolymere in ähnlicher Ausbeute und Molmassenverteilung zur Polymerisation mit **CTA1** erhalten werden.

Tabelle 13: Mittels CTA2 hergestellte Azid-funktionalisierte P(PFPMA) Homopolymere.

Polymer	Zusammensetzung ^{a)}	M_n ^{a)} / g·mol ⁻¹	\bar{D} ^{a)}
HA1	P(PFPMA) ₄₃	11.300	1,37
HA2	P(PFPMA) ₄₉	12.800	1,35
HA3	P(PFPMA) ₅₄	14.100	1,36

^{a)} bestimmt mittels THF-GPC.

Anschließend wurde mittels **HA2** als Makro-CTA ein P(PFPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymer synthetisiert. Nach 48-stündiger Reaktionsdauer bei 35 °C und der anschließenden Verkochung der RAFT-Endgruppe mittels AMDVN wurde das Blockcopolymer **BCA** erhalten.

Tabelle 14: Mittels CTA2 hergestelltes Azid-funktionalisiertes P(PFPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymer.

Polymer	Zusammensetzung ^{a)}	Homo- polymer	M_n ^{a)} / g·mol ⁻¹	\bar{D} ^{a)}	χ ^{b)} (PFPMA)
BCA	P(PFPMA) ₄₉ - <i>b</i> -P(LMA) ₄₆	HA2	24.500	1,32	0,515

^{a)} bestimmt mittels THF-GPC, ^{b)} bestimmt per ¹H-NMR-Spektroskopie.

Es konnten also mit **CTA2** als Kettentransferreagenz Blockcopolymere in vergleichbarer Zusammensetzung wie bei der Verwendung von **CTA1** hergestellt werden. **BCA** wurde im Folgenden mit DHPA zum amphiphilen Blockcopolymer **PA** umgesetzt. Die Umsetzung erfolgte in einer modifizierten Variante des in den Kapiteln 3.1.1.6 bzw. 3.1.3 beschriebenen Verfahrens. Dabei blieben die stöchiometri-

schen Verhältnisse unverändert, aber die polymeranaloge Reaktion wurde wiederum bei einer Temperatur von 35 °C durchgeführt. Auf diese Weise konnte das Azid-modifizierte P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymer **PA** hergestellt werden.

Tabelle 15: Azid-modifiziertes P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymer.

Polymer	Zusammensetzung ^{a)}	Vorläufer	M_n ^{a)} / g·mol ⁻¹	hydrophiler Massenanteil f ^{b)}
PA	P(DHPMA) ₄₉ - <i>b</i> -P(LMA) ₄₆	BCA	19.500	0,400

^{a)} bestimmt per THF-GPC aus den Daten des Vorläuferpolymers, ^{b)} bestimmt per ¹H-NMR Spektroskopie.

Im fertig umgesetzten Polymer war die Azidbande ($\nu = 2099 \text{ cm}^{-1}$) aufgrund des intrinsisch niedrigen Anteils von einer Azidgruppe pro Polymermolekül nur sehr schwach zu erkennen (Abb. 46). Durch ihr Vorhandensein konnte jedoch auch im fertigen polymeranalog umgesetzten amphiphilen Blockcopolymer die Integrität der Azidfunktion spektroskopisch verifiziert werden.

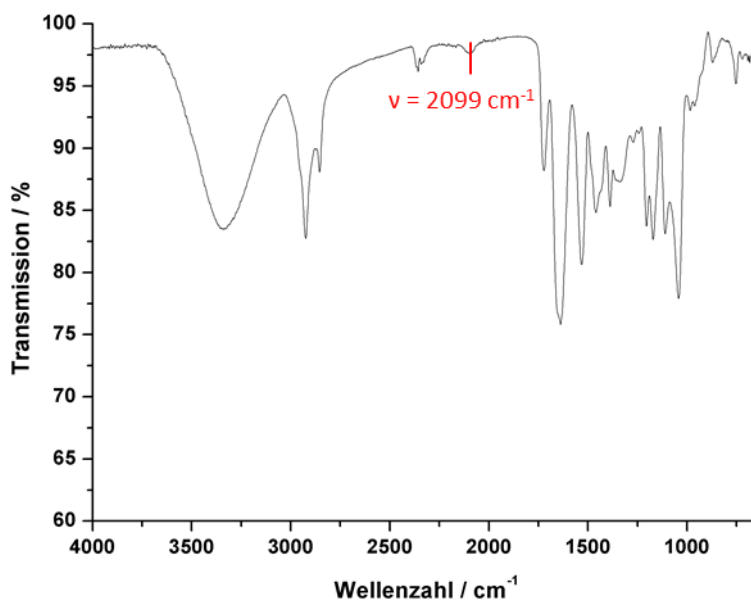
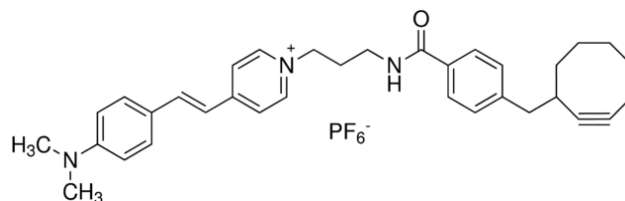


Abb. 46: IR-Spektrum des Azid-haltigen Polymers PA.

Als Modellsubstanz für die Huisgen-Cycloaddition zur Anbindung an das Azid-Polymer wurde der kommerziell erhältliche Farbstoff *Alkyne MegaStokes Dye 608* ausgewählt. Er verfügt über eine Cyclooctin-Struktur, die aufgrund der Ringspannung eine kupferfreie „Click“-Reaktion ermöglicht. Dies war insbesondere im Hin-

blick auf eine biomedizinische Anwendung relevant, da toxische Kupfersalze oftmals schwer aus wässrigen Proben zu entfernen sind.



Schema 21: Strukturformel des Alkin-Farbstoffes Alkyne MegaStokes Dye 608.

Die Umsetzung von **PA** zum fluoreszenzmarkierten Derivat **PA-608** erfolgte durch 18-stündiges Rühren des Polymers in DMSO bei 30 °C zusammen mit einem 3,5-fachen Überschuss des Farbstoffes. Die Abtrennung des überschüssigen, nicht umgesetzten Farbstoffes erfolgte per Dialyse gegen H₂O, gefolgt von der anschließenden Lyophilisation.

Der Nachweis der Anbindung des Farbstoffes erfolgte per UV/Vis-Spektroskopie. Hierzu wurden per Phaseninversion Vesikel des Farbstoff-modifizierten Polymers **PA-608** in 5 mM NaCl hergestellt. Als Referenz diente eine analog hergestellte Vesikelprobe des nicht-farbstoffmarkierten Ausgangsmaterials **PA**.

Abb. 47 zeigt die Absorptionsspektren der beiden Proben im Vergleich. Dabei weist das Spektrum der Farbstoff-funktionalisierten Vesikel eine breite Absorptionsbande des Alkyne MegaStokes Dye 608 mit einem Absorptionsmaximum von $\lambda_{\text{abs}} = 466 \text{ nm}$ auf. Dies verifiziert die erfolgreiche Anbindung der Modellspezies an die Azid-Endgruppe des amphiphilen Blockcopolymers.

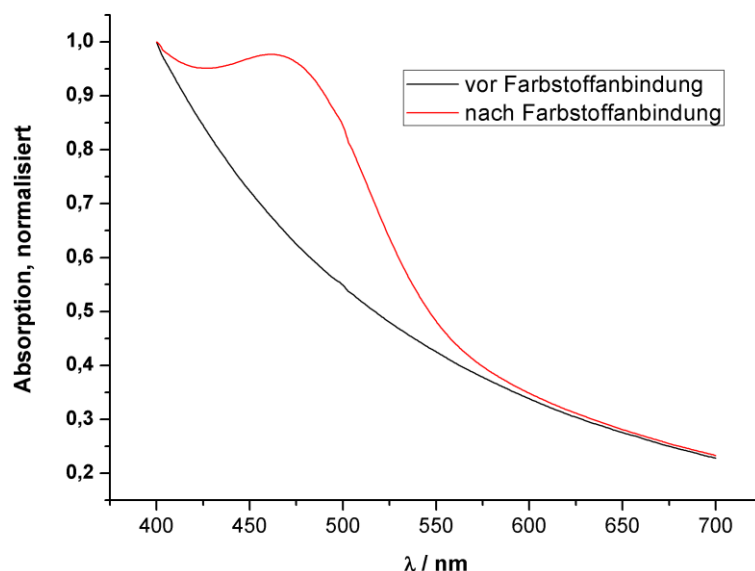


Abb. 47: UV/Vis-Spektrum von Vesikeln aus dem mittels CTA2 hergestellten Polymer PA. schwarz: vor Azid-Alkin-Click-Reaktion, rot: nach Azid-Alkin-Click-Reaktion und Abtrennung des freien Farbstoffes (PA-608).

Zur Farbstoffmarkierung zwecks biomedizinischer Erforschung der Transporteigenschaften der Vesikel ist dieses Modifikationsverfahren allerdings sehr aufwändig. Andere Techniken wie etwa der Zusatz Amin-funktionalisierter Farbstoffe in der polymeranalogen Umsetzung der PFP-Estergruppen sind vielfach erprobt und wesentlich komfortabler. Der Vorteil der Anbindung über die 1,3-dipolare Cycloaddition ist in der Möglichkeit zu sehen, Modifikationen, wie etwa die Ausstattung mit Targetingstrukturen, auch noch nach der Vesikelherstellung vornehmen zu können. Strukturen, deren Volumen nicht vernachlässigbar klein ist im Vergleich zum betreffenden Polymer, haben einen starken Einfluss auf die Kolloidbildungseigenschaften der Polymere. Sie erschweren die Ausbildung von Überstrukturen mit relativ hohem Ordnungsgrad – wie etwa Vesikeln – stark. Die gezeigte nachträgliche Modifikation der Vesikel ist ein wichtiger Ansatzpunkt zur Lösung dieses Problems.

3.3.3 Einbau eines säurespaltbaren Monomers zur pH-induzierten Desintegration der Vesikel

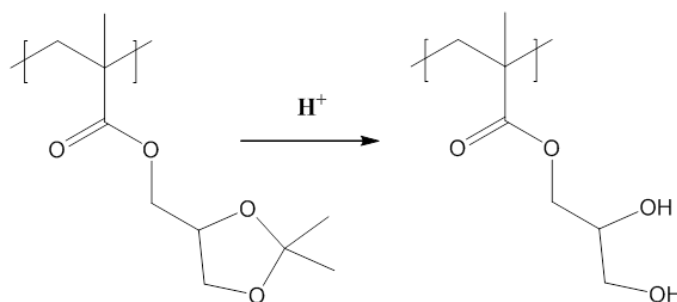
Wie in Kapitel 3.2.4 gezeigt, sind Polymersome, wie die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten P(DHPMA)-*b*-P(LMA)-basierten Vesikel, robuste Gebilde, die ihre Fracht deutlich stabiler einschließen als Lipidvesikel. Insbesondere ist die Mög-

lichkeit, mit anderen Vesikeln oder Zellkompartimenten zu verschmelzen durch die hohe Masse der konstituierenden Moleküle stark eingeschränkt.

Um eine effiziente Freisetzung der Fracht zu ermöglichen, wurden daher verschiedenste Wege zur Destabilisierung von Polymervesikeln untersucht (siehe Kap. 1.2.3). Aufgrund der Inkompatibilität der Reaktionsbedingungen der polymeranalogen Umsetzung mit redoxempfindlichen Strukturen, wie etwa Disulfiden,⁹⁹ erschien für das vorliegende System eine pH-induzierte Responsibilität günstig. Konkret wurde der Plan ausgearbeitet, eine Struktur in den hydrophoben Block der Polymervesikel einzubringen, die beim Absenken des pH-Wertes hydrolysiert wird. Durch die Hydrolyse sollte die Polarität der entsprechenden Wiederholungseinheiten deutlich ansteigen. Hierdurch sollte die Hydrophobie des gesamten wasserunlöslichen Blockes so stark erniedrigt werden, dass die doppelschichtige Anordnung in der Membran nicht mehr aufrechterhalten werden kann und das Vesikel zerfällt.

Als solches Monomer eignet sich (2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methylmethacrylat (Solketal-Methacrylat, DMDMA), dessen Polymerisation und Hydrolyse erstmals von Beinert beschrieben wurde.²²⁹ Dabei wird die Aceton-Schutzgruppe abgespalten und durch die nun entschützten Hydroxylgruppen die Wasserlöslichkeit stark erhöht (Schema 22).

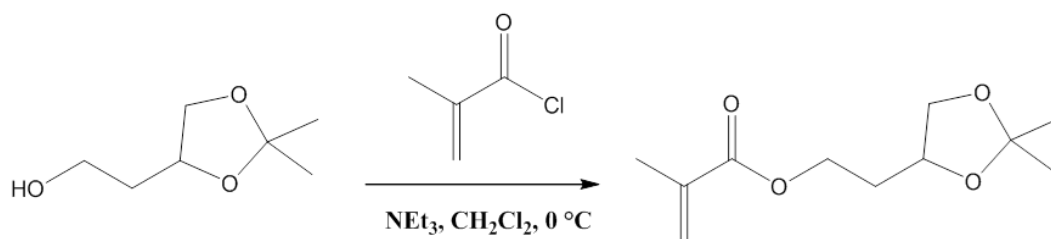
Dieser Mechanismus wurde von Zhang und Louage zum säureinduzierten Abbau von Mizellen genutzt, die das analoge Acrylat als Copolymerisat enthielten.^{230,231}



Schema 22: Hydrolyse von Solketal-Methacrylat.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine modifizierte Variante des Solketal-Methacrylates hergestellt und eingesetzt, die an die polymeranalogue Aktivester-Konversion im basischen Milieu angepasst wurde. So stellt die Estergruppe des

DMDMA aufgrund des elektronegativen Sauerstoffatoms in unmittelbarer Nachbarschaft zum α -Kohlenstoffatom des Esters selbst einen schwachen Aktivester dar. Daher kann als Nebenreaktion die Aminolyse der DMDMA-Wiederholungseinheiten stattfinden. Um dieses Problem zu umgehen, wurde eine um eine Methyleneinheit verlängerte Variante des Solketal-Monomers entwickelt. Die Synthese gelang über die Umsetzung von 4-(2-Hydroxyethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan mit Methacryloylchlorid unter Verwendung von Triethylamin als Hilfsbase.



Schema 23: Synthese von DDEMA.

Nach Aufreinigung mittels Kieselgel-Säulenchromatographie (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat, 6:1 v/v) konnte 2-(2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethylmethacrylat (**DDEMA**) als farbloses Öl in einer Ausbeute von 58 % erhalten werden.

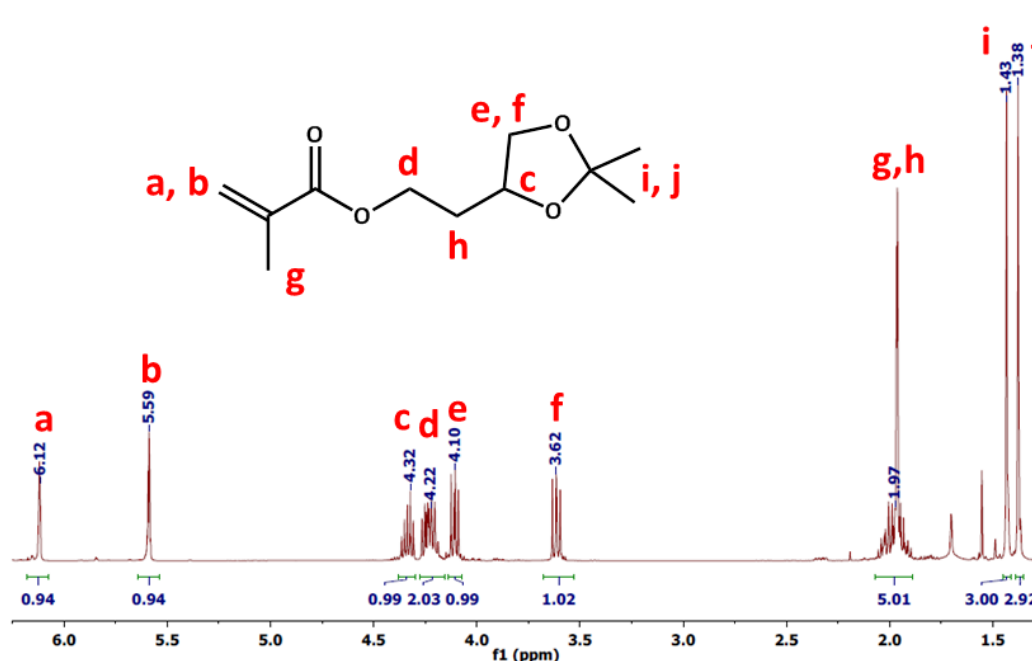


Abb. 48: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von DDEMA (CDCl_3 , 400 MHz).

Abb. 48 zeigt das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der aufgereinigten Verbindung und weist nach, dass DDEMA in guter Reinheit erhalten werden konnte. Die Signale im Bereich von $\delta = 1,75 - 1,50$ sind auf Laufmittelreste zurückzuführen. Diese wurden bewusst nicht komplett entfernt, da das Monomer in vollständig getrocknetem Zustand zum extrem schnellen Polymerisieren neigte.

Vor der Herstellung amphiphiler Blockcopolymerer $\text{P(DHPMA)-}b\text{-P(LMA-stat-DDEMA)}$ wurde zunächst die Copolymerisation der beiden hydrophoben Monomere untersucht.

Dazu wurden die beiden Monomere im Eduktverhältnis $\text{LMA:DDEMA} = 7:3$ gemischt und per RAFT mit **CTA1** zum statistischen Copolymer **SC** polymerisiert.

Tabelle 16: Analytik des P(LMA-stat-DDEMA) Copolymers SC.

Polymer	Zusammensetzung ^{a)}	M_n	\bar{D} ^{b)}
		/ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ^{b)}	
SC	$\text{P(LMA}_{16}\text{-stat-DDEMA}_6)$	5.500	1,13

^{a)} bestimmt mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und THF-GPC, ^{b)} bestimmt mittels THF-GPC.

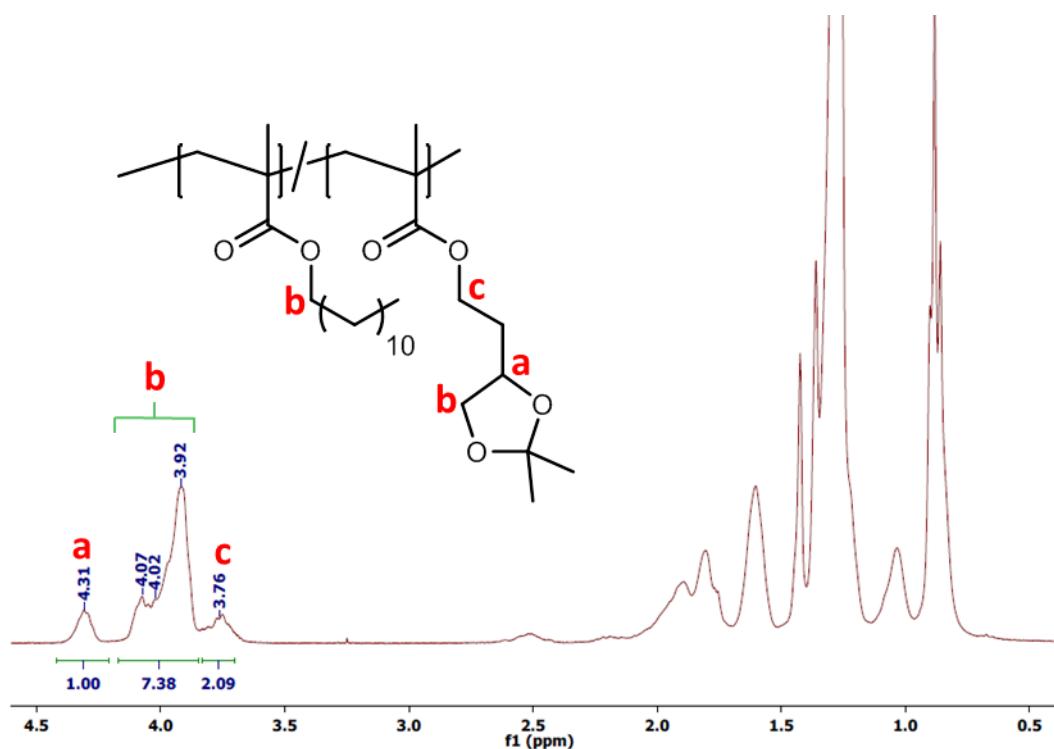


Abb. 49: Analytik von SC per $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie (CDCl_3 , 400 MHz).

Die Analyse der Zusammensetzung erfolgte anhand der $^1\text{H-NMR}$ -Signale im Bereich $\delta = 4,42 - 3,71$. Normiert wurde auf H_a der Dioxolan-Einheit von DDEMA. Das Integral **b** ($I = 7,38$) setzte sich aus dem Signal der beiden Protonen H_b der Methylengruppe des Dioxolanrings sowie der α -Methylengruppe des Dodecylesters zusammen. Wegen der Normierung auf DDEMA entsprach der Anteil der H_b -Protonen $I(\text{H}_b) = 2$ und es verblieb $I(\alpha\text{-CH}_2) = 5,38$.

Es lagen demnach

$$\frac{5,38}{2} = 2,69$$

Wiederholungseinheiten LMA pro DDEMA-Einheit vor. Dies entsprach einem Stoffmengenanteil an DDEMA von

$$1 - \left(\frac{2,69}{2,69 + 1} \right) = 27,1 \text{ \%}.$$

Bei einem ursprünglich eingesetzten Stoffmengenanteil an DDEMA im Ausgangsgemisch von 30,0 % konnte also das angestrebte Stoffmengenverhältnis zu 90,3 % erreicht werden.

Aufbauend auf diesem Ergebnis wurde unter Verwendung von **SC** ein Blockcopolymer $\text{P}(\text{PFPMa})\text{-}b\text{-P}(\text{LMA}\text{-}stat\text{-DDEMA})$ (**BS**) zur polymeranalogen Umsetzung mit DHPA zum amphiphilen Blockcopolymer für die Vesikelbildung synthetisiert. Hierzu wurde analog zur Blockcopolymer-synthese in Kapitel 3.1.1.4 PFPMa mit **SC** als Makroinitiator bei 70 °C polymerisiert.

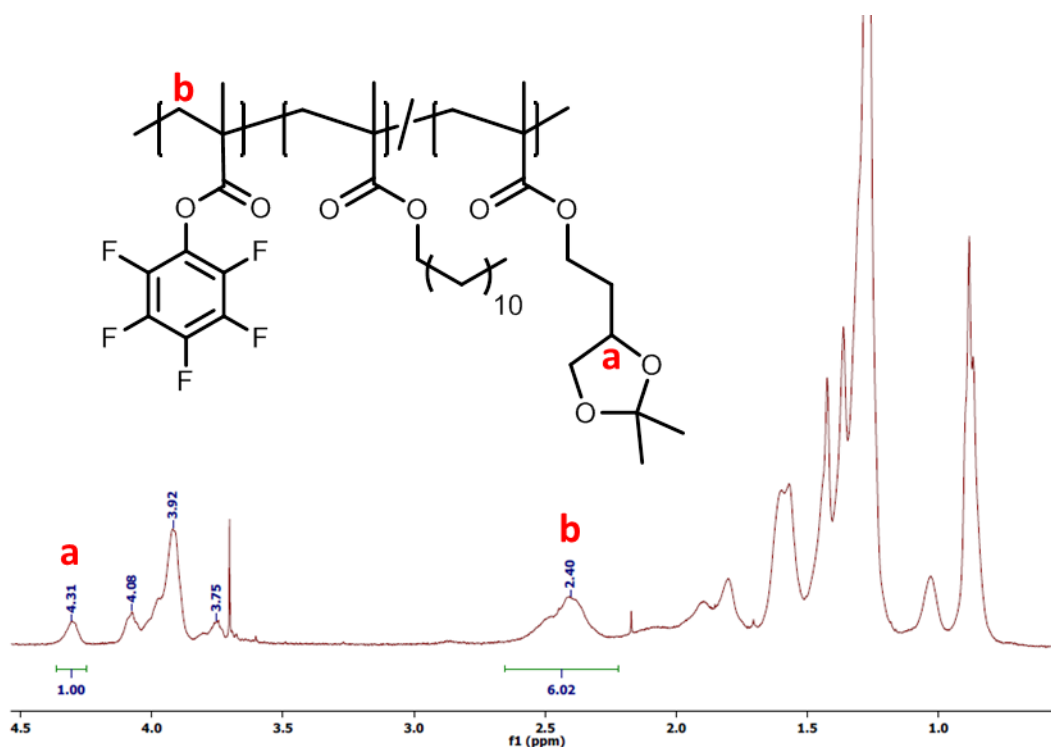


Abb. 50: Analytik von BS per ^1H -NMR-Spektroskopie (CDCl_3 , 400 MHz).

Analysiert werden konnte die Zusammensetzung des erhaltenen Blockcopolymer anhand des Integrals des H_a -Protons des Dioxolanrings sowie der Methylen-Wiederholungseinheit des P(PFPMA)-Rückgrats (H_b). Nach Definition des Integrals $I(\text{H}_a) \triangleq 1,00$ ergab sich ein Verhältnis von

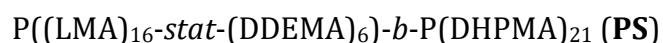
$$\frac{H_b}{H_a} = \frac{6,02}{1}$$

Hieraus ergab sich die Polymerzusammensetzung anhand von **SC** zu



mit einem mittleren Molekulargewicht von $M_n = 10.700 \text{ g/mol}$ ($\text{Đ} = 1,11$).

Nach dem Verkochen der RAFT-Endgruppe mit AIBN gemäß Kapitel 3.1.1.5 und der polymeranalogen Umsetzung mit DHPA (Kap. 3.1.3) wurde das amphiphile Blockcopolymer



mit $M_n = 8.800 \text{ g/mol}$ ($\text{Đ} = 1,27$) erhalten. Dessen hydrophiler Massenanteil betrug $f = 34,8 \%$.

Tabelle 17: Analytik der Polymere mit säurelabilem Anteil DDEMA.

Polymer	Zusammensetzung ^{a)}	M_n / g·mol ⁻¹	\bar{D}	hydrophiler Massenanteil $f^{a)}$
SC	P(LMA ₁₆ -stat- DDEMA ₆)	5.500 ^{b)}	1,13 ^{b)}	-
BS	P((LMA) ₁₆ -stat- (DDEMA) ₆)-b- P(PFPMA) ₂₁	10.700 ^{b)}	1,11 ^{b)}	-
PS	P((LMA) ₁₆ -stat- (DDEMA) ₆)-b- P(DHPMA) ₂₁	8.800 ^{c)}	1,27 ^{c)}	0,348

^{a)} bestimmt mittels ¹H-NMR-Spektroskopie und THF-GPC, ^{b)} bestimmt mittels THF-GPC, ^{c)} bestimmt mittels HFIP-GPC.

Für die Untersuchung des Abbaus der Nanopartikel aus **PS** wurden per Phaseninversion Vesikel in 5 mM NaCl-Lösung hergestellt und zu einer einheitlichen Größe von $R_h = 100$ nm extrudiert. Als Vergleichsprobe ohne säurelabile Ketalstruktur dienten analog hergestellte Polymersome aus **P23** mit einer vergleichbaren Molmasse von 8.900 g/mol. Die Vesikeldispersionen wurden aliquotiert und mittels Salzsäure auf pH 6,5/6,0/5,5/4,5/3,0 eingestellt. Die finale Polymerkonzentration betrug jeweils 10 mg/L. Nach 48-stündigem Inkubieren bei 37 °C wurden die Proben mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht.

Dabei konnte bis zu einem pH-Wert von 5,5 kein Einfluss auf Streuintensität oder Autokorrelationsfunktion von **PS** beobachtet werden. Bei pH 4,5 kam es jedoch zu einem vollständigen Einbruch der Streuintensität. Abb. 51 zeigt die experimentell ermittelten Autokorrelationsfunktionen der beiden Vesikeltypen bei pH 6,5 und pH 4,5. Im Fall des Polymers **P23** ohne eingebaute Ketalstruktur weichen die aufgetragenen Messwerte praktisch nicht voneinander ab. Der niedrigere pH-Wert hatte keinerlei Einfluss auf die Größe der Polymersome. Auch die Messwerte für die aus Polymer **PS** bestehenden Vesikel bei pH 6,5 sind nahezu deckungsgleich mit P23, was anhand der Extrusion beider Vesikeltypen zu gleicher Größe auch

erwartet worden war. Bei pH 4,5 konnte aufgrund der eingebrochenen Streuintensität ($I_{\text{pH } 4,5} = 1,2 \text{ kHz}$ gegen $I_{\text{pH } 6,5} = 85,4 \text{ kHz}$ bei $\alpha = 90^\circ$) keine Autokorrelationsfunktion ermittelt werden.

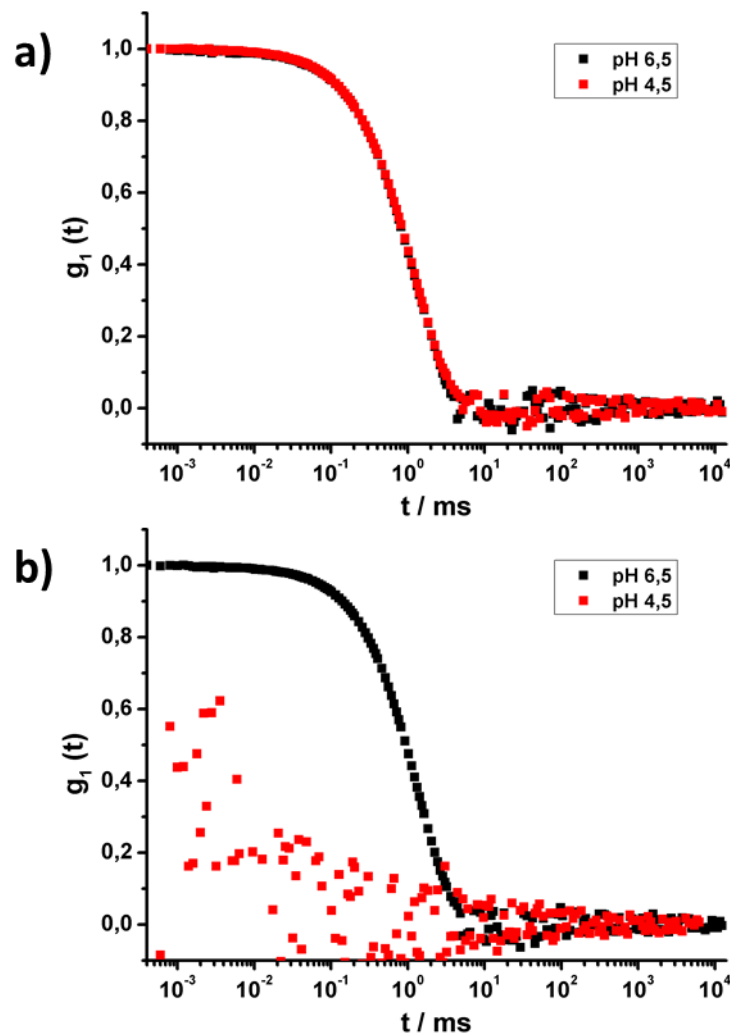


Abb. 51: DLS-Untersuchung des pH-Einflusses auf Vesikel ohne (a) und mit (b) Ketalstruktur.
 a) $P(\text{DHPMA})\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})$ -Vesikel (P23): experimentell ermittelte ACF (90°) bei pH 6,5 (schwarz) und pH 4,5 (rot).
 b) $P(\text{DHPMA})\text{-}b\text{-}P(\text{LMA-stat-DDEMA})$ -Vesikel (PS): experimentell ermittelte ACF (90°) bei pH 6,5 (schwarz) und pH 4,5 (rot).

Diese Beobachtung ist auf die Desintegration der Vesikel als Folge der Hydrolyse der Ketalstrukturen zurückzuführen. Hierdurch wurden die hydrophoben Blöcke, welche die Polymersomenmembran bilden, so stark hydrophilisiert, dass es zu einer vollständigen molekularen Solvatation der einzelnen Polymermoleküle kam. Supramolekulare Strukturen höherer Aggregationszahl hätten anhand ihrer wesentlich höheren Streuintensität detektiert werden können. Durch die molekulare

Solvatisierung war die Streuintensität trotz unveränderter Molekülzahl so gering, dass keine Autokorrelationsfunktion mehr ermittelt werden konnte.

Das Ziel, den hydrophoben Block der P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymeren mittels einer säurelabilen Komponente zu funktionalisieren, konnte durch die Copolymerisation von LMA mit DDEMA also erreicht werden. Die darauf basierenden Polymervesikel konnten bei pH 4,5 aufgrund der Hydrolyse der Ketalstruktur vollständig zerstört werden, während Vesikel aus Polymeren ähnlichen Molekulargewichtes, aber ohne Ketalstruktur, intakt blieben. Dies ist ein wichtiges Ergebnis im Hinblick auf die Anwendung der Polymervesikel als Wirkstoffträger. Durch die pH-induzierte Spaltbarkeit wird die Freisetzung eines verkapselten Stoffes aus der inhärent sehr stabilen Polymermembran (siehe Kapitel 3.2.4) maßgeblich erleichtert.

3.4 Versuche zur Rekonstitution des Aquaglyceroporins GlpF in Polymersom-Membranen

Wie in Kapitel 1.2.3 skizziert, erlaubt die Flexibilität von Polymerketten in manchen Fällen die Rekonstitution von Membranproteinen unter Erhalt ihrer Funktion. Entscheidend sind dabei die Membrandicke - die Größendifferenz zwischen der hydrophoben Membrandomäne und dem Protein darf nicht zu groß sein - und die Flexibilität der Ketten.²³² Mit wenigen Ausnahmen, wie etwa dem Einsatz eines speziell für die betreffende Polymermembran chemisch modifizierten Proteins,²³³ fußen derzeit erfolgreiche Rekonstitutionsexperimente nahezu ausschließlich auf der Verwendung von P(DMS)-basierten Blockcopolymeren.⁸⁰

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Material für den hydrophoben Block von Polymervesikeln verwendete P(LMA) weist eine Glas temperatur von $T_g = 208 \text{ K}$ auf. Dies geht einher mit einer hohen Kettenflexibilität bei Raumtemperatur. Ferner sind die langkettigen Acylreste der Monomer-Wiederholungseinheit strukturell sehr ähnlich zu den Acylglycerid-Resten der natürlichen Phospholipiden.

In Kooperation mit [REDACTED] wurde daher versucht, das Aquaglyceroporin GlpF in der Membran von P(DHPMA)-*b*-P(LMA) zu rekonstituieren.

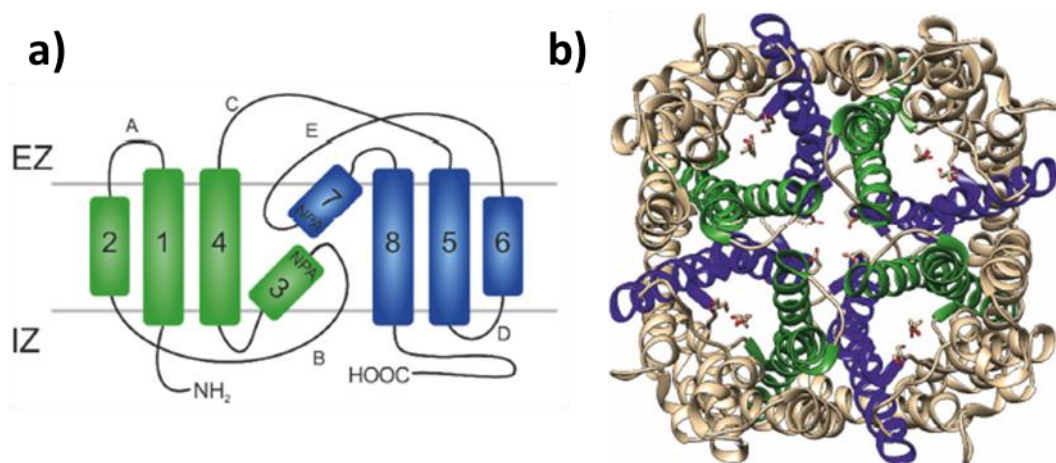


Abb. 52: Topologie- und Strukturmodell von GlpF.²¹⁷
a) Topologiemodell,
b) Kristallstruktur des GlpF-Tetramers.

GlpF liegt in der biologischen Membran als Tetramer vor und kann selektiv Wasser und niedere Polyole wie beispielsweise Glycerol transportieren.

Weil das Protein durch organische Lösungsmittel und unter dem Einfluss hoher Scherkräfte in der Dualen Zentrifugation denaturierte, wurde als Methode der Rekonstitution die Detergenzdialyse gewählt.²³⁴ Dabei werden Polymer und Protein mittels geeigneter Detergenzien zu gemischten Mizellen solubilisiert. Durch die langsame Absenkung der Detergenzkonzentration kommt es zu einer beständigen Änderung der Aggregatmorphologie, bis schließlich Vesikel ausgebildet werden. Kumar et al. konnten auf diesem Wege die Rekonstitution von Aquaporinen in der Membran von P(MOXA)-*b*-P(DMS)-*b*-P(MOXA) etablieren.²³⁵

Vor dem Versuch der Proteinrekonstitution wurde zunächst die Vesikelherstellung über die Detergenzdialyse getestet. Dazu kam **P22** als P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymer mit dem insgesamt niedrigsten Molekulargewicht von $M_n = 5.600$ g/mol zur Anwendung. Dieses Polymer wies eine Masse des hydrophoben Blocks von ca. 3300 g/mol auf. Die Membrandicke bei der Vesikelpräparation mittels Phaseninversion betrug $d = 9,3$ nm (Tabelle 10).

Zur Vesikelbildung wurde das Polymer in einer 5 %-igen Lösung von Octyl- β -D-glucopyranosid (OG) im Dialysepuffer (pH = 7,5) dispergiert. Durch kontrollierte Pufferzugabe wurde der Detergenzgehalt auf 0,5 % gesenkt, wobei die kritische Mizellbildungskonzentration von OG (0,7 % \cong 20 mM) unterschritten wurde. Eine nahezu vollständige Entfernung des Detergenz gelang durch Dialyse gegen weiteren Dialysepuffer. Die erhaltene trübe, kolloidal stabile Dispersion wurde per Stopped-Flow-UV/Vis-Spektrometrie auf die Bildung von Vesikeln untersucht.

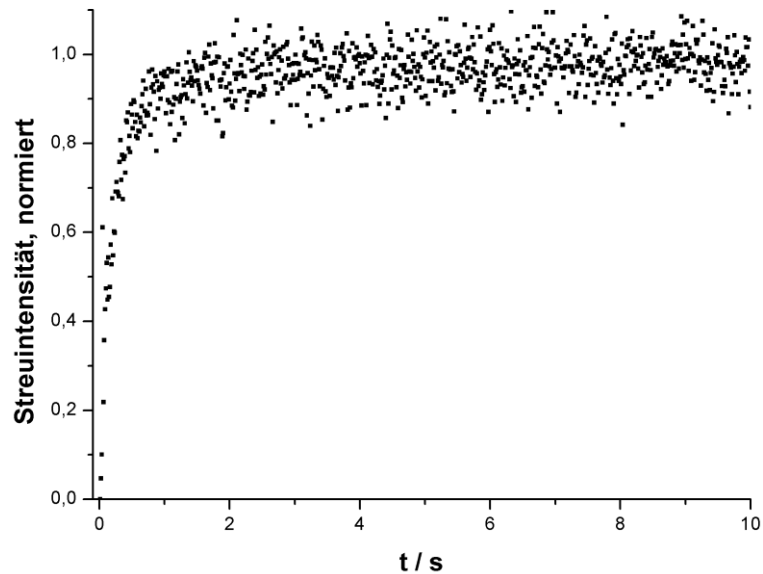


Abb. 53: Stopped-Flow-UV/Vis-Spektrometrie von Vesikeln aus P22 (600 mM Ribitol, $\lambda = 600$ nm).

Auch hier kam es zum typischen initialen Anstieg der Streuintensität durch osmotisch bedingten Wasserausfluss und dem konstanten Signal nach Gleichgewichtseinstellung. Dieser Zustand stellte sich nach $t = 2,8$ s ein, einem Wert, der deutlich näher am Ergebnis für DPPC-Vesikel lag ($t = 1,2$ s) als beim höhermolekularen **P21** ($t = 7,3$ s; $M_n = 12.200$ g/mol). Die Vesikelbildung mittels Detergenzdialyse verlief also erfolgreich.

Aufbauend auf der reinen Vesikelbildung aus der OG-Dispersion des Polymers wurden Versuche unternommen, das Membranprotein GlpF unter Erhalt seiner Transportaktivität in die sich bildende Polymermembran einzulagern. Dazu wurde die Polymerdispersion vor der Verdünnung mit einer OG-Dispersion des Proteins in PBS-Puffer versetzt. Das Polymer wurde in großem Überschuss (hohe *polymer-to-protein-ratio*, PoPR, und analog LPR bei Lipidvesikeln) eingesetzt, um den Einfluss des Proteins auf die Aggregatmorphologie zu minimieren. Bedingt durch die Fähigkeit vieler Proteine zur Kristallisation kann es bei hinreichend hohen Anteilen bis zur Ausbildung von 2D-Kristallen kommen.²³⁵

Variiert wurden die Parameter PoPR, Umgebungstemperatur und die Geschwindigkeit der Verdünnung unter die CMC des Detergenz. Als Positivkontrolle dienten bei allen Versuchsansätzen die analog durchgeführte Rekonstitution von GlpF in DOPC-Lipidvesikel sowie als Negativkontrolle die Polymervesikel ohne GlpF.

Tabelle 18: Ergebnisse der Versuchsansätze zur Rekonstitution von GlpF in Polymervesikel.

PoPR \ t^{a)}	19 h (4 °C)	48 h (4 °C)	72 h (4 °C)	19 h (25 °C)	48 h (25 °C)
200	Präzip. ^{b)}	k. A. ^{c)}	k. A.	k. Ves. ^{d)}	k. A.
100	Präzip.	k. A.	k. A.	k. Ves.	k. A.
50	Präzip.	Präzip.	Präzip.	Präzip.	Präzip.

^{a)} Dauer der Verdünnung zu $\beta(OG) = 0,5\%$, ^{b)} Probe präzipitiert, ^{c)} zwar Vesikel, aber keine Proteinaktivität detektiert, ^{d)} keine Vesikel detektiert; Polymerkonzentration: 0,6 mg/mL.

Den zu erwartenden Verlauf beim Vorhandensein aktiven Proteins zeigt die Positivkontrolle in Abb. 54a. Wie im Fall der reinen Vesikel kam es zunächst zum Signalanstieg, verursacht durch den osmotisch bedingten Ausfluss von Wasser. Gegen diesen arbeitete das Protein, welches durch seine Fähigkeit, Ribitol und Wasser zu transportieren, den osmotischen Gradienten auch durch den Einfluss von Ribitolösung in die Vesikel verringern konnte. Aufgrund der begrenzten Transportkapazität war der Prozess der Gleichgewichtseinstellung jedoch zunächst vom Wasser- ausfluss über die Membran dominiert. Erst nachdem dieser weitestgehend abgeschlossen war, trat der langsamere, ins Innere gerichtete Transport durch GlpF in den Vordergrund und es wurde eine Abnahme des Signals beobachtet.

Wie die Auflistung der Versuchsergebnisse in Tabelle 18 zeigt, konnte ein solches Verhalten jedoch nicht für die Polymervesikel beobachtet werden. Bei einer Umgebungstemperatur von 4 °C kam es im Fall der Verdünnung binnen 19 h durch die schnelle Absenkung der Detergenzkonzentration zu einer Präzipitation der Proben. Dasselbe Phänomen trat bei allen Proben des Polymer-zu-Protein-Verhältnisses PoPR = 50 auf. Als Ursache ist vermutlich der zu hohe Proteinanteil zu nennen, der die Vesikelbildung behinderte. Aber auch in den Fällen, bei denen es zu keiner Präzipitation, sondern zur Ausbildung kolloidal stabiler Aggregate kam, konnte keine Aktivität detektiert werden. Hier wurde zum einen Kurven erhalten, die im Rahmen der Messgenauigkeit identisch waren mit der proteinfreien Negativkontrolle. Dies zeigt Abb. 54b anhand des Polymer-zu-Protein-Verhältnisses PoPR = 200 bei der Verdünnung binnen 72 h. In anderen Fällen wurde eine

zeitlich konstante Lichtstreu-Intensität erhalten, was dafür spricht, dass keine Vesikel gebildet werden konnten.

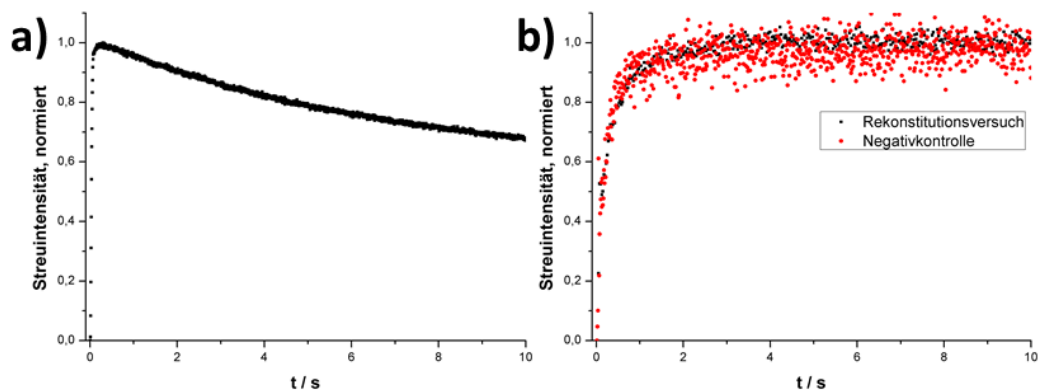


Abb. 54: Stopped-Flow-Untersuchung der GlpF-Rekonstitution. (600 mM Ribitol, $\lambda = 600$ nm).
 a) Positivkontrolle: Rekonstitution von GlpF in DOPC-Vesikeln,
 b) Versuch der Rekonstitution in Vesikeln aus P22 (schwarz, PoPR = 200, 4 °C, 72 h) und zugehörige Negativkontrolle (rot).

Um zu klären, ob das Protein gar nicht erst in die Membran inseriert worden war, oder ob es zwar eingelagert, aber nicht aktiv war, wurden die Vesikelproben mit Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgelöst und per semi-nativer SDS-Page untersucht (Abb. 55). Dazu wurden die Polymervesikel und DOPC-Vergleichsproben mit einem SDS-haltigen Auftragspuffer (Gehalt 10 % w/v) inkubiert. Dies entsprach der gut 3000-fachen Stoffmenge in Bezug auf das Polymer. Es konnte also vom vollständigen Auflösen der Vesikel ausgegangen werden (siehe Kap. 3.2.4.3). Das in DOPC-Vesikeln (Abb. 55c/g) als funktionsfähiges Tetramer rekonstituierte GlpF wurde unter diesen Bedingungen teilweise denaturiert und konnte als monomere Spezies das Gel weit penetrieren (30 kDa-Bande). Andere Anteile blieben in tetramerer Form erhalten (120 kDa-Bande).

Bei den Proben aus Polymervesikeln konnten jedoch weder GlpF-Monomere, noch höhere Spezies gefunden werden.

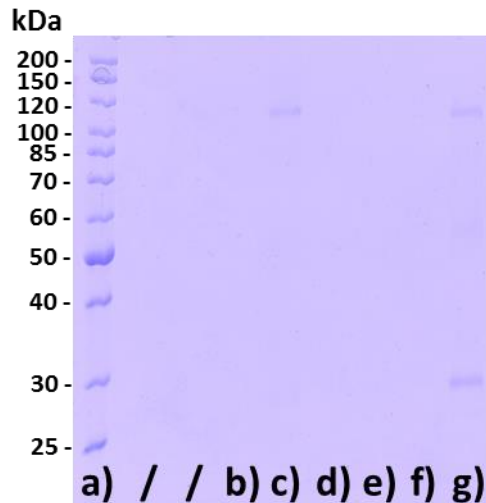


Abb. 55: *Semi-native SDS-PAGE.*

- a) PageRuler Protein Ladder,
- b) Polymervesikel, PoPR = 200 (25 °C, 48 h),
- c) DPPC-Vesikel, LPR = 400 (4 °C, 72 h),
- d) Polymervesikel, PoPR = 200 (4 °C, 48 h),
- e) Polymervesikel, PoPR = 200 (4 °C, 72 h),
- f) Polymervesikel, PoPR = 100 (4 °C, 72 h),
- g) DPPC-Vesikel, LPR = 400 (4 °C, 72 h).

Folglich muss es schon bei der Vesikelbildung zu einer Präzipitation von GlpF gekommen sein, bei der das Protein ausflockte. Eine Rekonstitution in der Membran konnte nicht erreicht werden. Die Membrandicke der verwendeten Polymervesikel von 9,3 nm lag innerhalb des Größenbereiches, für den bisher die Rekonstitution von Aquaporinen erreicht werden konnte. Zudem wurden sehr lange Formierungszeiten für die Vesikel gewählt, um die Einlagerung von GlpF in die Membran kinetisch möglichst stark zu begünstigen. Der Grund für die nicht erzielte Einlagerung - weder als funktionelle Rekonstitution, noch überhaupt eine Lokalisierung in der hydrophoben Membran - liegt mutmaßlich in der nicht ausreichenden Kompatibilität der langen Alkylketten des LMA-Blocks. P(DMS), welches bisher als hydrophobes Membrankompartiment für fast alle erfolgreichen Proteinrekonstitutionen eingesetzt wurde, ist extrem fluide. Es besitzt zudem entlang seiner Hauptkette aufgrund der polaren -Si-O- Bindungen eine intrinsische Polarität bei insgesamt starker Hydrophobizität (ähnlich den Amid-Bindungen in der Primärstruktur vieler Proteine). Diese beiden Faktoren begünstigen möglicherweise die Stabilisierung von Proteinstrukturen ausreichend stark, um Aquaporine unter Erhalt ihrer Funktion rekonstituieren zu können. Unter Verwendung eines P(DMS)-basierten

Polymers erscheint daher trotz der negativen Versuche mit P(DHPMA)-*b*-P(LMA) die funktionale Rekonstitution von GlpF durchaus realistisch. Dies war jedoch kein Ziel der vorliegenden Arbeit und wurde nicht untersucht.

3.5 Polymervesikel aus Sarkosin-basierten Polypeptid-*b*-Polypeptoid Blockcopolymeren

Als zweites Wirkstoffträgersystem auf Basis biokompatibler und funktionalisierbarer amphiphiler Blockcopolymerer wurde die Herstellung von Polymersomen aus Sarkosin-basierten Polypeptoid-*b*-Polypeptid Blockcopolymeren untersucht. Sarkosin ist eine endogen vorkommende, aber nicht proteinogene Aminosäure. Das entsprechende Polymer bietet daher das Potential, die für Wirkstoffträger günstigen *stealth-like* Eigenschaften unter Verwendung eines körpereigenen Materials zu erreichen.^{202,203} Poly(Sarkosin) wird daher, wie auch P(HPMA), als interessante Alternative zu Polyethylenglycol in der hydrophilen Korona von nanopartikulären Aggregaten untersucht.²³⁶

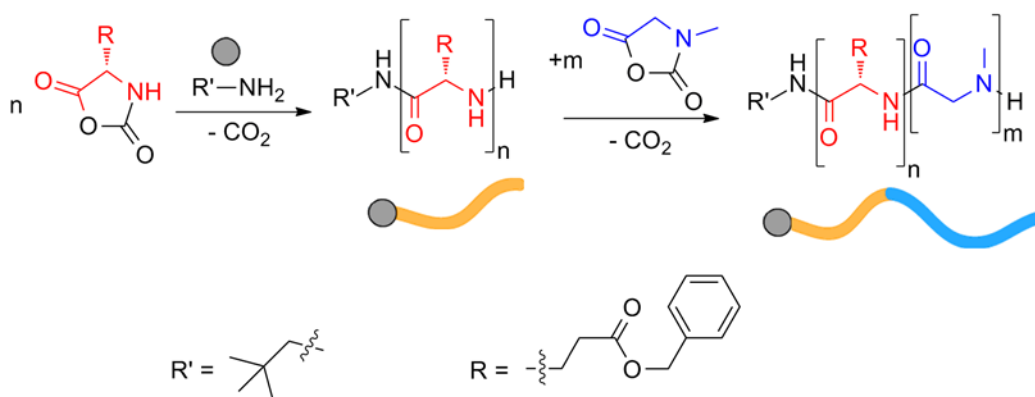
Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Vesikelbildung von P(Glu(OBn))-*b*-P(Sar) Blockcopolymeren untersucht. Sie hatte die morphologische Erweiterung der bisher existierenden mizellaren Anordnungen dieses Polymersystems zum Ziel.^{204,237} P(Glu(OBn))-*b*-P(Sar)-basierte Vesikel bieten im Gegensatz zu bisherigen Formulierungen den großen Vorteil, universell und ohne Wirkstoff-spezifische Modifizierung hydrophile Substanzen einschließen zu können.

3.5.1 Synthese von P(Glu(OBn))-*b*-P(Sar) Blockcopolymeren

Die Herstellung der verwendeten Sarkosin-basierten Blockcopolymerer wurde in Kooperation mit [REDACTED] durchgeführt.

Zur Polymersynthese wurden die entsprechenden Aminosäuren Sarkosin (Sar) und Glutaminsäure-*N*- ϵ -benzylester (Glu(OBn)) nach der Fuchs-Farthing-Methode mit Diphosgen zum jeweiligen α -Aminosäure-*N*-Carboxyanhydrid (NCA) umgesetzt.²³⁸ Die Herstellung der Polymere erfolgte in einer ringöffnenden NCA-Polymerisation unter Verwendung des Initiators Neopentylamin. Ausgehend vom Glu(OBn)-NCA wurde zunächst das Glutaminsäure-Homopolymer hergestellt und in einer Eintopfsynthese direkt mit dem Sar-NCA zum amphiphilen Blockcopolymer umgesetzt. Die Umsetzung erfolgte dabei jeweils nahezu quantitativ, was mit-

tels Infrarotspektroskopie verifiziert wurde. So konnte über die eingesetzte Menge an NCA und Initiator die gewünschte Blockzusammensetzung sehr präzise gesteuert werden.



Schema 24: Synthese von $P(\text{Glu}(\text{OBn}))\text{-}b\text{-}P(\text{Sar})$ mittels NCA-Polymerisation.
Modifiziert nach ²⁰⁴.

Mittels der beschriebenen NCA-Polymerisationsmethode wurden die in Tabelle 19 aufgeführten $P(\text{Glu}(\text{OBn}))\text{-}b\text{-}P(\text{Sar})$ Blockcopolymerer **P33** und **P34** erhalten. Die Analyse der hergestellten Polymere wurde per HFIP-Gelpermeationschromatographie und ¹H-NMR-Spektroskopie durchgeführt.

Tabelle 19: Übersicht Blockcopolymer(e)ide.

Polymer	Zusammensetzung ^{a)}	M_n ^{b)} /g·mol ⁻¹	\bar{D} ^{b)}	hydrophiler Massenanteil $f^a)$
P33	$P(\text{Glu}(\text{OBn}))_{32}\text{-}b\text{-}P(\text{Sar})_{48}$	10.500	1,09	0,342
P34	$P(\text{Glu}(\text{OBn}))_{45}\text{-}b\text{-}P(\text{Sar})_{125}$	18.100	1,32	0,490

^{a)} bestimmt per ¹H-NMR-Spektroskopie, ^{b)} bestimmt per HFIP-GPC.

Abb. 56 zeigt das ¹H-NMR-Spektrum des Polymeren **P34**. Die Ermittlung der Blocklängenverhältnisse erfolgte anhand der gut separierten Signale der Benzyl-Schutzgruppe (δ (H_b) = 7,26 ppm) sowie des *N*-Methyl-Peaks der Sarkosin-Wiederholungseinheiten (δ (H_e) = 2,85 ppm).

Die amphiphilen Blockcopolymerer konnten in enger Molmassenverteilung erhalten werden. Angepeilt wurden hydrophile Gewichtsanteile von 35,0 % (**P33**) und 50,0 % (**P34**). Diese konnten sehr genau erreicht werden.

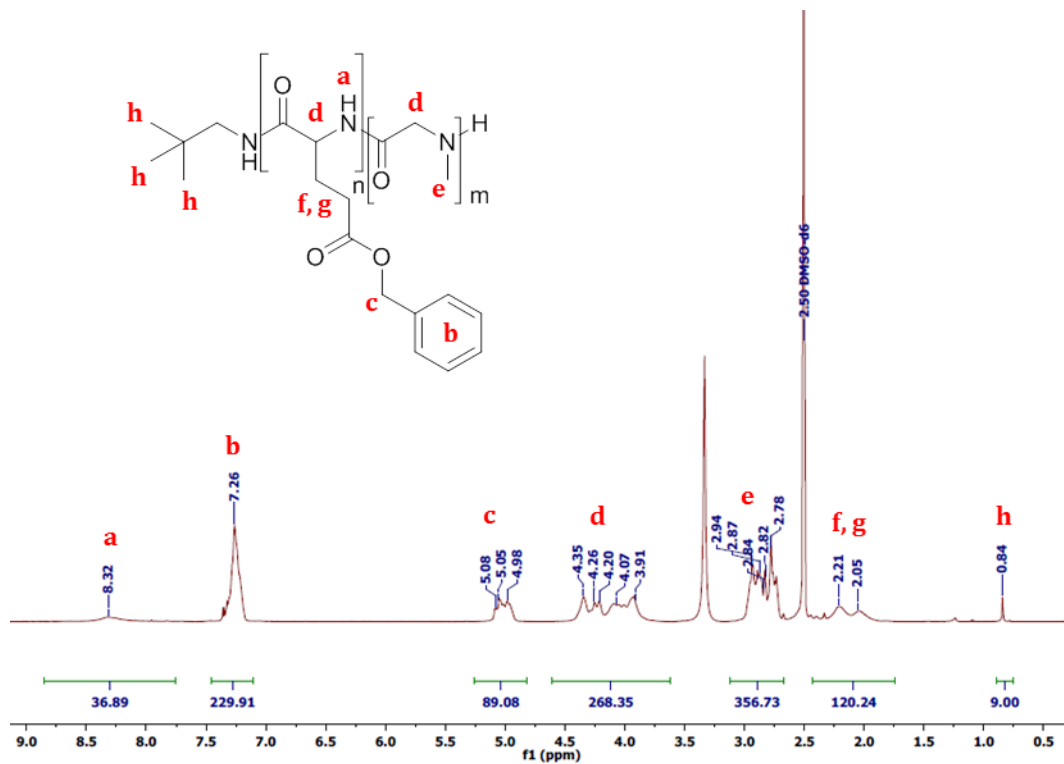


Abb. 56: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von P34 ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz).

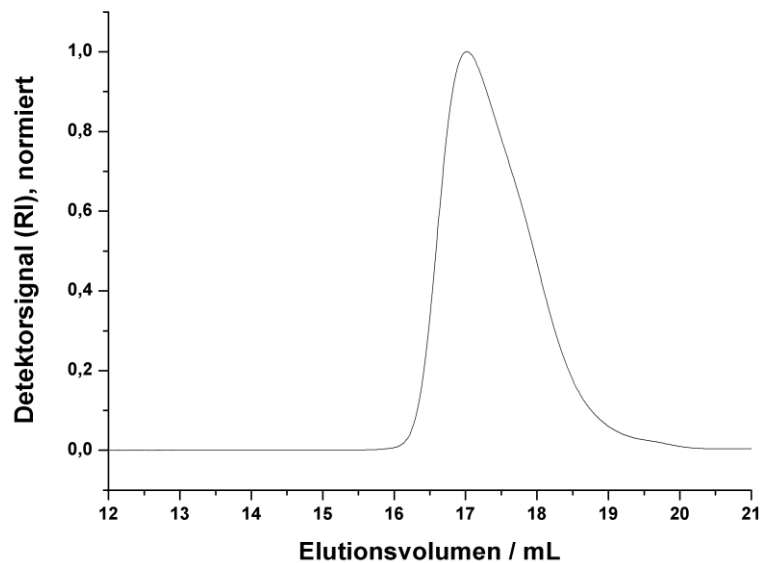


Abb. 57: GPC-Eluogramm des Blockcopolymeren P34 (HFIP-GPC).

3.5.2 Kolloidbildung mit P(Glu(OBn))-b-P(Sar) Blockcopolymeren

Die beiden Polymere **P33** und **P34** wurden bezüglich ihrer Fähigkeit untersucht, zu peptidbasierten Polymervesikeln, auch als Peptosome bezeichnet, zu aggregieren. Dabei war zu berücksichtigen, dass P(Glu(OBn)) durch Wasserstoffbrücken-

bindungen eine α -helicale Sekundärstruktur ausbilden kann. Das *N*-methylierte Glycinderivat Sarkosin dagegen kann aufgrund der Methylierung keine intramolekularen Überstrukturen wie α -Helices oder β -Sheets ausbilden. Es liegt aufgrund seiner Wasserlöslichkeit in wässriger Lösung als *random coil* vor. P(Glu(OBn))-*b*-P(Sar) Blockcopolymere zählen also zu den *rod-coil* Polymeren. Diese Geometrie erschwert die Bildung geordneter Überstrukturen durch die geringere Entropie im Vergleich zu *coil-coil* Aggregaten. Andererseits kann die parallele Ausrichtung der stäbchenartigen hydrophoben Blöcke die vesikuläre Anordnung thermodynamisch begünstigen.^{239,240} Es handelt sich bei *rod-coil* Vesikeln folglich um kinetisch zwar schwer zu bildende, aber nach der Bildung recht stabile Architekturen.

Zunächst wurde versucht, die Polymere mittels Phaseninversion zu kolloidal stabilen Aggregaten anzuordnen. Dies misslang allerdings, weil es unabhängig von den jeweils gewählten experimentellen Bedingungen (Tabelle 20) bei der Entfernung des organischen Lösungsmittels zur nahezu quantitativen Präzipitation des Polymers kam. Es ist zu vermuten, dass die Polymermoleküle durch die *rod-coil* Struktur nicht ausreichend voraggregiert waren und es durch die vollständige Entfernung des solvatisierenden Lösungsmittels zu einem Kollaps der Kolloide kam statt zur Ausbildung definierter Überstrukturen wie Vesikeln.

Dagegen konnten unter Einwirkung mechanischer Kräfte mittels Dualer Zentrifugation stabile Nanopartikel erhalten werden. Hierzu wurde wie im Fall der P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymere lyophilisiertes Material eingesetzt und mit PBS vorinkubiert. Nach analogen Zentrifugationsschritten (Kap. 3.2.3.1) wurden trübe Dispersionen erhalten, die mittels cryoTEM und dynamischer und statischer Lichtstreuung untersucht wurden.

Tabelle 20: Untersuchte Bedingungen zur Phaseninversion der Peptidvesikel.

Lösungsmittel	Temperatur	wässrige Phase
DMF	25 °C	PBS
DMAc		
NMP	40 °C	PBS + 10 mM
HFIP		Thioharnstoff

Abb. 58 zeigt cryoTEM-Aufnahmen der aus **P33** erhaltenen Nanopartikel. Es wird deutlich, dass aus der Kolloidbildung mit dieser Polymerzusammensetzung eine große morphologische Vielfalt resultierte. Zwar konnten tatsächlich Vesikel erhalten werden (Abb. 58a, $d = 200$ nm); den bei Weitem größten Anteil der Probe stellen aber kleine mizellare Strukturen mit Durchmessern von $d < 25$ nm dar. Daneben waren Strukturen inhomogener Größe ($d > 150$ nm) zu finden, bei denen es sich aufgrund ihres homogenen Kontrastes um scheibenförmige Aggregate zu handeln schien. Diese Vermutung konnte anhand der Verkippung des Aufnahmewinkels bestätigt werden (Abb. 58c, d). Bei der Bildaufnahme unter einem Winkel von 30° gegenüber der ersten Aufnahme zeigte sich die Formanisotropie des betrachteten Partikels. Es stellte sich heraus, dass der einen Durchmesser von ca. 140 nm aufweisende Partikel lediglich rund 25 nm hoch war und damit in der Größenordnung der sphärischen Mizellen lag.

Bei der Blockzusammensetzung des Polymers **P33**, die einem hydrophilen Massenanteil von 34,2 % entspricht, handelte es sich offensichtlich um einen Übergangsbereich zwischen verschiedenen Morphologien. Die Beobachtung, dass beim hydrophilen Anteil von 34,2 % sowohl Vesikel als auch Scheiben gefunden wurden, deckt sich mit dem in den Kapiteln 1.1 und 1.2 besprochenen Bereich, in welchem es zum Übergang von Vesikel zu Überstrukturen noch geringerer Krümmung kommt. Hierzu gehören auch die gefundenen Scheiben mit ihrer lamellaren und planaren Anordnung der Blockcopolymeren. Gleichzeitig wurden aber auch sphärische Mizellen gefunden. Diese sollten der Theorie nach im Bereich hoher hydrophi-

ler Anteile zu finden sein. Ihr Auftreten erklärt sich anhand des Bildungsmechanismus. Nach derzeitigem Wissensstand geht man davon aus, dass die Vesikelbildung grundsätzlich über mizellare Aggregate als Zwischenstufe abläuft.⁵¹⁻⁵³ Es dürfte daher eher die Regel, als die Ausnahme sein, dass in Vesikelproben auch mizellare Strukturen gefunden werden.

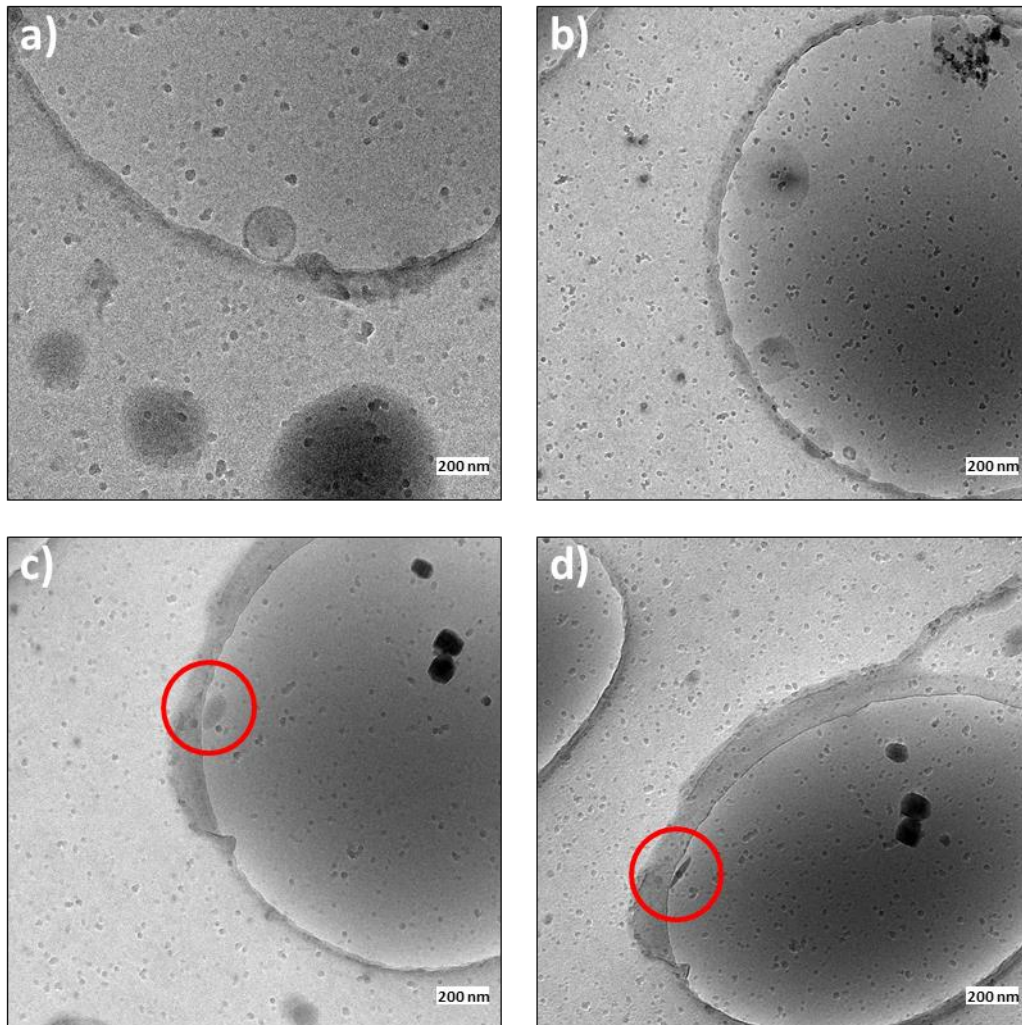


Abb. 58: cryoTEM-Aufnahmen von Vesikeln aus P33 (alle Aufnahmen aus identischer Probe).
 a) Vesikel und sphärische Mizellen,
 b) Scheiben und sphärische Mizellen,
 c), d) Nachweis der Scheibenmorphologie durch Kippung des Aufnahmewinkels um 30°.

Der relative Anteil der verschiedenen Aggregatformen ließ sich anhand der cryoTEM Aufnahmen nur insofern einschätzen, als dass Vesikel nicht die Hauptfraktion darstellten. Mizellen stellten zwar zahlenmäßig die größte Fraktion an Aggregaten dar, sie weisen aber im Allgemeinen viel geringere Aggregationszahlen auf als Vesikel oder Scheiben.

Anders als im Fall von **P33** stellte sich die Situation bei **P34** dar (Abb. 59). Hier wurden fast ausschließlich Vesikel einer Größenordnung von $d < 100$ nm gefunden. Sphärische Mizellen waren nur in viel geringerem Anteil vorhanden.

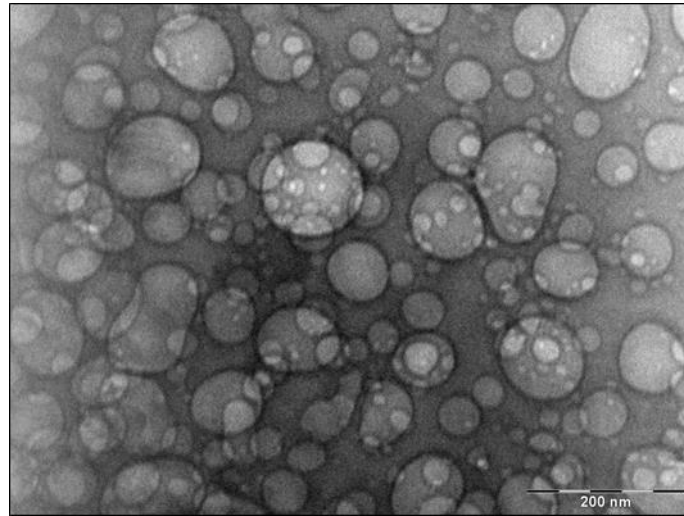


Abb. 59: cryoTEM Aufnahme von Vesikeln aus P34 (hergestellt per DZ).

Die mittlere Membrandicke lag mit $d = (6,3 \pm 0,4)$ nm deutlich unterhalb der Werte, die für P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Polymersome mit ähnlicher Masse des hydrophoben Blocks ermittelt worden waren. Dies ist mutmaßlich eine Folge der dichteren Packung der stäbchenartigen hydrophoben Blöcke.

Die Bestimmung des mittleren hydrodynamischen Radius gelang mittels dynamischer Lichtstreuung (Abb. 60a). Es resultierte $R_h = 39,2$ nm.

In Kombination mit der statischen Lichtstreuung (Abb. 60b) konnte zudem das ρ -Verhältnis der Partikel charakterisiert werden.

Aus $R_g = 37,3$ nm wurde das ρ -Verhältnis zu

$$\rho = \frac{37,3 \text{ nm}}{39,2 \text{ nm}} = 0,95$$

ermittelt. Dieses Verhältnis weicht nur wenig vom Idealwert $\rho = 1,0$ für Hohlkugeln infinitesimaler Schalendicke ab. Sie bestätigt zusätzlich zu den cryoTEM Aufnahmen die vesikuläre Architektur der aus **P34** erhaltenen Nanopartikel.

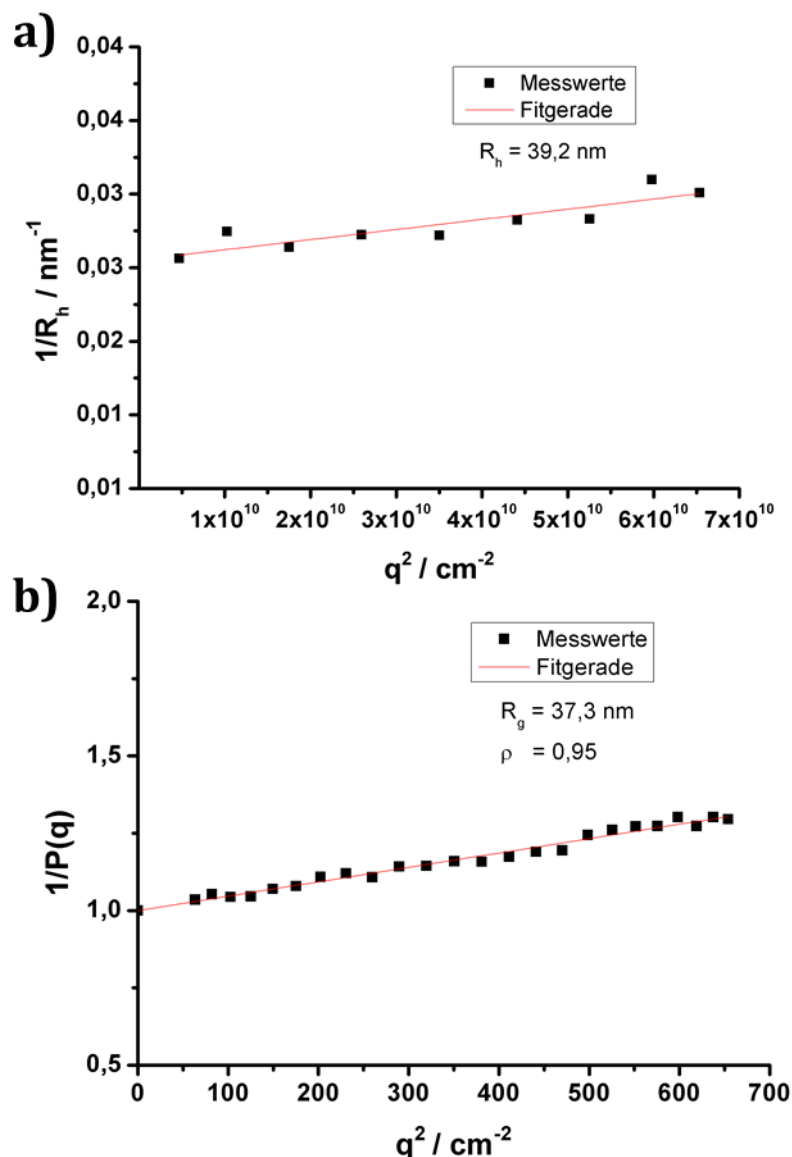


Abb. 60: Bestimmung des ρ -Verhältnisses von Kolloiden aus P34 (hergestellt per DZ).
 a) Ermittlung von R_h per DLS.
 b) Ermittlung von R_g per SLS.

Die Beladungseffizienz bei der Vesikelbildung mittels DZ wurde für **P34** in Analogie zu den P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymeren anhand der Verkapselung des wasserlöslichen Farbstoffes Sulforhodamin B ermittelt. Auch hier wurde das lyophilisierte Polymer mit einer 1 mM Lösung des Farbstoffes in PBS inkubiert und die Vesikel durch Duale Zentrifugation gebildet. Nach dem Abtrennen des nicht eingeschlossenen Farbstoffes per Größenausschlusschromatographie wurde dessen Menge nach Lambert-Beer quantifiziert. Nach Gleichung (3.12) wurde eine Einschlusseffizienz von $EE = 32,6 \%$ ermittelt. Dieser Wert lag in derselben Grö-

ßenordnung wie die Einschlusseffizienzen, welche für die Aktivester-basierten Polymersome bestimmt worden waren.

Es konnten also auch aus P(Glu(OBn))-*b*-P(Sar) Vesikel erhalten werden. Darüber hinaus gelang mittels Dualer Zentrifugation der Einschluss hydrophiler Stoffe in hoher Effizienz.

Zusammen mit den bisherigen grundlegenden Untersuchungen dieses Polymersystems^{204,237} machen die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse P(Glu(OBn))-*b*-P(Sar) zu einem vielversprechenden Kandidaten für die Verkapselung und den Transport hydrophiler Wirkstoffe.

3.6 *In vitro* Evaluierung von P(DHPMA)-*b*-P(LMA) und P(Glu(OBn))-*b*-P(Sar) Vesikeln

Aufbauend auf den Ergebnissen der vorangehend beschriebenen Versuche wurden erste grundlegende Untersuchungen zum praktischen Einsatz der hergestellten Vesikel als Wirkstoffträger unternommen.

Hierzu wurde zunächst der Einfluss der neuartigen P(DHPMA)-basierten Polymere auf die Zellviabilität untersucht. Die geringe Toxizität der Peptoid-Vesikel war bereits in vorangehenden Studien bestätigt worden.

Ferner wurde das Verhalten der P(DHPMA)-*b*-P(LMA) in menschlichem Blutserum per dynamischer Lichtstreuung evaluiert. Zudem wurde die Aktivierung dendritischer Zellen und T-Zellen durch wirkstoffbeladene Vesikel beiderlei Materialien untersucht. Darüber hinaus wurde die Zellaufnahme mannosylierter P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Vesikel untersucht, wobei bei hinreichend hohem Mannosylierungsgrad eine signifikante Steigerung der Zellaufnahme beobachtet werden konnte.

3.6.1 Untersuchung des Einflusses von P(DHPMA) auf die Zellviabilität im Vergleich zu P(HPMA)

Die geringe Toxizität und Immunogenität von P(HPMA) sind seit Jahrzehnten bekannt und experimentell bestätigt.^{146,241,242} Für das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Derivat P(DHPMA) lagen bisher keine Informationen diesbezüglich vor.

Daher wurde zunächst ein MTT-Test durchgeführt, bei dem P(DHPMA)- und P(HPMA) Homopolymere identischen Polymerisationsgrades hinsichtlich ihres Einflusses auf die Zellviabilität verglichen wurden. Bei dieser Untersuchung wurde die metabolische Aktivität von HEK 293T-Zellen anhand der Umsetzung des gelben Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zum entsprechenden violettfarbenen Formazan photometrisch quantifiziert und als Maß für die Zellviabilität interpretiert. Zur Herstellung der Polymerproben wurde analog zum Vorgehen in Kapitel 3.1.1.3 ein P(PFPMA)-Homopolymer **H16** mit dem Polymerisationsgrad $X_n = 36$ synthetisiert und die RAFT-Endgruppe mit

AIBN substituiert. Die polymeranaloge Umsetzung mit HPA bzw. DHPA ergab die beiden in Tabelle 21 aufgeführten Homopolymere.

Tabelle 21: Homopolymere für die Untersuchung der Zellviabilität.

Polymer	Zusammensetzung ^{a)}	M_n / g·mol ⁻¹ ^{a)}	\bar{D} ^{a)}
P16C	P(HPMA) ₃₆	5.200	1,35
P16D	P(DHPMA) ₃₆	5.700	1,35

^{a)} bestimmt mittels THF-GPC des Vorläuferpolymers P(PFMA)₃₆.

Abb. 61 zeigt die im MTT-Test ermittelten Messdaten für verschiedene Konzentrationen der beiden Polymere zwischen 0,001 - 1 mg/mL sowie die unbehandelte Referenzprobe (reiner PBS-Puffer) und das zytotoxische DMSO.

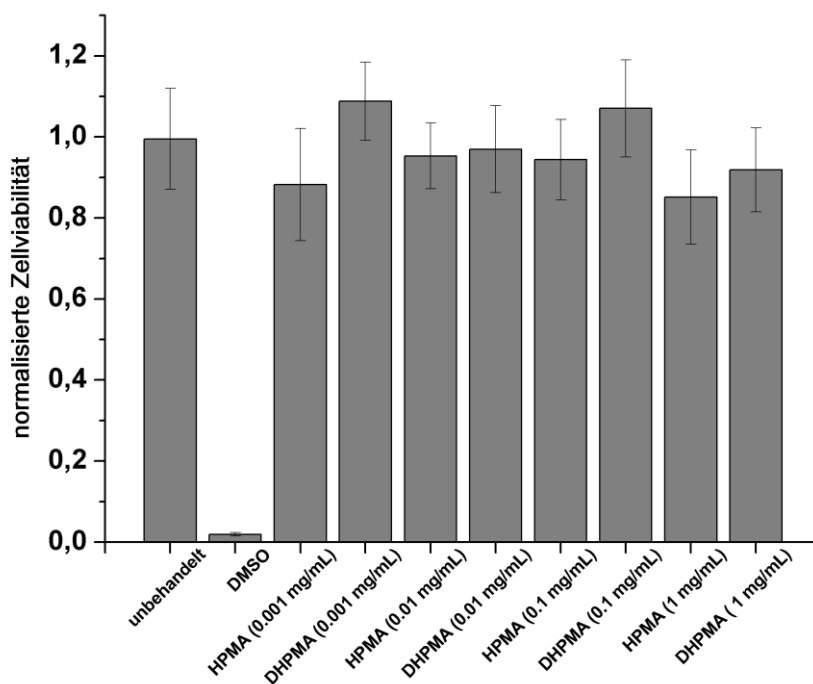


Abb. 61: MTT-Test von HPMA- und DHPMA Homopolymeren ($n = 6$).

HPMA: P(HPMA)₃₆ (P16C),

DHPMA: P(DHPMA)₃₆ (P16D).

Die ermittelten Werte für die Zellviabilität lagen bei allen Konzentrationen nahe des Referenzwertes 1,0, sodass keine nennenswerte Toxizität festgestellt werden

konnte. Ein signifikanter Trend bezüglich der Unterschiede zwischen P(DHPMA) und P(HPMA) war im Rahmen der statistischen Unsicherheit der Messwerte nicht zu erkennen. Allerdings lagen die Mittelwerte der jeweiligen Proben für das P(DHPMA) Homopolymer bei allen Konzentrationen etwas über den für P(HPMA) ermittelten Werten. Es kann daher die Aussage getroffen werden, dass P(DHPMA) mindestens genau so wenig toxisch ist, wie das generell als nichttoxisch beschriebene P(HPMA). P(DHPMA) eignet sich daher grundsätzlich für den Einsatz als hydrophile Korona von nanopartikulären Wirkstoffträgern.

Hätte das beschriebene Experiment eine in signifikantem Ausmaß geringere Toxizität gegenüber P(HPMA) ergeben, so wäre die Ursache in der stärkeren Hydratisierung zu suchen. Die DHPMA-Wiederholungseinheit präsentiert nach Außen identische Typen funktioneller Gruppen, weist aber gegenüber HPMA eine zusätzliche Hydroxylgruppe auf. Diese erhöht die Hydrophilie des Materials deutlich und sorgt somit auch für eine stärker gebundene Hydrathülle. Dies geht einher mit einer geringeren Wechselwirkung mit anderen Komponenten des umgebenden Mediums, wie etwa den HEK 293T-Zellen im MTT-Test.

Nach der grundlegenden Untersuchung des Einflusses von P(DHPMA) auf die Zellviabilität wurde auch die Toxizität der fertigen Wirkstoffträger, Vesikeln bestehend aus P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymeren, untersucht. Dies geschah anhand der Polymere **P19** und **P22**. Hergestellt wurden die Vesikel per Dualer Zentrifugation.

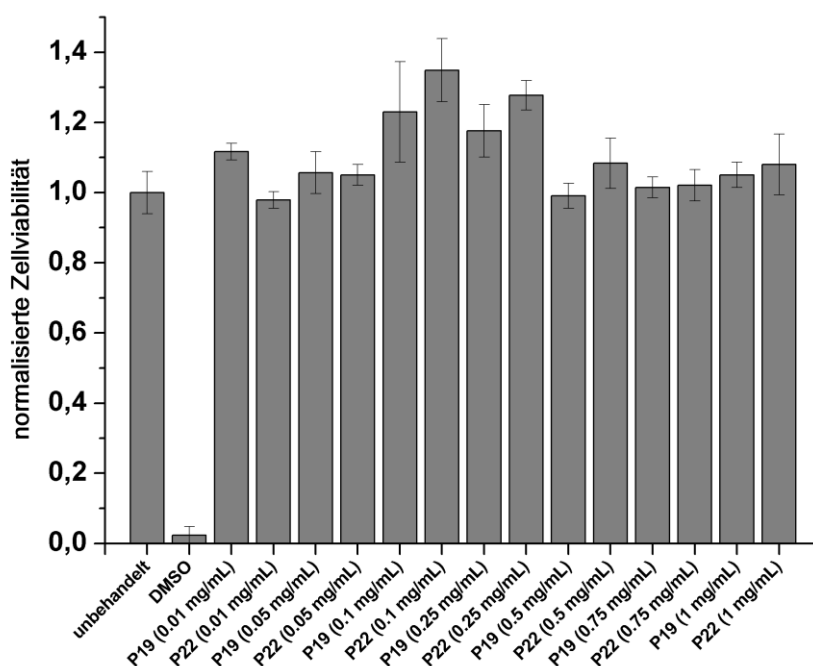


Abb. 62: MTT-Test von P(DHPMA)-b-P(LMA) Vesikeln bestehend aus P19/P22 ($n = 6$).

Auch im Fall der fertigen Vesikel waren über alle untersuchten Konzentrationen durchgängig hohe Zellviabilitäten zu beobachten. Die Unterschiede zwischen den beiden Polymeren waren sehr gering und lagen innerhalb der Standardabweichung der aus Hexaplikaten ermittelten Messdaten.

Mittels der MTT-Untersuchung der Homopolymere konnte gezeigt werden, dass es sich bei P(DHPMA) um ein nichttoxisches Polymer handelt. Sein Einfluss auf die Zellviabilität ist mindestens genau so gering wie die von P(HPMA), welches in der biomedizinischen Forschung weit verbreitet ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch Vesikel bestehend aus P(DHPMA)-b-P(LMA) keine nennenswerten zytotoxischen Effekte hervorrufen. Sie eignen sich in dieser Hinsicht also gut für die Anwendung als Wirkstoffträger in der Nanomedizin.

3.6.2 Untersuchung des Aggregationsverhaltens im Blutserum per dynamischer Lichtstreuung

Für die Anwendung als Wirkstofftransporter *in vivo* werden polymerbasierte Nanopartikel in der Regel parenteral eingesetzt, um einen Abbau durch das gastrointestinale System zu vermeiden. Dabei kommen die Partikel in direkten Kontakt mit

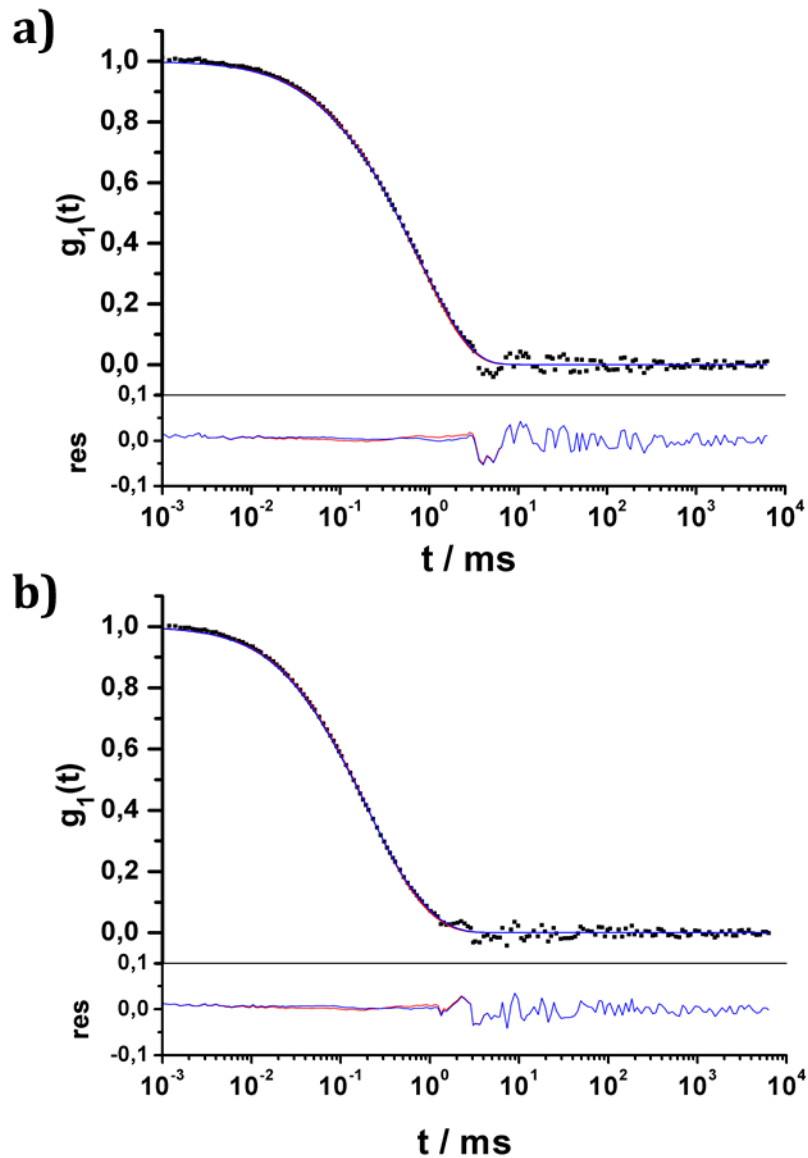


Abb. 63: DLS von Polymervesikeln in humanem Blutserum: Messdaten (schwarz) und ACF-Fit mit (blau) bzw. ohne (rot) Term für Aggregatbildung.

a) P23 (90°),

b) P20 (120°).

Tritt keine Aggregation auf, so können die experimentell erhaltenen Messwerte für die Autokorrelationsfunktion der Partikel im Serum mittels eines *Forced Fit* nach Gleichung (3.13) dargestellt werden. Dabei handelt es sich um die Summe der individuellen Autokorrelationsfunktionen des Serums $g_{1,s}(t)$ und der Vesikel $g_{1,np}(t)$ mit f_s und f_{np} als jeweilige Amplituden. Kommt es jedoch zur Aggregation, kann Gleichung (3.13) die experimentell gefundenen Daten nicht mehr korrekt beschreiben. In diesem Fall muss der Fit zu Gleichung (3.14) erweitert werden. Dabei repräsentiert der dritte Term die gebildeten Aggregate.

Wie Abb. 63 für die untersuchten P(DHPMA)-b-P(LMA)-Polymervesikel bestehend aus **P20** bzw. **P23** zeigt, konnte die Autokorrelationsfunktion der Mischung bestehend aus Blutserum und Vesikeln allerdings akkurat mithilfe der Summe der individuellen Korrelationsfunktionen beschrieben werden. Ein zusätzlicher Aggregat-Term war nicht nötig. Es trat also keine durch Serumkomponenten induzierte Aggregation auf.

3.6.3 Studien zur gezielten Aktivierung dendritischer Zellen und T-Zell-Proliferation

Die Vesikel auf Basis der funktionalisierbaren Aktivester-Polymere sowie der Sarkosin-basierten amphiphilen Polypeptide wurden in Kooperation mit [REDACTED] auf ihre Fähigkeit überprüft, als Wirkstoffträger für die Aktivierung dendritischer Zellen (DCs) zu fungieren. Hierzu wurden knochenmarksabgeleitete dendritische Zellen (engl. *bone marrow-derived dendritic cells*, BMDCs) verwendet. Dendritische Zellen gehören zu den „professionellen“ Zellen des Immunsystems, welche eine Aktivierung von T-Lymphozyten auslösen können. Sie dienen der Erkennung und Präsentation von Antigenen und sind als einzige Zelltypen fähig, durch die Aktivierung von T-Lymphozyten eine primäre Immunantwort zu induzieren.

Zur Untersuchung der Induktion der Reifung von BMDCs wurden die eingesetzten Vesikel mit dem CpG- (Cytosin-Phosphat-Guanin) Oligonukleotid *ODN 1826* beladen. Dieses synthetische Nukleotid hat die Sequenz *5'-tccatgacggttcctgacggt-3'*. CpG-Motive, wie die hier markierte Sequenz *gacggt*, liegen in nicht-methylierter Form im viralen und bakteriellen Genom weitaus häufiger vor, als bei Wirbeltieren. Sie dienen daher der Erkennung von Fremd-DNA mittels des Toll-like-Rezeptors 9 (*TLR9*). Werden durch *TLR9* derartige Sequenzen erkannt, kommt es zur Auslösung einer Immunantwort.

Mittels des verwendeten *ODN 1826* wurde versucht, die Reifung muriner BMDCs zu induzieren. Als Co-Stimulanz für die spätere Aktivierung von T-Zellen durch die gereiften dendritischen Zellen wurde das Ovalbumin-Peptidpitop *SIINFEKL* zusammen mit dem CpG-Oligonukleotid verkapselt. Zur Quantifizierung der Partikelaufnahme wurde außerdem der nicht-membrangängige hydrophile Fluoreszenz-

farbstoff Alexa Fluor 647 zusammen mit den Wirkstoffen in die Vesikel eingeschlossen. Hergestellt wurden die Partikel per Dualer Zentrifugation. Nach dem Quellen von jeweils 2 mg des betreffenden Polymers in 8 μ L einer PBS-Lösung der zu verkapselnden Stoffe (*ODN 1826* 695,7 μ g/mL; *SIINFEKL* 144,8 μ g/mL; Alexa Fluor 647 SE 327,9 μ M/L) wurden die Vesikel mittels Dualer Zentrifugation gemäß Kapitel 3.2.3 hergestellt und per Größenausschlusschromatographie nicht verkapselte Stoffe abgetrennt.

Eingesetzt wurden die Polymere **P19**, **P34** und **PS**. Hierbei wurde für das bioabbaubare Polypept(o)id-basierte Polymer **P34** eine gute Freisetzung nach intrazellulärem Auflösen der Vesikel erwartet. Für das nicht-bioabbaubare und sehr stabile P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Polymer **P19** war aufgrund der sicheren Verkapselung des Wirkstoffes keine relevante Aktivierung der dendritischen Zellen zu erwarten. Dagegen sollte bei **PS** die Aktivierung nach CpG-Freisetzung durch die Hydrolyse des säurelabilen Blockes stärker ausfallen als im Fall von **P19**.

Tabelle 22: Übersicht der für die BMDC-Aktivierung eingesetzten Polymere.

Proben	Polymer	Zusammensetzung
A1/A2	P34	P(Glu(OBn)) ₄₅ - <i>b</i> -P(Sar) ₁₂₅
B1/B2	PS	P(DHPMA) ₂₁ - <i>b</i> -P((LMA) ₁₆ - <i>stat</i> -(DDEMA) ₆)
C1/C2	P19	P(DHPMA) ₂₃ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₁

Zu allen CpG-beladenen Proben (A1/B1/C1) wurden jeweils unter Verwendung von reinem PBS-Puffer wirkstofffreie Negativkontrollen (A2/B2/C2) hergestellt.

Für die Untersuchung der Zellaktivierung wurden die BMDCs für 3 h mit der jeweiligen Partikeldispersion inkubiert und nach weiteren 21 h für die Datenaufnahme geerntet. Der Gehalt an *ODN 1826* in den CpG-haltigen Proben betrug bei allen nachfolgenden Experimenten 100 ng/mL. Zudem wurde eine Reihe von Vergleichsproben mit solublen *ODN 1826* (gelöst in PBS-Puffer) der Konzentrationen 0/25/50/100/250 ng/mL angesetzt. Nach dem Ernten der Zellen und der Markierung mit α -ms CD11c-PECy7 als DC-Marker sowie *CD80/CD86* Oberflächenmar-

kern zur Erkennung der Aktivierung erfolgte die weitere Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie (engl. *Fluorescence-activated Cell Sorting*, FACS).

Die durch die Partikelaufnahme induzierten Effekte bezüglich der Aktivierung der dendritischen Zellen zeigen Abb. 64 (CD80-Aktivierungsmarker) und Abb. 65 (CD86-Aktivierungsmarker). Die Auswertung der Daten ergab im Fall aller drei ODN 1826-freien Vesikelproben wie erwartet eine mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), die im Rahmen der Messgenauigkeit mit der unbehandelten Probe übereinstimmte. Dies galt auch für die CpG-beladene Probe C1 aus dem P(DHPMA)-b-P(LMA) Blockcopolymer **P19** ohne säurelabiles Co-Monomer. Hier war aufgrund der stabilen und wenig permeablen Polymersomenmembran keine von der Negativkontrolle abweichende DC-Aktivierung erwartet worden.

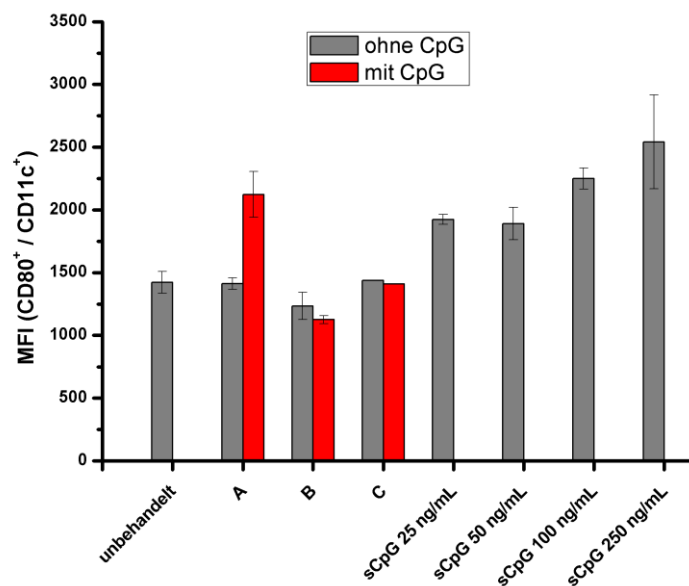


Abb. 64: Quantifizierung der DC-Aktivierung anhand des CD80-Aktivierungsmarkers. Grau: solubles CpG (sCpG) der Konzentrationen 0/25/50/100/250 ng/mL bzw. unbeladene Polymervesikel A2/B2/C2, Rot: CpG-beladene Polymervesikel A1/B1/C1.

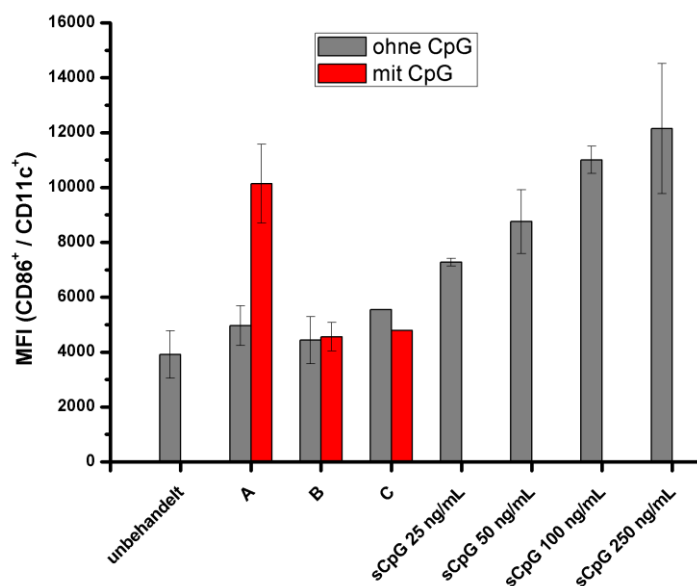


Abb. 65: Quantifizierung der DC-Aktivierung anhand des CD86-Aktivierungsmarkers. Grau: solubles CpG (sCpG) der Konzentrationen 0/25/50/100/250 ng/mL bzw. unbeladene Polymervesikel A2/B2/C2, Rot: CpG-beladene Polymervesikel A1/B1/C1.

Der enthaltene Wirkstoff *ODN 1826* konnte aufgrund der stabilen Verkapselung trotz der Aufnahme ins Innere der Zellen dort nicht freigesetzt werden und so auch keine BMDC-Reifung induzieren.

Im Rahmen der statistischen Abweichung lag allerdings auch die DC-Aktivierung durch CpG-beladene Vesikel des Polymers **PS**. Es konnte kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle mit unbeladenen Vesikeln festgestellt werden. Bei diesem Polymer war das säurelabile Monomer DDEMA in den hydrophoben Block copolymerisiert worden. Die Ergebnisse der DC-Aktivierung lassen jedoch darauf schließen, dass es unter den experimentell gegebenen Bedingungen zu keiner Freisetzung von CpG aus dem Vesikelinneren kam. Die Vesikel konnten also von den BMDCs nach der Partikelaufnahme innerhalb der Inkubationszeit nicht durch die Hydrophilisierung der Membran destabilisiert und dadurch desintegriert werden.

Ein anderes Ergebnis wurde für die Vesikel aus dem bioabbaubaren Polymer $P(\text{Glu}(\text{OBn}))_{45}\text{-}b\text{-}P(\text{Sar})_{125}$ (**P34**) erzielt. Hier lag die für die beladenen Vesikel (Probe A1) bestimmte MFI deutlich höher als im Fall der unbeladenen Vesikel. Sie lag unter Berücksichtigung der statistischen Ungenauigkeit nahezu auf dem Niveau, welches für die Probe von solublen CpG der Konzentration $c = 100 \text{ ng/mL}$

ermittelt worden war. Angesichts der Tatsache, dass die im Fall von A1 eingesetzte Konzentration an CpG beim selben Wert lag, kann von einer nahezu vollständigen Freisetzung des Wirkstoffes ausgegangen werden.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde anhand einer Co-Kultur von BMDCs und T-Zellen von OTI Mäusen die Fähigkeit der aktivierten dendritischen Zellen untersucht, eine T-Zell Proliferation zu induzieren.

Zunächst wurde aus den Überständen der vorangehenden FACS-Analyse der DC-Reifung die Konzentration an Zytokinen bestimmt, welche bei der DC-Reifung nach 24-stündiger Inkubation freigesetzt worden waren.

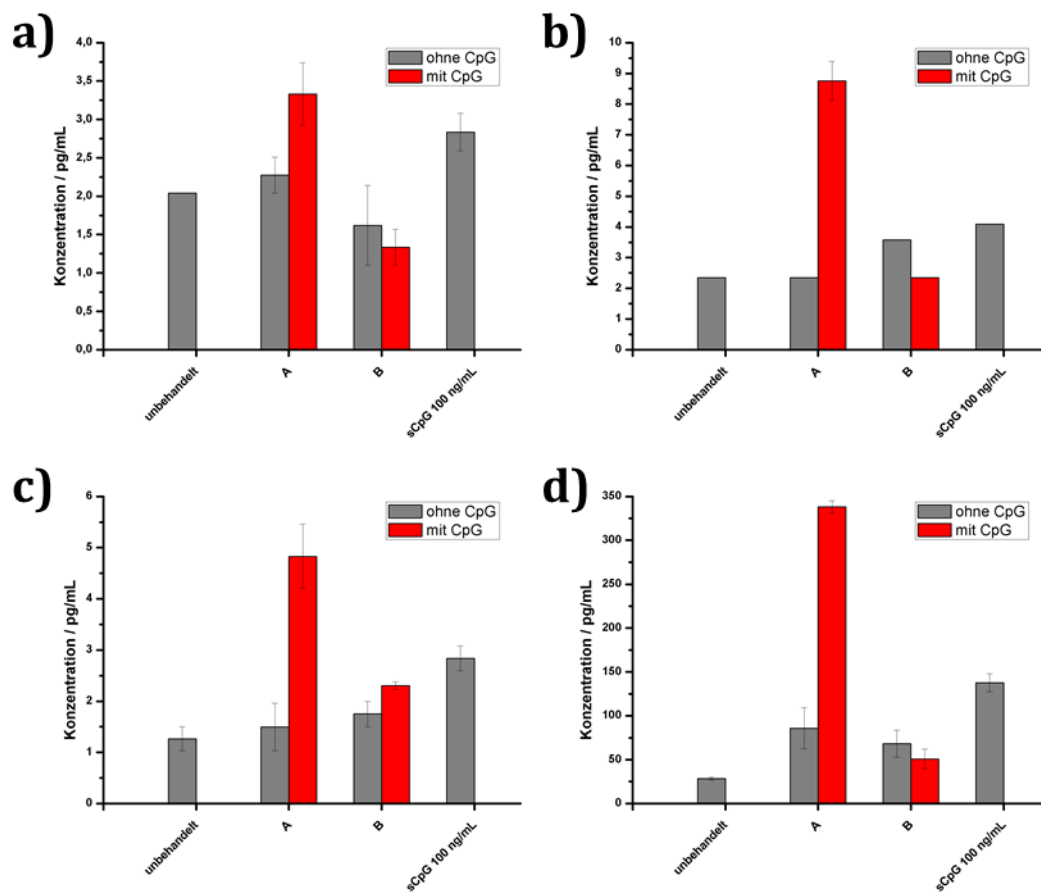


Abb. 66: Bestimmung der Zytokin-Konzentration nach der Inkubation von BMDCs mit CpG/SIINFEKL-beladenen Vesikeln A1/B1 (rot), bzw. der unbeladenen Vesikel A2/B2 sowie die unbehandelte Negativkontrolle und sCpG (100 ng/mL) als Referenz (grau).

- a) IL-1 β ,
- b) IL-10,
- c) IL-12,
- d) TNF- α .

Wie Abb. 66 für die untersuchten Zytokine IL-1 β , IL-10, IL-12 und TNF- α zeigt, korrelierte die Konzentration erwartungsgemäß mit dem zuvor anhand der MFI bestimmten Grad der DC-Aktivierung. Demnach war lediglich bei den CpG/SIINFEKL-beladenen Vesikel aus dem Polymer P(Glu(OBn))₄₅-*b*-P(Sar)₁₂₅ (Probe A1) eine signifikante Erhöhung der Zytokinkonzentration feststellbar.

Zur Überprüfung der T-Zell-Proliferation wurden die mit den Vesikeldispersionen inkubierten BMDCs nach der Abtrennung nicht aufgenommenen Partikel mit verschiedenen Verhältnissen an T-Zellen von 1:5 bis 1:40 versetzt. Nach 72 h wurde der radioaktive Marker ³H-Thymidin zugegeben, welcher in die DNA proliferierender Zellen eingelagert wird. Dessen β -Strahlung kann somit zur Quantifizierung der Proliferations- bzw. Aktivierungsrate genutzt werden. Die erzielten Ergebnisse für A1/A2 sowie die zugehörigen Referenzproben sind in Abb. 67 (P(Glu(OBn))-*b*-P(Sar)-Vesikel) bzw. Abb. 68 (P(DHPMA)-*b*-P(LMA-*stat*-DDEMA)-Vesikel) dargestellt.

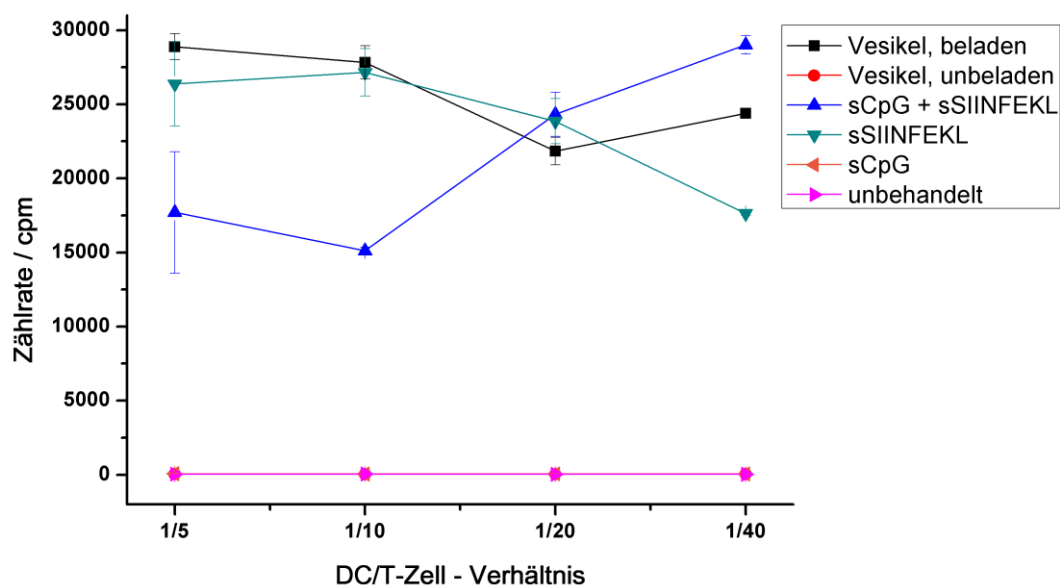


Abb. 67: ³H-Thymidin-Proliferationstest mit Polypeptoid-Vesikeln A1 (beladen) und A2 (unbeladen) sowie solublen Wirkstoffen analoger Konzentration als Kontrolle.

Im Fall der Polypept(o)id-Vesikel zeigte sich eine starke Proliferation, die in der Größenordnung des in identischer Konzentration direkt gelösten SIINFEKL lag. Bei der Verringerung des DC/T-Zell-Verhältnissen war die zu erwartende tendenzielle Abnahme der Zählrate zu erkennen. Dies ist eine direkte Folge der erhöhten Zahl von T-Zellen, die auf eine aktivierte dendritische Zelle kommen. Während das rei-

ne CpG keine Aktivierung zeigte, wies die Kombination beider Wirkstoffe einen nicht erwarteten, uneinheitlichen Verlauf auf. Die Zählrate stieg insgesamt mit fallendem DC/T-Zell-Verhältnis an. Dies könnte die Folge einer zu hohen Proliferation bei geringen Verhältnissen sein, die zum vorzeitigen Zelltod geführt haben könnte. Diese These wird dadurch gestützt, dass dasselbe Problem auch bei der Inkubation mit den Aktivester-basierten Vesikeln auftrat (Abb. 68).

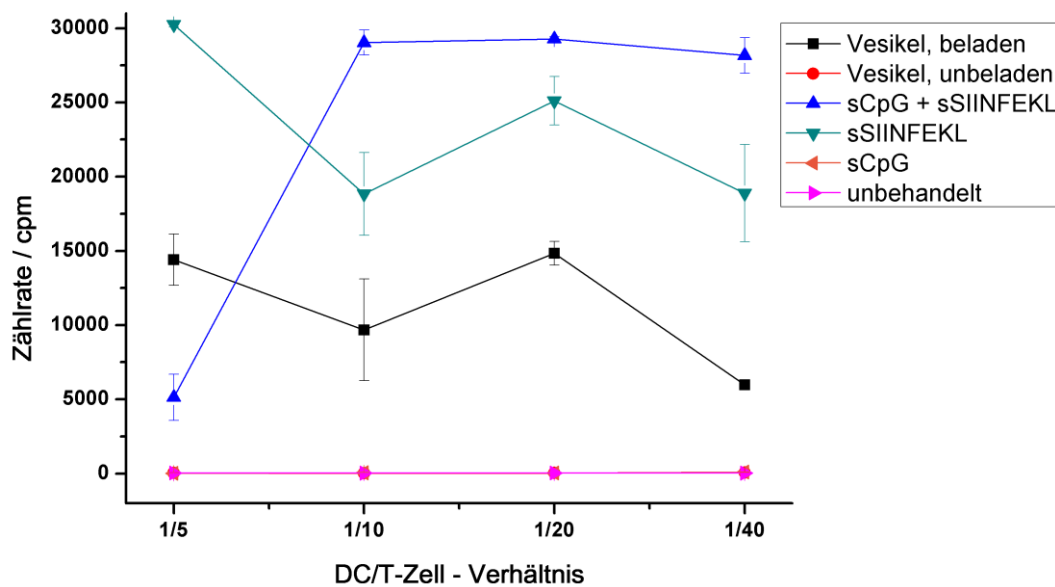


Abb. 68: ^3H -Thymidin-Proliferationstest mit Aktivester-basierten Vesikeln B1 (beladen) und B2 (unbeladen) sowie solublen Wirkstoffen analoger Konzentration als Kontrolle.

Im Unterschied zur direkten Bestimmung der Zytokine konnte im folgenden T-Zell-Proliferationstest ein signifikanter Effekt auf die Zellen festgestellt werden. Die Zählrate lag zwar unter dem jeweils für solubles *SIINFEKL* ermittelten Wert, hob sich aber eingedenk der Größenordnung um 10.000 cpm stark von der unbeladenen Vergleichsprobe und den unbehandelten Zellen ab, bei denen nahezu keine Radioaktivität detektiert werden konnte. Wie bei den Polypept(o)id-Vesikeln war bei steigenden Anteilen an T-Zellen eine tendenziell abnehmende Zählrate zu beobachten. Es konnte in diesem Versuch also eine Proliferation der T-Zellen durch die zuvor mittels der Vesikelprobe B1 aktivierten dendritischen Zellen erzielt werden. Diese Beobachtung steht im scheinbaren Gegensatz zum oben beschriebenen, erfolglosen Versuch, der die Aktivierung der BMDCs durch 24-stündige Inkubation zum Ziel hatte. Im Proliferationsversuch wurden die dendritischen Zellen gleich lang mit den wirkstoffbeladenen Vesikeln inkubiert, sodass die BMDCs zu Beginn des T-Zell-Proliferationsversuchs auch hier nur zu einem sehr geringen Anteil ak-

tiviert gewesen sein dürften. Es konnte jedoch trotzdem eine Proliferation erreicht werden. Dies ist mutmaßlich darauf zurückzuführen, dass die Desintegration der säurelabilen Vesikel durch Hydrolyse erst im zeitlichen Verlauf der dreitägigen Co-Inkubation erfolgte. So konnte nach intrazellulärer Wirkstofffreisetzung eine zeitlich verzögerte Proliferation erreicht werden. Diese Beobachtung ist im Einklang mit der Tatsache, dass die Zählrate etwas stärker unterhalb der Referenzproben lag, als bei den Polypept(o)id-Vesikeln.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass mittels der Polypept(o)id-basierten Vesikel nach 24-stündiger Inkubation durch die Freisetzung von CpG eine gezielte Reifung dendritischer Zellen induziert werden konnte. Die so aktivierten dendritischen Zellen konnten im T-Zell-Proliferationstest eine Zellteilung induzieren, deren Rate nahezu auf dem Niveau der direkt eingesetzten freien Wirkstoffe lag.

Dagegen konnten P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Vesikel der Erwartung entsprechend keine Wirkstoffe freisetzen. Es trat demnach auch keine Aktivierung der BMDCs auf.

Aktivester-basierte Vesikel aus Polymeren, in deren hydrophobe LMA-Domäne das säurelabile Monomer DDEMA copolymerisiert worden war, zeigten zunächst ebenfalls keine Aktivierung der dendritischen Zellen. Bei der folgenden Co-Kultivierung mit T-Zellen konnten diese dennoch zur Proliferation angeregt werden. Als Ursache hierfür ist die zeitlich verzögerte CpG-Freisetzung aus den säurelabilen Vesikeln im Verlauf des mehrtägigen Experiments anzunehmen. Hierdurch wurden die dendritischen Zellen aktiviert und konnten ihrerseits durch Abgabe von Zytokinen die Proliferation der T-Zellen induzieren.

3.6.4 Untersuchung des Einflusses der Mannose-Funktionalisierung auf die Aufnahme in dendritische Zellen

Zum Studium des Einflusses des Mannose-Liganden wurden die mannosylierten Polymere **P29** und **P31** (Kapitel 3.3.1) und ihre jeweiligen nicht-mannosylierten Äquivalente **P30** sowie **P32** bezüglich ihrer Aufnahme durch knochenmarksabgeleitete dendritische Zellen untersucht. BMDCs exprimieren den Mannoserezeptor an ihrer Zelloberfläche. Es sollte daher bei ihrer Inkubation mit Vesikeln aus mannosylierten Polymeren zu einer gesteigerten Clathrin-vermittelten Endozytose über den Mannoserezeptor kommen.

Für die Untersuchung wurden die entsprechenden Vesikel per Phaseninversion hergestellt und zu einer einheitlichen Größe von $R_h = 100$ nm extrudiert, um Größeneffekte auf die Internalisierung auszuschließen. Durchgeführt wurden die Zellexperimente in Kooperation mit [REDACTED].

Die BMDCs wurden aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen differenziert. Sie wurden nach der Gewinnung mit einer Dispersion der jeweiligen Polymervesikel in PBS behandelt und die Zellaufnahme anschließend per Durchflusszytometrie bestimmt.

Zunächst wurde die Aufnahme von Vesikeln aus **P29** mit einem Mannosegehalt von 2,2 % bestimmt und mit dem nicht-mannosylierten **P30** verglichen (Abb. 69). Diese Polymere waren mit Oregon Green 488 als Fluoreszenzmarker versehen. Der Anteil des kovalent angebundenen Farbstoffes betrug in allen Fällen 1 % der DHPMA-Wiederholungseinheiten.

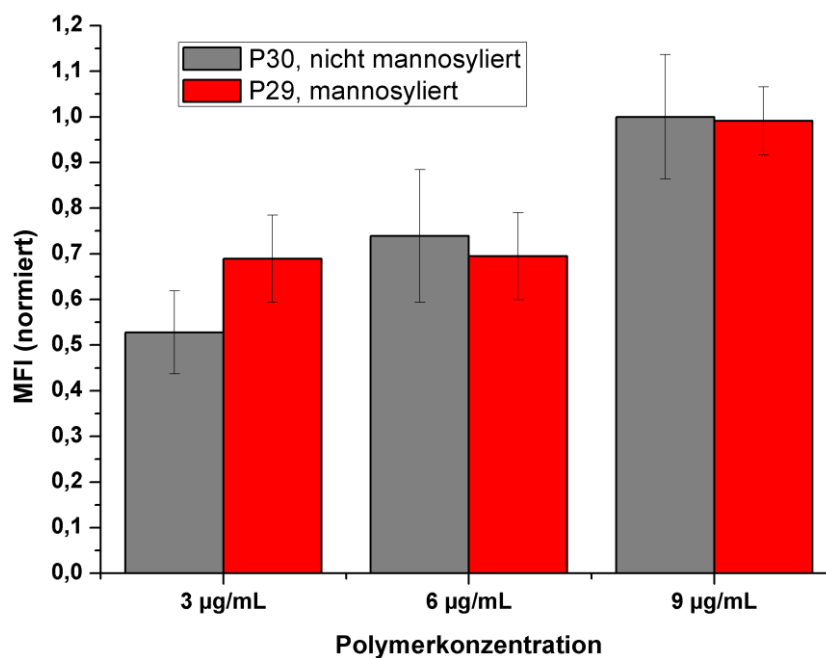


Abb. 69: Vergleich der Aufnahme von mannosylierten (rot, Mannosegehalt 2,2 %) und nicht-mannosylierten (grau) Polymervesikeln in BMDC (Inkubationszeit 24 h, $n = 2$).

Das bei Polymerkonzentrationen von 3, 6 und 9 µg Polymer pro Milliliter Inkubationsvolumen durchgeführte Experiment ergab für keine der drei untersuchten Konzentrationen einen signifikanten Unterschied zwischen mannosylierten und nicht-mannosylierten Vesikeln.

Die Aufnahme der Polymervesikel aus **P31** (Mannosegehalt 4,3 %) und **P32** wurde unter analogen Bedingungen bei einer Polymerkonzentration von 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durchgeführt. Hier ergab sich ein anderes Bild, als im Fall des niedrigeren Mannosylierungsgrades.

Die **P31**-Vesikel wurden im Vergleich zu den entsprechenden nicht-mannosylierten Vesikeln aus **P32** um ein Vielfaches stärker aufgenommen. Die ermittelte mittlere Fluoreszenzintensität betrug knapp das Sechsfache (Abb. 70).

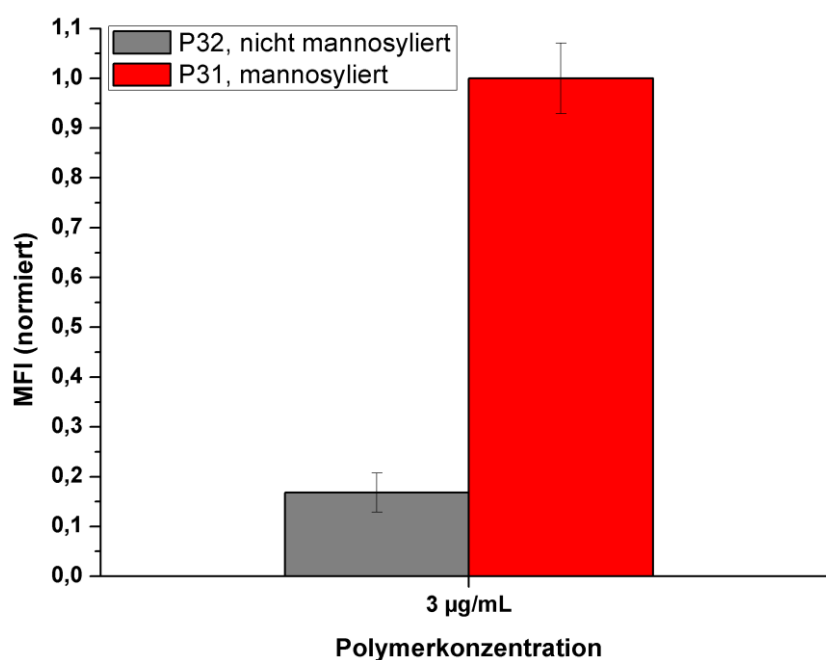


Abb. 70: Vergleich der Aufnahme von mannosylierten (Mannosegehalt 4,3 %, rot) und nicht-mannosylierten (grau) Polymervesikeln in BMDC (Inkubationszeit 24 h, $n = 2$).

Aufgrund der identischen Vesikelgröße und der quasi identischen Kettenlänge der nach außen präsentierten hydrophilen Domänen muss das unterschiedliche Aufnahmeverhalten eine Folge des Mannosylierungsgrades sein. Die Anbindung von Mannose an 2,2 % der Wiederholungseinheiten des Polymers **P29** entsprach einer Anbindung an 3,3 % der Wiederholungseinheiten des hydrophilen Blocks. Dies bedeutet, dass bei der Polymersynthese jeder dreißigste PFP-Ester durch den Mannoselinker substituiert wurde. Dieser Anteil reichte also nicht aus, um eine Mannoserezeptor-vermittelte Aufnahme zu induzieren. Ein großer Teil der Mannose-Substituenten wurde vermutlich sterisch von DHPMA-Wiederholungseinheiten nach außen abgeschirmt und konnte deshalb nicht mit dem Rezeptor wechselwirken. Weil folglich die rezeptorinduzierte Aufnahme eine relativ geringe

Rolle spielte, kam es zu keinem statistisch signifikanten Unterschied in der Zellaufnahme der mannosylierten Vesikel im Vergleich zu den nichtmannosylierten Polymersomen aus dem sonst chemisch identischen **P30**.

Beim Polymer **P31** wurden 4,3 % der gesamten Wiederholungseinheiten durch den Mannoselinker substituiert, was einem Anteil von 8,0 % bezogen auf den hydrophilen Block entspricht. Es trug also knapp jede zwölfte vormalige PFP-Einheit die Zuckerstruktur. Daraus ergibt sich, dass im statistischen Mittel an jede Polymerkette 2,7 Mannoseeinheiten angebunden waren, während das geringer substituierte **P29** nur 1,0 Einheiten aufwies. Folglich war im Fall der **P31**-Vesikel die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass es zur Mannose-Rezeptor-Wechselwirkung und damit zur rezeptorinduzierten Aufnahme kommen konnte. Aus diesem Grund konnte im Vergleich zum nicht-mannosylierten Äquivalent **P32** eine fast sechsfach höhere mittlere Fluoreszenzintensität detektiert werden.

Nach der erfolgreichen Modifizierung der P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Vesikel mit dem Mannoseliganden konnte durch die Funktionalisierung also eine signifikant gesteigerte Aufnahme in Mannoserezeptor-tragende dendritische Zellen als wichtigem Bestandteil des Immunsystems erreicht werden. Niedere Mannosegehalte um einen Substituenten pro Polymerelement reichten dafür allerdings nicht aus. Die mutmaßliche Ursache hierfür war die zu starke sterische Abschirmung eines großen Anteils der betreffenden Liganden durch die übrigen, nicht-funktionalisierten Wiederholungseinheiten des hydrophilen Blocks. Bei der stärkeren Mannosylierung von 2,7 Mannoseeinheiten pro Molekül konnte der gewünschte Effekt dagegen erreicht werden. Ein noch höherer Substitutionsgrad ist mit Hinblick auf die zu starke Beeinflussung der kolloidalen Eigenschaften kritisch zu sehen.

4 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von Vesikeln aus Aktivester-basierten Blockcopolymeren sowie Blockcopolypeptiden und die Untersuchung ihrer grundlegenden Eignung als Wirkstoffträger in der Nanomedizin.

Bezüglich der Aktivester-basierten Vesikel sah der initiale Plan vor, die gute Funktionalisierbarkeit von Pentafluorphenylestern durch die Konversion mit HPA zur Herstellung von Vesikeln aus P(HPMA)-*b*-P(LMA) zu nutzen. Dieser Polymertyp ist als biokompatibles und gut funktionalisierbares System für die Herstellung von Nanopartikeln in der biomedizinischen Anwendung bekannt. Um aus diesem Material Vesikel zu erhalten, wurden die für die Kolloidbildung relevanten Parameter systematisch variiert. Hierbei wurden zunächst *via* RAFT-Polymerisation P(HPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymere variabler Blocklängenverhältnisse und in Serien unterschiedlicher Molekulargewichte synthetisiert. Durch diese Polymere wurde ein breiter Zusammensetzungsbereich jenseits der bisher für die Herstellung von P(HPMA)-*b*-P(LMA) Nanopartikeln eingesetzten hydrophoben Anteile (> 20 %) abgedeckt. Jedoch konnten weder anhand der Variation des hydrophilen Gewichtsanteils noch mittels des Einsatzes verschiedener Filmrehydratisierungs- und Phaseninversionstechniken Polymersome erhalten werden. Als Ursache hierfür wurde die geringe Quellfähigkeit bzw. Hydrophilie der P(HPMA)-Blöcke identifiziert. Sie erlaubte auch bei höheren hydrophilen Gewichtsanteilen keine Vesikelbildung.

Dieses Problem konnte durch die Substitution von HPA gegen 2,3-Dihydroxypropylamin (DHPA) gelöst werden. DHPA bietet durch seine zusätzliche Hydroxylgruppe eine intrinsisch höhere Hydrophilie und verfügt im Vergleich zu HPA über keine sonstigen andersartigen funktionellen Gruppen. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, durch den Einsatz von DHPA die gewünschte Quellfähigkeit zu erzielen und dabei die geringe Toxizität und Immunogenität des ursprünglich verwendeten Materials beizubehalten.

In Analogie zur literaturbekannten Synthese von P(HPMA) über die Konversion des entsprechenden P(PFPMA) Aktivester-Vorläuferpolymers wurden so neuartige

Homo- und Blockcopolymere basierend auf P(DHPMA) hergestellt. Die Untersuchung ihres Löslichkeits- und Aggregationsverhaltens mittels dynamischer und statischer Lichtstreuung bestätigte die höhere Wasserlöslichkeit, quantifiziert durch den zweiten Virialkoeffizienten A_2 . Dieser lag deutlich näher am Wert für Polyethylenglycol, als der literaturbekannte Wert für P(HPMA). Dementsprechend konnten aus P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymeren Vesikel erhalten werden, deren Morphologie mittels cryoTEM und statischer Lichtstreuung bestätigt wurde. Durch die Untersuchung der Kolloidbildung von Polymeren verschiedener Blocklängenverhältnisse konnte der Zusammensetzungsbereich für die Bildung von Polymersomen auf das Intervall $26,9 \% < f < 55,4 \%$ festgelegt werden. Die Membrandicke der untersuchten Vesikel lag zwischen 9,3 nm und 25,5 nm. Sie skalierte mit dem mittleren Molekulargewicht der verwendeten Polymere. Die erhaltenen Vesikel wiesen hydrodynamische Radien der Größenordnung $98 \text{ nm} < R_h < 175 \text{ nm}$ auf und konnten mittels Extrusion durch eine Membran entsprechender Porengröße bis auf $R_h = 50 \text{ nm}$ verkleinert werden. Hierbei konnte auch die Größen dispersität verringert werden.

Erste Beladungsexperimente über Phaseninversionsmethoden ergaben zwar eine erfolgreiche Verkapselung wasserlöslicher Substanzen im Vesikelinneren, bedingt durch das Herstellungsverfahren war die Einschlusseffizienz allerdings sehr gering. Sie lag in Übereinstimmung mit literaturbekannten Beispielen für die Beladung von Vesikeln mit hydrophiler Fracht im niedrigen einstelligen Prozentbereich.

Um die Einschlusseffizienz zu verbessern, wurde erstmals die bisher nur in der Herstellung von Lipidvesikeln angewandte Methode der Dualen Zentrifugation für die Herstellung von Polymersomen eingesetzt. Nach der grundsätzlichen Verifizierung der Vesikelbildung mittels dieser Methode wurde die Beladung von Polymer-vesikeln untersucht. Verglichen mit der Beladung *via* Phaseninversion konnten gut zehnfach höhere Einschlusseffizienzen in einer Größenordnung von $EE = 30\text{-}35 \%$ erreicht werden. Zudem eignet sich diese Methode zur Verkapselung empfindlicher Wirkstoffe, die nicht mit organischen Lösungsmitteln kompatibel sind.

Die Stabilität der Polymervesikel wurde mittels verschiedener Methoden im Vergleich zu Lipidvesikeln aus den niedermolekularen Phosphatidylcholinen DLPC

und DPPC bestimmt. Hierbei wurde zunächst der Widerstand gegen einen osmolaren Gradienten untersucht. Die Polymervesikel zeigten einen signifikant langsameren, osmotisch bedingten Wasserausfluss. Dieser Effekt skalierte mit der Dicke der Polymersomenmembran. Darauf aufbauend wurde mittels Dualer Zentrifugation das Enzym Glucoseoxidase im Inneren der Vesikel eingeschlossen. In einer Multienzymkaskade wurde hierbei die Umsetzung extravesikulärer Glucose quantifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass im Fall der Polymervesikel das Substrat Glucose, welches in der gegebenen Versuchsanordnung nur nach Diffusion über die Membran oxidiert werden konnte, verglichen mit Lipidvesikeln extrem langsam umgesetzt wurde. Neben der stark verringerten Permeabilität konnte anhand dieses Experimentes auch die erfolgreiche Verkapselung hochmolekularer Spezies unter Erhalt ihrer Enzymaktivität sowie die Abtrennung nicht verkapselten Materials demonstriert werden. Beide sind elementar wichtige Aspekte für den Einsatz von Polymersomen als Wirkstoffträger. Darüber hinaus wurde die Stabilität der hergestellten Polymervesikel gegenüber Detergenzien untersucht. Bei gleicher Ausgangskonzentration und -größe wurden DPPC-Vesikel von 50 Äquivalenten des Detergenz Triton X-100 vollständig desintegriert. Die Polymervesikel lösten sich dagegen erst jenseits von 200 Äquivalenten auf.

Für den Einsatz der Polymervesikel als Wirkstoffträger wurden verschiedene Ansätze zur Funktionalisierung demonstriert. So konnten die Vesikel in hoher Effizienz über die polymeranaloge Umsetzung mittels eines Amin-Farbstoffes fluoreszenzmarkiert werden. Auf dem gleichen Weg gelang auch die Anbindung einer Mannosestruktur als Targeting-Ligand. Dies geschah, wie bei der Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffes, durch die Zugabe des entsprechenden Aminderivates während der polymeranalogen Konversion des P(PFPMA)-Aktivester-Präpolymers. Zudem konnte durch die Verwendung eines Azid-funktionalisierten Kettentransferreagenzes eine Azid-Gruppe als Endgruppe eingeführt werden. Mittels dieser Azid-Funktion gelang die kupferfreie Azid-Alkin-„Click“-Anbindung eines Cycloktinfarbstoffes.

Zur Erleichterung der Freisetzung von Wirkstoffen aus dem Vesikelinneren wurde das säurespaltbare Monomer DDEMA entwickelt, welches die stark basischen Bedingungen der polymeranalogen Konversion toleriert. Es konnte durch die Copoly-

merisation mit Laurylmethacrylat als Bestandteil des hydrophoben Block eingebracht werden. Derart funktionalisierte Vesikel konnten unter sauren Bedingungen (pH 4,5) durch die Hydrophilisierung der Membran desintegriert werden.

Versuche zur Rekonstitution des Aquaglyceroporins GlpF in der Membran von P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Vesikeln waren nicht erfolgreich. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit der LMA-Wiederholungseinheiten zu den natürlichen Phosphatidylcholinen konnte kein Einbau des Proteins erreicht werden. Nahezu alle in der Literatur beschriebenen Proteinrekonstitutionen in Polymersomenmembranen wurden unter dem Einsatz von P(DMS) als hydrophobem Block erzielt. Mutmaßlich ist die Insertion in diesem Fall durch die extrem hohe Fluidität des Materials sowie die intrinsische Polarität entlang der Hauptkette begünstigt und bei anderen Polymeren deutlich erschwert.

Für die grundlegende *in vitro* Evaluierung der hergestellten Vesikel wurde zunächst ihre Zytotoxizität untersucht. Das Homopolymer P(DHPMA) zeigte im MTT-Test eine sehr geringe Zytotoxizität, welche dem als nichttoxisch bekannten P(HPMA) ebenbürtig war. Auch die P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymer-Vesikel ließen selbst bei hohen Konzentrationen von 1 mg/mL keinerlei negativen Einfluss auf die verwendete Zelllinie erkennen.

Im nächsten Schritt wurde das Verhalten der Blockcopolymer-Vesikel in menschlichem Blutserum untersucht. Mittels dynamischer Lichtstreuung konnte bestätigt werden, dass es zu keiner Aggregation der Partikel unter Einwirkung adsorbierter Serumsbestandteile kam. Dies ist ein wichtiger Anhaltspunkt für das *in vivo* Verhalten der Partikel und deutet darauf hin, dass es auch hier zu keiner Aggregation verbunden mit einer raschen Eliminierung aus dem Blutkreislauf kommt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die Anbindung des Mannose-Targetingliganden eine verstärkte Aufnahme der Vesikel in dendritische Zellen erreicht werden konnte. Hierzu war ein Substitutionsgrad von rund 2,7 Mannoseeinheiten pro Polymerelement erforderlich. Bei Vesikeln, deren Grundbausteine im Mittel nur 1,0 Einheiten trugen, konnte keine signifikant stärkere Aufnahme im Vergleich zu nicht-mannosylierten Vesikeln beobachtet werden.

Neben den Aktivester-basierten Vesikeln wurde ein weiteres vesikuläres Wirkstoffträgersystem aus dem Polypeptid-*b*-Polypeptoid P(Glu(OBn))-*b*-P(Sar) ent-

wickelt. Diese Polymere wurden bereits von Barz und Mitarbeitern für die Präparation mizellarer Wirkstoffträger verwendet und untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Polymere höheren hydrophoben Anteils synthetisiert, mit denen erstmals auch Vesikel hergestellt werden konnten. Dies gelang mittels Dualer Zentrifugation, was anhand von Lichtstreu-Messungen und cryoTEM-Aufnahmen bestätigt wurde. Die Einschlusseffizienz für hydrophile Wirkstoffe lag, wie auch bei den P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Vesikeln, bei hohen Werten um $EE = 30\%$.

Beide Polymersysteme wurden auf die Aktivierung knochenmarksabgeleiteter dendritischer Zellen und der hierdurch induzierten Proliferation von T-Zellen untersucht. Hierzu wurden die entsprechenden Polymersome mit dem Oligonukleotid *ODN 1826* sowie dem Ovalbumin-Peptidepitop SIINFEKL beladen. Die bioabbaubaren Polypept(o)id-Vesikel konnten nach 24-stündiger Inkubation durch die Freisetzung der Wirkstoffe eine gezielte Reifung dendritischer Zellen induzieren. Die so aktivierten dendritischen Zellen konnten im T-Zell-Proliferationstest eine Zellteilung induzieren, deren Rate nahezu auf dem Niveau der direkt eingesetzten freien Wirkstoffe lag.

Bei wirkstoffbeladenen P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Vesikeln traten erwartungsgemäß keine Wirkstofffreisetzung und die damit verbundene DC-Aktivierung auf. Wurde der hydrophobe Block der Polymere mit dem säurelabilen Monomer DDEMA modifiziert, konnte zunächst ebenfalls keine Aktivierung der dendritischen Zellen bzw. eine Freisetzung von Zytokinen festgestellt werden. Dennoch konnte bei der folgenden mehrtägigen Co-Kultivierung mit T-Zellen ein signifikanter Effekt auf deren Teilungsrate festgestellt werden. Diese Steigerung der Proliferation ist mutmaßlich auf die zeitverzögerte Wirkstofffreisetzung nach Hydrolyse der säurelabilen Wiederholungseinheiten und die dadurch verursachte Desintegration der Vesikel zurückzuführen. In der Folge konnte es zur Aktivierung der dendritischen Zellen und schließlich zur Proliferation der T-Zellen kommen.

Insgesamt konnte das grundlegende Potential der Aktivester-basierten P(DHPMA) Blockcopolymere wie auch der Polypeptid-*b*-Polypeptoid Copolymere zur Herstellung von Vesikeln für den Transport hydrophiler Wirkstoffe aufgezeigt werden. Bei beiden handelt es sich um gut funktionalisierbare Polymersysteme, die hydrophile Substanzen in guter Effizienz im Vesikelinneren verkapseln können und sich an-

hand der hier präsentierten Ergebnisse bzw. anhand vorheriger Studien als biokompatibel und nicht immunogen erwiesen haben. In beiden Fällen konnte zudem der erfolgreiche Einsatz als Wirkstoffträger im Zellversuch demonstriert werden.

Weiterführende Untersuchungen haben die Charakterisierung des *in vivo*-Verhaltens der Vesikel zum Ziel und die weitere Optimierung der kontrollierten Wirkstofffreisetzung inklusive detaillierter kinetischer Studien.

5 Experimenteller Teil

5.1 Verbrauchsmaterialien und Allgemeines

Tabelle 23: Übersicht der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Abkürzung	Anbieter	Reinheitsgrad / Gehalt
Aceton	-	Sigma Aldrich	p.a.
Agarose	-	Sigma Aldrich	low EEO
Alexa Fluor 647 NHS-Ester	AF647	Invitrogen	-
Alkyne MegaStokes Dye 608	-	Sigma Aldrich	-
1-Amino-11-azido-3,6,9-trioxaundekan	-	Sigma Aldrich	90 %
Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) Diammoniumsalz	-	Sigma Aldrich	HPLC grade
4,4'-Azo-bis(4-cyanovaleriansäure)	ACVA		98 %
2,2'-Azo-bis(isobutyronitril)	AIBN	Fluka	98 %
2,2'-Azo-bis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril)	AMDVN	Acros Organics	98 %
Borsäure	-	Acros Organics	99,5 %
Benzol	-	Sigma Aldrich	p.a.
Chloroform	CHCl ₃	Sigma Aldrich	p.a.
Chloroform-d ₁	CDCl ₃	Deutero	-
Chlorwasserstoffsäure	HCl	Fisher Scientific	37 %
Cyclohexan	-	Sigma Aldrich	99 %
Dialysemembran Spectra/Por 3; MWCO 3500 g/mol	-	Spectrumlabs	-
Dichlormethan	DCM	Sigma Aldrich	99,4 %
Diethylether	Et ₂ O	Sigma Aldrich	99,9 %
2,3-Dihydroxypropylamin	DHPA	Sigma Aldrich	98 %
Dimethylformamid	DMF	Acros Organics	99,8 %
Dimethylsulfoxid	DMSO	Acros Organics	99,7 %
Dimethylsulfoxid-d ₆	DMSO-d ₆	Deutero	-
1,4-Dioxan	-	Fisher Scientific	99,9 %
Dilauroyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	DLPC	Sigma Aldrich	99 %+
Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin	DPPC	Sigma Aldrich	99 %+
Essigsäuredimethylamid	DMAc	Sigma Aldrich	99 %
Essigsäureethylester	EtOAc	Sigma Aldrich	99,5 %
Ethanol	EtOH	Sigma Aldrich	99,5 %
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid	EDC·HCl	Alfa Aesar	98 %
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz	EDTA	Acros Organics	99 %+

(Fortsetzung)

Chemikalie	Abkürzung	Anbieter	Reinheitsgrad / Gehalt
GelRed™	-	VWR	10.000x
D-(+)-Glucose	-	Sigma Aldrich	99,5 %
Glucoseoxidase aus <i>Aspergillus niger</i>	GOx	Sigma Aldrich	ca. 200 U/mg
Hexafluorisopropanol	HFIP	Carbolution	-
4-(2-Hydroxyethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan	-	Sigma Aldrich	95 %
<i>n</i> -Hexan	-	Fisher Scientific	95 %
1-Hydroxybenzotriazol Hydrat	HOBT·H ₂ O	Acros Organics	98 %
2-Hydroxypropylamin	HPA	Acros Organics	94 %
Iod	I ₂	Fluka	-
Kaliumiodid	KI	Sigma Aldrich	-
Kieselgel, Partikelgröße 35-70 µm	-	Acros Organics	-
Laurylmethacrylat	LMA	Sigma Aldrich	96 %
Magnesiumsulfat	MgSO ₄	Acros Organics	99 %
Meerrettichperoxidase	HRP	Carl Roth	-
Methacryloylchlorid	-	Sigma Aldrich	-
Methanol	MeOH	Sigma Aldrich	99,9 %
Methanol-d ₄	MeOH-d ₄	Deutero	-
Methyl-2-pyrrolidon	NMP	Acros Organics	99 %+
Natriumchlorid	NaCl	VWR	-
Natriumdodecylsulfat	SDS	Alfa Aesar	99 %
Octyl-β-D-glucopyranosid	OG	Carl Roth	99 %+
Oregon Green 488 Cadaverin	OG488	Invitrogen	-
Pentafluorphenol	PFP	Apollo Scientific	99 %
Phenylmagnesiumchlorid	-	Acros Organics	0,8 M (THF)
Phosphatgepufferte Salzlösung, steril	PBS	Fisher Scientific	-
Pyren	-	Acros Organics	96 %
Ribitol	-	Sigma Aldrich	BioReagent
Schwefelkohlenstoff	CS ₂	Sigma Aldrich	99 %
Sephadex CL-2B	-	Sigma Aldrich	-
Sephadex CL-4B	-	Sigma Aldrich	-
siRNA, scrambled sequence, M = 14.035 g/mol	-	IBA Lifesciences	-
Sulforhodamin B Natriumsalz	-	Sigma Aldrich	BioReagent
Tetrahydrofuran	THF	Sigma Aldrich	99,9 %
4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenylpolyethylenglycol	Triton X-100	Sigma Aldrich	97 %
Thioharnstoff	-	Acros Organics	99 %+
Triethylamin	NEt ₃	Sigma Aldrich	-
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	TRIS	Acros Organics	96 %

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden, sofern nicht anders beschrieben, ohne weitere Aufreinigung eingesetzt.

Benzol, Cyclohexan, 1,4-Dioxan, Essigsäureethylester, HFIP, THF und Triethylamin wurden vor Gebrauch nach Standardverfahren getrocknet und destilliert.

Laurylmethacrylat wurde vor der Verwendung durch Vakuumdestillation (86 °C, 2×10^{-3} mbar) vom enthaltenen Stabilisator befreit.

Die Radikal-Initiatoren ACVA, AIBN und AMDVN wurden vor dem Gebrauch aus Diethylether oder Methanol umkristallisiert.

Sephadex CL-2B/4B wurde in 20% Ethanol gelagert und vor der Anwendung mit PBS-Puffer gespült.

Für die dünn-schichtchromatographische Analyse der Reaktionsansätze wurden Silica-beschichtete Aluminiumplatten der Firma Merck verwendet (*Silica Gel 60 F₂₅₄*). Die Detektion erfolgte unter Zuhilfenahme einer UV-Lampe ($\lambda_{em} = 303/254$ nm) sowie Seebach- und Permanganat-Tauchreagenzien. Zur Entwicklung wurden die Chromatogramme kurz in das jeweilige Reagenz eingetaucht und nach dem Entfernen von überschüssigem Reagenz mittels eines Heißluftgebläses vorsichtig erwärmt.

Zur Dialyse wurden die verwendeten Membranschläuche durch 15-minütiges Quellen in MilliQ-Wasser konditioniert. Die Dialyse erfolgte, sofern nicht anders angegeben, gegen das 150-fache Volumen an MilliQ-Wasser unter dreimal täglichem Wechsel des Mediums. Dabei wurde das Medium während der Dialyse mittels eines Magnetrührers durchmischt.

Reinstwasser wurde aus einer Wasseraufbereitungsanlage des Typs *MilliQ Reference A+* (Merck) entnommen.

Die für die Kolloidbildung verwendeten Glasgeräte wurden vor Verwendung durch 12-stündiges Einlegen in *NOCHROMIX* Reinigungslösung (*Godax Laboratories*), anschließendes Spülen mit MilliQ-Wasser und Trocknen im Ofen gesäubert.

Das durch Transfektion von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit pRSET-His-GlpF Plasmiden erhaltene GlpF wurde von [REDACTED] zur Verfügung gestellt.

Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen:**Dialysepuffer für Proteinrekonstitution**

150 mM *N*-Methylglucamin

50 mM 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)

50 mM NaCl

pH 7,5

SDS-PAGE Trenngelpuffer

1,5 M TRIS-HCl

0,4 % (w/v) SDS

pH 8,8

SDS-PAGE Sammelgelpuffer

0,5 M TRIS-HCl

0,4 % (w/v) SDS

pH 6,8

PBS-Puffer (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, ThermoFisher*)

2,67 mM KCl

1,47 mM KH₂PO₄

137,93 mM NaCl

8,06 mM Na₂HPO₄ · 7 H₂O

TBE-Puffer

89 mM TRIS

89 mM Borsäure

2 mM EDTA Dinatriumsalz

5x SDS-Probenpuffer

250 mM TRIS-HCl

10 % (w/v) SDS

50 % (v/v) Glycerin

0,2 % (w/v) Bromphenolblau

pH 6,8

Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Messungen wurden mittels eines *FACS Canto II* Durchflusszytometers (*BD Bioscience*) durchgeführt. Zur Auswertung dienten die Softwareprogramme *BD FACS Diva* (*BD Bioscience*) und *FlowJo* (*FLOWJO*).

Extrusion

Zur nachträglichen Beeinflussung der Vesikelgröße und -größenverteilung wurden die Vesikel nach der Herstellung durch eine Polycarbonatmembran mit gewünschter Porengröße extrudiert. Hierzu wurde der *Mini-Extruder* (*Avanti Polar Lipids*) mit *Whatman Nuclepore Track-Etched Membranes* der Porengrößen 400/200/100 nm samt *Filter Supports* (*Avanti Polar Lipids*) verwendet. Die Dispersion wurde 21x durch die Membran extrudiert, um eine möglichst große Homogenität zu erreichen und eventuell vorhandene Präzipitate in der Ausgangsspritze zurückzulassen.

Fluoreszenzspektrometrie

Fluoreszenzemissionsspektren wurden mittels eines *Varian Cary Eclipse* Spektrometers (*Agilent Technologies*) aufgenommen. Hierzu wurde eine Fluoreszenzküvette der Schichtdicke 10x10 mm (*Hellma Analytics*) verwendet.

Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde die Elektrophoresekammer *Midi* samt zugehörigem Gießstand (*Plano*) verwendet. Zur Herstellung der Gele wurden 160 mL TBE-Puffer mit 1 % Agarose bis zum vollständigen Auflösen aufgekocht, nach kurzem Abkühlen 32 μ L GelRed zugegeben und das Gel für 4 h bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Auftragung der Proben erfolgte zusammen mit 1/5 Volumenanteil 40 % Glycerinlösung. Durchgeführt wurde die Elektrophorese bei $U = 120$ V für 30 min, sofern nicht anders angegeben. Die Detektion und Dokumentation erfolgte unter UV-Licht ($\lambda = 365$ nm) mittels einer *EXview HAD CCD* Kamera (*Intas*).

Für die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Poly(acrylamid)-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli²⁴⁶ wurden Acrylamidanteile von 6 % im Sammelgel und 10 % im Trenngel verwendet. Die Gele wurden unter Verwendung einer *Mini-Protean 3 Casting*-Kammer (*BioRad*) gegossen. Zunächst wurde das Trenngel

gegossen und mit verdünntem Isopropanol (1:3 v/v) überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, das Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet und die Kämme für die Geltaschen positioniert und das Sammelgel anschließend polymerisiert.

Für die SDS-Page wurden die Proben mit 5x konzentriertem SDS-Puffer für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Elektrophorese wurde bis zum Erreichen des Trenngels bei einer Gleichspannung von $U = 100 \text{ V}$ durchgeführt, bevor die Spannung auf $U = 200 \text{ V}$ erhöht wurde. Als Molmassenstandard wurde *PageRuler Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific)* verwendet. Die Färbung erfolgte durch 30-minütige Inkubation mit Coomassie-Brilliant-Blau.

Gelpermeationschromatographie

Die Größenbestimmung der PFPMA-basierten Polymere erfolgte mit einer GPC-Anlage der Firma *Jasco*. Sie bestand aus einer HPLC Pumpe vom Typ *PU 1850*, einem Probengeber *AS 1555* und den Detektoren *UV 1575* (UV-Detektion, $\lambda = 254 \text{ nm}$) und *RI 1530* (Brechungsindex-Detektion). Die Gelpermeationssäule (*MZ-Analysentechnik*) war mit quervernetzten Styrol-Divinylbenzol Copolymeren der Porengröße 10^2 , 10^4 und 10^6 \AA befüllt. Zur Kalibrierung wurden Polystyrolstandards der Firma *PSS Polymer Standards Service* (Mainz) verwendet. Als Laufmittel wurde Tetrahydrofuran (Reinheitsgrad p.a.) von *Sigma Aldrich* verwendet. Die Probenkonzentration betrug 2 mg/mL . Als interner Standard wurde den Proben Toluol (*Acros Organics*) zu einem Anteil von ca. 0,2 % zugegeben. Die Flussrate betrug 1 mL/min .

Für die Peptoid-basierten Blockcopolymere wurde eine zweite GPC-Anlage der Firma *Jasco* verwendet. Sie bestand aus einer HPLC Pumpe vom Typ *PU 2080+*, einem Probengeber *AS 1555* und den Detektoren *UV 2075+* (UV-Detektion, $\lambda = 254 \text{ nm}$) und *RI 2080+* (Brechungsindex-Detektion). Die Gelpermeationssäule (*MZ-Analysentechnik*) war mit modifiziertem Kieselgel (PFG) der Porengröße 10^2 und 10^3 \AA befüllt. Die Partikelgröße betrug 7 \mu m . Zur Kalibrierung wurden PMMA-Standards der Firma *PSS Polymer Standards Service* (Mainz) verwendet. Als Laufmittel wurde Hexafluorisopropanol mit einem Zusatz von 3 g/L Kaliumtrifluorsäure verwendet. Die Probenkonzentration betrug 2 mg/mL . Als interner Standard wurde den Proben Toluol (*Acros Organics*) zu einem Anteil von ca. 0,2 % zu-

gegeben. Die Anlage wurde auf $T = 40\text{ °C}$ temperiert und die Flussrate betrug $0,8\text{ mL/min}$.

Infrarotspektroskopie

Die Messung von Infrarotspektren wurde mit einem ATR-FT-IR-Spektrometer *Spectrum 100 FT-IR (Perkin Elmer)* durchgeführt. Es wurden jeweils ca. $0,5\text{ mg}$ der Probe direkt auf den Messkristall aufgetragen

Kernresonanzspektroskopie

Zur Aufnahme von Kernresonanz-Spektren wurden die beiden Geräte *Avance III HD 300* ($300\text{ MHz }^1\text{H-NMR}$) und *Avance II 400* ($400\text{ MHz }^1\text{H-NMR}$; $100\text{ MHz }^{13}\text{C-NMR}$; $377\text{ MHz }^{19}\text{F-NMR}$) der Firma *Bruker* verwendet. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen δ wurden in ppm relativ zum Standard Tetramethylsilan angegeben. Die Spektrenauswertung erfolgte mittels der Software *MestReNova 9.0.0*.

LAL-Tests zur Untersuchung auf Endotoxine

Vor weiterführenden Zellversuchen wurden die hergestellten Vesikelproben auf Verunreinigungen durch bakterielle Endotoxine getestet. Untersucht wurden die Proben mittels des Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Tests. Hierzu wurde das *Pierce LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit (ThermoFisher Scientific)* verwendet und die Tests protokollgemäß durchgeführt.

Dabei wurden die Proben zusammen mit LAL und dem chromogenen Substrat Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA inkubiert. Bei der Anwesenheit von Endotoxine aktivieren diese den LAL-Faktor C, welcher aus dem aus dem peptidischen Substrat das Chromophor *p*-Nitroanilin (pNA) freisetzt. Unter Verwendung von Endotoxin-Standards zur Erstellung einer Kalibrationskurve konnte so der Gehalt an Endotoxin in der jeweiligen Probe bestimmt werden.

Die untersuchten Proben zeigten durchgängig keine Anwesenheit von Endotoxinen, was dafür spricht, dass es während der Vesikelpräparation mittels dualer Zentrifugation und der nachfolgenden Aufarbeitung zu keiner Kontamination der Proben kam.

Lichtstreuung

Zur Durchführung von Lichtstreuexperimenten wurden die Proben in einer staubfreien Flow Box mittels *Millex LCR/GHP* Filtern der Porengrößen 0,45/0,20 μm in die zuvor mit destilliertem Aceton staubfrei gespülten zylindrischen Messküvetten (*Suprasil 20 mm, Hellma, Mühlheim*) filtriert.

DLS-Messungen wurden unter Verwendung eines *Uniphase* He/Ne Lasers ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$, 25 mW), eines *ALV-SP125* Goniometers, einer *ALV/High QE APD* Avalanche Photodiode mit fiberoptischer Detektion, einem *ALV 5000/E/PCI* Korrelator und einem *Lauda RC-6* Thermostat bei 20 °C durchgeführt. Die winkelabhängigen Messungen wurden im Bereich von 30°-150° in Schritten von jeweils 15° durchgeführt. Die experimentell erhaltenen Intensitätskorrelationsfunktionen wurden mittels der Siegert-Relation in eine Amplitudenkorrelationsfunktionen überführt, um negative Werte nach der Basislinienkorrektur mit einzuschließen. Die Amplitudenkorrelationsfunktionen wurden zu

$$g_1(t) = \text{SIGN}(G_2(t)) \cdot \text{SQRT}(\text{ABS}(G_2(t) - A) / A)$$

erhalten, wobei A die gemessene Basislinie darstellt und $G_2(t)$ die experimentell erhaltene Intensitätskorrelationsfunktion.

Die Feldkorrelationsfunktionen wurden anhand der Summe zweier Exponentialfunktionen

$$g_1(t) = a \cdot \exp(-t/b) + c \cdot \exp(-t/d)$$

gefittet, um der Polydispersität der Proben Rechnung zu tragen. Die mittleren apparenten Diffusionskoeffizienten D_{app} wurden nach

$$q^2 \cdot D_{\text{app}} = (a \cdot b^{-1} + c \cdot d^{-1}) / (a + c)$$

ermittelt, woraus die entsprechenden winkelabhängigen Diffusionskoeffizienten bzw. reziproken hydrodynamischen Radii $\langle 1/R_h \rangle_{\text{app}}$ erhalten wurden. Die zugemittelten hydrodynamischen Radii R_h wurden aus der Extrapolation der winkelabhängigen $\langle 1/R_h \rangle_{\text{app}}$ zu $q = 0$ erhalten. Der normalisierte zweite Cumulant μ_2 wurde mittels eines Cumulanten-Fits bei 90° berechnet.

Statische Lichtstremessungen wurden mittels eines *Uniphase* He/Ne Lasers ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$, 25 mW), eines *ALV-SP86* Goniometers, eines *ALV-3000* Korrelators

und einer ALV/High QE APD Avalanche Photodiode mit fiberoptischer Detektion durchgeführt.

Die winkelhängigen reziproken statistischen Streuintensitäten wurden entweder nach dem Zimm- oder Berry-Verfahren ausgewertet. Das Verfahren nach Berry wurde angewandt, um der größenbedingten Aufwärtskrümmung aufgrund von nichtlinearer Abweichungen des reziproken Formfaktors in Kombination mit der intrinsischen moderaten Dispersität der Proben Rechnung zu tragen. Beide Verfahren lieferten den z-gemittelten mittleren Trägheitsradius, $R_g = \sqrt{\langle R_g^2 \rangle_z}$.

Lyophilisation

Die durch polymeranaloge Umsetzung erhaltenen amphiphilen Blockcopolymere wurden nach der Aufreinigung durch Dialyse lyophilisiert. Dazu wurde die jeweilige Dispersion in MilliQ-Wasser in Aliquote von nicht mehr als 20 mL aufgeteilt, in $N_{2,1}$ eingefroren und an einer *VirTis Benchtop Pro (SP Scientific)* Gefriertrocknungsanlage für 3 d lyophilisiert.

MTT-Tests

MTT-Tests wurden mittels des *CellTiter96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTT) Kits (Promega)* nach der Vorgabe des Herstellers durchgeführt.

Dazu wurden die Zellen in den Vertiefungen einer 96-well Kulturplatte ausgesät (12.500 Zellen/well) und mit der betreffenden Menge an Polymer, gelöst in 10 μ L sterilem PBS-Puffer und einem Gesamtvolumen von 100 μ L für 24 h bei 37 °C inkubiert. Der Test wurde in Hexaplikaten für jede Probe durchgeführt. Am Folgetag wurden 30 μ L der MTT-Substratlösung zu jedem Ansatz hinzugegeben und die Zellen für weitere 4 h inkubiert. Danach wurden jeweils 100 μ L des Solubilisierungs-/Stopp-Gemisches zugegeben. Nach 1 h wurde die Absorption bei $\lambda = 570$ nm gemessen.

pH-Wert-Bestimmung

pH-Werte wurden mittels des pH-Meters *S230 SevenCompact (Mettler Toledo)* bestimmt. Das pH-Meter wurde vor Verwendung mittels einer Dreipunkt-Kalibrierung (pH 3,0/8,0/11,0) geeicht.

Stopped-Flow-UV/Vis-Spektrometrie

Zur Durchführung der Stopped-Flow-Spektrometrieexperimente wurde das Spektrometer *SX-18.MV* (*Applied Photophysics*) verwendet. Die Totzeit des verwendeten Systems lag bei 1,0 ms.

Ultraschall-Sonotrode

Die Ultraschall-vermittelten Dispersionsversuche wurden mittels einer *Sonopuls mini20* Sonotrode (*Bandelin*) unter Verwendung einer Titan-Mikrospitze *MS 1.5* bei einer Amplitude von 90 % durchgeführt.

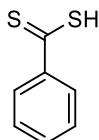
UV/Vis-Spektrometrie

UV/Vis Spektren und Absorptions-/Transmissionswerte wurden mittels eines Spektrometers Typ *V-630* (*Jasco*) erhalten. Verwendet wurden Quarzglasküvetten (*Hellma Analytics*) mit einer Schichtdicke der durchstrahlten Lösung von $d = 10$ mm. Das Spektrometer wurde mittels eines *Jasco ETC-717* Peltier Elementes auf $T = 20$ °C temperiert. Die Auswertung erfolgte mittels der Software *Spectra Manager 2.04*.

5.3 Synthese von Kettentransferreagenzien und Monomeren

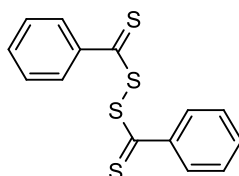
5.3.1 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)sulfanyl)pentansäure (CTA1)

5.3.1.1 Dithiobenzoessäure



Im 250 mL Zweihalskolben mit Magnetrührer wurden unter Inertgasatmosphäre 56,25 mL einer 0,8 M Phenylmagnesiumchlorid-Lösung in THF (45,0 mmol) mit weiteren 40 mL wasserfreiem THF versetzt. Durch ein Septum wurden 2,72 mL Schwefelkohlenstoff (45,0 mmol; 1,0 eq.) so langsam zur Grignard-Lösung hinzugegossen, dass diese nur schwach siedete. Nach vollständiger Zugabe wurde eine weitere Stunde gerührt und der Kolbeninhalt dann auf 30 g Eis geschüttet. Nach Ansäuern mit $\text{HCl}_{\text{conc.}}$ auf pH 1 wurde 3x mit je 40 mL Diethylether extrahiert. Die Extrakte werden vereinigt und im Vakuum eingengt. Die erhaltene rot-violette, viskose Lösung wurde direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

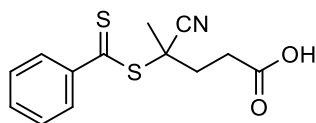
5.3.1.2 Dithiobenzoyldisulfit



Am Vortag der Umsetzung wurden 3,36 g KI (21,0 mmol) und 5,14 g I_2 (21,0 mmol) durch Rühren über Nacht in 175 mL Wasser gelöst. Die Lösung wurde auf Folgetag mit dem Rohprodukt aus der Vorstufe sowie 90 mL Diethylether versetzt. Das Gemisch wurde so lange im Scheidetrichter geschüttelt, bis die wässrige Phase nur noch leicht gelblich war. Diese wurde anschließend abgetrennt und die organische Phase mit 3x 80 mL Wasser gewaschen und anschließend über MgSO_4 getrocknet. Nach Einengen im Vakuum wurde die erhaltene zähflüssige Masse mit einem Gemisch aus 50 mL Acetonitril und 50 mL Wasser gewaschen. Hierbei wurde ein violetter Feststoff erhalten, der über dem Büchnertrichter abgesaugt und anschließend im Vakuum getrocknet wurde.

Ausbeute: m = 12,85 g (41,9 mmol; 93,1 % d. Th.).

5.3.1.3 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)sulfanyl)pentansäure



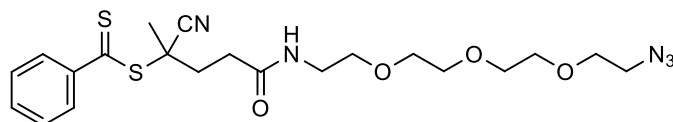
Das Rohprodukt der Vorstufe wurde im 250 mL Schlenkkolben in 150 mL Ethylacetat gelöst und mit 18,81 g ACVA (67,1 mmol; 1,6 eq.) versetzt. Der Kolbeninhalt wurde in N₂ eingefroren und drei Freeze-Pump-Thaw-Cyclen unterworfen. Nach dem dritten Auftauvorgang wurde im N₂-Gegenstrom ein Rückflusskühler montiert und die Mischung unter Inertgasatmosphäre für 12 h zum Sieden erhitzt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das rotviolette Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Laufmittel: CHCl₃/ EtOH, 20:1 v/v). Das Endprodukt wurde als rot-violetter, amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: m = 6,67 g (23,8 mmol; 56,8 % d. Th.).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7,92 (d, 8,4 Hz, 2H, *o*-ArH); 7,57 (t, 7,4 Hz, 1H, *p*-ArH); 7,40 (t, 7,7 Hz, 2H, *m*-ArH); 2,82-2,41 (m, 4H, -CH₂-CH₂-); 1,95 (s, 3H, -CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 222,28 (-CSS); 177,30 (-COOH); 144,61 (CSS-ArC); 133,24 (*p*-ArC); 128,73 (*m*-ArC); 126,82 (*o*-ArC); 118,52 (-CN); 45,73 (-C-CH₃); 33,14 (-CH₂-COOH); 29,68 (-CH₂-CH₂-COOH); 24,32 (-CH₃).

5.3.2 1-Azido-16-cyano-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecan-16-yl-benzodithioat (CTA2)



Das Edukt **CTA1** (m = 0,50 g; 1,79 mmol) wurde unter N₂-Atmosphäre in wasserfreiem Dichlormethan (V = 20 mL) gelöst und der Kolben auf 0 °C abgekühlt. Dann wurden 0,54 g Triethylamin (5,37 mmol; 3,0 eq.) und 1,03 g EDC·HCl (5,37 mmol; 3,0 eq.), gelöst in weiteren 10 mL Dichlormethan, zugegeben. Nach 15-minütigem

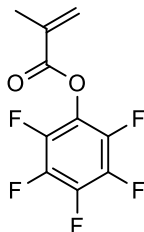
Rühren wurden 0,73 g HOBt·H₂O (5,37 mmol; 3,0 eq.) zugegeben, nach weiteren 15 min dann 0,39 g (1,79 mmol; 1,0 eq.) 1-Amino-11-azido-3,6,9-trioxaundekan. Der Kolbeninhalt wurde bei Raumtemperatur für 15 h gerührt und das Reaktionsgemisch anschließend mit 3x15 mL 5% Citronensäurelösung ausgeschüttelt. Anschließend wurde die organische Phase mit 3x20 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung ausgeschüttelt und danach durch dreimaliges Ausschütteln mit je 20 mL konzentrierter NaCl-Lösung und Rühren über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Einengen im Vakuum wurde das Rohprodukt per Kieselgel-Säulenchromatographie (Laufmittel: CHCl₃) gereinigt und anschließend im Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde in Form eines hochviskosen rot-violetten Öls erhalten.

Ausbeute: m = 0,573 g (12,0 mmol; 66,9 % d. Th.).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7,90 (d, 8,4 Hz, 2H, *o*-ArH); 7,56 (t, 7,4 Hz, 1H, *p*-ArH); 7,39 (t, 7,7 Hz, 2H, *m*-ArH); 6,37 (bs, 1H, -NH-); 3,68 (m, 8H, -O-CH₂-CH₂-O-); 3,65 (m, 2H, -NH-CH₂); 3,56 (m, 2H, -NH-CH₂-CH₂-); 3,48 (m, 2H, -CO-CH₂-); 3,38 (m, 2H, N₃-CH₂-CH₂-); 2,64 (m, 1H, N₃-CH₂-); 2,55 (m, 2H, -CO-CH₂-CH₂-); 2,43 (m, 1H, N₃-CH₂-); 1,94 (s, 3H, -CH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 222,67 (-CSS); 170,77 (-COO-); 144,66 (CSS-ArC); 133,13 (*p*-ArC); 128,69 (*m*-ArC); 126,78 (*o*-ArC); 118,83 (-CN); 70,81 (-NH-C-); 70,76 (-O-C-C-O-); 70,65 (-O-C-C-O-); 70,41 (-O-C-C-O-); 70,15 (-O-C-C-O-); 46,17 (-C-CH₃); 39,65 (-CO-C-); 34,25 (N₃-C-); 31,90 (-CH₂-CH₂-COO-); 24,28 (-CH₃).

5.3.3 Pentafluorphenylmethacrylat (PFPMA)



Im 1000 mL-Zweihalskolben wurden unter Inertgasatmosphäre 30 g Pentafluorphenol (163,0 mmol) in 300 mL Dichlormethan gelöst und im Eis-Wasser-Bad auf 0 °C gekühlt. Nach der Zugabe von 18,10 g Triethylamin (178,9 mmol; 1,10 eq.) wurden unter Rühren und weiterer Kühlung durch ein Septum hindurch 17,47 mL Methacryloylchlorid (178,9 mmol; 1,10 eq.) zugetropft. Nach beendeter Zugabe

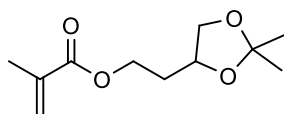
wurde für weitere 15 min im Eis-Wasser-Bad, dann 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Der farblose Niederschlag wurde abfiltriert und das Reaktionsgemisch durch dreimaliges Ausschütteln mit je 150 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene gelbliche Rohprodukt wurde einer Vakuumdestillation (2×10^{-2} mbar, 36°C) unterzogen, wobei PFPMA als farblose Flüssigkeit erhalten wurde.

Ausbeute: $m = 29,78$ g (118,1 mmol; 72,5 % d. Th.).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 6,45 (s, 1H, $\text{C}=\text{CH}_2$ -cis); 5,91 (s, 1H, $\text{C}=\text{CH}_2$ -trans); 2,09 (m, 3H, $-\text{CH}_3$).

$^{19}\text{F-NMR}$ (377 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -153,95 (d, $J = 18,0$ Hz, 2F, *o*-ArF); -159,9 (t, $J = 21,7$ Hz, 1F, *p*-ArF); -163,65 (t, $J = 26,0$ Hz, 2F, *m*-ArF).

5.3.4 2-(2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethylmethacrylat (DDEMA)



4-(2-Hydroxyethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan ($m = 5,0$ g; 34,2 mmol) wurde zusammen mit 4,15 g (41,0 mmol; 1,2 eq.) Triethylamin unter Argon-Atmosphäre in 100 mL wasserfreiem Dichlormethan gelöst und der Kolbeninhalt auf 0°C gekühlt. Unter Rühren wurden tropfenweise 3,93 g Methacryloylchlorid (37,6 mmol; 1,1 eq.) zugegeben und die Mischung für 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Der farblose Niederschlag wurde abfiltriert und die organische Phase mit 3x 50 mL Wasser gewaschen und mit MgSO_4 getrocknet. Das nach dem Einengen am Rotationsverdampfer leicht gelbliche Rohprodukt wurde per Kieselgel-Säulenchromat (Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat, 6:1 v/v) aufgereinigt. Nach erneutem Einengen am Rotationsverdampfer wurde ein farbloses Öl erhalten.

Ausbeute: $m = 4,28$ g (20,0 mmol; 58,4 % d. Th.).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 6,12 (s, 1H, $\text{C}=\text{CH}_2$ -cis); 5,59 (s, 1H, $\text{C}=\text{CH}_2$ -trans); 4,32 (m, 1H, $-\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_2-$); 4,22 (m, 2H, $-\text{COO}-\text{CH}_2-$); 4,10 (dd, $J_1 = 7,0$ Hz;

$J_2 = 1,1$ Hz, 1H, -O-CH₂-CH-); 3,62 (dd, $J_1 = 7,0$ Hz; $J_2 = 1,1$ Hz, 1H, -O-CH₂-CH-); 2,06-1,89 (m, 2H, -COO-CH₂-CH₂-); 1,97 (s, 3H, CH₃-C(CH₂)-); 1,43 (s, 3H, CH₃-C(CH₃)-O-); 1,38 (s, 3H, CH₃-C(CH₃)-O-).

5.4 Polymersynthesen und polymeranaloge Modifikationen

5.4.1 PFPMA- und LMA- Homo- und Blockcopolymere

Allgemeine Vorgehensweise für die Synthese der P(PFPMA) und P(LMA) Homopolymere:

Zur Herstellung von Homopolymeren aus PFPMA bzw. LMA wurden die jeweiligen Mengen an Monomer und CTA in ein Schlenkrohr eingewogen und mit absolutiertem Dioxan versetzt. Als letztes wurde AIBN, gelöst in Dioxan, zugegeben und darauf das verschlossene Schlenkrohr unverzüglich in N_{2,l} eingefroren. Das Gesamtvolumen an Dioxan betrug jeweils ca. 1,5 mL pro Gramm Monomer. Das Reaktionsgemisch wurde drei Freeze-Pump-Thaw-Zyklen unterworfen. Nach dem dritten Durchgang wurde das Gemisch unter Vakuum für 19 h bei 65 °C gerührt. Beendet wurde die Reaktion durch Fällern des entstandenen Polymers in eisgekühltem *n*-Hexan. Das Polymer wurde abzentrifugiert (15 min, 4000 rpm) und erneut in absolutiertem Dioxan gelöst. Nach zwei weiteren Sequenzen aus Fällern und Zentrifugieren wurde das Polymer für 16 h im Vakuum bei 40 °C getrocknet. Die so hergestellten Homopolymere wurden als pinkfarbener amorpher Feststoff (P(PFPMA)) bzw. pinkfarbendes viskoses Öl (P(LMA)) erhalten.

Tabelle 24: Ansätze zur P(PFPMA) und P(LMA) Synthese mittels CTA1.

Polymer	Monomer / mol	CTA1 / mol	AIBN / mol	Ausbeute / g
H1	7,92E-3	3,91E-4	3,96E-5	1,09
H2	1,77E-2	7,38E-4	6,58E-5	1,63
H3	7,93E-3	3,92E-4	3,92E-5	1,26
H4 ^{a)}	1,75E-2	7,36E-4	6,42E-5	3,02
H5 ^{a)}	1,20E-2	5,04E-4	4,40E-5	1,67
H6	7,93E-3	2,59E-4	2,92E-5	1,49

(Fortsetzung)

Polymer	Monomer / mol	CTA1 / mol	AIBN / mol	Ausbeute / g
H7	1,20E-2	5,29E-4	6,40E-5	1,91
H8	1,20E-2	3,01E-4	3,01E-5	0,98
H9	1,19E-2	3,00E-4	4,40E-5	1,95
H10	1,59E-2	1,12E-4	1,95E-5	2,12
H11	1,18E-2	6,36E-4	6,33E-5	1,01
H12	1,18E-2	6,36E-4	6,33E-5	2,26
H13	7,86E-3	2,82E-4	2,83E-5	1,03
H14	7,87E-3	2,82E-4	2,90E-5	1,42
H15	1,18E-2	4,11E-4	5,35E-5	3,11
H16	1,20E-3	5,29E-4	9,20E-5	1,91

^{a)} mehrere identische Chargen.

P(PFPMA) Homopolymere:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 2,55 – 1,90 (br, 2H, -CH₂-); 1,65 – 1,18 (br, 3H, -CH₃).

¹⁹F-NMR (377 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -151,30 – -153,50 (br, *o*-ArF); -157,60 – -158,60 (br, *p*-ArF); -162,65 – -163,70 (br, *m*-ArF).

P(LMA) Homopolymere:

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4,02 – 3,78 (br, -COO-CH₂-); 1,96 – 0,83 (br, -CH₂-, -CH₃-).

Allgemeine Vorgehensweise für die Synthese der P(PFPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymer:

Die jeweiligen Makro-CTAs (P(PFPMA) bzw. P(LMA) Homopolymere) wurden in absolutiertem Dioxan gelöst und zusammen mit der betreffenden Menge an Monomer des zweiten Blocks in einen Schlenkkolben überführt. Nach Zugabe von AIBN, gelöst in weiterem Dioxan, wurde das verschlossene Schlenkrohr unverzüglich in N₂ eingefroren. Die Gesamtmenge an Dioxan betrug ca. 4 mL pro Gramm Polymer. Das Reaktionsgemisch wurde drei Freeze-Pump-Thaw-Zyklen unterworfen. Nach dem dritten Durchgang wurde das Gemisch unter Vakuum für 55 h bei 65 °C gerührt. Beendet wurde die Reaktion durch Fällen des Polymers in eisgekühltem Methanol. Das Polymer wurde abzentrifugiert (30 min, 4000 rpm) und erneut in absolutiertem Dioxan gelöst. Nach zwei weiteren Sequenzen aus Fällen und Zentrifugieren wurde das Polymer für 16 h im Vakuum bei 40 °C getrocknet. Die so hergestellten Blockcopolymer wurden als pinkfarbener Feststoff von glasiger bis gummiartiger Konsistenz erhalten.

Tabelle 25: Ansätze zur P(PFPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymer-synthese.

Polymer	Homo-polymer	Stoff-menge / mol	Monomer 2. Block / mol	AIBN / mol	Ausbeute / g
BC1	H14	1,11E-4	2,72E-3	1,88E-5	0,937
BC2	H13	1,86E-4	2,76E-3	2,42E-5	1,350
BC3	H12	1,25E-4	2,60E-3	1,25E-5	0,920
BC4	H4	4,32E-4	8,05E-4	4,63E-6	0,443
BC5	H4	4,32E-4	9,84E-4	4,63E-6	0,434
BC6	H8	2,70E-5	1,01E-3	4,20E-6	0,305
BC7	H15	6,20E-5	2,19E-3	7,98E-6	0,805
BC8	H3	5,45E-5	2,38E-3	6,76E-6	0,786
BC9	H6	3,45E-5	1,06E-3	4,38E-6	0,318
BC10	H8	2,70E-5	1,56E-3	9,5E-6	0,477

(Fortsetzung)

Polymer	Homo-polymer	Stoff-menge / mol	Monomer 2. Block / mol	AIBN / mol	Ausbeute / g
BC11	H6	3,40E-5	2,09E-3	4,26E-6	0,685
BC12	H6	3,37E-5	1,61E-3	4,26E-6	0,474
BC13	H9	2,94E-5	9,21E-3	3,17E-6	1,873
BC14	H15	6,33E-5	5,15E-3	6,21E-6	1,398
BC15	H15	6,42E-5	1,38E-3	6,39E-6	0,645
BC16	H5	1,79E-5	1,00E-3	4,20E-6	0,460
BC17	H1	4,57E-5	1,14E-3	5,97E-6	0,480
BC18	H4	1,23E-4	5,93E-3	1,23E-5	1,990
BC19	H5	1,43E-4	7,12E-3	1,46E-5	2,510
BC20	H11	1,24E-4	1,84E-3	1,20E-5	0,687
BC21	H4	1,10E-4	2,26E-3	1,38E-5	1,240
BC22	H7	1,08E-4	3,83E-3	1,83E-5	1,561

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3,96 – 3,68 (br, -O-CH₂-CH₂-); 2,70 – 0,78 (br, -CH₂- (Rückgrat PFPMA/LMA), -CH₃ (Rückgrat PFPMA/LMA), -CH₂- (LMA Seitenkette), -CH₃ (Rückgrat PFPMA/LMA)).

¹⁹F-NMR (377 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = -151,30 – -153,50 (br, *o*-ArF); -157,60 – -158,60 (br, *p*-ArF); -162,65 – -163,70 (br, *m*-ArF).

Allgemeines Vorgehen für die Substitution der Dithiobenzoat-Endgruppe mit AIBN:

Die Substitution der Dithiobenzoat-Endgruppe wird beispielhaft anhand des Blockcopolymers **BC19** beschrieben. Alle anderen mittels **CTA1** polymerisierten P(PFPMA)-*b*-P(LMA) Polymere wurden in analoger Weise umgesetzt.

Zur Umsetzung wurden 2,03 g ($1,31 \cdot 10^{-4}$ mol) des Polymers in 3,5 mL absolutiertem Dioxan gelöst und mit einer Lösung von 0,648 g ($3,95 \cdot 10^{-3}$ mol; 30 eq.) AIBN in weiteren 1,5 mL Dioxan versetzt. Die Mischung wurde unter Argon bei 65 °C gerührt, bis eine vollständige Entfärbung eintrat (ca. 5 h). Die Reaktion wurde durch Fällen des Polymers in eisgekühltem Methanol beendet. Das Polymer wurde abzentrifugiert (30 min, 4000 rpm) und erneut in absolutiertem Dioxan gelöst. Nach zwei weiteren Sequenzen aus Fällen und Zentrifugieren wurde das Polymer für 16 h im Vakuum bei 40 °C getrocknet. Die vollständige Umsetzung wurde mittels UV/Vis-Spektrometrie sichergestellt.

Ausbeute: $m = 1,93$ g ($1,25 \cdot 10^{-4}$ mol; 95,1 % d. Theorie).

THF-GPC: $M_n = 15.500$ g/mol; $M_w = 18.800$ g/mol; $\bar{D} = 1,21$.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3,96 – 3,68 (br, -O-CH₂-CH₂-); 2,70 – 0,78 (br, -CH₂- (Rückgrat PFPMA/LMA), -CH₃ (Rückgrat PFPMA/LMA), -CH₂- (LMA Seitenkette), -CH₃ (Rückgrat PFPMA/LMA)).

$^{19}\text{F-NMR}$ (377 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -151,30 – -153,50 (br, *o*-ArF); -157,60 – -158,60 (br, *p*-ArF); -162,65 – -163,70 (br, *m*-ArF).

5.4.2 Polymeranaloge Konversionen zur Herstellung amphiphiler Blockcopolymerer

Allgemeines Vorgehen für die polymeranaloge Umsetzung mit HPA bzw. DHPA

Die polymeranaloge Konversion der PFP-Wiederholungseinheiten mit DHPA wird anhand des Polymers **BC19** beschrieben. Alle anderen Umsetzungen mit HPA oder DHPA ohne weitere Funktionalisierung wurden in analoger Weise entweder bei 35 °C oder bei 50 °C durchgeführt.

Zur Umsetzung mit DHPA wurden 512,2 mg Polymer ($3,31 \cdot 10^{-5}$ mol; $\cong 1,08 \cdot 10^{-3}$ mol PFP) im Schlenkkolben und unter Argon in 5 mL absolutiertem Dioxan gelöst. Über eine Kanüle wurde eine Lösung von 195,8 mg DHPA ($2,15 \cdot 10^{-3}$ mol; 2 eq. bezogen auf PFP) und 435,0 mg Triethylamin ($4,30 \cdot 10^{-3}$ mol; 4 eq. bezogen auf PFP) in 2 mL wasserfreiem DMSO zugegeben und die Mischung für 17 h bei 50 °C gerührt. Nach Zugabe einer zweiten, in ihrer Zusammensetzung

identischen Charge aus DHPA und Triethylamin in DMSO wurde der Kolbeninhalt für weitere 24 h gerührt. Währenddessen trat eine Trübung auf, die sich nach Zugabe eines weiteren Milliliters wasserfreiem DMSO auflöste. Nach beendeter Reaktion wurde der Kolben auf Raumtemperatur abgekühlt und die Lösung zur Entfernung der organischen Lösungsmittel in einen Dialyseschlauch überführt. Nach dreitägiger Dialyse gegen MilliQ-Wasser wurde der Schlauchinhalt lyophilisiert und so das fertige amphiphile Polymer erhalten.

Ausbeute: $m = 353,3 \text{ mg}$ ($2,90 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$; 87,5 % d. Theorie).

$M_n = 12.200 \text{ g/mol}$ (berechnet aus Zusammensetzung des Vorläufer-Polymers).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-d}_4$): δ [ppm] = 3,95 – 3,68 (br, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2-$); 3,35 – 3,05 (br, O=CNH-CH_2-); 2,96 – 2,66 (br, $-\text{CHOH-CH}_3$); 2,59 – 0,51 (br, $-\text{CH}_2-$ (Rückgrat HPMA/LMA), $-\text{CH}_3$ (Rückgrat HPMA/LMA), $-\text{CH}_2-$ (LMA Seitenkette)).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-d}_4$): δ [ppm] = 177,99 ($-\text{CON-}$); 177,68 ($-\text{COO-}$); 77,43 ($-\text{NH-CH}_2\text{-COH-}$); 65,14 (HO-CH_2-); 64,32 (COO-CH_2-); 54,32 ($-\text{CH}_2-$ Backbone); 54,16 ($-\text{CH}_2-$ Backbone); 45,14 ($-\text{NH-CH}_2-$); 44,90 (C_{qart} Backbone); 44,75 (C_{qart} Backbone); 31,93 ($\text{COO-CH}_2\text{-CH}_2-$); 29,63/29,60/29,53/ 29,33/28,21/28,10 ($-\text{CH}_2-$ Seitenkette); 26,06 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$); 22,68 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2-$); 18,38 (CH_3 Backbone); 16,45 (CH_3 Backbone); 14,01 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2-$).

Ergänzende Schritte für die Anbindung von Oregon Green 488 Cadaverin und des Mannose-Linkers

Wurde ein Polymer mit Oregon Green 488 markiert, so wurde der Lösung des P(PFPMA)-*b*-P(LMA) Vorläuferpolymers eine Lösung des Farbstoffes in wasserfreiem DMSO hinzugegeben (0,01 eq. pro PFPMA-Wiederholungseinheit). Wegen der geringen Substanzmenge wurde Triethylamin nicht im stöchiometrischen Verhältnis von 2 eq. (bezogen auf den Farbstoff) zugesetzt, sondern es wurde pauschal ein Tropfen (ca. 5 μL) zugegeben. Nach fünfstündigem Rühren unter Argon bei 35 °C wurde für die vollständige polymeranaloge Umsetzung mit DHPA zum amphiphilen Blockcopolymer nach dem oben beschriebenen Protokoll verfahren. Die Anbindung des Farbstoffes wurde unter Lichtausschluss durchgeführt. Als Beispiel für konkrete Umsetzungen sei auf Tabelle 26 verwiesen.

Um den Anteil des angebondenen Farbstoffes zu quantifizieren, wurde die Transmission einer Vesikeldispersion in PBS bestimmt. Um die Abwesenheit freien Farbstoffes sicherzustellen, wurde nicht angebondenes Oregon Green 488 mittels Sepharose CL-4B Größenausschlusschromatographie abgetrennt. Bei einer Polymerkonzentration von $c = 10 \text{ mg/L}$ wurde die Transmission bei $\lambda = 494 \text{ nm}$ bestimmt.

So wurde beispielsweise im Fall des Polymers **P23D** die Transmission zu $T = 0,9469$ ermittelt.

Hieraus ergab sich

$$c = \frac{\lg\left(\frac{1}{T}\right)}{\varepsilon \cdot d} = \frac{\lg\left(\frac{1}{0,9469}\right)}{75.000 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 1 \text{ cm}} = 3,16 \cdot 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$$

und damit

$$N_{av,real} = \frac{3,16 \cdot 10^{-7} \frac{\text{mol}}{\text{l}}}{1,12 \cdot 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{l}}} = 0,282$$

als mittlere Anzahl an Farbstoffmolekülen pro Polymerkette ($N_{av,real}$).

Die theoretische Höchstzahl $N_{av,max}$ ergab sich aus den eingesetzten Substanzmengen zu

$$N_{av,max} = \frac{1,95 \cdot 10^{-6} \text{ mol Oregon Green}}{6,26 \cdot 10^{-6} \text{ mol Vorläuferpolymer}} = 0,311$$

Die Anbindungseffizienz berechnete sich zu

$$\frac{N_{av,real}}{N_{av,max}} = 0,907.$$

Die Mannose-funktionalisierten Polymere wurden hergestellt, indem die Lösung des Vorläuferpolymers mit einer DMSO-Lösung von 0,08 eq. Mannose-Linker pro PFPMA-Wiederholungseinheit sowie einem Tropfen Triethylamin versetzt wurde. Das Gemisch wurde für 8 h (Umsatz 75%) bzw. 24 h (Umsatz 100 %) unter Argon bei 50 °C gerührt, bevor für die weitere Umsetzung mit Oregon Green 488 Cadaverin und DHPA wie oben geschildert verfahren wurde.

Tabelle 26: Ansätze für die Herstellung der Mannose-funktionalisierten Polymere P29/31 und ihrer nicht-mannosylierten Äquivalente P30/32.

Polymer	Vorläufer	$n_{\text{Polym.}}$ / mol	n (DHPA) ^{a)} / mol	n (OG488) / mol	n (Mannose) / mol
P29	BC21	6,06E-6	7,52E-4	1,88E-6	1,50E-5
P30	BC21	6,25E-6	7,78E-4	1,95E-6	-
P31	BC19	1,29E-5	1,63E-3	4,07E-6	3,25E-5
P32	BC19	1,28E-5	1,60E-3	4,01E-6	-

^{a)} $n(\text{NEt}_3) = 2n(\text{DHPA})$.

¹³C-NMR (100 MHz, *inverse gated*, CDCl₃): δ [ppm] = 179,3 – 176,2 (m, O=CNH-); 100,4 – 100,0 (m, C₁-Mannose).

5.4.3 Synthese des Azid-funktionalisierten P(DHPMA)-*b*-P(LMA) Polymers und Farbstoffanbindung über „Click“-Chemie

Allgemeine Vorgehensweise für die Synthese der Azid-funktionalisierten P(PFPMA) Homopolymere:

Die generelle Verfahrensweise für die Synthese der Azid-funktionalisierten Homopolymere war analog zur Polymerisation mittels **CTA1** (Kapitel 5.4.1). Neben der Verwendung von **CTA2** wurde hier 2,2'-Azobis-(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril) (AMDVN) als Radikalinitiator eingesetzt und die Polymerisation durch Rühren im Vakuum bei 35 °C für 24 h durchgeführt. Die entsprechenden Homopolymere wurden wie bei der Verwendung von CTA1 als pinkfarbene amorphe Feststoffe erhalten.

Tabelle 27: Ansätze zur P(PFPMA) Synthese mittels CTA2.

Polymer	Monomer / mol	CTA2 / mol	AMDVN / mol	Ausbeute / g
HA1	3,63E-3	8,35E-5	1,10E-5	0,146
HA2	7,93E-3	2,38E-4	2,92E-5	1,090
HA3	3,97E-3	9,09E-5	9,09E-6	0,283

FT-IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 2100 (Azid-Schwingungsbande).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 2,55 – 1,90 (br, 2H, $-\text{CH}_2-$); 1,65 – 1,18 (br, 3H, $-\text{CH}_3$).

Blockcopolymerisation von HA2 mit LMA zu BCA:

0,50 g ($3,88 \cdot 10^{-5}$ mol) des Homopolymers **HA2** wurden in 4 mL absolutiertem Dioxan gelöst und im Schlenkkolben mit 0,741 g Laurylmethacrylat ($2,92 \cdot 10^{-3}$ mol) sowie 1,2 mg ($3,89 \cdot 10^{-6}$ mol) AMDVN versetzt. Das Gemisch wurde drei Freeze-Pump-Thaw-Zyklen unterworfen und für 96 h im Vakuum bei 35 °C gerührt. Nach dem Fällern in eisgekühltem Ethanol wurde das erhaltene Polymer abzentrifugiert (30 min, 4000 rpm) und erneut in absolutiertem Dioxan gelöst. Nach zwei weiteren Sequenzen aus Fällern und Zentrifugieren wurde das Polymer für 5 h bei Raumtemperatur im Vakuum getrocknet. Das so hergestellte Blockcopolymer wurde als pinkfarbener Feststoff von gummiartiger Konsistenz erhalten.

Ausbeute: $m = 0,873$ g ($3,88 \cdot 10^{-5}$ mol).

THF-GPC: $M_n = 24.500$ g/mol; $M_w = 32.200$ g/mol; $\bar{D} = 1,32$.

FT-IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 2099 (Azid-Schwingungsbande).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3,96 – 3,68 (br, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2-$); 2,70 – 0,78 (br, $-\text{CH}_2-$ (Rückgrat PFPMA/LMA), $-\text{CH}_3$ (Rückgrat PFPMA/LMA), $-\text{CH}_2-$ (LMA Seitenkette), $-\text{CH}_3$ (Rückgrat PFPMA/LMA)).

Substitution der RAFT-Endgruppe von BCA:

0,500 g ($2,04 \cdot 10^{-5}$ mol) des Blockcopolymers BCA wurden zusammen mit 190 mg AMDVN ($6,16 \cdot 10^{-4}$ mol; 30 eq.) in 5 mL absolutiertem Dioxan gelöst. Die Lösung wurde für 5 h bei 35 °C unter Argon gerührt, mit weiteren 95 mg AMDVN versetzt und erneut für 12 h gerührt. Nach dem Fällern in eisgekühltem Ethanol wurde das Polymer abzentrifugiert (30 min, 4000 rpm) und erneut in absolutiertem Dioxan gelöst. Nach zwei weiteren Sequenzen aus Fällern und Zentrifugieren wurde das Polymer für 5 h bei Raumtemperatur im Vakuum getrocknet. Das AMDVN-substituierte **BCA** wurde als farbloser Feststoff von gummiartiger Konsistenz erhalten.

Ausbeute: $m = 0,408$ g ($1,66 \cdot 10^{-5}$ mol).

THF-GPC: $M_n = 24.900$ g/mol; $M_w = 32.700$ g/mol; $\bar{D} = 1,31$.

FT-IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 2101 (Azid-Schwingungsbande).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3,96 – 3,68 (br, -O-CH₂-CH₂-); 2,70 – 0,78 (br, -CH₂- (Rückgrat PFPMA/LMA), -CH₃ (Rückgrat PFPMA/LMA), -CH₂- (LMA Seitenkette), -CH₃ (Rückgrat PFPMA/LMA)).

Polymeranaloge Umsetzung von BCA mit DHPA:

0,100 g ($4,02 \cdot 10^{-6}$ mol) des Endgruppen-substituierten Blockcopolymers **BCA** wurden in 2 mL absolutiertem Dioxan gelöst und mit 35,9 mg ($3,94 \cdot 10^{-6}$ mol; 2 eq pro PFP-Wiederholungseinheit) DHPA sowie 79,7 mg ($7,87 \cdot 10^{-6}$ mol; 2 eq pro PFP-Wiederholungseinheit) Triethylamin, gelöst in 1 mL DMSO, versetzt. Die Mischung wurde bei 35 °C unter Argon gerührt und nach 12 h eine zweite, in ihrer Zusammensetzung identischen, Charge aus DHPA und Triethylamin in DMSO zugegeben. Der Kolbeninhalt wurde für weitere 36 h gerührt, wobei nach 12 h ein weiterer Milliliter DMSO zugesetzt wurde. Die Lösung wurde anschließend für 2 d gegen MilliQ Wasser dialysiert und nach Lyophilisation das fertige Polymer **PA** erhalten.

Ausbeute: $m = 49,7$ mg ($2,53 \cdot 10^{-6}$ mol).

FT-IR (ATR): ν (cm^{-1}) = 2099 (Azid-Schwingungsbande).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃/MeOH-d₄): δ [ppm] = 3,95 – 3,68 (br, -O-CH₂-CH₂-); 3,35 – 3,05 (br, O=CNH-CH₂-); 2,96 – 2,66 (br, -CHOH-CH₃); 2,59 – 0,51 (br, -CH₂- (Rückgrat HPMA/LMA), -CH₃ (Rückgrat HPMA/LMA), -CH₂- (LMA Seitenkette)).

Anbindung des Farbstoffes Alkyne MegaStokes Dye 608 an PA:

25,0 mg (1,28·10⁻⁶ mol) des Polymers **PA** wurden zusammen mit 2,92 mg (4,47·10⁻⁶ mol; 3,5 eq) Alkyne MegaStokes Dye 608 im Schlenkkolben unter Argon in 4 mL wasserfreiem DMSO gelöst und für 18 h bei 30 °C gerührt. Der Kolbeninhalt wurde unter Lichtausschluss für 2 d gegen MilliQ-Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert. **PA-608** wurde als orangefarbener Feststoff von watterartiger Konsistenz erhalten.

Ausbeute: m = 18,2 mg (9,33·10⁻⁷ mol).

UV/Vis: λ_{abs, max} (5 mM NaCl/MilliQ) = 466 nm.

5.4.4 Synthese des säurelabilen Blockcopolymers P(LMA-*stat*-DDEMA)-*b*-P(DHPMA)

Zur Synthese des säurelabilen Blockcopolymers **PS** wurde zunächst das statistische Copolymer **SC** hergestellt. Hierzu wurden 3,93·10⁻³ mol Laurylmethacrylat zusammen mit 1,68·10⁻³ mol DDEMA im Schlenkkolben eingewogen. Nach Zugabe von 1,65·10⁻⁴ mol **CTA1** und 2,75·10⁻⁵ mol AIBN, gelöst in 5,5 mL wasserfreiem Dioxan wurde der Kolbeninhalt drei Freeze-Pump-Thaw-Zyklen unterworfen und im Anschluss für 19 h bei 65 °C im Vakuum gerührt. Nach dreimaligem Fällen in eisgekühltem Methanol wurde **SC** als pinkfarbendes viskoses Öl erhalten.

Ausbeute: m = 550 mg (1,06·10⁻⁴ mol).

THF-GPC: M_n = 5.500 g/mol; M_w = 6.200 g/mol; Đ = 1,13.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4,37 – 4,25 (br, -O-CH-CH₂-); 4,12 – 3,86 (br, -COO-CH₂- LMA, -O-CH₂-CH-); 3,85 – 3,73 (br, -COO-CH₂- DDEMA); 2,65 – 0,82 (br, -C(CH₃)₂, -CH₂ (LMA Seitenkette), -COO-CH₂-CH₂- (DDEMA), -CH₂- (Rückgrat DDEMA/LMA), -CH₃ (Rückgrat DDEMA/LMA), -CH₃ (LMA)).

Zur Herstellung des PFPMA-Blockcopolymeren **BS** wurden $1,05 \cdot 10^{-3}$ mol PFPMA mit $4,80 \cdot 10^{-5}$ mol von **SC** als Makroinitiator in 3,5 mL absolutiertem Dioxan polymerisiert. Die Polymerisation wurde durch $6,09 \cdot 10^{-6}$ mol AIBN initiiert und erfolgte nach drei Freeze-Pump-Thaw-Durchgängen durch 72-stündiges Rühren bei 70 °C. Nach dreimaligem Fällen in eisgekühltem Ethanol wurde das Polymer als pinkfarbener amorpher Feststoff erhalten.

Ausbeute: $m = 411$ mg ($3,84 \cdot 10^{-5}$ mol).

THF-GPC: $M_n = 10.700$ g/mol; $M_w = 11.900$ g/mol; $\bar{D} = 1,11$.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4,37 – 4,25 (br, -O-CH-CH₂-); 4,12 – 3,86 (br, -COO-CH₂- LMA, -O-CH₂-CH-); 3,85 – 3,73 (br, -COO-CH₂- DDEMA); 2,65 – 0,82 (br, -C(CH₃)₂, -CH₂ (LMA Seitenkette), -COO-CH₂-CH₂- (DDEMA), -CH₂- (Rückgrat DDEMA/LMA/PFPMA), -CH₃ (Rückgrat DDEMA/LMA/PFPMA), -CH₃ (LMA)).

Die polymeranaloge Umsetzung von **BS** mit DHPA zum säurelabilen P(LMA-*stat*-DDEMA)-*b*-P(DHPMA) erfolgte nach vorheriger Substitution der RAFT-Endgruppe gemäß der allgemeinen Vorschrift. Für die Aminolyse wurden $1,35 \cdot 10^{-5}$ mol des Polymeren in 2 mL absolutiertem Dioxan gelöst und zusammen mit $4,39 \cdot 10^{-4}$ mol DHPA und $8,80 \cdot 10^{-4}$ mol Triethylamin, gelöst in 1 mL wasserfreiem DMSO, bei 50 °C unter Argonatmosphäre gerührt. Nach 24 h wurde eine zweite, identische Charge der beiden Amine zugegeben und das Reaktionsgemisch für weitere 60 h gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte durch viertägige Dialyse gegen MilliQ-Wasser und anschließende Lyophilisation. Hierdurch wurde **PS** als farbloser Feststoff von watteartiger Konsistenz erhalten.

Ausbeute: $m = 100$ mg ($1,12 \cdot 10^{-5}$ mol).

THF-GPC: $M_n = 8.800$ g/mol; $M_w = 12.050$ g/mol; $\bar{D} = 1,27$.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 4,95 – 4,72 (br, -CHOH-); 4,67 – 4,40 (br, -CH₂OH); 3,90 – 3,45 (br, -COO-CH₂- LMA, -COO-CH₂- DDEMA, -NH-CH₂-); 2,95 – 0,27 (br, -C(CH₃)₂, -CH₂ (LMA Seitenkette), -COO-CH₂-CH₂- (DDEMA), -CH₂- (Rückgrat DDEMA/LMA/DHPMA), -CH₃ (Rückgrat DDEMA/LMA/DHPMA), -CH₃ (LMA)).

5.4.5 P(Glu(OBn))-*b*-P(Sar) Blockcopolymere

Die Polypeptid-*b*-Polypeptoid Blockcopolymere wurden von [REDACTED] [REDACTED] nach dem von Birke et al. beschriebenen Verfahren hergestellt.²⁰⁴

5.5 Vesikelpräparation und Beladung

5.5.1 Übersicht der Kolloidbildungsversuche mit P(HPMA)-*b*-P(LMA)

Tabelle 28: Übersicht der Kolloidbildungsversuche mit P(HPMA)-*b*-P(LMA) Blockcopolymeren.

Polymer	Phasen-inversion DMSO, 25 °C	Phasen-inversion DMSO, 60 °C	Phasen-inversion THF/MeOH 8:2	Electro- for- mation	Ultra- schall	Micro- mixing	Duale Zen- trifu- gation	Deter- genz- dialyse
P2	✓ ^{a)}	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
P3	✓	✗ ^{b)}	✓	✗	✓	✗	✗	✗
P4	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✗	✗
P7	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✓
P10	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✓
P12	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✗	✗
P14	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✓
P15	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✗	✗

^{a)} untersucht, ^{b)} nicht untersucht.

5.5.2 Filmrehydratisierung mittels Ultraschall

Zur Filmherstellung wurden je 3 mg des betreffenden Polymers in 0,4 mL einer Mischung aus Chloroform und Methanol (8:2 v/v) gelöst. Die Lösung wurde im Schnappdeckelglas im Stickstoffstrom zu einem dünnen Film eingetrocknet und letzte Lösungsmittelspuren im Hochvakuum entfernt. Die Rehydratisierung wurde in PBS-Puffer durch Ultraschall-Behandlung mittels der oben beschriebenen Sonotrode durchgeführt. Die Beschallung erfolgte unter Eis/Wasser-Kühlung in Sequenzen zu 10 s, unterbrochen durch ein fünfsekündige Pause. Die Gesamtdauer der Bestrahlung betrug 5 min. Reichte diese Dauer zur Herstellung dauerhaft stabiler kolloidaler Strukturen nicht aus, wurde die Prozedur bis zu einer Höchstbestrahlungsdauer von 30 min wiederholt.

Die Kolloidpräparation unter Verwendung lyophilisierten Materials geschah in analoger Durchführung, wobei jedoch statt eines Polymerfilms direkt das lyophilisierte Polymer eingesetzt wurde.

5.5.3 Elektroformierung

Für die Elektroformierung wurde eine im Eigenbau hergestellte Kammer verwendet. Sie bestand aus rechteckigen, Indiumzinnoxid-beschichteten Glaträgern (15-25 Ω /sq, *Sigma Aldrich*), die mittels eines 2 mm dünnen Silikonspacers (hergestellt aus *Sylgard 184 Base Silicone Elastomer* und zugehörigem *Curing Agent, Dow Chemical*) in Form eines ausgehöhlten Rechteckes voneinander isoliert waren. Zur Generation des Wechselstroms wurde ein Funktionsgenerator FG601 (*FB Feedback*) verwendet.

In einem typischen Experiment wurden 5 μ L Polymer- bzw. Lipidlösung der Konzentration 10 mg/mL auf einem der beiden Glaträger eingetrocknet, mittels des Spacers und des zweiten Glaträgers die Kammer zusammengesetzt und über eine Kanüle mit MilliQ-Wasser geflutet. Für den elektrischen Kontakt wurde an gegenüberliegenden Glaträgern selbstklebendes Kupferband angebracht und mit den Polen des Funktionsgenerators verbunden. Anschließend wurde eine Spannung von $U = 5$ V ($f = 10$ Hz) angelegt und die Vesikelbildung *in situ* mittels Aufrichtmikroskopie beobachtet. Bei der erfolglosen Herstellung von Polymervesikeln wurde mittels DLS sichergestellt, dass tatsächlich keine kolloidalen Strukturen entstanden waren und diese nicht bloß zu klein zur mikroskopischen Detektion waren.

5.5.4 Detergenzdialyse zur Vesikelherstellung und Proteinrekonstitution

Zur Herstellung von Kolloiden mittels Detergenzdialyse wurde jeweils 2 mg des amphiphilen Blockcopolymers in 1 mL einer 5 %-igen Lösung von Octyl- β -D-glucopyranosid in PBS (bzw. im Dialysepuffer, s.o.) dispergiert. Hierzu wurde das Gemisch auf dem *ThermoMixer (Eppendorf)* bei 800 rpm und einer Temperatur von 40 °C geschüttelt, bis eine klare Dispersion erhalten wurde. Diese wurde bei Raumtemperatur durch kontinuierliche Zugabe von weiterem Puffermedium mittels Spritzenpumpe binnen 48 h unter Rühren bis auf $\beta(\text{OG}) = 0,5$ % verdünnt. Im

Anschluss wurde die Dispersion in einen Dialyseschlauch überführt und gegen das reine Puffermedium dialysiert, um das Detergenz zu entfernen.

In Abwandlung dieser Vorgehensweise bei der bloßen Kolloidherstellung wurden für den Versuch der Rekonstitution des Membranproteins GlpF auch Umgebungstemperatur (4 °C / 25 °C), Dauer der Verdünnung (19 h/48 h/72 h) und das Protein-zu-Polymer-Stoffmengenverhältnis (PoPR 200/100/50) variiert. Die Dialyse zur Detergenzentfernung erfolgte bei allen Rekonstitutionsversuchen bei 4 °C.

5.5.5 Phaseninversion

Für die Vesikelherstellung mittels Phaseninversion wurden, wenn nicht anders beschrieben, jeweils ca. 2,5 mg des betreffenden Polymers in 0,5 – 1,0 mL DMSO oder THF/MeOH (8:2 v/v) durch dreistündiges Schütteln auf dem *ThermoMixer* (*Eppendorf*) bei 800 rpm gelöst. Die Polymerlösung wurde in ein Schnappdeckelglas überführt. Unter Verwendung einer *PHD 2000 Infusion* Spritzenpumpe (*Harvard Apparatus*) wurde über eine Teflonkapillare (*Wicom*, $d = 0,5$ mm) das jeweils genannte wässrige Medium bis zu einem Wasseranteil von 90 % eingeleitet. Dabei wurde die Polymerlösung mittels eines 1 cm Teflon-Magnetührstabes mit einer Geschwindigkeit von 800 rpm gerührt. Das Einleiten erfolgte binnen 48 h. Nach erfolgter Verdünnung wurde das organische Lösungsmittel per Dialyse gegen das betreffende wässrige Medium entfernt.

Für die Kolloidbildung mittels Mikromischer wurde der Edelstahl-Raupenmischer *CPMM-V.1.2-R300* (*Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH*) verwendet, der mit zwei HPLC-Pumpen *Smartline* (*Knauer*) betrieben wurde. Eingesetzt wurde das Polymer in einer THF-Lösung der Konzentration $c = 2,01$ g/L, versetzt mit ca. 0,5 % MilliQ-Wasser. Die Partikelherstellung erfolgte durch Mischen der Polymerlösung mit MilliQ-Wasser im Raupenmischer bei Flussgeschwindigkeiten von 2 mL/min (Polymerlösung) und 8 mL/min (Wasser). Die Entfernung des organischen Lösungsmittels geschah durch Dialyse gegen MilliQ-Wasser.

5.5.6 Duale Zentrifugation

In einem typischen Ansatz wurden 4,5 mg des Polymers in 0,1 mL Chloroform/Methanol (8:2 v/v) gelöst und an der Wandung eines 0,2 mL Zentri-

fugengefäßes im Stickstoffstrom eingeengt und anschließend im Vakuum getrocknet. Alternativ wurde das Polymer in lyophilisierter Form direkt eingewogen. Danach wurde das Polymer für 30 min mit 8 μL PBS-Puffer inkubiert und 47 mg Keramikkügelchen ($\varnothing = 0.3\text{-}0.4$ mm) zugegeben. Zentrifugiert wurde die Probe für 2x 16 min in einer für die Duale Zentrifugation ausgestatteten Zentrifuge (Rotanda 400, Hettich/Tuttlingen) bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 2500 min^{-1} . Anschließend wurden weitere 19,1 μL PBS zugegeben und die Probe in zwei Zentrifugationsläufen zu je 2 min bei unveränderter Umdrehungsgeschwindigkeit homogenisiert. Die hergestellten Proben wurden als hochviskose Dispersion im Kühlschrank bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und vor der weiteren Nutzung zur gewünschten Konzentration verdünnt.

Wurden wasserlösliche Substanzen verkapselt, so wurden identische Verhältnisse von Polymermengen und Lösungsvolumina verwendet. Im Unterschied zur obigen Beschreibung wurde hier für die Inkubation statt des reinen PBS-Puffers die Lösung des zu verkapselnden Stoffes eingesetzt. Der Verdünnungsschritt erfolgte unter Verwendung von PBS-Puffer. Nach der Vesikelbildung wurde der jeweilige nicht verkapselte Substanzanteil mittels Größenausschlusschromatographie über Sepharose CL-2B/4B abgetrennt. Dies geschah in einer Flowbox unter Einsatz von Chargen der Rohdispersion zu je 7 μL pro Durchgang.

5.6 Zellexperimente

Nach der Isolierung der murinen BMDCs wurden die Zellen in 12 Well-Platten zu 250.000 Zellen/well ausgesät und 1,25 mL Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, versetzt mit 5 % fetalem Kälberserum (FCS), 5 % Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor, 1 % Penicilin/Streptavidin, 1 % Glutamin und 1 % β -Mercaptoethanol) zugegeben. Am dritten Tag der Inkubation wurden 500 μ L des Kulturmediums gegen 500 μ L frischen Mediums ausgetauscht. Am siebten Tag wurde das Kulturvolumen auf 750 μ L reduziert und mit 75 μ L der betreffenden Vesikellösung versetzt (Endkonzentration an CpG: 100 ng/mL bzw. 0 ng/mL im Fall der Negativkontrollen). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 3 h. Anschließend wurden die Zellen zur Entfernung überschüssiger Partikel mit FACS-Medium (PBS-Puffer/2 % FCS) gewaschen und nach weiteren 21 h für die Datenaufnahme geerntet. Die Zellen wurden auf FACS-Röhrchen (BD, #352008) verteilt (0,2-0,5x 10⁶ Zellen pro Röhrchen) und auf Eis gelagert für 20 min mit den folgenden Oberflächenmarkern inkubiert:

α -ms CD80-FITC 0,25 μ L (*eBioscience*)

α -ms CD86-PE 0,25 μ L (*eBioscience*)

α -ms CD11c-PECy7 0,20 μ L (*eBioscience*)

α -ms MCH-II-eFluor450 0,25 μ L (*eBioscience*)

Anschließend wurden die Proben mit je 1 mL FACS-Medium gewaschen und mit 0,5 mL 0,7 % PFA fixiert und bis zur Messung im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

Die Inkubation der mannosylierten Nanopartikel bzw. ihrer nicht-mannosylierten Äquivalente geschah in analoger Weise (Dauer: 24 h) mit Endkonzentrationen an Polymervesikeln von jeweils 3/6/9 μ g/mL. Als Marker wurde α -ms CD206-BV421 2,5 μ L (*eBioscience*) verwendet.

Für den Zytokin-Test und den T-Zell-Proliferationstest wurden die BMDCs am achten Tag der Kultur für 24 h mit Polymervesikeln inkubiert (Konz.: 25 ng/mL bezo-

gen auf den SIINFEKL-Gehalt). Am nächsten Tag wurden die BMDCs geerntet, mit dem oben beschriebenen *IMD*-Medium gewaschen und gezählt. Die Zellen wurden in Triplikaten in den Vertiefungen einer 96-well Kulturplatte in einer 1:2-Verdünnungsreihe eingesät, beginnend mit 20.000 Zellen pro Vertiefung. Anschließend wurde die dem jeweiligen DC/T-Zell-Verhältnis entsprechende Zahl an OTI T-Zellen zugegeben und bei 37 °C inkubiert. Nach 72 h wurde pro Vertiefung ³H-Thymidin einer Aktivität von 0,25 µCi zugegeben und die Proben für weitere 16 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen eingefroren und nach dem Ernten auf Filtermatten die Radioaktivität mittels eines β-Counters bestimmt.

Die Bestimmung der Zytokingehalte wurde nach dem *Cytokine Bead Array* Verfahren durchgeführt. Dazu wurde die Capture Beads im FACS-Röhrchen vorgelegt und mit je 10 µL der Überstände aus der FACS-Analyse der BMDC-Aktivierung versetzt. Als Standard diente ein vorgemischter Zytokin-Mix (10 pg/mL pro Zytokin). Nach einstündiger Inkubation im Dunkeln wurden zu jeder Probe 10 µL PE-Antikörper-Mix pipettiert und die Mischung für eine weitere Stunde inkubiert. Die Proben wurden mit Puffer (PBS + 1 % FCS) gewaschen und abzentrifugiert (300 g, 10 min, 4 °C). Anschließend wurden die Proben binnen 60 min am FACS-Gerät vermessen.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Schmuck, C.; Keilitz, J. *Angew. Chemie* **2014**, *126* (11), 3078–3091.
- (2) Small, D. M. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1968**, *45* (3), 108–119.
- (3) Small, D. M. *Fed. Proc.* **1970**, *29*, 1320–1326.
- (4) Fuhrhop, J.-H.; Köning, J. *Membranes and Molecular Assemblies: the Synkinetic Approach*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1994.
- (5) Menger, F. M.; Littau, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1451–1452.
- (6) Dörfler, H.-D. *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*; Springer: Berlin, Heidelberg, 2002.
- (7) Blokzijl, W.; Engberts, J. B. F. N. *Angew. Chemie* **1993**, *105* (11), 1610–1648.
- (8) Hartley, G. S. *Aqueous Solutions of Paraffin-chain Salts; a Study in Micelle Formation*; Hermann & cie: Paris, 1936.
- (9) Kauzmann, W. *Adv. Prot. Chem.* **1959**, *14*, 1–63.
- (10) Fuhrhop, J.-H.; Helfrich, W. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1565–1582.
- (11) Israelachvili, J. N. *Intermolecular and Surface Forces*; Academic Press: New York, 1985.
- (12) Tanford, C. *The Hydrophobic effect*; Wiley-Interscience: New York, 1973.
- (13) Israelachvili, J.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1976**, *72*, 1525–1568.
- (14) Ramanathan, M.; Shrestha, L. K.; Mori, T.; Ji, Q.; Hill, J. P.; Ariga, K. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (26), 10580–10611.
- (15) Adams, M. L.; Lavasanifar, A.; Kwon, G. S. *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92* (7), 1343–1355.
- (16) Torchilin, V. P. *Pharm. Res.* **2007**, *24* (1), 1–16.
- (17) Letchford, K.; Burt, H. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *65* (3), 259–269.
- (18) Smart, T.; Lomas, H.; Massignani, M.; Flores-Merino, M. V.; Perez, L. R.; Battaglia, G. **2008**, *3* (3), 38–46.
- (19) Blanazs, A.; Armes, S. P.; Ryan, A. J. *Macromol. Rapid Commun.* **2009**, *30* (4-5), 267–277.
- (20) Alexandridis, P.; Lindman, B. *Amphiphilic Block Copolymers: Self-Assembly and Applications*; Elsevier: Amsterdam, 2000.
- (21) Mai, Y.; Eisenberg, A. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (18), 5969.
- (22) Riess, G. *Prog. Polym. Sci.* **2003**, *28* (7), 1107–1170.

- (23) Zhang, P.; Xu, X.; Zhang, M.; Wang, J.; Bai, G.; Yan, H. *Langmuir* **2015**, 150219095049004.
- (24) Jiang, W.; Zhou, Y.; Yan, D. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 3874–3889.
- (25) Matsen, M. W.; Schick, M. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1996**, 1 (3), 329–336.
- (26) Hajduk, D.; Kossuth, M. B.; Hillmyer, M.; Bates, F. S. *J. Phys. Chem. B* **1998**, 5647 (97), 4269–4276.
- (27) Zhang, L.; Eisenberg, A. *Science (80-.)*. **1995**, 268, 1728–1731.
- (28) Cameron, N. S.; Corbierre, M. K.; Eisenberg, A. *Can. J. Chem.* **1999**, 77, 1311–1326.
- (29) Zhang, L.; Eisenberg, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118 (13), 3168–3181.
- (30) Zhang, L. F.; Eisenberg, A. *Polym. Adv. Technol.* **1998**, 9 (May), 677–699.
- (31) Bangham, A. D.; Horne, R. W. *J. Mol. Biol.* **1964**, 8 (5), 660–IN10.
- (32) Torchilin, V. P. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, 4 (2), 145–160.
- (33) Drummond, D. C.; Meyer, O.; Hong, K.; Kirpotin, D. B.; Papahadjopoulos, D. *Pharmacol. Rev.* **1999**, 51 (4), 691–744.
- (34) Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C. *Pharmacol. Rev.* **2001**, 53 (2), 283–318.
- (35) Cho, K.; Wang, X.; Nie, S.; Chen, Z.; Shin, D. M. *Clin. Cancer Res.* **2008**, 14 (5), 1310–1316.
- (36) Senior, J. H. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* **1987**, 3, 123–193.
- (37) Regen, S. L.; Bronislaw, C.; Singh, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 6638–6640.
- (38) Cho, I.; Chung, K.-C. *Macromolecules* **1984**, 17, 2935–2937.
- (39) Woodle, M. C.; Lasic, D. D. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, 1113, 171–199.
- (40) Woodle, M. C. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, 32 (1-2), 139–152.
- (41) Parr, M. J.; Ansell, S. M.; Choi, L. S.; Cullis, P. R. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1195, 21–30.
- (42) Kenworthy, A. K.; Simon, S. A.; McIntosh, T. J. *Biophys. J.* **1995**, 68, 1903–1920.
- (43) van Hest, J. C.; Delnoye, D.; Baars, M. W.; van Genderen, M. H.; Meijer, E. W. *Science* **1995**, 268 (5217), 1592–1595.
- (44) Zhang, L.; Yu, K.; Eisenberg, A. *Science (80-.)*. **1996**, 272 (5269), 1777–1779.
- (45) Aranda-Espinoza, H.; Bermudez, H.; Bates, F. S.; Discher, D. E. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, 87 (20), 208301.
- (46) Discher, D. E.; Eisenberg, A. *Science* **2002**, 297 (5583), 967–973.
- (47) Thiermann, R. **2014**.
- (48) Uneyama, T. *J. Chem. Phys.* **2007**, 126 (11), 114902–114917.

- (49) Antonietti, M.; Förster, S. *Adv. Mater.* **2003**, *15* (16), 1323–1333.
- (50) He, X.; Schmid, F. *Macromolecules* **2006**, *39* (7), 2654–2662.
- (51) Chen, L.; Shen, H.; Eisenberg, A. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (44), 9488–9497.
- (52) Du, J.; Chen, Y. *Macromolecules* **2004**, *37* (15), 5710–5716.
- (53) Adams, D. J.; Adams, S.; Atkins, D.; Butler, M. F.; Furzeland, S. *J. Control. Release* **2008**, *128* (2), 165–170.
- (54) Brinkhuis, R. P. *Polymeric Vesicles for drug delivery over the blood-brain barrier and in vivo imaging*, Radboud Universiteit Nijmegen, 2012.
- (55) Luo, L.; Eisenberg, A. *Langmuir* **2001**, *17* (22), 6804–6811.
- (56) Rodríguez-García, R.; Mell, M.; López-Montero, I.; Netzel, J.; Hellweg, T.; Monroy, F. *Soft Matter* **2011**, *7* (4), 1532.
- (57) Bermudez, H.; Brannan, A. K.; Hammer, D. A.; Bates, F. S.; Discher, D. E. *Macromolecules* **2002**, *35*, 8203–8208.
- (58) Opsteen, J. A.; Cornelissen, J. J. L. M.; Hest, J. C. M. Van. *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 1309–1319.
- (59) Chang, H.; Sheng, Y.; Tsao, H. *Soft Matter* **2014**, *10*, 6373–6381.
- (60) Lee, J. C. M.; Santore, M.; Bates, F. S.; Discher, D. E. *Macromolecules* **2002**, *35* (2), 323–326.
- (61) Dimova, R.; Seifert, U.; Pouligny, B.; Förster, S.; Döbereiner, H.-G. *Eur. Phys. J. E* **2002**, *250*, 241–250.
- (62) Lorenceau, E.; Utada, A. S.; Link, D. R.; Cristobal, G.; Joanicot, M.; Weitz, D. A. *Langmuir* **2005**, *21* (20), 9183–9186.
- (63) Napoli, A.; Valentini, M.; Tirelli, N.; Müller, M.; Hubbell, J. A. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 183–189.
- (64) Chécot, F.; Brûlet, A.; Oberdisse, J.; Gnanou, Y.; Mondain-Monval, O.; Lecommandoux, S. *Langmuir* **2005**, *21* (10), 4308–4315.
- (65) Ahmed, F.; Photos, P. J.; Discher, D. E. *Drug Dev. Res.* **2006**, *67*, 4–14.
- (66) Discher, D. E.; Ahmed, F. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2006**, *8*, 323–341.
- (67) Le Meins, J.-F.; Sandre, O.; Lecommandoux, S. *Eur. Phys. J. E. Soft Matter* **2011**, *34* (2), 1–17.
- (68) LoPresti, C.; Lomas, H.; Massignani, M.; Smart, T.; Battaglia, G. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19* (22), 3576.
- (69) Luo, L.; Eisenberg, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (5), 1012–1013.
- (70) Battaglia, G.; Ryan, A. J. *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2106–2110.
- (71) Battaglia, G.; Ryan, A. J.; Building, D.; Uni, T.; Hill, B.; Sheffield, S. **2006**, 10272–10279.
- (72) Olson, F.; Hunt, C. A.; Szoka, F. C.; Vail, W. J.; Papahadjopoulos, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *557*, 9–23.

- (73) Hunter, D. G.; Frisken, B. J. *Biophys. J.* **1998**, *74* (6), 2996–3002.
- (74) Srividya, N.; Muralidharan, S. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (24), 7147–7152.
- (75) Funkhouser, J. *Curr. Drug Discov.* **2002**, *2*, 17–19.
- (76) Ahmed, F.; Pakunlu, R. I.; Brannan, A.; Bates, F.; Minko, T.; Discher, D. E. *J. Control. Release* **2006**, *116*, 150–158.
- (77) Chen, W.; Meng, F.; Cheng, R.; Zhong, Z. *J. Control. Release* **2010**, *142* (1), 40–46.
- (78) Sachsenhofer, R.; Binder, W. H.; Farnik, D.; Zirbs, R. **2007**, 375–377.
- (79) Onaca, O.; Nallani, M.; Ihle, S.; Schenk, A.; Schwaneberg, U. *Biotechnol. J.* **2006**, *1* (7-8), 795–805.
- (80) Palivan, C. G.; Fischer-Onaca, O.; Delcea, M.; Itel, F.; Meier, W. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2800–2823.
- (81) Kircheis, R.; T. Blessing, S.; Brunner, L.; Wightman, E. W. *J. Control. Release* **2001**, *72*, 165–170.
- (82) Arifin, D. R.; Palmer, A. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2172–2181.
- (83) Rameez, S.; Alostta, H.; Palmer, A. F. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1025–1032.
- (84) Lomas, H.; Canton, I.; MacNeil, S.; Du, J.; Armes, S. P.; Ryan, A. J.; Lewis, A. L.; Battaglia, G. *Adv. Mater.* **2007**, *19* (23), 4238–4243.
- (85) Christian, D.; Cai, S.; Bowen, D. M.; Kim, Y.; Pajerowski, J. D.; Discher, D. E. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *71* (3), 463–474.
- (86) Upadhyay, K. K.; Bhatt, A. N.; Castro, E.; Mishra, A. K.; Chuttani, K.; Dwarakanath, B. S. Schatz, C.; Le Meins, J. F.; Misra, A.; Lecommandoux, S. *Macromol. Biosci.* **2010**, *10*, 503–512.
- (87) Yang, X.; Grailer, J. J.; Rowland, I. J.; Javadi, A.; Hurley, S. A.; Matson, V. Z.; Steeber, D. A.; Gong, S. *ACS Nano* **2010**, *4*, 6805–6817.
- (88) Brinkhuis, R. P.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M. *Polym. Chem.* **2011**, *2* (7), 1449.
- (89) Lee, J. S.; Feijen, J. *J. Control. Release* **2012**, *161* (2), 473–483.
- (90) De Oliveira, H.; Thevenot, J.; Lecommandoux, S. *Nanomedicine and nanobiotechnology* **2012**, *4* (5), 525–546.
- (91) Liu, G.-Y.; Chen, C.-J.; Ji, J. *Soft Matter* **2012**, *8* (34), 8811.
- (92) Pawar, P. V.; Gohil, S. V.; Jain, J. P.; Kumar, N. *Polym. Chem.* **2013**, *4* (11), 3160.
- (93) Bleul, R.; Maskos, M. In *Bio- and Bioinspired Nanomaterials*; Ruiz-Molina, D., Novi, F., Roscini, C., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2014.
- (94) Anajafi, T.; Mallik, S. *Ther. Deliv.* **2015**, *6* (4), 521–534.
- (95) Li, M.-H.; Keller, P. *Soft Matter* **2009**, *5* (5), 927.

- (96) Onaca, O.; Enea, R.; Hughes, D. W.; Meier, W. *Macromol. Biosci.* **2009**, *9* (2), 129–139.
- (97) Meng, F.; Zhong, Z.; Feijen, J. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (2), 197–209.
- (98) Chécot, F.; Lecommandoux, S.; Klok, H.; Gnanou, Y. *Eur. Phys. J. E. Soft Matter* **2003**, *10* (1), 25–35.
- (99) Cerritelli, S.; Velluto, D.; Hubbell, J. A. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (6), 1966–1972.
- (100) Meng, F.; Hiemstra, C.; Engbers, G. H. M.; Feijen, J. *Macromolecules* **2003**, *36* (9), 3004–3006.
- (101) Ghoroghchian, P. P.; Li, G.; Levine, D. H.; Davis, K. P.; Bates, F. S.; Hammer, D. a.; Therien, M. J. *Macromolecules* **2006**, *39* (5), 1673–1675.
- (102) Hales, M.; Barner-Kowollik, C.; Davis, T. P.; Stenzel, M. H. *Langmuir* **2004**, *20* (25), 10809–10817.
- (103) Rodriguez, A. R.; Kramer, J. R.; Deming, T. J. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (10), 3610–3614.
- (104) Qin, S. H.; Geng, Y.; Discher, D. E.; Yang, S. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 2905–2909.
- (105) Tong, X.; Wang, G.; Soldera, A.; Zhao, Y. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (43), 20281–20287.
- (106) Zhou, W.; Meng, F.; Engbers, G. H. M.; Feijen, J. *J. Control. Release* **2006**, *116* (2), 62–64.
- (107) Wang, X.; Liu, G.; Hu, J.; Zhang, G.; Liu, S. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53* (12), 3138–3142.
- (108) Gaitzsch, J.; Appelhans, D.; Gräfe, D.; Schwille, P.; Voit, B. *Chem. Comm.* **2011**, *47*, 3466–3468.
- (109) Gaitzsch, J.; Canton, I.; Appelhans, D.; Battaglia, G.; Voit, B. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (12), 4188–4195.
- (110) Van Dongen, S. F. M.; Nallani, M.; Cornelissen, J. J. L. M.; Nolte, R. J. M.; Van Hest, J. C. M. *Chem. - A Eur. J.* **2009**, *15* (5), 1107–1114.
- (111) Meier, W.; Nardin, C.; Winterhalter, M. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2000**, *39* (24), 4599–4602.
- (112) Graff, A.; Sauer, M.; Van Gelder, P.; Meier, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (8), 5064–5068.
- (113) Kumar, M.; Grzelakowski, M.; Zilles, J.; Clark, M.; Meier, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (52), 20719–20724.
- (114) Graff, A.; Fraysse-Ailhas, C.; Palivan, C. G.; Grzelakowski, M.; Friedrich, T.; Vebert, C.; Gescheidt, G.; Meier, W. *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211* (2), 229–238.
- (115) Pata, V.; Dan, N. *Biophys. J.* **2003**, *85* (4), 2111–2118.

- (116) Ehrlich, P. *Int. Wochenschrift für Wissenschaft, Kunst und Tech.* **1907**, *1*, 125–132.
- (117) Ringsdorf, H. J. *Polym. Sci. Polym. Symp.* **1975**, *51* (1), 135–153.
- (118) Nakaoka, R.; Tabata, Y.; Yamaoka, T.; Ikada, Y. *J. Control. Release* **1997**, *46* (3), 253–261.
- (119) Fox, M. E.; Szoka, F. C.; Fréchet, J. M. J. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42* (8), 1141–1151.
- (120) Duncan, R. *Adv. Polym. Sci.* **1984**, *57*, 51–101.
- (121) Duncan, R.; Dimitrijevic, S.; Evagorou, E. G. *STP Pharma Sci.* **1996**, *6*, 237–263.
- (122) Duncan, R. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2* (5), 347–360.
- (123) Donaruma, L. G. *Prog. Polym. Sci.* **1974**, *4*, 1–25.
- (124) *Handbook of Anticancer Drug Development*; Budman, D. R., Calvert, A. H., Rowinsky, E. K., Eds.; Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, 2003.
- (125) Veronese, F. M.; Harris, J. M. *Adv. Drug Del. Syst.* **2002**, *54*, 453–609.
- (126) Harris, J. M.; R.B., C. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 214–221.
- (127) Masayuki, Y.; Mizue, M.; Noriko, Y.; Teruo, O.; Yasuhisa, S.; Kazunori, K.; Shohei, I. *J. Control. Release* **1990**, *11* (1-3), 269–278.
- (128) Kabanov, A. V.; Felgner, P. L.; Seymour, L. W. *Self-assembling Complexes for Gene Delivery. From Laboratory to Clinical Trial*; Wiley: Chichester, 1998.
- (129) Vicent, M. J.; Duncan, R. *Trends Biotechnol.* **2006**, *24* (1), 39–47.
- (130) Zhang, L.; Gu, F. X.; Chan, J. M.; Wang, A. Z.; Langer, R. S.; Farokhzad, O. C. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**, *83* (8), 761–769.
- (131) Duncan, R.; Vicent, M. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65* (1), 60–70.
- (132) Sun, T.; Zhang, Y. S.; Pang, B.; Hyun, D. C.; Yang, M.; Xia, Y. *Angew. Chemie* **2014**, *126* (46), 12520–12568.
- (133) Matsumura, Y.; Maeda, H. *Cancer Res.* **1986**, *46* (December), 6387–6392.
- (134) Aruna, U.; Rajalakshmi, R.; Muzib, Y. I.; Vinesha, V.; Sushma, M.; Vandana, K. R.; Kumar, N. V. *Inter. J. Inn. Pharm. Res.* **2013**, *4*, 318–324.
- (135) Nori, A.; Jensen, K. D.; Tijerina, M.; Kopečková, P.; Kopeček, J. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14* (1), 44–50.
- (136) Pirollo, K. F.; Chang, E. H. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26* (10), 552–558.
- (137) Farokhzad, O. C.; Langer, R. *ACS Nano* **2009**, *3* (1), 16–20.
- (138) Low, P. S.; Kularatne, S. A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13* (3), 256–262.
- (139) Wagner, E.; Curiel, D.; Cotten, M. *Adv Drug Deliv Rev* **1994**, *14*, 113–135.
- (140) Tang, Y.; Scollard, D.; Chen, P.; Wang, J.; Holloway, C.; Reilly, R. M. *Nucl Med Commun* **2005**, *26*, 427–432.

- (141) Neri, D.; Bicknell, R. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5* (6), 436–446.
- (142) Irache, J. M.; Salman, H. H.; Gamazo, C.; Espuelas, S. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5*, 703–724.
- (143) Sprincl, L.; Exner, J.; Stěrba, O.; Kopecek, J. *J. Biomed. Mater. Res.* **1976**, *10* (6), 953–963.
- (144) Říhová, B.; Kopecek, J.; Ulbrich, K.; Chytrý, V. *Makromol. Chemie* **1985**, *24*, 13–24.
- (145) Rihova, B.; Bilej, M.; Vetvicka, V.; Ulbrich, K.; Strohalm, J.; Kopecek, J.; Duncan, R. *Biomaterials* **1989**, *10*, 335–342.
- (146) Říhová, B.; Kovář, M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (2), 184–191.
- (147) Duncan, R.; Seymour, L. W.; O'Hare, K. B.; Flanagan, P. a.; Wedge, S.; Hume, I. C.; Ulbrich, K.; Strohalm, J.; Subr, V.; Spreafico, F.; Grandi, M.; Ripamonti, M.; Farao, M.; Suarato, a. *J. Control. Release* **1992**, *19* (1-3), 331–346.
- (148) Vasey, P. A.; Kaye, S. B.; Morrison, R.; Twelves, C.; Wilson, P.; Duncan, R.; Thomson, A. H.; Murray, L. S.; Hilditch, T. E.; Murray, T.; Burtles, S.; Fraier, D.; Frigerio, E.; Cassidy, J. *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5* (January), 83–94.
- (149) Duncan, R.; Seymour, L. C. W.; Scarlett, L.; Lloyd, J. B.; Rejmanova, P.; Kopecek, J. *Health Care (Don. Mills)*. **1986**, *880*, 62–71.
- (150) Seymour, L. W.; Ferry, D. R.; Anderson, D.; Hesslewood, S.; Julyan, P. J.; Poyner, R.; Doran, J.; Young, A. M.; Burtles, S.; Kerr, D. J.; Committee, for the C. R. C. P. I. C. T. *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20* (6), 1668–1676.
- (151) Lin, X.; Zhang, Q.; Rice, J. R.; Stewart, D. R.; D.P.Nowotnik; S.B.Howell. *Eur. J. Cancer* **2004**, *40*, 291–297.
- (152) Rademaker-Lakhai, J. M.; C. Terret, S. B. H.; Baud, C. M.; De Boer, R. F.; Pluim, D.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H.; Droz, J. P. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *15*, 3386–3395.
- (153) Rice, J. R.; Gerberich, J. L.; Nowotnik, D. P.; Howell, S. B. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 2248–2254.
- (154) Campone, M.; Rademaker-Lakhai, J. M.; Bennouna, J.; Howell, S. B.; Nowotnik, D. P.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2007**, *60*, 523–533.
- (155) Nowotnik, D. P.; Cvitkovic, E. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 1214–1219.
- (156) Schoemaker, N. E.; Kesteren, C. van; Rosing, H.; Jansen, S.; Swart, M.; Lieverst, J.; Fraier, D.; Breda, M.; Pellizzoni, C.; Spinelli, R.; Grazia, P. M.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H.; Bokkel Huinink, W. W. *Br. J. Cancer* **2002**, *87*, 608–617.
- (157) Terwogt, J. M. M.; Huinink, W. W. ten B.; Schellens, J. H. M.; Schot, M.; Mandjes, I. A. M.; Zurlo, M. G.; Rocchetti, M.; Rosing, H.; Koopman, F. J.; Beijnen, J. H. *Anticancer Drugs* **2001**, *12*, 315–323.
- (158) Duncan, R.; Vicent, M. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (2), 272–282.
- (159) Liu, X.-M.; Miller, S. C.; Wang, D. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (2), 258–271.

- (160) Miller, S. C.; Pan, H.; Wang, D.; Bowman, B. M.; Kopečková, P.; Kopeček, J. *Pharm. Res.* **2008**, *25* (12), 2889–2895.
- (161) Liu, X. M.; Quan, L. D.; Tian, J.; Alnouti, Y.; Fu, K.; Thiele, G. M.; Wang, D. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 2910–2919.
- (162) Nan, A.; Croft, S. L.; Yardley, V.; Ghandehari, H. *J. Control. Release* **2004**, *94*, 115–127.
- (163) Jensen, J. D.; Kopeckova, P.; Kopeček, J. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 975–984.
- (164) Talelli, M.; Rijcken, C. J. F.; van Nostrum, C. F.; Storm, G.; Hennink, W. E. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (2), 231–239.
- (165) Schellinger, J. G.; Pahang, J. a.; Johnson, R. N.; Chu, D. S. H.; Sellers, D. L.; Maris, D. O.; Convertine, A. J.; Stayton, P. S.; Horner, P. J.; Pun, S. H. *Biomaterials* **2013**, *34* (9), 2318–2326.
- (166) Kelsch, A.; Tomcin, S.; Rausch, K.; Barz, M.; Maila, V.; Schmidt, M.; Landfester, K.; Zentel, R. *Biomacromolecules* **2012**.
- (167) Lundy, B. B.; Convertine, A.; Miteva, M.; Stayton, P. S. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24* (3), 398–407.
- (168) Hemmelmann, M.; Knoth, C.; Schmitt, U.; Allmeroth, M.; Moderegger, D.; Barz, M.; Koynov, K.; Hiemke, C.; Rösch, F.; Zentel, R. *Macromol. Rapid Commun.* **2011**, *32* (9-10), 712–717.
- (169) Herth, M.; Barz, M.; Moderegger, D.; Allmeroth, M.; Jahn, M.; Thews, O.; Zentel, R.; Ro, F. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1697–1703.
- (170) Jenkins, A. D.; Jones, R. G.; Moad, G. *Pure Appl. Chem.* **2009**, *82* (2), 483–491.
- (171) Kato, M.; Kamigaito, M.; Sawamoto, M.; Higashimuras, T. *Macromolecules* **1995**, *28*, 1721–1723.
- (172) Wang, J.-S.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **1995**, *28* (23), 7901–7910.
- (173) Chiefari, J.; Chong, Y. K. B.; Ercole, F.; Krstina, J.; Jeffery, J.; Le, T. P. T.; Mayadunne, R. T. A.; Meijs, G. F.; Moad, C. L.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H.; South, C. *Macromolecules* **1998**, *31*, 5559–5562.
- (174) Salomon, D. H.; Rizzardo, E.; Cacioli, P.; 1985; Polymerization process and polymers produced thereby. US Patent 4,581,429, 1985.
- (175) Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Aust. J. Chem.* **2012**, *65*, 985–1076.
- (176) Moad, G.; Barner-Kowollik, C. In *Handbook of RAFT Polymerization*; Barner-Kowollik, C., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2008.
- (177) Moad, G.; Rizzardo, A. E.; A, S. H. T. *Aust. J. Chem.* **2006**, 669–692.
- (178) Cunningham, W. a. *J. Chem. Educ.* **1935**, *12* (3), 120–124.
- (179) Günay, K. A.; Theato, P.; Klok, H.-A. In *Functional Polymers by Post-Polymerization Modification*; Theato, P., Klok, H.-A., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2013.
- (180) Wieland, T.; Schäfer, W.; Bokelmann, E. *Ann. der Chemie* **1951**, *7*, 99–104.

- (181) Schwyzer, R.; Iselin, B.; Feurer, M. *Helv. Chim. Acta* **1954**, *1* (7), 69–79.
- (182) Farrington, J. A.; Hextall, P. J.; Kenner, G. W.; Turner, J. M. *J. Chem. Soc.* **1957**, 1407–1413.
- (183) Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (9), 1839–1842.
- (184) Batz, H. G.; Franzmann, G.; Ringsdorf, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1972**, *11* (12), 1103–1104.
- (185) Ferruti, P.; Bettelli, A.; Feré, A. *Polymer (Guildf)*. **1972**, *13*, 462–464.
- (186) Gauthier, M. A.; Gibson, M. I.; Klok, H.-A. *Angew. Chemie* **2009**, *121* (1), 50–60.
- (187) Theato, P. *J. Polym. Sci. Part A-Polymer Chem.* **2008**, *46* (3), 6677–6687.
- (188) Kakuchi, R.; Theato, P. In *Functional Polymers by Post-Polymerization Modification*; Theato, P., Klok, H.-A., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2013.
- (189) Roth, P. J.; Jochum, F. D.; Zentel, R.; Theato, P. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 238–244.
- (190) Eberhardt, M.; Théato, P. *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, *26* (18), 1488–1493.
- (191) Eberhardt, M.; Mruk, R.; Zentel, R.; Théato, P. *Eur. Polym. J.* **2005**, *41* (7), 1569–1575.
- (192) Barz, M.; Tarantola, M.; Fischer, K.; Schmidt, M.; Luxenhofer, R.; Janshoff, A.; Theato, P.; Zentel, R. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (11), 3114–3118.
- (193) Tappertzhofen, K.; Bednarczyk, M.; Koynov, K.; Bros, M.; Grabbe, S.; Zentel, R. *Macromol. Biosci.* **2014**, *14* (10), 1444–1457.
- (194) Tappertzhofen, K.; Weiser, F.; Montermann, E.; Reske-Kunz, A.; Bros, M.; Zentel, R. *Macromol. Biosci.* **2015**, n/a – n/a.
- (195) Klibanov, L.; Maruyama, K.; Torchilin, V. P.; Huang, L. *FEBS Lett.* **1990**, *268* (1), 235–237.
- (196) Hamburger, R.; Azaz, E.; Donbrow, M. *Pharm Acta Helv* **1975**, *50*, 10–17.
- (197) Moghimi, S. M.; Hunter, a C.; Dadswell, C. M.; Savay, S.; Alving, C. R.; Szebeni, J. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1689* (2), 103–113.
- (198) Ishida, T.; Kiwada, H. *Int. J. Pharm.* **2008**, *354* (1-2), 56–62.
- (199) Ostuni, E.; Chapman, R. G.; Holmlin, R. E.; Takayama, S.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **2001**, *17* (18), 5605–5620.
- (200) Lau, K. H. A.; Ren, C.; Sileika, T. S.; Park, S. H.; Szleifer, I.; Messersmith, P. B. *Langmuir* **2012**, *28*, 16099–16107.
- (201) Sun, J.; Zuckermann, R. N. *ACS Nano* **2013**, *7* (6), 4715–4732.
- (202) Huesmann, D.; Sevenich, A.; Weber, B.; Barz, M. *Polymer (Guildf)*. **2015**, *67*, 240–248.

- (203) Heller, P.; Birke, A.; Huesmann, D.; Weber, B.; Fischer, K.; Reske-Kunz, A.; Bros, M.; Barz, M. *Macromol. Biosci.* **2014**, 1380–1395.
- (204) Birke, A.; Huesmann, D.; Kelsch, A.; Weilbacher, M.; Xie, J.; Bros, M.; Bopp, T.; Becker, C.; Landfester, K.; Barz, M. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 548–557.
- (205) Allmeroth, M.; Moderegger, D.; Gündel, D.; Buchholz, H. G.; Mohr, N.; Koynov, K.; Rösch, F.; Thews, O.; Zentel, R. *J. Control. Release* **2013**, *172* (1), 77–85.
- (206) Hemmelmann, M.; Kurzbach, D.; Koynov, K.; Hinderberger, D.; Zentel, R. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (12), 4065–4074.
- (207) Houben, J. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1906**, *39*, 3219–3233.
- (208) Thang, S. H.; Chong, B. Y. K.; Mayadunne, R. T. a; Moad, G.; Rizzardo, E. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40* (12), 2435–2438.
- (209) Aamer, K. A.; Tew, G. N. *J. Polym. Sci., Part A Polym. Chem.* **2007**, *47*, 4289–4301.
- (210) Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. *Aust. J. Chem.* **2005**, *58* (6), 379.
- (211) Soininen, P. Quantitative ¹H NMR Spectroscopy - Chemical and Biological Applications, University of Kuopio, 2008.
- (212) Roth, P. J.; Kessler, D.; Zentel, R.; Theato, P. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2009**, No. February, 3118–3130.
- (213) Pissuwan, D.; Boyer, C.; Gunasekaran, K.; Davis, T. P.; Bulmus, V. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 412–420.
- (214) Perrier, S.; Takolpuckdee, P.; Mars, C. A. *Macromolecules* **2005**, *38* (6), 2033–2036.
- (215) Mohr, N.; Barz, M.; Forst, R.; Zentel, R. *Macromol. Rapid Commun.* **2014**.
- (216) Montes, L.-R.; Alonso, A.; Goñi, F. M.; Bagatolli, L. a. *Biophys. J.* **2007**, *93* (10), 3548–3554.
- (217) Klein, N. Protein-Protein- und Protein-Lipid-Wechselwirkungen beeinflussen die Oligomerisierung und Funktion des E. coli Aquaglyceroporins GlpF, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 2015.
- (218) Konak, C.; Rathi, R. C.; Kopeckova, P.; Kopecek, J. *Polymer (Guildf).* **1993**, *34* (22), 4767–4773.
- (219) Hasse, H.; Kany, H. P.; Tintinger, R.; Maurer, G. *Macromolecules* **1995**, *28* (10), 3540–3552.
- (220) Kratochvil, P. In *Polymer Science Library 5*; Jenkins, A. D., Ed.; Elsevier: Philadelphia, 1987.
- (221) Kalyanasundaram, J. K.; Thomas, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (conformation D), 2039–2044.
- (222) Haley, B.; Frenkel, E. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Invest.* **2008**, *26* (1), 57–64.
- (223) Parnell, A. J.; Tzokova, N.; Topham, P. D.; Adams, D. J.; Adams, S.; Fernyhough, C. M.; Ryan, A. J.; Jones, R. A. L. *Faraday Discuss.* **2009**, *143*, 29–46.

- (224) Massing, U.; Cicko, S.; Ziroli, V. *J. Control. Release* **2008**, *125* (1), 16–24.
- (225) Holmes, D. L.; Stellwagen, N. C. *Electrophoresis* **1990**, *11* (1), 5–15.
- (226) Mattei, B.; França, A. D. C.; Riske, K. a. *Langmuir* **2014**.
- (227) Pata, V.; Ahmed, F.; Discher, D. E.; Dan, N. *Langmuir* **2004**, *20* (10), 3888–3893.
- (228) Nuhn, L.; Schüll, C.; Frey, H.; Zentel, R. *Macromolecules* **2013**, *46* (8), 2892–2904.
- (229) Beinert, G.; Hild, G.; Rempp, P. *Makromol. Chem.* **1974**, *175*, 2069.
- (230) Zhang, D.; Zhang, H.; Nie, J.; Yang, J. *Polym. Int.* **2010**, *59* (7), 967–974.
- (231) Louage, B.; Zhang, Q.; Vanparijs, N.; Voorhaar, L.; Castele, S. Vande; Hennink, W. E.; Bocxlaer, J. Van; Hoogenboom, R.; Geest, B. G. De. *Biomacromolecules* **2014**.
- (232) Lomora, M.; Garni, M.; Itef, F.; Tanner, P.; Spulber, M.; Palivan, C. G. *Biomaterials* **2015**, *53*, 406–414.
- (233) Muhammad, N.; Dworeck, T.; Fioroni, M.; Schwaneberg, U. *J. Nanobiotechnology* **2011**, *9* (1), 8.
- (234) Marsden, H. R.; Quer, C. B.; Sanchez, E. Y.; Gabrielli, L.; Jiskoot, W.; Kros, A. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (4), 833–838.
- (235) Kumar, M.; Habel, J. E. O.; Shen, Y.; Meier, W. P.; Walz, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (45), 18631–18637.
- (236) Barz, M.; Luxenhofer, R.; Zentel, R.; Vicent, M. J. *Polym. Chem.* **2011**, *2* (9), 1900.
- (237) Heller, P.; Mohr, N.; Birke, A.; Weber, B.; Reske-Kunz, A.; Bros, M.; Barz, M. *Macromol. Biosci.* **2015**, *15* (1), 63–73.
- (238) Oya, M.; Katakai, R.; Nakai, H.; Iwakura, Y. *Chem. Lett.* **1973**, *2*, 1143–1144.
- (239) Iatrou, H.; Frielinghaus, H.; Hanski, S.; Ferderigos, N.; Ruokolainen, J.; Ikkala, O.; Richter, D.; Mays, J.; Hadjichristidis, N. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (7), 2173–2181.
- (240) Tian, B.; Tao, X.; Ren, T.; Weng, Y.; Lin, X.; Zhang, Y.; Tang, X. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22* (34), 17404.
- (241) Lammers, T.; Ulbrich, K. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 119–121.
- (242) Kopeček, J.; Kopecková, P. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (2), 122–149.
- (243) van den Berg, J. H.; Oosterhuis, K.; Hennink, W. E.; Storm, G.; van der Aa, L. J.; Engbersen, J. F. J.; Haanen, J. B. a G.; Beijnen, J. H.; Schumacher, T. N.; Nuijen, B. *J. Control. Release* **2010**, *141* (2), 234–240.
- (244) Rausch, K.; Reuter, A.; Fischer, K.; Schmidt, M. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2836–2839.
- (245) Becker, A.; Köhler, W.; Müller, B. *Ber. Bunsen-Ges.* **1999**, *4*, 600–608.

(246) Laemmli, U. *Nature* **1970**, 224, 680–685.

Abkürzungsverzeichnis

Eine vollständige Auflistung der Abkürzungen verwendeter Chemikalien findet sich in Kapitel 5.1.

Abb.	Abbildung
ACF	Autokorrelationsfunktion
Ar-	Aryl-
ATRP	Atom Transfer Radical Polymerization
-b-	Blockcopolymer
BMDC	bone marrow-derived dendritic cell
br	breites Signal
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CM	Compound-Mizelle
CMC	critical micelle concentration
cpp	critical packing parameter
cryoTEM	cryogene Transmissionselektronenmikroskopie
CTA	chain transfer agent
d	Dublett
-dendr-	dendritisches Polymer
d. Theorie	der Theorie
Đ	Dispersität
D _a	apparenter Diffusionskoeffizient
DC	dendritische Zelle
DDEMA	2-(2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethylmethacrylat
DHPA	2,3-Dihydroxypropylamin
DHPMA	2,3-Dihydroxypropyl-methacrylamid
DLS	dynamische Lichtstreuung
dn/dc	Brechungsindexinkrement

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZ	duale Zentrifugation
EE	Einschlusseffizienz
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
<i>engl.</i>	englisch
EPR	enhanced permeability and retention
eq.	Äquivalente
f	Gewichtsanteil des hydrophilen Blocks am Gesamtgewicht
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GPC	Gelpermeationschromatographie
GUV	giant unilamellar vesicle
HPA	2-Hydroxypropylamin
HPMA	2-Hydroxypropyl-methacrylamid
ig	inverse-gated
ITO	Indiumzinnoxid
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kDa	Kilodalton
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
Leu	Leucin
LMA	Laurylmethacrylat
LPR	Lipid-zu-Protein-Verhältnis
LUV	large unilamellar vesicle
m	Masse; oder: Multiplett
<i>m-</i>	meta-
Mann	Mannose
mbar	Millibar
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
mL	Milliliter

MLV	multilamellar vesicle
mM	Millimol
M_n	Zahlenmittel der Molmasse
mol%	prozentualer Stoffmengenanteil
MPS	mononukleären Phagozytensystem
ms	Millisekunde
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
M_w	Massenmittel der Molmasse
n	Anzahl
$N_{2,l}$	flüssiger Stickstoff
NCA	<i>N</i> -Carboxyanhydrid
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
NMP	Nitroxide-Mediated Polymerization
NMR	Kernspinresonanz
<i>o</i> -	ortho-
OBn	Benzyl-Schutzgruppe
<i>p</i> -	para-
<i>p.a.</i>	zur Analyse
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionen- konzentration
Phe	Phenylalanin
PFP	Pentafluorphenyl
PFPMA	Pentafluorphenylmethacrylat
PoPR	Polymer-zu-Protein-Verhältnis
ppm	parts per million
q	Quartett
RAFT	Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer
RDRP	reversible-deactivation radical polymerization
RI	Brechungsindex
R_h	hydrodynamischer Radius

R_g	Trägheitsradius
RNA	Ribonukleinsäure
s	Singulett
-stat-	statistisches Copolymer
Sar	Sarkosin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Poly(acrylamid)-Gelelektrophorese
siRNA	kleine eingreifende RNA
SLS	statische Lichtstreuung
SUV	small unilamellar vesicle
t	Zeit; oder: Triplett
$T_{1/2}$	Halbwertszeit
TLR9	Toll-like-Rezeptor 9
μm	Mikrometer
UV	Ultraviolett
Vis	Visible
χ	Stoffmengenanteil
X_n	Polymerisationsgrad
z.B.	zum Beispiel

Publikationen

- 2015 M. Scherer, K. Fischer, F. Depoix, T. Fritz, R. Thiermann, K. Mohr, R. Zentel, Pentafluorophenyl Ester-based Polymersomes as Nano-Sized Drug Delivery Vehicles, *Macromol. Rapid Commun.* 37 (2016), 60-66.
- 2014 M. Scherer, P. Scheibe, J. Schoenhentz, A. Hoffmann-Röder, R. Zentel, Patterned monomolecular films from polymerizable and fluorinated lipids for the presentation of glycosylated lipids, *Colloid Polym. Sci.* 292 (2014), 1803-1815.
- A. Hermann, R. Mruk, R. F. Roskamp, M. Scherer, L. Ma, R. Zentel, Poly(*N*-isopropylacrylamide)-Modified Styrene-Butadiene Rubber as Thermo-responsive Material, *Macromol. Chem. Phys.* 215 (2014), 32-43.
- 2013 P. Heller*, D. Huesmann*, M. Scherer*, M. Barz* (*equally contributing): From Polymers to Nanomedicines: New Materials for Future Vaccines. in "Molecular Vaccines: From Prophylaxis to Therapy", Springer Vienna/New York (M. Giese, Ed.), 2013.

Danksagung

- aus Datenschutzgründen gelöscht -