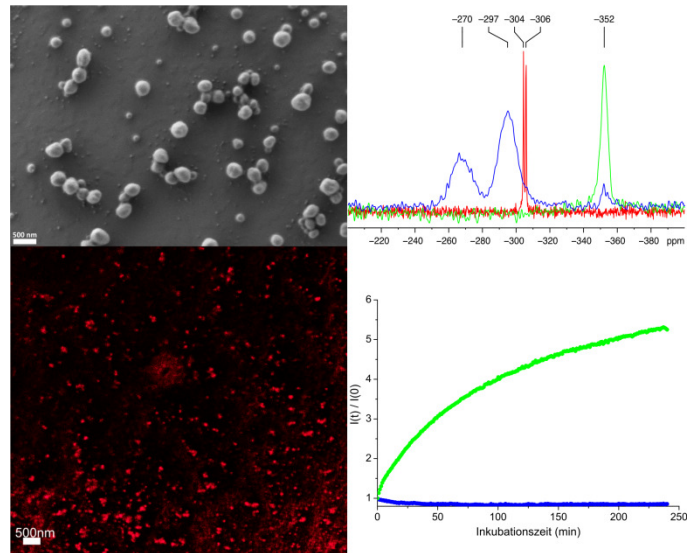


Synthese von selektiv Protease-spaltbaren Nanopartikeln



Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Chemie
am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes-Gutenberg Universität
in Mainz

Matthias Maier

geb. in Wangen im Allgäu

Mainz, den 08.08.2011

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2008 bis August 2011 im Max-Planck-Institut für Polymerforschung in Mainz unter der Anleitung von durchgeführt.



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Max-Planck-Institut für Polymerforschung
Max Planck Institute for Polymer Research



Amtierender Dekan

1. Gutachterin
2. Gutachter

Tag der mündlichen Prüfung:

12.12.2011

Für meine Familie

Inhalt

1. Einleitung	1
2. Grundlagen der Festphasenpeptidsynthese	4
2.1 Das Prinzip der Festphasenpeptidsynthese	4
2.2 Vorteile der Festphasensynthese gegenüber der Synthese in Lösung.....	5
2.3 Geschichtliche Entwicklung der SPPS	5
2.4 Schutzgruppen der Peptidhauptkette - Fmoc und Boc.....	7
2.5 Schutzgruppen der Peptidseitenketten	7
2.6 Das Harz - polymerer Träger und Linker.....	8
2.7 Entschützung der wachsenden Peptidkette	10
2.8 Basen für die SPPS	11
2.9 Peptidkupplung	12
2.10 Additive - HOBt und Oxyma Pure.....	19
2.11 COMU - Ein Reagenz zur Amidbildung in Lösung	19
2.12 Abspaltung des Peptids vom Harz	20
2.13 Nicht kanonische Aminosäuren für die gezielte Peptidfunktionalisierung.....	21
3. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET).....	22
4. Enzyme.....	25
5. Die radikalische Copolymerisation	27
6. Peptid-Polymer-Konjugate.....	29
6.1 Definition der Peptid/Protein-Polymer-Konjugate	29
6.2 Einteilung der Peptid/Protein-Polymer-Konjugate	29
6.3 Synthesestrategien für die Peptid-Polymer-Konjugate	30
6.3.1 Die Peptidkomponente - Funktionalisierung einer Peptidsequenz.....	30
6.3.2 Die Polymerkomponente - Funktionalisierung des Polymers	32
6.3.3 Die direkte Kupplung	33
6.3.4 Die Verwendung von Peptidmakroinitiatoren - „grafting from“.....	37
6.3.5 Der inverse Ansatz	38
6.3.6 Einsatz eines Peptid(makro)monomers - „grafting through“	39
6.4 Anwendungen der Peptid-Polymer-Konjugaten	39

6.5 Enzymatisch spaltbare Peptid-Polymer-Konjugate.....	41
7. Formulierung von Nanopartikeln durch die Miniemulsionstechnik.....	44
8. Analysemethoden.....	46
8.1 Hochleistungsflüssigchromatographie.....	46
8.2 Gelpermeationschromatographie.....	47
8.3 Photonen-Kreuzkorrelations-Spektroskopie.....	48
8.4 ¹⁵ N-Festkörper-NMR-Spektroskopie.....	49
9. Aufgabenstellung und Syntheseplanung.....	52
10. Ergebnisse und Diskussion.....	55
10.1 Identifizierung der enzymatisch spaltbaren Peptidsequenzen.....	55
10.2 Das Polymer für die partikulären Systeme.....	57
10.2.1 Polymernomenklatur.....	57
10.2.2 Polymersynthese.....	57
10.2.3 Hinweis auf die Zusammensetzung der Copolymerketten.....	58
10.2.4 Polymeranalyse.....	60
10.2.5 Bestimmung der Copolymerzusammensetzung.....	60
10.2.6 Polymeranaloge Umsetzung von Poly(styrol- <i>co</i> -acrylsäure).....	62
10.2.7 Zusammenfassung.....	64
10.3 Enzymatisch spaltbare Nanopartikel der 1. Generation (GFF).....	65
10.3.1 Peptidsynthese von GFF-OH.....	65
10.3.2 Synthese der Peptid-Polymer-Konjugate.....	67
10.3.3 Synthese der Nanopartikel.....	71
10.3.4 Enzymatischer Abbau der Nanopartikel.....	74
10.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der 1. Generation.....	75
10.4 Enzymatisch spaltbare Nanopartikel der 2. Generation (Y _N GFFK _{Mant}).....	76
10.4.1 Peptidsynthese mit Anthranilsäure und ihren Derivaten.....	76
10.4.2 Synthese der Peptid-Polymer-Konjugate.....	91
10.4.3 Synthese der Nanopartikel.....	93
10.4.4 Enzymatischer Abbau der Y _N GFFK _{Mant} -vernetzten Nanopartikel.....	96
10.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der 2. Generation.....	97

10.5 Enzymatisch spaltbare Nanopartikel der 3. Generation ($K_{Mca}GFFK_{Dnp}$)	98
10.5.1 Synthese der Mca-basierten Peptide	98
10.5.2 Synthese der Peptid-Polymer-Konjugate	103
10.5.3 Synthese der $K_{Mca}FFGK_{Dnp}$ -vernetzten Nanopartikel	107
10.5.4 Enzymatischer Abbau der $K_{Mca}FFGK_{Dnp}$ -vernetzten Nanopartikel	110
10.5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der 3. Generation	112
10.6 Enzymatisch spaltbare Nanokapseln der 4. Generation ($K_{Mca}RQLRVVGGK_{Dnp}$)	113
10.6.1 Peptidsynthese - Die azido- oder propargylfunktionalisierte hydrophile Komponente...	113
10.6.2 Die azido- oder propargylfunktionalisierte hydrophobe Komponente	118
10.6.3 Synthese der Nanokapseln	118
10.6.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der 4. Generation	120
11. Experimenteller Teil	121
11.1 Materialien	121
11.2 Geräte und Probenvorbereitung	121
11.2.1 Festphasenpeptidsynthese mit automatisiertem Mikrowellensystem	121
11.2.2 1H - und ^{13}C -Kernspinresonanzspektroskopie	122
11.2.3 Diffusionsabhängige Kernspinresonanzspektroskopie	123
11.2.4 Festkörperkernspinresonanzspektroskopie	123
11.2.5 Matrix-assistierte Laser-Desorptions-Ionisations-Flugzeitmassenspektrometrie	123
11.2.6 Gelpermeationschromatographie	123
11.2.7 Hochleistungsflüssigchromatographie	124
11.2.8 Rasterelektronenmikroskopie	124
11.2.9 Photonen-Kreuzkorrelations-Spektroskopie	124
11.2.10 Ultraschallbehandlung	124
11.2.11 Infrarotspektroskopie (IR)	125
11.2.12 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	125
11.3 Methoden	125
11.3.1 Ninhydrintest	125
11.4. Synthesen	125
11.4.1 Polymersynthese	125

11.4.2 Synthese der fluoreszierenden Aminosäuren.....	128
11.4.3 Synthese der Reagenzien zur Verwendung in der Clickchemie	131
11.4.4 Festphasenpeptidsynthese.....	133
11.4.5 Synthese der Peptid-Polymer-Konjugate.....	135
11.4.6 Synthese vernetzter Polymernanopartikel in inverser Miniemulsion	138
12. Zusammenfassung/Summary.....	142
12.1 Zusammenfassung und Ausblick	142
12.2. Summary and outlook	144
13. Anhang	147
13.1 Die 20 kanonischen Aminosäuren.....	147
13.2 Reagenzien basierend auf 1 <i>H</i> -Benzotriazol	148
13.3 Chemikalienverzeichnis	149
13.4 Abkürzungen und Symbole.....	151
13.5 Analytik der synthetisierten Verbindungen.....	153
13.5.1 Polymeranalytik.....	153
13.5.2 Analytik der fluoreszierenden Aminosäuren	153
13.5.3 Analytik der Reagenzien zur Verwendung in der Clickchemie.....	155
13.5.4 Analytik der Peptide aus der Festphasenpeptidsynthese.....	156
13.5.5 Analytik der Peptid-Polymer-Konjugate	160
14. Literaturverzeichnis.....	162
15. Danksagung	170
Lebenslauf	171

1. Einleitung

Krebs ist eine der häufigsten Todesursachen des angehenden 21. Jahrhunderts. Unter dem Begriff „Krebs“ werden alle bösartigen Neubildungen einschließlich der Lymphome und Leukämien zusammengefasst. Hauptrisikofaktoren sind vor allem Tabak- und Alkoholkonsum sowie Übergewicht und Bewegungsmangel. In Deutschland beträgt das Risiko im Laufe seines Lebens an Krebs zu erkranken als Frau 38% und als Mann 47%. Bei Frauen ist die häufigste Krebsneuerkrankung mit 29% das Mammakarzinom (Brustkrebs), bei Männern mit 26% das Prostatakarzinom. Bei den Krebssterbefällen steht das Prostatakarzinom mit 10%, nach dem Bronchialkarzinom (Lungenkrebs, 26%) und dem kolorektalem Karzinom (Darmkrebs, 12%), an dritter Stelle.¹

Unter Prostatakrebs bzw. dem Prostatakarzinom versteht man eine bösartige Veränderung der Vorsteherdrüse (Prostata). Was diese Krebsart von anderen unterscheidet, ist das langsame und spät einsetzende Tumorwachstum. Davon abzugrenzen sind gutartige Veränderungen der Prostata, wie das Benigne Prostata-Syndrom (BPS) oder das Prostatitis-Syndrom. Das BPS ist eine „harmlose“ Vergrößerung der Prostata, die bei 50% der 60-jährigen und 90% der 80-jährigen Männer auftritt. Unter dem Prostatitis-Syndrom werden entzündliche Formen und nicht entzündliche chronische Schmerzsyndrome der Prostata zusammengefasst.²

Eine evidenzbasierte Prävention von Prostatakrebs, bei der Risikofaktoren noch vor ihrem Auftreten eliminiert werden, ist primär nicht möglich. Sekundär kann jedoch eine Vorbeugung über eine Früherkennung erreicht werden, wobei die bösartige Veränderung der Prostata idealerweise in einem möglichst frühen Stadium bemerkt werden soll, um dadurch die Chancen auf Heilung zu verbessern. Obwohl ab einem Alter von 45 Jahren eine jährliche, digital-rektale Untersuchung (DRU) von den gesetzlichen Krankenkassen übernommen wird, nehmen nur 18,3% der Männer in Deutschland dieses Angebot in Anspruch.² Der Erfolg dieser Methode zur Erkennung von Prostatakarzinomen ist zudem mit 2 - 5% sehr gering. Daneben wird die „transrektale Ultraschall“ (TRUS)-Untersuchung durchgeführt. Ein weiteres Verfahren ist die Bestimmung des „Prostata-spezifischen Antigens“ (PSA) im Blut. Ein großer Nachteil ist hierbei jedoch eine hohe Rate an falsch positiven Befunden. Individuelle Einflussgrößen wie die Größe der Vorsteherdrüse oder Infektionen können einen erhöhten PSA-Wert zur Folge haben, ohne dass ein Karzinom vorliegt. Klarheit kann hier nur eine Entnahme von Gewebeprobe(n) (invasive Prostatabiopsie) schaffen. Auch die falsch negative Diagnose ist aufgrund des Testergebnisses mittels PSA möglich, da durch diese „nur“ 75% aller asymptomatischen Karzinome der Prostata erkannt werden.² Aufgrund der aufgezeigten Defizite werden die genannten Methoden in Kombination verwendet.

Es existiert eine Reihe von Therapien bei Prostatakrebs. Bei organbegrenztem Tumor besteht die Möglichkeit einer Operation mit vollständiger Entfernung der Prostata (Prostatektomie), einer Bestrahlung (externe 3D-Konformationsbehandlung oder Brachytherapie), des kontrollierten Zuwartens („Watchful-Waiting“) oder einer Hormonentzugstherapie.

1. Einleitung

Der Erfolg dieser Therapien hängt jedoch entscheidend von einer frühen Erkennung des Karzinoms ab, da eine Heilung bei organüberschreitenden Tumoren bzw. Metastasen zunehmend schwieriger wird. Durch eine effektive Früherkennung können zudem Therapierisiken, wie z.B. Impotenz oder Harninkontinenz, zunehmend verringert werden. Aus diesen Gründen sollte es Ziel einer Früherkennung sein, den Tumor möglichst früh zu erkennen, um optimale Heilungschancen zu gewährleisten.²

Für den Einsatz als Screening-Methode, einer systematischen, flächendeckenden Untersuchung Gesunder, wird ein wissenschaftlich nachgewiesener Zusammenhang zwischen der Teilnahme an der Untersuchung und der Verringerung der Sterblichkeit bei akzeptabler Lebensqualität und akzeptablen Kosten vorausgesetzt. Diese Anforderung ist gegenwärtig für den PSA-Test nicht gegeben. Daraus wird ersichtlich, dass für die Zukunft eine neue, zuverlässigere, spezifischere und sensitivere Früherkennungsmethode für das Prostatakarzinom benötigt wird, welche einen möglichst untersuchungsnahen Befund liefert und idealerweise kostengünstig ist.²

Ein einfach anzuwendender Ansatz für eine neue Früherkennungsmethode wäre ein Nachweis des Tumors mit nicht-invasiven, optischen Methoden, da so ein untersuchungsnaher Befund gewährleistet ist. Da sich das Prostatakarzinom meistens im hinteren, das heißt zum Enddarm hin gelegenen Bereich der Vorsteherdrüse bildet und sich damit nicht weit im Körperinneren befindet, wäre die Schichtdicke an Gewebe hier gering genug, um von Licht im nahen Infrarotbereich durchdrungen zu werden. Durch den Einsatz eines sensitiven fluoreszierenden Markers wäre es so möglich, das gesamte Organ zu erfassen. Der Farbstoff soll im nahen Infrarotbereich anregbar sein und emittieren, wodurch eine hohe Sensitivität sowie eine große Eindringtiefe ins Gewebe vorhanden wäre. Für den unbeschädigten Transport zum Wirkort soll der Marker in polymere Nanotransporter eingebracht werden. Innerhalb der Strukturen kommt es aufgrund einer hohen Farbstoffkonzentration zum Phänomen des Fluoreszenzquenchings, wodurch der Farbstoff erst beim Austritt aus der Transportstruktur durch Verdünnung zu detektieren ist. Um den Farbstoff freizusetzen, sollen die Nanopartikel „Sollbruchstellen“ aufweisen, welche hoch selektiv durch die Serin-Protease Hepsin gespalten werden können. Hepsin wird im malignen Tumor überexprimiert und tritt in der gesunden Prostata nicht auf.³ Dies trägt sehr zu einer hohen Selektivität des Verfahrens bei. Die Formulierung in wässriger Dispersion würde eine einfache Applikation (kostengünstige Anwendung) bieten und ist durch die Anwendung des Miniemulsionsprozesses realisierbar. Diese Überlegungen bilden die Grundlage des interdisziplinären BMBF-Projekts, in dessen Rahmen diese Dissertation verfasst wurde.

Um die Idee dieser neuen Früherkennungsmethode zu realisieren, war das Ziel dieser Arbeit, zuerst anhand eines vereinfachten Modells, die Machbarkeit des Prinzips von Protease-spaltbaren Nanopartikeln zu zeigen. Die gesammelten Erfahrungen sollten dann auf die Protease Hepsin übertragen werden, um das Ziel der Synthese Hepsin-spaltbarer Nanokapseln unter Farbstoff-freisetzung zu erreichen.

Die Arbeit gliedert sich wie folgt: Nach einer Einführung in die Prinzipien der Festphasenpeptidsynthese wird kurz auf die Hintergründe des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) und der radikalischen Polymerisation eingegangen. Nachdem ein Überblick über die Materialklasse der Peptid-Polymer-Konjugate gezeigt wurde, wird kurz das Prinzip der Nanopartikelformulierung über den Miniemulsionsprozess erläutert. Im Folgenden werden die wichtigsten eingesetzten Analysemethoden, die Aufgabenstellung sowie die Syntheseplanung erläutert. Anschließend werden die vier Generationen an dargestellten, enzymatisch spaltbaren Nanopartikeln vorgestellt und dabei auf die Polymer- und Peptidkomponenten eingegangen, sowie die Ergebnisse diskutiert. Abschließend werden die experimentellen Details gezeigt und die Ergebnisse zusammengefasst. Im Anhang befinden sich weitere Strukturen, ein Überblick über die eingesetzten Chemikalien, Abkürzungen und Symbole und eine detaillierte Analytik der synthetisierten Verbindungen.

2. Grundlagen der Festphasenpeptidsynthese

In diesem Abschnitt werden die wichtigsten Grundlagen der Festphasenpeptidsynthese erläutert und auf die einzelnen Aspekte der Synthese eingegangen. Die hier nicht aufgeführten Strukturformeln, wie die der 20 kanonischen Aminosäuren, sind in Abschnitt 13.1 zu finden.

2.1 Das Prinzip der Festphasenpeptidsynthese

Die Festphasenpeptidsynthese (engl. Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS) basiert auf einer schrittweisen Anbindung von Aminosäuren an einen unlöslichen polymeren Träger - das sogenannte Harz (siehe Abbildung 1). Da die Anbindung über die Säuregruppe erfolgt, muss die Aminogruppe der Aminosäure durch eine Schutzgruppe wie 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) oder *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc) geschützt werden (siehe Abbildung 2). Nach der Entschützung der ersten polymergebundenen Aminosäure wird die nächste N-geschützte Aminosäure zugegeben. Die Kupplung der Aminosäure erfolgt durch ein Kupplungsreagenz unter Zugabe einer Base. Das Peptid wird schrittweise vom C- zum N-Terminus aufgebaut. Durch wiederholte Durchführung des Zyklus kann das Peptid bis zur gewünschten Länge aufgebaut werden. Dies bietet großes Potential für eine Automatisierung.

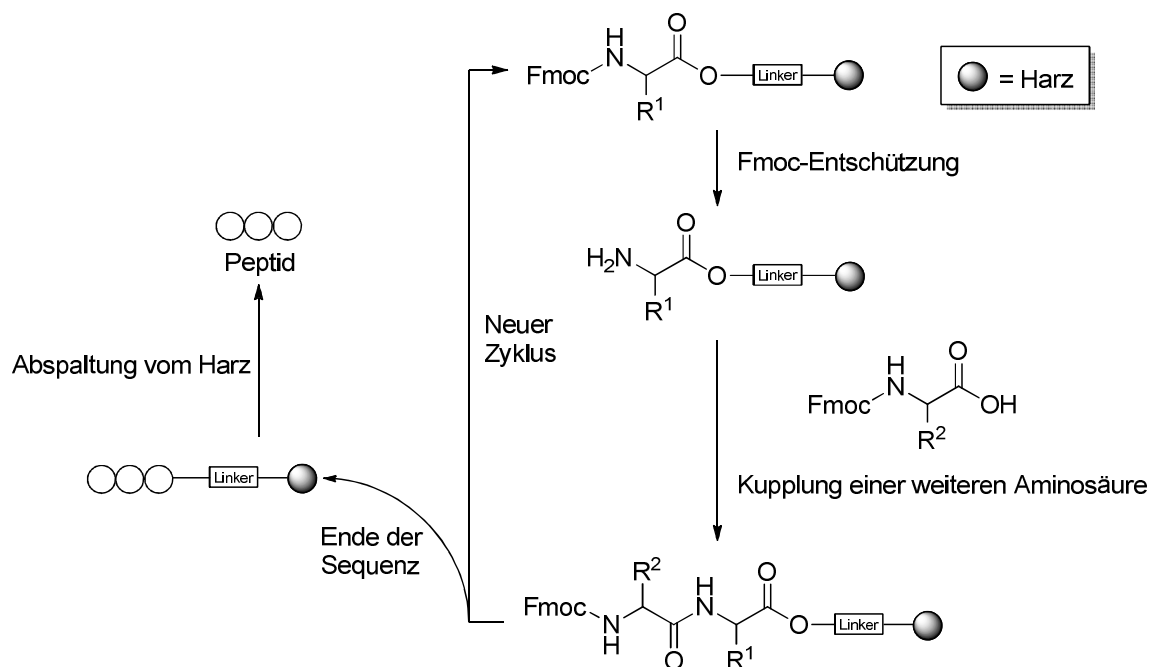


Abbildung 1: Prinzip der Festphasenpeptidsynthese.

Das Peptid ist über einen Linker an den polymeren Träger angebunden. Am Ende der Synthese erfolgt die Abspaltung des Peptids vom Harz mittels eines Abspaltungsreagenzes. Je nach gewähltem Linker kann dabei das Peptid als Säure oder als Amid freigesetzt werden (siehe 2.6 und 2.12). Die Schutzgruppen der Seitenketten der Aminosäuren können simultan zur Abspaltung des Peptids vom Harz entfernt werden. Bei der Wahl des richtigen Harzes und des richtigen Abspaltungsreagenzes ist es auch möglich, vollständig geschützte Peptide zu erhalten.

2.2 Vorteile der Festphasensynthese gegenüber der Synthese in Lösung

Die Verwendung von Harzen in der Festphasenpeptidsynthese bietet im Vergleich zur Peptidsynthese in Lösung folgende Vorteile:⁴

- Durch die Verwendung eines großen Überschusses an Reagenzien kann die Reaktion nahezu quantitativ durchgeführt werden;
- Die Frage der Löslichkeit der wachsenden Peptidkette stellt sich nicht;
- Überschüssige Reagenzien und lösliche Nebenprodukte können durch einfaches Waschen des Harzes quantitativ entfernt werden;
- Durch die kovalente Anbindung des Peptids werden Verluste des Produkts minimiert;
- Es besteht ein hoher Grad an Automatisierbarkeit der zu Quantitätssteigerung, enormer Zeitersparnis und geringerem Arbeitsaufwand führt.

Eingeschränkt einsetzbar ist die SPPS bei der Proteinsynthese (> 100 Aminosäuren). Außerdem kann die Synthese spezieller Aminosäurefolgen, aufgrund sterischer Wechselwirkungen, problematisch sein.⁵

2.3 Geschichtliche Entwicklung der SPPS

Die Entwicklung der automatisierten Festphasenmethode bis zu der in dieser Arbeit angewandten Form wird in diesem Kapitel kurz dargelegt.

Die erste in der Literatur beschriebene Peptidsynthese sowie die Prägung des Begriffs „Peptid“ erfolgten 1901 von Fischer und Fourneau.⁶ Die Entdeckung der ersten reversiblen Schutzgruppe - Carbobenzoxy (Cbz) - im Jahr 1932 geht auf Bergmann und Zervas zurück.⁷ Die Synthese eines aktiven Peptids mit Oxytocin ähnlicher Wirkung mittels „klassischer“ Peptidsynthese in Lösung gelang erstmals Du Vigneaud 1953.⁸ Da sich dieser Weg routinemäßig als sehr zeitaufwändig erwies, wurde bald nach Alternativen gesucht.

In den frühen 1960er Jahren schlug Merrifield die Verwendung eines auf Polystyrol-basierten Harzes für die Synthese von Peptiden vor. 1963 konnte er erfolgreich die Synthese eines Tetrapeptides auf Festphase durchführen.⁹ Dabei wurde Cbz als Schutzgruppe für die α -Aminosäuren, *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) als Kupplungsreagenz und HBr bzw. NaOH (Esterhydrolyse) für die Abspaltung des Peptides vom Harz angewandt. In den folgenden Jahren wurde die Festphasenpeptidsynthese modifiziert. So wurde 1967 *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc) als Schutzgruppe¹⁰ und Fluorwasserstoff (HF) als Abspaltungsreagenz¹¹ verwendet. Die erste Automatisierung des Prozesses unter Verwendung von Boc erfolgte durch Merrifield, Steward und Jernberg.¹² Der Prozess wurde im Laufe der 1970er und 1980er Jahre weiter verbessert¹³ und zur Synthese verschiedener Peptide verwendet.¹⁴⁻¹⁶ 1972 wurde 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) von Carpino als *N*- α -Schutzgruppe eingeführt.¹⁷ Da diese Gruppe mithilfe einer mittelstarken Base entfernt werden konnte, bot sich nun eine chemisch mildere Alternative zu Boc. Daher wurde Fmoc in den späten 1970er Jahren in die SPPS integriert. Es konnte damit ein orthogonaler Syntheseweg beschrritten werden, da Seitengruppen (z.B. COOH, OH, SH,...) mit *tert*-Butyl (*t*-Bu) geschützt und Hydroxymethylphenoxy-

basierte Linker als Harz verwendet wurden. So konnte auch die Aminosäure Tryptophan (Trp) eingesetzt werden, die bisher durch Nebenreaktionen des Indolrings in der Boc-basierten Synthese nicht eingesetzt werden konnte.¹⁸ Im Laufe der nächsten Jahre wurden bestehende Probleme, wie schlechte Löslichkeit der wachsenden Peptidketten oder langsamere Kupplungskinetik, beseitigt¹⁹⁻²¹ und so etablierte sich die Fmoc-basierte SPPS. Innerhalb der nächsten Jahre wurde die Festphasensynthese zunehmend verbessert. 1992 wurden erste Versuche unternommen, mithilfe von Mikrowellenstrahlung die Peptidsynthese zu beschleunigen.²²

Lange Zeit wurde dieses Feld vernachlässigt, da man annahm, dass unerwünschte Nebenreaktionen durch Mikrowelleneinwirkung begünstigt werden. Nach intensiver Entwicklung ist es mittlerweile nicht nur möglich, Peptide²³ innerhalb von wenigen Stunden anstatt in mehreren Tagen zu erhalten, sondern auch andere organischen Synthesen damit zu beschleunigen.²⁴ Der Erfolg dieses Prinzips zeigt sich unter anderem in der kommerziellen Verfügbarkeit von automatisierten Mikrowellen-basierten Peptidsynthesizern.²⁵

Mehrere Effekte erscheinen essentiell für die Reduktion der Reaktionszeit der Einzelschritte auf drei bis fünf Minuten. Eine ausführliche Diskussion über den Effekt von Mikrowellen auf die Reaktionsführung erfolgte bereits in zahlreichen Übersichtsartikeln.²⁶⁻²⁸

Die N-terminale Aminogruppe sowie das Peptidrückgrat sind polar und richten sich im alternierenden elektrischen Feld der Mikrowellen stetig neu aus. Diese Wellenbewegung führt zu einer Verminderung der Aggregation der Peptidketten, die aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen auftreten kann. Dadurch sind die wachsenden Peptidketten zugänglicher als bei der herkömmlichen SPPS.²⁹

Ein weiterer Aspekt ist die Möglichkeit einer effizienten, homogenen und sehr schnellen Temperaturerhöhung. Da in einem Mikrowellenfeld alle polaren Moleküle in Bewegung versetzt werden, wird das Reaktionsgefäß von innen heraus homogen erwärmt. Bei einem Ölbad hingegen erfolgt der Wärmeübertrag inhomogen von der Gefäßwand aus nach innen.³⁰ Die Möglichkeit, die Temperatur innerhalb von Sekunden zu ändern, trägt sehr zur Automatisierung des Prozesses bei. Weitere in der Literatur beschriebene Effekte der Mikrowelle sind unter anderem die Existenz von „Hotspots“³¹ oder von nichtthermischen Mikrowelleneffekten.³²

Potentielle negative Effekte der Mikrowellen bezüglich Racemisierung und Aspartimidbildung konnten durch Anpassung der Kupplungszeiten und der Reaktionstemperatur überwunden werden.³³

Zusammenfassend kann man sagen, dass es nicht nur zu einer Weiterentwicklung im Bereich der polymeren Träger, sondern auch bei den Kupplungsreagenzien, den Schutzgruppen der Seitenketten sowie bei den automatisierten Systemen gekommen ist. Der heutige Stand der Festphasenpeptidsynthese soll im Folgenden dargelegt werden.

2.4 Schutzgruppen der Peptidhauptkette - Fmoc und Boc

In der SPPS werden hauptsächlich zwei Strategien verfolgt - die Verwendung von Boc- oder Fmoc-geschützten Aminosäuren (siehe Abbildung 2).

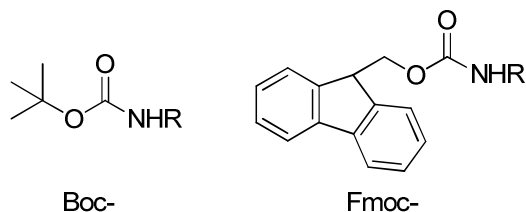


Abbildung 2: Struktur von *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc) und 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc).

Bei Verwendung der Boc-Gruppe¹⁰ für die Aminofunktionen der wachsenden Peptidkette basiert die Synthese auf der Labilität der Schutzgruppen gegenüber Säuren verschiedener Stärke. Die Schutzgruppen der Hauptkette (Boc) kann durch Verwendung von Trifluoressigsäure (engl.:trifluoroacetic acid, TFA) entfernt werden. Die Schutzgruppen der Seitenketten sowie das ans Harz gebundene Peptid sind stabil in Anwesenheit von TFA und werden erst durch die Anwendung sehr starker Säuren, wie wasserfreier Fluorwasserstoffsäure (HF) abgespalten (siehe 2.12).

Die Fmoc-Methode¹⁷ eröffnet die Möglichkeit des orthogonalen Einsatzes der Schutzgruppen. Bei diesem Ansatz wird die *basenlabile* Fmoc-Gruppe zum Schutz der wachsenden Peptidkette verwendet, die Schutzgruppen der Seitenkette sowie der Linker zum Harz hingegen sind *säurelabil*. Diese Strategie macht die Verwendung milderer Bedingungen unter Verwendung von TFA und Piperidin möglich, da die Entfernung der Schutzgruppen nach unterschiedlichen Mechanismen verläuft.

Aufgrund der hoch korrosiven Eigenschaften von HF, der daraus resultierenden Notwendigkeit der Verwendung von Materialien aus Polytetrafluorethylen (PTFE) und der Möglichkeit der Schädigung bestimmter Peptidsequenzen durch die stark sauren Bedingungen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Fmoc-Methode angewendet.

Ein weiteres interessantes Detail in Zusammenhang mit den Schutzgruppen der Hauptkette ist der Grund für den Aufbau der Peptide in der SPPS vom C- zum N-Terminus. Dieser liegt in der besseren Stabilität der Urethan-basierten Schutzgruppen (siehe Abbildung 2) für Amine gegenüber Epimerisierung.

2.5 Schutzgruppen der Peptidseitenketten

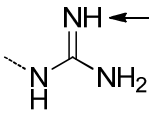
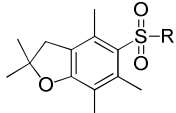
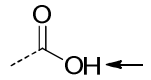
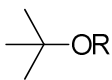
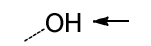
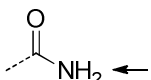
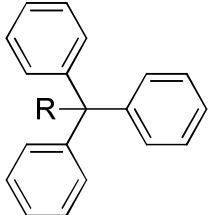
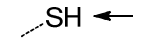
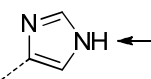
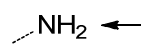
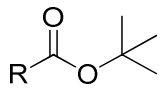
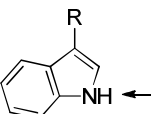
Neben den beiden Schutzgruppen für die Hauptkette des Peptids gibt es noch eine Vielzahl an Schutzgruppen für die Peptidseitenketten. Aufgrund der großen Fülle sollen in diesem Abschnitt nur diejenigen beschrieben werden, die sich in der Peptidsynthese bewährt haben³⁴, die kommerziell erhältlich sind und die beim Einsatz der entsprechenden Aminosäuren in dieser Arbeit verwendet wurden (siehe Tabelle 1).

2. Grundlagen der Festphasensynthese

Basierend auf der Fmoc-Synthesestrategie wurden für die Synthese ungeschützter Peptide Schutzgruppen verwendet, die simultan mit der Abspaltung des Peptids vom Harz durch 95%ige TFA entfernt werden können (siehe 2.12).

Tabelle 1: Repräsentative Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten in der SPPS.³⁵

Der Pfeil zeigt das Atom, über das die Bindung zur Schutzgruppe erfolgt.

Aminosäure	Schutzgruppe
Arginin (Arg) 	Pbf (2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl) 
Asparagin (Asp)/ Glutamin (Glu) 	tBu (<i>tert</i> -Butyl) 
Serin (Ser)/ Threonin (Thr) Tyrosin (Tyr) 	
Asparagin (Asn)/ Glutamin (Gln) 	Trt (Triphenylmethyl, Trityl) 
Cystein (Cys) 	
Histidin (His) 	
Lysin (Lys) 	Boc (<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl) 
Tryptophan (Trp) 	

2.6 Das Harz - polymerer Träger und Linker

Der polymere Träger wird zusammen mit dem sogenannten Linker als Harz bezeichnet. Aus der Vielzahl von kommerziell erhältlichen Systemen sollen hier nur die wichtigsten und für diese Arbeit bedeutenden Harze aufgeführt werden.

Der polymere Träger besteht aus vernetzten Mikropartikeln („beads“) mit einem Durchmesser von 75 - 150 μm oder 38 - 75 μm . Am häufigsten sind Polystyrol (PS)-basierte Harze mit einer Beladung

an funktionellen Gruppen von 0.5 bis 0.8 mmol/g und einer geringen Vernetzung von 1%, die durch Zugabe von Divinylbenzol erreicht wird.⁴ Die daraus resultierende gute Quellbarkeit in DMF erlaubt eine schnelle Diffusion der Reagenzien innerhalb der Mikropartikel und eine gute Zugänglichkeit zu den wachsenden Peptidketten. Für längere (> 25 Aminosäuren) und schwieriger herzustellende Peptidsequenzen wird eine geringere Beladung (0.1 - 0.3 mmol/g) benötigt.³⁶ Eine Funktionalisierung (-NH₂, -Cl, -COOH) wird durch nachträgliche Behandlung der Mikropartikel³⁷ oder durch die Zugabe von 4-Methoxymethylstyrol bei der Polymerisierung erreicht.⁴

Bei hydrophileren Peptiden, bei denen die physikalischen Eigenschaften stark von denen des Polymers PS abweichen, führt die Verwendung von vernetzten Poly(dimethylacrylamid) (PDMA)-basierten Harzen zu höherer Syntheseeffizienz.³⁸ Die Vernetzung wird hier durch Copolymerisation von Di-1,2-(acrylamido)ethan erreicht. Die Funktionalisierung erfolgt durch den Einbau von *N*-Methoxycarbonylmethyl-*N*-methylacrylamid.³⁹

Weitere hydrophilere Alternativen, die sich für bestimmte Peptidsequenzen und -längen besser eignen, sind Polystyrol-Polyethylenglycol (PS-PEG)-basierte Harze.⁴⁰ Diese können z.B. durch Veretherung des Polystyrol-Harzes und anschließendem Aufbau der PEG-Kette hergestellt werden.

Die Anbindung der ersten Aminosäure einer Peptidsequenz an das Harz wird als „Beladung“ („loading“) bezeichnet. Dies erfolgt über einen Linker, der das Peptid kovalent an den polymeren Träger bindet. Er ist über eine C-C-, eine Ether- oder eine Amid-Bindung an den polymeren Träger gebunden. Beispiele sind 4-(Methoxymethyl)phenyl, 4-(Chlormethyl)phenyl, Chlortrityl, 4-(Hydroxybenzyloxy)benzyl oder (Methoxycarbonyl)methyl.⁴ Die Anbindung der Aminosäure an den Linker kann je nach gewünschter Endfunktionalisierung des Peptids erfolgen. Prinzipiell ist die ganze Vielfalt der funktionellen Gruppen der organischen Synthese darstellbar. Dies würde allerdings in das sehr weite Feld der SPOS (Solid-Phase Organic Synthesis) führen.⁴¹ Darum wird hier nur genauer auf die Peptidengruppen (-COOH, -CONH₂) eingegangen. Um diese zu erhalten, wird der Linker in fast allen Fällen über einen Benzylester oder ein Benzylamid an den polymeren Träger gebunden (siehe 2.12).⁴

Leider ist die Namensgebung bei den Harzen nicht konsistent und folgt verschiedenen Aspekten, wie dem Name des Entwicklers (Wang, Rink), dem Trivialnamen (Trityl), Akronymen (PAM) usw. Im Folgenden wird nur ein Ausschnitt aus der Vielzahl von Harzen aufgezeigt.

2.6.1 Peptide mit C-terminaler Säure

Für die Synthese von Peptiden mit einer C-terminalen Säure werden häufig die in Abbildung 3 dargestellten Harze verwendet.⁴²⁻⁴⁴ Sie sind mit den Bedingungen der Fmoc-Strategie, unter Verwendung von TFA und Piperidin, kompatibel.

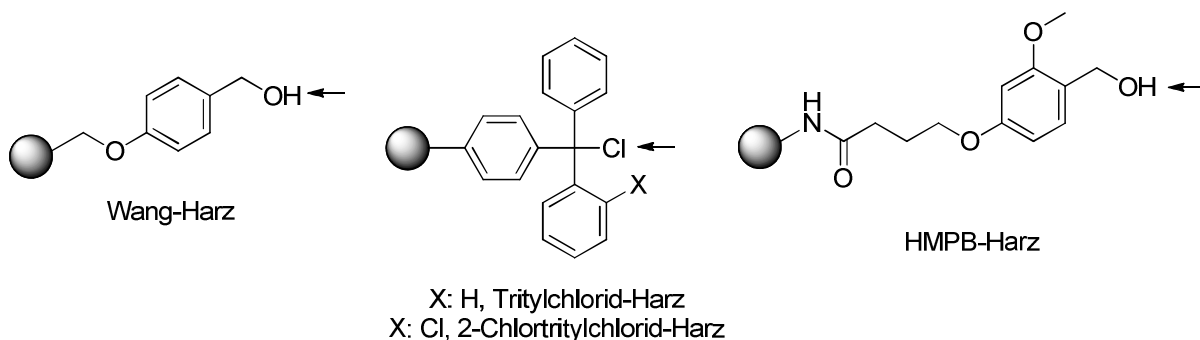


Abbildung 3: Harze für die Synthese von Peptiden mit C-terminaler Säure. Der Pfeil zeigt die funktionelle Gruppe, über die das Peptid angebunden wird (nach ³⁶).

2.6.2 Peptide mit C-terminalem Amid

Für die Synthese von Peptiden mit einem C-terminalen Amid werden häufig die in Abbildung 4 dargestellten Harze verwendet.⁴⁵⁻⁴⁷ Sie sind ebenfalls mit den Bedingungen der Fmoc-Strategie, unter Verwendung von TFA und Piperidin, kompatibel.

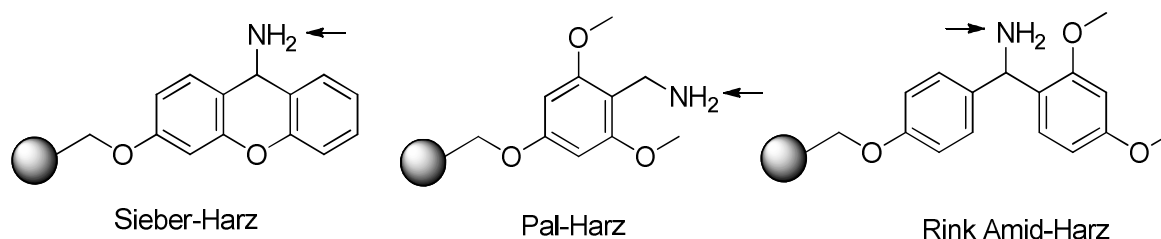


Abbildung 4: Harze für die Synthese von Peptiden mit C-terminalem Amid. Der Pfeil zeigt die funktionelle Gruppe, über die das Peptid angebunden wird (nach ³⁶).

Die meisten Linker sind beim Kauf schon an den polymeren Träger gebunden. Außerdem ist die Anbindung der ersten Aminosäure ein Schlüsselschritt in der Synthese, da durch ihn die Harzbeladung definiert wird. Bei diesem Syntheseschritt kann es zu vermehrter Epimerisierung, Dipeptidbildung und geringer Beladung kommen. Um diese Fehlerquellen auszuschließen, wurde in dieser Arbeit ausschließlich vorbeladenes Harz verwendet (75 - 150 μ m).

2.7 Entschützung der wachsenden Peptidkette

Die Fmoc-Schutzgruppe wurde in den 1970er Jahren eingeführt¹⁷ und ist stabil gegen Säuren, aber labil in Gegenwart von Basen. Die Entfernung erfolgt durch β -Eliminierung. Das Wasserstoffatom an C9 wird durch den Aromaten aktiviert und kann so leicht durch Deprotonierung in ein Anion

umgewandelt werden (siehe Abbildung 5). Die dadurch induzierte Elektronenverschiebung führt zum Bindungsbruch. Es bildet sich ein Carbamat-Anion und Dibenzofulven mit einer exocyclischen Doppelbindung.

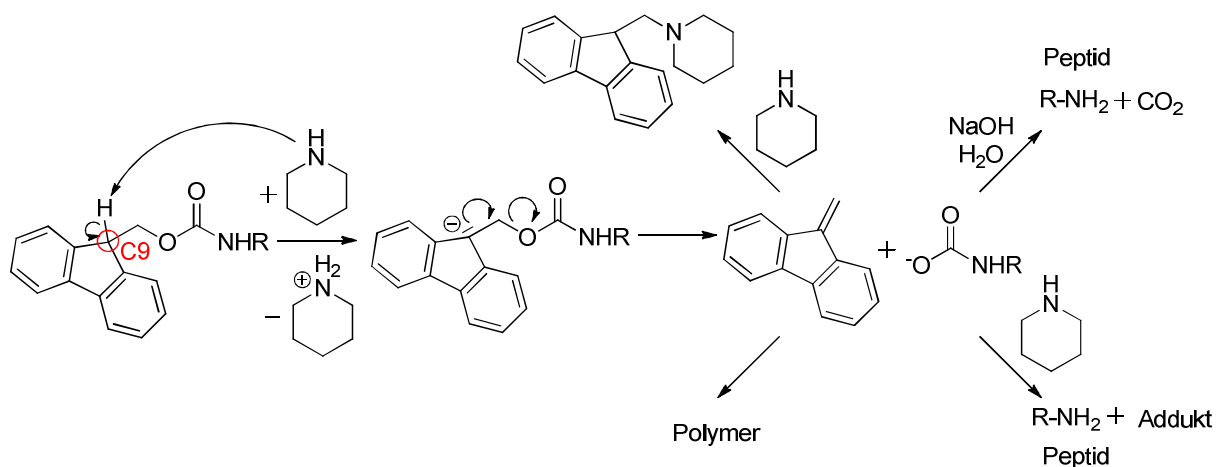


Abbildung 5: Mechanismus der Fmoc-Entschützung mittels Piperidin (nach⁴).

Um zum gewünschten Amin ($\text{H}_2\text{N-R}$) zu gelangen, müsste unter wässriger Aufarbeitung CO_2 abgespalten werden. Für die Entschützung wird aber in der Praxis ein sekundäres Amin, meistens Piperidin (20% in DMF), in großem Überschuss (140 Äquivalente) verwendet, was auch schon zur vorangegangenen Deprotonierung dient. Da es zu keiner Gasentwicklung während der Reaktion kommt, wird möglicherweise ein Addukt aus CO_2 und Piperidin gebildet. In der Literatur wird die Existenz von Piperidinium-1-piperidincarbamat-Monohydrat beschrieben.⁴⁸

Die Verwendung dieser Base hat außerdem den Vorteil, dass das nach der Deprotonierung gebildete Anion aufgrund der Nucleophilie der Base abgefangen und die Bildung des Dibenzofulvens, welches zur Polymerbildung neigt, unterdrückt wird. Somit kann die Bildung von Nebenprodukten verringert werden.

Da Piperidin flüchtig, sehr geruchsintensiv und fruchtbarkeitsschädigend ist, wurde für die Synthesen der ungefährlichere Feststoff Piperazin (5% in DMF) verwendet. Die Entschützung findet hier etwas langsamer statt, der Entschützungsmechanismus verläuft aber identisch.⁴⁹

2.8 Basen für die SPPS

Neben der Fmoc-Entschützung besteht die Aufgabe einer Base in der Peptidsynthese zum einen darin, die N-geschützten Aminosäuren zu deprotonieren, um eine Reaktion mit dem Kupplungsreagenz zu ermöglichen. Zum anderen müssen die Protonen, die während der Amidbildung auftreten, abgefangen werden. Zu diesem Zweck werden tertiäre Amine verwendet, da sie sehr schwache Nucleophile sind und so kaum mit Elektrophilen, die an der Reaktion beteiligt sind, reagieren.⁴ Um die gewünschte Reaktion effektiv ablaufen zu lassen und gleichzeitig Nebenreaktionen zu vermindern, ist die Balance zwischen Basenstärke und sterischer Hinderung des basischen Stickstoffs essentiell. In der SPPS eingesetzte Basen sind zum Beispiel 2,4,6-Trimethylpyridin (TMP),⁵⁰ N-Methylmorpholin

(NMM),⁵¹ Triethylamin (TEA)¹² oder Diisopropylethylamin (DIEA).¹³ In Verbindung mit Phosphonium- und Uronium-Salzen (siehe 2.9) zeigten DIEA und TMP die größte Kupplungseffizienz und eine sehr geringe Tendenz zur Racemisierung des Peptids während der Reaktion.⁵² Aus diesem Grund wurden diese Basen im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt.

2.9 Peptidkupplung

Eine Peptid- bzw. Amidbindung entsteht aus einer Säure und einem Amin. Die Reaktion erfolgt bei Raumtemperatur jedoch nicht spontan. Die notwendige Eliminierung von Wasser findet erst bei hohen Temperaturen (z.B. 200 °C)⁵³ statt. Da sich solche Reaktionsbedingungen meist nachteilig auf die Stabilität der an der Reaktion beteiligten Moleküle auswirken, ist es nötig, sogenannte Kupplungsreagenzien einzusetzen. Durch sie wird die OH-Gruppe der Säure vor der Reaktion mit dem Amin in eine gute Abgangsgruppe umgewandelt. An die Kupplungsreagenzien werden hohe Anforderungen, wie hohe Reaktivität und geringe Tendenz zur Epimerisierung gestellt. Bei schlechter Wahl des Kupplungsreagenzes ist es möglich, dass eine L-Aminosäure über die Bildung eines Oxazolons in die D-Form umgewandelt wird⁵⁴ (siehe Abbildung 6) und somit das resultierende Peptid seine physiologische Aktivität verlieren kann.

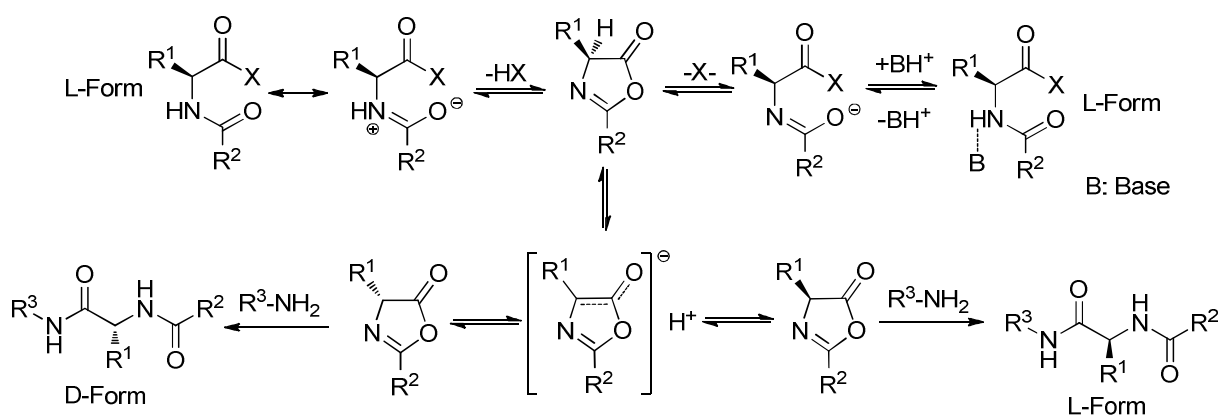


Abbildung 6: Der Oxazolone-Mechanismus.

Um diese Nebenreaktion zu vermeiden, werden hohe Anforderungen an das Kupplungsreagenz gestellt. Aus diesem Grund wird im Folgenden ein Überblick über die verschiedenen Arten von Kupplungsreagenzien gegeben und vor allem auf die in dieser Arbeit verwendeten Methoden eingegangen.

Im Vergleich zur Peptidsynthese in Lösung können nicht alle denkbaren Kupplungsreagenzien für die Festphasensynthese verwendet werden, da aufgrund des Synthesepinzips eine Einschränkung besteht. Die Methode der sogenannten gemischten Anhydride⁵¹ sowie die Verwendung von 1-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin (EEDQ)⁵⁵ sind in der SPPS nicht möglich, da man den nukleophilen Angriff desamins an der „falschen“ Carbonylgruppe des Anhydrids nicht ausschließen kann. Acylazide⁵⁶ reagieren zu langsam und die Herstellung der Acylhalogenide⁷ ist zu aufwändig. Es wird nur genauer auf die Kupplungsmethoden eingegangen, die in der SPPS Anwendung finden. Ein umfassender Überblick kann in zahlreichen Übersichtsartikeln⁵⁷⁻⁶⁰ erhalten werden.

2.9.1 Carbodiimide

N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) ist der bekannteste Vertreter dieser Reagenzklasse und wurde in der Peptidsynthese zum ersten Mal 1955 beschrieben.⁶¹ Die Aktivierung verläuft über die Bildung eines *O*-Acylharnstoffs (siehe Abbildung 7). Durch den nukleophilen Angriff eines Amins bildet sich das gewünschte Amid und *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff. Dieser ist in der Reaktionslösung unlöslich, fällt aus und kann durch Filtration entfernt werden. Mögliche Nebenreaktionen sind die Bildung des Säureanhydrids, woraus ebenfalls das Amid resultiert sowie die Bildung des *N*-Acylharnstoffs.⁶² Ein großer Nachteil bei der Verwendung von DCC ist die Möglichkeit der Oxazolombildung (siehe Abbildung 6). Ein Überblick über die möglichen Reaktionen bei der Verwendung von DCC ist in Abbildung 7 dargestellt.

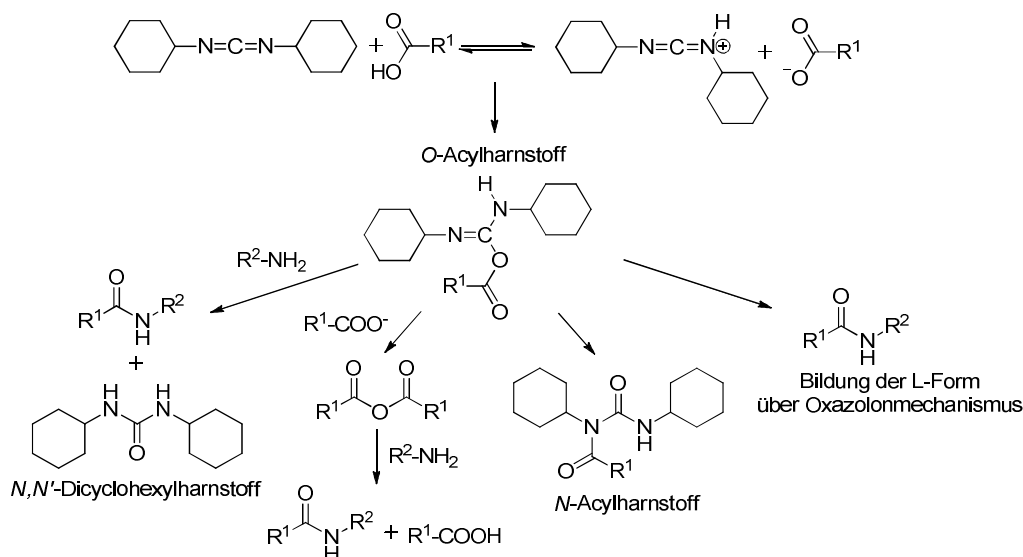


Abbildung 7: Mögliche Reaktionen bei der Verwendung von DCC.

Die Bildung des unlöslichen *N,N'*-Dicyclohexylharnstoffs während der Reaktion ist in der SPPS ein großer Nachteil. Andere Carbodiimide (siehe Abbildung 8) wie *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC),⁶³ *N,N'*-*tert*-Butylmethylcarbodiimid (BMC) oder *N,N'*-*tert*-Butylethylcarbodiimid (BEC)⁶⁴ sind hier besser geeignet, da ihre Nebenprodukte einfacher mit organischen Lösemitteln entfernt werden können. Zu erwähnen sind hier noch wasserlösliche Carbodiimide wie 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC),⁶⁵ die zur Amidbildung in wässriger Umgebung eingesetzt werden können. Diese sind aber sehr teuer und führen meist zu keiner effizienten Kupplung, da sie mit dem im großen Überschuss vorhandenen Nukleophil Wasser reagieren.

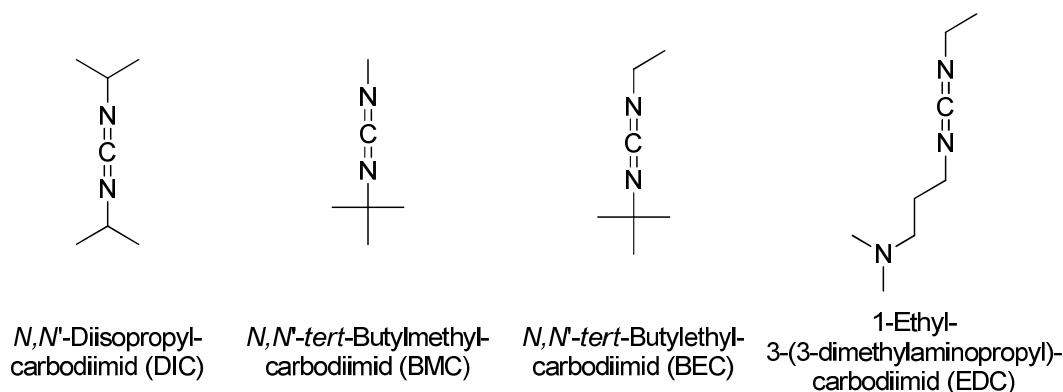


Abbildung 8: Einige wichtige Carbodiimide.

Um das Problem der Epimerisierung aufgrund der Oxazolombildung zu verringern, wurde von König und Geiger 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) als Additiv eingeführt (siehe Abbildung 9).⁶⁶

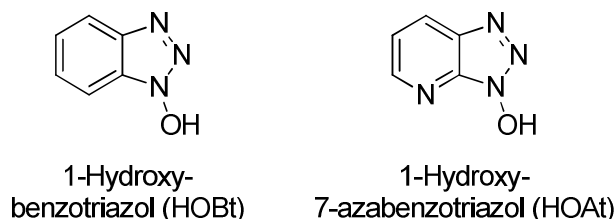


Abbildung 9: Additive für die Carbodiimidkupplung.

Durch den Einsatz von HOBt war es möglich, höhere Ausbeuten und geringere Epimerisierungsgrade zu erhalten. Dies wird zum einen dadurch erreicht, dass HOBt die Oxazolombildung vermindert, indem es den *O*-Acylharnstoff (siehe Abbildung 10) protoniert, dessen Elektrophilie erhöht und somit dessen Umsetzung beschleunigt. Außerdem wird dadurch das Oxybenzotriazol-Anion erzeugt, welches als Nukleophil agiert. Zum anderen wird, ebenfalls durch Protonierung, die Enolbildung des Oxazolons, die zur Epimerisierung führt, durch HOBt unterdrückt (siehe Abbildung 10).⁴

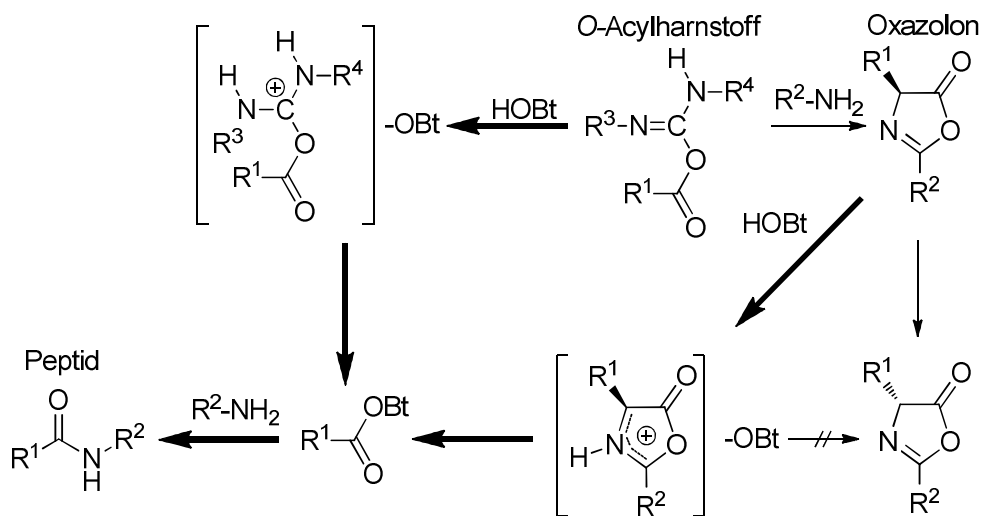


Abbildung 10: Reaktionsschema der Carbodiimidkupplung durch den Einsatz von HOBt zur Verminderung der Epimerisierung (nach⁴).

Ein verwandtes Additiv, 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt), wurde 1993 von Carpino entwickelt⁶⁷ (siehe Abbildung 9) und als noch effizienter hinsichtlich Ausbeute, Kinetik und geringem Epimerisierungsgrad beschrieben.

Es ist zu beachten, dass diese Komponenten explosive Eigenschaften aufweisen. Solange den Verbindungen im trockenen Zustand keine Wärme zugeführt wird, ist der Umgang damit aber unbedenklich.

2.9.2 Symmetrische Anhydride

Eine weitere wichtige Möglichkeit für die Peptidsynthese ist die Methode der symmetrischen Anhydride. Die Reaktion von zwei Äquivalenten der entsprechend geschützten Aminosäure unter Zugabe von einem Äquivalent eines Aktivierungsreagenzes (z.B. DCC) führt zu deren Bildung.⁶⁸ Nach dem Aktivierungsschritt werden die Nebenprodukte entfernt (z.B. bei DCC durch Filtration). Die eigentliche Knüpfung der Peptidbindung erfolgt dann durch Zugabe des symmetrischen Anhydrids - (Fmoc-NH-CHR-CO)₂O - zur wachsenden Peptidkette.⁶⁹

Die Verwendung symmetrischer Anhydride bietet den Vorteil einer hohen Reaktivität. Nachteilig an dieser Methode sind Löslichkeitsprobleme bei der Verwendung einiger Aminosäuren wie z.B. Glycin.⁷⁰ Außerdem ist es bei diesem Syntheseweg notwendig, neben dem ohnehin schon großen Überschuss an Reagenzien, den das Konzept der Festphasensynthese mit sich bringt, diese noch in doppelter Menge aufzubringen. Außerdem sollten die Anhydride vor jeder Synthese neu dargestellt werden.

2.9.3 Aktivestersynthese

Ein weiterer Ansatz, um Peptide zu synthetisieren, ist die Verwendung von Aktivestern.⁷¹ Unter diesem Begriff versteht man Derivate der *N*-geschützten Aminosäuren, die stabil genug sind, um gelagert zu werden, aber noch so reaktiv sind, um mit Aminosäuren weiter zu reagieren. Man erhält diese Verbindungen unter anderem, indem man die Aminosäure mit einem Phenol- oder Hydroxylaminderivat⁷²⁻⁷⁴ umsetzt. Aus der Vielzahl an Möglichkeiten sind in Abbildung 11 die bekanntesten aufgeführt.

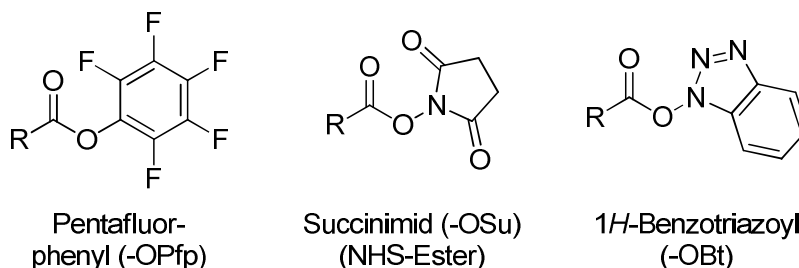


Abbildung 11: Beispiele von Aktivestern.

Zu erwähnen sind neben Pentafluorphenol (HOPfp) das 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und das *N*-Hydroxysuccinimid (HOSu), deren Nebenprodukte wässrig entfernt werden können. Die Aktivierung

kann durch den elektronenziehenden Effekt der Substituenten erklärt werden. Das Problem bei den Aktivestern ist die Lagerfähigkeit, da diese mit zunehmender Reaktivität zunehmend geringer wird.⁴ Daher wurde in dieser Arbeit auf den direkten Einsatz dieser Verbindungen verzichtet. Indirekt kommen diese jedoch trotzdem zum Einsatz, da die Ester der Hydroxamsäuren als Zwischenstufe in Kupplungsreaktionen auftreten, bei denen *N*-Hydroxylykcomponenten (z.B. HOBt) als Additive zugesetzt wurden (siehe 2.10).

2.9.4 Kupplungsreagenzien basierend auf 1*H*-Benzotriazol

Bei diesen Kupplungsreagenzien (Strukturen, siehe 13.2) findet man viele Salze des 1*H*-Benzotriazols wie Uronium-/Aminium-, Phosphonium- und Immonium-/Carbonium-Salze (siehe Abbildung 12).

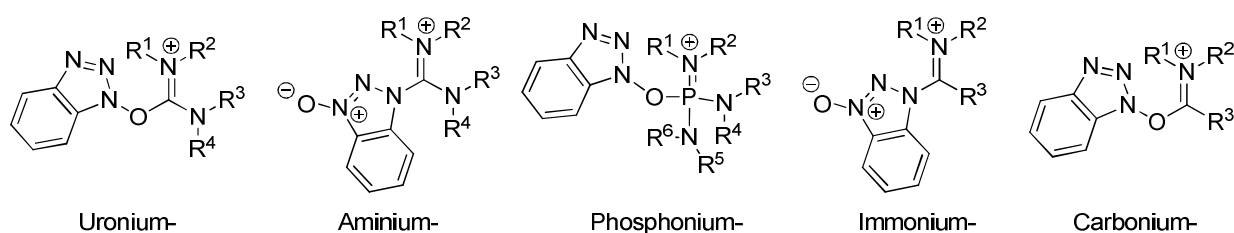


Abbildung 12: Salze des 1*H*-Benzotriazols.

2.9.4.1 Uronium-/Aminium-Salze

Es sind sowohl Uronium- als auch Aminium-Isomere von 1*H*-Benzotriazol identifiziert worden (siehe Abbildung 13). Die Frage nach der Struktur ist nach wie vor umstritten und hängt vom verwendeten Lösemittel, der Isolierungsmethode und dem Gegenion ab.⁷⁵ Die bekanntesten Vertreter dieser Klasse der Kupplungsreagenzien sind wohl *O*-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) und *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU)⁷⁶ (siehe Abbildung 13).

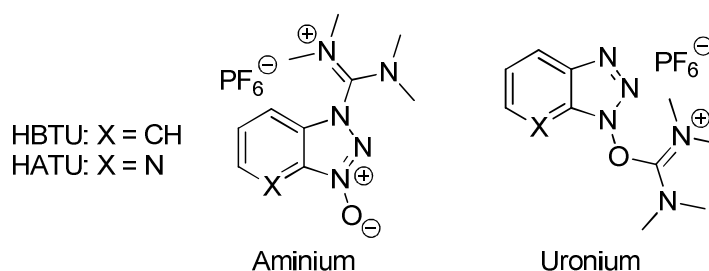


Abbildung 13: Uronium- und Aminium-Form von HBTU und HATU.

Der detaillierte Mechanismus der Aktivierung von Aminosäuren ist in Abbildung 14 dargestellt.⁴ Die *N*-geschützte Aminosäure (R^1 -COOH) muss erst durch eine Base (z.B. DIEA) in das Säureanion überführt werden. Das Carboxyanion greift das positiv geladene Kohlenstoffatom des Kupplungsreagenzes (z.B. HBTU) an, und ein *O*-Acyluroniumkation sowie das Benzotriazolonyanion werden gebildet. Nun stehen zwei mögliche Reaktionswege zum Peptid zur Verfügung, entweder der direkte Angriff des Amins der wachsenden Peptidkette (R^2 -NH₂) am Acylkohlenstoff unter direkter Bildung des Peptids oder der Angriff des Benzotriazolonyanions am Acylkohlenstoff, was zum

Benzotriazolester führt. Dieser kann dann wiederum vom Amin der wachsenden Peptidkette ($R^2\text{-NH}_2$) zum gewünschten Peptid umgesetzt werden. Da die Reaktion nur vollständig abläuft, wenn das sich bildende HOBt neutralisiert wird, wird mindestens ein zweifacher Überschuss an Base zugegeben.

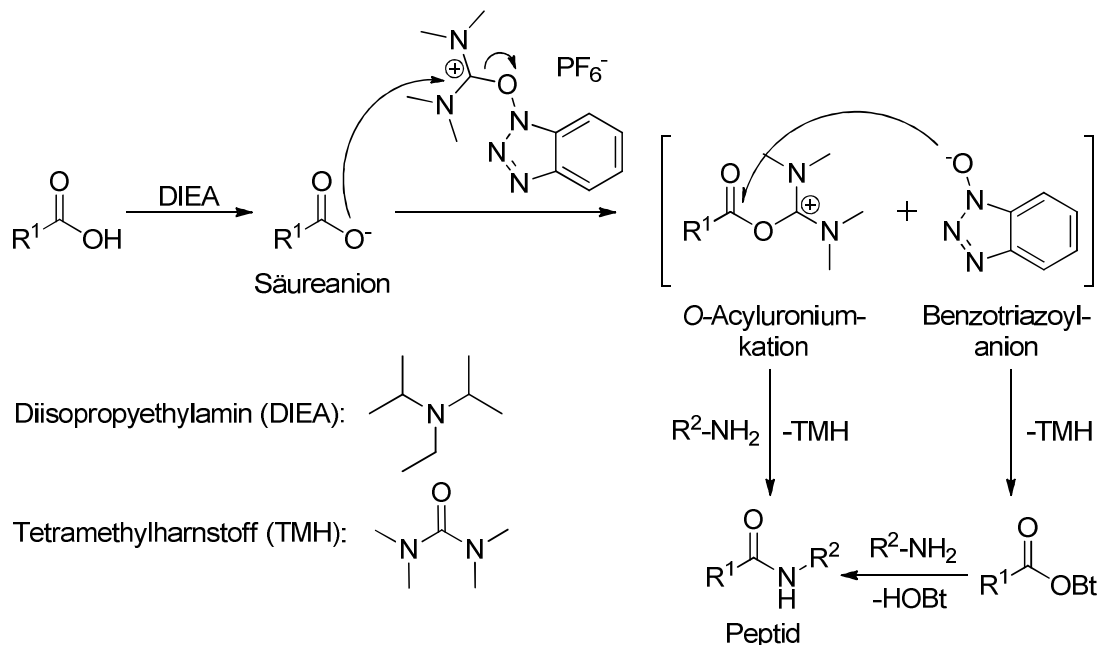


Abbildung 14: Mechanismus der Peptidsynthese unter Verwendung von HBTU (nach⁴).

Da die Bildung eines Guanidinium-Nebenprodukts durch die Reaktion des Amins ($R^2\text{-NH}_2$) mit dem Kupplungsreagenz möglich ist,⁷⁷ sind die Reihenfolge und der Zeitpunkt der Reagenzien-Zugabe sehr wichtig.

Andere Uronium-/Aminium-Salze wie *O*-1*H*-Benzotriazol-1-yl-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU),⁷⁸ *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TATU),⁶⁷ 1-(Dipyrrolidinylmethyl)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridiniumhexafluorophosphat-3-oxid (HAPyU),⁷⁹ (2-(6-Chloro-1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium)hexafluorophosphat (HCTU)⁸⁰ oder 1-((Dimethylamino)(morpholino)methyl)-1*H*-benzotriazoliumhexafluorophosphat-3-oxid (HDMB)⁸¹ können jeweils kleine Vorteile in Hinblick auf Löslichkeit oder ähnlichem aufweisen. Hinsichtlich Ausbeute, Racemisierungsgrad und Kinetik bieten sie aber im Vergleich zu HATU oder HBTU keine drastische Verbesserung.⁶²

2.9.4.2 Phosphonium-Salze

Eine weitere Gruppe ist auf den Phosphonium-Salzen von HOBt und HOAt basiert. Sie bieten den Vorteil, kein Guanidinium-Nebenprodukt bilden zu können. Das erste Reagenz dieser Art war 1*H*-Benzotriazolyl-*N*-oxytris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat (BOP).⁸² Seine Kanzerogenität, die auf die Bildung von Hexamethylphosphoramid während der Reaktion zurückzuführen ist, führte zur Entwicklung von 1*H*-Benzotriazol-1-yl-oxytri(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP).⁸³ Durch Insertion eines weiteren Stickstoffatoms erhielt man

(7-Azabenzotriazol-1-yl)oxytris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphat (AOP) und (7-Azabenzotriazol-1-yl)-oxytris(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat (PyAOP).⁷⁶ Auch hier führte dieser Schritt wieder zu einer reaktiveren Spezies. Als weitere Verbindungen sind hier[(6-Nitrobenzotriazol-1-yl)oxy]tris(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat (PyNOP)⁸⁴ oder 6-Chloro-1-hydroxybenzotriazol-1-yl-*N*-oxytris(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat (PyClocK)⁸⁵ zu nennen, die aber jeweils Nachteile wie geringe Hydrolysestabilität oder geringe Löslichkeit aufweisen.

2.9.4.3 Immonium-Salze

In die Kategorie der Immonium-Salze fallen Reagenzien wie 5-(1*H*-Benzotriazol-1-yloxy)-3,4-dihydro-1-methyl-2*H*-pyrrolidiniumhexachloroantimonat (BDMP), 1*H*-Benzotriazol-1-yloxy-*N,N*-dimethylmethaniminiumhexachloroantimonat (BOMI) oder 1-(1-(1*H*-Benzo[d][1,2,3]triazol-1-yloxy)ethyliden)pyrrolidiniumhexachloroantimonat (BMMP).⁸⁶ Obwohl BDMP gute Resultate hinsichtlich Reaktivität und Racemisierungsgrad aufweist, wurde hier kein Vergleich mit klassischen Reagenzien wie HBTU oder HATU angestellt.

2.9.4.4 Sonstige Reagenzien basierend auf 1*H*-Benzotriazol

Diethoxyphosphinyloxybenzotriazol (DepOBt), ursprünglich Benzotriazol-1-yldiethylphosphat (BDP) genannt, wurde zum ersten Mal von Kim erwähnt.⁸⁷ 3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]pyridin-3-yldiethylphosphat (DepOAt), 1-(2,8-Dimethylphenoxaphosphinyloxy)-7-azabenzotriazol (DmppOAt) und 1-[Di(*O*-tolyl)phosphinyloxy]-7-azabenzotriazol (DtpOAt) wurden von Carpino synthetisiert,⁸⁸ zeigten jedoch keinen Vorteil gegenüber HATU. Lediglich hinsichtlich des Racemisierungsgrades zeigten DmppOAt und DtpOAt um einige Prozent verbesserte Werte. Weitere Reagenzien basierend auf Sulfonaten wurde von Itoh entwickelt,⁸⁹ wobei 6-Chloro-1*H*-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl-4-chlorobenzolsulfonat (HCSCP) die besten Resultate lieferte. Hier erfolgte jedoch kein Vergleich mit klassischen Reagenzien.

Nach dem Überblick über die Kupplungsreagenzien basierend auf 1*H*-Benzotriazol, lässt sich zusammenfassend sagen, dass in diesem weiten Feld zwar viele Reagenzien entwickelt wurden, sich aber diese nur sehr wenig voneinander unterscheiden.⁹⁰ HBTU und TBTU sind die beiden Reagenzien, die sehr gute Resultate erbringen und kommerziell einfach und kostengünstig erhältlich sind. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit HBTU unter Zusatz von Oxyma Pure als Kupplungsreagenz verwendet (siehe 2.10).

2.10 Additive - HOBt und Oxyma Pure

Der Einsatz von Phosphonium- und Uronium-Salzen impliziert die Aktivierung des Säureanions einer Aminosäure. Der Benzotriazolester ist einer von zwei möglichen Zwischenstufen (siehe Abbildung 14). Empirisch stellte sich heraus, dass durch die Zugabe von zusätzlichem HOBt diese Zwischenstufe vermehrt gebildet wird, was einen positiven Effekt im Hinblick auf Racemisierungsgrad und Ausbeute mit sich bringt.⁹¹ Diese Maßnahme ist nachvollziehbar, wenn man sich überlegt, dass die Racemisierung dadurch vermindert werden könnte. Zum einen wird die Base durch HOBt gepuffert und zum anderen wird durch Protonierung die Enolbildung des Oxazolons, die zur Epimerisierung führt, durch HOBt unterdrückt (siehe Abbildung 10). In dieser Arbeit wurde diese Methode angewendet, obwohl der universelle Einsatz in der Literatur weiter diskutiert wird.⁴

Alternativ zu HOBt kann Ethyl-2-cyano-2-(hydroxyimino)acetat (Oxyma Pure) verwendet werden (siehe Abbildung 15).

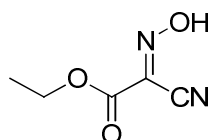


Abbildung 15: Struktur von Ethyl-2-cyano-2-(hydroxyimino)acetat (Oxyma Pure).

Oxyma Pure wurde 1973 als potentielles Additiv für Kupplungsreaktionen entdeckt.⁹² Es stellte sich heraus, dass dieses Reagenz noch effektiver als HOBt ist und einen noch geringeren Grad an Racemisierung bietet.⁹³ Aufgrund des identischen pK_a des Oxims kann angenommen werden, dass der positive Einfluss auf die Kupplung identisch zu dem von HOBt ist.

2.11 COMU - Ein Reagenz zur Amidbildung in Lösung

Obwohl COMU⁹⁴ - 1-[(1-(Cyano-2-ethoxy-2-oxoethyliden-aminoxy)dimethylamino-morpholino)]-uroniumhexafluorophosphat - ebenfalls auf der Uronium-Struktur basiert, ist es aufgrund seiner Bedeutung in dieser Arbeit detailliert aufgeführt. Die Vorteile dieses Reagenzes, vor allem zur Peptidkupplung in Lösung, sind vielfältig. Die Anwendung von DCC/HOBt (siehe 2.9) führt zum Problem der quantitativen Entfernung des gebildeten Harnstoffs, der, wenn auch in geringer Konzentration, in organischen Lösemitteln löslich ist. Beim Einsatz der Methoden, die in der SPPS Anwendung finden (siehe 2.9), steht man vor dem Problem der Aufreinigung des nicht an einer Festphase gebundenen Produkts. Andere Methoden⁶² implizieren zum Teil wiederum einen großen Syntheseaufwand für die Darstellung der Kupplungsreagenzien. Eine kommerziell erhältliche, einfach abzutrennende Alternative bietet das in dieser Arbeit verwendete Reagenz COMU (siehe Abbildung 16), dessen Struktur von Oxyma Pure abgeleitet wird.

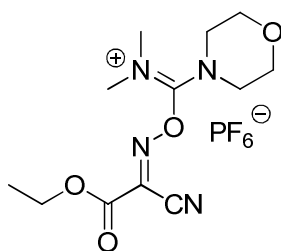


Abbildung 16: Struktur von COMU - 1-[(1-(Cyano-2-ethoxy-2-oxoethyliden-aminoxy)dimethylaminomorpholino)uroniumhexafluorophosphat.

Es besitzt eine bessere Stabilität als HOBt, HATU oder HBTU und hat im Gegensatz dazu keine explosiven Eigenschaften, agiert aber dennoch als Protonenakzeptor (siehe 2.10). Außerdem kann 2,4,6-Trimethylpyridin (TMP) als milde Base eingesetzt werden, was zu noch geringerer Tendenz der Racemisierung führt.⁹⁴ Der Endpunkt der Reaktion kann zudem je nach eingesetzten Edukten über einen Farbwechsel der Reaktionslösung erkannt werden und ist bei Raumtemperatur bereits nach 2-3 h erreicht. Der größte Vorteil dieses Reagenzes liegt jedoch in der Tatsache, dass die gebildeten Nebenprodukte durch wässrige Extraktion entfernt werden können. Dadurch wird eine effiziente Kupplung mit einer schnellen und einfachen Aufreinigung des Produkts vor allem auch außerhalb der SPPS gewährleistet.⁹⁴

2.12 Abspaltung des Peptids vom Harz

Bei Anwendung der Fmoc-Strategie wird TFA zur Abspaltung des Peptids vom Harz verwendet. Die Bindung des Peptids an das Harz erfolgt in vielen Fällen über einen Benzylester oder ein Benzylamid (siehe 2.6). Der Grund hierfür ist, dass durch das aromatische System eine elektronenreiche Bindung generiert wird, an der der Bindungsbruch durch die Säure stattfinden kann. Es resultiert das Peptid als Säure bzw. Amid und ein Carbeniumion (siehe Abbildung 17), das durch einen Carbokationenfänger („scavenger“) abgefangen wird.⁴

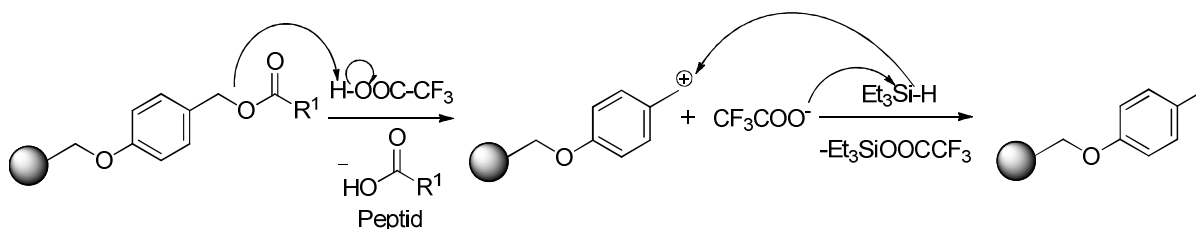


Abbildung 17: Abspaltung des Peptids mit TFA unter Verwendung eines Carbokationenfängers am Beispiel des Wang-Harzes (siehe 2.6).

Unter diesen Bedingungen kommt es zur simultanen Entfernung der Schutzgruppen der Seitenketten des Peptids. Es bilden sich dabei in einem S_N1 -Schritt stabile Carbokationen (siehe Abbildung 17), die mit elektronenreichen Seitenketten von Aminosäuren reagieren können (z.B. Ser, Met, Tyr) und zu Nebenprodukten führen.³⁶ Um dies zu unterdrücken, wird erneut von den Carbokationenfängern Gebrauch gemacht. Verwendet werden dafür je nach Schutzgruppe z.B. Anisol,⁹⁵ Thioanisol,⁹⁶ o/m-Kresol, 1,2-Ethandithiol, Methanol oder Wasser. Silane haben dabei gegenüber Thiolen den

Vorteil, geruchslos zu sein. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein Gemisch aus TFA, Wasser und Triisopropylsilan (95:2.5:2.5) verwendet.

Bei Verwendung Trityl-basierter Linker (z.B. Tritylchlorid-Harz), die säurelabiler sind, ist die Verwendung von 1%iger TFA-Lösung in DCM ausreichend für die Abspaltung vom Harz.⁹⁷ Somit ist es möglich, das Peptid vom Harz abzuspalten, ohne dabei die Schutzgruppen der Seitenketten zu entfernen. Man erhält so geschützte Peptide, die sehr hydrophob sind und als funktionelle Gruppen nur den freien N- und C-Terminus aufweisen.

2.13 Nicht kanonische Aminosäuren für die gezielte Peptidfunktionalisierung

Um bestimmte funktionelle Gruppen für chemoselektive Reaktionen (siehe 6.3.3) in eine Peptidsequenz einzubauen, ist der Einsatz von nicht kanonischen Aminosäuren ideal. Man versteht darunter Moleküle mit dem Grundgerüst einer α -Aminosäure (HOOC-CHR-NH_2), bei der der Rest Rentsprechend modifiziert ist. Diese Modifikationen können funktionelle Gruppen wie zum Beispiel Propargyl- oder Azidogruppen (siehe 6.3.3) sowie Markierungsstellen („Labels“) sein, um bestimmte Eigenschaften wie die Kupplungseffizienz oder die enzymatische Spaltung eines Peptids einfach detektieren zu können. In dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck neben den genannten funktionellen Gruppen ein ^{15}N -Label sowie ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Label eingebaut.

3. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Allgemein wird die Emission von Licht als Lumineszenz bezeichnet. Man unterscheidet dabei zwischen Phosphoreszenz und Fluoreszenz. Das Phänomen der Fluoreszenz tritt typischerweise bei Molekülen mit π -Bindungen, sogenannten Fluorophoren, auf.⁹⁸ Ein Fluorophor absorbiert Licht und emittiert einen Teil davon wieder als Strahlung. Dies kann anschaulich anhand eines Jablonski-Diagramms (siehe Abbildung 18) erklärt werden.⁹⁹ Ein Elektron wird durch Licht ($h\nu_A$) angeregt und erreicht ein höheres Energieniveau ($S_0 \rightarrow S_1$). Wegen eines Energieverlusts im angeregten Zustand (S_1) durch Schwingung (0, 1, 2) ist die Frequenz des emittierten Lichts ($h\nu_F$) kleiner als die des eingestrahlenen Lichts. Dieses Phänomen wird als „Stokes shift“ bezeichnet.¹⁰⁰ Durch ihn ist eine Detektion des emittierten Lichts trotz des Hintergrundlichts der Anregung möglich.

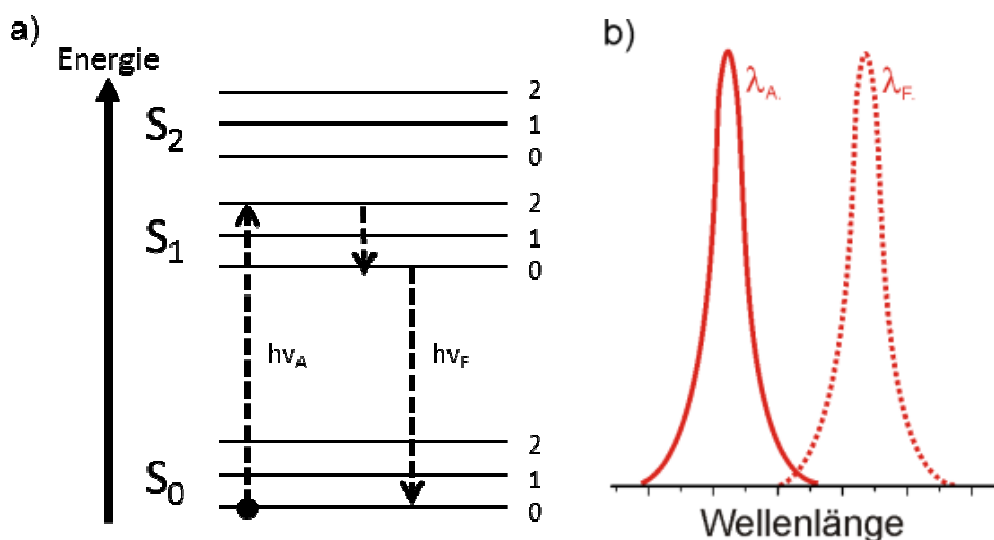


Abbildung 18: a) Jablonski-Diagramm, mit S_0 als elektronischen Grundzustand, S_1 und S_2 als ersten und zweiten angeregten Zustand, 0, 1 und 2 als Schwingungsniveaus, $h\nu_A$ als Energie des anregenden Lichts und $h\nu_F$ als Energie des emittierten, fluoreszierenden Lichts, b) Transfer der Frequenzen in Wellenlängen.

Eine Verminderung der Fluoreszenz wird als „Quenching“ bezeichnet. Dieses Phänomen kann durch drei Hauptprozesse erfolgen, dem dynamischen Quenching (Kollisionsquenching), dem statischen Quenching oder dem Resonanz-Energie-Transfer (RET).⁹⁸ Beim erstgenannten Prozess wird das Fluorophor vom angeregten Zustand durch Kollision mit dem Quencher (z.B. molekularem Sauerstoff), strahlungslos in den Grundzustand versetzt. Beim zweiten Prozess bildet sich ein nicht fluoreszierender Komplex aus Fluorophor und Quencher. Beim RET hingegen ist kein direkter Kontakt von Akzeptor (A) und Donor (D) nötig.

RET wird häufig auch als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnet, wenn der strahlungslose Energietransfer zwischen einem angeregten Fluorophor (Donor, D) und einem geeigneten Quencher (Akzeptor, A) übertragen wird. Der Energietransfer kann dabei als Energieaustausch zwischen einem oszillierenden Dipol und einem Dipol mit gleicher Frequenz betrachtet werden. Der Energietransfer hängt dabei von der spektralen Überlappung der beiden

Komponenten, deren Abstand und der relativen Orientierung der Dipole ab.⁹⁸Mögliche Donor-Akzeptor-Paare sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Donor-Akzeptor-Paare und deren Abkürzungen.

Fluorophor (Donor)-Gruppe		Quencher (Akzeptor)-Gruppe		Lit.
Abkürzung	Name	Abkürzung	Name	
Trp	Typtophan	Z-(4-NO ₃)	4-Nitro-Benzoyloxycarbonyl	101
EDANS	(5-[(2-Aminoethyl)amino]-naphthalin-1-sulfonsäure	DABCYL	4-(4-Dimethylamino-phenylazo)-benzoesäure	102
Ant	Anthraniloyl-	Tyr-(3-NO ₃)	3-Nitrotyrosin	103
Mant	N-Methylantraniloyl-	Dnp	2,4-Dinitrophenyl-	104
Mca	(7-Methoxycoumarin-4-yl)-acetyl-	Dnp	2,4-Dinitrophenyl-	105

Im Rahmen der Theorie von Förster¹⁰⁶ werden die Rate des Energietransfers und die Effizienz des Energietransfers zwischen A und D beschrieben. Dabei hängt die Rate des Energietransfers zu allererst von der Quantenausbeute von D in Abwesenheit von A ab. Je höher dieser Wert ist, desto effektiver ist der Energietransfer. Die gleiche Bedeutung hat die Fluoreszenzlebensdauer von D in Abwesenheit von A. Wichtig sind außerdem der Abstand zwischen den Mittelpunkten von D und A und der Brechungsindex des Mediums. Effizienter Energietransfer setzt folglich voraus, dass sich der Donor und der Akzeptor in Resonanz befinden. Das heißt, dass das Emissionsspektrum des Fluorophors (Donors) mit dem Absorptionsspektrum des Quenchers (Akzeptors) überlappen muss (siehe Abbildung 19).⁹⁸

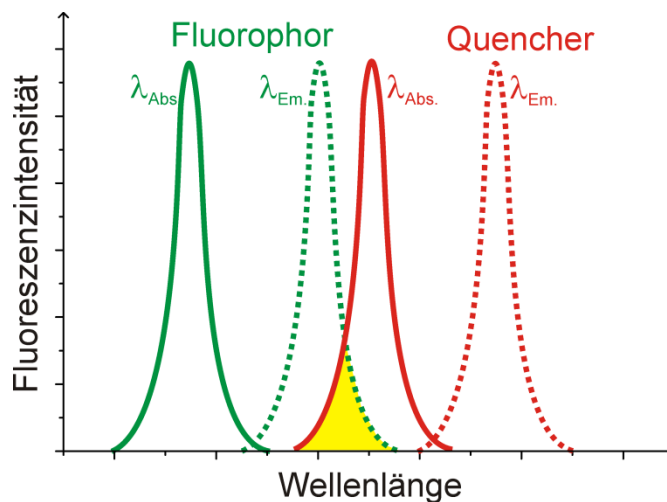


Abbildung 19: Schematische Darstellung der spektralen Überlappung (gelb) vom Emissionsspektrum des Fluorophors (grün) und dem Absorptionsspektrum des Quenchers (rot).

Des Weiteren hat die räumliche Orientierung der beiden Moleküldipole κ^2 einen Einfluss auf die Rate des Energietransfers. Werte, die hier möglich sind, rangieren zwischen 0 und 4.¹⁰⁷ Die Rate des Energietransfers steht in Relation zum Förster-Radius (R_0). Dieser ist definiert als der Abstand, bei

3. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

dem die Übergangseffizienz 50% erreicht hat.⁹⁸ Der Förster-Radius befindet sich generell im Bereich von 1 - 8 nm.¹⁰⁷

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Rate des Energietransfers und somit die Effizienz des FRET-Systems linear von der spektralen Überlappung, der Quantenausbeute des Donors, der relativen Orientierung beider Dipole und reziprok von der sechsten Potenz der Distanz zwischen beiden Komponenten und dem Brechungsindex des Mediums abhängt.

Das Prinzip wird in einer Vielzahl von Anwendungen als „spektroskopisches Lineal“ angewandt.^{98,107} Es ist damit möglich, eine Konformationsanalyse von Proteinen durchzuführen, Proteinfaltungen zu bestimmen, die Orientierung von Polymer-gebundenen Peptiden aufzuklären, Calciumindikatoren darzustellen oder DNA-Bindungskinetik zu bestimmen. Des Weiteren hat es große Bedeutung in der Bestimmung von Enzymaktivitäten. Dabei wird die Spaltungssequenz des Peptids zwischen Quencher und Fluorophor eingebaut. Bei einer Spaltung des Peptids und der daraus resultierenden räumlichen Entfernung zwischen Donor und Akzeptor kommt es zu einer Fluoreszenzzunahme. Dies kann sehr einfach und hoch sensitiv detektiert werden.

4. Enzyme

Peptide bzw. Proteine sind in der Lage, neben der Primärstruktur auch Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen zu bilden, welche unter anderem die Funktionalität von Enzymen bestimmt. Da in dieser Arbeit die Synthese im Vordergrund stand, soll auf das Thema „Enzyme“ nur kurz eingegangen werden. Es wird auf die für die Syntheseplanung relevanten Details, wie Enzymcharakteristika und Zielsubstrate, eingegangen. Detaillierte Betrachtungen über Spaltungsmechanismen, Abbaukinetik oder Klassifizierung der Enzyme werden nicht angestellt. Drei Enzyme sind hier von Bedeutung - Pepsin, Trypsin und Hepsin.

4.1 Pepsin

Pepsin A (EC 3.4.23.1), eine Aspartat-Protease, hat ein Molekulargewicht von ca. 35000 g/mol und kommt im Magensaft von Wirbeltieren vor. Es ist aus 327 Aminosäuren bekannter Sequenz aufgebaut.¹⁰⁸ Die Erkennungssequenz dieser Endopeptidase ist sehr unspezifisch und erfordert lediglich hydrophobe Aminosäuren. Die Spaltung erfolgt bevorzugt C-terminal an aromatischen Aminosäureresten (Phe-Phe, Phe-Tyr, Tyr-Tyr, Phe-Trp, Tyr-Leu, Leu-Val).¹⁰⁹ Das Temperatur-optimum der Enzymaktivität liegt dabei bei 37 °C, das pH-Optimum zwischen 1.5 und 4. Aktivitätshemmend wirken dabei Hydroxidionen, Neutralsalze, Gallensäure und Peptide wie Pepstatin A. Irreversible Denaturierung tritt beim Erhitzen von mehr als 70 °C oder bei einem pH-Wert größer als sechs ein. Technisch gewonnen wird Pepsin A durch Extraktion aus der Magenschleimhaut von Schlachttieren.¹¹⁰

4.2 Trypsin

Trypsin (EC 3.4.21.4) ist eine Serin-Protease mit einem Molekulargewicht von ca. 23300 g/mol, bestehend aus 223 Aminosäuren und kommt im Dünndarm von Säugetieren vor.¹¹⁰ Diese Endopeptidase spaltet Peptide präferentiell C-terminal der basischen Aminosäuren L-Arginin und L-Lysin, da diese positiv geladenen Seitenketten mit dem negativ geladenen L-Aspartat-Rest in der Substrat-Bindungstasche ionische Wechselwirkungen ausbilden können.¹¹⁰ Optimale Spaltungsbedingungen werden bei 37 °C und einem pH-Wert zwischen 7 und 9.5 erreicht. Ein bekannter Inhibitor ist α_1 -Antitrypsin. Irreversible Denaturierung tritt beim Erhitzen von mehr als 70 °C ein.¹¹¹ Technisch gewonnen wird Trypsin aus der Bauchspeicheldrüse von Schwein, Rind und Mensch.

4.3 Hepsin

Hepsin (EC 3.4.21.106) wird ebenfalls zu den Serin-Proteasen gezählt. Es ist eine extrazelluläre Typ-II-Transmembran-Protease, die aus 417 Aminosäuren aufgebaut ist und ein Molekulargewicht von ca. 51000 g/mol besitzt.¹¹² Das Enzym spaltet Peptide ebenfalls C-terminal der basischen Aminosäuren L-Arginin und L-Lysin, jedoch erfolgt keine Spaltung nach aromatischen oder aliphatischen Aminosäuren.¹¹³ Des Weiteren nimmt die Spezifität mit zunehmender Länge der Erkennungssequenz (QRR, RQLRVVGG) zu.¹¹⁴ Das Temperaturoptimum liegt, wie bei vielen Enzymen, bei 37 °C, das pH-Optimum zwischen 6 und 9. Aktivitätshemmend wirken dabei generelle Proteaseinhibitoren wie z.B. 3,4-Dichloroisocoumarin, Leupeptin oder Aprotinin.^{113,114}

Hepsin kommt in der Leber vor und wird unter anderem im Prostatakrebs überexprimiert.¹¹⁵ Man gewinnt es z.B. aus der Leber (Ratte) oder aus Zellkulturen.^{113,114}

Ausgehend vom Zielenzym des Projektes Hepsin als überexprimiertes Enzym in Prostatakrebs wurde ein einfacheres, billigeres Modellsystem gesucht. Pepsin wurde als Vertreter der Proteasen als erstes Modellenzym gewählt, da es eine kurze Peptidsequenz ohne störende funktionelle Gruppen als Substrat erlaubte. Für erste Experimente war diese Protease sehr gut geeignet.¹¹⁶ Da dieses Enzym nicht unter physiologischen pH-Werten arbeitet, wurde für die folgenden Experimente eine ebenfalls unspezifische Protease gesucht, die eine ähnliche Peptidsequenz wie Pepsin spaltet. Trypsin bot sich durch die gute Verfügbarkeit und einem ähnlichen pH-Optimum wie Hepsin dafür an. Nach der Entwicklung der entsprechenden Modellsysteme wurde das gewonnene Wissen auf eine Hepsin-spaltbare Peptidsequenz übertragen.

5. Die radikalische Copolymerisation

Da ein Großteil dieser Arbeit auf einem Copolymer aus Acrylsäure und Styrolbasiert, werden in diesem Kapitel die Grundlagen der radikalischen Copolymerisation nur kurz beschrieben.

In der Forschung und vor allem in der Industrie wird die radikalische Polymerisation sehr häufig eingesetzt, da sie sehr kostengünstig und einfach in der Durchführung ist. Außerdem kann dabei ein breites Spektrum an Monomeren eingesetzt werden.

Die Vielfalt der so gewonnenen Materialien kann erheblich erweitert werden, indem man zwei oder mehrere unterschiedliche Monomere zusammen umsetzt. In diesem Fall spricht man von Copolymerisation. Dabei kann man die Copolymere nach der Anordnung der Monomereinheiten unterteilen. Es existieren statistische, alternierende, Gradienten-, Block- sowie Pfropfcopolymere.¹¹⁷

Die Theorie wird auf die radikalische Copolymerisation von zwei Monomeren beschränkt und ist im Detail in der Literatur beschrieben.¹¹⁷⁻¹¹⁹

Eine Möglichkeit, die Copolymerisation zu beschreiben, ist das Terminal-Modell.¹¹⁸ Hierbei wird angenommen, dass die aktiven Kettenenden a oder b der wachsenden Polymere irreversibel mit den beiden Monomeren A und B reagieren. Daraus resultiert die Copolymerisationsgleichung:¹¹⁸

$$\frac{d[a]}{d[b]} = \frac{1 + r_A \left(\frac{[A]}{[B]} \right)}{1 + r_B \left(\frac{[B]}{[A]} \right)}$$

Dabei ist $d[a]/d[b]$ die Änderung der Monomer Konzentrationen [A] und [B] im Copolymer und r_A bzw. r_B sind die Copolymerisationsparameter die durch folgende Gleichungen angegeben werden:¹¹⁸

$$r_a = \frac{k_{aA}}{k_{aB}} \quad r_b = \frac{k_{bB}}{k_{bA}}$$

Hier sind k_{aA} bzw. k_{bB} die Geschwindigkeitskonstanten der Homopolymerbildungsreaktionen und k_{aB} bzw. k_{bA} die Geschwindigkeitskonstanten der Copolymerbildungsreaktionen. Man kann aus ihnen die Wahrscheinlichkeit ablesen, ob ein Monomer mit der wachsenden Polymerkette reagiert, wodurch letztlich die Polymersequenz bestimmt wird.

Mithilfe der Copolymerisationsgleichung und -parametern lässt sich für ein beliebiges Monomerverhältnis die Zusammensetzung des entsprechenden Copolymers berechnen. Um die Copolymerzusammensetzung über den gesamten Bereich der Monomerzusammensetzungen anschaulich zu beschreiben, ist die Verwendung von Copolymerisationsdiagrammen sinnvoll (siehe Abbildung 20).¹¹⁸

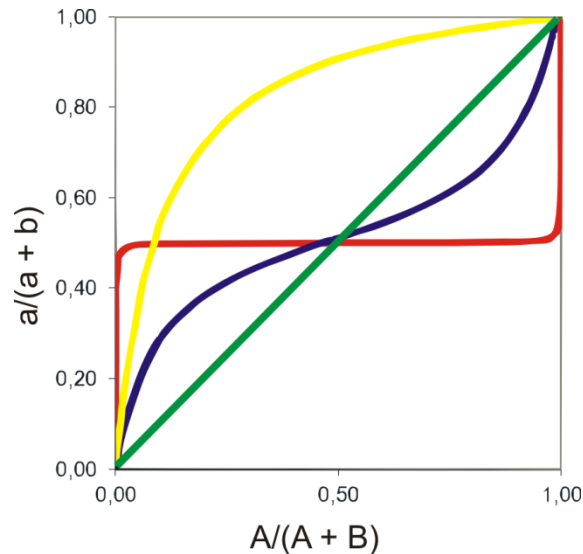


Abbildung 20: Copolymerisationsdiagramm für ideal azeotrope ($r_1 = r_2 = 1$, grün), alternierend azeotrope ($r_1 = r_2 = 0.001$, rot), statistische ($r_1 = 1/r_2 = 10$, gelb) und statistisch azeotrope ($r_1 = r_2 = 0.2$, blau) Copolymerisation.
Y-Achse: Polymerzusammensetzung, X-Achse: Monomerzusammensetzung.

Um die Copolymerisationsparameter zu bestimmen, kann die Methode nach Lewis-Mayo oder nach Finemann-Ross angewendet werden.¹¹⁸ Bekannte Werte für bestimmte Monomerkombinationen lassen sich in der Literatur nachschlagen.¹²⁰

Alternativ lassen sie sich über das Q - e Schema von Alfrey und Price über folgende Beziehungen ermitteln¹¹⁹:

$$r_a = \left(\frac{Q_A}{Q_B} \right) \cdot \exp[-e_A(e_A - e_B)] \cdot \text{bzw.} \cdot r_b = \left(\frac{Q_B}{Q_A} \right) \cdot \exp[-e_B(e_B - e_A)]$$

Hier beschreiben die Variablen Q_A bzw. Q_B die Reaktivität des Monomers A bzw. B und e_A bzw. e_B ein Maß für die Polarität des Monomers A bzw. B. Beide Größen zusammen geben eine Auskunft über die Reihenfolge des Einbaus der Monomere ins Copolymer.

Für das verwendete Monomerpaar Styrol und Acrylsäure lauten die Q -, e - und r -Werte:¹²⁰

$$\begin{array}{ll} \text{Styrol:} & Q_A = 1, e_A = -0.8 \\ \text{Acrylsäure:} & Q_B = 0.83, e_B = 0.88 \\ & \rightarrow r_a = 0.31 \\ & \rightarrow r_b = 0.19 \end{array}$$

Da die Q -Werte sehr ähnlich sind und die e -Werte unterschiedliche Vorzeichen haben, lässt sich ein statistischer Einbau der Monomere ins Copolymer vermuten. Dies wird durch die recht ähnlichen Copolymerisationsparameter, die kleiner als eins sind, unterstützt. Die resultierende Copolymersequenz hängt jedoch von weiteren Parametern wie Temperatur, eingesetztem Lösemittel usw. ab. Somit lässt sich aus diesen Werten nur eine Tendenz erkennen.¹¹⁷

6. Peptid-Polymer-Konjugate

In diesem Abschnitt wird auf die Materialklasse der Peptid-Polymer-Konjugate eingegangen, ihre Einteilung, ihre Synthese und ihre Anwendungsgebiete erläutert.

6.1 Definition der Peptid/Protein-Polymer-Konjugate

Eine interessante Klasse von organischen Hybridmaterialien sind die sogenannten Peptid-Polymer-Konjugate bzw. Protein-Polymer-Konjugate. Dabei wird eine bestimmte Anzahl an Peptiden oder Proteinen mit definierter Primärstruktur kovalent an ein definiertes synthetisches Polymer gebunden.¹²¹ Die resultierenden Materialien profitieren dabei vom Zusammenspiel der beiden Komponenten, indem sich entweder die positiven Eigenschaften ergänzen oder Nachteile der Einzelkomponenten verringert werden.

Polymere besitzen eine Vielzahl an interessanten Eigenschaften wie die Reaktionsfähigkeit auf einen äußeren Reiz wie pH-Wert oder Temperatur (engl.: stimuli responsiveness), Bioabbaubarkeit und -kompatibilität, hohe mechanische Festigkeit, Leitfähigkeit usw.¹²² Um dieses Spektrum noch zu erweitern, kann die Fähigkeit von Peptiden bzw. Proteinen zur Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturbildung sowie die hochspezifische Erkennung durch Enzyme in synthetische Polymere eingeführt werden.¹²²

Peptide und Proteine können aber auch negative Eigenschaften aufweisen. Sie können toxisch sein, eine Immunreaktion im Organismus auslösen und ihre biologische Aktivität durch enzymatischen Abbau verlieren. Hier kann die kovalente Anbindung eines Polymers helfen, diese unerwünschten Effekte zu vermindern.¹²³

Peptid/Protein-Polymer-Konjugate sind in der Lage, das Beste aus beiden Materialklassen zu vereinen, was zu stark verbesserten oder gänzlich neuen Eigenschaften führt. Sie wurden erstmals 1954 in der Literatur in Form eines Poly(*N*-vinylpyrrolidon)-Gly-Leu-Meskalin-Konjugats beschrieben.¹²⁴

6.2 Einteilung der Peptid/Protein-Polymer-Konjugate

Es gibt mehrere Möglichkeiten, die Materialklasse der Peptid/Protein-Polymer-Konjugate zu klassifizieren. Zum einen kann eine Einteilung nach der Synthesemethode der Konjugate erfolgen. Man kann dabei zwischen vier Synthesestrategien unterscheiden (siehe Abbildung 21).¹²² Die erste Möglichkeit, die direkte Kupplung, zielt mithilfe chemoselektiver Reaktionen auf die kovalente Anbindung des vorgefertigten Peptids oder Proteins an das Polymer ab. Die zweite Methode verwendet Peptidmakroinitiatoren, um das Polymer zu synthetisieren („grafting from“). Der dritte, der inverse Ansatz, basiert auf dem Prinzip der SPPS und baut das Peptid auf einem vorgefertigten Polymer auf. Die vierte Möglichkeit der Peptid/Protein-Polymer-Konjugatsynthese setzt Peptid(makro)monomere ein, um durch deren Copolymerisation ein Polymer zu erhalten („grafting through“).

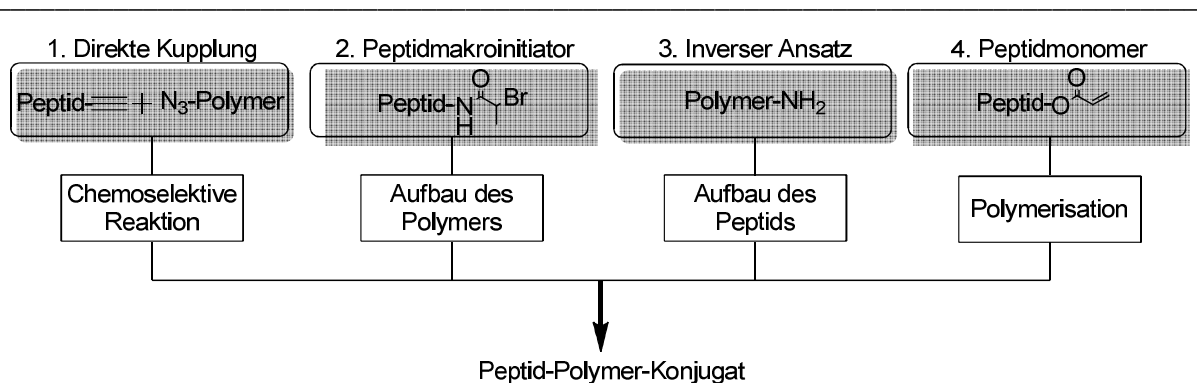


Abbildung 21: Die vier Synthesestrategien der Peptid-Polymer-Konjugatsynthese.

Eine weitere Möglichkeit der Klassifizierung basiert auf den Eigenschaften der Einzelkomponenten. Ausgehend vom Polymerteil kann man den Einsatz von hydrophilen oder hydrophoben Polymeren unterscheiden (siehe 6.3.2). Betrachtet man den Peptid- oder Proteinteil, kann dieser nach dessen Funktion eingeteilt werden (siehe 6.3.1).

Schließlich besteht die Möglichkeit, die Peptid/Protein-Polymer-Konjugate als Einheit zu betrachten und nach ihren Anwendungen einzuteilen (siehe 6.4), wobei ihre kombinierten Eigenschaften zum Tragen kommen. Als Beispiele können hier besondere mechanische Eigenschaften,¹²⁵ der Wirkstofftransport (Drug-delivery),¹²⁶ die Wirkung als Mineralisationsadditive,¹²⁷ Selbstorganisationsphänomene,¹²⁸ die Bildung von biologisch aktiven Oberflächen¹²⁹ oder die Reaktionsfähigkeit auf einen äußeren Reiz (pH, Temperatur, Enzym)^{122,130} angeführt werden.

Aufgrund des breiten Spektrums dieser Materialklasse wird im Folgenden vor allem auf Peptid-Polymer-Konjugate (≤ 40 Aminosäuren) eingegangen und dabei nur Konjugate mit synthetischen Polymeren vorgestellt. Der Fokus liegt dabei auf enzymatisch spaltbaren Konjugaten. Ein umfassender Überblick kann in zahlreichen Übersichtsartikeln^{121-123,128,131-134} erhalten werden.

6.3 Synthesestrategien für die Peptid-Polymer-Konjugate

Bevor die eigentliche Synthese der Peptid-Polymer-Konjugate erklärt wird, muss zuerst auf die beiden Einzelkomponenten eingegangen werden. Das Polymer bzw. das Peptid müssen so konzipiert sein, dass beide chemoselektiv miteinander reagieren können.

6.3.1 Die Peptidkomponente - Funktionalisierung einer Peptidsequenz

Für die Synthese der Konjugate sind einige wichtige Details zu bedenken. Die Anbindung an ein Polymer darf die Peptidstruktur oder -funktion nicht verändern. Außerdem muss sichergestellt werden, dass die Gruppe, über die die Anbindung erfolgen soll, für chemische Reaktionen zugänglich ist und sich nicht im Inneren der gebildeten Tertiärstruktur befindet. Der wichtigste Aspekt ist allerdings die Wahl der richtigen funktionellen Gruppe für die Kupplung. Beim Design des Peptids ist es nötig, entweder Aminosäuren einzubauen, die chemoselektiv modifiziert werden können, ohne dabei andere Aminosäuren der Sequenz zu beeinflussen, oder aber direkt Gruppen einzuführen, die bei der Kupplung des Polymers chemoselektiv agieren.

Eine Vielzahl von Möglichkeiten für die erstgenannte Strategie ist in der Literatur zu finden.^{121,122,128,135} Die Möglichkeiten dabei reichen von der Modifizierung von Aminosäuren mit bestimmten Funktionen wie Lysin (-NH₂), Cystein (-SH), Glutamin (-CONH₂), Tyrosin (-OH) oder Asparagin- bzw. Glutaminsäure (-COOH) bis zur Verwendung des C- und/oder N-Terminus eines Peptids. Reaktionen, die dabei zum Einsatz kommen, sind zum Beispiel der elektrophile Angriff durch aktivierte Carbonsäuren, Aldehyde oder Ketone,¹³⁶ die Michael-Addition,¹²⁸ die Disulfidbildung,¹³⁶ Reaktionen mit π -Allylpalladiumkomplexen,¹³⁵ die Diazoniumkupplung,¹³⁵ enzymatische Umsetzungen mit Transglutaminase¹²⁸ oder die Thioesterbildung.¹²¹

Das Problem dieser nachträglichen Modifikation der Peptidsequenz ist die inhärente Beschränkung des Synthesepotentials durch funktionelle Aminosäuren. Um Nebenreaktionen zu vermeiden, muss immer darauf geachtet werden, dass die entsprechende Aminosäure bzw. funktionelle Gruppe nur einmal in der Peptidsequenz auftritt. Das bedeutet, dass diese Methoden zwar nicht universell, jedoch häufig schnell und einfach anzuwenden sind und deshalb bei entsprechender Eignung der Peptidsequenz sehr gute Resultate liefern.

Um diese Beschränkung zu vermeiden, ist es im Gegensatz zur nachträglichen Modifikation des Peptids möglich, eine chemoselektive Gruppe direkt bei der Peptidsynthese einzubauen. Bei Peptiden mit bis zu 50 Aminosäuren hat man mithilfe der SPPS die Möglichkeit, nicht kanonische Aminosäuren an beliebiger Position in das Peptid einzubauen. Diese können spezifische funktionelle Gruppen tragen, die für eine chemoselektive Umsetzung eingesetzt werden können. Beispiele hierfür sind Aminosäuren mit Alken-, Alkin-, Borsäureester- oder Azidogruppen, die in den in Abschnitt 6.3.3 aufgeführten chemoselektiven Reaktionen eingesetzt werden können.¹²¹ Die einzige Einschränkung hierbei ist die nötige Kompatibilität mit den Reaktionsbedingungen der SPPS, welche aber bei den genannten Gruppen gegeben ist.

Alternativ kann ein gezielter Einsatz bestimmter Harze oder Schutzgruppen in der SPPS erfolgen, um spezielle Funktionen unter definierten Bedingungen gezielt freizusetzen bzw. einzuführen. Als Beispiel kann die Verwendung der Acetamidomethyl (Acm)-Schutzgruppe für die Thiofunktion (Cys) oder der 4-Methyltrityl (Mtt)-Schutzgruppe für Aminogruppen (Lys) angeführt werden.⁹⁷ Bei längeren Peptidsequenzen bzw. Proteinen ist die Synthese mittels SPPS zunehmend schwieriger und wird einfacher über biosynthetische Methoden realisiert.¹²²

Peptide, die bei der Synthese von Peptid-Polymer-Konjugaten Anwendung finden, haben bestimmte Funktionen. Zum einen existieren Peptide, die bestimmte Konformationen annehmen, wie z.B. eine α -Helix,¹³⁷ eine gewundene Schraube (coiled-coil),¹³⁸ ein β -Faltblatt¹³⁹, und diese auf einen Reiz hin verändern können.¹⁴⁰ Außerdem werden Peptide eingesetzt, die besondere strukturelle Eigenschaften aufweisen. Hier können seiden-,¹²⁵ elastin-,¹⁴¹ titin-,¹⁴² oder collagenähnliche¹⁴³ Peptide aufgezählt

werden. Ein weiterer Aspekt sind zelladhäsive Peptide wie RGD¹⁴⁴ oder zellpenetrierende Peptide wie TAT.¹⁴⁵ Außerdem existieren antimikrobielle Peptide, wie z.B. Tritrpticin¹⁴⁶ oder Magainin I.¹²⁹ Zu erwähnen sind zudem rezeptorbindende¹⁴⁷ oder enzymatisch spaltbare¹³⁰ Peptidsequenzen.

6.3.2 Die Polymerkomponente - Funktionalisierung des Polymers

Betrachtet man die Polymerkomponente, ist zum einen die Verwendung eines multifunktionalisierten Polymers denkbar, zum anderen der Einsatz eines monofunktionalisierten Polymers. Die Funktionalität der Polymerkomponente muss dabei jeweils auf die spezifische funktionelle Gruppe des gewünschten Peptids angepasst werden.

Es gibt eine Reihe von Polymerisationsarten, die für die Synthese eines *multifunktionalisierten* Polymers in Frage kommen. Die (kontrolliert) radikalische Polymerisation kann verwendet werden, um Monomere umzusetzen, die funktionelle Gruppen tragen, die anschließend chemoselektiv mit der Peptidkomponente reagieren. Als Beispiele sind hier Monomere mit Aryl-Halogeniden, Alkinen und Aziden, Aldehyden, Ketonen, Säuren oder Aktivestern anzuführen.¹²¹ Monomere, die mit Aminosäuren funktionalisiert wurden, können auch eingesetzt werden,¹⁴⁸ wobei die in Abschnitt 6.3.3 erläuterten Synthesestrategien angewendet werden können.

Eine weitere wichtige Polymerisationsart ist hier die anionische Polymerisation. Die funktionellen Gruppen müssen jedoch die stark basischen Bedingungen tolerieren, die dabei auftreten. Durch diese Polymerisationsart wurde unter anderem thiol-, hydroxyl-, amino- alkin- oder säurefunktionalisiertes Polystyrol¹⁴⁹ dargestellt. Auch die lebende kationische Ring-öffnende Polymerisation (engl.: cationic ring-opening polymerization, CROP) stellt eine Möglichkeit dar, um amino-, azido-, alkenyl- oder aldehydfunktionalisierte Polymere zu synthetisieren.¹²¹ Weitere potentielle Polymerisationsarten sind die Ring-öffnende Metathesen-Polymerisation (ROMP), die acyclische Dien-Metathesen-Polymerisation (ADMET) sowie die Ring-öffnende Polymerisation (ROP) von zyklischen Estern.¹³¹

Bei der *Monofunktionalisierung* von Polymeren bieten sich entsprechend funktionalisierte Initiatoren oder Kettenabbruchreagenzien für kontrollierte oder lebende Polymerisationsarten an. Potentielle Initiatoren für die Atom-Transfer radikalische Polymerisation (ATRP) sind in verschiedenen Übersichtsartikeln aufgeführt.^{150,151} Eine weitere Alternative ist der Einsatz funktioneller Initiatoren für die Nitroxid-mediierte radikalische Polymerisation (NMRP), bei denen zum Beispiel geschützte Amino- oder Hydroxylgruppen verwendet wurden. Die reversible Additions-Fragmentierungs-Ketten-Transfer-Polymerisation (RAFT) wurde ebenfalls für die Synthese einfach funktionalisierter Polymere verwendet, um Amino-, Alkin- oder Säurefunktionen in das Polymer einzubauen. Die anionische Polymerisation kann bei der Wahl des passenden Initiators ebenfalls für die Synthese von thiol-, hydroxyl-, amino-, säure-, oder aldehydfunktionalisierter Polymere eingesetzt werden.¹²¹

Der Einsatz von Kettenabbruchreagenzien ermöglicht die Einführung funktioneller Endgruppen, die dann für die Peptidkupplung verwendet werden können. So können an halogenterminierte Polymere aus der ATRP mittels nukleophiler Substitution, elektrophiler oder radikalischer Addition reaktive Gruppen wie Azide oder Amine angebunden werden.¹⁵⁰ Die anionische Polymerisation kann mit

geschützten funktionellen Gruppen abgebrochen werden. So können Säurefunktionen, Aldehyde, Alkine, Azide oder Amine in das Polymer eingeführt werden. Auch bei der ROP, ADMET oder ROMP ist die Einführung von funktionellen Gruppen möglich.¹²¹

Die Liste der Polymere, die bereits für die Synthese von Peptid-Polymer-Konjugaten eingesetzt wurden, ist lang. Es sind hydrophile Polymere wie Polyethylenglycol (PEG), Poly(2-hydroxypropyl)methacrylat (PHPMA), Polyacrylsäure (PAA), Poly(*N*-vinylpyrrolidon) (PVP), Polyacrylamid (PA), Polyvinylalkohol (PVA) oder hydrophobe Polymere wie Polystyrol (PS), Polymethylmethacrylat (PMMA), Polyphenylen (PPE), Polylactid (PLA), Polybutadien (PB) oder Poly(*n*-butylacrylat) (PnBA) eingesetzt worden. Daneben sind auch noch Polymere zu erwähnen, deren Polarität sich aufgrund von äußeren Reizen verändert. Zu solchen Polymeren zählt unter anderem Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAAm), das eine „untere kritische Lösungstemperatur“ (engl.: lower critical solution temperature, LCST) in einem interessanten Bereich aufweist.

6.3.3 Die direkte Kupplung

Bei dieser Synthesemethode von Peptid-Polymer-Konjugaten wird ein entsprechend funktionalisiertes, vorgefertigtes Peptid mithilfe chemoselektiver Reaktionen direkt an ein Polymer mit komplementärer Funktion gekuppelt.

6.3.3.1 Die Peptidkupplungschemie

Der direkteste Weg der Synthese der Peptid-Polymer-Konjugate liegt in der Anwendung der Synthesemethoden, die bereits vom Aufbau der Peptide bekannt sind. Wie in Abschnitt 2.9 erläutert, existieren hierfür über Jahrzehnte entwickelte, hoch effiziente Kupplungsreagenzien für die Bildung einer Amidbindung aus einem Amin und einer Säure (siehe Abbildung 22).

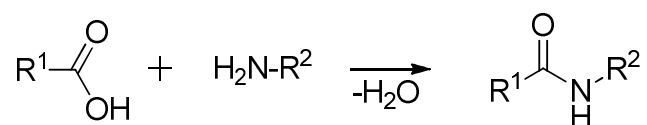


Abbildung 22: Amidbildung als Strategie zur Peptid-Polymer-Konjugatsynthese.

Diese Methode wurde zum Beispiel bei der Synthese von PEGylierten Peptiden, die eine β -Faltblattstruktur einnehmen,¹⁵² bei Peptid-Polymer-Konjugaten basierend auf der Peptidsequenz (TV)₅FG und dem Polymer Poly(*n*-butylacrylat)¹⁵³ oder bei der Synthese von PS-*b*-(GANPNAAG)-*b*-PS auf Festphase verwendet.¹⁵⁴

Obwohl diese Strategie zwar bei entsprechend konzipierten Peptiden sehr gute Resultate liefert, bleibt eine inhärente Beschränkung des Synthesepotentials bestehen. Um eine definierte Reaktion zu gewährleisten, muss immer darauf geachtet werden, dass die entsprechende Aminosäure (Glu, Asp, Lys) bzw. funktionelle Gruppe (-COOH, NH₂) nur einmal in der Peptidsequenz auftritt oder gleiche Funktionen geschützt vorliegen.

6.3.3.2 Die reduktive Aminierung, Oxim- und Hydrazonbildung

Weitere funktionelle Gruppen, die in der Peptid-Polymer-Konjugat Synthese sehr nützlich sind, sind Ketone und Aldehyde. Sie können mit Aminen durch reduktive Aminierung, mit Alkoxyaminen und Hydrazinen umgesetzt werden (siehe Abbildung 23). Dabei entstehen Amine, Oxime und Hydrazone.

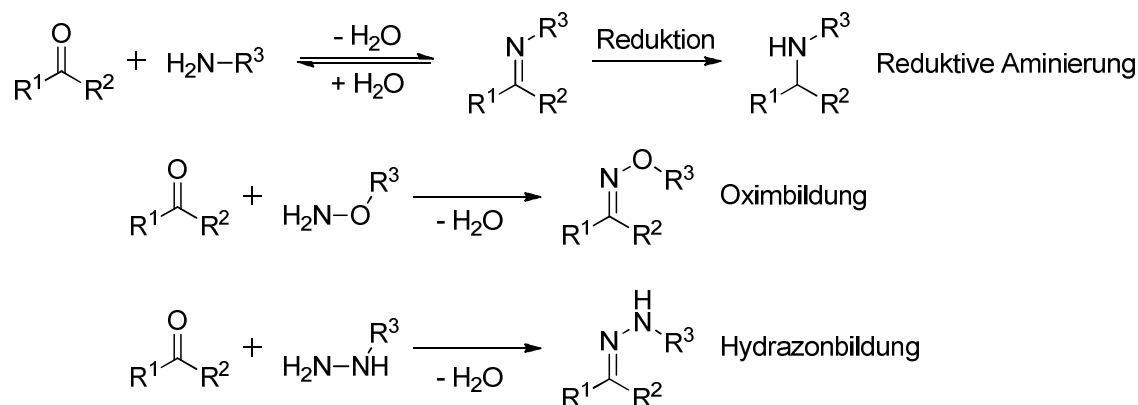


Abbildung 23: Die reduktive Aminierung, Oxim- und Hydrazonbildung als Strategien zur Peptid-Polymer-Konjugatsynthese.

Die reduktive Aminierung wurde unter anderem für die Synthese von PEGylierten Proteinen verwendet.¹⁵⁵ Das gebildete Imin ist nicht stabil und somit muss ein Reduktionsschritt angeschlossen werden. Die Hydrazonbildung wurde beispielsweise für die Synthese von Polyethylenimin-gebundenem humanem Transferrin eingesetzt.¹⁵⁶ Die Oximbildung diente zur PEG-Modifizierung eines Proteins mit 166 Aminosäuren.¹⁵⁷

Ein negativer Aspekt der reduktive Aminierung liegt wiederum in der Beschränkung des Synthesepotentials, da Amine in Form von Lysin häufig in Peptiden vorkommen. Die Einschränkung bei den Oximen und Hydrazonen liegt in ihrer mangelnden chemischen Stabilität bei pH-Werten über 9.¹⁵⁸

6.3.3.3 Die Michael-Addition

Eine häufig verwendete Synthesestrategie ist die Michael-Addition von Thiolen. Dabei wird ein Mercaptan (R-SH) mit Alkenen wie Acrylaten, Maleinsäureimiden, Vinylsulfonen oder Iodacetamiden umgesetzt (siehe Abbildung 24).¹²⁸

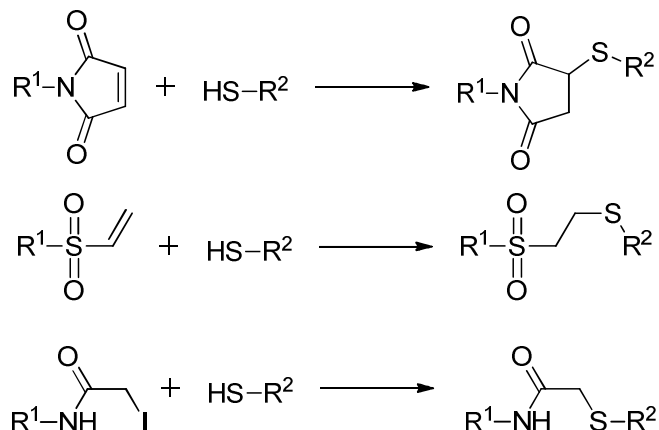


Abbildung 24: Die Michael-Addition als Strategie zur Peptid-Polymer-Konjugatsynthese.

Die Reaktion wurde zum Beispiel dazu verwendet, ein Peptid (GCPLYKKIIKKLLES) auf PEG-Acrylat-funktionalisiertes Harz aus der SPPS zu kuppeln.¹⁵⁹

Der Vorteil dieses Syntheseweges sind die milden Reaktionsbedingungen sowie die Abwesenheit jeglicher organometallischer Katalysatoren. Nachteilig wirkt sich die Reaktion mit Cystein in der Beschränkung des Synthesepotentials aus, wenn mehrere Cysteineinheiten im Peptid auftreten.

6.3.3.4 Die Staudinger-Ligation

Eine weitere, chemoselektive Methode ist die Staudinger-Ligation, bei der ein Azid und ein Triarylphosphin zu einem Amid umgesetzt werden. Eine Weiterentwicklung ist die sogenannte spurlose („traceless“) Staudinger-Ligation (siehe Abbildung 25), bei der ein Phosphinothioester mit einem Azid reagiert, dabei ein Amid bildet, aber im Gegensatz zur ursprünglichen Reaktion kein Triarylphosphin im Zielmolekül verbleibt.¹⁶⁰

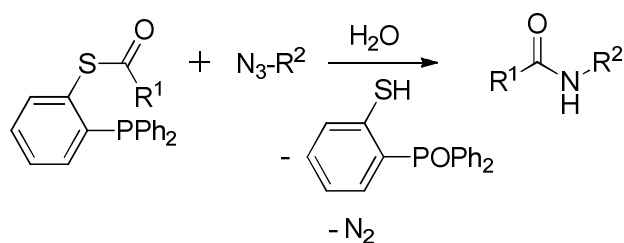


Abbildung 25: Die spurlose Staudinger-Ligation als Strategie zur Peptid-Polymer-Konjugatsynthese.

Diese Strategie wurde bei der Synthese eines PEG-basierten Konjugats eines bestimmten Proteins (Thrombomodulin) verwendet.¹⁶¹ Obwohl noch nicht viele Beispiele für diese Syntheseroute von Peptid-Polymer-Konjugaten in der Literatur existieren, ist diese Reaktion sehr wertvoll, da sie chemoselektiv und unter milden Bedingungen verläuft.

6.3.3.5 Cycloadditionsreaktionen

Eine weitere Klasse chemoselektiver Synthesen sind Cycloadditionsreaktionen. Dabei kann man vor allem die Retro-Diels-Alder-Reaktion in Kombination mit einer Cu(I)-assistierte Huisgen [1,3]-dipolaren Cycloaddition („Click-Reaktion“) oder die Click-Reaktion alleine für die Darstellung von Peptid-Polymer-Konjugaten heranziehen (siehe Abbildung 26).¹⁶²

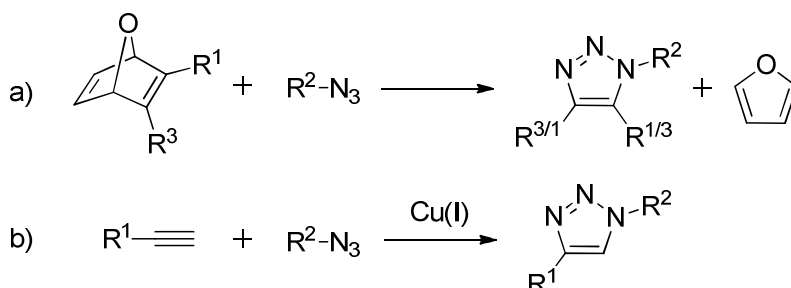


Abbildung 26: a) Tandemreaktion aus Retro-Diels-Alder- und Click-Reaktion und
b) Click-Reaktion als Strategien zur Peptid-Polymer-Konjugatsynthese.

Mittels einer spontanen, kupferfreien Tandemreaktion aus Retro-Diels-Alder und [1,3]-dipolarer Cycloaddition konnte erfolgreich PEG mit einem RGD-Peptid kovalent gebunden werden.¹⁶³ Auch die Click-Reaktion alleine wurde schon mehrfach erfolgreich für die Synthese von Peptid-Polymer-Konjugaten eingesetzt. So wurde azid-funktionalisiertes Polystyrol an eine alkynylfunktionalisierte Peptidsequenz (GGR) gekuppelt, um daraus selbstaggregierende Mizellen zu erhalten.¹⁶⁴ Des Weiteren wurde das RGD-Peptid erfolgreich durch einen „grafting to“-Ansatz der Click-Reaktion an einen aliphatischen Polyester¹⁶⁵ bzw. an endfunktionalisiertes Poly(oligo(ethylenglycol)acrylat) (POEGA)¹⁶⁶ gebunden. Auch Polystyrol wurde eingesetzt, um daran ein Derivat des TAT-Peptids (GRKKRRQRRR) zu binden.¹⁶⁷

Betrachtet man die Eignung dieser beiden Synthesestrategien, lässt sich feststellen, dass auch hier entsprechend modifizierte Aminosäuren einfach in Peptide eingebaut werden können (siehe 2.13). Bei der Retro-Diels-Alder-Reaktion können jedoch Nebenreaktionen mit Lysin, Arginin und Histidin auftreten.¹⁶³ Mit der Click-Reaktion ist synthetische Vielfalt und Chemoselektivität gewährleistet. Außerdem ist es möglich, hohe Ausbeuten unter milden, wässrigen Bedingungen zu erzielen.¹²² Obwohl Probleme durch Koordination des Kupfers durch Aminosäuren wie Arginin auftreten können, lässt sich dies durch den Einsatz effektiver Cu(II)-chelatisierender Liganden wie *N,N,N',N'',N''*-Pentamethyldiethylentriamin (PMDETA) vermeiden.¹⁶⁴ Um den Aspekt der Toxizität von Cu(I) zu umgehen, wurden kupferfreie Varianten der Click-Reaktion entwickelt.^{168,169}

6.3.3.6 Weitere potentielle Reaktionen

Theoretisch ist auch der Einsatz palladium-katalysierter Kreuzkupplungen wie die Heck-,¹⁷⁰ die Suzuki-Miyaura-¹⁷¹ und die Sonogashira-Hagihara-Kupplung¹⁷² denkbar. Entsprechend modifizierte Aminosäuren können ebenfalls in Peptide eingebaut werden. Exotischere Varianten, die nur auf bestimmte Systeme angewandt werden können, sollen hier nur am Rande erwähnt werden. Es existiert

die Möglichkeit der Einführung einer Tetracysteineinheit in Peptide, welche dann selektiv mit zweifach arsenhaltigen Organometallverbindungen reagieren kann.¹⁷³ Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz des Enzyms Transglutaminase¹⁷⁴ oder der Weg über eine oxidative Kupplung.¹⁷⁵

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es viele Möglichkeiten der Darstellung von Peptid-Polymer-Konjugaten gibt, aber die ultimativ anwendbare Synthesestrategie bisher noch nicht existiert. Man muss entweder Einschränkungen hinsichtlich der Synthesefreiheit eingehen oder aber die Anwesenheit von metallischen Katalysatoren in der Reaktion tolerieren. Unter diesem Aspekt sind die kupferfreie Click-Reaktion sowie die Staudinger-Ligation sehr vielversprechend.

6.3.4 Die Verwendung von Peptidmakroinitiatoren - „grafting from“

Wenn bei der direkten Kupplung Probleme aufgrund der eingeschränkten Zugänglichkeit der funktionellen Gruppen im Makromolekül oder aufgrund der schwierigen Trennung von Edukten und Produkt Probleme auftreten, kann alternativ die Polymerisation ausgehend von Peptidmakroinitiatoren angewandt werden. In der Literatur sind dazu vor allem kontrolliert radikalische Polymerisationen wie die ATRP,¹⁷⁶ die NMRP¹⁷⁷ und die RAFT¹⁷⁸ beschrieben. Drei potentielle Initiatoren für diese Polymerisationsarten sind in Abbildung 27 aufgeführt.

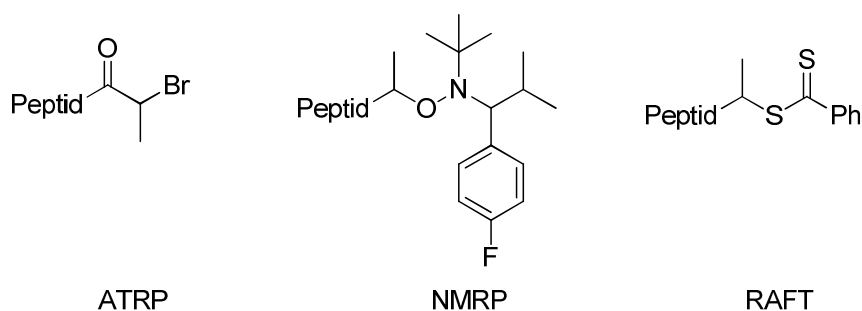


Abbildung 27: Initiatoren für die ATRP,¹⁷⁹ die NMRP¹⁸⁰ und die RAFT¹⁸¹ zum Einsatz in der Peptid-Polymer-Konjugatsynthese.

6.3.4.1 Die ATRP

Eines der ersten, durch die ATRP synthetisiertes Peptid-Polymer-Konjugat bestand aus einem Poly(2-hydroxyethylmethacrylat)-gebundenem RGD-Peptid.¹⁷⁹ Die Polymerisation von 2-Hydroxyethylmethacrylat wurde von einem Harz-gebundenen Peptid gestartet. Kurz danach wurde von einer Konjugatsynthese mittels ATRP in Lösung berichtet.¹⁸² Dabei wurde, ausgehend vom Peptid in Lösung, DFGDG-*b*-Poly(*n*-butylacrylat) synthetisiert. Außerdem konnte durch diesen Ansatz erfolgreich ein ABA-Triblockcopolymer aus Polymethylmethacrylat und dem zweifach funktionalisierten Peptid (SGSGSEGAGASG) hergestellt werden.¹⁸³ Diese Konjugate zeigen ein Aggregationsverhalten zu Mizellen. Daneben sind auch zahlreiche Polymerisationen ausgehend von Proteinmakroinitiatoren beschrieben.¹⁵¹

All diese Beispiele lassen das breite Spektrum der möglichen Reaktionen nur erahnen. Da aber bei der ATRP auch Cu(II) eingesetzt wird, können die gleichen Probleme auftreten, die schon bei der Click-

Reaktion erwähnt wurden. Auch der Effekt von Radikalen auf bestimmte Peptidsequenzen ist noch nicht untersucht.

6.3.4.2 Die NMRP

Mithilfe der NMRP wurden auf das Festphasen-gebundene TAT-Peptid (GRKKRRQRRR) *tert*-Butylacrylat sowie Methylacrylat copolymerisiert, um das Konjugat TAT-*b*-Polyacrylsäure-*b*-Polymethylacrylat zu erhalten.¹⁸⁰ Nach demselben Prinzip konnte das antimikrobielle Peptid VRRFPWWPFLRR (Tritrpticin) umgesetzt werden, um das amphiphile Blockcopolymer Tritrpticin-*b*-Polyacrylsäure-*b*-Polystyrol darstellen zu können.¹⁴⁶ Eingeschränkt wird die NMRP im Allgemeinen durch die begrenzte Anzahl von Monomeren (z.B. Styrol, Methacrylat), die eingesetzt werden können.¹²²

6.3.4.2 Die RAFT-Polymerisation

Auch die RAFT-Polymerisation wurde für die Synthese von Peptid-Polymer-Konjugaten wie GDGFD-*b*-Poly(*n*-butylacrylat)¹⁸¹ oder Polyethylenoxid-*b*-(Arg)₁₀-*b*-Poly(*n*-butylacrylat)¹⁸⁴ eingesetzt. Auch Proteine wurden diesem Polymerisationsprozess unterzogen. Als Beispiel kann die Polymerisation von *N*-Isopropylacrylamid und Hydroxyethylacrylat ausgehend von BSA angeführt werden.¹⁸⁵ Ein Nachteil ist hier die Intoleranz gegenüber Nukleophilen wie Aminen (Lys) oder Thiolen (Cys), was bedeutet, dass nur mit geschützten Peptiden gearbeitet werden kann.

Betrachtet man allgemein die Strategie der kontrolliert radikalischen Synthese von Peptid-Polymer-Konjugaten, lässt sich sagen, dass alle drei Methoden durch die notwendige geringe Initiatordichte auf dem Protein oder Peptid eingeschränkt werden, woraus undefinierte Produkte resultieren können.¹⁸⁶

6.3.5 Der inverse Ansatz

Bei der Strategie des Aufbaus des Peptids auf dem Polymer wird wieder die SPPS eingesetzt (siehe Abschnitt 2). Es existieren Harze, bei denen PEG-Ketten über säurelabile Linker an den polymeren Träger gebunden sind. Mit dieser Methode wurde zum Beispiel ein PEGyliertes Peptid mit β -Faltblattstruktur¹⁵² oder ein PEGyliertes β -Amyloidfragment aus 27 Aminosäuren synthetisiert.¹⁸⁷ Außerdem wurde die Synthese von linearen Polystyrol-Peptid-Konjugaten (PS-*b*-GANPNAAG-*b*-PS) über SPPS beschrieben.¹⁵⁴ Daneben ist in Lösung die Synthese von Peptid-Polymer-Konjugaten basierend auf PEG, PS, Polyvinylalkohol, oder Polyethylenimin (PEI) möglich.¹⁸⁸

Eingeschränkt wird diese Synthesemethode durch das Problem der Produktaufreinigung beim Auftreten von Abbruchsequenzen während der Peptidsynthese. Die säulenchromatographische Trennung stellt hier eine große Herausforderung dar, da die Produkte sich aufgrund des großen Polymerteils im Vergleich zum kurzen Peptidteil sehr ähneln.

6.3.6 Einsatz eines Peptid(makro)monomers - „grafting through“

Als letzte Synthesemöglichkeit für Peptid-Polymer-Konjugate kann auch die Polymerisation eines Peptidmakromonomers erfolgen („grafting through“). In der Literatur ist die Anbindung von Peptiden wie AAAA oder GANPNAAG an Diacetylen mit anschließender Polymerisation beschrieben.^{189,190} Des Weiteren konnte die freie radikalische Polymerisation von *N*-Methacryloyl-(L-leucyl-L-alanyl)_nmethylester ($n = 2 - 4$)¹⁹¹ und die freie radikalische Copolymerisation von (2-Hydroxypropyl)methacrylat- und Methacrylamid-YILHRN¹⁴⁷ bzw. der an(2-Hydroxypropyl)methacrylat gebundenen, enzymatisch spaltbaren Sequenz GFLG¹⁹² erfolgreich durchgeführt werden. Auch von RAFT, NMRP, ATRP und ROMP wurde berichtet.¹²²

Die Vorteile dieser Strategie liegen in der einfacheren Trennung des resultierenden Makromoleküls und den niedermolekularen Edukten. Allerdings kann Cys als Kettenüberträger Probleme bereiten. Außerdem sinken der Monomerumsatz und das Molekulargewicht des Polymers mit zunehmender Länge des Peptids.¹⁹¹

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein sehr breites Portfolio an möglichen Synthesen für Peptid-Polymer-Konjugate existiert. In dieser Arbeit wurde aufgrund der Abwesenheit funktioneller Gruppen in der eingesetzten Trypsin-spaltbaren Peptidsequenz (GFF) die Peptidkupplungschemie eingesetzt. Bei der komplexeren, Hepsin-spaltbaren Peptidsequenz wurde die Click-Reaktion verwendet, da in der Sequenz Amide und Guanidingruppen vorhanden waren.

6.4 Anwendungen der Peptid-Polymer-Konjugaten

In diesem Abschnitt wird auf die Anwendungen der Peptid-Polymer-Konjugate eingegangen. Detaillierter werden enzymatisch abbaubare Konjugate dargelegt, da diese den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildeten.

6.4.1 Biomimetische Kristallisation

Ein Feld, in dem Peptid-Polymer-Konjugate erfolgversprechendes Potential aufweisen, ist die biomimetische Kristallisation von anorganischen Festkörpern. PEG-*b*-(Asp_n) und PEG-*b*-(Glu_n) wurden als Additive für die Mineralisation von CaCO₃ und BaSO₄ eingesetzt.¹²⁷ Die Eignung von PEG-*b*-(Glu_n) als Additiv der CaCO₃-Kristallisation in organischen bzw. organisch/wässrigen Systemen wurde ebenfalls untersucht.¹⁹³ Ein weiteres System, das in der Literatur beschrieben wurde, ist die Bildung von Silika-Komposit-Nanofasern mithilfe von Peptid-Polymer-Konjugaten.¹⁹⁴

6.4.2 Spezielle mechanische Eigenschaften

Peptid-Polymer-Konjugate können spezielle mechanische Eigenschaften aufweisen. Inspiriert von Seide wurde PEG alternierend mit einer als β -Faltblatt kristallisierenden Peptidsequenz (GAGA¹⁹⁵ bzw. A₄₋₆¹²⁵) verknüpft. Es zeigten sich ein verbesserter Elastizitätsmodul und eine erhöhte

Reißfestigkeit. Auch der Einsatz von Poly(*n*-butylacrylat)-*b*-(TV)₅FG im Blend (5%) mit hochmolekularem Poly(*n*-butylacrylat) führte zu einer signifikanten Erhöhung der Materialsteifheit.¹⁹⁶

6.4.3 Biomedizinischer Sektor

Häufig finden Peptid-Polymer-Konjugate im biomedizinischen Sektor breite Anwendung, was vor allem auf den Peptidteil im Konjugat zurückzuführen ist.

Die am intensivsten untersuchte Polymerkomponente dabei ist PEG. Sie wurde seit den 1970er¹⁹⁷ Jahren verwendet, um unerwünschte Nebenwirkungen von Polypeptid-basierten Therapeutika, wie eine kurze Halbwertszeit im Organismus, das Auslösen einer Immunreaktion, enzymatischen Abbau und geringe Löslichkeit, zu umgehen.¹⁹⁸ Vor allem im Bereich der Knochenregeneration, der Bildung biologisch aktiver Oberflächen, der Synthese künstlichen Gewebes („Tissue engineering“) und des gezielten Wirkstofftransports sowie der Wirkstofffreisetzung („Drug delivery and release“) finden sich viele Beispiele von Peptid-Polymer-Konjugaten.

6.4.3.1 Knochenregeneration

Peptid-Polymer-Konjugate wurden z.B. zur Knochenregeneration eingesetzt. Ein Hydrogel aus PEG, einem RGD-Peptid und einem Matrixmetalloprotease (MMP)-spaltbaren Peptid (GPQGIWGQ) wurde dazu verwendet, Proteine auf Knochendefektstellen freizusetzen. Auf diesen Proteinen konnte neues Knochenmaterial aufgebaut werden.¹⁹⁹

6.4.3.2 Biologisch aktive Oberflächen

Ein weiterer wichtiger Bereich sind biologisch aktive Oberflächen z.B. für antibakterielle Beschichtungen. Es wurde ein PEG-modifiziertes Methacrylat zu Bürstenpolymeren umgesetzt und daran das antibakterielle Peptid Magainin I bestehend aus 23 Aminosäuren gebunden.¹²⁹ Des Weiteren wurden verschiedene Oberflächen mit einem Konjugat aus PEG und einem muskeladhäsiven Peptid beschichtet. Dabei wurde ein deutlich reduziertes Anwachsen von Zellen beobachtet.²⁰⁰

6.4.3.3 Synthese künstlichen Gewebes

Im Bereich der Synthese künstlichen Gewebes („Tissue engineering“) finden sich vielfältige Beispiele in der Literatur. So wurde unter anderem PEG mit enzymatisch spaltbaren (Collagenase bzw. Elastase) Peptiden (A₉K, GGLGPAGGGK) sowie mit zelladhäsiven Peptiden (RGDS, KQAGDV) umgesetzt und anschließend copolymerisiert, um ein Gerüst für das Aufwachsen künstlichen Gewebes zu erhalten.²⁰¹ Ein ähnliches System basiert auf PEG, RGD und einem Matrixmetalloprotease (MMP)-spaltbaren Peptid (GPQGIWGQ).²⁰² Um elastomeres Material für einen möglichen Einsatz in diesem Gebiet zu erhalten, wurde ein Konjugat aus PEG und einer elastin-ähnlichen Peptidsequenz (AKAAAKA) synthetisiert.¹³⁷

6.4.3.4 Wirkstofftransport

Besonders zum Wirkstofftransport (Drug-delivery) werden Peptid-Polymer-Konjugate erfolgreich eingesetzt. Neben den oben erwähnten Beispielen sind amphiphile Blockcopolymere aus PEG und Polyasparaginsäure synthetisiert worden, die zu Mizellen aggregieren, dabei den Krebswirkstoff Adriamycin²⁰³ einschließen und später freisetzen können. Ein ähnlicher Ansatz konnte auf den Transport von *cis*-Platin angewendet werden, wobei der Wirkstoff an die Säuregruppen der Asparaginsäure komplexiert wurde.²⁰⁴ Ein Überblick über Nanotransporter, die auf Tumore abzielen, kann z.B. in folgendem Übersichtartikel erhalten werden.²⁰⁵ Ein Konjugat, was es bis in die klinische Testphase geschafft hat, ist ein (2-Hydroxypropyl)methacrylat (HPMA) Polymer, an das, über eine enzymatisch spaltbare Sequenz (GFLG) Doxorubicin gebunden wurde.¹²⁶

Eine Erweiterung dieses Konzepts bietet die zusätzliche Anbindung von Peptiden, die die Zellaufnahme fördern. So wurde das von der Transaktivator-Domäne des HI-Virus abgeleitete TAT-Peptid (GRKKRRQRRR) an Poly(2-hydroxypropyl)methacrylat (PHPMA) gebunden und gezeigt, dass die Konjugate im Vergleich zum reinen Polymer über einen schnelleren Weg in Zellen aufgenommen wurden.¹⁴⁵ Konjugate aus Poly(2-hydroxypropyl)methacrylat (PHPMA) und einem Peptid, das zu einer gewundenen Schraube (coiled-coil) aggregiert, sind in der Lage, durch Selbstaggregation Hydrogele auszubilden, die auf äußere Reize wie Ionenstärke oder Temperatur reagieren und daraufhin quellen oder schrumpfen.²⁰⁶ Ein weiterer Ansatz ist der Einsatz eines PEG-Blocks, der von zwei fibrinähnlichen coiled-coil Peptiden flankiert wird. Dabei bildete sich durch Selbstaggregation ein Hybridhydrogel.²⁰⁷ Ähnliche Experimente wurden mit einem Tetraphenylalanin-PEG-Konjugat durchgeführt, wobei eine Nanoröhrenstruktur resultierte.²⁰⁸

6.5 Enzymatisch spaltbare Peptid-Polymer-Konjugate

Obwohl in den eben beschriebenen Anwendungen immer wieder das Phänomen der enzymatischen Spaltbarkeit auftrat, wird hier nochmal gesondert auf diesen Aspekt eingegangen, da dies der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war.

Ein interessanter Übersichtsartikel, der nicht speziell auf Hybride aus enzymatisch spaltbaren Peptiden und Polymeren ausgerichtet ist, sondern allgemein auf Enzym-responsive Materialien eingeht, wurde von Ulijn veröffentlicht.²⁰⁹ Dort sind allerdings nicht alle hier erwähnten Publikationen aufgeführt, da der Autor seinen Fokus nicht speziell auf Polymere legt, sondern auch andere Materialien aufgreift.

Eine Vielzahl an Peptid-Polymer-Konjugaten wurde entwickelt, um folgende Proteasen zu nutzen: Cathepsin B (Spaltungssequenz GFLG^{126,130}), Cathepsin D (Spaltungssequenz LRFFC(Et)IP²¹⁰), Collagenase (Spaltungssequenz AAAAAAAAAAK²⁰¹ bzw. APGL²¹¹), Elastase (Spaltungssequenz GGLGPAGGGK²⁰¹ bzw. DAAR²¹²), Matrixmetalloproteasen - MMP - (Spaltungssequenz MMP-1 - GPQGIWQ^{199,202}, MMP-13 - HKALGQPQ²¹³), Plasmin (Spaltungssequenz VRN²¹¹), Thermolysin (Spaltungssequenz DAAR²¹²) oder Chymotrypsin (Spaltungssequenz CKYC²¹⁴).

Duncan et al. stellten ein Copolymer aus 2-Hydroxypropyl-methylacrylamid (HPMA) und einem Methylacrylamid-gebundenem Peptid dar. Über das Cathepsin B-spaltbare Peptid GFLG wurde Doxorubicin an das Polymer gebunden. Die Spaltung erfolgte unter anderem in Zellen. Mittlerweile hat es dieses System bis in die klinische Testphase geschafft.^{126,215}

Weissleder et al. setzten das Enzym Cathepsin D ein. Für dessen Erkennung wurde ein gefropftes Copolymer aus teilweise Methoxy-PEG modifiziertem Poly-L-lysin synthetisiert und der Farbstoff Cy5.5 über die spaltbare Peptidsequenz CKGLRFFC(Et)IPG gebunden. Die Spaltung unter Freisetzung des Farbstoffs wurde in Lösung und in Zellen getestet.²¹⁰

West et al. verwendeten Collagenase- und Elastase-spaltbare Hydrogele. Dazu wurde diacrylatfunktionalisiertes PEG mit ABA-Blockcopolymeren photopolymerisiert. Das ABA-System wurde durch die Kupplung von zwei Acryloyl-PEG-Einheiten an das jeweilige Peptid erhalten. Die eingesetzten Peptide waren die Collagenase-spezifische Sequenz GGLGPAGGK und die Elastase-spaltbare Sequenz AAAAAAAAAAK. Die Spaltung der Hydrogele erfolgte dann in Lösung.²⁰¹

West und Hubbell verfolgten eine ähnliche Strategie zur Synthese Collagenase- oder Plasmin-spaltbarer Hydrogele. Dazu wurden die Peptide APGL (Collagenase) bzw. VRN (Plasmin) beidseitig an PEG gebunden. Der resultierende Block Peptid-PEG-Peptid wurde anschließend an beiden Enden mit Acrylgruppen versehen und die so erhaltenen Makromonomere durch UV-Bestrahlung polymerisiert. Die resultierenden Hydrogele konnten dann selektiv durch die entsprechenden Enzyme abgebaut werden.²¹¹

Hubbell et al. setzten ein verzweigtes, vierarmiges PEG ein, das mit Vinylsulfongruppen versehen wurde. Durch die Anwendung der Michael-Reaktion konnten vernetzte Hydrogele mithilfe des MMP-1 spaltbaren Peptids QGWIGQPG erhalten werden. Durch den Einbau von je einem Cysteinrest an den beiden Peptidenden konnte das Polymer durch das Peptid vernetzt werden. Als weitere Funktion wurde ein monocysteinfunktionalisiertes, zelladhäsives RGD-Peptid in die Matrix eingebracht. Dieses System wurde in Zellen eingesetzt und im Tierversuch mit Ratten konnte erfolgreich ein Protein (rhBMP-2) freigesetzt werden.^{199,202}

Ulijn et al. wendeten Harz aus der SPPS an, um Enzym-responsives Material zu erhalten. Die Partikel im μm -Bereich, die aus einem Acrylamid-Rückgrat mit PEG-Seitenketten bestanden, wurden mittels SPPS mit der Elastase und Thermolysin spaltbaren Peptidsequenz DAAR versehen. Durch Änderung des pH-Werts konnten fluoreszenzmarkiertes Dextran oder ein Protein (Avidin) eingebracht werden. Enzymzugabe führte zu einer Freisetzung der Materialien durch Quellung der Partikel, die auf Abstoßung der sich bildenden Ladungen zurückzuführen war.²¹²

Roy et al. benutzten einen lithographischen Prozess, um durch UV-Bestrahlung Polymerpartikel auf Siliziumsubstraten darzustellen. Als Monomere wurden diacrylatfunktionalisiertes PEG und die diacrylatfunktionalisierte, Cathepsin B-spaltbare Peptidsequenz GFLGK eingesetzt. Es konnten verschiedene Substanzen wie Proteine, DNA oder Antikörper eingebracht werden und nach Überführung der Partikel in wässriges Milieu durch Zugabe von Enzymlösung freigesetzt werden.¹³⁰

Plunkett et al. setzten die Chymotrypsin-spaltbare Sequenz H₂N-CKYC-Ac ein, um an die Thiolgruppen des Cysteins Acrylamideinheiten zu binden. Die so erhaltenen Monomere wurden zu einem Hydrogel polymerisiert, welches in Lösung von Chymotrypsin abgebaut werden konnte.²¹⁴

Healy et al. entwickelten ein Peptid-vernetztes Gel, das auf dem Polymer Poly(*N*-isopropylacrylamid-*co*-acrylsäure)-basierte. Das MMP-13 spaltbare Peptid HKALGQPQ wurde mit zwei Acrylatgruppen versehen und dann mit *N*-Isopropylacrylamid und Acrylsäure umgesetzt. Außerdem wurde zusätzlich das zelladhäsive Peptid RGD an das Polymer gebunden. Dieses Material zeigte neben einer „unteren kritischen Lösungstemperatur“ (LCST) bei 32 °C auch eine Spaltbarkeit durch das Enzym MMP-13 in Lösung.²¹³

Die aufgezeigten Arbeiten werden durch eine undefinierte Synthese der Peptid-Polymer-Hybride, die in Eintopfreaktionen synthetisiert wurden, dominiert. Außerdem wurden fast ausschließlich hydrophile Polymere, allen voran PEG, eingesetzt. Hydrophobe Polymere wurden sehr selten verwendet. Auch die Vorteile der Formulierung als Nanopartikel (siehe Abschnitt 7.) wurden nicht genutzt. Eine Anwendung der Hydrogele *in vitro* ist oft nicht möglich, da ein Nachweis der Spaltung häufig nur durch eine Gewichtsabnahme des Hydrogels erfolgte, was *in vitro* nicht möglich ist.

7. Formulierung von Nanopartikeln durch die Miniemulsionstechnik

In diesem Abschnitt wird auf das Prinzip der Miniemulsion eingegangen und vor allem der inverse Prozess näher erläutert.

Um potentielle Wirkstoffe in den Körper zu bringen, ist eine Formulierung als Nanopartikel eine häufig eingesetzte Methode. Dadurch wird im Gegensatz zur direkten intravenösen Injektion die Möglichkeit eröffnet, eine höhere Dosis des Wirkstoffs verabreichen zu können, die nicht durch Verdünnung im Blut verringert wird. Gleichzeitig werden durch eine Verkapselung des Wirkstoffs dessen Nebenwirkungen vermindert und es ist ebenfalls möglich, hydrophobe Substanzen zu verabreichen. Außerdem wird der Wirkstoff vor unerwünschtem Abbau im Organismus geschützt. Gleichzeitig wird der Organismus vor einer Überdosierung durch die Möglichkeit der kontrollierten Wirkstofffreisetzung geschützt.²¹⁶ Es existiert eine Vielzahl an Möglichkeiten, Nanopartikel zu formulieren. Es werden z.B. die Emulsionspolymerisation, die Hochdruckhomogenisation, die Nanopräzipitation oder die Nanolithographie¹³⁰ eingesetzt.

In dieser Arbeit wurde der Miniemulsionsprozess angewendet, dessen Prinzip zum ersten Mal 1973 in der Literatur erwähnt wurde.²¹⁷ Der Begriff „Miniemulsion“ wurde erst später von Chou et al. geprägt.²¹⁸ Dieses Konzept soll kurz erläutert werden. Eine detaillierte Beschreibung ist in zahlreichen Übersichtsartikeln²¹⁹⁻²²³ zu finden. Bei einer Miniemulsion handelt es sich um ein kritisch-stabilisiertes Zweiphasensystem aus nicht mischbaren Flüssigkeiten. Dabei liegt die innere (disperse) Phase in Form von Tröpfchen mit einem Durchmesser von 50 - 500 nm emulgiert in der äußeren (kontinuierlichen) Phase vor.²²⁴ Eine Einteilung erfolgt nach der Polarität der äußeren Phase. Man unterscheidet zwischen direkten (Öl-in-Wasser-, O/W-) und inversen (Wasser-in-Öl-, W/O-) Miniemulsionen. Die Nanotröpfchen werden dabei von zwei Hauptprozessen destabilisiert - der Ostwald-Reifung²²⁵ und der Koaleszenz.²²⁶ Unter Koaleszenz versteht man das Anwachsen der Tröpfchen durch kollisionsbedingtes Zusammenfließen. Bei der Ostwald-Reifung hingegen wachsen große Tröpfchen auf Kosten der kleineren, bedingt durch Diffusion der dispersen Phase durch die kontinuierliche. Dies lässt sich durch die sehr geringe, aber immer noch vorhandene Löslichkeit der dispersen in der kontinuierlichen Phase erklären, was auf den hohen LaPlace-Druck an der stark gekrümmten Tröpfchenoberfläche zurückgeführt werden kann. Beide Mechanismen führen letztlich zu einer Trennung der beiden Phasen. Weitere Faktoren, die die Stabilität der Miniemulsion beeinflussen, sind die Temperatur, die Löslichkeit der Komponenten in den einzelnen Phasen und das Verhältnis der beiden Phasenvolumina.²¹⁹ Um trotz dieser Faktoren eine stabile Miniemulsion zu erhalten, wird wie folgt vorgegangen. Das Prinzip wird hier am Beispiel einer organischen Reaktion in inverser Miniemulsion aufgezeigt, da dieses Konzept in dieser Arbeit angewendet wurde. In der kontinuierlichen Phase (z.B. Isooctan) wird ein Tensid gelöst. Hier werden im Gegensatz zur direkten Miniemulsion, bei der ionische (z.B. Natriumdodecylsulfat, SDS) und nichtionische Tenside (z.B. Lutensol AT50) zum Einsatz kommen, typischerweise nichtionische verwendet. Der Grund ist die Bildung von Kontaktionenpaaren beim Einsatz von ionischen Tensiden, die nur wenig zur

Stabilisierung beitragen. Daher werden bei der indirekten Miniemulsion häufig amphiphile Blockcopolymere mit geringen HLB („Hydrophilic-Lipophilic-Balance“-)Werten ($HLB < 7$),²²⁷ eingesetzt. Diese Bedingung erfüllt z.B. Poly(butyl-*co*-ethylen)-*b*-poly(ethylenoxid) P(B/E-*b*-EO) ($HLB \sim 6.7$). Der hydrophobe Teil ragt dabei in die hydrophobe äußere Phase, der hydrophile Block in die hydrophiledisperse Phase. Diese Tenside verhindern die Koaleszenz durch sterische Abstoßung.²²⁸ Hierfür ist ein osmotischer und ein entropischer Effekt verantwortlich.

Die disperse Phase enthält neben dem möglichst hydrophilen Lösemittel (z.B. DMF, H₂O) und den notwendigen Edukten ein sogenanntes (Ultra)hydrophil. Hierbei werden häufig Zucker oder Salze eingesetzt.²²⁸ Durch ihren Zusatz wird der osmotische Druck (Π_0) innerhalb der Tröpfchen so erhöht, dass dieser dem LaPlace-Druck (p_L), der sich in den Tröpfchen ausbildet, entgegenwirkt. Dadurch bildet sich ein Gleichgewicht, das die Ostwald-Reifung unterdrückt.²¹⁹

Nach der Zugabe der dispersen Phase zur kontinuierlichen wird die Emulsion durch Rühren vorhomogenisiert und eine Makroemulsion gebildet. Die eigentlichen Nanotröpfchen werden durch anschließende Behandlung mit Ultraschall²²⁹ erzeugt. Alternativ ist die Anwendung eines Mikrofluidizers²³⁰ oder eines Hochdruckhomogenisators²³¹ möglich. Wird Ultraschall eingesetzt, ist das entscheidende Phänomen für die Tröpfchenbildung die Kavitation,²³² die eine Folge starker Scherkräfte während des Prozesses ist. Durch die Bewegung des Ultraschallstabs entstehen Unter- und Überdruckphasen, die energiereiche longitudinale Kompressionswellen zur Folge haben. Es entstehen Dampfblasen bzw. Hohlräume, die während der Überdruckphasen kollabieren. Durch diesen Prozess werden die Tröpfchen immer weiter verkleinert und die neu erzeugte Grenzfläche wird durch Tensid stabilisiert. Da die Tensidmenge so gewählt wurde, dass in der kontinuierlichen Phase der Emulsion dessen kritische Mizellbildungskonzentration (cmc) nicht erreicht wird, stabilisiert es im sogenannten „Pseudogleichgewicht“ die maximale Tröpfchenoberfläche (kritisch stabilisierter Zustand).²³³ Somit kann durch die Tensidmenge und -art die Tröpfchengröße und somit die spätere Partikelgröße bestimmt werden.²³⁴

Nach der Homogenisierung erfolgt die eigentliche Reaktion in den Tröpfchen durch Erhöhung der Temperatur oder der Zugabe eines Reaktionsstarters (siehe 11.4.6). Da in der Miniemulsion durch oben beschriebene Maßnahmen keine Nettodiffusion zwischen den Tröpfchen auftritt, kann bei der klassischen Polymerisation der entstandene Partikel als Kopie des Tröpfchens angesehen werden.²²⁸ Deshalb werden die Tröpfchen auch als unabhängige Nanoreaktoren bezeichnet.

Nach diesem Prinzip kann durch Variation der Reaktionsparameter eine Vielzahl an Reaktionen durchgeführt werden. Ein Überblick über die vielfältigen Möglichkeiten der Polymerisation in Miniemulsion, der Verkapselung verschiedenster Materialien sowie der Partikelfunktionalisierung und potentieller Freisetzungstimuli aus Nanopartikeln, kann in einem ausführlichen Übersichtsartikel erhalten werden.²²⁰

8. Analysemethoden

In diesem Abschnitt werden die für diese Arbeit relevanten Analysemethoden kurz vorgestellt.

8.1 Hochleistungsflüssigchromatographie

Für die Bestimmung der Reinheit der dargestellten Peptide wurde die Hochleistungsflüssigchromatographie (engl.: high performance liquid chromatography, HPLC) eingesetzt. Sie ist eine flüssigchromatographische Methode und kann zum qualitativen und quantitativen Nachweis von einzelnen Substanzen eines Probegemisches verwendet werden. Mit dieser Methode ist es möglich, eine sehr hohe Auflösung bei der Trennung von Substanzgemischen mit einer Analysendauer im Minutenbereich, verbunden mit einer sehr guten Nachweisempfindlichkeit ($<10^{-10}$ g), zu erreichen. In Abbildung 28 ist der Aufbau einer HPLC-Anlage schematisch skizziert.²³⁵

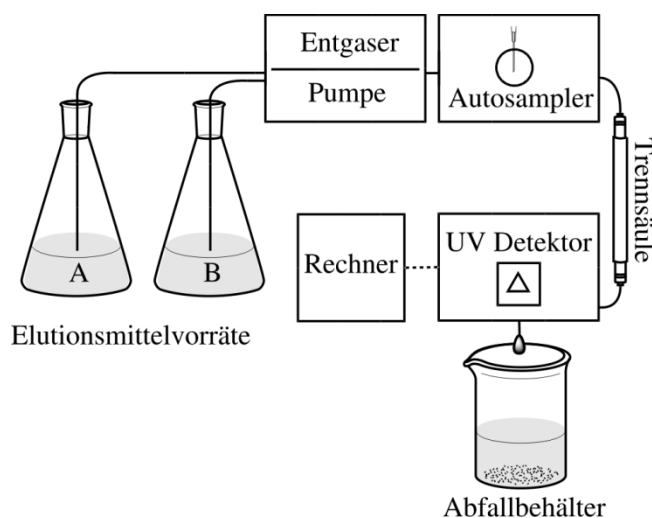


Abbildung 28: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage.

Aus den Elutionsmittelvorräten wird das gewünschte Elutionsmittelgemisch mithilfe der Pumpe (Druck bis 150 bar) mit konstanter Flussrate (0,5 - 5 mL/min) durch das System geleitet. Als Laufmittel können verschiedene organische Lösemittel oder wässrige Lösungen (z.B. 0,1% TFA) verwendet werden. Diese können einzeln, in einem konstanten Verhältnis (isokratisch, z.B. 10/90) oder als Gradient, unter Variation der Zusammensetzung über die Zeit, eingesetzt werden. Um dabei einen konstanten Fluss zu gewährleisten, werden die Elutionsmittel mittels eines Entgasers von gelösten Gasen befreit. Das zu untersuchende Substanzgemisch wird mittels eines Autosamplers oder einer Injektionsschleife in den Elutionsmittelstrom injiziert. Die Trennung erfolgt in der Trennsäule und basiert auf Wechselwirkung der Analyten mit der Oberfläche des feinkörnigeren Trägermaterials (3 - 10 μm).

Neben den chemisch modifizierten polaren Kieselgelen mit funktionellen Gruppen (normal phase, NP) werden häufig unpolare stationäre Phasen (reversed phase, RP) mit alkylsilyliertem Kieselgel eingesetzt. Außerdem existieren vernetzte polymere Träger sowie poröse anorganische Aluminium- und Zirkoniumoxide.²³⁶ Nach der Auftrennung der Substanzen werden die Komponenten durch einen

Detektor detektiert. Hierzu werden photometrische, refraktometrische, elektrochemische, selten auch Fluoreszenz-Detektoren eingesetzt.²³⁶ Durch die Detektoren wird, je nach Menge und Art des Chromophors, ein entsprechendes Signal an den Rechner übertragen. Dieser generiert ein x - t -Diagramm, indem er das Detektorsignal gegen die Retentionszeit aufträgt. Qualitativ kann der Nachweis über entsprechende Vergleichssubstanzen erfolgen, die über die Retentionszeiten zugeordnet werden. Die quantitative Auswertung wird über eine Kalibrierreihe mit Vergleichssubstanzen definierter Konzentration und anschließender Integration der Signal-Flächen erreicht.²³⁶

8.2 Gelpermeationschromatographie

Um die Molekulargewichte der synthetisierten Polymere und deren Verteilung zu bestimmen, wurde die einfache und schnelle Methode der Gelpermeationschromatographie (GPC) oder Größenausschlusschromatographie (engl.: size exclusion chromatography, SEC) verwendet.²³⁷ Das Trennungsprinzip dieser Methode lässt sich aus dem Namen ableiten. Die Trennung basiert auf dem molekulargewichtsabhängigen hydrodynamischen Radius („Molekülgröße“) der Polymere und nicht, wie bei der Affinitätschromatographie, auf der Wechselwirkung der Substanz mit der stationären Phase. Der Aufbau und die Durchführung entspricht der HPLC (siehe Abbildung 28). Unterschiede bestehen in der stationären Phase der Säule, bei der häufig ein Gel aus Divinylbenzol-vernetztem Styrol, vernetztem Dextran (Sephadex), vernetztem Polyacrylamid oder auch poröses Glas verwendet wird. Die Porengröße liegt in einem Bereich von 5 - 10⁵ nm mit einer enger Porengrößenverteilung.²³⁸ Durch die poröse Struktur der stationären Phase werden bei der Elution im Lösemittelstrom Polymermoleküle mit geringerem hydrodynamischen Radius länger zurückgehalten als Polymermoleküle mit größerem. Da der hydrodynamische Radius proportional zum Molekulargewicht ist, erfolgt im Eluat eine Trennung in Reihenfolge abnehmender Molmassen. Detektiert werden die Moleküle häufig über die Messung des Brechungsindex (engl.: refractive index, RI) oder der UV-Absorption.²³⁸ Man erhält daraus eine Elutionskurve, indem man das Detektionssignal gegen das Elutionsvolumen aufträgt.

Die GPC stellt eine Relativmethode dar, d.h. es bedarf einer Eichkurve, um auf das Molekulargewicht und dessen Verteilung in einer Probe schließen zu können. Dies kann mithilfe von Polymeren identischer Struktur und bekanntem Molekulargewicht erfolgen. Der analysierbare Molekulargewichtsbereich liegt dabei typischerweise zwischen 10² und 10⁶ g/mol.²³⁷

8.3 Photonen-Kreuzkorrelations-Spektroskopie

Zur Charakterisierung der hergestellten Dispersionen wurde die Photonen-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (engl.: Photon Cross Correlation Spectroscopy, PCCS) eingesetzt, welche eine Weiterentwicklung der dynamischen Lichtstreuung (DLS) bzw. der Photonen-Korrelations-Spektroskopie (engl.: Photon Correlation Spectroscopy, PCS) ist. Sie wird dazu verwendet, Partikelgrößen von Dispersionen und deren Größenverteilung in einem Bereich von 1 - 2000 nm zu analysieren.²³⁹ Der Aufbau ist in Abbildung 29 skizziert.²⁴⁰

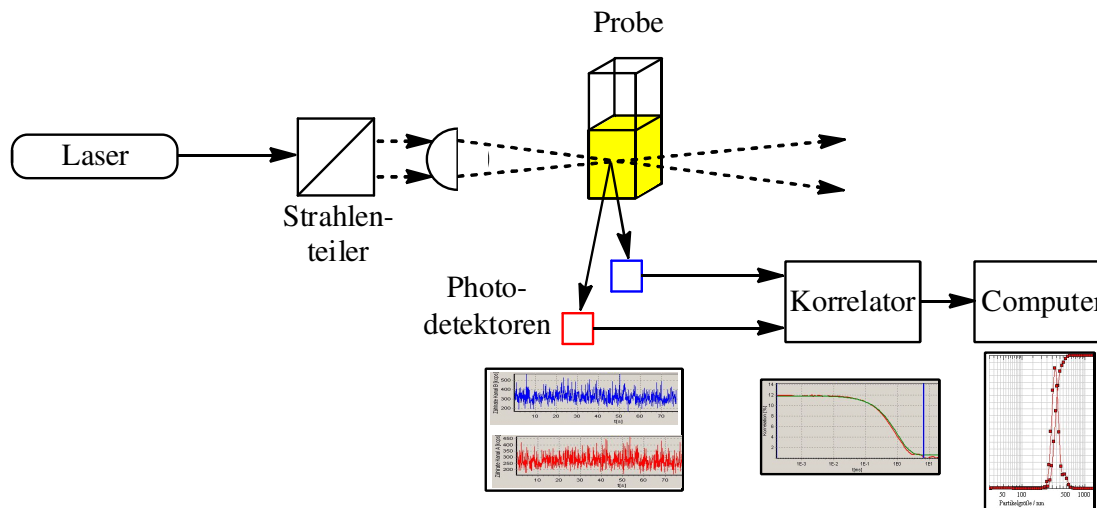


Abbildung 29: Aufbau eines Photonen-Kreuzkorrelations-Spektrometers.

Der monochromatische, kohärente Strahl eines Lasers wird im Gegensatz zur DLS durch einen Strahlenteiler geleitet, so dass zwei Strahlen generiert und diese über Linsen fokussiert werden. Die Strahlen treffen auf ein definiertes Messvolumen in der Probe und werden von den kolloidalen Partikeln gestreut. Das Streulicht beider Strahlen wird jeweils in einem Winkel von 90° zu den Einstrahlwinkeln von Photodetektoren detektiert und miteinander verglichen.

Durch die Brown'sche Molekularbewegung kommt es zur isotropen Diffusion der zu untersuchenden Partikel, was zu einer zeitlichen Intensitätsfluktuation des detektierten Streulichts^{240,241} führt. Es wird in Intervallen (Δt) über einen Zeitraum t gemessen und jeweils die Anfangsintensität $I_0(t)$ mit der Intensität nach Δt ($I_0(t) + \Delta t$) verglichen.¹¹⁷ Im Korrelator wird aus der Intensitätsfluktuation eine Autokorrelationsfunktion errechnet. Die Intensitäten und somit die Korrelation sind abhängig von der Diffusionsgeschwindigkeit der gemessenen Teilchen. Bei großen, langsam diffundierenden Teilchen nimmt die Korrelation langsamer ab als bei kleinen, schnell diffundierenden Partikeln.^{239,241}

Unter Annahme unendlicher Verdünnung ohne Wechselwirkung zwischen den idealisiert monodispersen, kugelförmigen Partikeln gilt für die Autokorrelationsfunktion $g(t)$:²⁴¹

$$F(g, \tau) = A_\infty e^{-D\tau q^2}$$

Dabei ist A_∞ der Formfaktor der Partikel, D der Translationsdiffusionskoeffizient, τ die Korrelationszeit und q der Streulichtvektor.

Aus der so erhaltenen Diffusionskonstante $D[\text{m}^2/\text{s}]$ lässt sich mittels der Stokes-Einstein-Gleichung, der hydrodynamische Partikeldurchmesser (d_p) nach folgender Gleichung bestimmen:

$$d_p = \frac{k_B T}{3\pi D \eta}$$

Dabei ist k_B die Boltzmannkonstante ($1.38065 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$), T die Temperatur der Probe [K] und η die Viskosität der kontinuierlichen Phase [$\text{mPa}\cdot\text{s}$].^{239,241}

Die Ergebnisse sind in dieser Arbeit als Gaussfunktionen aufgetragen. Der mittlere Partikeldurchmesser (X_{50}) kann aus dem Kurvenmaximum abgelesen werden. Durch einen Vergleich der Signalbreite kann die Partikelgrößenverteilung bestimmt werden.

Die Vorteile der PCCS gegenüber der PCS liegen in der Möglichkeit, konzentrierte kolloidale Dispersionen zu untersuchen und dabei Phänomene wie Mehrfachstreuung und Wechselwirkungen zwischen den Teilchen durch die Überlagerung der beiden Strahlen auszuschließen. Dies erfolgt durch die mathematische Eliminierung des Streulichts. Daraus resultieren kurze Messzeiten, ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis und eine hohe Toleranz gegenüber Verunreinigungen der Probe (z.B. Staub). Außerdem besteht die Möglichkeit unverdünnte Probe zu vermessen.²³⁹⁻²⁴¹

8.4 ¹⁵N-Festkörper-NMR-Spektroskopie

Um die ¹⁵N-markierte Aminosäure zur Detektion der Partikelbildung zu untersuchen, wurde die Methode der ¹⁵N-Festkörper-NMR-Spektroskopie eingesetzt. Da die natürliche Häufigkeit von ¹⁵N-Kernen sehr gering ist, muss mit ¹⁵N-angereicherten Proben gearbeitet werden.

Die kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie (NMR) beschäftigt sich im Allgemeinen mit den magnetischen Eigenschaften von Kernen. Viele Isotope tragen intrinsisch einen Kernspin I . Sowohl ¹H- als auch ¹⁵N-Kerne besitzen den Kernspin $I = 1/2$. Wird die Probe, bestehend aus vielen Kernspins, in ein externes Magnetfeld B_0 gebracht, so richten sich die Spins parallel oder antiparallel zur Magnetfeldrichtung z aus. Die sonst entarteten Energieniveaus in $2I + 1$ Zustände werden dadurch aufgespalten (Zeeman-Aufspaltung).²⁴² Durch Radiofrequenzpulse können die Spins dazu angeregt werden, ihre Orientierung im Magnetfeld und damit ihren Energiezustand zu wechseln. Die Wiederherstellung des Gleichgewichtszustandes wird analysiert und ist Gegenstand des NMR-Experiments. Die Stärke der Zeeman-Wechselwirkung ist kernspezifisch und hängt von der Magnetfeldstärke B_0 ab. Der energetische Unterschied zwischen den Zeeman-Niveaus kann in Einheiten von rad/s angegeben werden als $\omega_0 = -\gamma \cdot \hbar \cdot B_0$. Dabei ist γ das gyromagnetische Verhältnis der Kerne, $\hbar = h/2\pi$ - das Planck'sche Wirkungsquantum und ω_0 die Resonanzfrequenz (Larmor-Frequenz), mit der die Kernspins um das externe Magnetfeld B_0 präzedieren.²⁴²

Eine zentrale Rolle bei der Analyse von NMR-Spektren spielt die chemische Verschiebung δ [ppm]. Sie ist abhängig von der Kernsorte und deren Umgebung. Sie stellt die Abweichung von der Resonanzfrequenz einer Standardsubstanz der zu betrachtenden Kerne dar. Solche Abweichungen ergeben sich aus den unterschiedlichen chemischen und somit magnetischen Umgebungen der

Kernspins. So sind zum Beispiel Informationen über Struktur und Zusammensetzung einer Probe zugänglich.²⁴²

In Lösungen sind die Resonanzlinien einer Substanz meist sehr scharf und lassen sich gut zur Strukturaufklärung nutzen. In Festkörpern hingegen kommt es zu stark verbreiterten Linien. Bei Spin $\frac{1}{2}$ -Kernen können die Gründe dafür die heteronukleare und homonukleare dipolare Kopplung oder die Anisotropie der chemischen Verschiebung sein.²⁴² Da bei dem in dieser Arbeit betrachteten System nur die ersten beiden Phänomene auftreten, werden nur diese hier erläutert.

Alle Kernspins können in erster Näherung als magnetische Dipole angenommen werden. Unter bestimmten Bedingungen können zwei oder mehr Dipolmomente miteinander wechselwirken und Energie austauschen. Man spricht im Fall gleicher Kernsorten von homonuklearer dipolarer Kopplung, anderenfalls von heteronuklearer dipolarer Kopplung.

Der Hamiltonoperator für ein solches System hängt linear mit der dipolaren Kopplungskonstante (d) zusammen. Die extreme Abstandabhängigkeit der Kopplungskonstante erfordert für eine wirksame Kopplung Abstände von $r < 0.5$ nm. Im Fall von statischen NH_2 -Gruppen beträgt die Kopplung um die -11 kHz, was eine starke Verbreiterung zur Folge haben kann.²⁴²

Um Resonanzlinien trotz dipolarer Verbreiterung auflösen zu können, werden in der Festkörper-NMR-Spektroskopie hauptsächlich zwei Methoden angewandt. Die Rotation im magischen Winkel, das sogenannte „Magic Angle Spinning“ (MAS), ist eine Technik, bei der die Probe in einem Winkel von 54.7° zum externen Magnetfeld sehr schnell rotiert wird. Standardmäßig werden Rotationsgeschwindigkeiten von $10 - 35$ kHz genutzt. Ist die Drehfrequenz viel größer als die Stärke der Wechselwirkung, wird sie in erster Näherung ausgemittelt.²⁴²

Eine zweite Technik, die auch in der Lösungs-NMR-Spektroskopie Anwendung findet, ist die heteronukleare Entkopplung. Dabei werden während der Aufnahme der Signale die Resonanzen der koppelnden Spezies mit Radiofrequenzpulsen derart manipuliert, dass eine Entkopplung stattfindet und somit schmalere Signale resultieren.²⁴²

Ein weiterer entscheidender Faktor in der Spektroskopie ist das Signal/Rausch-Verhältnis. Wird ein Experiment N -mal wiederholt, so steigt die Signalstärke um den Faktor $N^{1/2}$. Daher kann das Signal/Rausch-Verhältnis zwar durch Wiederholung des Experimentes verbessert werden, bei jeder Wiederholung muss jedoch darauf geachtet werden, dass sich das System wieder im Gleichgewichtszustand befindet. Die Zeitkonstante, mit der ein Kernspin wieder den Ausgangszustand erreicht, ist die longitudinale Relaxationszeit T_1 . Bei ^{15}N -Kernen ist diese Zeit im Allgemeinen sehr lang und liegt im Bereich von Minuten, während das Experiment nur Millisekunden dauert.

Da ^1H -Kerne wesentlich kürzere Relaxationszeiten im Bereich von Sekunden haben, wird in der Festkörper-NMR-Spektroskopie oft auf die Methode der Kreuzpolarisation (CP = Cross Polarization) zurückgegriffen. Dabei wird die Ausgangspolarisation von ^1H -Kernen auf die ^{15}N -Kerne übertragen. Dies geschieht über gleichzeitiges Einstrahlen von Radiofrequenz-Pulsen auf beide

Kerne(Kontaktpuls). Die Effektivität dieser Übertragung hängt von der MAS-Frequenz, der Pulsdauer und den Pulsstärken ab. Ein Maximum tritt bei der sogenannten Hartmann-Hahn-Bedingung auf.²⁴²Der Polarisationsaustausch wird über die dipolare Kopplung vollzogen und hängt dementsprechend auch von deren Stärke ab. Dabei gilt, je schwächer die dipolare Kopplung ist, desto länger muss der Kontaktpuls sein.

Ein weiterer Vorteil der CP-Methode ist die mögliche Vergrößerung der Polarisation der ^{15}N -Kerne. Die Größe der Polarisation hängt im Wesentlichen von den Besetzungszahlen der Zeeman-Niveaus ab. Mit steigendem gyromagnetischen Verhältnis steigt auch der Besetzungsgrad des günstigsten Energielevels. Daher ist die Gleichgewichtspolarisation von ^1H größer als die von ^{15}N . CP überträgt ebenfalls die Eigenschaft des Besetzungsverhältnisses. Auf diese Weise kann das ^{15}N -Signal zusätzlich verstärkt werden.²⁴²

9. Aufgabenstellung und Syntheseplanung

Wie bereits in der Einleitung erwähnt (siehe Abschnitt 1), ist die Entwicklung einer neuen, nicht invasiven, hoch sensitiven und selektiven Früherkennungsmethode für Prostatakrebs wünschenswert. Die Eignung eines auf optischen Methoden basierten Systems wird im Rahmen eines BMBF-Projekts untersucht. Als selektives Zielenzym wurde Hepsin gewählt, da es spezifisch im malignen Prostatakarzinom überexprimiert vorkommt. Das Konzept basiert auf Enzym-spaltbaren Nanokapseln, die mit einem selbst quenchenden und somit nicht fluoreszierenden Nah-Infrarot-Farbstoff beladen werden. Liegt ein Tumor vor, werden die Kapseln selektiv durch Hepsin gespalten, wobei der sich verdünnende Farbstoff beim Austritt aus den Kapseln im Nah-Infrarot-Bereich fluoresziert. Da Licht dieser Wellenlänge Gewebe bis zu einer bestimmten Dicke (3-4 cm), durchdringt, sollte es möglich sein, den Farbstoff nicht invasiv und sensitiv mit optischen Methoden detektieren zu können. Zu diesem Zweck soll im Institut für Lasertechnologien in der Medizin und Messtechnik (ILM, Ulm), anhand von Computersimulationen die Entwicklung eines optischen Detektors erfolgen, dessen Eignung im weiteren Verlauf anhand von Prostataphantomen eruiert werden soll. Die Erkenntnisse aus den einzelnen Entwicklungsschritten sollen die Synthese der Nanokapseln weiter verbessern. Abschließend sollen die Erfahrungen aus Synthese und Detektion kombiniert werden und das Material im Hinblick auf die Anwendung in der Urologie am Institut für klinische Transfusionsmedizin (IKT, Ulm) *in vivo* getestet werden.

Um das Konzept der Enzym-spaltbarkeit zu zeigen, sollen, basierend auf einem Modellsystem, enzymatisch-spaltbare, polymere Nanopartikel und -kapseln dargestellt werden. Durch diesen dualen Ansatz von Partikeln und Kapseln ist es möglich, sowohl hydrophobe als auch hydrophile Substanzen einzubetten, um das mögliche Anwendungspotential von Anfang an sehr breit zu gestalten. Der Erfolg der Synthese soll stets durch enzymatische Spaltungsexperimente *in vitro* nachgewiesen werden. Nach erfolgreicher Entwicklung des Modellsystems soll die gewonnene Erfahrung auf das System der Hepsin-spaltbaren Sequenz übertragen werden, um damit das Projektziel Hepsin-spaltbarer Nanokapseln zu erreichen. Dies soll schließlich durch eine Spaltung in Zellkultur nachgewiesen werden. Neben dieser synthetischen Arbeit am Max-Planck-Institut für Polymerforschung sollen von den Projektpartnern parallel dazu Zelllinien untersucht werden, die spezifisch Hepsin exprimieren. Des Weiteren soll ein hydrophiler Nah-Infrarot-Fluoreszenz-Farbstoff eingesetzt werden, der eine einfache, nicht invasive optische Detektion erlaubt. Abschließend soll das System *in vivo* getestet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit soll der erste Schritt dieses Projekts, die Synthese enzymatisch-spaltbarer Nanopartikel erfolgen. Das Konzept der Partikel impliziert die Verwendung eines hydrophoben Farbstoffs, der, wie bereits erwähnt, das mögliche Anwendungspotential der Systeme deutlich

erweitert. Zur Methodenentwicklung soll ein Modellenzym dienen und später die gewonnenen Erkenntnisse auf das eigentliche Zielenzym übertragen werden.

Für die Synthese der hydrophoben, enzymatisch spaltbaren Partikel mussten fünf Aspekte beachtet werden: 1) Es sollte eine spaltbare Peptidsequenz synthetisiert werden, bei der eine Detektion der Spaltung schnell und sensitiv erfolgen kann. 2) Es musste ein hydrophobes Polymer synthetisiert werden, das chemoselektiv mit dem Peptid reagiert. 3) Die Kupplung beider Komponenten zu einem Peptid-Polymer-Konjugat musste definiert erfolgen, um in jedem Schritt die Kontrolle über die Reaktion zu haben. 4) Nach Entschützung des Konjugats sollte die Synthese von Nanopartikeln durch eine Vernetzungsreaktion erfolgen. Dazu wurde der Miniemulsionsprozess eingesetzt. 5) Der Abbau der Partikel sollte in Heterophase ablaufen und dabei simultan detektiert werden. Der geplante Syntheseweg ist in Abbildung 30 dargestellt.

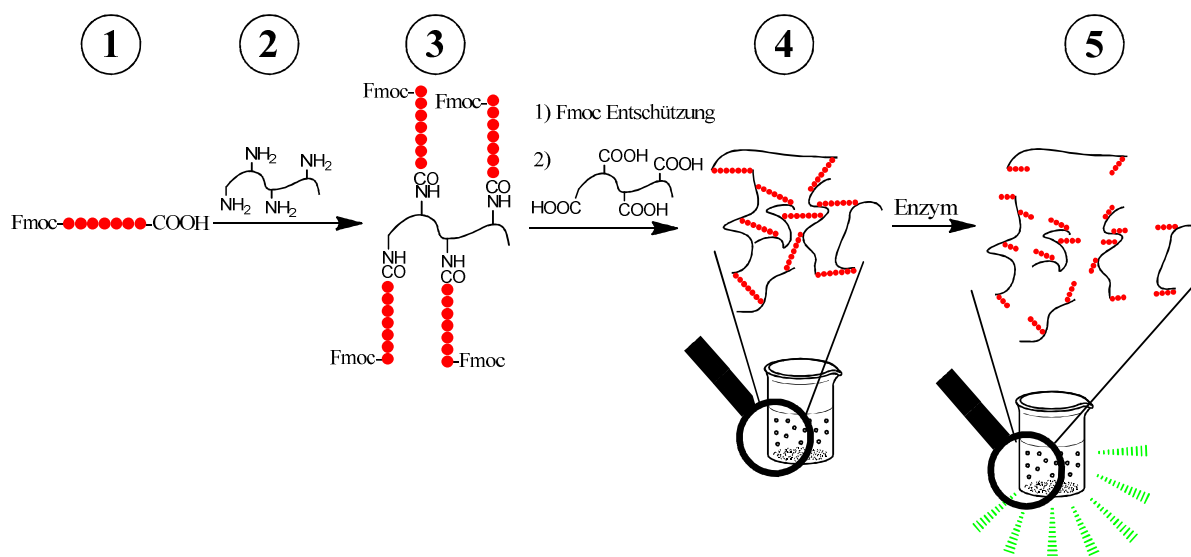


Abbildung 30: Syntheseweg zu enzymatisch spaltbaren, hydrophoben Nanopartikeln.

Die Ausgangsbedingungen werden im Folgenden kurz dargelegt. Als Modellenzyme für einen Nachweis der Machbarkeit wurden die unspezifischen Proteasen Pepsin und Trypsin gewählt. Als Erkennungssequenz für die Enzyme wurde eine möglichst kurze und einfach zugängliche Peptidsequenz - Gly-Phe-Phe (GFF) - (schematisch in Rot, Abbildung 30, 1) identifiziert.²⁴³ Die Sequenz wies als funktionelle Gruppen nur den N- und den C-Terminus, mit einer Amino- bzw. Säuregruppe auf. Da diese jeweils orthogonal geschützt werden konnten, sollen damit definierte Peptid-Polymer-Konjugate dargestellt werden. Damit bot sich der Einsatz der über Jahrzehnte entwickelten und hoch effizienten Reagenzien der Peptidsynthese an (siehe 2.9). Somit musste die Peptidsequenz so synthetisiert werden, dass ein Ende geschützt ist. In der Diplomarbeit¹¹⁶ wurden bereits erste Versuche zur Konjugatsynthese über die Schützung des C-Terminus des Peptids (H₂N-GFF-OEt) durchgeführt. Da aber beim Einsatz der Schützung des N-Terminus die Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden kann, bietet sich dieser Weg für ein flexibleres und

tiefgreifenderes Design der Peptide an (siehe Abbildung 30, 1). Daher wurde in dieser Arbeit die Schützung des N-Terminus des Peptids verfolgt (Fmoc-GFF-OH).

Da das Modellpeptid nur zwei funktionelle Gruppen trägt, muss bei der Übertragung des Prinzips auf die Hepsin-spaltbare Sequenz RQLRVVGG, die mehrere Funktionen besitzt, eine chemoselektive Reaktionsführung verwendet werden. Um dabei das System in Richtung der geplanten Anwendung eines hydrophilen Farbstoffs weiterzuentwickeln, sollten in einem weiteren Schritt Kapseln mit hydrophilem Kern dargestellt werden.

Für ein Kapsel-basiertes System ist ein möglicher Syntheseweg, eine Grenzflächenreaktion in Miniemulsion durchzuführen. Dazu müssen ein Monomer mit mehreren identischen funktionellen Gruppen in der hydrophilen Phase und ein zweites Monomer mit dazu komplementären funktionellen Gruppen in der hydrophoben Phase löslich sein. Die Polymerisation soll nach Bildung der Miniemulsion, durch eine selektive Reaktion der Monomere erfolgen (siehe Abbildung 31).

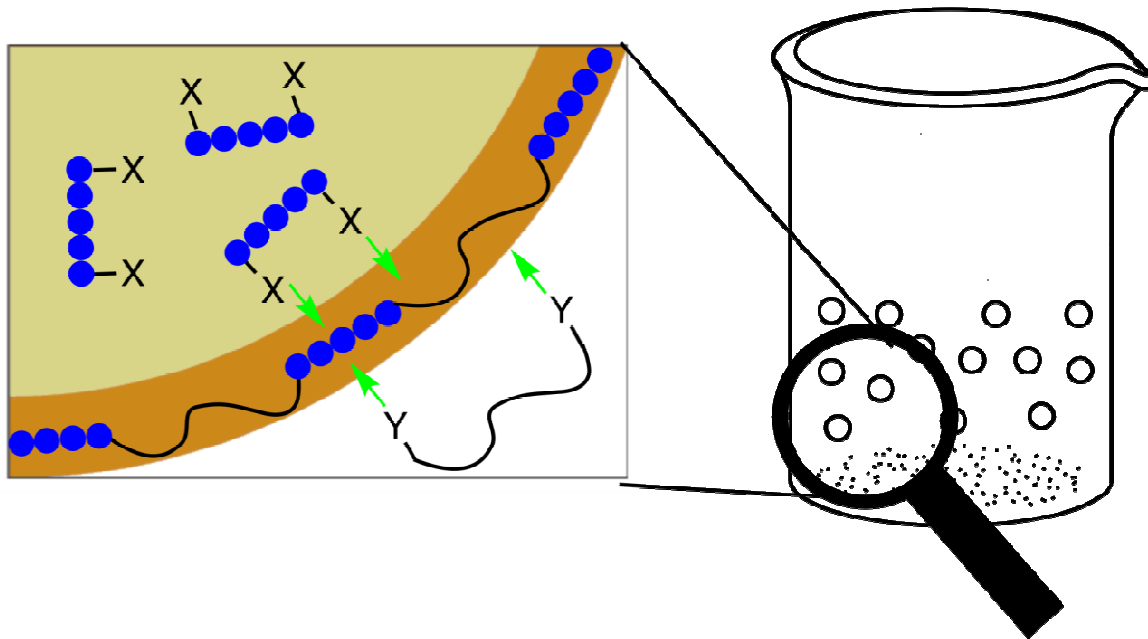


Abbildung 31: Syntheseweg zu enzymatisch spaltbaren Nanokapseln.

10. Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse dieser Arbeit vorgestellt und diskutiert. Zuerst wird die Synthese der Peptide sowie der polymeren Ausgangsmaterialien erörtert, dann die in Abschnitt 9 vorgestellte Synthesestrategie verfolgt und dabei die Entwicklung von vier Generationen von Peptid-basierten Nanopartikeln vorgestellt, die Synthesedetailliert erläutert und die enzymatische Spaltung der Partikel diskutiert. Das experimentelle Vorgehen sowie die vollständige Analytik der Produkte können in den Abschnitten 11.4 und 13.5 nachgelesen werden.

Alle enzymatischen Spaltungsexperimente fanden in gepuffertem Medium bei 37 °C statt und wurden von Niklas Kotman durchgeführt. Details dazu sind in seiner Dissertation zu finden. Wenn nicht anders erwähnt, sind bei Prozentangaben (%) stets Gewichtsprozent (%-Gew.) gemeint.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sind aus den NMR-Spektren beispielhaft nur die wichtigsten charakteristischen Signale einer Verbindung beschrieben, eine vollständige Auflistung aller Signale kann in Abschnitt 13.5 gefunden werden.

10.1 Identifizierung der enzymatisch spaltbaren Peptidsequenzen

In der Literatur wird GFF-OEt als einfach zugängliche Pepsin-spaltbare Sequenz²⁴³ und RGLRVVGG als selektiv Hepsin-spaltbare Sequenz¹¹⁴ beschrieben. Zur Entwicklung des Konzepts wurde mit dem kommerziell verfügbaren Enzym Pepsin gestartet.¹¹⁶ Im Laufe der Weiterentwicklung der Synthesen diente Trypsin als alternatives Enzym, das die gewählte Sequenz ebenfalls spaltet (siehe 10.4). Schließlich wurden die am Modellsystem gesammelten Erfahrungen auf die Hepsin-spaltbare Sequenz übertragen (siehe 10.6).

In Abbildung 32 sind die vier Generationen an Peptiden dargestellt, auf denen die vier Generationen der Nanopartikel basieren. Zur besseren Verständlichkeit sind die einzelnen Komponenten farblich gekennzeichnet. In rot wird die Erkennungssequenz für das entsprechende Enzym, in lila die Anknüpfungspunkte für die weitere Reaktion, in grün ab der 2. Generation das Fluorophor, in blau der Fluoreszenzquencher und in schwarz sonstige Funktionen dargestellt.

In der ersten Generation lag der Fokus auf dem Nachweis der enzymatischen Spaltbarkeit der Grundstruktur GFF (siehe Abbildung 32). In der zweiten Generation wurde das kleinste mögliche FRET-Paar bestehend aus Anthranilsäure (Ant) und 3-Nitro-L-Tyrosin (Y_N) eingeführt, um die enzymatische Spaltung *in situ* detektieren zu können (siehe Abbildung 32). In der dritten Generation wurde das FRET-Konzept weiterentwickelt und ein Coumarin-basiertes Fluorophor (Mca) verwendet (siehe Abbildung 32). In der vierten Generation wurden schließlich die Peptide so modifiziert, dass sie mit der Huisgen [1,3]-dipolaren Cycloaddition (Click-Reaktion) umgesetzt werden konnten (z.B. durch Azidogruppen), um so eine Reaktion in Anwesenheit anderer funktioneller Gruppen zu gewährleisten (siehe Abbildung 32).

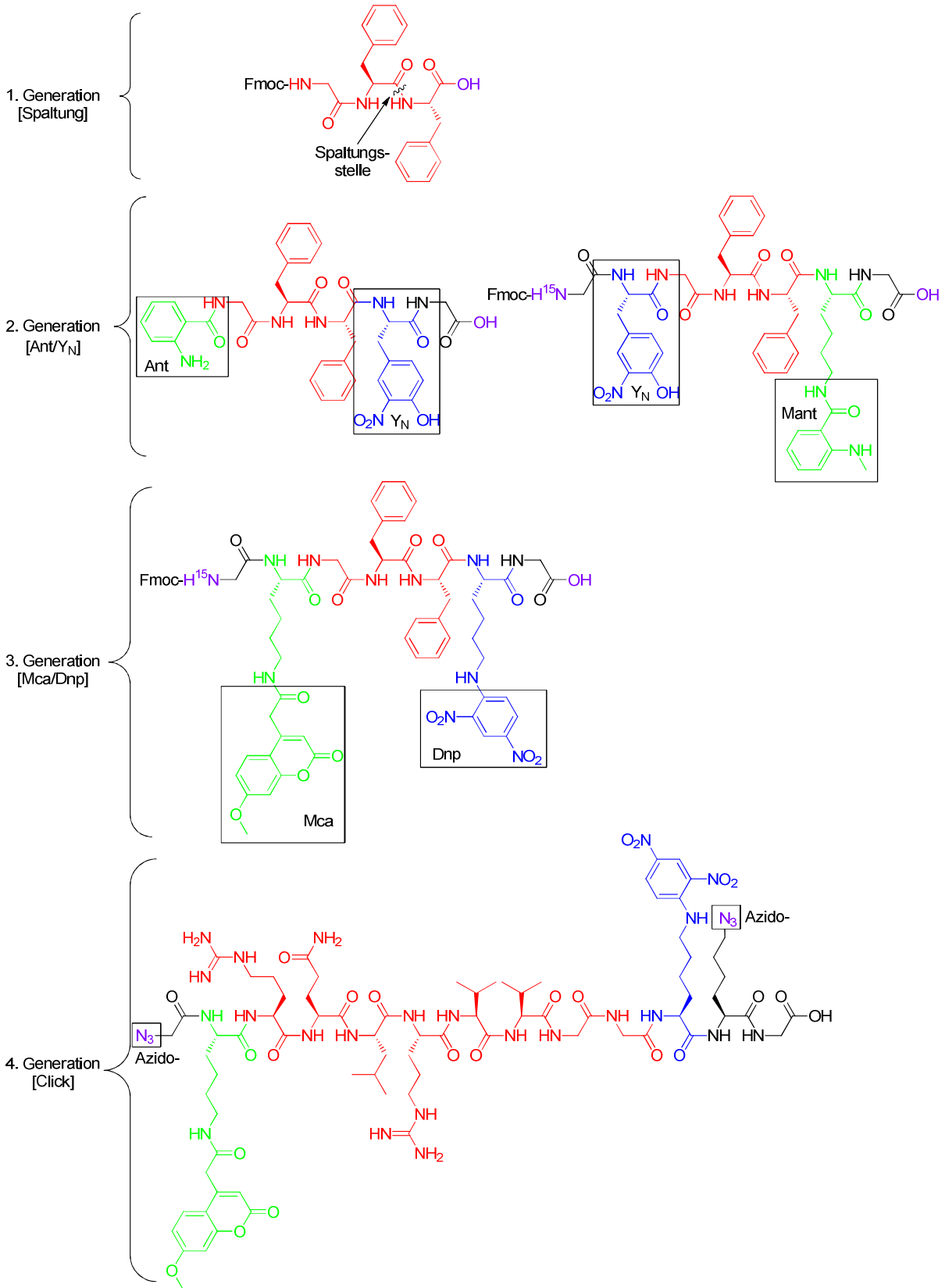


Abbildung 32: Die Evolution der Peptidstrukturen als Basis für die vier Generationen von Nanopartikeln.

Nach der Synthese des Polymers, welches die Grundlage für die drei ersten Generationen bildet, wird anschließend genauer auf die Entwicklung der einzelnen Generationen eingegangen.

10.2 Das Polymer für die partikulären Systeme

10.2.1 Polymernomenklatur

Das im Folgenden dargestellte, multifunktionelle Polymer **Poly(styrol-co-acrylsäure)** (siehe Abbildung 33) wird in dieser Arbeit als PS-co-PAS abgekürzt. Bei einer polymeranalogen Umsetzung, wird das resultierende Copolymer **Poly[styrol-co-N-(Linker/Peptid)-acrylamid]** (PS-co-PAA)-Linker/Peptid genannt und der Linker oder das Peptid tritt nicht einmalig am Ende, sondern mehrfach im Polymer auf.

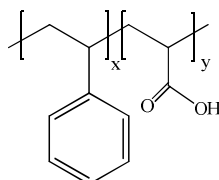


Abbildung 33: Struktur von Poly(styrol-co-acrylsäure).

Um den Einsatz der einzelnen Ansätze in den beschriebenen Synthesen einfacher nachvollziehen zu können, wird folgende Nomenklatur eingeführt. Die Polymere werden P_xY-Z genannt, wobei P für Polymer, X für die funktionelle Gruppe am Polymer (S = Säure, BA = Boc-geschütztes Amin oder A = Amin), Y für den Anteil der funktionellen Einheit am Polymer [%] (siehe 10.2.4) und Z für das Molekulargewicht [10^2 g/mol] (THF, RI) des Ausgangspolymers steht (siehe 10.2.3).

10.2.2 Polymersynthese

Das Polymer spielt beim Aufbau und der Spaltung der Nanopartikel eine entscheidende Rolle. Die Partikel sollten sich auf der einen Seite nicht in Wasser lösen oder quellen, da sonst ein Farbstoff- bzw. Wirkstoffeinschluss nicht realisierbar ist, auf der anderen Seite sollten sich die Fragmente nach der enzymatischen Spaltung auflösen oder quellen, um eine effektive Freisetzung der Ladung zu gewährleisten.

Polystyrol wurde als Ausgangsmaterial gewählt, da die synthetischen Methoden sowie die Analytik sehr gut ausgereift sind und es zudem ideal für erste Zellversuche geeignet ist, um das Anwendungspotential des Systems abzuschätzen. Außerdem kann so der Transport einer hydrophoben Substanz realisiert werden. Polystyrol als hydrophobes Modellpolymer kann dann bei Bedarf je nach Anwendung durch andere Polymere ersetzt werden, die dann auch für *in vivo*-Anwendungen geeignet sind.

Durch entsprechende Funktionalisierung sollten in das Basispolymer Anknüpfungspunkte für die Peptidkupplung eingeführt werden. Außerdem sollte der Funktionalisierungsgrad so gewählt werden, dass nach der enzymatischen Spaltung die Partikelfragmente gelöst bzw. gequollen vorliegen. Hierfür eignet sich Acrylsäure als Comonomer, da das Polymer dadurch etwas hydrophiler wird und über die Säuregruppen Peptide angebunden werden können.

Aus Styrol und Acrylsäure konnten mithilfe der freien radikalischen Lösungsmittelpolymerisation in Ethanol Copolymere dargestellt werden. Als Radikalstarter diente 2,2'-Azo-bis-(isobutyronitril)

(AIBN), die Struktur des resultierenden Copolymers Poly(styrol-*co*-acrylsäure) - PS-*co*-PAS - ist in Abbildung 33 dargestellt.

Bei Betrachtung der Copolymerisationsparameter der beiden Komponenten in Ethanol (Styrol: $r_s = 0.31$, Acrylsäure: $r_{AA} = 0.19$)¹²⁰ wurde die Bildung eines statistischen Copolymers erwartet (siehe Abschnitt 5). Die Untersuchung der Zusammensetzung erfolgte durch GPC und ¹H-NMR-Spektroskopie, wobei eine Analyse durch MALDI TOF-MS aufgrund des gewählten Synthesewegs der freien radikalischen Polymerisation nicht möglich war, da wegen der breiten Molekulargewichtsverteilung ein großes Spektrum an Einzelmolekülen detektiert wird. Dadurch ist nur ein intensives „Rauschen“ zu erkennen, in dem die Produktsignale nicht zu erkennen sind.

10.2.3 Hinweis auf die Zusammensetzung der Copolymerketten

Da die Polymersynthese mittels freier radikalischer Polymerisation erfolgte, musste trotz der breiten Verteilung an erwarteten Polymerketten sichergestellt werden, dass die Anzahl an funktionellen Gruppen über die gesamte Probe identisch ist.

Für die Analyse wurde das Verhältnis beider Monomereinheiten im Copolymer bei verschiedenen Molekulargewichten bestimmt und die Verhältnisse miteinander verglichen. Bei der Untersuchung von PS-*co*-PAS mit einem Molekulargewicht (M_w) von 10800 g/mol wurden bei der GPC-Messung drei Fraktionen bei definierten Elutionsvolumina entnommen, getrocknet und mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) und ¹H-Kernspinresonanzspektroskopie (¹H-NMR-Spektroskopie) analysiert. Auf diese Weise konnten drei Polymerfraktionen bei 8000, 12900 und 20200 g/mol (siehe Abbildung 34a; 1, 2 und 3) erhalten werden. Ein repräsentatives ¹H-NMR-Spektrum ist in Abbildung 34b gezeigt.

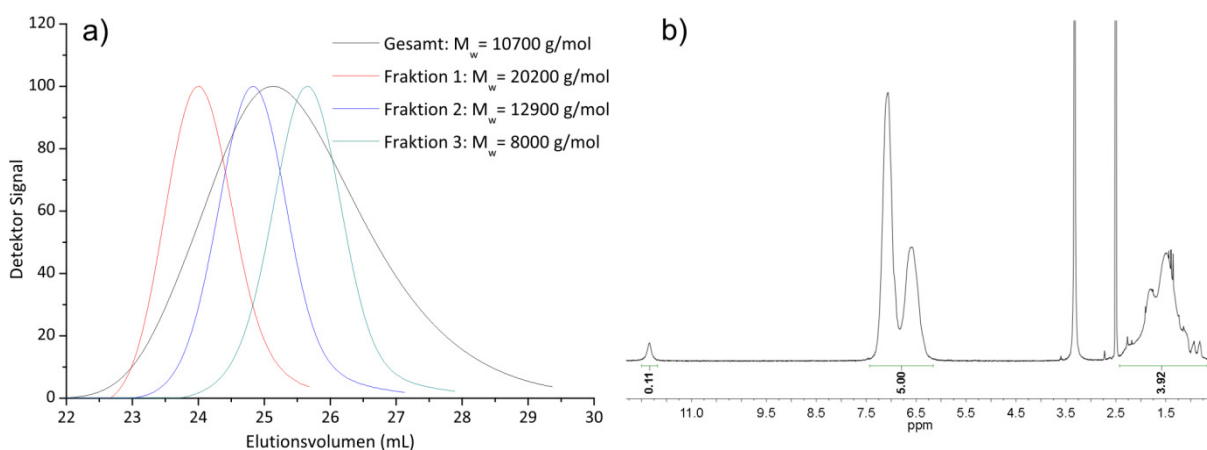


Abbildung 34: a) Drei Fraktionen eines GPC-Elugramms von Poly(styrol-*co*-acrylsäure), b) ein repräsentatives ¹H-NMR-Spektrum einer Fraktion (300 MHz, DMSO-*d*₆, 289.3 K).

In Tabelle 3 sind die Molekulargewichte der Copolymerfraktionen 1, 2, 3 und deren Integrale der aromatischen (arom.) und aziden (az.) Protonensignale aufgeführt.

Tabelle 3: M_w , Integrale der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren und Monomerverhältnisse der drei Copolymerfraktionen.

Fraktion	M_w (g/mol)	Integral (arom.)	Integral (az.)	Styrol/Acrylsäure
1	20200	5	0.10	91/9
2	12900	5	0.12	89/11
3	8000	5	0.11	90/10

Die Verwendung des Integrals des sauren Protons ist der Verwendung des Integrals des aliphatischen Signals vorzuziehen, da geringe Mengen an Lösemittel (Ethanol, THF) die Integration der aliphatischen Protonen verfälschen. Im Bereich der aromatischen Protonen sowie im Bereich der Säuregruppen tritt dieses Problem nicht auf. Ein Austausch der sauren Protonen mit dem deuterierten Lösemittel ist beim Einsatz vom DMSO- d_6 ebenfalls nicht zu erwarten, da DMSO ein aprotisches Lösemittel ist und keine weiteren aziden Protonen vorhanden sind. Dies konnte anhand eines Kontrollexperiments gezeigt werden. Styrol und Acrylsäure wurden in einem molaren Verhältnis von 9 zu 1 in DMSO- d_6 gelöst und mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht. Es stellte sich heraus, dass sowohl ein Vergleich der aliphatischen Protonen als auch der sauren Protonen der Acrylsäure mit den aromatischen Signalen des Styrols zu einem identischen Ergebnis führte. Aus dem Spektrum resultierte exakt das eingewogene Verhältnis von 9 zu 1. Durch dieses Modellexperiment konnte gezeigt werden, dass bei dem hier vorliegenden System die aziden Protonen der Acrylsäure zur Bestimmung der Copolymerzusammensetzung eingesetzt werden können.

Der Gehalt von Styrol und Acrylsäure im Copolymer wurde über die Verhältnisse der Integrale bestimmt, indem das aromatische Signal den fünf Protonen des Styrols zugeordnet wurde. Vergleicht man die Integrale der Säureprotonen untereinander (siehe Tabelle 3), lässt sich feststellen, dass zwischen den einzelnen Fraktionen nur ein geringer Unterschied besteht, der sich im Rahmen des Fehlers bei der Integration bewegt. Daraus lässt sich schließen, dass das Verhältnis der Monomere im Copolymer über alle Kettenlängen vergleichbar ist.

Die Unterscheidung zwischen einem alternierenden und einem statistischen Copolymer lässt sich so allerdings nicht vornehmen, sondern kann nur anhand der Copolymerisationsparameter abgeleitet werden. Eine genauere Untersuchung über eine Triadenanalyse würde eine detailliertere Aussage über die Sequenz erlauben. Dies ist aber nicht im Detail von Bedeutung, da für die weiteren Experimente nur eine homogene Verteilung der funktionellen Gruppen über die gesamte Probe wichtig ist, um eine definierte Synthese zu gewährleisten.

10.2.4 Polymeranalyse

Nach erfolgreicher Synthese wurden die Copolymere Poly(styrol-*co*-acrylsäure) (PS-*co*-PAS) analysiert und deren Struktur mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie bestimmt. Im ^1H -NMR-Spektrum sieht man deutlich das Signal der aromatischen Protonen des Styrols bei 6.10-7.51 ppm, die aliphatischen Protonen des Polymerrückgrats bei 0.69-2.42 ppm sowie das Signal der Acrylsäure bei 11.85 ppm (-COOH). Auch im ^{13}C -NMR-Spektrum sind die entsprechenden Signale zu finden. Die Molekulargewichte der Copolymere und deren Verteilung (PDI) wurden mittels GPC bestimmt. Als Standard diente Polystyrol. Der Einsatz dieses Standards führte aufgrund des geringen Prozentsatzes an Acrylsäure in den Copolymeren zu verlässlichen Daten, was durch Lichtstreuungsexperimente bestätigt wurde. In Tabelle 4 sind beispielhaft neun Ansätze gezeigt.

Tabelle 4: Probennummer, Initiator- und Lösemittelmenge, M_w (THF, RI) und Polydispersitätsindex (PDI) von Poly(styrol-*co*-acrylsäure).

Probennummer	Initiatormenge [mg]	Lösemittelmenge [mL]	M_w [g/mol], THF, RI	PDI
P _S 16-85	752	100	8500	2.1
P _S 7-88	1001	200	8800	1.6
P _S 7-96	750	100	9600	2.1
P _S 7-104	753	100	10400	2.0
P _S 5-125	752	100	12500	1.9
P _S 7-131	753	100	13100	1.6
P _S 7-166	502	100	16600	1.6
P _S 7-197	77	80	19700	1.6
P _S 7-494	504	40	49400	1.5

Aus Tabelle 4 werden die Einflüsse verschiedener Parameter auf das Molekulargewicht des Polymers deutlich. Zum einen führt erwartungsgemäß eine erhöhte Menge an Initiator zu einem geringeren Molekulargewicht, zum anderen führt der Einsatz einer geringeren Menge an Lösemittel (Ethanol) zu einem erhöhten Molekulargewicht. Der PDI der Polymere bewegte sich zwischen 1.5 und 2.1, was im erwarteten Bereich (1.5 - 2.0) der freien radikalischen Polymerisation war.

Eslässt sich festhalten, dass säurefunktionalisierte Polymere für die Peptidanbindung mit einem Molekulargewicht zwischen 8500 g/mol und 49400 g/mol synthetisiert werden konnten.

10.2.5 Bestimmung der Copolymerzusammensetzung

Die Bestimmung der Copolymerzusammensetzung erfolgte mittels ^1H -NMR-Spektroskopie und Titration. Bei der erst genannten Methode wurden die Integrale der Protonensignale verwendet. Der Anteil an Styrol ($m_{St}[\%]$) und Acrylsäure ($m_{AS}[\%]$) wurde anhand eines Vergleichs zwischen dem aromatischen Protonensignal (I_{arom} , 6.1 - 7.5 ppm) und dem Signal des Säureprotons (I_{SP}) der Acrylsäure bei 11.85 ppm berechnet. Das aromatische Signal der Styrolprotonen wurde auf fünf

normiert. Daraus ergibt sich der prozentuale Anteil der beiden Monomere im Copolymer. Beispielsweise ergibt ein Integral des sauren Protons (I_{SP}) von 0.11, einen Gehalt von 7.1% Acrylsäure und 92.9% Styrol.

Zusätzlich zur Bestimmung der Copolymerzusammensetzung mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie wurde eine volumetrische Analyse durch Titration durchgeführt und die Ergebnisse beider Methoden miteinander verglichen. Dazu wurden dreimal definierte Mengen an Polymer gelöst und jeweils mit 0.1 M NaOH bis zum Äquivalenzpunkt titriert und der Umschlagspunkt bei pH 8.2 mittels Phenolphthalein visualisiert. Die Eignung dieser Methode wurde zuvor unter Zuhilfenahme einer pH-Elektrode zwischen pH 6 und 12 verifiziert. Die Ergebnisse beider Methoden sind in Abbildung 35 aufgeführt.

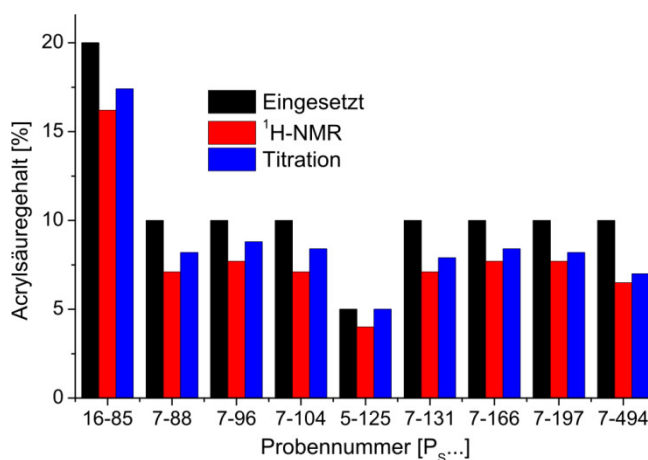


Abbildung 35: Bestimmung der Zusammensetzung von Poly(styrol-co-acrylsäure) über $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und Titration im Vergleich mit der eingesetzten Menge an Acrylsäure.

Der Abweichung der Messungen bei der Bestimmung mittels NMR liegt, bedingt durch Fehler bei der Integration, bei $X\% \pm 0.6\%$. Bei der Titration liegt die Abweichung bei $X\% \pm 1\%$, was auf Schwankungen in der Wahrnehmung des Umschlagspunktes zurückzuführen ist.

Aus Abbildung 35 ist ersichtlich, dass im Rahmen des Fehlerbereichs mit beiden Methoden die gleichen Ergebnisse erreicht wurden. Die Titration führte im Allgemeinen zu höheren Werten als die $^1\text{H-NMR}$ -Analyse, da bei der Bestimmung mittels Titration der Umschlagspunkt nach dem Äquivalenzpunkt auftritt.

Bei P₅16-85 wurden 20%, bei P₅5-125 5% und bei den anderen Proben (P₅7-Z) 10% Acrylsäure eingesetzt. Es fällt auf, dass bei allen Ansätzen weniger Acrylsäure eingebaut als der Reaktion zugesetzt wurde, was offensichtlich an den moderaten Umsätzen von 35 - 70% liegt (siehe 11.4.1). Trotzdem erfolgte eine Polymersynthese mit einer definierten Zusammensetzung der Copolymeren mit 5, 7 und 16% Acrylsäure. Aus der ermittelten Copolymerzusammensetzung wurde hierfür die weiteren Synthesen notwendige Anzahl an funktionellen Gruppen berechnet.

Damit ein N-terminal-geschütztes Peptid über seinen C-Terminus an das Polymer gebunden werden konnte (siehe Abbildung 30, Abschnitt 9), musste das Polymer mit Aminogruppen funktionalisiert werden. Um im Verlauf der Synthese zu definierten Nanopartikeln zu gelangen, sollte das

aminofunktionalisierte Polymer dem säurefunktionalisierten Gegenstück möglichst ähnlich sein. Ein effektiver Weg, um einen ähnlichen Polymerisationsgrad, eine ähnliche Molekulargewichtsverteilung und eine möglichst identische Anzahl an funktionellen Gruppen zu erreichen, ist eine polymeranaloge Reaktion. Dadurch konnte Poly(styrol-*co*-acrylsäure) wie folgt in Poly[styrol-*co*-*N*-(2-aminoethyl)-acrylamid] umgewandelt werden.

10.2.6 Polymeranaloge Umsetzung von Poly(styrol-*co*-acrylsäure)

10.2.6.1 Kupplung von Boc-geschütztem Ethylendiamin

Poly(styrol-*co*-acrylsäure) wurde unter Anwendung von Peptidkupplungsreagenzien mit einfach Boc-geschütztem Ethylendiamin umgesetzt. Neben der Verwendung von *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in Kombination mit 1-Hydroxybenzotriazol-Hydrat (HOBt·H₂O) und Triethylamin (TEA) bzw. *N,N*-Diisopropylethylamin (DIEA) wurde COMU (1-[(1-(Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylaminomorpholino)]uroniumhexafluorophosphat und 2,4,6-Trimethylpyridin (TMP) eingesetzt (siehe Abbildung 36). Eine genaue Diskussion über den Unterschied der Kupplungsreagenzien erfolgt in Abschnitt 10.4.

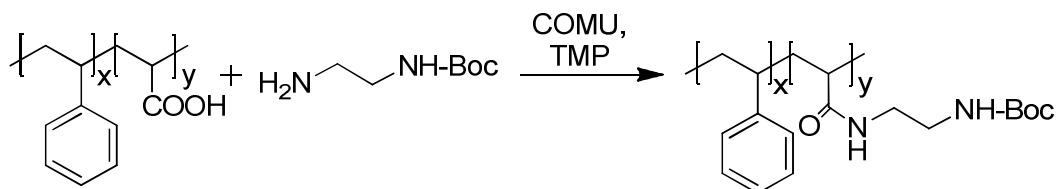


Abbildung 36: Polymeranaloge Umsetzung von Poly(styrol-*co*-acrylsäure) zu Poly[styrol-*co*-*N*-(2-(*tert*-butyloxycarbonylaminoethyl)acrylamid].

Das Produkt (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-Boc konnte durch einfache wässrige Extraktion aufgereinigt werden, da alle Edukte und Nebenprodukte wasserlöslich waren. Ein negativer Ninhydrin test zeigte die Abwesenheit freier Aminogruppen, was ein Hinweis dafür war, dass der eingesetzte Überschuss an Amin quantitativ entfernt werden konnte. Die erfolgreiche polymeranaloge Reaktion wurde mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopien nachgewiesen. Das Signal der Protonen der Aminogruppe von Ethylendiamin tritt im Produktspektrum nicht mehr auf. Vergleicht man das Spektrum von Edukt und Produkt, treten die Signale der CH₂-Gruppen des Ethylendiamins hochfeldverschoben von 2.88 nach 2.50 ppm auf. Eine CH₂-Gruppe wird dabei vom aliphatischen Signal des Polymers überdeckt, die andere ist immer noch deutlich bei 2.63-3.13 ppm zu erkennen. Außerdem tritt das Signal der Protonen der Boc-Schutzgruppe bei 1.38 ppm auf. Im ¹³C-NMR-Spektrum treten die entsprechenden Kohlenstoffsignale ebenso vollständig auf.

Aus den Spektren ist außerdem ersichtlich, dass die Säuregruppen des Polymers nicht quantitativ umgesetzt werden konnten. 10% der Säurefunktionen konnten nicht funktionalisiert werden. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der sterischen Abschirmung vereinzelter reaktiver Gruppen durch die Polymerketten. Auf das mögliche Auftreten dieses Problems wurde bereits im Theorieteil hingewiesen (siehe 6.3.4).

Der nicht vollständige Umsatz hat an dieser Stelle aber keinerlei negativen Auswirkungen auf die weiteren Syntheseschritte. Wenn die freien Säuregruppen im weiteren Verlauf reagieren, tragen sie zur weiteren Vernetzung der Partikel bei. Kommt es weiterhin zu keiner Reaktion, sind die vereinzelt Säuregruppen bei der enzymatischen Partikelspaltung, dem Auflösen bzw. Quellen der Partikel eher zuträglich.

10.2.6.2 Entfernung der Boc-Schutzgruppe

Das erhaltene Produkt Poly[styrol-co-N-(2-(*tert*-butyloxycarbonylaminoethyl)acrylamid] wurde anschließend in Poly[styrol-co-N-(2-aminoethyl)acrylamid] (PS-co-PAA)-NH-C₂H₄-NH₂ umgewandelt, indem die Boc-Schutzgruppe sauer entfernt wurde (siehe Abbildung 37).

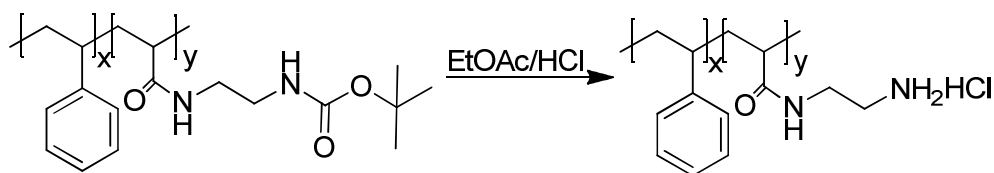


Abbildung 37: Umsetzung von Poly[styrol-co-N-(2-(*tert*-butyloxycarbonylaminoethyl)acrylamid] zu Poly[styrol-co-N-(2-aminoethyl)acrylamid].

Die Boc-geschützte Vorstufe wurde in HCl/Ethylacetat gelöst, gerührt und das Lösemittel entfernt. Da alle Nebenprodukte ausschließlich gasförmig auftraten, konnte so das Produkt rein als Hydrochlorid erhalten werden. Die Struktur wurde mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie verifiziert. Die Entfernung der Schutzgruppe kann sowohl im ¹H-NMR-Spektrum als auch im ¹³C-NMR-Spektrum über die Abwesenheit der Signale der Boc-Schutzgruppe [¹H: 1.15 ppm (-C(CH₃)₃), ¹³C: 28.22 ppm (-C(CH₃)₃), 77.57 (-C(CH₃)₃) und 155.53 ppm (-COOC(CH₃)₃)] nachvollzogen werden.

Im weiteren Verlauf der Synthese wird auf die Angabe von GPC-Daten verzichtet, da die resultierenden Polymere strukturell zu sehr vom vorhandenen Polystyrol-Standard abweichen.

10.2.6.3 Analyse der Polymerzusammensetzung

Die Zusammensetzung des erhaltenen Polymers bzw. die Anzahl der funktionellen Gruppen im Polymer wurde, wie bereits bei der Vorstufe (siehe Abbildung 35), mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt, indem das Protonensignal der NH₃⁺-Gruppe des Ethylendiamins bei 8.13 ppm mit dem aromatischen Protonensignal verglichen wurde. Die theoretisch erreichbaren Werte, die ausgehend vom Ausgangsmaterial Poly(styrol-co-acrylsäure) berechnet wurden, sind zusammen mit den experimentell ermittelten Werten in Abbildung 38 aufgeführt.

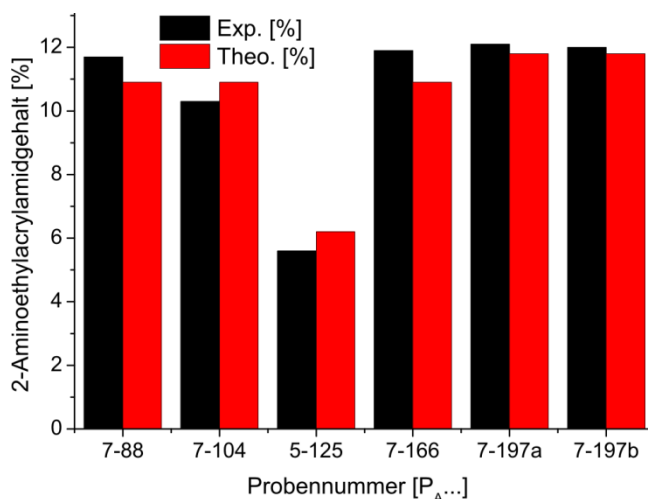


Abbildung 38: Experimentelle und theoretisch, berechnete Werte für die Zusammensetzung von Poly[styrol-*co*-*N*-(2-aminoethyl)acrylamid].

Der Fehlerbereich liegt bei den experimentellen Werten, durch eventuelle Abweichungen bei der Integration, bei $X\% \pm 1\%$. Bei den theoretischen Werten liegt der Fehlerbereich bei $X\% \pm 0.6\%$.

Die theoretischen Werte weichen nur geringfügig von den mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopieexperimentell bestimmten Werten ab. Man kann feststellen, dass fast die gleiche Anzahl an funktionellen Gruppen wie im Ausgangspolymer vorliegt. Es lässt sich auch auf eine identische Verteilung der funktionellen Gruppen in den Polymeren und einen identischen Polymerisationsgrad schließen, da es bei der polymeranalogen Umsetzung zu keiner Depolymerisationsreaktion gekommen ist.

Hier stellte sich die volumetrische Analyse zur Bestimmung der Anzahl der funktionellen Gruppen im Polymerals nicht geeignet heraus. Die Titration mit NaOH an mehreren Proben führt im Vergleich zur Bestimmung über $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie stets zu erhöhten Werten. Es wurde daraus geschlossen, dass ein geringer Rückstand an überschüssiger HCl im Produkt die Werte dementsprechend erhöht. Außerdem verfälschen die nicht umgesetzten Säuregruppen das Messergebnis.

10.2.7 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die freie radikalische Copolymerisation von Styrol und Acrylsäure und der anschließenden polymeranalogen Reaktion, beide polymere Bausteine für die weiteren Synthesen erfolgreich hergestellt wurden. Die polymeranaloge Reaktion ermöglichte dabei ein Maximum an Vergleichbarkeit von Poly(styrol-*co*-acrylsäure) und Poly[styrol-*co*-*N*-(2-aminoethyl)acrylamid] bezüglich der Anzahl funktioneller Gruppen und dem Polymerisationsgrad, der sich bei dieser Umsetzung nicht änderte.

10.3 Enzymatisch spaltbare Nanopartikel der 1. Generation (GFF)

Im ersten Schritt wurde die kurze Erkennungssequenz GFF eingesetzt, um enzymatisch spaltbare Polymerpartikel zu erhalten. Es soll gezeigt werden, dass das Peptid mittels der gewählten Syntheseroute an das Polymer gekuppelt werden kann, dass eine Nanopartikelbildung möglich ist und dass eine enzymatische Heterophasenspaltung erreicht werden kann. Des Weiteren sollen die nötigen Syntheseschritte anhand des preiswerten Peptids entwickelt werden, bevor ein kosten- und zeitintensiveres System eingesetzt wurde.

10.3.1 Peptidsynthese von GFF-OH

Die kürzeste von Proteasen spaltbare Sequenz, GFF,²⁴³ wurde als Grundlage der Experimente gewählt. Die Sequenzen Fmoc-GFF-OH (siehe Abbildung 39) und H₂N-GFF-OH wurden mittels Festphasenpeptidsynthese (siehe 11.4.4), unter Verwendung der Fmoc-Schutzgruppenstrategie, synthetisiert.

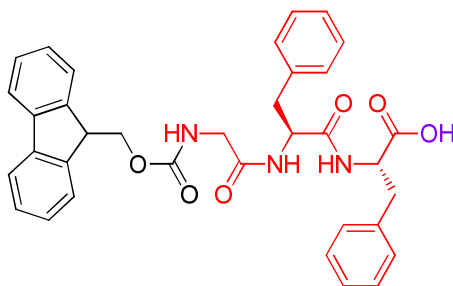


Abbildung 39: Struktur von Fmoc-GFF-OH.

Die Struktur wurde mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie sowie Matrix-unterstützter Laser-Desorptions-Ionisations-Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI TOF-MS) analysiert. Im ¹H-NMR-Spektrum treten unter anderem die charakteristischen Protonensignale des Phenylalanins (-NH-CHPh-CO-) im Peptidrückgrat (4.40 - 4.59 ppm) auf. Die Signale der aromatischen Protonen sind zwischen 7.13 und 7.29 ppm zu finden. Wichtig ist hier, dass die Fmoc-Gruppe vorliegt und somit im weiteren Syntheseverlauf die Aminogruppe geschützt ist. Dies kann durch das ¹H-NMR-Spektrum bestätigt werden. Die Signale der aliphatischen Protonen der Fmoc-Gruppe treten zwischen 4.18 und 4.27 ppm (-CH-CH₂-OCO-NH-) und die Signale der aromatischen Protonen bei 7.31, 7.41, 7.70 und 7.89 ppm auf. Im ¹³C-NMR-Spektrum erkennt man unter anderem die Signale von Fmoc bei 46.62 (-CH-CH₂-OCO-NH-) und 65.78 ppm (-CH-CH₂-OCO-NH-), sowie die Signale des Phenylalanins bei 53.45 und 53.53 ppm (-NH-CHPh-CO-).

10.3.1.1 Analyse der Reaktionsparameter der Synthese von GFF-OH

Bei der Analyse der Reaktionsparameter der Peptidsynthese wurden die einzelnen Ansätze der gleichen Peptidsequenz im Hinblick auf die Reinheit und die Ausbeute verglichen. Die Gründe für die Unterschiede bei diesen Werten sind auf drei Parameter zurückzuführen: erstens die Ansatzgröße, zweitens, ob und wie oft eine Temperatur von 80 °C während der Synthese überschritten wurde, und drittens, wie oft bei den einzelnen Syntheseschritten in 90 s die erforderliche Temperatur von 75 °C erreicht wurde. Diese Faktoren sind in Tabelle 5 für die Synthese von GFF aufgeführt und werden im Folgenden detailliert erläutert.

Tabelle 5: Peptidansatz, Ausbeute [%] und Peptidreinheit [%] korreliert mit den Syntheseparametern, Ansatzgröße [mmol], Maximaltemperatur ($T_{Max.}$), Anzahl der Reaktionstemperaturen unter 80 °C ($n < 80$ °C) sowie die Anzahl der Reaktionsschritte im optimalen Bereich zwischen 75 °C und 80 °C ($n_{Opt.}$) im Vergleich zur Gesamtzahl an Reaktionsschritten ($n_{Ges.}$) der Peptide Fmoc-GFF-OH und H₂N-GFF-OH.

Ansatz	Ausbeute [%]	Ansatzgröße [mmol]	$T_{Max.}$ [°C]	$n < 80$ °C / $n_{Ges.}$	Reinheit [%]	$n_{Opt.} / n_{Ges.}$
1 Fmoc-	50	3	80	4/4	92	4/4
2 Fmoc-	53	3	80	4/4	97	4/4
3 Fmoc-	56	0.5	84	2/4	99	4/4
4 Fmoc-	67	0.5	86	3/4	90	2/4
5 Fmoc-	76	0.5	82	2/4	90	2/4
6 H ₂ N-	80	0.5	82	3/4	87	3/4
7 Fmoc-	80	0.1	80	4/4	78	0/4
8 Fmoc-	82	0.1	79	4/4	93	3/4

Aus Tabelle 5 wird ersichtlich, dass Ansatz 1 und 2 sehr niedrige Ausbeuten aufweisen. Die Ansatzgröße hat einen großen Einfluss auf die Ausbeute, was vor allem bei diesen beiden Ansätzen (3 mmol) zu sehen ist. Aufgrund der großen Harzmenge wurde ein geringeres Verhältnis von TFA zu Harzmenge zugegeben. Dies führte offensichtlich zu einer unvollständigen Peptidabspaltung vom Harz, was zu einem deutlichen Ausbeuteverlust bei den 3 mmol Ansätzen führte.

Die Ausbeute der Ansatz 3 bis 8 steigt zunehmend. Hier wird der zweite wichtige Aspekt deutlich. Essentiell für die Ausbeute ist auch, ob bei der Synthese eine Maximaltemperatur von 80 °C überschritten wurde. Ab dieser Temperatur kann es zu Denaturierung sowie zu einer Abspaltung der Peptide vom Harz kommen. Dieser Effekt erhöht sich zunehmend bei höheren Temperaturen (z.B. Ansatz 4, 86 °C). Aus diesem Grund ist in Tabelle 5 die Maximaltemperatur ($T_{Max.}$) der Synthese angegeben. Außerdem gibt die Zahl in der fünften Spalte ($n < 80$ °C / $n_{Ges.}$) Auskunft darüber, in wie vielen Syntheseschritten 80 °C nicht überschritten wurde ($n < 80$ °C). Diese Zahl wird mit der Anzahl der Gesamtschritte ($n_{Ges.}$) verglichen. Aus dem Verhältnis lassen sich Rückschlüsse über die Ausbeute ziehen. Je seltener eine Überschreitung von 80 °C während der Synthese auftrat (hoher $n < 80$ °C /

$n_{Ges.}$ Wert), desto höher sind die Ausbeuten. Dies schlägt sich in den Ansätzen 3 bis 8 nieder. Da hier immer seltener 80 °C überschritten wurde, nimmt die Ausbeute immer weiter zu.

Ein entscheidender Faktor für die Reinheit der Peptide ist, ob die benötigte Mindestreaktionstemperatur von 75 °C innerhalb von 90 s erreicht wurde. Aufgrund der sehr kurzen Reaktionszeiten (3 min bei der Entschützung und 5 min bei der Kupplung, siehe 11.2.1) muss sich die Reaktionstemperatur nach 90 s im optimalen Bereich zwischen 75 und 80 °C befinden. Ist das nicht der Fall, können die Reagenzien nicht effizient genug reagieren, was zu unvollständigen Reaktionen und somit zu einer Zunahme der Nebenprodukte führt. In Tabelle 5 gibt die letzte Spalte ($n_{Opt.} / n_{Ges.}$) Auskunft darüber, in wie vielen Syntheseschritten der optimale Temperaturbereich für die Synthese erreicht wurde ($n_{Opt.}$). Diese Zahl wird mit der Anzahl der Gesamtschritte ($n_{Ges.}$) verglichen. Aus dem Verhältnis lassen sich Rückschlüsse über die Peptidreinheit ziehen. Je häufiger diese Optimaltemperatur während der Synthese erreicht wurde (hoher $n_{Opt.} / n_{Ges.}$ Wert), desto höher ist die Reinheit. Die Reinheit ist bei den Ansätzen 2 und 3 am höchsten, da sich die Reaktionstemperatur am häufigsten im optimalen Bereich bewegte. Die Reinheit wurde durch HPLC bestimmt und konnte bei Ansatz 3 auf $\geq 99\%$ gesteigert werden.

Die hier im Detail besprochenen Aspekte treffen auf alle weiteren Peptide zu. Daher wird in den entsprechenden Generationen darauf nur kurz eingegangen.

10.3.2 Synthese der Peptid-Polymer-Konjugate

10.3.2.1 Kupplung von Peptid und Polymer

Das GFF-Peptid wurde an das synthetisierte Ausgangspolymer gekuppelt. Dazu wurde Fmoc-GFF-OH mittels DCC/HOBt/DIEA aktiviert und mit Poly[styrol-*co*-*N*-(2-aminoethyl)acrylamid] (P_A7-166) umgesetzt (siehe Abbildung 40).

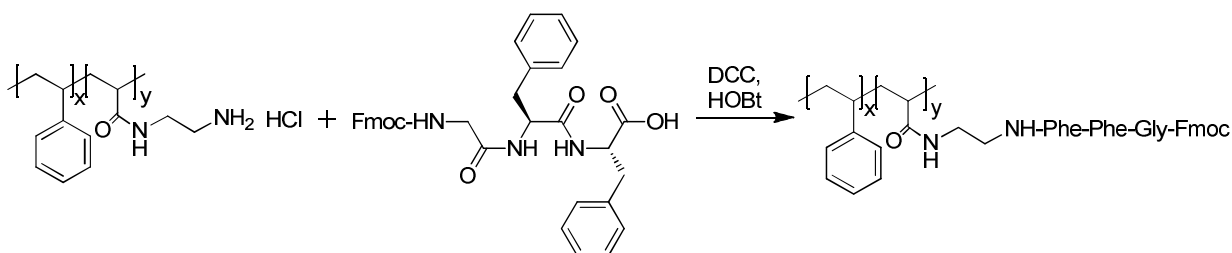


Abbildung 40: Reaktionsschema für die Synthese von (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-FFG-Fmoc.

Das erhaltene Produkt (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-FFG-Fmoc wurde aufgereinigt und konnte mit einer Ausbeute von 94% erhalten werden. Der anschließend durchgeführte Ninhydrintest zeigte ein negatives Ergebnis, was die Abwesenheit von Aminogruppen und somit einen vollständigen Umsatz indizierte. Die Struktur des Peptid-Polymer-Konjugats wurde mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie verifiziert. Im ¹H-NMR-Spektrum ist eine deutliche Verbreiterung der Protonensignale des Peptids zu erkennen, was auf eine Anbindung an das Polymer schließen lässt, da aufgrund einer eingeschränkten Beweglichkeit die T_2 -Zeiten verkürzt werden. Außerdem treten das Säureproton des Peptids bei 12.78 ppm sowie die Aminoprotonen des Polymers bei 8.13 ppm nicht mehr auf. Daneben treten alle

anderen zu erwartenden Signale im ^1H -Spektrum auf, obwohl ein großer Teil der Peptidsignale von den Signalen des Polymers überlagert wird. Klar zu erkennen sind zum Beispiel die Protonensignale des Phenylalanins zwischen 4.37 und 4.64 ppm (NH-CHPhe-CO), die Protonensignale der Fmoc-Gruppe zwischen 4.09 und 4.31 ppm ($-\text{CH-CH}_2\text{-OCO-NH-}$), sowie zwischen 7.64 und 8.08 ppm (vier Aromatenprotonen) (siehe 10.3.1). Anhand der Verschiebung der Kohlenstoffsignale, die der Amidbindung benachbart sind, ist die erfolgreiche Anbindung ebenfalls durch einen Vergleich der ^{13}C -Spektren von Edukt und Produkt nachvollziehbar. Alle anderen zu erwartenden Signale sind ebenfalls zu finden.

10.3.2.2 DOSY-NMR-Spektroskopie

Der endgültige Beweis der quantitativen Anbindung an das Polymer konnte über diffusionsabhängige Kernspinresonanzspektroskopie (DOSY-NMR-Spektroskopie, engl.: diffusion ordered spectroscopy) erbracht werden. Mit dieser Methode ist es möglich, Diffusionskoeffizienten (D , [m^2/s]) von Molekülen zu bestimmen und mit deren ^1H -NMR-Spektrum zu korrelieren. In Abbildung 41 ist die Überlagerung von drei DOSY-NMR-Spektren zusammen mit dem ^1H -NMR-Spektrum des Produkts dargestellt.

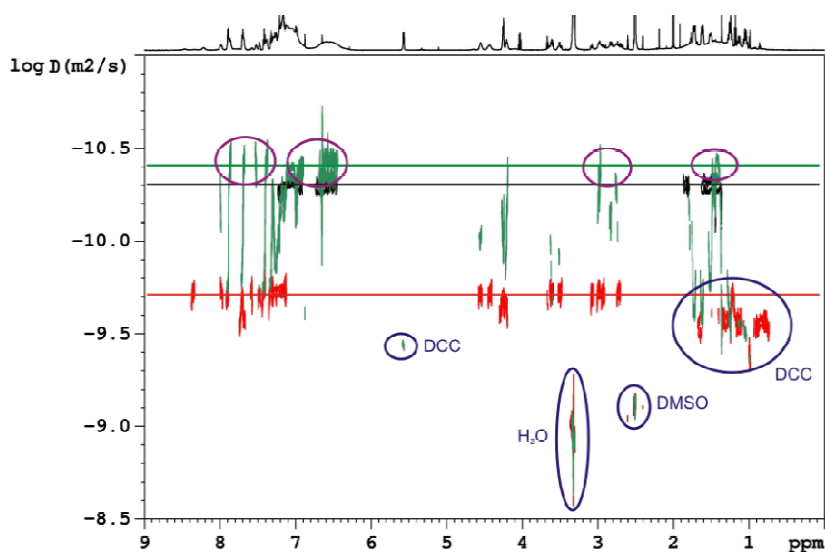


Abbildung 41: Überlagerung von drei DOSY-NMR-Spektren: Fmoc-GFF-OH in rot, PS-co-PAS ($P_n 7-166$) in schwarz und (PS-co-PAA)- $\text{C}_2\text{H}_4\text{-NH-FFG-Fmoc}$ in grün (700 MHz, DMSO-d_6 , $T = 289.3\text{ K}$).

Der Diffusionskoeffizient von Molekülen ist über die Stokes-Einstein-Gleichung (siehe 8.3) mit ihrem hydrodynamischen Radius verknüpft. Mit zunehmender Größe des Moleküls verringert sich der Diffusionskoeffizient. Durch einen Vergleich der DOSY-NMR-Spektren können so verschiedene Molekülgrößen unterschieden werden. Die Signale des reinen Peptids, Fmoc-GFF-OH, sind in rot dargestellt und entsprechen einem Diffusionskoeffizienten von $1.778 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$. Die Signale des polymeren Ausgangsmaterials sind in schwarz dargestellt und können einem Diffusionskoeffizienten von $4.966 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ zugeordnet werden. Vergleicht man beide Werte, erkennt man, dass das Polymer als größeres Molekül einen kleineren Diffusionskoeffizienten als das Peptid besitzt. In grün ist

schließlich das Signal des Peptid-Polymer-Konjugats - (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-FFG-Fmoc - mit einem Diffusionskoeffizienten von $4.571 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ dargestellt. Dieser Wert ist kleiner als der des reinen Polymers, was auf ein Molekül mit größerem hydrodynamischen Radius schließen lässt. Daraus lässt sich schließen, dass ein „größeres“ Molekül entstanden ist und somit die Peptide erfolgreich an das Polymer gekuppelt werden konnten. Diese Beobachtung wird durch die Tatsache unterstützt, dass sowohl die Protonensignale des Peptids (z. B. bei 2.71, 2.96, 7.41 oder 7.70 ppm, lila markiert) als auch die Protonensignale des Polymers (z. B. bei 1.25-1.83 oder 6.42-7.51 ppm, lila markiert) bei dem gleichen Diffusionskoeffizienten auftreten. Die Signale bei 3.33 ppm und bei 2.50 ppm (blau markiert), die in allen drei Spektren auftreten, sind Wasser und DMSO-d₆ zuzuordnen.

Aus Abbildung 41 werden allerdings auch die Nachteile der Verwendung von *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid ersichtlich. Zwischen 0.70 und 1.75 ppm sowie bei 5.57 ppm (blau markiert) sind Signale im „grünen“ Spektrum bei einem deutlich höheren Diffusionskoeffizienten zu sehen. Es stellte sich heraus, dass entgegen den Angaben in der Literatur,²⁴³ die quantitative Entfernung des bei der Kupplung entstehenden *N,N'*-Dicyclohexylharnstoffs durch Filtration nicht möglich war. Daher musste ein alternatives Kupplungsreagenz gefunden werden. Trotz dieser Verunreinigung wurde die Synthese weiterverfolgt, um die Machbarkeit der geplanten Syntheseroute zu zeigen.

Es lässt sich feststellen, dass aus dem gezeigten Spektrum, trotz der Verunreinigung, der Erfolg der Kupplung eindeutig zu sehen ist. Außerdem konnte die Anwesenheit von freiem Peptid ausgeschlossen werden, da sonst im grünen Spektrum Signale des Peptids bei größeren Diffusionskoeffizienten vorhanden wären.

Die Analyse des erhaltenen Konjugats zeigte, dass die Anbindung von Fmoc-GFF-OH an das Polymer Poly[styrol-*co*-*N*-(2-aminoethyl)acrylamid] möglich war.

10.3.2.3 Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe

Im nächsten Syntheseschritt musste die Fmoc-Gruppe entfernt werden, um die für die Kupplung notwendige Aminogruppe zu entschützen, damit das erhaltene Konjugat für die Synthese der Nanopartikel eingesetzt werden konnte. Beim ersten Versuch, die Fmoc-Schutzgruppe zu entfernen, wurde die aus der Peptidsynthese bekannte Entfernung mittels Piperidin (siehe Abschnitt 2.7) angewendet. Die Entschützung von (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-FFG-Fmoc wurde erreicht, jedoch konnte das dabei entstehende Fmoc-Addukt nicht entfernt werden. Versuche wie Umkristallisieren, Ausfällen, wässrige Extraktion oder eine säulenchromatographische Aufreinigung waren nicht erfolgreich. Die säulenchromatographische Aufreinigung und die Ausfällung gestalteten sich aufgrund der sehr ähnlichen chemischen Eigenschaften von Produkt und Nebenprodukt als schwierig. Das Umkristallisieren war aufgrund des amorphen Charakters des Polymers ebenfalls nicht durchführbar. Die wässrige Extraktion schien eine sehr vielversprechende Alternative zu sein, da als Ersatz für

Piperidineine ähnlich starke Base - 4-Aminomethylpiperidin (4-AMP) -gefunden wurde, deren Addukt wässrig zu entfernen sein sollte.²⁴⁴ Dazu wurde (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-FFG-Fmoc in Chloroform gelöst und mit hundertfachem Überschuss an 4-Aminomethylpiperidin versetzt. Nach Ausfällen mit Phosphatpuffer und mehrfacher Aufreinigung wurde das Produkt mit einer Ausbeute von 56% erhalten.

Da dieser Weg prinzipiell funktionierte, konnte durch eine Anpassung des Lösemittels (THF) die Fmoc-Gruppe erfolgreich abgespalten und vom Produkt getrennt werden. Durch den Einsatz der Base Tris(2-aminoethyl)amin (TAEA),²⁴⁵ die ähnliche Eigenschaften wie 4-AMP aufweist, konnte die Aufreinigung des Produkts quantitativ durchgeführt und beschleunigt werden (siehe Abbildung 42).

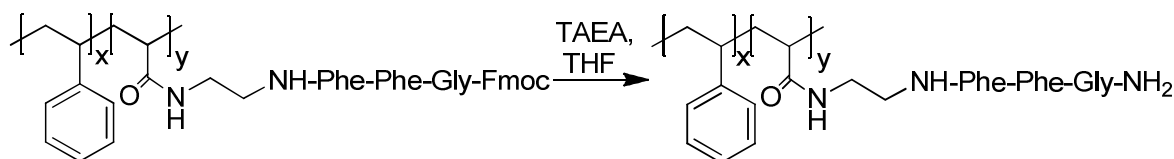


Abbildung 42: Reaktionsschema für die Synthese von (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-FFG-NH₂.

Die Struktur des Produkts (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-FFG-NH₂ wurde mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie verifiziert. Im ¹H-Spektrum sieht man deutlich, dass nach der Umsetzung die Protonensignale der Fmoc-Gruppe des Edukts bei 7.89, 7.70, 7.41, 7.31 ppm nicht mehr vorhanden sind. Dieselbe Beobachtung kann im ¹³C-Spektrum gemacht werden. Hier treten die Signale der Fmoc-Gruppe bei 156.39, 143.82, 140.70, 127.61, 127.07, 125.25, 120.09, 65.75 und 46.59 ppm ebenfalls nicht mehr auf.

10.3.2.4 Bestimmung des Peptidgehalts im Konjugat

Der Peptidgehalt im Konjugat wurde anschließend bestimmt, um die Anzahl an freien Aminogruppen zu quantifizieren. Diese Information war für den nächsten Syntheseschritt, der Partikelbildung durch Vernetzung, essentiell, da hier die Aminogruppen äquivalent zu den Säuregruppen eingesetzt werden sollten. Die Bestimmung der Produktzusammensetzung konnte nicht mehr wie beim polymeren Ausgangsprodukt PS-*co*-PAS erfolgen (siehe 10.2.4), da das ¹H-NMR-Spektrum nun die Signale des Polymers und des Peptids vereinte und somit sehr viele überlagerte Signale aufwies. Somit war kein getrenntes Signal des Polymers, das als Vergleich dienen konnte, mehr vorhanden. Aus diesem Grund wurde die quantitative ¹H-NMR-Spektroskopie unter Verwendung eines externen Standards eingesetzt. Eine definierte Menge Produkt und eine definierte Menge des Standards DSS (4,4-Dimethyl-4-silapentan-1-sulfonsäure-Natriumsalz) wurden eingewogen und in DMSO-d₆ gelöst. Das Salz kann genau eingewogen werden und hat damit einen großen Vorteil gegenüber anderen potentiellen, flüchtigeren NMR-Standards (wie z.B. 1,1,2,2-Tetrabromethan). Im resultierenden Spektrum trat das Signal der Methylprotonen des Standards - R-Si-(CH₃)₃ - nach Kalibrierung auf das Lösemittelsignal (DMSO-d₆, 2.50 ppm) bei 0.03 ppm auf. In diesem Bereich befanden sich keine Signale des Produkts. Im ¹H-NMR-Spektrum trat ein separiertes Signal bei 4.55 ppm auf, das

einem Proton des Phenylalanins (-NH-CHPh-CO-) zugeordnet werden konnte. Aus dem Verhältnis der Integrale und den eingewogenen Massen konnte die Menge an Peptid als 25.5% bestimmt werden. Der theoretische Wert wurde, ausgehend von einer quantitativen Umsetzung von P_S7-166, als 32.6% berechnet. Daraus wird ersichtlich, dass an etwa 78% der Aminogruppen eine Peptidsequenz gebunden werden konnte. Daraus lässt sich auf eine gewisse sterische Hinderung des Polymers bei der Peptidanbindung schließen.

10.3.3 Synthese der Nanopartikel

Hydrophobe Peptid-vernetzte Polystyrol-Nanopartikel wurden durch eine Vernetzungsreaktion in inverser Miniemulsionstechnik hergestellt. Dieses Verfahren ist, wie in Abschnitt 7 beschrieben, eine vielseitige Methode, um definierte Nanopartikel darzustellen.²⁴⁶ Bisher wurde der inverse Ansatz hauptsächlich für die Synthese von Polymerpartikeln, polymeren Kapseln mit flüssigem, hydrophilem Kern,²⁴⁷ anorganischen Nanopartikeln^{220,248} oder zur Hochtemperaturpolymerisation²⁴⁹ eingesetzt.

In dieser Arbeit wurde DMF als hydrophile, disperse Phase verwendet, da es ein ausgezeichnetes Lösemittel für die eingesetzten Peptide, das Polymer, die synthetisierten Peptide-Polymer Konjugate sowie für alle nötigen Reagenzien war. Außerdem kann es nach der Überführung der Partikel in Wasser durch einfache Dialyse aus der Dispersion entfernt werden. Als kontinuierliche Phase wurde Isooctan gewählt, da es nicht mit DMF mischbar ist und durch moderates Erhitzen, nach der Überführung in Wasser, entfernt werden kann.

Im Folgenden wurde eine Reaktion zwischen dem Konjugat (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-FFG-NH₂ basierend auf P_A7-166 und Poly(styrol-*co*-acrylsäure) (P_S7-166) durchgeführt. Es sollte gezeigt werden, dass über den Einsatz des inversen Miniemulsionsprozesses eine Nanopartikelbildung möglich ist und eine Vernetzung in den Partikeln auftritt.

N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid konnte als Kupplungsreagenz nicht verwendet werden, da die quantitative Entfernung des ausfallenden Harnstoffs nach der Partikelbildung kaum möglich (siehe 10.3.2) ist. Als Alternative wurden Kupplungsreagenzien aus der Festphasenpeptidsynthese (siehe 2.9) angewendet.

10.3.3.1 Reaktion in Homophase

Zur Bestimmung der Reaktionsparameter wie Reagenzienmengen, Lösemittelmengen, Reaktionszeit usw. (siehe 11.4.6) wurde die Reaktion in Homophase durchgeführt. Dazu wurde (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-FFG-NH₂ basierend auf P_A7-166, Poly(styrol-*co*-acrylsäure) (P_S7-166), HBTU und HOBT·H₂O in DMF/NMP gelöst und *N,N*-Diisopropylethylamin (DIEA) zugegeben. Nach 12 h war das Reaktionsgemisch geliert und das Produkt in organischen Lösemitteln (THF oder DMF), in denen die Edukte zuvor löslich waren, unlöslich. Das Vorliegen eines mit Lösemittel gequollenen Gels deutete auf eine erfolgreiche Vernetzung hin.

10.3.3.2 Reaktion in inverser Miniemulsion

Die evaluierten Reaktionsbedingungen wurden im Anschluss auf die inverse Miniemulsionstechnik übertragen. Für die innere Phase wurde wie zuvor (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-FFG-NH₂ basierend auf P_A7-166, Poly(styrol-*co*-acrylsäure) (P_S7-166), HBTU und HOBT·H₂O in DMF gelöst. Um als Reaktionsstarter DIEA zugeben zu können, wurde der inneren Phase NMP zugesetzt, da die Base mit diesem Lösemittel besser mischbar war als mit DMF. Beide Lösemittel haben außerdem den Vorteil, mit Wasser mischbar zu sein, und somit bei einer späteren Überführung der Nanopartikel in Wasser durch Dialyse entfernt werden zu können.

Da sich bei der Peptidsynthese eine Reaktionstemperatur von 75 °C als effektiv erwiesen hatte, sollte dies auf die Amidbildung in Miniemulsion übertragen werden. Aus diesem Grund musste die äußere Phase mehrere Kriterien erfüllen: Zum einen sollte die Dispersion auf 75 °C erhitzt werden können, zum anderen sollte eine spätere Entfernung durch Verdampfen möglich sein. Durch den Einsatz von Isooctan, das einen Siedepunkt bei 99 °C aufweist, konnten beide Anforderungen erfüllt werden. Als Tensid diente das amphiphile Blockcopolymer P(B/E-*b*-EO).

Die gebildete Miniemulsion wurde mit DIEA als Reaktionsstarter versetzt und die Reaktion bei 75 °C durchgeführt (siehe Abbildung 43), wobei die Reaktion in der inneren Phase stattfand.

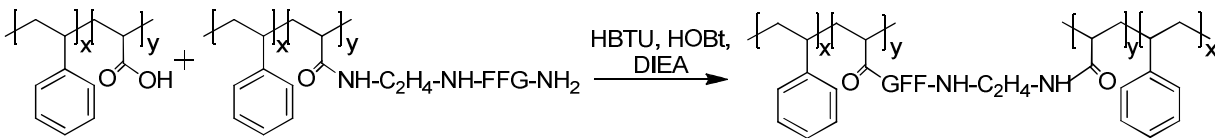


Abbildung 43: Reaktionsschema für die Synthese der GFF-vernetzten Partikel.

Anschließend erfolgte eine Überführung der inversen Miniemulsion in wässrige SDS-Lösung und eine Verdampfung von Isooctan. Die eingesetzten Lösemittel (DMF, NMP) und fast alle Reagenzien (HOBT, DIEA) konnten durch Dialyse entfernt werden, wodurch die Partikel aufgereinigt werden konnten. Nur das Kupplungsreagenz HBTU war durch diesen Prozess nicht zu entfernen und verblieb aufgrund seiner Wasserunlöslichkeit in den Partikeln, was durch eine Analyse mittels ¹H-NMR gezeigt werden konnte.

10.3.3.3 Charakterisierung der GFF-vernetzten Partikel

Der Durchmesser der resultierenden Nanopartikel wurde vor und nach der Dialyse mittel Photonen-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (PCCS) bestimmt. Alle vier Ansätze bewegten sich dabei im gleichen Größenbereich. Eine beispielhafte Partikelgrößenverteilung ist in Abbildung 44 gezeigt.

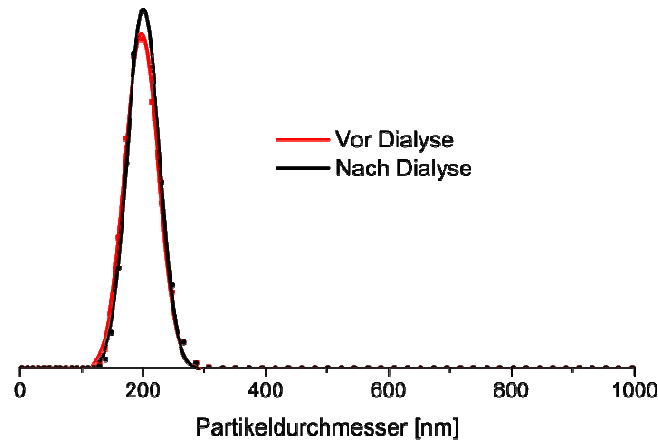


Abbildung 44: Partikeldurchmesser der GFF-vernetzten Partikel vor und nach der Dialyse (PCCS, Intensitätsverteilung).

In Abbildung 44 ist die Verteilung der Partikeldurchmesser vor und nach Dialyse gezeigt. Der Mittelwert (X_{50}) befindet sich nach der Dialyse bei 200 nm. Es wird ersichtlich, dass sich während der Dialyse der Partikeldurchmesser nicht änderte. Die Verteilung der Partikelgrößen, die aus der Signalbreite ersichtlich wird, änderte sich ebenfalls nicht. Die Partikelmorphologie wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht. Ein exemplarisches REM-Bild der Probe zeigt Abbildung 45.

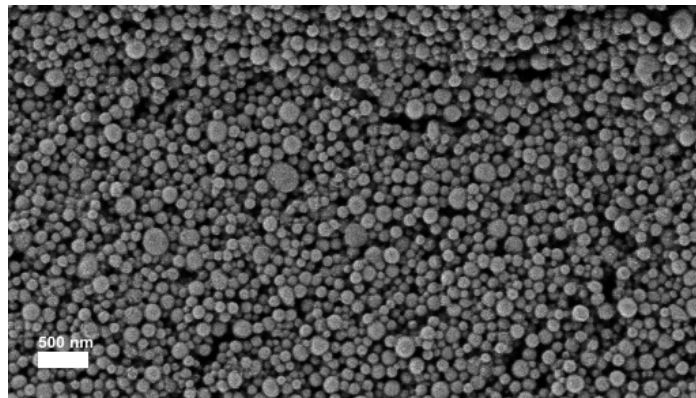


Abbildung 45: REM-Aufnahme der GFF-vernetzten Partikel.

Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist zu erkennen, dass runde Partikel mit einer ähnlichen Größe, wie zuvor mittels PCCS bestimmt, vorlagen. Eine grafische Bestimmung von 100 Partikelgrößen anhand der Aufnahme, zeigte einen durchschnittlichen Partikeldurchmesser von 160 nm. Der etwas geringere Wert kann dadurch erklärt werden, dass mittels PCCS der hydrodynamische Radius bestimmt wurde, während bei den REM-Bildern die Partikel getrocknet und somit ohne Hydrathülle vorlagen. Außerdem wurde durch die PCCS das Intensitätsmittel und durch die

REM das Zahlenmittel bestimmt, welches niedriger ist. Das Zetapotential der Dispersionen betrug zwischen -5 und -7 mV, der Feststoffgehalt zwischen 0.3 und 0.9% und der pH-Wert um 5.3.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Synthese von Nanopartikeln möglich war, wurde im nächsten Schritt deren enzymatische Spaltung untersucht.

10.3.4 Enzymatischer Abbau der Nanopartikel

Es muss geklärt werden, ob die hier eingesetzten Nanopartikel von Pepsin abgebaut werden können und ob die Erkennungssequenz für das Enzym in einem solchen Konjugat zugänglich ist. Proteasen spalten typischerweise Proteine, deren Größe sich im Nanometerbereich befindet. Die enzymatische Reaktion findet dabei in Lösung bzw. in Homophase statt. Aus der Literatur ist bekannt, dass Enzyme an Heterophasen arbeiten können.²⁵⁰⁻²⁵²

Der enzymatische Abbau der Nanopartikel mit Pepsin war nicht möglich, da das Enzym bei pH 2 aktiv ist und die Dispersion bei diesem pH-Wert nicht mehr stabil war. Aufgrund der hohen Ionenkonzentration kann es zu einer Störung der elektrostatischen Stabilisierung der Partikel kommen. Als Alternative wurde Trypsin eingesetzt, da diese Protease bei pH 7.4 arbeitet, einem Wert, der näher an dem pH-Wert der Dispersion lag. Ein Teil der Dispersion wurde mit Trypsin in phosphatgepufferter Salzlösung (pH 7.4) (PBS) versetzt, ein anderer diente als Blindprobe bei dem kein Enzym eingesetzt wurde. Durch anschließende Analyse der Abbauprodukte mittels PCCS, GPC und HPLC sollte die Spaltung nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der PCCS vor und nach der Behandlung mit Trypsin sind in Abbildung 46 aufgeführt.

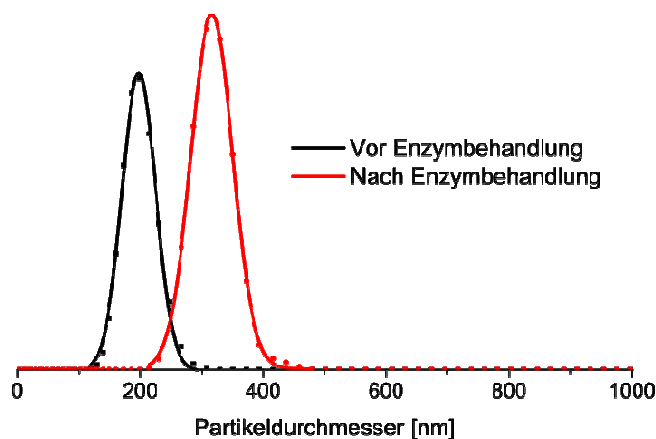


Abbildung 46: Partikeldurchmesser der GFF-vernetzten Partikel vor und nach Behandlung mit Trypsin (PCCS, Intensitätsverteilung).

Die Ergebnisse der PCCS zeigten einen Anstieg des Partikeldurchmessers (X_{50}) von 200 auf 320 nm. Dieses Phänomen kann zum einen durch Quellen der Partikel erklärt werden, wenn durch die Spaltung Vernetzungspunkte durchtrennt wurden und dadurch COOH-Gruppen auftraten. Zum anderen könnte diese Beobachtung auch durch eine Adsorption der Enzyme auf der Partikeloberfläche und einer daraus resultierenden Aggregation der Partikel zu erklären sein. Es war damit mittels PCCS nicht möglich, die Spaltung eindeutig zu beweisen. Mittels GPC und HPLC war dies ebenfalls nicht möglich, da die

Proben in den entsprechenden Lösemitteln nicht löslich waren. Dies spricht zwar für die erfolgreiche Vernetzung der Partikel, aber nicht für die Bildung löslicher Spaltungsprodukte.

Die HPLC ist nicht für eine *in situ*-Detektion der enzymatischen Spaltung geeignet. Auch die GPC und die PCCS sind nicht in der Lage, die enzymatische Spaltung der Nanopartikel zu beweisen. Aus diesem Grund war es notwendig, eine alternative Detektionsmöglichkeit für die enzymatische Spaltung der Peptid-vernetzten Nanopartikel zu finden.

10.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der 1. Generation

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Synthese der Nanopartikel der 1. Generation mithilfe des GFF-System gezeigt werden konnte, dass die Kupplung von Peptiden an das synthetisierte Polymer möglich ist und der N-Terminus des so synthetisierten Peptid-Polymer-Konjugats durch die selektive Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe freigesetzt werden kann. Auf diesem mehrfach durchgeführten, reproduzierbaren Weg war die Synthese von Nanopartikeln mit Hilfe der Miniemulsionstechnik möglich. Die enzymatische Spaltung in Heterophase konnte an diesem System jedoch nicht nachgewiesen werden.

Um das System weiterzuentwickeln, müssen mehrere Punkte verbessert werden. Zum einen muss die enzymatische Spaltung eindeutig detektierbar sein, zum anderen muss ein Ersatz für *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid und HBTU gefunden werden, wobei die Reaktionsnebenprodukte einfach zu entfernen sein müssen. Wünschenswert wäre zudem ein quantitativer Nachweis der Vernetzung innerhalb der Nanopartikel. Außerdem musste gezeigt werden, dass das hier eingesetzte Trypsin die für Pepsin konzipierte Peptidsequenz GFF ebenfalls spaltet. Diese Aspekte wurden in der nächsten Generation enzymatisch spaltbarer Nanopartikel verwirklicht.

10.4 Enzymatisch spaltbare Nanopartikel der 2. Generation (Y_N GFFK_{Mant})

10.4.1 Peptidsynthese mit Anthranilsäure und ihren Derivaten

10.4.1.1 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Wie bereits erwähnt, ist es bei der Analyse größerer Strukturen, im Besonderen für vernetzte partikuläre Polymere, mittels HPLC nur sehr schwer möglich, eine Aussage über die Identität der Spaltungsprodukte zu treffen. Eine exzellente Möglichkeit, enzymatische Spaltungen zu detektieren, ist der Einsatz des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET).^{98,107,253} Durch den Einsatz eines FRET-Paares, bestehend aus Fluorophor (Donor) und Quencher (Akzeptor), ist es möglich, eine enzymatische Spaltung über die Zunahme der Fluoreszenz zu detektieren (siehe Abschnitt 3). Hierbei werden beide Komponenten so in das Peptid eingeführt, dass die Erkennungssequenz des Enzyms zwischen Fluorophor und Quencher liegt (siehe Abbildung 47).

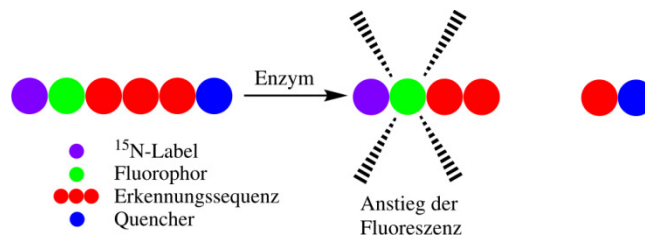


Abbildung 47: Prinzip des FRET zur Detektion enzymatischer Spaltung.

Die Emission des Fluorophors bleibt unbeeinflusst, solange der Abstand zwischen Donor und Akzeptor größer als der Förster-Radius (1 - 8 nm)¹⁰⁷ ist. Wird der Abstand zwischen beiden verringert, kommt es zu einem strahlungslosen Energieübertrag vom Donor zum Akzeptor. Dies wird als „Quenching“ der Fluoreszenz bezeichnet. Im intakten Peptid ist der gegenseitige Abstand geringer als der Förster-Radius und somit der FRET sehr effektiv. Eine Spaltung des Peptids führt folglich zu einem Anstieg der Fluoreszenz aufgrund des größer werdenden Abstands zwischen Donor und Akzeptor, was *in situ* detektiert werden kann. Für die Detektion enzymatischer Spaltungen wird diese Methode häufig verwendet,¹⁰⁵ da sie im Gegensatz zu anderen Methoden (z.B. Gravimetrie) auch in Zellen einsetzbar ist. Somit steht ein Detektionssystem für potentielle, biomedizinische Anwendungen zur Verfügung.

10.4.1.2 Anthranilsäure (Ant) und 3-Nitro-L-Tyrosin (Y_N) - AntGFFY_NG-OH

Idealerweise sollte die Erkennungssequenz durch die Einführung des FRET-Paares nur gering verändert werden, da sonst die Erkennung durch das Enzym nicht mehr erfolgen kann. Aus diesem Grund sollte das kleinstmögliche FRET-Paar eingesetzt werden. Dieses wurde nach einer Literaturrecherche in Anthranilsäure (Ant) als Fluorophor und 3-Nitro-L-Tyrosin (Y_N) als Quencher gefunden (siehe Abbildung 48).¹⁰³

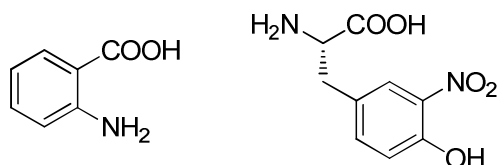


Abbildung 48: Struktur von Anthranilsäure (Ant) und 3-Nitro-L-Tyrosin (Y_N).

Um zu zeigen, dass eine Spaltung durch diese Veränderung immer noch möglich war, wurde AntGFFY_NG-OH synthetisiert (siehe Abbildung 49).

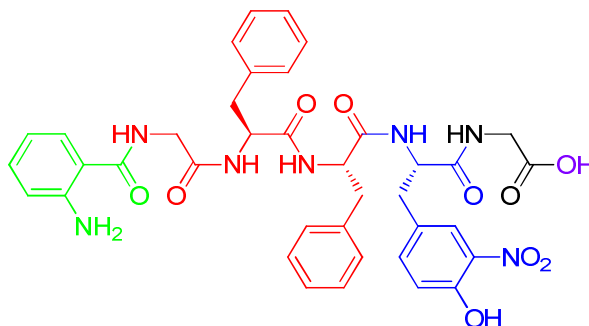


Abbildung 49: Struktur von AntGFFY_NG-OH.

Die Struktur wurde mittels ¹H-, und ¹³C-NMR-SpektroskopiesowieMALDI TOF-MS verifiziert. Charakteristisch im ¹H-NMR-Spektrum(siehe Abbildung 50) sind unter anderem die Signale zweier Protonen der Anthranilsäure bei 6.58 und 6.75 ppm. Außerdem treten die Signale des Phenylalanins (NH-CHPhe-CO), sowie des 3-Nitro-L-Tyrosins (NH-CHR-CO)im Peptidrückgrat zwischen 4.45 und 4.62 ppm auf. Die Signale der Aromaten des Phenylalanins sind zwischen 7.10 und 7.27 ppm zu finden.

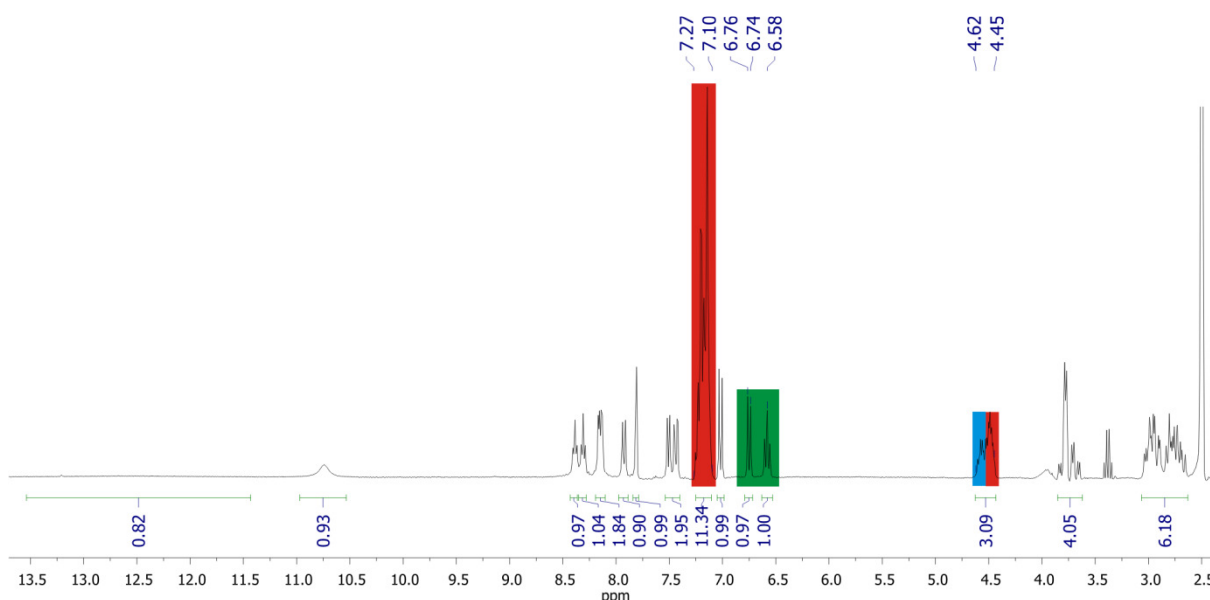


Abbildung 50: ¹H-NMR-Spektrum von AntGFFY_NG-OH mit charakteristischen, farbig markierten Signalen.

Im ¹³C-NMR-Spektrum erkennt man z.B. die Signale des Phenylalanins bei 53.57 und 53.31 ppm (NH-CHPhe-CO) oder die aromatischen Signale der Anthranilsäure bei 152.46, 136.64, 115.09, 113.49, und 109.65 ppm.

10.4.1.3 Analyse der Reaktionsparameter der Synthese von AntGFFY_NG-OH

Eine detaillierte Erklärung der Einflüsse der Reaktionsparameter erfolgte in Abschnitt 10.3.1.1. Ein Überblick über die Synthese von AntGFFY_NG-OH kann in Tabelle 6 gefunden werden.

Tabelle 6: Peptidansatz, Ausbeute [%] und Peptidreinheit [%] korreliert mit den Syntheseparametern Ansatzgröße [mmol], Maximaltemperatur ($T_{Max.}$), Anzahl der Reaktionstemperaturen unter 80 °C ($n < 80$ °C) sowie die Anzahl der Reaktionsschritte im optimalen Bereich zwischen 75 °C und 80 °C ($n_{Opt.}$) im Vergleich zur Gesamtzahl an Reaktionsschritten ($n_{Ges.}$) der Peptide AntGFFY_NG-OH.

Ansatz	Ausbeute [%]	Ansatzgröße [mmol]	$T_{Max.}$ [°C]	$n < 80$ °C / $n_{Ges.}$	Reinheit [%]	$n_{Opt.} / n_{Ges.}$
1 H ₂ N-	59	3	81	6/10	74	3/10
2 H ₂ N-	88	0.1	80	9/10	95	6/10
3 H ₂ N-	94	0.5	79	10/10	51	2/10

Aus Tabelle 6 wird ersichtlich, dass die niedrige Ausbeute von Ansatz 1 durch die gewählte Ansatzgröße bedingt wird. Die Reinheit der Ansatz 2 und 3 steigt zunehmend, da hier immer seltener 80 °C überschritten wurde. Die Reinheit ist bei Ansatz 2 am höchsten, da sich hier die Reaktionstemperatur am häufigsten im optimalen Bereich bewegte. Die Reinheit wurde durch HPLC bestimmt und konnte durch Anpassung der Reaktionstemperaturen auf $\geq 95\%$ gesteigert werden.

10.4.1.4 Enzymatische Spaltung von AntGFFY_NG-OH

Nach Behandlung mit Trypsin in PBS-Puffer, konnte eine Spaltung der Sequenz durch einen Anstieg der relativen Fluoreszenz nachgewiesen werden (siehe Abbildung 51).

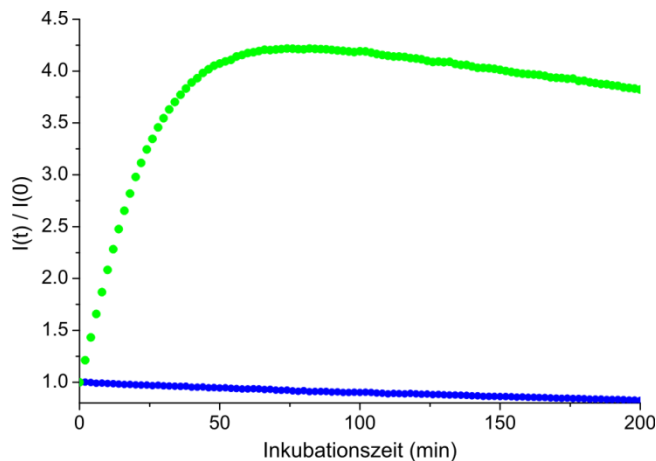


Abbildung 51: Anstieg der relativen Fluoreszenz, bei der Spaltung von AntGFFY_NG-OH durch Trypsin (Messung durch Niklas Kotman).

Im Abbildung 51 ist der relative Fluoreszenzanstieg bei der Spaltung von AntGFFY_NG-OH mit Trypsin dargestellt. Man erkennt, dass der Anstieg und somit die Spaltung nach 70 min ihr Maximum erreicht haben. Danach kommt es zu einem Absinken der Fluoreszenz. Dieser Effekt kann durch ein Ausbleichen des Fluorophors erklärt werden. Trotz dieses Phänomens ist ein deutlicher Anstieg um

mehr als das Vierfache der Anfangsfluoreszenz zu verzeichnen. Außerdem konnte dadurch nachgewiesen werden, dass der Ersatz von Pepsin durch Trypsin problemlos erfolgen kann. Dieses Experiment zeigte außerdem die Eignung des Ant/Dnp-Systems für den *in situ*-Nachweis der enzymatischen Spaltung.

10.4.1.5 Anthranilsäure (Ant) und 3-Nitro-L-Tyrosin (Y_N) - AntRQLRVVGGY $_N$ G-OH

Da sich das FRET-Paar bewährt hatte, wurde die in der Literatur als Hepsin-spaltbar beschriebene¹¹⁴ Sequenz AntRQLRVVGGY $_N$ G-OH synthetisiert (siehe Abbildung 52). Damit sollte gezeigt werden, dass die Zielstruktur in Hepsin-exprimierenden Zellen gespalten werden kann und dass die Einführung des FRET-Paares die enzymatische Spaltbarkeit nicht unterbindet.

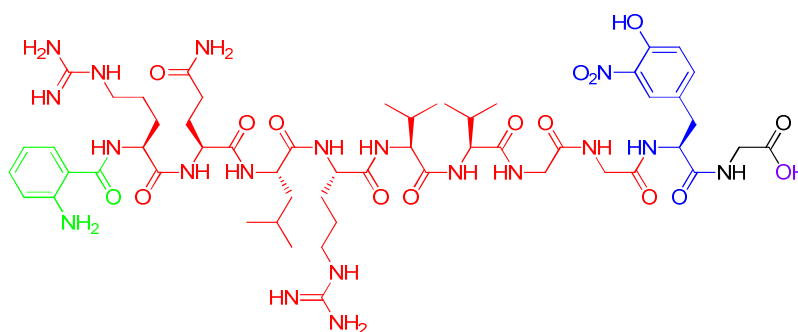


Abbildung 52: Struktur von AntRQLRVVGGY $_N$ G-OH.

Die Struktur wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und MALDI TOF-MS analysiert. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum erkennt man charakteristische Gruppen einzelner Aminosäuren der Sequenz. Die Signale von Leucin (L: CH_3) und Valin (V: CH_3) treten zwischen 0.73 und 0.91 ppm auf. Die Signale des Lysin-Linkers (K: CH_2) befinden sich zwischen 1.36 und 1.79 ppm. Die Protonen des Rückgrats von Leucin, Valin, Arginin und Glutamin ($-\text{CRH}-$) finden sich zwischen 4.14 und 4.57 ppm, das von 3-Nitro-L-Tyrosin ($-\text{CRH}-$) bei 4.53 ppm. Außerdem ist das Signal eines aromatischen Protons der Anthranilsäure zwischen 6.50 und 6.59 ppm charakteristisch.

10.4.1.6 Analyse der Reaktionsparameter der Synthese von AntRQLRVVGGY $_N$ G-OH

Eine detaillierte Erklärung der Einflüsse der Reaktionsparameter erfolgte in Abschnitt 10.3.1.1. Ein Überblick über alle Ansätze für die Synthese des Peptids kann in Tabelle 7 gefunden werden.

Tabelle 7: Peptidansatz, Ausbeute [%] und Peptidreinheit [%] korreliert mit den Syntheseparametern Ansatzgröße [mmol], Maximaltemperatur (T_{Max}), Anzahl der Reaktionstemperaturen unter 80°C ($n < 80^\circ\text{C}$) sowie die Anzahl der Reaktionsschritte im optimalen Bereich zwischen 75°C und 80°C (n_{Opt}) im Vergleich zur Gesamtzahl an Reaktionsschritten (n_{Ges}) der Peptide AntRQLRVVGGY $_N$ G-OH.

Ansatz	Ausbeute [%]	Ansatzgröße [mmol]	T_{Max} [$^\circ\text{C}$]	$n < 80^\circ\text{C} / n_{\text{Ges}}$	Reinheit [%]	$n_{\text{Opt}} / n_{\text{Ges}}$
1 $\text{H}_2\text{N}-$	80	0.1	81	13/19	90	15/19
2 $\text{H}_2\text{N}-$	90	0.1	80	19/19	85	13/19

Aus Tabelle 7 wird ersichtlich, dass die niedrige Ausbeute von Ansatz 1 durch die geringere Anzahl von Syntheseschritten unter 80°C bedingt wird. Die Reinheit von Ansatz 1 ist höher, da sich hier die Reaktionstemperatur häufiger im optimalen Bereich bewegte. Die Reinheit wurde durch HPLC bestimmt und konnte durch Anpassung der Reaktionstemperaturen auf $\geq 90\%$ gesteigert werden.

10.4.1.7 Enzymatische Spaltung von AntRQLRVVGGY_NG-OH

Um die Eignung der Sequenz als Zielsubstrat zu evaluieren, wurde die Sequenz in Hepsin-exprimierender Zellkultur (LNCaP) gespalten (siehe Abbildung 53).

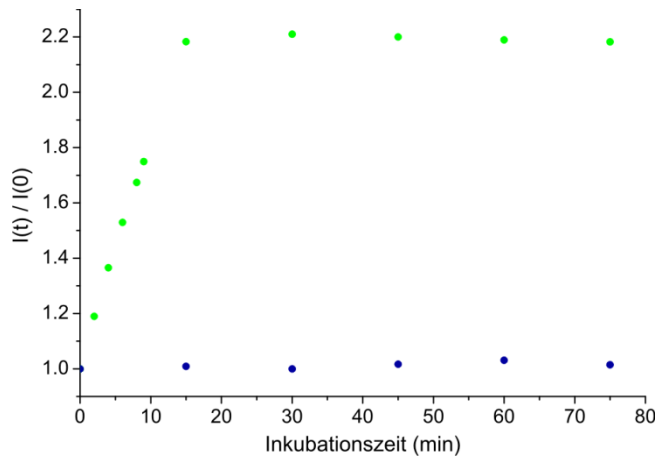


Abbildung 53: Anstieg der relativen Fluoreszenz, bei der Spaltung von AntRQLRVVGGY_NG-OH durch Hepsin in Zellkultur (Messung durch Niklas Kotman).

Aus Abbildung 53 ist ersichtlich, dass nach 15 min die relative Fluoreszenz um den Faktor 2 anstieg. Damit lässt sich für eine spätere Anwendung der Sequenz in der Krebsfrüherkennung, eine Eignung als Zielsubstrat hinsichtlich eines untersuchungsnahen Befundserkennens.

Es konnte gezeigt werden, dass Anthranilsäure als FRET-Donor geeignet ist, der aber bisher nur am N-terminalen Ende eines Peptids verwendet wurde. Um das Anwendungspotential und die Synthesefreiheit zu erweitern, sollte der Donor an jeder beliebigen Position im Peptid einsetzbar sein. Die funktionellen Gruppen der Anthranilsäure stehen jedoch in ortho-Position zueinander. Eine Anbindung weiterer Aminosäuren könnte daher problematisch werden, da es bei der Kupplung zu sterischer Abstoßung kommen könnte. Da aus diesem Grund der universelle Einsatz des Fluorophors bezweifelt wurde, musste nach einer Alternative gesucht werden.

Um diese universelle Eignung neuer Fluorophore zu überprüfen, wurden sie an der C-terminalen Seite der Erkennungssequenz eingebaut, wodurch gewährleistet wurde, dass an dieser Stelle im Gegensatz zum N-terminalen Ende der Peptide, von beiden Seiten eine Bindung stattfand. Das bedeutet, dass das Fluorophor somit theoretisch in jeder Position im Peptid platziert werden kann. Die Eignung als universell einsetzbares Fluorophor konnte damit direkt aus der Analyse des Peptids erkannt werden.

10.4.1.8 Para-Aminobenzoesäure (p-Abz) und 3-Nitro-L-Tyrosin (Y_N)

Para-Aminobenzoesäure (p-Abz) bot sich als Alternative für Anthranilsäure an, da hier die funktionellen Gruppen in para-Position stehen und somit eine sterische Hinderung bei der Anbindung weiterer Aminosäure unwahrscheinlich ist.

10.4.1.9 Analyse der Reaktionsparameter der Peptidsynthesen mit para-Aminobenzoesäure

Eine detaillierte Erklärung der Einflüsse der Reaktionsparameter erfolgte in Abschnitt 10.3.1.1. Ein Überblick über alle Ansätze für die Synthese verschiedener Peptide mit para-Aminobenzoesäure kann in Tabelle 8 gefunden werden.

Tabelle 8: Peptid, Ausbeute [%] und Peptidreinheit [%] korreliert mit den Syntheseparametern Ansatzgröße [mmol], Maximaltemperatur ($T_{Max.}$), Anzahl der Reaktionstemperaturen unter 80°C ($n < 80$ °C) sowie die Anzahl der Reaktionsschritte im optimalen Bereich zwischen 75 °C und 80 °C ($n_{Opt.}$) im Vergleich zur Gesamtzahl an Reaktionsschritten ($n_{Ges.}$) von verschiedenen Peptiden mit para-Aminobenzoesäure.

Peptide	Ausbeute [%]	Ansatzgröße [mmol]	$T_{Max.}$ [°C]	$n < 80$ °C / $n_{Ges.}$	Reinheit [%]	$n_{Opt.} / n_{Ges.}$
Y_N GFF(p-Abz)G-OH	41	0.1	81	7/11	64	6/11
Fmoc- Y_N GFF(p-Abz)G-OH	67	0.1	81	8/10	50	3/10
Fmoc-(p-Abz)GFF Y_N G-OH	74	0.1	81	6/10	65	1/10
Fmoc-(p-Abz)GFF Y_N G-OH	76	1	81	9/10	65	5/10
(p-Abz)RQLRVVGG Y_N G-OH	95	0.1	81	12/21	46	13/21
(p-Abz)GFF Y_N G-OH	98	0.1	81	8/11	48	6/11

Da in Tabelle 8 nicht die gleichen Peptidsequenzen aufgeführt sind, kann hier kein Vergleich zwischen den Ausbeuten oder den Reinheiten erfolgen. Hier war wohl der Hauptaspekt für die schlechte Reinheit der Peptide die schlechte Löslichkeit des Anthranilsäurederivats (p-Abz) in DMF.

Da die gewünschten Produkte in sehr schlechter Reinheit erhalten wurden, wurde entschieden, das zuvor eingesetzte Fluorophor (Ant) beizubehalten, aber vom Rückgrat des Peptids zu entkoppeln und übereinen α -Aminosäurelinker an das Peptid zu koppeln. Die Aminogruppe in ϵ -Position von L-Lysin (Lys, K) könnte durch die Anwendung der Peptidkupplungschemie an das Fluorophor gebunden werden. So könnte das Fluorophor in das Peptid eingebaut werden, ohne größeren Einfluss auf die Spaltungssequenz sowie auf die Peptidsynthese zu nehmen.

10.4.1.10 *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Anthraniloyl-L-lysin (K_{Ant}) und 3-Nitro-L-Tyrosin (Y_{N}) - Y_{N} GFFK $_{\text{Ant}}$ G-OH

Im Folgenden wurde gezeigt, dass die bereits eingesetzte Anthranilsäure für die Anbindung an Lysin geeignet war. Es wurde das Peptid Y_{N} GFFK $_{\text{Ant}}$ G-OH synthetisiert (siehe Abbildung 54) und dabei die Anbindung des Fluorophors auf der Festphase realisiert.

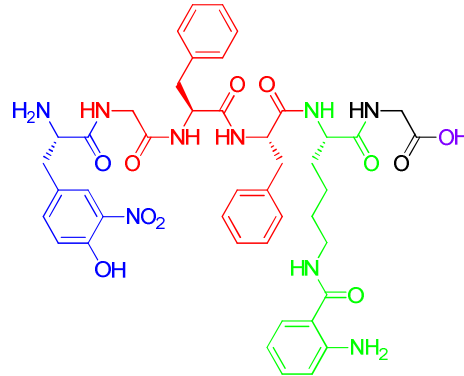


Abbildung 54: Struktur von Y_{N} GFFK $_{\text{Ant}}$ G-OH.

Die Synthese erfolgte unter Verwendung von Methyltrityl (Mtt)-geschütztem Lysin. Es wurde *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Methyltrityl-L-lysin (Fmoc-Lys(Mtt)-OH) an das Glycin-beladene Harz gebunden und die Mtt-Schutzgruppe durch Behandlung mit 1%iger TFA-Lösung in Dichlormethan⁹⁷ selektiv entfernt (siehe Abbildung 55).

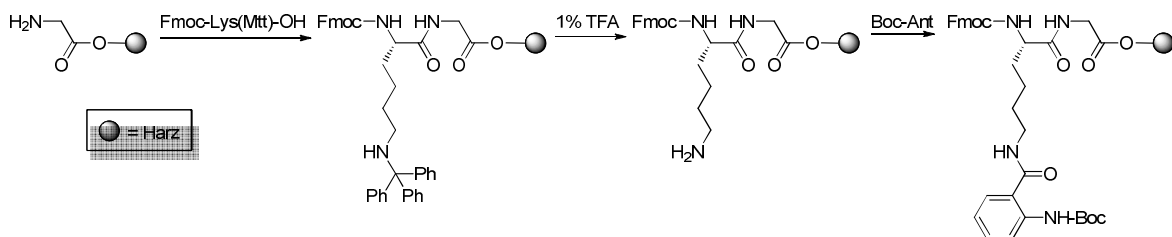


Abbildung 55: Syntheseroute unter Verwendung der Mtt-Schutzgruppe.

Im Anschluss konnte Boc-Anthranilsäure (Boc-Ant) an die freigesetzte ϵ -Aminogruppe des Lysins gekuppelt und dann der Rest des Peptids aufgebaut werden. Nach Abspaltung und Aufarbeitung des Peptids resultierte Fmoc- Y_{N} GFFK $_{\text{Ant}}$ G-OH. Die Struktur wurde mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie MALDI TOF-MS verifiziert. Im ^1H -NMR-Spektrum traten neben den Signalen der GFF Sequenz, unter anderem wieder die zwei charakteristischen Protonen der Anthranilsäure bei 6.48 und 6.67 ppm sowie die sechs Protonen des Lysin-Linkers zwischen 1.27 und 1.77 ppm auf. Das Signal der OH-Gruppe des Tyrosins tritt bei 12.68 ppm auf. Diese charakteristischen Signale sind auch im ^{13}C -Spektrum zu erkennen. Die Reinheit wurde durch HPLC als $\geq 97\%$ bestimmt.

10.4.1.11 Enzymatische Spaltung von $\text{H}_2\text{N-Y}_\text{N}\text{GFFK}_{\text{Ant}}\text{G-OH}$

Um das Konzept der Anbindung des Fluorophors über einen Linker als sinnvoll nachzuweisen, wurde das Peptid einem Spaltungsexperiment mit Trypsin in PBS-Pufferunterzogen (siehe Abbildung 56).

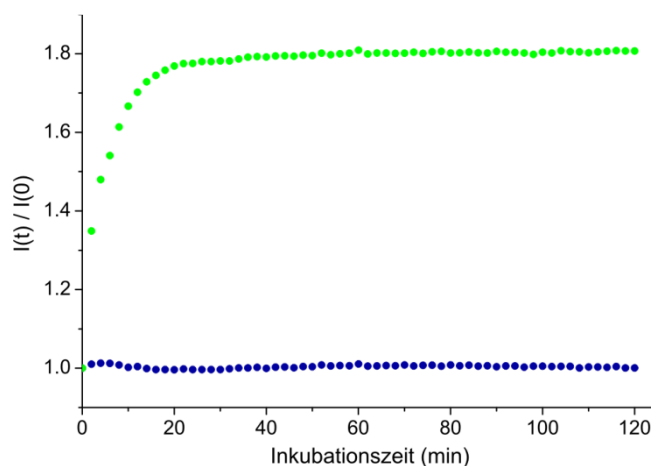


Abbildung 56: Anstieg der relativen Fluoreszenz, bei der Spaltung von $\text{H}_2\text{N-Y}_\text{N}\text{GFFK}_{\text{Ant}}\text{G-OH}$ durch Trypsin (Messung durch Niklas Kotman).

Man erkennt, dass die relative Fluoreszenzintensität nach 40 min ihr Maximum erreicht hat. Im Vergleich zur Anthranilsäure, die nicht über den Lysin-Linker gebunden wurde (siehe Abbildung 51), fällt auf, dass die Spaltung wesentlich schneller abläuft. Aus dem Ergebnis lässt sich schließen, dass durch die Entkopplung des Fluorophors vom Peptidrückgrat eine bessere Zugänglichkeit der Erkennungssequenz gegeben war. Daher wurde der Lysin-Linker auch in den weiteren Synthesen eingesetzt.

Obwohl die Spaltung von $\text{H}_2\text{N-Y}_\text{N}\text{GFFK}_{\text{Ant}}\text{G-OH}$ erfolgreich und die dadurch erreichte Fluoreszenzzunahme akzeptabel war, bestand im Hinblick auf den weiteren Einsatz des Peptids für den Aufbau von Partikeln ein Problem in der Chemoselektivität. Da in der Sequenz, selbst bei Fmoc-Schützung des Peptid N-Terminus, die freie Aminogruppe der Anthranilsäure vorhanden war, wäre die anschließende Kupplung an das Polymer nicht selektiv. Die Konsequenz wäre eine unkontrollierte Oligomerbildung. Aus diesem Grund musste die Aminogruppe der Anthranilsäure, unter Erhalt der Fluoreszenz, mit einer Schutzgruppe versehen werden.

10.4.1.12 *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Methylantraniloyl-L-lysin (K_{Mant})

Eine Möglichkeit bestand in der einfachen Methylierung der Aminogruppe, wobei das Produkt *N*-Methylantranilsäure (Mant) resultierte (siehe Abbildung 57).

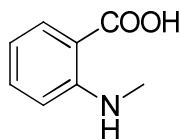


Abbildung 57: Struktur von *N*-Methylantranilsäure (Mant).

N- α -Fmoc-*N*- ϵ -Methylantraniloyl-L-lysin (K_{Mant}) wurde über eine selektive Reaktion des ϵ -Amins von *N*- α -Fmoc-L-Lysin mit dem entsprechenden Anhydrid dargestellt. Dazu wurde die Carboxylgruppe der *N*-Methylantranilsäure durch Überführung in *N*-Methylisatosäureanhydrid²⁵⁴ aktiviert (siehe Abbildung 58). Die Reaktion konnte mit einer Ausbeute von 81% durchgeführt werden.

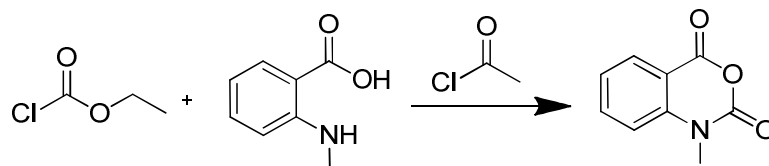


Abbildung 58: Synthese von *N*-Methylisatosäureanhydrid.

Im ¹H-NMR-Spektrum kann der Erfolg der Reaktion deutlich anhand der Abwesenheit des Säureprotons der Anthranilsäure bei 10.07 ppm nachvollzogen werden. Außerdem erkennt man im ¹³C-NMR-Spektrum einen Peak bei 158.91 ppm, der dem Kohlenstoff zwischen dem Stickstoff- und dem Sauerstoffatom des Anhydrids (-N-Me-CO-O-CO-) zugeordnet werden kann. Die Masse des Produkts konnte mittels MALDI TOF-MS verifiziert werden. Die anschließende Umsetzung mit *N*- α -Fmoc-L-Lysin war zwar erfolgreich, das Produkt konnte jedoch trotz mehrerer Versuche nicht von den Nebenprodukten getrennt werden. Bei der säulenchromatographischen Aufreinigung lagen die Retentionszeiten von Edukt und Produkt so nahe zusammen, dass eine Trennung unmöglich war. Dies konnte auch durch verschiedenste Lösemittelgemische nicht verbessert werden.

Aus diesem Grund wurde ein alternativer Weg, über die Überführung der *N*-Methylantranilsäure in einen Aktivester und anschließender Umsetzung mit *N*- α -Fmoc-L-Lysin, gewählt. Die Synthese des benötigten Bausteins (K_{Mant}) konnte schließlich unter Einsatz von COMU erfolgreich durchgeführt werden (siehe Abbildung 59).

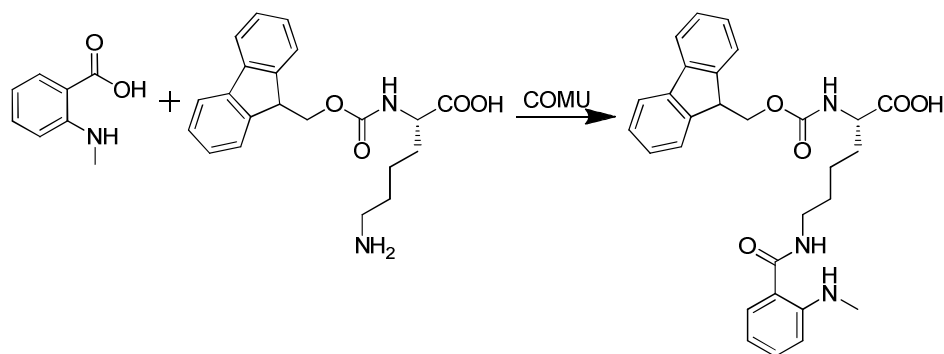


Abbildung 59: Synthese von *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Methylanthraniloyl-L-lysin.

Durch die Verwendung von COMU konnte das Produkt sehr einfach durch wässrige Extraktion gereinigt und in guter Ausbeute von 72% erhalten werden. In den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von Edukt und Produkt kann die erfolgreiche Anbindung über die Abwesenheit des Säurepeaks der *N*-Methylanthranilsäure bei 10.07 ppm sowie der Tieffeldverschiebung der Signale der Protonen, die der ϵ -Aminogruppe benachbart sind, von 2.75 auf 3.20 ppm nachgewiesen werden. Die entsprechenden Veränderungen konnten auch in den ^{13}C -Spektren nachvollzogen werden.

Die äquimolare Zugabe des Kupplungsreagenzes, der halbständige Reaktionsvorlauf vor Zugabe von *N*- α -Fmoc-L-Lysin sowie eine große Verdünnung des Reaktionsansatzes verhinderten eine Aktivierung der Säuregruppe des Lysins. Dadurch wurden nur vernachlässigbar kleine Mengen an Lysin-Di- und Trimeren gebildet, was durch MALDI TOF-MS und NMR-Spektroskopie bestätigt werden konnte.

10.4.1.13 K_{Mant} und 3-Nitro-L-Tyrosin (Y_N) - Fmoc- Y_N GFFK $_{\text{Mant}}$ G-OH

Mit diesem Baustein K_{Mant} war die Synthese von Fmoc- Y_N GFFK $_{\text{Mant}}$ G-OH mittels SPPS möglich, wobei durch die HPLC ersichtlich wurde, dass ein Produktgemisch resultierte. Ein möglicher Grund lag in den zu geringen Temperaturen bei der Peptidsynthese. Analytische Mengen wurden mittels HPLC aufgetrennt und durch ^1H -, und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie MALDI TOF-MS analysiert. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum traten die charakteristischen Signale der Lysin-gebundenen *N*-Methylanthranilsäure bei 2.73 (-NH- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$) und zwischen 1.30 und 1.79 ppm (Lys: - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -NHR) auf. Auch im ^{13}C -NMR-Spektrum sind die Signale bei 29.32(-NH- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 22.72, 28.88, 31.98 und 37.57 ppm (Lys: - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -NHR) erkennbar. Es wurde eine neue Synthese mit angepassten Parametern durchgeführt, wobei simultan ein weiterer synthetischer Aspekt eingebracht wurde.

10.4.1.14 K_{Mant} und 3-Nitro-L-Tyrosin (Y_N) - H_2 ^{15}N -GY $_{\text{N}}$ GFFK $_{\text{Mant}}$ G-OH

Im weiteren Verlauf der Synthese soll das Peptid-Polymer-Konjugat nach erfolgter Entschützung der Aminogruppe an das carboxylfunktionalisierte Polymer gebunden werden, um somit Partikel aus vernetztem Polymer zu erhalten. Aus diesem Grund wäre es wünschenswert, eine Detektions- und Quantifizierungsmöglichkeit für die Vernetzung zu besitzen. Da ein unlösliches Produkt resultiert, (siehe 10.3.3) ist die Anwendung der Lösung-NMR-Spektroskopie nicht möglich, weshalb die

Festkörper-NMR-Spektroskopie eingesetzt werden muss. Die Möglichkeit, isotopenmarkierte Aminosäuren kommerziell zu erwerben, bot die Grundlage für ein geeignetes Detektionslabel. Fmoc-(^{15}N)-Glycin (siehe Abbildung 60) bot sich als in der SPPS einsetzbare Aminosäure an. Sie kann an den N-Terminus eines Peptids gebunden und dann die Reaktion der Aminogruppe mit einer Säure zum Amid, mittels ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektroskopie, nachvollzogen werden.

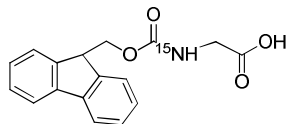


Abbildung 60: Struktur von Fmoc-(^{15}N)-Glycin.

Unter Einsatz von 20% Fmoc-(^{15}N)-Glycin und der FRET-markierten GFF-Sequenz wurde schließlich H_2^{15}N -GY_NGFFK_{Mant}G-OH in geschützter und ungeschützter Form synthetisiert (siehe Abbildung 61).

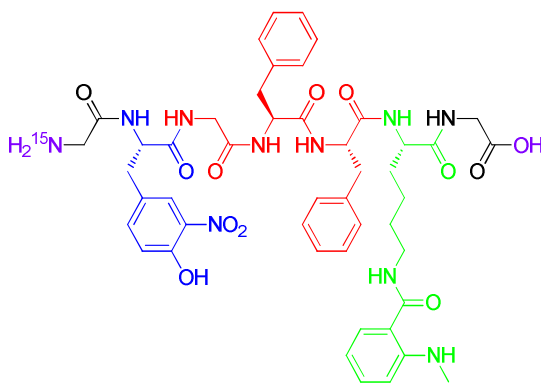


Abbildung 61: Struktur von H_2^{15}N -GY_NGFFK_{Mant}G-OH.

Die Strukturen wurden mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie MALDI TOF-MS verifiziert.

10.4.1.15 Analyse der Reaktionsparameter der Synthese von H_2^{15}N -GY_NGFFK_{Mant}G-OH

Eine detaillierte Erklärung der Einflüsse der Reaktionsparameter erfolgte in Abschnitt 10.3.1.1. Ein Überblick über alle Ansätze für die Synthese des Peptids kann in Tabelle 9 gefunden werden.

Tabelle 9: Peptidansatz, Ausbeute [%] und Peptidreinheit [%] korreliert mit den Syntheseparametern Ansatzgröße [mmol], Maximaltemperatur ($T_{\text{Max.}}$), Anzahl der Reaktionstemperaturen unter 80°C ($n < 80^\circ\text{C}$) sowie die Anzahl der Reaktionsschritte im optimalen Bereich zwischen 75°C und 80°C ($n_{\text{Opt.}}$) im Vergleich zur Gesamtzahl an Reaktionsschritten ($n_{\text{Ges.}}$) der Peptide AntRQLRVGGY_NG-OH und Fmoc-AntRQLRVGGY_NG-OH.

Ansatz	Ausbeute [%]	Ansatzgröße [mmol]	$T_{\text{Max.}}$ [$^\circ\text{C}$]	$n < 80^\circ\text{C} / n_{\text{Ges.}}$	Reinheit [%]	$n_{\text{Opt.}} / n_{\text{Ges.}}$
1 Fmoc-	38	0.1	84	11/12	50	4/12
2 Fmoc-	60	0.1	82	11/12	20	0/12
3 H_2N -	65	0.5	80	13/13	55	4/13
4 Fmoc-	65	0.1	79	12/12	60	5/12
5 H_2N -	67	0.1	79	13/13	65	10/13
6 Fmoc-	72	0.5	80	12/12	55	3/12

Aus Tabelle 9 wird ersichtlich, dass die niedrige Ausbeute von Ansatz 1 durch die Maximaltemperatur von 84°C bedingt wurde. Die Reinheit der Ansätze 2 bis 6 ist sehr ähnlich, da 80°C nicht überschritten wurde. Die Reinheit ist bei den Ansätzen am höchsten, bei denen sich die Reaktionstemperatur am häufigsten im optimalen Bereich bewegte. Trotz Anpassung der Reaktionstemperaturen (Ansatz 5) trat hier ebenfalls ein Produktgemisch auf. Somit bestätigte sich die Vermutung nicht, dass die Bildung des Gemischs auf zu geringe Temperaturen während der Reaktion zurückzuführen ist. Die Methylgruppe war nicht dafür geeignet, die Aminogruppe effektiv zu schützen. Eine aktivierte Säuregruppe ist offensichtlich in der Lage, die Methyl-geschützte Aminogruppe anzugreifen und in ein tertiäres Amin umzuwandeln.

Da für die Synthese des Peptids mehrere Schritte mit aktivierten Aminosäuren notwendig sind, ist ein breites Spektrum an möglichen Nebenreaktionen denkbar. Dabei ist zwar in allen Nebenprodukten die nötige Struktur vorhanden, das Peptid wird aber an der Aminogruppe des Fluorophors unkontrolliert verlängert. Wahrscheinlich konnte ein Teil der entstandenen Nebenprodukte bei der Aufreinigung der Peptide entfernt werden, das Peptid wurde aber trotzdem nicht rein erhalten (Reinheit ~ 65%).

Es wurde trotzdem entschieden, das Produktgemisch weiter zu verwenden, um die Eignung der ^{15}N -Markierung zu zeigen. Das Fluorophor muss zwar für eine definierte Synthese ausgetauscht werden, die Zielstruktur war aber dennoch als Hauptprodukt enthalten. Außerdem bestanden die Nebenprodukte wahrscheinlich „nur“ aus der Zielstruktur, die am Fluorophor unkontrolliert verlängert wurde.

10.4.1.16 Enzymatische Spaltung von $\text{H}_2^{15}\text{N-GY}_\text{N}\text{GFFK}_{\text{Mant}}\text{G-OH}$

Trotz der synthetischen Probleme mit *N*-Methylantranilsäure konnte eine Detektion der enzymatischen Spaltung durch Trypsin in PBS-Puffer erfolgen (siehe Abbildung 62), weshalb das Produktgemisch auch für weitere Experimente, zur Überprüfung der ^{15}N -Markierung, eingesetzt werden konnte.

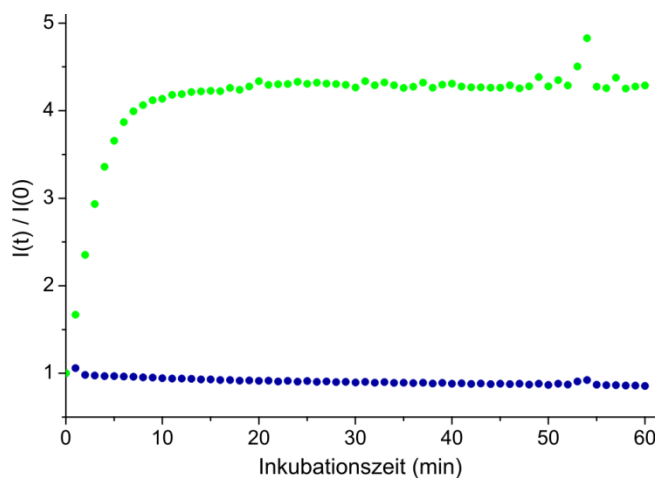


Abbildung 62: Anstieg der relativen Fluoreszenz bei der Spaltung von $\text{H}_2^{15}\text{N-GY}_\text{N}\text{GFFK}_{\text{Mant}}\text{G-OH}$ durch Trypsin (Messung durch Niklas Kotman).

Man erkennt, dass nach 10 min eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität um mehr als das Vierfache auftritt. Mit diesem System war folglich, trotz der aufgeführten Probleme, eine Detektion der enzymatischen Spaltung möglich. Außerdem konnte gezeigt werden, dass trotz der Methylschutzgruppe, die Fluoreszenzeigenschaften der Anthranilsäure weiterhin für die Detektion der enzymatischen Spaltung eingesetzt werden konnten.

10.4.1.17 K_{Mant} und 3-Nitro-L-Tyrosin (Y_N) - $H_2^{15}N$ - GK_{Mant} RQLRVVGGY $_N$ G-OH

Es wurden erneut Experimente mit dem Hepsin-spaltbaren Peptid durchgeführt, um zu zeigen, dass auch diese Sequenz, trotz des Einsatzes von K_{Mant} , vom Zielenzym gespalten werden kann. Um die Anzahl der möglichen Nebenreaktionen der *N*-Methylantranilsäure zu minimieren, wurde die Position des Donors mit der des Akzeptors getauscht. Da Mant nun an zweitletzter Stelle im Peptid eingesetzt wird, können nur noch Nebenreaktionen mit einer weiteren Aminosäure erfolgen, die anschließend gekuppelt wird. Aus diesem Grunde folgte die Synthese der Sequenz $H_2^{15}N$ - GK_{Mant} RQLRVVGGY $_N$ G-OH mit der entsprechend umgekehrten Anordnung des FRET-Paars (siehe Abbildung 63).

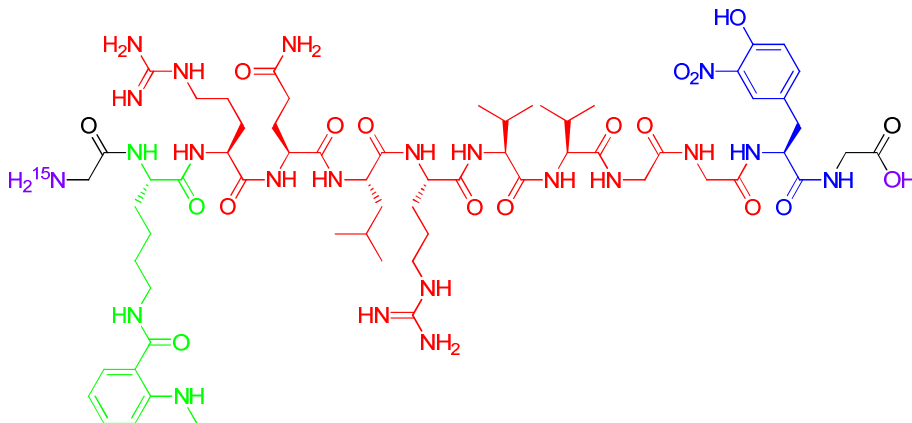


Abbildung 63: Struktur von $H_2^{15}N$ - GK_{Mant} RQLRVVGGY $_N$ G-OH.

Die Struktur wurde mittels 1H -, und ^{13}C -NMR-SpektroskopiesowieMALDI TOF-MS verifiziert. Im 1H -NMR-Spektrum erkennt man erneut die charakteristischen Gruppen einzelner Aminosäuren der Erkennungssequenz (siehe 10.4.1). Die Signale von Leucin (L: $-CH_3$) und Valin (V: $-CH_3$) treten zwischen 0.73 und 0.90 ppm auf, die des Lysin-Linkers (K: $-CH_2$ -) befinden sich zwischen 1.23 und 1.75 ppm. Die Protonen des Rückgrats von Leucin, Valin, Arginin und Glutamin ($-CRH-$) befinden sich zwischen 4.11 und 4.37 ppm, das von 3-Nitro-L-Tyrosin ($-CRH-$) bei 4.53 ppm. Außerdem fallen noch zwei Protonen der Anthranilsäure zwischen 6.52 und 6.64 ppm sowie deren Methylgruppe ($-NH-CH_3$) bei 2.75 ppm auf. Im ^{13}C -NMR-Spektrum treten ebenfalls alle Signale des Peptids auf.

10.4.1.18 Analyse der Reaktionsparameter der Synthese von $\text{H}_2^{15}\text{N-GK}_{\text{Mant}}\text{RQLRVVGGY}_\text{N}\text{G-OH}$

Eine detaillierte Erklärung der Einflüsse der Reaktionsparameter erfolgte in Abschnitt 10.3.1.1. Ein Überblick über alle Ansätze für die Synthese des Peptids kann in Tabelle 10 gefunden werden.

Tabelle 10: Peptidansatz, Ausbeute [%] und Peptidreinheit [%] korreliert mit den Syntheseparametern Ansatzgröße [mmol], Maximaltemperatur (T_{Max}), Anzahl der Reaktionstemperaturen unter 80°C ($n < 80^\circ\text{C}$) sowie die Anzahl der Reaktionsschritte im optimalen Bereich zwischen 75°C und 80°C ($n_{\text{Opt.}}$) im Vergleich zur Gesamtzahl an Reaktionsschritten ($n_{\text{Ges.}}$) der Peptide $\text{H}_2^{15}\text{N-GK}_{\text{Mant}}\text{RQLRVVGGY}_\text{N}\text{G-OH}$ und $\text{Fmoc-(}^{15}\text{N)GK}_{\text{Mant}}\text{RQLRVVGGY}_\text{N}\text{G-OH}$.

Ansatz	Ausbeute [%]	Ansatzgröße [mmol]	T_{Max} [$^\circ\text{C}$]	$n < 80^\circ\text{C} / n_{\text{Ges.}}$	Reinheit [%]	$n_{\text{Opt.}} / n_{\text{Ges.}}$
1 Fmoc-	55	0.1	81	18/22	44	3/22
2 $\text{H}_2\text{N-}$	68	0.1	81	20/23	70	17/23
3 Fmoc-	77	0.5	81	21/22	56	12/22

Aus Tabelle 10 wird ersichtlich, dass die Reinheit von Ansatz 1 zu 3 zunimmt, da hier immer seltener 80°C überschritten wurde. Die Reinheit ist bei dem Peptid am höchsten, bei dem sich die Reaktionstemperatur am häufigsten im optimalen Bereich bewegte. Die Reinheit wurde durch HPLC bestimmt und konnte durch Anpassung der Reaktionstemperaturen auf $\geq 70\%$ gesteigert werden. Die Vermutung wurde bestätigt, dass die Bildung von Nebenprodukten auf die *N*-Methylantranilsäure zurückzuführen ist, da hier aufgrund der Positionierung des Fluorophors am *N*-Terminus des Peptids ein geringerer Teil an Nebenprodukten gebildet wurde.

10.4.1.19 *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Anthraniloyl-L-lysin ($\text{K}_{\text{Ac-Ant}}$)

Da der Schutz der Aminogruppe der Anthranilsäure durch Methylierung nicht erfolgreich war, wurde nach alternativen Schutzgruppen gesucht. Eine vollständige Methylierung des Amins war nicht möglich, da das Produkt *N,N'*-Dimethylantranilsäure laut Literatur keine Fluoreszenz aufweist.²⁵⁵ Daher wurde die Acetylgruppe als mögliche alternative Schutzgruppe gewählt, die in der Peptidchemie häufig zum sogenannten „Capping“ eingesetzt wird.³⁶ Als „Capping“ wird der Schutz eventuell auftretender Abbruchsequenzen in der Peptidsynthese, beim Einsatz ineffektiver Kupplungsreagenzien, durch Acetylierung verstanden. Daher ist die Acetylgruppe sicherlich eine effektive Methode, um Aminogruppen zu schützen. *N*-Acetylantranilsäure ist nur unter strengen Auflagen käuflich zu erwerben, da es sich um einen Stoff der Kategorie I nach dem Grundstoffüberwachungsgesetz handelt. Aus diesem Grund wurde auf die direkte Synthese von *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Acetylantraniloyl-L-lysin verzichtet und eine alternative Syntheseroute entwickelt (siehe Abbildung 64).

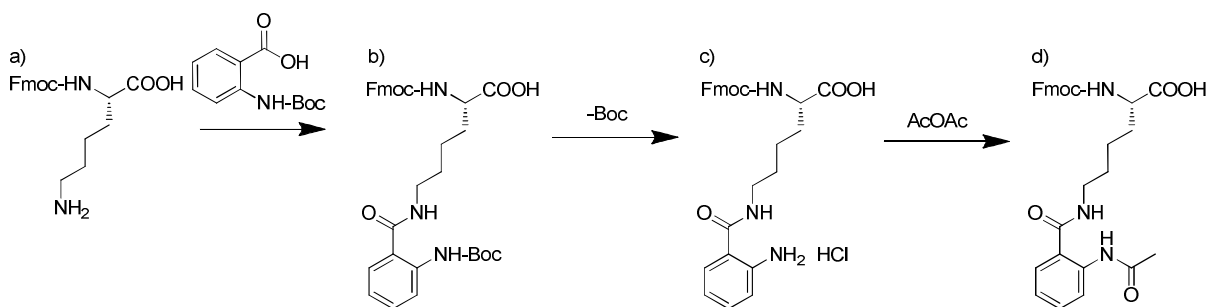


Abbildung 64: Syntheseroute für die Darstellung von *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Acetylanthraniloyl-L-lysin.

N- α -Fmoc-*N*- ϵ -(Boc-Anthraniloyl)-L-lysin wurde erfolgreich über den gleichen synthetischen Ansatz dargestellt wie *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Methylanthraniloyl-L-lysin (siehe 10.4.1). Zur Kupplung von *N*- α -Fmoc-L-Lysin und *N*-Boc-Anthranilsäure dienen COMU und DIEA (siehe Abbildung 64b).

Ein negativer Ninhydrintest deutete eine quantitative Kupplung an. Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 98% dargestellt und mittels MALDI TOF-MS, ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie analysiert werden. Die erfolgreiche Anbindung der Boc-geschützten Anthranilsäure kann in den ^1H -NMR-Spektren des Edukts und des Produkts über die Abwesenheit des Säurepeaks der Anthranilsäure bei 10.07 ppm sowie der Tieffeldverschiebung der zur gebildeten Amidbindung benachbarten CH_2 -Gruppe von 2.75 auf 3.25 ppm nachvollzogen werden. Außerdem treten im ^1H -NMR-Spektrum wieder die charakteristischen Signale auf. Diese sind unter anderem die Signale der Protonen der Boc-Schutzgruppe bei 1.46 ppm ($-\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), die geschützte Aminogruppe der Anthranilsäure bei 10.72 ppm ($-\text{NH}-\text{Boc}$) und die Signale der Protonen der Seitengruppe des Lysins zwischen 1.29 und 1.80 ppm ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$). Dies bestätigte auch das ^{13}C -NMR-Spektrum, worin die äquivalenten Signale ebenfalls auftreten.

Im nächsten Schritt wurde die Boc-Schutzgruppe sauer entfernt, und das Produkt *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Anthraniloyl-L-lysin-Hydrochlorid konnte in einer Ausbeute von 98% erhalten werden (siehe Abbildung 64c).

Neben der Analyse des Produkts mittels MALDI TOF-MS konnte im ^1H -NMR-Spektrum die Abwesenheit der Protonensignale der Boc-Gruppe bei 1.46 ppm ($-\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$) nachgewiesen werden. Die entsprechenden Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum bei 28.47 ppm ($-\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 80.04 ($-\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$) und 168.54 ppm ($-\underline{\text{C}}\text{OOC}(\text{CH}_3)_3$) sind ebenfalls nicht mehr vorhanden.

Das so freigesetzte Amin wurde durch Essigsäureanhydrid acetyliert (siehe Abbildung 64d). *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Acetylanthraniloyl-L-lysin konnte somit in einer Dreistufensynthese mit einer Gesamtausbeute von 60% synthetisiert und das Molekulargewicht mittels MALDI TOF-MS bestätigt werden. Im den ^1H -NMR-Spektren von Edukt und Produkt ist eine Verschiebung des Amin-Signals von 6.69 ppm auf 11.23 ppm sowie das Auftreten der drei Acetylprotonen ($-\text{CO}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$) bei 2.07 ppm zu erkennen. Im ^{13}C -NMR-Spektrum treten ebenfalls die Signale der Acetylgruppe bei 24.85 ($-\text{CO}\underline{\text{C}}\text{H}_3$) und 168.18 ppm ($-\underline{\text{C}}\text{OCH}_3$) auf, außerdem ist das Kohlenstoffsignal, das dem Amid benachbart ist, von 134.8 nach 138.9 ppm ins Tieffeld verschoben.

Bei der anschließenden Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften des Produkts war jedoch nur eine sehr geringe Fluoreszenzintensität nachzuweisen. Somit konnte die effektiv geschützte Lysin-gebundene Anthranilsäure nicht als FRET-Donor eingesetzt werden. Offensichtlich besteht ein Zusammenhang zwischen Eignung als Fluorophor und dem effektiven Schutz des Amins. Für den effektiven Schutz des Amins ist eine Erniedrigung der Nukleophilie des freien Elektronenpaars am Stickstoff über eine elektronenziehende Gruppe notwendig (-NH-Ac bzw. -NH-Boc). Dieses Elektronenpaar scheint jedoch einen entscheidenden Beitrag zur Fluoreszenz des Systems zu leisten. Es wurde folglich entschieden, die Synthese dieser Generation mit K_{Mant} als Fluorophor abzuschließen, um die Eignung der ^{15}N -Markierung zu zeigen.

10.4.2 Synthese der Peptid-Polymer-Konjugate

10.4.2.1 Kupplung von Peptid und Polymer

Für die Anbindung des Peptids an das Polymer konnte eine deutlich schnellere Synthese durch den Einsatz vom COMU erreicht werden (siehe 2.11). Der Vorteil dieses Kupplungsreagenzes liegt nebender schnellen Umsetzung der Komponenteninnerhalb von drei bis vier Stunden in der Möglichkeit, dessen Nebenprodukte durch wässrige Extraktion zu entfernen. Im Rahmen der Anpassung der Syntheseparameter wurde DIEA durch TMP ersetzt. Dadurch ist, je nach Edukt, eine visuelle Endpunktbestimmung der Reaktion durch eine deutliche Farbänderung möglich.

Die Anbindung von Fmoc- $(^{15}\text{N})\text{GY}_\text{N}\text{GFFK}_{\text{Mant}}\text{G-OH}$ an Poly[styrol-*co*-*N*-(2-aminoethyl)acrylamid]-Hydrochlorid ($P_{\text{A}7-104}$) konnte durch den Einsatz von COMU und TMP erfolgreich mit einer Ausbeute von 83% durchgeführt werden (siehe Abbildung 65).

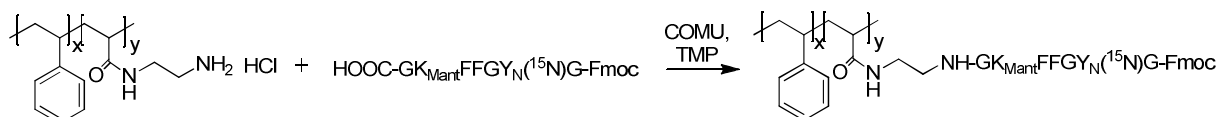


Abbildung 65: Reaktionsschema für die Synthese von (PS-*co*-PAA)- $\text{C}_2\text{H}_4\text{-NH-GK}_{\text{Mant}}\text{FFGY}_\text{N}(^{15}\text{N})\text{G-Fmoc}$.

Die Durchführung des Ninhydrintests zeigte ein negatives Ergebnis, was auf die Abwesenheit von freien Aminogruppen hindeutete und somit ein Hinweis auf eine vollständige Umsetzung war. Das erhaltene Produkt (PS-*co*-PAA)- $\text{C}_2\text{H}_4\text{-NH-GK}_{\text{Mant}}\text{FFGY}_\text{N}(^{15}\text{N})\text{G-Fmoc}$ wurde mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie untersucht.

Die Signale des ^1H -Spektrums zeigten eine deutliche Verbreiterung der Signale des Peptids, was erneut auf eine erfolgreiche Reaktion hindeutet. Die Ammoniumprotonen des Polymers bei 8.13 ppm wurden ins Hochfeld verschoben und liegen unter dem breiten Aromatensignal des Styrols (6.17 - 7.50 ppm). Die Säureprotonen des Peptids bei 12.64 ppm treten ebenfalls nicht mehr auf. Charakteristische Signale des Peptids sind z.B. zwischen 4.44 - 4.67 ppm (Phe: -NH- $\underline{\text{C}}\text{H}$ Phe-CO-), bei 2.73 ppm (Mant: -NH- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), bei 7.87 ppm (Y_N : Aromat) oder zwischen 4.06 - 4.35 ppm (Fmoc: -NH-CO-O- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}$ R) zu erkennen. Die erfolgreiche Anbindung kann auch im ^{13}C -Spektrum nachvollzogen werden.

Da bei dem Peptid ein Produktgemisch vorlag, wurde auf eine intensive Untersuchung mittels DOSY-NMR und HPLC verzichtet und der Fokus in dieser Versuchsreihe auf die Funktion des ^{15}N -Labels gelegt.

Der Versuch einer Anbindung von Fmoc- $(^{15}\text{N})\text{GK}_{\text{Mant}}\text{RQLRVVGGY}_\text{N}\text{G-OH}$ unter identischen Bedingungen an Poly[styrol-*co*-*N*-(2-aminoethyl)acrylamid] ($\text{P}_{\text{A}7-104}$) führt zu einem undefinierbaren Produkt. Mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie war es nicht möglich, das gewünschte Produkt zu detektieren. Zum einen traten nicht alle erwarteten Signale des Peptids auf, zum anderen wurden nicht die erwarteten Integralverhältnisse erhalten. Es lag die Vermutung nahe, dass die Hepsin-spaltbare Sequenz aufgrund der vielen funktionellen Gruppen (z.B. Arginin, Glutamin) nicht selektiv reagiert und es zu unkontrollierten Nebenreaktionen der Säure-, Amino-, Guanidin- und Amidgruppen der Peptidseitenketten kommt.

10.4.2.2 Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe

Als nächster synthetischer Schritt musste die Fmoc-Schutzgruppe des Konjugats entfernt werden, um die Aminogruppe zugänglich zu machen. Dies geschah über den bereits erfolgreich angewendeten und optimierten Einsatz von Tris(2-aminoethyl)amin. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 66 gezeigt.

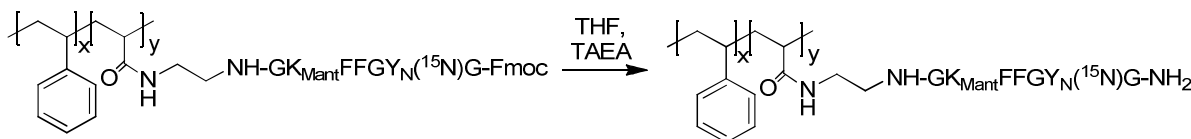


Abbildung 66: Reaktionsschema für die Synthese von $(\text{PS-}co\text{-PAA})\text{-C}_2\text{H}_4\text{-NH-GK}_{\text{Mant}}\text{FFGY}_\text{N}\text{G-}^{15}\text{NH}_2$.

Durch eine Analyse des Produkts $(\text{PS-}co\text{-PAA})\text{-C}_2\text{H}_4\text{-NH-GK}_{\text{Mant}}\text{FFGY}_\text{N}\text{G-}^{15}\text{NH}_2$ mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie konnte die Struktur verifiziert werden. Die quantitative Reaktion ist über die Abwesenheit der Signale der Fmoc-Schutzgruppe zu sehen. Im ^1H -NMR-Spektrum treten die Signale von jeweils zwei Protonen bei 7.78, 7.70, 7.41, 7.31 (aromatische Fmoc-Protonen) und von drei Protonen zwischen 4.06 - 4.35 ppm (Fmoc: $-\text{NH-CO-O-CH}_2\text{-CHR}$) nicht mehr auf. Im ^{13}C -NMR-Spektrum sind die entsprechenden Signale der Fmoc-Gruppe bei 156.84, 143.64, 139.50, 129.03, 127.40, 121.51, 120.15, 65.98 und 46.64 ppm nicht mehr zu sehen.

10.4.2.3 Bestimmung des Peptidgehalts im Konjugat

Der Peptidgehalt im Konjugat wurde bestimmt, um die Anzahl an freien Aminogruppen zu quantifizieren. Im nächsten Syntheseschritt, der Partikelbildung, ist diese Information essentiell, um die nötigen Reagenzienmengen zu berechnen. Dazu wurde erneut die quantitative ^1H -NMR-Spektroskopie eingesetzt (siehe 10.3.2.4).

Durch diese Methode konnte der Peptidgehalt als 39.5% bestimmt werden. Vergleicht man diesen Wert mit dem entsprechenden Peptidgehalt des Peptid-Polymer-Konjugats der 1. Generation (25.5%, siehe 10.3.2.4), sieht man eine deutliche Zunahme. Da in beiden Synthesen mit den Polymeren

P_{A7-166} und P_{A7-104} ein ähnlicher Funktionalisierungsgrad eingesetzt wurde, lässt sich diese Änderung auf das höhere Molekulargewicht des Peptids $H_2^{15}N\text{-GY}_N\text{GFFK}_{\text{Mant}}\text{G-OH}$ ($M = 954.99 \text{ g/mol}$) im Gegensatz zu $H_2\text{N-GFF-OH}$ ($M = 396.41 \text{ g/mol}$) zurückführen. Der theoretische Wert wurde, ausgehend von einer quantitativen Umsetzung von P_{S7-104} , als 52.3% berechnet. Daraus wird ersichtlich, dass trotz der längeren Sequenz an etwa 76% der Aminogruppen eine Peptidsequenz gebunden werden konnte. Da dieser Wert dem Kupplungsgrad der 1. Generation entspricht (siehe 10.3.2.4) kann man daraus schließen, dass die Peptidlänge keinen Einfluss auf die Anbindungseffizienz hat.

10.4.3 Synthese der Nanopartikel

Um den Erfolg der ^{15}N -Markierung zu bestätigen, wurde die Nanopartikelbildung durch Vernetzung der Polymere erreicht. Wie für die Nanopartikel der 1. Generation wurde DMF aufgrund der idealen Lösungseigenschaften als hydrophile disperse Phase eingesetzt, als kontinuierliche Phase diente Isooctan. Statt HBTU und HOBT-H₂O wurde für die Synthese der Nanopartikel das Kupplungsreagenz COMU verwendet, wodurch es möglich war, alle Lösemittel und Reagenzien nach der Reaktion durch Dialyse zu entfernen. Die Base DIEA wurde nicht durch TMP ersetzt, da die Mischbarkeit von TMP mit Isooctan geringer war als die von DIEA.

10.4.3.1 Reaktion in Homophase

Die genauen Bedingungen der Synthese wurden in einer Einphasenreaktion evaluiert. Dazu wurde das Konjugat $(\text{PS-co-PAA})\text{-C}_2\text{H}_4\text{-NH-GK}_{\text{Mant}}\text{FFGY}_N\text{G-}^{15}\text{NH}_2$ basierend auf P_{A7-104} , Poly(styrol-co-acrylsäure) (P_{S7-104}) und COMU in DMF/NMP gelöst und *N,N*-Diisopropylethylamin (DIEA) zugegeben. Nach 12 h war das Reaktionsgemisch geliert und das Produkt war in organischen Lösemitteln wie THF oder DMF, in denen die Edukte zuvor löslich waren, unlöslich. Dies war ein Hinweis auf eine erfolgreiche Vernetzung.

10.4.3.2 Reaktion in inverser Miniemulsion

Die aus der Einphasenreaktion gewonnenen Erkenntnisse wurden auf den inversen Miniemulsionsprozess übertragen. $(\text{PS-co-PAA})\text{-C}_2\text{H}_4\text{-NH-GK}_{\text{Mant}}\text{FFGY}_N\text{G-}^{15}\text{NH}_2$, basierend auf P_{A7-104} , PS-co-PAS (P_{S7-104}) und COMU, wurden in einem Gemisch aus DMF und *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) gelöst. Nach Zugabe der äußeren Phase und dem Tensid P(B/E-*b*-EO) konnte, nach Vorhomogenisierung und Behandlung mit Ultraschall, eine stabile Emulsion erhalten werden. Die Vernetzungsreaktion, die zur Nanopartikelbildung führte, wurde durch anschließende Zugabe von DIEA initiiert und bei Raumtemperatur durchgeführt (siehe Abbildung 67).

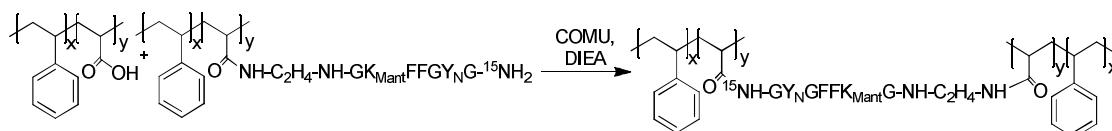


Abbildung 67: Reaktionsschema für die Synthese der $Y_N\text{GFFK}_{\text{Mant}}$ -vernetzten Partikel.

Nachdem multifunktionelle Peptid-Polymer-Konjugate sowie multifunktionelle Polymere eingesetzt wurden, resultierten nach der Reaktion in DMF gequollene Partikel. Um Nanopartikel für enzymatische Spaltungsexperimente zu erhalten, wurde die inverse Miniemulsion in Wasser überführt. Dazu wurde 8.5 mL an wässriger 0.3%iger SDS-Lösung zugegeben und die Emulsion erneut mit Ultraschall behandelt, um eventuell auftretende Aggregate zu trennen. Nach Verdampfen der Isooctanphase und Reinigung der Dispersion durch Dialyse wurde ein Teil der Probe gefriergetrocknet. Nach einer Extraktion der unlöslichen Partikel wurde das Extrakt mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass alle Reagenzien und Lösemittel durch Dialyse entfernt werden konnten. Die erfolgreiche Vernetzung konnte mithilfe der ins Peptid eingebauten ^{15}N -Markierung durch Festkörper-NMR-Spektroskopie gezeigt und quantifiziert werden.

10.4.3.3 Charakterisierung der $Y_N\text{GFFK}_{\text{Mant}}$ -vernetzten Partikel

Durch die Markierung von 20% des N-Terminus der Peptide mit einem ^{15}N -Atom konnte die Reaktion des Amins (Edukt) zum Amid (Produkt) nachvollzogen werden. Da vernetzte Strukturen entstanden, die in Wasser oder in organischen Lösemitteln nicht löslich waren, musste die Festkörper-NMR-Spektroskopie eingesetzt werden, um die ^{15}N -Markierung zu detektieren. Dazu wurden das Spektrum des Produkts (blau), das Spektrum des Edukts (grün) und ein Vergleichsspektrum von Fmoc- (^{15}N) -Glycin (rot) aufgenommen. In Abbildung 68 ist die Überlagerung der drei Spektren zu sehen.

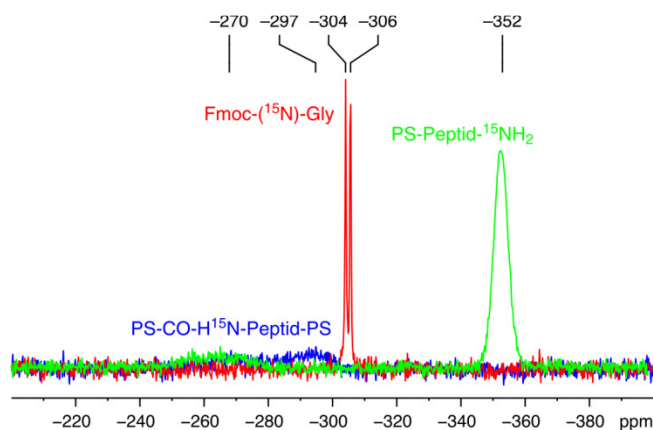


Abbildung 68: ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektren des Edukts $(\text{PS-co-PAA})\text{-C}_2\text{H}_4\text{-NH-GK}_{\text{Mant}}\text{FFGY}_N\text{G-}^{15}\text{NH}_2$ in grün, des Produkt Amids $\text{PS-co-H}^{15}\text{N-Peptid-PS}$ in blau und des Referenzamids Fmoc- (^{15}N) -Gly in rot (30.4 MHz, T = 289.3 K).

Das Spektrum des Edukts $(\text{PS-co-PAA})\text{-C}_2\text{H}_4\text{-NH-GK}_{\text{Mant}}\text{FFGY}_N\text{G-}^{15}\text{NH}_2$ ist in grün dargestellt, wobei ein deutliches Signal bei - 352 ppm auftrat. Es ist der ^{15}N -markierten Aminogruppe am N-Terminus des Peptid-Polymer-Konjugats zuzuordnen. Das schwache Signal bei - 270 ppm kann den unmarkierten Amiden des Peptids zugeschrieben werden. Da das ^{15}N -Label nur zu 20% eingesetzt wurde, werden sie, aufgrund der großen Anzahl an Scans, bei der Messung sichtbar. In rot wurde das Spektrum des Referenzamids Fmoc- (^{15}N) -Glycin dargestellt, um unabhängig vom Edukt festzustellen, in welchem ppm-Bereich Amidsignale auftreten. Es erschienen zwei scharfe Signale bei - 304 und

- 306 ppm. Der Grund für die Existenz zweier Signale liegt wahrscheinlich im Vorhandensein zweier Modifikationen im vorliegenden Pulver. Ein Vergleich mit dem Eduktspektrum zeigt, dass Amidbindungen im Vergleich zu Aminen tieffeldverschoben auftreten. Im Spektrum des Produkts (in blau) treten zwei breite Signale auf, ein Signal bei - 297 ppm sowie ein schwächeres bei - 270 ppm. Bei -352 ppm ist kein Signal zu erkennen. Da die Intensität der Signale aufgrund der geringen Menge des eingesetzten Labels trotz sehr langer Messzeit nicht sehr groß ist, lässt sich hier keine Aussage darüber machen, ob das Edukt vollständig umgesetzt wurde. Der Gehalt an ^{15}N -Label wurde deshalb bei allen weiteren Experimenten von 20% auf 100% erhöht (siehe 10.5.2.2). Aus den Spektren lässt sich dennoch schließen, dass die Umsetzung des Amins zum Amid erfolgreich war und somit die Vernetzung der Partikel stattgefunden hat. Die Durchführung einer HPLC-Untersuchung nach der Extraktion des Produkts stützt den Erfolg der Vernetzung, da kein Produktsignal erhalten wurde.

Das erfolgreich vernetzte Polymer, das vor dem Gefriertrocknen als Partikel in wässriger Lösung vorlag, konnte nun weiter anhand seiner kolloidalen Eigenschaften charakterisiert werden. Der Partikeldurchmesser in Wasser wurde mittels Photonen-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (PCCS) bestimmt. Die Ergebnisse vor und nach der Dialyse sind in Abbildung 69 aufgeführt.

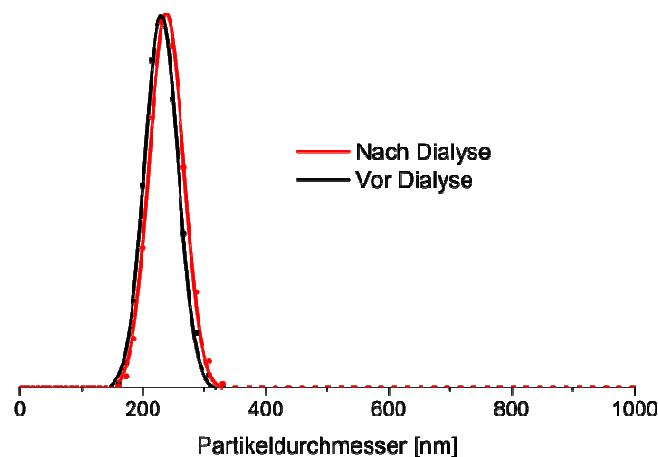


Abbildung 69: Partikeldurchmesser der $\text{Y}_\text{N}\text{GFFK}_{\text{Mant}}$ - vernetzten Partikel vor und nach Dialyse (PCCS, Intensitätsverteilung).

In Abbildung 69 ist die Verteilung der Partikeldurchmesser vor und nach Dialyse gezeigt. Der Mittelwert (X_{50}) befindet sich nach der Dialyse bei 235 nm. Während der Dialyse kam es nur zu einer minimalen Zunahme der Partikelgröße. Die Verteilung der Partikelgrößen wird aus den Signalbreitensichtlich. Die Partikelmorphologie wurde mittels REM untersucht. Ein exemplarisches Bild der Probe ist in Abbildung 70 gezeigt.

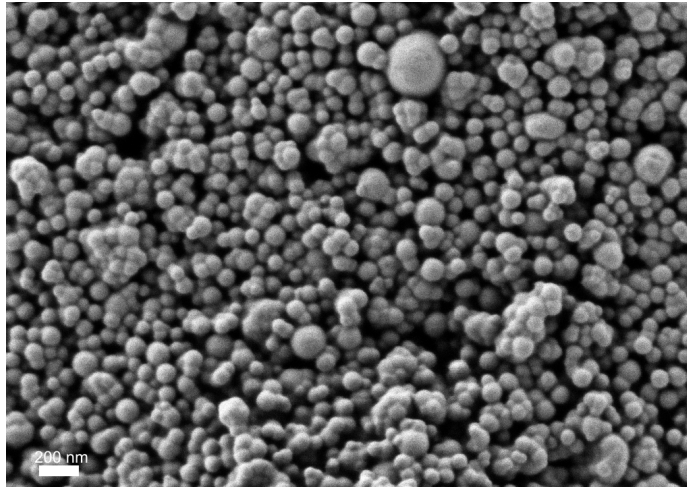


Abbildung 70: REM-Aufnahme der Y_N GFFK_{Mant}-vernetzten Partikel.

Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist zu erkennen, dass runde Partikel mit einer ähnlichen Größe, wie zuvor mittels PCCS bestimmt, vorlagen. Eine grafische Bestimmung von 100 Partikelgrößen anhand der Aufnahme zeigte einen durchschnittlichen Partikeldurchmesser von 140 nm. Der etwas geringere Wert kann dadurch erklärt werden, dass mittels PCCS der hydrodynamische Radius bestimmt wurde, während bei den REM-Bildern die Partikel getrocknet und somit ohne Hydrathülle vorlagen. Außerdem wurde durch die PCCS das Intensitätsmittel und durch die REM das Zahlenmittel bestimmt, was niedriger ist. Das Zetapotential der Dispersion wurde als - 7.04 mV, der Feststoffgehalt als 0.45% und der pH-Wert der Dispersion als 5.5 bestimmt.

10.4.4 Enzymatischer Abbau der Y_N GFFK_{Mant}-vernetzten Nanopartikel

Die hergestellte wässrige Dispersion wurde mit Trypsin-Lösung in PBS-Puffer versetzt. Die enzymatische Aktivität konnte durch einen Anstieg der relativen Fluoreszenz *in situ* verfolgt werden (siehe Abbildung 71).

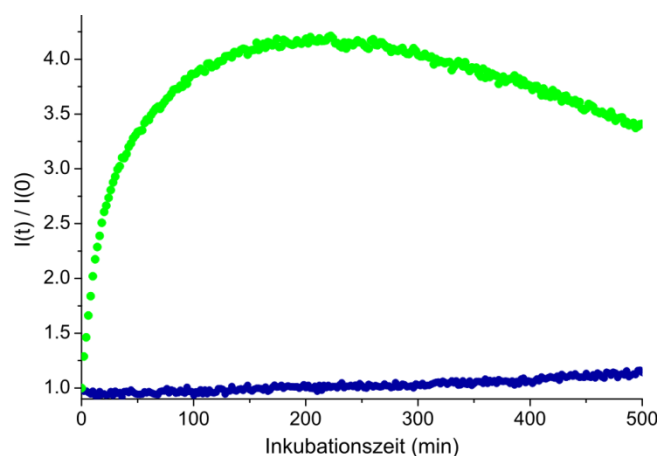


Abbildung 71: Anstieg der relativen Fluoreszenz bei der Spaltung der Y_N GFFK_{Mant}-vernetzten Partikel durch Trypsin (Messung durch Niklas Kotman).

In Abbildung 71 ist der Anstieg der relativen Fluoreszenz bei der Spaltung der Y_N GFFK_{Mant}-vernetzten Partikel dargestellt (grün). Die Negativkontrolle, bei der kein Enzym zugegeben wurde, ist in blau

aufgetragen. Bei der grünen Kurve ist ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten. Nach drei Stunden ist das Maximum der Fluoreszenz erreicht. Danach kommt es zu einem Abfall der Signalintensität. Dies ist wahrscheinlich auf Effekte, wie dem Ausbleichen, der Aggregation oder dem Ausfallen des Fluorophors zurückzuführen. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass ein Nachweis der enzymatischen Spaltung eines Heterophasensubstrats mittels FRET erfolgen kann.

10.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der 2. Generation

Die erfolgreiche Vernetzung des Polymers mit GFF konnte über eine ^{15}N -Markierung nachgewiesen und eine enzymatische Spaltung der Nanopartikel gezeigt werden. Mit COMU wurde ein einfach einzusetzendes Kupplungsreagenz gefunden, bei dem die Nebenprodukte mit einer einfachen wässrigen Extraktion abgetrennt werden konnten. Die Anbindung der Hepsin-spaltbaren Sequenz konnte so nicht erreicht werden.

Um abschließend eine definierte Peptidsynthese zu gewährleisten, muss ein FRET-Paar gefunden werden, das zu keiner Nebenreaktion während der Synthese führt. Außerdem wird die Menge des ^{15}N -Labels auf 100% erhöht, um so ein intensiveres Signal bei der Messung des Vernetzungsgrades zu erhalten. Des Weiteren soll im Folgenden ein weiterer Schritt in Richtung des Projektziels gemacht und ein Farbstoff in das System eingebracht werden.

10.5 Enzymatisch spaltbare Nanopartikel der 3. Generation ($K_{Mca}GFFK_{Dnp}$)

10.5.1 Synthese der Mca-basierten Peptide

10.5.1.1 7-Methoxycoumarin-4-yl-essigsäure (Mca) und 2,4-Dinitrophenyl (Dnp)

Wie während der Peptidsynthese der 2. Generation gezeigt, eignet sich Anthranilsäure nicht als universell einsetzbares Fluorophor in der Peptidsynthese. Es musste nach einem alternativen FRET-Paar gesucht werden, dabei sollte, aus bereits genannten Gründen (siehe 10.4.1), das Fluorophor nicht wesentlich größer sein. Ein geeignetes System wurde in dem Fluorophor 7-Methoxycoumarin-4-yl-essigsäure (Mca) und dessen Quencher 2,4-Dinitrophenyl (Dnp) gefunden (siehe Abbildung 72).¹⁰⁵

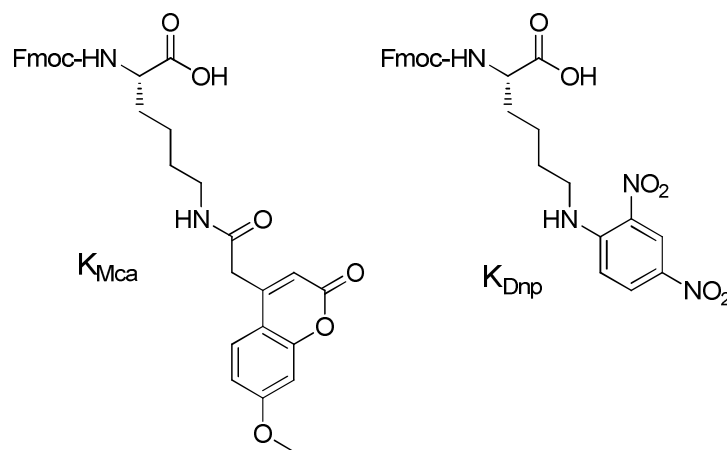


Abbildung 72: Struktur von *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -(7-Methoxycoumarin-4-acetyl)-L-lysine (K_{Mca}) und *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -2,4-Dinitrophenyl-L-lysine (K_{Dnp}).

Neben der Abwesenheit von funktionellen Gruppen, die in der Peptidsynthese zu Nebenreaktionen führen könnten, sind beide Komponenten über den bereits bewährten Linker *N*- α -Fmoc-L-Lysin angehängt. So wird zum einen die Effizienz des Quenchings durch gesteigerte Flexibilität von Donor und Akzeptor erhöht und somit ein deutlicherer Fluoreszenzunterschied zwischen intaktem und gespaltenem Peptid erreicht.²⁵⁶ Zum anderen wird durch den Einsatz der Aminosäure Lysin eine Verwendung in jeder gewünschten Position des Peptids unter Einsatz der automatisierten Festphasenpeptidsynthese möglich.

Bei der Synthese von *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -(7-Methoxycoumarin-4-acetyl)-L-lysine als Baustein für die Peptidsynthese wurde als erste Stufe 7-Methoxycoumarin-4-yl-essigsäure in einer Pechmannreaktion synthetisiert, indem 3-Hydroxyanisol mit Acetondicarbonsäurediethylester in 70%iger Schwefelsäure umgesetzt wurde (siehe Abbildung 73).

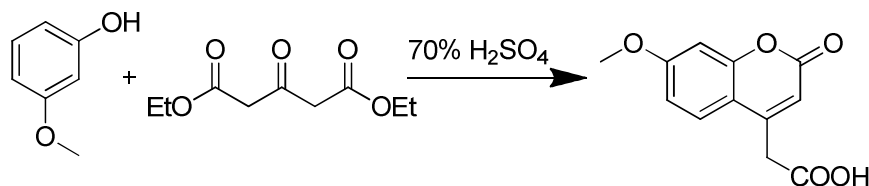


Abbildung 73: Reaktionsschema für die Synthese 7-Methoxycoumarin-4-yl-essigsäure.

Die Synthese konnte erfolgreich mit einer Ausbeute von 60% durchgeführt und die Struktur mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie MALDI TOF-MS verifiziert werden.

Um *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -(7-Methoxycoumarin-4-acetyl)-L-lysin zu erhalten, sollte ein ähnlicher Weg wie bei der Synthese von *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -(Boc-Anthraniloyl)-L-lysin bzw. *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Methyl-anthraniloyl-L-lysin verfolgt werden. Dabei konnte kein Produkt isoliert werden, da die Aufreinigung des Produkts durch wässrige Extraktion an der guten Löslichkeit des Produkts im Basischen scheiterte.

Daher wurde eine alternative Syntheseroute über eine Aktivierung der Säure mittels des isolierbaren Aktivesters Benzotriazols beschriftet. Nach Aktivierung von 7-Methoxycoumarin-4-yl-essigsäure wurde das Produkt isoliert und mit *N*- α -Fmoc-L-Lysin umgesetzt. Bei dieser Synthese konnte nur eine geringe Ausbeute von 5% erreicht werden (siehe 11.4.2).

10.5.1.2 Mca und Dnp -Fmoc-(^{15}N)GK_{Mca}GFFK_{Dnp}G-OH

N- α -Fmoc-*N*- ϵ -(7-Methoxycoumarin-4-acetyl)-L-lysin und *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -2,4-Dinitrophenyl-L-lysin wurde folglich kommerziell erworben, was es ermöglichte, unter Verwendung von 100% Fmoc-(^{15}N)-Glycins das Peptid Fmoc-(^{15}N)GK_{Mca}GFFK_{Dnp}G-OH (siehe Abbildung 74) mit einer Ausbeute von 69% zu synthetisieren.

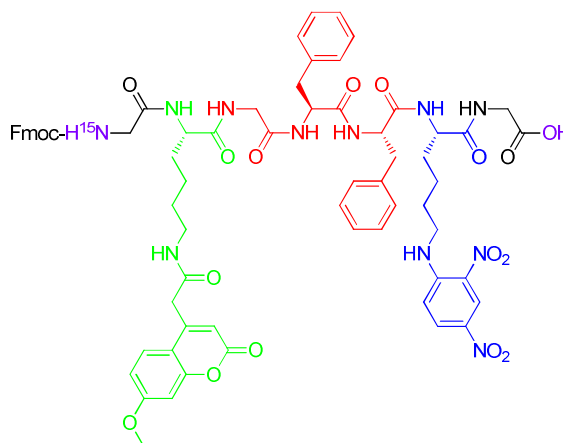


Abbildung 74: Struktur von Fmoc-(^{15}N)GK_{Mca}GFFK_{Dnp}G-OH.

Die Struktur wurde mittels ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie MALDI TOF-MS verifiziert und die Reinheit durch HPLC als $\geq 92\%$ bestimmt. Im ^1H -NMR-Spektrum sieht man deutlich die charakteristischen Signale der einzelnen Aminosäuren. Zum Beispiel tritt das Signal der Protonen der Methoxygruppe von 7-Methoxycoumarin bei 3.83 ppm auf. Ebenfalls deutlich treten die aromatischen Protonensignale von 7-Methoxycoumarin bei 6.22 ppm und zwischen 6.93 und 6.98 ppm auf. Auch die Signale des Peptidrückgrats von Glycin zwischen 3.51 und 3.70 ppm und die Signale von Phenylalanin zwischen 4.44 und 4.58 ppm sind gut zu erkennen. Außerdem fallen die aromatischen Signale der 2,4-Dinitrophenylgruppe zwischen 8.80 und 8.85 ppm auf. Im ^{13}C -NMR-Spektrum ist die erfolgreiche Synthese ebenfalls nachvollziehbar. So tritt zum Beispiel die Methoxygruppe von 7-Methoxycoumarin bei 55.92 ppm auf. Auch alle anderen Signale sind wie erwartet vorhanden.

10.5.1.3 Analyse der Reaktionsparameter der Synthese von Fmoc-(¹⁵N)GK_{Mca}GFFK_{Dnp}G-OH

Eine detaillierte Erklärung der Einflüsse der Reaktionsparameter erfolgte in Abschnitt 10.3.1.1. Ein Überblick über alle Ansätze für die Synthese des Peptids kann in Tabelle 11 gefunden werden.

Tabelle 11: Peptidansatz, Ausbeute [%] und Peptidreinheit [%] korreliert mit den Syntheseparametern Ansatzgröße [mmol], Maximaltemperatur ($T_{Max.}$), Anzahl der Reaktionstemperaturen unter 80 °C ($n < 80$ °C) sowie die Anzahl der Reaktionsschritte im optimalen Bereich zwischen 75 °C und 80 °C ($n_{Opt.}$) im Vergleich zur Gesamtzahl an Reaktionsschritten ($n_{Ges.}$) der Peptide $H_2^{15}N$ -GK_{Mca}GFFK_{Dnp}G-OH und Fmoc-(¹⁵N)GK_{Mca}GFFK_{Dnp}G-OH.

Ansatz	Ausbeute [%]	Ansatzgröße [mmol]	$T_{Max.}$ [°C]	$n < 80$ °C / $n_{Ges.}$	Reinheit [%]	$n_{Opt.} / n_{Ges.}$
1 Fmoc-	44	0.1	80	10/12	92	10/12
2 H ₂ N-	53	0.1	79	12/13	91	8/14
3 Fmoc-	69	1	80	12/12	86	6/12

Aus Tabelle 11 wird ersichtlich, dass die Reinheit von Ansatz 1 bis 3 ansteigt, da hier immer seltener 80 °C überschritten wurde. Die Reinheit ist bei allen drei Ansätzen sehr ähnlich. Die Reinheit wurde durch HPLC bestimmt und konnte durch Anpassung der Reaktionstemperaturen auf $\geq 92\%$ gesteigert werden.

10.5.1.4 Enzymatische Spaltung von $H_2^{15}N$ NGK_{Mca}GFFK_{Dnp}G-OH

Der Einfluss des eingeführten FRET-Paares auf die enzymatische Spaltung des reinen Peptids wurde anschließend getestet. Abbildung 75 zeigt die Spaltung des Mca-basierten Systems im Vergleich zum Anthranilsäure-basierten System, das in der 2. Generation eingesetzt wurde (siehe 10.4.1), wobei beiden Peptide in PBS-Puffer Trypsin zugesetzt wurde.

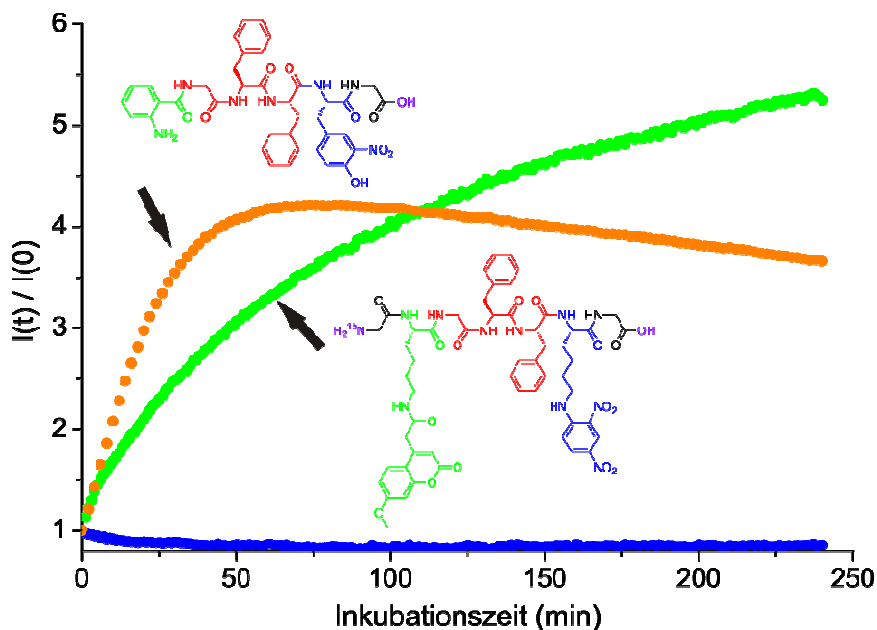


Abbildung 75: Anstieg der relativen Fluoreszenz bei der Spaltung von AntGFFY_NG-OH (orange) und $H_2^{15}N$ -GK_{Mca}GFFK_{Dnp}G-OH (grün) durch Trypsin (Messung durch Niklas Kotman).

Die orange Kurve zeigt den Verlauf der enzymatischen Spaltung von AntGFFY_NG-OH mit einem Maximum der relativen Fluoreszenz bei 4.2 nach 60 min. Die grüne Kurve zeigt den Verlauf der enzymatischen Spaltung von H₂¹⁵N-GK_{Mca}GFFK_{Dnp}G-OH mit einem Maximum der relativen Fluoreszenz von > 5.5, wobei das absolute Maximum in dieser Auftragung nach 250 min noch nicht erreicht ist. Vergleicht man die orange Kurve mit der grünen, sieht man deutlich, dass der Anstieg der relativen Fluoreszenz beim Einsatz des Mca-basierten FRET-Paares (Mca/Dnp) wesentlich höher ist als beim Anthranilsäure-basierten Paar (Ant/Y_N). Ebenfalls deutlich erkennbar ist, dass die Spaltung von AntGFFY_NG-OH etwas schneller stattfindet als die Spaltung von H₂¹⁵N-GK_{Mca}GFFK_{Dnp}G-OH. Offensichtlich wird die freie Zugänglichkeit der Spaltungssequenz durch den Einsatz des sterisch anspruchsvolleren FRET-Paares eingeschränkt. Dadurch wird die Vermutung bestätigt, dass die Größe des Fluorophors einen Einfluss auf die Spaltungskinetik hat (siehe 10.4.1).

Der Abfall der orangenen Kurve nach 60 min kann durch Effekte wie Ausbleichen des Fluorophors erklärt werden, was bei Mca nicht auftritt. Dadurch weist das Mca-System einen weiteren Vorteil gegenüber dem Ant-System auf.

Mit der Sequenz Fmoc-(¹⁵N)GK_{Mca}GFFK_{Dnp}G-OH liegen nun alle notwendigen Eigenschaften vereint in einer Sequenz vor (siehe Abbildung 76) - die Erkennungssequenz für die enzymatische Spaltung (in rot), das Fluorophor/Quencher-Paar (Mca/Dnp) für die einfache *in situ*-Detektion der Spaltung (in grün und blau) und die ¹⁵N-Markierung des N-terminalen Endes des Peptids, um die Vernetzung des Polymers in den Partikeln zu verfolgen (in lila).

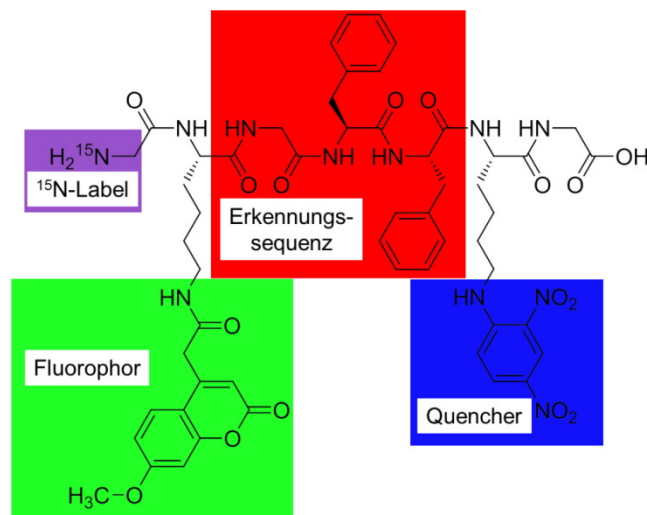


Abbildung 76: ¹⁵N-markierte, FRET-markierte, spaltbare Peptidsequenz.

10.5.1.5 K_{Mca} und K_{Dnp} - $H_2^{15}N$ -GK $_{Mca}$ RQLRVVGGK $_{Dnp}$ G-OH

Aufgrund der erfolgreichen Synthese eines reinen multifunktionellen Peptids wurde das FRET-Paar ebenfalls auf die Hepsin-spaltbare Sequenz angewendet und $H_2^{15}N$ -GK $_{Mca}$ RQLRVVGGK $_{Dnp}$ G-OH synthetisiert (siehe Abbildung 77).

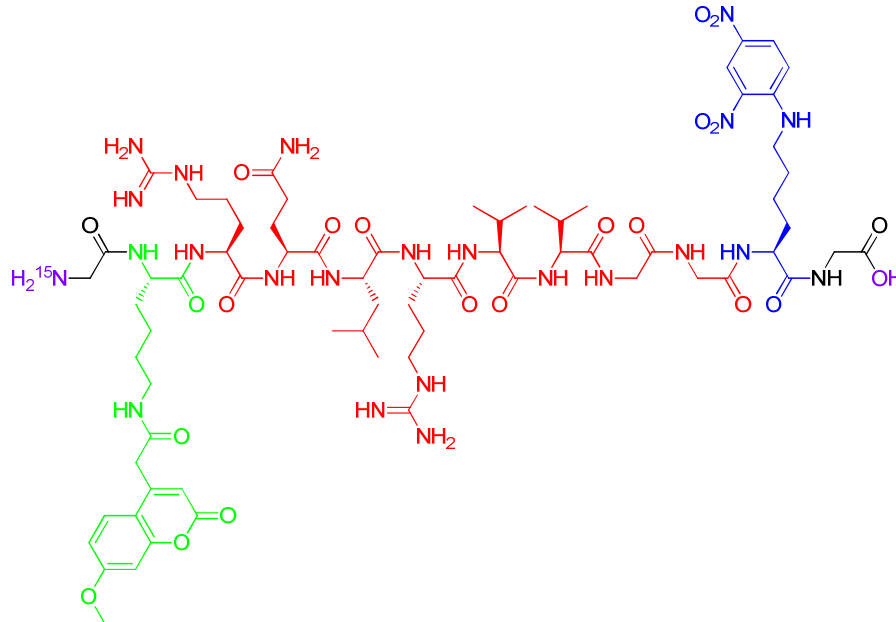


Abbildung 77: Struktur von $H_2^{15}N$ -GK $_{Mca}$ RQLRVVGGK $_{Dnp}$ G-OH.

Die Struktur wurde mittels 1H - und ^{13}C -NMR-SpektroskopiesowieMALDI TOF-MS verifiziert. Es treten wieder alle zu erwartenden Signale der entsprechenden eingesetzten Aminosäuren sowie des FRET-Labels auf.

10.5.1.6 Analyse der Reaktionsparameter der Synthese von $H_2^{15}N$ -GK $_{Mca}$ RQLRVVGGK $_{Dnp}$ G-OH

Eine detaillierte Erklärung der Einflüsse der Reaktionsparameter erfolgte in Abschnitt 10.3.1.1. Ein Überblick über alle Ansätze für die Synthese des Peptids kann in Tabelle 12 gefunden werden.

Tabelle 12: Peptidansatz, Ausbeute [%] und Peptidreinheit [%] korreliert mit den Syntheseparametern Ansatzgröße [mmol], Maximaltemperatur ($T_{Max.}$), Anzahl der Reaktionstemperaturen unter $80^\circ C$ ($n < 80^\circ C$) sowie die Anzahl der Reaktionsschritte im optimalen Bereich zwischen $75^\circ C$ und $80^\circ C$ ($n_{opt.}$) im Vergleich zur Gesamtzahl an Reaktionsschritten ($n_{Ges.}$) der Peptide $H_2^{15}N$ -GK $_{Mca}$ RQLRVVGGK $_{Dnp}$ G-OH und Fmoc- (^{15}N) GK $_{Mca}$ RQLRVVGGK $_{Dnp}$ G-OH.

Ansatz	Ausbeute [%]	Ansatzgröße [mmol]	$T_{Max.}$ [$^\circ C$]	$n < 80^\circ C / n_{Ges.}$	Reinheit [%]	$n_{opt.} / n_{Ges.}$
1 Fmoc-	48	1	82	15/22	67	12/23
2 Fmoc-	53	1	85	20/22	45	7/22
3 H_2N -	86	0.1	80	23/23	88	16/23

Aus Tabelle 12 wird ersichtlich, dass die Reinheit von Ansatz 1 bis 3 steigt, da hier immer seltener $80^\circ C$ überschritten wurde. Die Reinheit ist bei Ansatz 3 am höchsten, da sich hier die

Reaktionstemperatur am häufigsten im optimalen Bereich bewegte. Die Reinheit wurde durch HPLC bestimmt und konnte durch Anpassung der Reaktionstemperaturen auf $\geq 88\%$ gesteigert werden.

10.5.1.7 Enzymatische Spaltung von $H_2^{15}N$ -GK_{Mca}RQLRVVGGK_{Dnp}G-OH

Die Spaltung der Sequenz wurde in Hepsin-exprimierenden Zellen (LNCaP) durchgeführt.

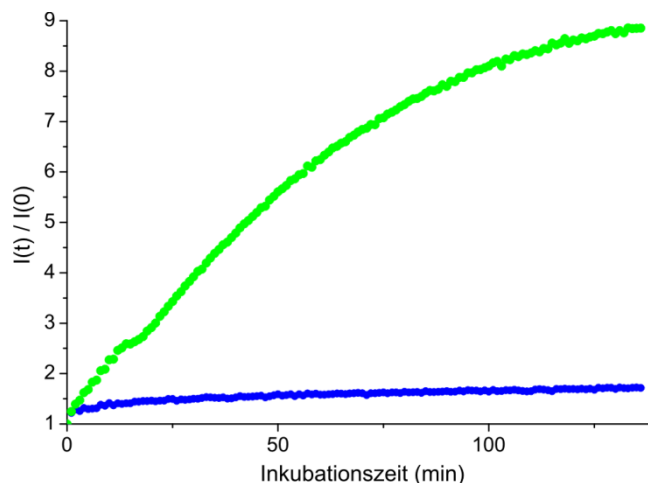


Abbildung 78: Anstieg der relativen Fluoreszenz bei der Spaltung von $H_2^{15}N$ -GK_{Mca}RQLRVVGGK_{Dnp}G-OH durch Hepsin in Zellkultur (Messung durch Niklas Kotman).

In Abbildung 78 ist der Anstieg der relativen Fluoreszenz bei der Spaltung von $H_2^{15}N$ -GK_{Mca}RQLRVVGGK_{Dnp}G-OH dargestellt (grün). Die Negativkontrolle mit reinem Puffer ist blau dargestellt. Bei der grünen Kurve ist ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten. Nach 150 min ist ein Anstieg auf das Neunfache des Anfangswerts zu sehen. Es konnte gezeigt werden, dass das Mca/Dnp-System auch auf die Hepsin-spaltbare Sequenz angewendet werden kann und die enzymatische Erkennung nicht unterbindet.

10.5.2 Synthese der Peptid-Polymer-Konjugate

10.5.2.1 Kupplung von Peptid und Polymer

Beim Einsatz von *N*-Methylantranilsäure konnte gezeigt werden, dass eine enzymatische Spaltung der Peptide im Partikel und damit ein Abbau der Nanopartikel durch den Einsatz eines FRET-Systems nachgewiesen werden kann. Dies musste nun erneut für die neue Sequenz evaluiert werden.

Es wurde COMU²⁵⁷ und 2,4,6-Trimethylpyridin (TMP) eingesetzt, um Fmoc-(¹⁵N)GK_{Mca}GFFK_{Dnp}G-OH an Poly[styrol-*co*-*N*-(2-aminoethyl)acrylamid] (P_A7-104) zu binden (Abbildung 79).

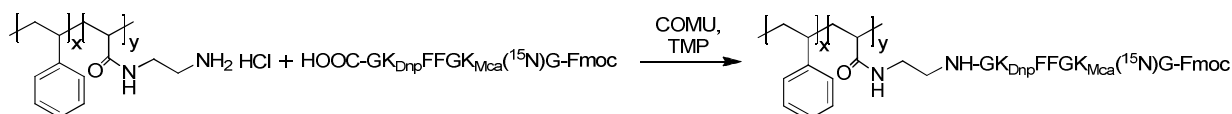


Abbildung 79: Reaktionsschema für die Synthese von (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-GK_{Dnp}FFGK_{Mca}(¹⁵N)G-Fmoc.

Die erfolgreiche Kupplung wurde mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie bestätigt, die HPLC diente zur Bestimmung der Reinheit. Obwohl die Aufreinigung des Produkts unter identischen Bedingungen

wie bei den anderen Konjugaten durchgeführt wurden, stellte sich heraus, dass noch eine geringe Menge an ungebundenem Peptid in der Probe vorlag. Der Grund lag wahrscheinlich in der hydrophoberen Natur des FRET-Systems, was eine schlechtere Wasserlöslichkeit des Peptids zur Folge hatte. Eine Aufreinigung in diesem Schritt war aber nicht unbedingt nötig, da im nächsten Schritt eine intensive Reinigung des Polymers durchgeführt wird.

Die Entschützung des Fmoc-geschützten Amins erfolgte erneut durch Einsatz eines hundertfachen Überschusses an Tris(2-aminoethyl)amin, die Aufreinigung wurde durch mehrmaliges Ausfällen des Polymers in wässrigem Phosphatpuffer (pH 5.5) erreicht, wodurch das Produkt (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-GK_{Dnp}FFGK_{Mca}G-¹⁵NH₂, nach Gefrierdrying, rein erhalten werden konnte (siehe Abbildung 80). Die Struktur wurde über ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie bestimmt.

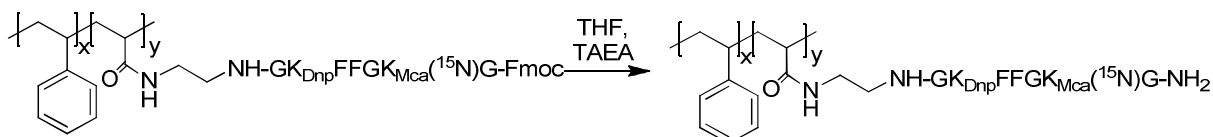


Abbildung 80: Reaktionsschema für die Synthese von (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-GK_{Dnp}FFGK_{Mca}G-¹⁵NH₂.

Der Versuch einer Anbindung von Fmoc-(¹⁵N)GK_{Mca}RQLRVVGGK_{Dnp}G-OH unter identischen Bedingungen an Poly[styrol-*co*-N-(2-aminoethyl)acrylamid] (P_A7-104) führt erneut zu einem undefinierbaren Produkt. Es lag die Vermutung nahe, dass die Hepsin-spaltbare Sequenz aufgrund der vielen funktionellen Gruppen (z.B. Arginin, Glutamin) nicht mehr selektiv reagiert und es zu unkontrollierten Nebenreaktionen der Säure-, Amino-, Guanidin- und Amidogruppen der Peptidseitenketten kommt. Aus diesem Grund wurde in der nächsten Generation eine chemoselektive Strategie verfolgt.

10.5.2.2 DOSY-NMR-Spektroskopie

Der Erfolg der Kupplung von Fmoc-(^{15}N)GK_{Mca}GFFK_{Dnp}G-OH an Poly[styrol-co-N-(2-aminoethyl)-acrylamid] konnte wieder mittels DOSY-NMR gezeigt werden. In Abbildung 81 ist die Überlagerung von drei DOSY-NMR-Spektren mit dem ^1H -NMR-Spektrum des Produkts dargestellt.

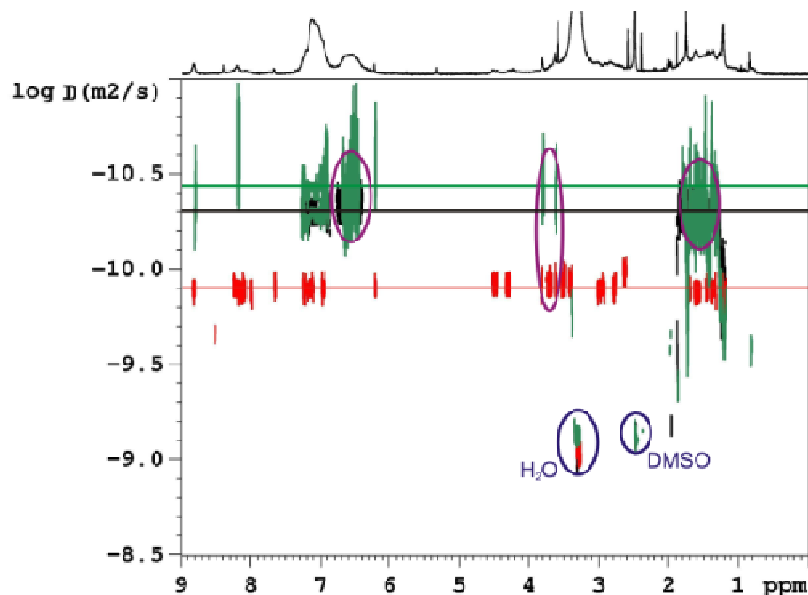


Abbildung 81: Überlagerung von drei DOSY-NMR Spektren: (PS-co-PAA)-C₂H₄-NH-GK_{Dnp}FFGK_{Mca}G- $^{15}\text{NH}_2$ in grün, PS-co-PAS in schwarz und H₂ ^{15}N -GK_{Mca}GFFK_{Dnp}G-OH in rot (700 MHz, DMSO-d₆, T = 289.3 K).

Die Signale des reinen Peptids H₂ ^{15}N -GK_{Mca}GFFK_{Dnp}G-OH, die einem Diffusionskoeffizienten von $1.268 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ entsprechen, sind in rot dargestellt. Die Signale des reinen Polymers sind in schwarz dargestellt und einem kleineren Diffusionskoeffizienten von $4.966 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ zuzuordnen. Dieser kann auf das größere Molekül und den daraus resultierenden größeren hydrodynamischen Radius zurückgeführt werden. In grün ist schließlich das Signal des Peptid-Polymer-Konjugats mit einem Diffusionskoeffizienten von $4.436 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ dargestellt. Dieser Wert ist geringer als der des reinen Polymers, was einem Molekül mit noch größerem hydrodynamischen Radius entspricht. Dies kann durch die erfolgreiche Anbindung der Peptide an das Polymer gedeutet werden. Diese Beobachtung wird durch die Tatsache gestützt, dass sowohl die Protonensignale des Peptids (zum Beispiel bei 4.3 oder 4.5 ppm, lila markiert) als auch die Protonensignale des Polymers (zum Beispiel bei 1.6 oder 6.7 ppm, lila markiert) beim gleichen Diffusionskoeffizienten auftreten.

Der Grund für die Abwesenheit einiger Peptidsignale (rot) im Spektrum des Peptid-Polymer-Konjugats (grün) lässt sich auf unterschiedliche Signalintensitäten zurückführen. Im abgebildeten Spektrum ist die Balance zwischen den einzelnen Signalintensitäten so gewählt, dass die Übersichtlichkeit bei der Spektrenüberlagerung gewahrt bleibt. Bei Erhöhung der Intensität des Spektrums sind die einzelnen Peptidsignale zwar besser zu erkennen, aber die Signale des Polymers werden dann so breit, dass im Spektrum die Übersichtlichkeit sehr eingeschränkt wird.

Vergleich man die Daten mit dem DOSY-NMR-Spektrum der 1. Generation (siehe Abbildung 41) erkennt man folgende Unterschiede: Das kleinere Peptid der 1. Generation Fmoc-GFF-OH hat mit

$1.778 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ einen größeren Diffusionskoeffizienten als das größere Peptid der 3. Generation $\text{H}_2^{15}\text{N-GK}_{\text{Mca}}\text{GFFK}_{\text{Dnp}}\text{G-OH}$ ($D = 1.268 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$). Denselben Trend erkennt man beim Vergleich der Konjugate der 1. ($D = 4.571 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) und 3. Generation ($D = 4.436 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$).

10.5.2.3 HPLC-Analyse des Konjugats

Aus dem DOSY-NMR-Spektrum ist die erfolgreiche Kupplung des Peptids an das Polymer eindeutig abzuleiten. Diese Beobachtung wird durch das Ergebnis der HPLC-Analyse des Konjugats unterstützt (siehe Abbildung 82).

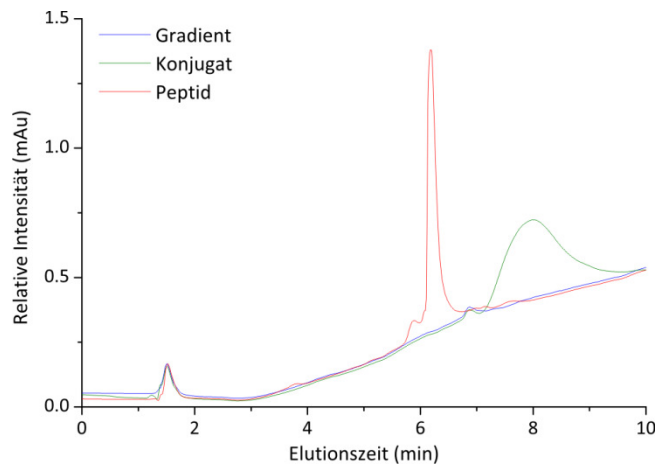


Abbildung 82: HPLC des Konjugats $(\text{PS-co-PAA})\text{-C}_2\text{H}_4\text{-NH-GK}_{\text{Dnp}}\text{FFGK}_{\text{Mca}}\text{G-}^{15}\text{NH}_2$ (grün), des Peptids $\text{H}_2^{15}\text{N-GK}_{\text{Mca}}\text{GFFK}_{\text{Dnp}}\text{G-OH}$ (rot) und der eingesetzte Gradient ohne Analyten (blau).

Im Abbildung 82 wurden drei HPLC-Elugramme übereinander gelegt. Überlagert sind das Elugramm des reinen Peptids (rot), das Signal des Konjugats (grün) und der identische Lösemittelgradient ohne Zugabe eines Analyten (blau). Man erkennt aus der Abbildung, dass im Elugramm des Konjugats $(\text{PS-co-PAA})\text{-C}_2\text{H}_4\text{-NH-GK}_{\text{Dnp}}\text{FFGK}_{\text{Mca}}\text{G-}^{15}\text{NH}_2$ nur ein breites Signal ($t_{\text{ret.}} = 7.9 \text{ min}$) aber kein weiteres Signal auftritt, das dem freien Peptid zugeordnet werden könnte ($t_{\text{ret.}} = 6.2 \text{ min}$). Aus dem Elugramm wird deutlich, dass im Peptid-Polymer-Konjugat kein freies Peptid mehr vorhanden ist, das nach der Partikelbildung durch das Enzym gespalten werden könnte. Die quantitative Kupplung bestätigte sich damit durch die Ergebnisse der HPLC.

10.5.2.4 Bestimmung des Peptidgehalts im Konjugat

Der Peptidgehalt im Konjugat wurde bestimmt, um die Anzahl an freien Aminogruppen zu quantifizieren, der für die Berechnung der Reagenzienmengen für die Partikelbildung im nächsten Schritt essentiell ist.

Mittels quantitativer $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie konnte ein Peptidgehalt von 42.7% bestimmt werden. Vergleicht man diesen Wert mit dem entsprechenden Peptidgehalt des Peptid-Polymer-Konjugats der 1. (25.5%, siehe 10.3.2.4) und 2. Generation (39.5%, siehe 10.4.2.3), liegt dieser Wert erneut höher. Bei allen drei Konjugaten wurden Polymere mit einem ähnlichen Funktionalisierungsgrad eingesetzt ($\text{P}_{\text{A}7-166}$ und $\text{P}_{\text{A}7-104}$). Vergleicht man die Molekulargewichte der Peptide $\text{H}_2\text{N-GFF-OH}$

($M = 369.41 \text{ g/mol}$), $\text{H}_2^{15}\text{N-GY}_\text{N}\text{GFFK}_{\text{Mant}}\text{G-OH}$ ($M = 954.99 \text{ g/mol}$) und $\text{H}_2^{15}\text{N-GK}_{\text{Mca}}\text{GFFK}_{\text{Dnp}}\text{G-OH}$ ($M = 1123.14 \text{ g/mol}$), lässt sich dadurch der höhere Peptidgehalt erklären. Offensichtlich bleibt die Anbindungseffizienz von den eingesetzten FRET-Paaren unbeeinflusst. Der theoretische Wert wurde, ausgehend von einer quantitativen Umsetzung von P_S7-104, als 56.0% berechnet. Daraus wird ersichtlich, dass trotz der Verwendung des größeren Fluorophors, an etwa 76% der Aminogruppen eine Peptidsequenz gebunden werden konnte. Da sich dieser Anbindungsgrad bei allen drei Generationen findet, ist das ein sicheres Indiz dafür, dass die Peptidlänge sowie die Größe der eingesetzten FRET-Komponenten keinen Einfluss auf die Anbindungseffizienz haben.

10.5.3 Synthese der $\text{K}_{\text{Mca}}\text{FFGK}_{\text{Dnp}}$ -vernetzten Nanopartikel

Da für die Synthese der Nanopartikel der 3. Generation bereits Erfahrungen aus den vorher dargestellten Systemen vorlagen, wurde die Reaktion direkt in Miniemulsion durchgeführt und außerdem einhydrophober, rot fluoreszierender BODIPY-Farbstoff ²⁵⁸ in die Reaktion eingebracht (siehe Abbildung 83), der im Folgenden als „RFF“ (rot fluoreszierender Farbstoff) bezeichnet wird.

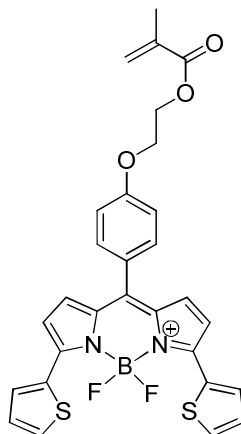


Abbildung 83: Rot fluoreszierender BODIPY-Farbstoff.

(PS-co-PAA)-C₂H₄-NH-GK_{Dnp}FFGK_{Mca}G-¹⁵NH₂, basierend auf P_A7-104, Poly(styrol-co-acrylsäure) (P_S7-104) und COMU wurden in einem Gemisch aus DMF und NMP gelöst. Nach Zugabe des Farbstoffs (RFF) in Isooctan und dem Tensid P(B/E-b-EO) (äußere Phase), konnte nach einer Behandlung mit Ultraschall eine stabile Miniemulsion erhalten werden. Die Vernetzungsreaktion, die zur Nanopartikelbildung führte, wurde durch anschließende Zugabe von DIEA initiiert und erfolgte über 15 h bei Raumtemperatur in der inneren Phase. Um die Dispersion in Wasser zu überführen, wurde 8.5 mL an wässriger 0.3%iger SDS-Lösung zugegeben und erneut Ultraschall eingesetzt, um eventuell auftretende Aggregate aufzubrechen. Nach Verdampfen des Isooctans und Reinigung der Dispersion durch Dialyse wurde ein Teil der Probe gefriergetrocknet. Die Vernetzung konnte durch das eingebaute ¹⁵N-Label mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht werden.

10.5.3.1 Charakterisierung der $K_{Mca}FFGK_{Dnp}$ -vernetzten Partikel

Das Spektrum des Produkts (blau), das Spektrum des Edukts (grün) und ein Vergleichsspektrum von Fmoc-(^{15}N)-Glycin (rot) wurden aufgenommen und die Überlagerung der drei Spektren in Abbildung 84 dargestellt. Da 100% ^{15}N -Glycin für die Peptidsynthese eingesetzt wurde, ist das Signal/Rausch-Verhältnis deutlich besser als im entsprechenden Spektrum der 1. Generation (siehe Abbildung 68).

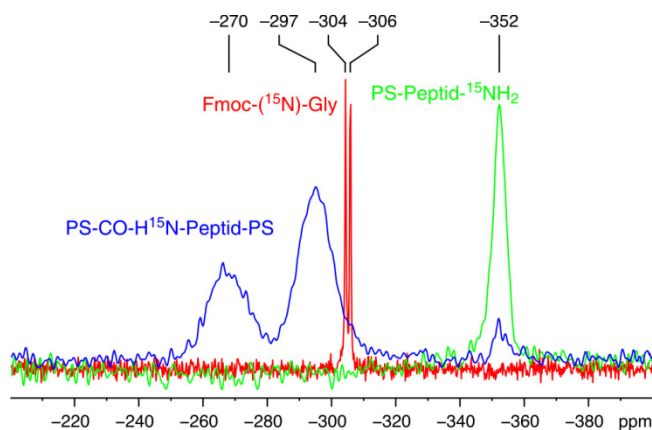


Abbildung 84: ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektren des Edukts (PS-co-PAA)- $C_2H_4-NH-GK_{Dnp}FFGK_{Mca}G-^{15}NH_2$ in grün, des Produktamids PS-CO-H ^{15}N -Peptid-PS in blau und des Referenzamids Fmoc-(^{15}N)-Gly in rot (30.4 MHz, T = 289.3 K).

Das Spektrum des Edukts (PS-co-PAA)- $C_2H_4-NH-GK_{Dnp}FFGK_{Mca}G-^{15}NH_2$ ist in grün dargestellt. Dort tritt ein Signal bei -352 ppm auf, welches der ^{15}N -markierten Aminogruppe zuzuordnen ist. In rot wurde das Spektrum eines Referenzamids Fmoc-(^{15}N)-Glycin dargestellt, um erneut zu zeigen, in welchem ppm-Bereich Amidsignale auftreten. Im Spektrum des Produkts (in blau) treten drei deutlich erkennbare, breite Signale auf: Zwei intensive Signale bei -270 und -297 ppm sowie ein schwaches bei -352 ppm. Das Edukt bei -352 ppm (in grün) ist demnach fast vollständig umgesetzt und zwei neue Signale im ppm-Bereich der Amide sind entstanden (in blau). Aus dieser Beobachtung lässt sich schließen, dass die Umsetzung des Amins zum Amid erfolgreich war und somit die Vernetzung des Polymers stattgefunden hat. Die Reaktion war folglich nicht ganz quantitativ und kann aus dem Spektrum als $\geq 90\%$ abgeschätzt werden. Es soll noch einmal erwähnt werden, dass dadurch kein freies Peptid in der Probe verbleibt, sondern lediglich einseitig gebundenes Peptid (siehe Abbildung 82). Dies ist essentiell für den enzymatischen Spaltungsschritt, da sonst ein Fluoreszenzanstieg auf die Spaltung von freiem Peptid und nicht auf eine Partikelspaltung zurückzuführen wäre. Eine HPLC-Untersuchung stützt den Erfolg der Vernetzung, da eine Analyse des Extrakts, was aus einer Extraktion der Partikel erhalten wurde, zu keinem Produktsignal führte. Bei der Untersuchung der kolloidalen Eigenschaften der Partikel wurden folgende Ergebnisse erhalten. Die Partikeldurchmesser in Wasser wurden mittels Photonen-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (PCCS) bestimmt. Die Ergebnisse vor und nach der Dialyse sind in Abbildung 85 dargestellt.

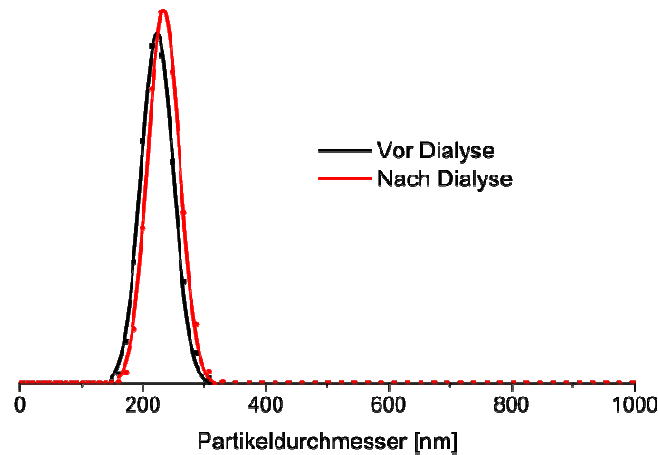


Abbildung 85: Partikeldurchmesser der $K_{Mca}FFGK_{Dnp}$ -vernetzten Partikel vor und nach Dialyse (PCCS, Intensitätsverteilung).

In Abbildung 85 ist die Verteilung der Partikeldurchmesser vor und nach Dialyse gezeigt. Der Mittelwert (X_{50}) befindet sich nach der Dialyse bei 230 nm. Es zeigt sich, dass die Partikelgröße während der Dialyse minimal zunahm. Die Verteilung der Partikelgrößen, die aus der Signalbreite ersichtlich wird, änderte sich nicht. Die Morphologie der Partikel wurde mittels REM untersucht. Ein exemplarisches Bild der Probe zeigt Abbildung 86.

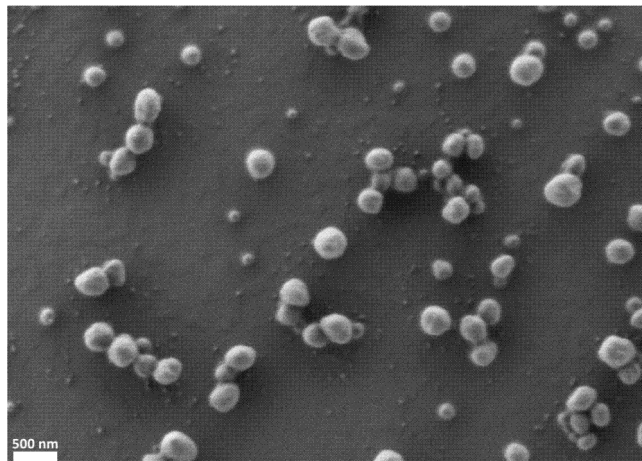


Abbildung 86: REM-Aufnahme der $K_{Mca}GFFK_{Dnp}$ -vernetzten Partikel.

Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist zu erkennen, dass runde Partikel mit einer ähnlichen Größe, wie zuvor mittels PCCS bestimmt, vorlagen. Eine grafische Bestimmung von 100 Partikelgrößen anhand von REM-Aufnahmen, zeigte einen durchschnittlichen Partikeldurchmesser von 240 nm. Das Zetapotential der Dispersionen betrug zwischen - 3 und - 6 mV, der Feststoffgehalt zwischen 0.3 und 1.0% und der pH-Wert um 5.7.

Da in die Probe ein hydrophober Farbstoff eingebracht wurde, konnte man mittels Konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) die Verteilung des Farbstoffs und somit die Nanopartikel detektiert. In Abbildung 87 ist eine beispielhafte Aufnahme zu sehen.

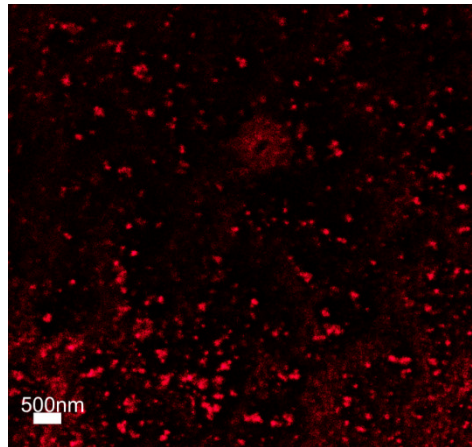


Abbildung 87: LSM-Aufnahme der K_{Mca}GFFK_{Dnp}-vernetzten Partikel mit eingeschlossenem Farbstoff (RFF).

Man erkennt deutlich, dass der Farbstoff lokalisiert ist und nicht homogen verteilt auftritt. Aus dieser Aufnahme lässt sich schließen, dass der Farbstoff erfolgreich in die Nanopartikel eingebracht werden konnte und sich nicht durch Dialyse entfernen ließ.

10.5.4 Enzymatischer Abbau der K_{Mca}GFFK_{Dnp}-vernetzten Nanopartikel

Nach der Überführung der Partikel in Wasser erfolgte die enzymatische Spaltung der Nanopartikel, indem die Dispersion mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, pH 7.4) versehen und anschließend mit unterschiedlich konzentrierten Trypsin-Lösungen (0.01 mg/mL bis 2.5 mg/mL) versetzt wurde. Der Verlauf der Spaltung kann über den Anstieg der Fluoreszenzintensität in Abbildung 88 verfolgt werden.

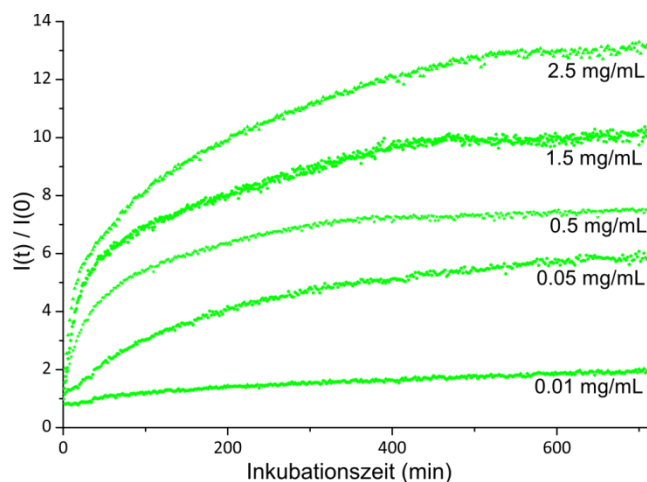


Abbildung 88: Anstieg der relativen Fluoreszenz bei der Spaltung der K_{Mca}GFFK_{Dnp}-vernetzten Partikel mit unterschiedlicher Trypsinkonzentration (Messung durch Niklas Kotman).

Die Ergebnisse in Abbildung 88 zeigen einen deutlichen Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität mit der Zeit, wobei der Endwert mit ansteigender Enzymkonzentration zunimmt. Um die Enzymselektivität zu zeigen, wurden die Partikel mit Dextranase und Lipase behandelt, was zu keinem Fluoreszenzanstieg führte (siehe Abbildung 89).

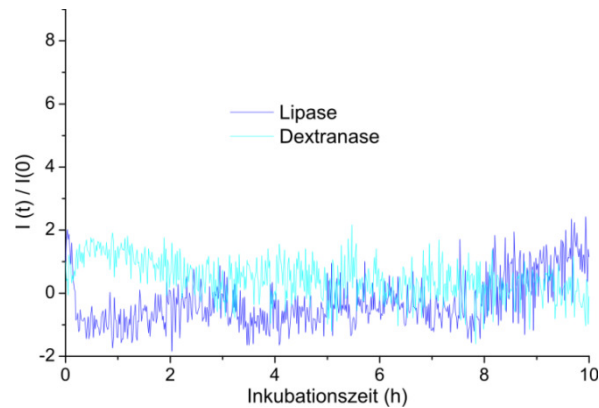


Abbildung 89: Relative Fluoreszenz bei der Behandlung der $K_{Mca}GFFK_{Dnp}$ -vernetzten Partikel mit Lipase und Dextranase (Messung durch Niklas Kotman).

Für den Fall einer Peptidspaltung in Lösung sollten die Endwerte unter Variation der Enzymkonzentration alle auf demselben Niveau enden, da die gleiche Menge an Peptid gespalten wird. Da dieses Verhalten bei der Heterophasenspaltung der Partikel nicht auftritt, gibt es Grund zu der Annahme, dass es zu einer Hemmung der Enzymaktivität kommt. In der Literatur wird beschrieben, dass Enzyme dazu tendieren, an Oberflächen zu adsorbieren, was zu ihrer Inaktivierung führt.^{259,260}

Eine mögliche Erklärung wäre im vorliegenden Fall, dass für geringe Enzymkonzentrationen die Enzyme die oberflächennahen Peptide spalten, auf der Oberfläche verbleiben und kein Enzym mehr vorhanden ist, um weitere Peptide zu spalten. Bei größeren Enzymkonzentrationen kommt es zu einer partiellen Verdrängung der inaktiven Enzyme von der Oberfläche, was zu einem größeren Anstieg der Gesamtfluoreszenz führt, da nun wieder mehr Peptide zugänglich sind.

10.5.4.1 Sequentielle Enzymzugabe

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde eine definierte Enzymmenge (2.5 mg/mL), die im vorher präsentierten Experiment auf einmal zugegeben wurde, in zehn Einzelschritten zu je 0.25 mg/mL zugesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 90 zu sehen.

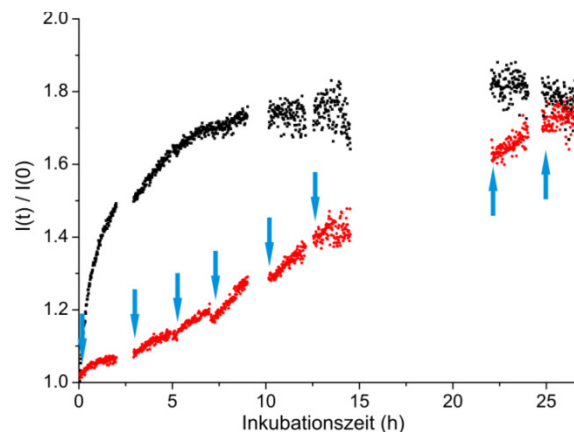


Abbildung 90: Anstieg der relativen Fluoreszenz, bei der Zugabe von Trypsin in zehn Schritten (rot) und einmaliger Zugabe der gleichen Menge an Trypsin (schwarz). Die Zeitpunkte der Zugabe sind mit blauen Pfeilen markiert (Messung durch Niklas Kotman).

Man erkennt, dass die sequenzielle Zugabe zu einem treppenartigen Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität führt. Der Endwert der Mehrfachzugabe (in rot) stimmt mit dem Endwert der einmaligen Zugabe (in schwarz) überein. Dies unterstützt die aufgestellte Hypothese, dass es zu einer Inaktivierung der Enzyme auf der Oberfläche kommt und diese durch erneute Enzymzugabe teilweise verdrängt werden, was zu weiterer Peptidspaltung führt.

10.5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der 3. Generation

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass über den Einsatz des Mca/Dnp-Systems eine definierte Peptid- sowie eine definierte Peptid-Polymer-Konjugat-Synthese erfolgen konnten. Daraus wurden definierte polymere Nanopartikel mehrfach reproduzierbar synthetisiert und die Vernetzung des Polymers mittels ^{15}N -NMR-Spektroskopie nachgewiesen und quantifiziert. Ein hydrophober Farbstoff konnte dabei in die Partikel eingebracht und die enzymatische Spaltung der Nanopartikel über einen Fluoreszenzanstieg nachgewiesen werden.

Um das angestrebte Ziel, Hepsin-spaltbarer Nanopartikel unter simultaner Freisetzung eines hydrophilen Farbstoffs zu erreichen, müssen für eine weitere Syntheseriehe folgende Parameter adaptiert werden: Die Peptidsequenz muss, unter Beibehaltung Mca/Dnp-Markierung, angepasst und ein effektiver Weg der Freisetzung eines hydrophilen Farbstoffs gefunden werden. Außerdem muss dabei eine chemoselektive Reaktion eingesetzt werden.

10.6 Enzymatisch spaltbare Nanokapseln der 4. Generation ($K_{Mca}RQLRVVGGK_{Dnp}$)

Eine Möglichkeit Substanzen effektiv einzubetten und freizusetzen, ist die Verwendung von polymeren Nanokapseln mit flüssigem Kern.²⁴⁷ Ein denkbarer Ansatz für die Kapselsynthese ist eine Polymerisation an der Grenzfläche von Nanotröpfchen.

Für die Bildung von Kapseln in Miniemulsion und der dafür nötigen Grenzflächenpolymerisation muss eine Komponente aus der dispersen, hydrophilen Phase und die andere aus der kontinuierlichen, hydrophoben Phase reagieren, wobei die Komponenten nicht in der jeweils anderen Phase löslich und das gebildete Polymer in beiden Phasen unlöslich sein sollte. Da die gewünschte Hepsin-spaltbare Peptidsequenz RQLRVVGG hydrophil ist, sollte sie entsprechend funktionalisiert und in der dispersen Phase eingesetzt werden. Das hydrophobe Gegenstück soll dann aus der kontinuierlichen Phase mit dem Peptid reagieren (siehe Abschnitt 9, Abbildung 31).

Wenn enzymatisch spaltbare Sollbruchstellen in Form der Peptidsequenz RQLRVVGG in die Kapselwand eingebracht werden sollen, muss wegen der zusätzlichen funktionellen Amidgruppe des Glutamins (Q) und der Guanidingruppe des Arginins (R) eine chemoselektive Reaktionsführung gewährleistet werden, welche diese Gruppen unberührt lässt. Der Einsatz der bisher eingesetzten Peptidkupplungsreagenzien oder die Verwendung von Polyadditionsreaktionen mit Diisocyanat führt zu unerwünschten Nebenreaktionen, da hier auch die Amid oder Guanidingruppen reagieren können (siehe 10.5.2.1). Um dies zu vermeiden, ist der Einsatz von chemoselektiven Reaktionen sinnvoll. Beispiele sind in Abschnitt 6.3.3 beschrieben.

Ein sehr großes Potential weist dabei die Huisgen [1,3]-dipolare Cycloaddition (Click-Reaktion)²⁶¹ auf, da sie sehr effektiv ist und gleichzeitig fast alle funktionellen Gruppen von Peptiden toleriert. Dabei reagiert eine Azidokomponente unter Cu(I)-Katalyse mit einem Alkin. Das Problem der Koordination von Kupfer durch stickstoffhaltige Peptidseitenketten (z.B. Arginin) kann durch Zugabe chelatisierender Liganden wie *N,N,N',N'',N'''*-Pentamethyldiethylentriamin (PMDETA)¹²¹ oder der Anwendung einer kupferfreien Reaktion vermieden werden.

10.6.1 Peptidsynthese - Die azido- oder propargylfunktionalisierte hydrophile Komponente

Um einen gewissen synthetischen Spielraum zu gewinnen, wurde sowohl eine azidofunktionalisierte als auch eine propargylfunktionalisierte Peptidsequenz hergestellt. Die dafür nötigen Aminosäuren wurden synthetisiert (*N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Azido-L-lysin, Azidoessigsäure) oder kommerziell bezogen (*N*- α -Fmoc-L-Propargylglycin) (siehe Abbildung 91).

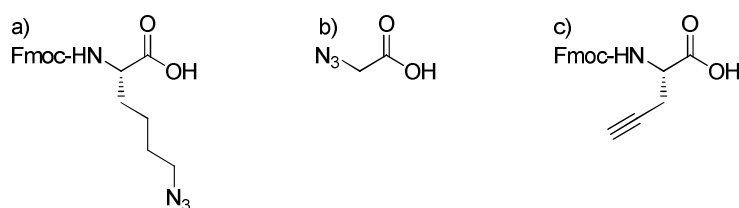


Abbildung 91: Struktur von a) *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Azido-L-lysin, b) Azidoessigsäure und c) *N*- α -Fmoc-L-Propargylglycin.

N- α -Fmoc-*N*- ϵ -Azido-L-lysin (siehe Abbildung 91) konnte durch einen Diazotransfer ausgehend von *N*- α -Fmoc-L-Lysin-Hydrochlorid, Natriumazid und Trifluormethansulfonsäureanhydrid dargestellt werden. Nach einer säulenchromatographischen Abtrennung des Trifluormethansulfonamids konnte das Produkt in einer Ausbeute von 88% erhalten werden. Die Struktur wurde mithilfe von ^1H -, ^{13}C -NMR- und IR-Spektroskopie sowie MALDI TOF-MS bestätigt. Im den ^1H -NMR-Spektren des Edukts und Produkts tritt eine deutliche Tieffeldverschiebung der CH_2 -Gruppe in Nachbarschaft der Azidogruppe von 2.75 ppm nach 3.32 ppm auf. Im ^{13}C -NMR-Spektrum tritt der Kohlenstoff in Nachbarschaft der Azidogruppe, tieffeldverschoben bei 50.53 ppm, auf. Im IR-Spektrum ist das Auftreten der N_3 -Bande bei 2098 cm^{-1} deutlich zu erkennen.

Für die Synthese von Azidoessigsäure wurde Bromessigsäure mit Natriumazid umgesetzt und nach wässriger Aufarbeitung in einer Ausbeute von 77% erhalten. Im IR-Spektrum ist deutlich das Auftreten der N_3 -Bande bei 2118 cm^{-1} zu beobachten. Die Struktur wurde mithilfe von ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie MALDI TOF-MS bestätigt.

10.6.1.1 Diazidofunktionalisiertes Peptid - $\text{N}_3\text{-CH}_2\text{-CO-K}_{\text{Mca}}\text{RQLRVVGGK}_{\text{Dnp}}\text{K}_{\text{N}_2}\text{G-OH}$

Durch die Synthese dieser beiden Azidobausteine konnte $\text{N}_3\text{-CH}_2\text{-CO-K}_{\text{Mca}}\text{RQLRVVGGK}_{\text{Dnp}}\text{K}_{\text{N}_2}\text{G-OH}$ synthetisiert werden (siehe Abbildung 92).

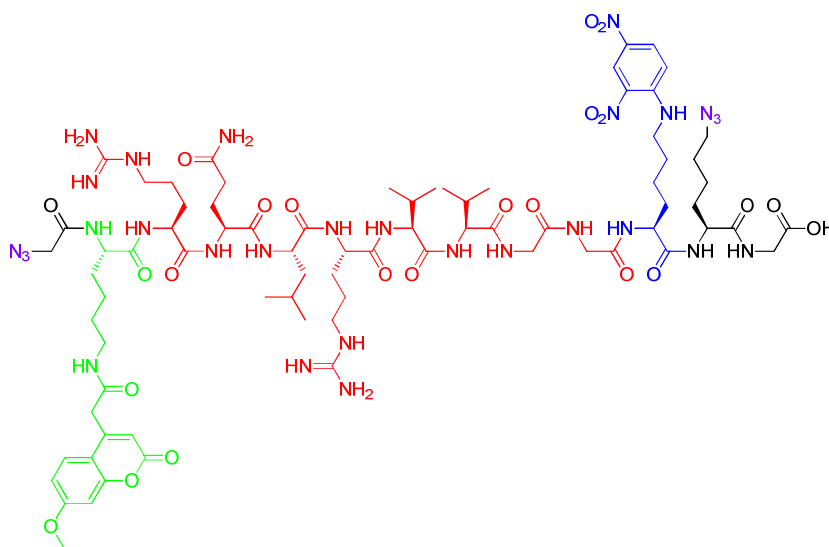


Abbildung 92: Struktur von $\text{N}_3\text{-CH}_2\text{-CO-K}_{\text{Mca}}\text{RQLRVVGGK}_{\text{Dnp}}\text{K}_{\text{N}_2}\text{G-OH}$.

Der Erfolg der Reaktion konnte mittels ^1H -, ^{13}C -NMR-Spektroskopie und MALDI TOF-MS gezeigt und die Reinheit durch HPLC als $\geq 75\%$ bestimmt werden. Im ^1H -NMR-Spektrum treten neben den Signalen der Protonen der Hepsin-spaltbaren Sequenz (siehe 10.4.1) und der Protonen des FRET-Paares (siehe 10.5.1), die Signale der Protonen der Azidoaminosäuren auf. Die Protonen des Azidolysins in Nachbarschaft der Azidogruppe z.B. findet man als Triplett mit einer identischen Kopplungskonstante wie das Proton des Edukts ($^3J_{\text{HH}} = 6.7\text{ Hz}$) bei 3.29 ppm. Im ^{13}C -NMR-Spektrum lässt sich die erfolgreiche Synthese ebenfalls nachverfolgen.

10.6.1.2 Analyse der Reaktionsparameter der $N_3\text{-CH}_2\text{-CO-K}_{Mca}\text{RQLRVVGGK}_{Dnp}\text{K}_{N_2}\text{G-OH}$ Synthese

Eine detaillierte Erklärung der Einflüsse der Reaktionsparameter erfolgte in Abschnitt 10.3.1.1. Ein Überblick über alle Ansätze für die Synthese von $N_3\text{-CH}_2\text{-CO-K}_{Mca}\text{RQLRVVGGK}_{Dnp}\text{K}_{N_2}\text{G-OH}$ kann in Tabelle 13 gefunden werden.

Tabelle 13: Peptidansatz, Ausbeute [%] und Peptidreinheit [%] korreliert mit den Syntheseparametern Herzbeladung, Ansatzgröße [mmol], Maximaltemperatur ($T_{Max.}$), Anzahl der Reaktionstemperaturen unter 80°C ($n < 80^\circ\text{C}$) sowie die Anzahl der Reaktionsschritte im optimalen Bereich zwischen 75°C und 80°C ($n_{opt.}$) im Vergleich zur Gesamtzahl an Reaktionsschritten ($n_{Ges.}$) der Peptide $N_3\text{-CH}_2\text{-CO-K}_{Mca}\text{RQLRVVGGK}_{Dnp}\text{K}_{N_2}\text{G-OH}$.

Ansatz	Ausbeute [%]	Ansatzgröße [mmol]	Harz Beladung	$T_{Max.}$ [$^\circ\text{C}$]	$n < 80^\circ\text{C} / n_{Ges.}$	Reinheit [%]	$n_{opt.} / n_{Ges.}$
1 $N_3\text{-}$	28	0.5	Hoch	81	23/25	45	2/25
2 $N_3\text{-}$	63	0.5	Gering	80	25/25	81	22/25

Wie aus Tabelle 13 ersichtlich wird, liegt der Grund für die geringe Ausbeute von Ansatz 1 hier offensichtlich nicht an der Überschreitung von 80°C . Dabei führte die Verwendung von Harz mit geringer Beladung („LL-Resin“, 0.33 mmol/g) zu wesentlich höheren Ausbeuten als die Verwendung des bisher eingesetzten Harzes mit hoher Beladung (0.79 mmol/g). Betrachtet man die Anzahl der Reaktionsschritte im optimalen Bereich, ist dieser Wert ($2/25$) bei Ansatz 1 ungewöhnlich niedrig. Dies erklärt auch die niedrige Reinheit. Die Reinheit wurde durch HPLC bestimmt und konnte durch Anpassung der Reaktionstemperaturen und dem Einsatz von Harz mit geringer Beladung auf $\geq 81\%$ gesteigert werden.

10.6.1.3 Enzymatische Spaltung von $N_3\text{-CH}_2\text{-CO-K}_{Mca}\text{RQLRVVGGK}_{Dnp}\text{K}_{N_2}\text{G-OH}$

Als nächstes wurde die Peptidsequenz auf ihre enzymatische Spaltbarkeit getestet. Dazu wurde das Peptid gelöst und zu einer Zellkultur aus Hepsin-exprimierenden Zellen (LNCaP) gegeben.

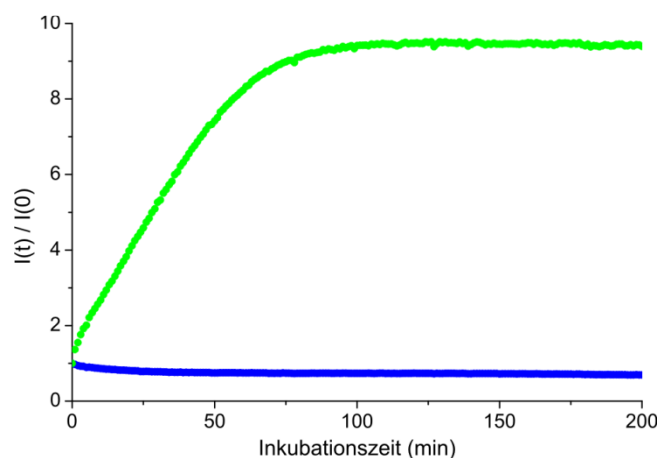


Abbildung 93: Anstieg der relativen Fluoreszenz bei der Spaltung von $N_3\text{-CH}_2\text{-CO-K}_{Mca}\text{RQLRVVGGK}_{Dnp}\text{K}_{N_2}\text{G-OH}$ durch Hepsin in Zellkultur (Messung durch Niklas Kotman).

In Abbildung 93 ist der Anstieg der relativen Fluoreszenz bei der Spaltung von $N_3\text{-CH}_2\text{-CO-K}_{\text{Mca}}\text{RQLRVVGGK}_{\text{Dnp}}\text{K}_{\text{N}_2}\text{G-OH}$ dargestellt (grün). Die Negativkontrolle mit reinem Puffer ist blau dargestellt. Bei der grünen Kurve ist bereits nach 25 min ein Anstieg der Fluoreszenz um das Dreifache zu sehen, nach 100 min ist das Maximum der Fluoreszenz erreicht. Diese sehr kurze Zeitspanne ist ein großer Vorteil für den gewünschten untersuchungsnahen Befund der späteren Krebsfrüherkennungsmethode. Somit konnte gezeigt werden, dass die Spaltungssequenz offensichtlich tolerant gegenüber der erneuten Modifikation des Peptids und weiterhin eine enzymatische Spaltung möglich ist.

10.6.1.4 Dipropargylfunktionalisiertes Peptid - $\text{H}_2\text{N-PraK}_{\text{Mca}}\text{RQLRVVGGK}_{\text{Dnp}}\text{PraG-OH}$

Das entsprechende propargylfunktionalisierte Peptid $\text{H}_2\text{N-PraK}_{\text{Mca}}\text{RQLRVVGGK}_{\text{Dnp}}\text{PraG-OH}$ konnte mithilfe des kommerziell bezogenen *N*- α -Fmoc-L-Propargylglycins synthetisiert werden (siehe Abbildung 94).

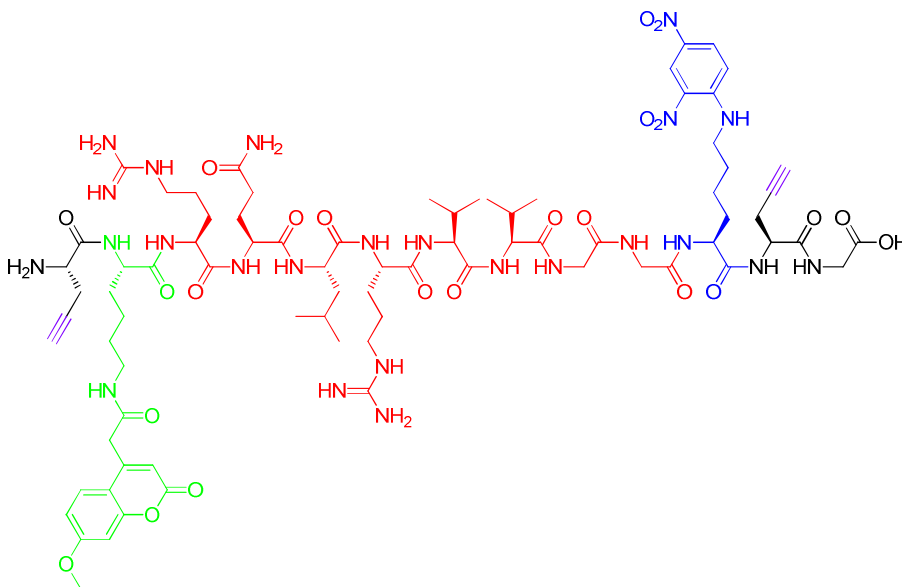


Abbildung 94: Struktur von $\text{H}_2\text{N-PraK}_{\text{Mca}}\text{RQLRVVGGK}_{\text{Dnp}}\text{PraG-OH}$.

Die Struktur wurde mittels ^1H -, ^{13}C -NMR-Spektroskopie und MALDI TOF-MS verifiziert und die Reinheit durch HPLC als $\geq 92\%$ bestimmt. Im ^1H -NMR-Spektrum treten neben den Signalen der Hepsin-spaltbaren Sequenz (siehe 10.4.1) sowie des FRET-Paares (siehe 10.5.1) die Signale des Propargylglycins auf. Die entsprechenden Protonen findet man zwischen 2.82 und 3.16 ppm. Im ^{13}C -NMR-Spektrum bietet sich das gleiche Bild, hier treten die Signale des Alkin-Linkers bei 21.62, 21.66, 52.66, 52.81, 72.92, 77.91 und 80.51 ppm auf.

10.6.1.5 Analyse der Reaktionsparameter der Synthese von $\text{H}_2\text{N-PraK}_{\text{Mca}}\text{RQLRVVGGK}_{\text{Dnp}}\text{PraG-OH}$

Eine detaillierte Erklärung der Einflüsse der Reaktionsparameter erfolgte in Abschnitt 10.3.1.1. Ein Überblick über alle Ansätze für die Synthese von $\text{H}_2\text{N-PraK}_{\text{Mca}}\text{RQLRVVGGK}_{\text{Dnp}}\text{PraG-OH}$ kann in Tabelle 14 gefunden werden.

Tabelle 14: Peptidansatz, Ausbeute [%] und Peptidreinheit [%] korreliert mit den Syntheseparametern Ansatzgröße [mmol], Harzbeladung, Maximaltemperatur (T_{Max}), Anzahl der Reaktionstemperaturen unter 80°C ($n < 80^\circ\text{C}$) sowie die Anzahl der Reaktionsschritte im optimalen Bereich zwischen 75°C und 80°C ($n_{\text{opt.}}$) im Vergleich zur Gesamtzahl an Reaktionsschritten ($n_{\text{Ges.}}$) des Peptids $\text{H}_2\text{N-PraK}_{\text{Mca}}\text{RQLRVVGGK}_{\text{Dnp}}\text{PraG-OH}$.

Ansatz	Ausbeute [%]	Ansatzgröße [mmol]	Harz Beladung	T_{Max} [$^\circ\text{C}$]	$n < 80^\circ\text{C} / n_{\text{Ges.}}$	Reinheit [%]	$n_{\text{opt.}} / n_{\text{Ges.}}$
1 $\text{H}_2\text{N-}$	27	0.5	Hoch	80	25/25	52	1/25
2 $\text{H}_2\text{N-}$	90	0.5	Gering	79	25/25	92	22/25

Wie aus Tabelle 14 ersichtlich wird, liegt der Grund für die geringe Ausbeute von Ansatz 1 hier ebenfalls nicht an der Überschreitung von 80°C . Die Verwendung von Harz mit geringer Beladung („LL-Resin“, 0.33 mmol/g) führte erneut zu wesentlich höheren Ausbeuten als die Verwendung des Harzes mit hoher Beladung (0.79 mmol/g). Betrachtet man die Anzahl der Reaktionsschritte im optimalen Bereich, ist dieser Wert ($1/25$) bei Ansatz 1 wieder ungewöhnlich niedrig. Dies erklärt erneut die niedrigere Reinheit. Die Reinheit wurde durch HPLC bestimmt und konnte durch Anpassung der Reaktionstemperaturen und dem Einsatz von Harz mit geringer Beladung auf $\geq 92\%$ gesteigert werden.

10.6.1.6 Enzymatische Spaltung von $\text{H}_2\text{N-PraK}_{\text{Mca}}\text{RQLRVVGGK}_{\text{Dnp}}\text{PraG-OH}$

Wird das Peptid zu einer Zellkultur aus Hepsin-exprimierenden Zellen (LNCaP) gegeben, erfolgt erneut ein Anstieg der Fluoreszenz (siehe Abbildung 95).

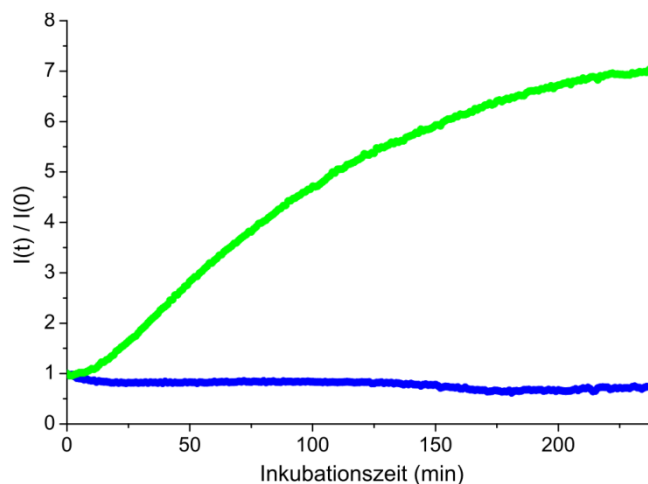


Abbildung 95: Anstieg der relativen Fluoreszenz bei der Spaltung von $\text{H}_2\text{N-PraK}_{\text{Mca}}\text{RQLRVVGGK}_{\text{Dnp}}\text{PraG-OH}$ durch Hepsin in Zellkultur (Messung durch Niklas Kotman).

Nach 1 h ist bereits ein Anstieg um das Dreifache zu sehen, nach 4 h ist die relative Fluoreszenz um das Siebenfache angestiegen. Vergleich man die Kurve mit Abbildung 93 lässt sich ein langsamerer Anstieg der relativen Fluoreszenz erkennen. Daraus lässt sich schließen, dass die Modifikation mit *N*- α -Fmoc-L-Propargylglycin die Enzymerkennung stärker einschränkt als die Modifikation mit den Azidokomponenten. Dies könnte auf die hydrophobere Natur des Propargylrestes zurückzuführen sein. Trotzdem zeigt sich, dass die Veränderungen an der Erkennungssequenz die Spaltung nicht gänzlich unterbinden.

10.6.2 Die azido- oder propargylfunktionalisierte hydrophobe Komponente

Die für die Kapselsynthese nötigen hydrophoben Comonomere konnten ebenfalls synthetisch oder kommerziell erhalten werden (siehe Abbildung 96).

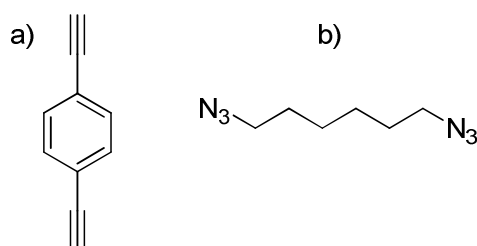


Abbildung 96: Struktur von a) 1,4-Diethinylbenzol und b) 1,6-Diazidohexan.

1,4-Diethinylbenzol konnte kommerziell bezogen werden, 1,6-Diazidohexan wurde ausgehend von 1,6-Dibromhexan mit einer Ausbeute von 89% dargestellt. ¹H-, ¹³C-NMR-Spektroskopie und MALDI TOF-MS dienten als Nachweis der erfolgreichen Synthese. Vergleicht man die ¹H-NMR-Spektren von Edukt und Produkt, ist eine deutliche Tieffeldverschiebung der CH₂-Gruppe in Nachbarschaft der Azidogruppe, von 3.54 ppm nach 3.31 ppm zu beobachten. Im ¹³C-NMR-Spektrum tritt der Kohlenstoff in Nachbarschaft der Azidogruppe, tieffeldverschoben bei 50.55 ppm auf. Im IR-Spektrum ist das Auftreten der N₃-Bande bei 2097 cm⁻¹ deutlich zu erkennen.

10.6.3 Synthese der Nanokapseln

10.6.3.1 Reaktion in Homophase

Um die geeigneten Parameter für die Click-Reaktion zu evaluieren, wurde eine Modellreaktion in Lösung durchgeführt. Die Reaktion erfolgte in DMSO-d₆, um die Reaktionsprodukte direkt mittels ¹H-NMR-Spektroskopie untersuchen zu können. 1,4-Diethinylbenzol wurde äquimolar mit 1,6-Diazidohexan in DMSO-d₆ gelöst und mit dem Cu(II)-Katalysator versehen. Die Reaktion ist Sauerstoff-empfindlich, da die reaktive Cu(I)-Spezies durch Sauerstoff zum inaktiven Cu(II) oxidiert wird. Daher wurde die Lösung entgast und unter Schutzgas zum Reduktionsmittel Sn(II) gegeben. Nach Ende der Reaktion resultierte ein weißer Niederschlag, der auf die Bildung eines Polymers schließen lässt. Der lösliche Anteil wurde mittels ¹H-NMR-Spektroskopie untersucht. Dabei traten alle zu erwartenden Signale auf, signifikant ist vor allem das Signal bei 8.65 ppm, was dem sich bildenden Triazolring zugeordnet werden kann. Die Integrale der Einzelkomponenten traten jedoch nicht wie erwartet im Verhältnis 1:1, sondern im Verhältnis 1:0.5 auf. Da jedoch angenommen werden kann,

dass der ausgefallene, unlösliche Feststoff das eigentliche Polymer darstellte, wurden mittels ^1H -NMR-Spektroskopie nur Oligomere detektiert, bei denen die Verhältnisse der Integrale von denen des Polymers abweichen. Das Molekulargewicht des Polymers konnte aufgrund der Unlöslichkeit in THF und DMF nicht bestimmt werden. Ein Hinweis auf eine erfolgreiche Reaktion konnte allerdings mittels IR-Spektroskopie erhalten werden. Hier war nur noch ein schwaches Signal der Azidogruppe zu sehen.

Diese Modellreaktion zeigte, dass das gewählte Verhältnis von Cu(II) und dem Reduktionsmittel Sn(II) sowie das Arbeiten unter Schutzgas und bei RT für die Click-Reaktion geeignet waren.

10.6.3.2 Reaktion in inverser Miniemulsion

Für die Synthese der Nanokapseln wurde das Lösemittel verändert und auf die Erfahrungen aus der Synthese der vorangegangenen Generationen an Nanopartikeln zurückgegriffen. DMF sollte erneut als innere Phase dienen. Da die Click-Reaktion bei RT durchführbar ist, wurde Isooctan durch Cyclohexan ersetzt werden, da bedingt durch dessen niedrigeren Siedepunkt eine spätere Entfernung schneller durchgeführt werden kann.

Somit boten sich als die zwei möglichen Syntheserouten für Kapseln an: $\text{PraK}_{\text{Mca}}\text{RQLRVVGGK}_{\text{Dnp}}\text{PraG}$ in DMF für die innere Phase, in Kombination mit 1,6-Diazidohexan in Cyclohexan für die äußere Phase bzw. $\text{N}_3\text{-CH}_2\text{-CO-K}_{\text{Mca}}\text{RQLRVVGGK}_{\text{Dnp}}\text{K}_{\text{N}_2}\text{G-OH}$ in DMF für die innere Phase, in Kombination mit 1,4-Diethinylbenzol in Cyclohexan für die äußere Phase.

Als erste Syntheseroute wurde $\text{PraK}_{\text{Mca}}\text{RQLRVVGGK}_{\text{Dnp}}\text{PraG}$ und 1,6-Diazidohexan zu Kapseln umgesetzt. Es stellte sich jedoch heraus, dass bei der propargylfunktionalisierten, Hepsin-spaltbaren Sequenz DMSO besser als Lösemittel geeignet war. Bei dem Versuch, das Peptid wie bisher in DMF zu lösen, kam es nach wenigen Sekunden zu einer Gelbildung. In DMSO trat dieser Effekt nicht auf.

Da Kapseln synthetisiert werden sollten, sollte das hydrophobe Polymer bei dessen Bildung eine Phasenseparation unterlaufen, um so eine Kapsel und keinen Partikel aufzubauen. Aus dieser Überlegung heraus wurde wässrige NaCl-Lösung zur Peptidlösung gegeben, um eine Phasenseparation zu erzwingen. Nach wenigen Minuten trat hier vor der Behandlung mit Ultraschall Gelierung auf. Da es aufgrund der funktionellen Gruppen der Peptidsequenz denkbar war, dass Wasserstoffbrücken für die Gelbildung verantwortlich sind, wurde das Lösemittel vorher mit DIEA versetzt, um durch das basische Milieu Wasserstoffbrücken zu unterbinden. Trotz dieser Maßnahme kam es bei Zugabe von wässriger NaCl-Lösung erneut zur Gelierung. Eine weitere Ursache für die Gelbildung könnte in der aromatischen Struktur des FRET-Paares liegen, was in Kombination mit der Peptidsequenz zu starken π - π -Wechselwirkung führen könnte.²⁶² Um dies auszuschließen, wurde das FRET-Paar gegen weitere Einheiten Propargylglycin ausgetauscht.

Nachdem $\text{Pra}_2\text{RQLRVVGGPra}_2\text{G}$ in DMSO und wässriger NaCl-Lösung gelöst wurde, wurde Cu(II) zugegeben (innere Phase). Als äußere Phase diente 1%-ige P(B/E-*b*-EO)-Lösung mit

1,6-Diazidohexan in Cyclohexan. Nach Ultraschallbehandlung und Entfernung des Sauerstoffs aus der Dispersion wurde diese unter Schutzgas zu Sn(II) gegeben. Nach 24 h Reaktion bei RT wurde die Tröpfchengröße in Cyclohexan mittels Photonen-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (PCCS) bestimmt. Nach Überführung der Dispersion in Wasser und Entfernung des Cyclohexans wurden erneut die Kapseldurchmesser bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 97 aufgeführt.

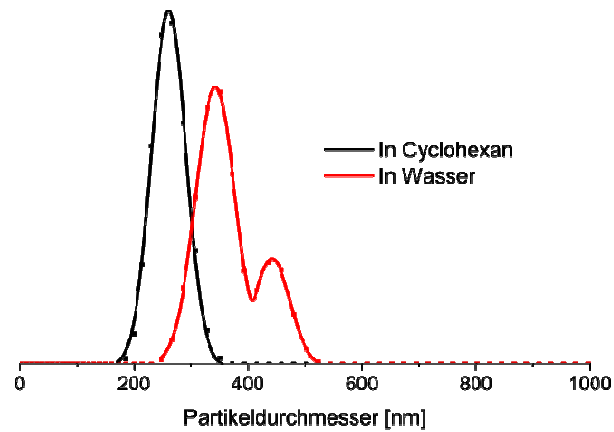


Abbildung 97: Kapseldurchmesser der Pra₂-RQLRVGGPra₂G-Kapseln(PCCS, Intensitätsverteilung).

Aus Abbildung 97 ist zu erkennen, dass der Kapseldurchmesser von 270 nm in Cyclohexan (X_{50}), bei der Überführung in Wasser deutlich zunahm und eine bimodale Verteilung aufwies (Maxima bei 340 und 440 nm). Dies war ein Hinweis auf eine einsetzende Destabilisierung der Dispersion.

Eine Untersuchung der Suspension auf Kapseln erfolgte mittels REM. Statt der erwarteten partikulären bzw. kapselartigen Strukturen war jedoch auf den REM-Aufnahmen nur ein Film zu erkennen. Außerdem resultierte nach einem Tag eine rote Lösung statt einer lila Dispersion, was andeutete, dass der Versuch, Sulforhodamin 101 zu verkapseln bislang fehlschlug. Daraus lässt sich schließen, dass keine dichten Kapseln erhalten wurden und die Dispersion nicht lange stabil war.

10.6.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der 4. Generation

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass für die vollständige Ausarbeitung der 4. Generation an Enzym-spaltbaren Nanokapseln noch weitere Untersuchungen angestellt werden müssen. Ausgehend von den hier gezeigten grundlegenden Peptiden und Monomerstrukturen sollte es möglich sein, Kapseln aufzubauen. Dies könnte durch eine Erhöhung der Anzahl an reaktiven Gruppen am Peptid erreicht werden. Auch eine Multifunktionalisierung der komplementären Monomere ist denkbar. Diese Maßnahme könnte zu einer größeren Vernetzungsdichte und somit zu einem höheren Molekulargewicht des vernetzten Polymers führen. Außerdem muss das Problem des Gelierens in Verbindung mit dem FRET-Paar gelöst werden, um weiterhin eine *in situ*-Detektion der enzymatischen Spaltung durchführen zu können.

11. Experimenteller Teil

In diesem Abschnitt wird neben den verwendeten Materialien und Methoden das experimentelle Vorgehen zur Synthese der einzelnen Verbindungen erläutert. Die analytischen Daten zur Charakterisierung der Komponenten sind in Abschnitt 13.5 aufgeführt.

11.1 Materialien

Alle eingesetzten Lösemittel wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Das eingesetzte Wasser hatte VE-Qualität. Die Monomere wurden vor der Synthese im Vakuum destilliert. Wasserfreie 1.7 M HCl/Ethylacetatlösung wurde durch Destillation von Ethylacetat über Phosphorpentoxid und anschließender Durchleitung von gasförmigem Chlorwasserstoff durch das Destillat erhalten. Getrocknete Lösemittel wurden kommerziell bezogen. Das Tensid Poly(butylen-*co*-ethylen)-*b*-poly(ethylenoxid) - P(B/E-*b*-EO) - für den Einsatz in inverser Miniemulsion, bestand aus einem Poly(butylen-*co*-ethylen) Block ($M_w = 3700$ g/mol) und einem Poly(ethylenoxid)-Block ($M_w = 7300$ g/mol), der ausgehend von „Kraton liquid“ (Shell) synthetisiert wurde. Dazu wurde „Kraton liquid“ in Toluol gelöst und unter anionischen Polymerisationsbedingungen Ethylenoxid zugegeben.²⁶³

Ein Überblick über die eingesetzten Chemikalien kann in Abschnitt 13.3 erhalten werden.

11.2 Geräte und Probenvorbereitung

11.2.1 Festphasenpeptidsynthese mit automatisiertem Mikrowellensystem

Die Synthese der Peptide erfolgte mit einem zwei Komponentensystem der Firma CEM, bestehend aus einer Dosiereinheit (Liberty) und einer Mikrowelleneinheit (Discover) (siehe Abbildung 98a). Alle gelösten Reagenzien, das Harz (75 - 150 μm) in DMF und die Lösemittel wurden an die Dosiereinheit angeschlossen. Die Vor- und Nachbereitung der Reaktion ist in Abschnitt 11.4.4 beschrieben.

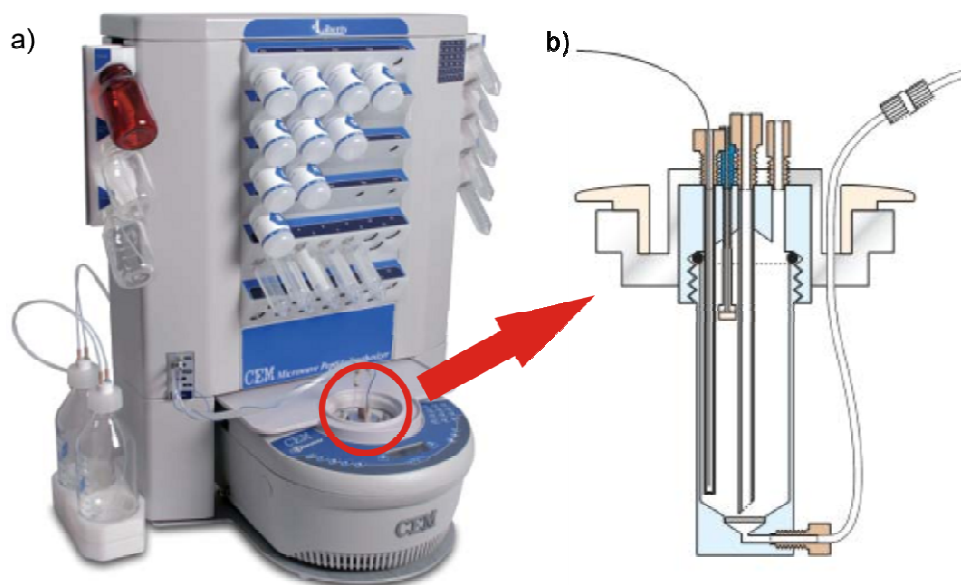


Abbildung 98: a) Automatisierter Peptidsynthesizer mit Mikrowelle, b) Reaktionsgefäß für die SPPS.²⁶⁴

Das Reaktionsgefäß (siehe Abbildung 98b) befindet sich in der Mikrowelleneinheit, die die notwendigen Reaktionstemperaturen erzeugt. Der Reaktionsraum ist so dimensioniert, dass sein Durchmesser (7.5 cm) genau der Wellenlänge der Strahlung entspricht, wodurch eine konstante Temperatur im gesamten Reaktionsraum gewährleistet wird. Das Reaktionsgefäß ist so konzipiert, dass von oben durch eine Sprühdüse die Zugabe von Lösemittel und Reagenzien erfolgen kann. Am Boden befindet sich ein Filter, dessen Porengröße auf das Harz abgestimmt ist ($< 75 - 150 \mu\text{m}$). Durch ihn wird überschüssiges Reagenz nach der Reaktion bzw. Lösemittel nach den Waschschrritten entfernt. Außerdem wird das Reaktionsgefäß während der Reaktion von unten mit Stickstoff durchspült, um so eine gute Durchmischung des Reaktionsmediums zu gewährleisten. Die Zugabe von Lösemittel, Harz und Reagenzien erfolgt durch Stickstoffüberdruck.

Nach Start der Synthese wird das Harz in das Reaktionsgefäß transportiert und 900 s in DMF gequollen. Nach Entfernung des Lösemittels wird Piperazinlösung zugegeben und in 30 s auf $40 \text{ }^\circ\text{C}$ geheizt („Initial deprotection“). Anschließend wird die Lösung entfernt, mit DMF gewaschen und erneut Piperazinlösung zugegeben. Nachdem innerhalb von 90 s auf $75 \text{ }^\circ\text{C}$ geheizt und diese Temperatur für weitere 90 s gehalten wurde („Deprotection“), wird die Lösung entfernt und das Harz fünfmal mit DMF gewaschen. Die Kupplung der Aminosäure an das wachsende Peptid erfolgt durch die sequentielle Zugabe der Aminosäurelösung, des Kupplungsreagenzes und der Base. Dann wird das Reaktionsgemisch in 90 s auf $75 \text{ }^\circ\text{C}$ geheizt und nach weiteren 210 s bei dieser Temperatur („Coupling“) die Reagenzien entfernt und das Harz fünfmal mit DMF gewaschen. Dieser Zyklus aus Entschützung und Kupplung (siehe Abbildung 1, Abschnitt 2) wird so lange durchgeführt, bis die gewünschte Peptidlänge erreicht ist. Am Ende der Sequenz ist es möglich, die Fmoc-Schutzgruppe zu entfernen („Deprotection“) und den freien Peptid N-Terminus zu erhalten oder diesen Fmoc-geschützt zu lassen. Abschließend wird das Harz in ein separates Gefäß gefüllt und durch Zugabe von DCM geschrumpft.

11.2.2¹H- und ¹³C-Kernspinresonanzspektroskopie

Alle NMR-Spektren wurden an einem Bruker DRX Spektrometer 300 oder 500 aufgenommen, wobei bei 300.13 bzw. 500.13 MHz (¹H) oder 75.47 MHz (¹³C) eingestrahlt wurde. Kalibrierung der Protonenspektren erfolgte auf das angegebene Lösemittelsignal (DMSO-d₆ bei 2.50 ppm), wobei die Angabe der chemischen Verschiebung in ppm (δ -Maßstab) erfolgt. Die Temperatur wurde konstant bei 298.3 K gehalten. Die Angaben sind wie folgt angegeben: „chemische Verschiebung (Multiplizität, Kopplungskonstanten, Protonenzahl)“.

Bei Angabe der Kopplungskonstanten (J in Hz) erfolgte die Analyse der Spinsysteme nach erster Ordnung. Abkürzungen für die Peakmultiplizität wurden wie folgt angegeben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, m = Multipllett, wobei bei einem sehr breiten Signal ein b voran geschrieben wurde. Für die Probenvorbereitung löste man jeweils 30 mg Substanz in 0.55 mL deuteriertem Lösemittel und füllte sie in ein Probenröhrchen ($d = 4 \text{ mm}$).

Für die quantitativen Messungen diente das Natriumsalz von 3-Trimethylsilyl-1-propansulfonsäure (DSS: (4,4-Dimethyl-4-silapentan-1-sulfonsäure) als Referenz. Zwischen den 90° - ^1H -Pulsen betrug der „Relaxationsdelay“ 30s.

11.2.3 Diffusionsabhängige Kernspinresonanzspektroskopie

Die DOSY-NMR-Messungen erfolgten an einem Bruker Avance-III 700 MHz NMR-Spektrometer mithilfe eines 5 mm BBI $^1\text{H}/\text{X}$ z-Gradienten Probenkopfs mit einer Gradientenfeldstärke von

5.35 G/mm. Die Kalibrierung erfolgte über das Referenzsystem $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$, indem bei 298.3 K der experimentelle Diffusionskoeffizient mit dem theoretischen abgeglichen wurde. Es wurde die „Bruker Topspin 2.1“ Auswertesoftware verwendet. Zur Bestimmung der exakten Temperatur, diente ein ^1H -Methanol-Standard. Die Gradientenfeldstärke wurde in 32 bzw. 64 Stufen von 2 bis 100% variiert, wobei eine Diffusionszeit von 30-400 ms und eine Gradientenpulsdauer von 1.1 ms eingesetzt wurde. Für die Diffusionsmessung wurde eine 2D-Sequenz (Bruker Programm: dstebpgp3s) und ein „doppelt stimuliertes Echo“ verwendet, um die Konvektion auszugleichen. Zur Bestimmung des Fehlers der ermittelten Diffusionskoeffizienten wurde die Standardabweichung von Zerfallskurven ausgewählter Protonensignale mittels des „Bruker SimFit Packets“ und entsprechender Diffusionsfitfunktionen angepasst. Die relative Standardabweichung bewegte sich im Bereich von $1 \cdot 10^{-3}$. Als interner Standard diente DMSO-d_6 .

11.2.4 Festkörperkernspinresonanzspektroskopie

Die Festkörper-NMR-Spektren wurden an einem Bruker DSX „wide bore“-Spektrometer mit einer ^1H -Resonanzfrequenz von 300 MHz und einer ^{15}N -Resonanzfrequenz von 30.4 MHz gemessen. Sowohl die ^{15}N -Einzelpulse, als auch die $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -Kreuzpolarisationsspektren wurden mittels eines 4 mm MAS („magic angle spinning“-)Rotor und einer Drehfrequenz von 10 kHz aufgenommen. Für die Einzelpulsmessungen wurde eine ^{15}N -Anregungspulszeit von 1.25 μs eingesetzt, was einem 22.5° -Puls entsprach. Die Durchführung der Kreuzpolarisationsexperimente erfolgte mit einer Protonenanregungspulsdauer von 5 μs und einer Kreuzpolarisationskontaktzeit von 5 ms, um einen effizienten Übertrag der Polarisation von den Protonen auf die Stickstoffatome zu gewährleisten.

11.2.5 Matrix-assistierte Laser-Desorptions-Ionisations-Flugzeitmassenspektrometrie

Das Massenspektrum (MS) der organischen Komponenten wurde mittels MALDI unter Verwendung eines Bruker-Daltonics Reflex-TOF Spektrometers erhalten und dabei ein Stickstofflaser (337 nm, 3 - 5 ns Puls) sowie eine Beschleunigungsspannung von 15 und 35 kV eingesetzt. Dithranol diente als Matrix.

11.2.6 Gelpermeationschromatographie

Zur Bestimmung der Molekulargewichte der Polymere wurde für die GPC 1 mg Feststoff in 1 mL DMF bzw. THF gelöst und mit einem Teflonspritzenfilter (Porengröße 0.45 μm) filtriert. Die

Probeninjektion erfolgte durch einen 717plus Autosampler (Waters) bei einer konstanten Temperatur von 60 °C für DMF bzw. 30 °C für THF. Die Flussrate hatte einen Wert von 1 mL/min. Bei beiden Anlagen wurde eine P580-Pumpe von Dionex verwendet. Für THF wurden drei SDV-Säulen (PSS), mit einer Größe von 300 · 80 mm, Partikelgrößen von 10 µm und Porengrößen von 10⁶, 10⁴ und 500 Å eingesetzt. Für DMF kamen drei GRAM-Säulen (PSS) zum Einsatz mit einer Größe von 300·80 mm, Partikelgrößen von 10 µm und Porengrößen von 10⁶, 10⁴ und 10³ Å. Zur Signalaufnahme diente ein RI-101-Detektor (ERC) sowie ein UV-Detektor S-3702 (Soma). Polystyrol wurde als Standard eingesetzt.

11.2.7 Hochleistungsflüssigchromatographie

Zur Bestimmung der Produktreinheit wurden für die HPLC 1.5 mg der Probe in 1 mL THF und der notwendigen Menge an 0.1%iger TFA in H₂O gelöst. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus THF und 0.1%iger TFA in H₂O. Dabei wurde ein Gradient über 10 min, ausgehend von einem Verhältnis von 20:80 (THF/0.1% TFA) bis zu einem Verhältnis von 100:0 (THF/0.1% TFA) verwendet. Die Flussrate betrug 1.0 mL/min. Als Pumpe wurde eine „Series 1100“ (Hewlett Packard), als Säule eine RP-HD C₈-modifizierte Kieselgelsäule (Macherey Nagel) eingesetzt. Die Probeninjektion erfolgte dabei durch einen Autosampler „Series 1200“ (Agilent Technologies). Die Substrate wurden über einen UV-Vis-Detektor S-3702 (Soma) bei 220 bzw. 260 nm detektiert.

11.2.8 Rasterelektronenmikroskopie

REM-Bilder wurden an einem Gemini 1530 (Carl Zeiss AG) mit einem „InLens“-Detektor aufgenommen. Zur Probenvorbereitung wurden 2.5 µL verdünnter Dispersion auf einen Siliziumwafer getropft.

11.2.9 Photonen-Kreuzkorrelations-Spektroskopie

Die Partikeldurchmesser in den Dispersionen wurde bei 25 °C an einem Nanophox Photon-Kreuzkorrelationssensor (Sympatec GmbH) mit einem HeNe-Laser ($\lambda = 632.8$ nm) bei einem Streuwinkel von je 90° gemessen. Für die Messung wurden 50 µL der Dispersion mit 1.5 mL Wasser verdünnt. Die Korrelationsfunktion wurde mit der „Auto-NNLS Robust“ Methode ausgewertet. Die Ergebnisse sind in dieser Arbeit als Gaussfunktionen aufgetragen. Der mittlere Partikeldurchmesser (X_{50}) kann aus dem Kurvenmaximum abgelesen werden. Durch einen Vergleich der Signalbreite kann die Partikelgrößenverteilung bestimmt werden.

11.2.10 Ultraschallbehandlung

Für die Darstellung der Miniemulsionen wurde der Ultraschallgenerator Sonifier 450D der Firma Branson mit einer 1/2“ oder 1/8“-Metallspitze verwendet. Die verwendeten Pulsdauern sind im Einzelnen bei den entsprechenden Experimenten beschrieben.

11.2.11 Infrarotspektroskopie (IR)

Zur Aufnahme der IR-Spektren wurden KBr-Platten bzw. KBr-Presslinge verwendet. Die Messung erfolgte an eine FT-IR Spektrometer, Spektrum BX (Perkin Elmer) zwischen 400 und 4000 cm^{-1} .

11.2.12 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Bei dem eingesetzten CLS-Mikroskop handelte es sich um ein Leica SP5 II-System mit einem DMI6000 CS-Grundkörper. Dieser war mit fünf Lasern ausgestattet, einem Multiline-Argonlaser mit 458, 476, 488, 496 und 514 nm, einem DPSS 561 nm-Laser, einem HeNe-Laser mit 494 bzw. 633 nm und einem 592 nm CWSTED-Laser mit einer HCX PL APO CS 63x /1.4 - 0.6 Öllinse (Leica). Der Farbstoff wurde mit 633 nm angeregt und die Emission zwischen 643 und 750 nm detektiert.

11.3 Methoden

11.3.1 Ninhydrintest

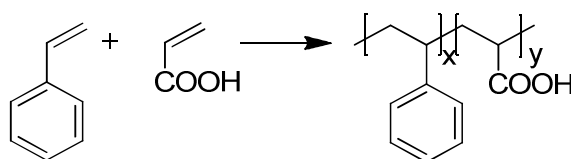
Zur Detektion freier Amine wurden 2 mL der Ninhydrin-Lösung nach Stahl (Sigma-Aldrich) mit 20 mg Probe versetzt und das Gemisch bis zum Sieden erhitzt. Eine lila Färbung zeigte die Anwesenheit von Aminogruppen. Bei jeder Probe wurden parallel eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle durchgeführt. Die Nachweisgrenze für Amine wurde mit einem Amin bekannter Konzentration ermittelt und als 5 $\mu\text{mol/g}$ bestimmt. Bei einem negativen Ninhydrintest beträgt die Produktreinheit somit 99.9%.

11.4. Synthesen

11.4.1 Polymersynthese

11.4.1.1 Carboxylfunktionalisierte Polymere

a) Allgemeine Vorschrift für die Synthese von Poly(styrol-co-acrylsäure)



Destilliertes Styrol, destillierte Acrylsäure und AIBN wurden in Ethanol gelöst (siehe Tabelle 15) und $\frac{1}{2}$ h Argon hindurchgeleitet. Die Reaktion wurde anschließend für 18 h bei 80 °C unter Schutzgas durchgeführt. Nach Ende der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch in ein Eisbad gestellt, der Überstand vom ausgefallenen Produkt abdekantiert, der Niederschlag in THF gelöst und durch Eintropfen in ein Wasser/Ethanol-Gemisch (1:1) ausgefällt. Das Rohprodukt wurde in wenig THF gelöst und erneut durch Eintropfen in ein Wasser/Ethanol-Gemisch (1:1) ausgefällt. Das Produkt wurde filtriert, mit dem Wasser/Ethanol-Gemisch (1:1) gewaschen und unter Vakuum getrocknet (weißer Feststoff).

Der Gehalt an Acrylsäure im Copolymer wurde neben der Bestimmung mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie durch Titration bestimmt. Eine definierte Menge Copolymer wurde in einem

11. Experimenteller Teil

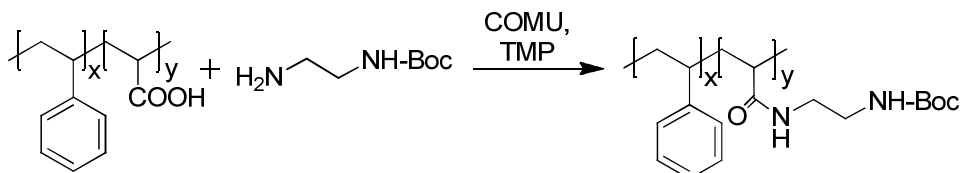
THF/Wasser-Gemisch gelöst, Phenolphthalein zugegeben und mit 0.1 m NaOH bis zum Äquivalenzpunkt titriert. Aus drei Wiederholungen mit verschiedenen Einwaagen wurde der Mittelwert gebildet.

Tabelle 15: Einwaagen und Ausbeute für die Synthese von Poly(styrol-*co*-acrylsäure).

Ansatz:	Acrylsäure	Styrol	AIBN	Ethanol	Ausbeute	
	[g]	[g]	[mg]	[mL]	[g]	[%]
P _S 16-85	4.01	16.02	752	100	13.89	69
P _S 7-88	2.00	18.00	1001	200	7.79	39
P _S 7-96	1.99	18.01	750	100	10.01	50
P _S 7-104	2.00	18.04	753	100	10.30	51
P _S 5-125	1.00	19.00	752	100	13.14	66
P _S 7-131	2.02	18.12	753	100	12.30	61
P _S 7-166	2.02	18.22	502	100	8.81	44
P _S 7-197	2.01	18.00	77	80	13.4	67
P _S 7-494	2.02	18.00	504	40	7.01	35

11.4.1.2 Aminofunktionalisierte Polymere

a) Poly[styrol-*co*-*N*-(2-(*tert*-butyloxycarbonylaminoethyl)acrylamid)] (nach^{265,266})



Poly(styrol-*co*-acrylsäure) und *N*-Boc-Ethyldiamin (Tabelle 16 und Tabelle 17) wurden in einem Gemisch aus DMF/EtOAc (1:1) gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt, die Base und das Kupplungsreagenz zugegeben, 1 h bei 0 °C und weitere 21 h bei RT gerührt. Nach Filtration und Zugabe von EtOAc wurde die organische Phase dreimal mit 1 M H₂SO₄, dreimal mit 5%iger NaHCO₃ und zweimal mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde separiert, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel bei 50 °C unter Vakuum entfernt (gelber Feststoff).

Tabelle 16: Einwaagen und Ausbeute für die Synthese von Poly[styrol-*co*-*N*-(2-(*tert*-butyloxycarbonylaminoethyl)acrylamid)], Teil 1.

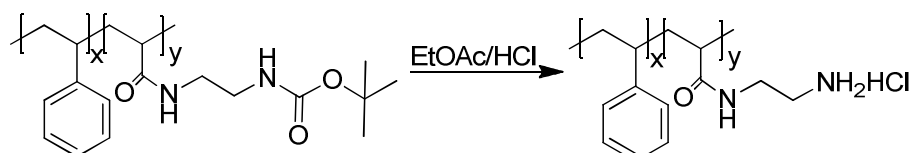
Ansatz	Poly(styrol- <i>co</i> -acrylsäure)		<i>N</i> -Boc-Ethyldiamin		DMF/EtOAc	Ausbeute	
	[g]	[mmol]	[g]	[mmol]	[mL]	[g]	[%]
P _{BA} 5-125	5.00	6.25	2.00	12.48	60	5.44	91
P _{BA} 7-88	4.01	4.56	0.80	4.99	60	4.36	92
P _{BA} 7-104	5.02	6.27	2.01	12.55	60	5.70	95
P _{BA} 7-166	4.00	7.22	1.20	7.49	44	4.54	88

P _{BA} 7-197a	1.00	1.10	0.22	1.37	20	1.06	83
P _{BA} 7-197b	5.03	5.72	1.04	6.49	100	5.45	90

Tabelle 17: Einwaagen und Ausbeute für die Synthese von

Poly[styrol-*co*-*N*-(2-(*tert*-butyloxycarbonylaminoethyl)acrylamid)], Teil 2.

Ansatz	Base	Base		Kupplungsreagenz			Kupplungsadditiv		
		[mL]	[mmol]		[g]	[mmol]		[g]	[mmol]
P _{BA} 5-125	TMP	4.00	3.04	COMU	5.35	12.50	-	-	-
P _{BA} 7-88	DIEA	0.90	0.68	DCC	1.07	5.19	HOBt·H₂O	0.68	4.43
P _{BA} 7-104	TMP	4.00	3.04	COMU	5.39	12.60	-	-	-
P _{BA} 7-166	NEt₃	1.00	7.21	DCC	1.56	7.56	HOBt·H₂O	1.02	6.64
P _{BA} 7-197a	NEt₃	0.20	1.44	DCC	0.33	1.60	HOBt·H₂O	0.18	1.17
P _{BA} 7-197b	NEt₃	0.95	6.85	DCC	1.34	6.49	HOBt·H₂O	1.13	7.36

b) Poly[styrol-*co*-*N*-(2-aminoethyl)acrylamid]-Hydrochlorid (nach ^{265,266})

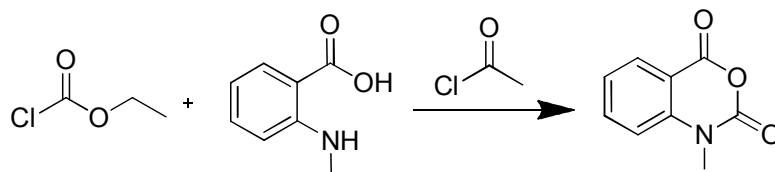
Poly[styrol-*co*-*N*-(2-(*tert*-butyloxycarbonylaminoethyl)acrylamid)] wurde in 1.7 M HCl/Ethylacetat gelöst (siehe Tabelle 18) und für 15 h bei RT gerührt. Nach Verdampfen des Lösemittels wurde das Produkt unter Vakuum getrocknet. Es resultierte das Produkt als Hydrochlorid (gelber Feststoff). Ein positiver Ninhydrintest zeigte die Anwesenheit von Aminogruppen im Produkt.

Tabelle 18: Einwaagen und Ausbeute für die Synthese von Poly[styrol-*co*-*N*-(2-aminoethyl)acrylamid]-Hydrochlorid.

Ansatz	Poly[styrol- <i>co</i> - <i>N</i> -(2-(<i>tert</i> -butyloxycarbonylaminoethyl)acrylamid)]		1.7 M HCl/ Ethylacetat		Ausbeute	
	[g]	[mmol]	[mL]	[mmol]	[g]	[%]
P _A 5-125	5.44	6.25	70	119	5.01	99
P _A 7-88	4.00	4.56	120	204	3.44	93
P _A 7-104	5.20	6.27	140	238	4.52	94
P _A 7-166	3.00	7.22	120	204	2.43	96
P _A 7-197a	1.00	1.10	40	68	0.87	94
P _A 7-197b	5.01	5.72	100	170	4.61	99

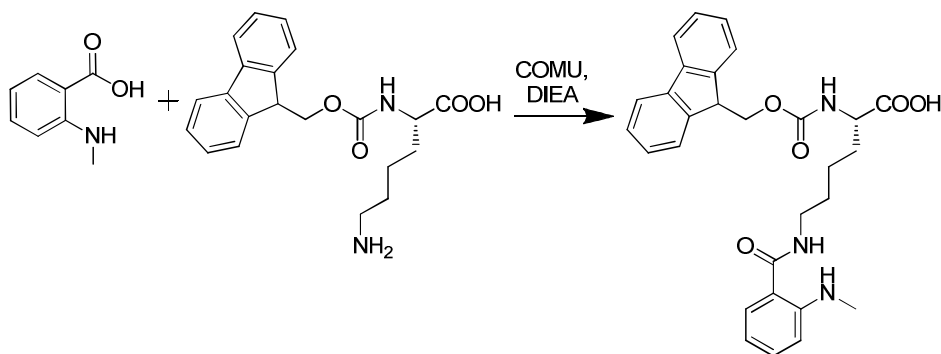
11.4.2 Synthese der fluoreszierenden Aminosäuren

11.4.2.1 *N*-Methylisatosäureanhydrid²⁵⁴



Eine Mischung aus *N*-Methylantranilsäure (10.00 g, 66.16 mmol) und Chlorameisensäureethylester (19.00 mL, 199.46 mmol) wurde 3.5 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde das Gemisch auf RT abgekühlt, Acetylchlorid (5.17 mL, 72.77 mmol) zugegeben und die flüssigen Reagenzien mittels Destillation entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde aus Ethanol umkristallisiert und unter Vakuum getrocknet (brauner Feststoff, 9.49 g, 81%).

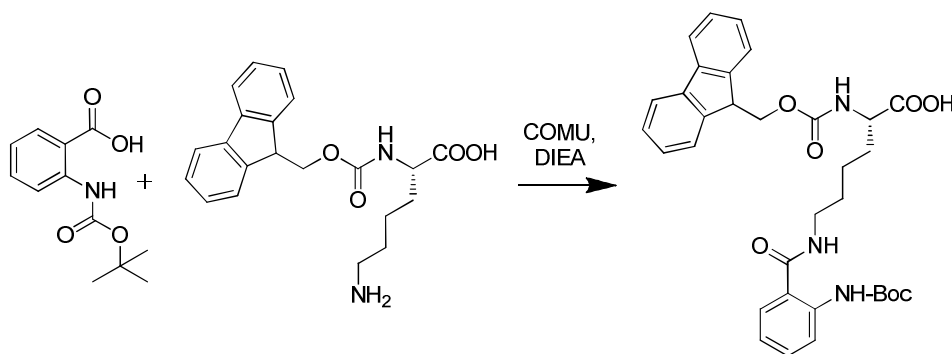
11.4.2.2 *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Methylantraniloyl-L-lysin (nach²⁶⁷)



Eine Lösung aus *N*-Methylantranilsäure (1.97 g, 13.0 mmol), COMU (5.58 g, 13.0 mmol) und *N,N*-Diisopropylethylamin (4.45 mL, 26.1 mmol) in DMF (94 mL) wurde 30 min bei RT gerührt und dann Fmoc-L-Lys-OH (4.00 g, 10.9 mmol) zugegeben. Die resultierende Suspension wurde mit 188 mL DMF verdünnt und für 15 h bei RT gerührt.

Die resultierende Lösung wurde filtriert, mit EtOAc versetzt und jeweils einmal mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung, 1 M H₂SO₄, 5%iger NaHCO₃, 1 M H₂SO₄ und verdünnter wässriger NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde separiert, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter Vakuum entfernt (gelber Feststoff, 3.9 g, 72%).

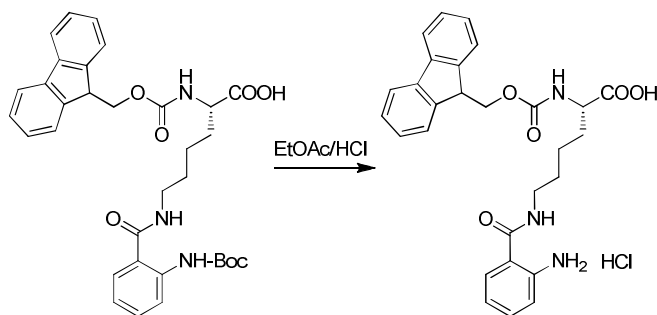
11.4.2.3 *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -(Boc-Anthraniloyl)-L-lysin (nach²⁶⁷)



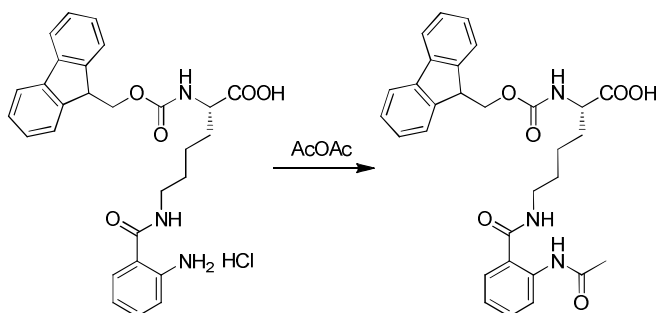
Eine Lösung aus *N*-Boc-Anthranilsäure (3.10 g, 13.07 mmol), COMU (5.60 g, 13.07 mmol) und *N,N*-Diisopropylethylamin (4.55 mL, 26.63 mmol) in 94 mL DMF wurde 30 min bei RT gerührt und dann Fmoc-L-Lys-OH (4.00 g, 10.87 mmol) zugegeben. Die resultierende Suspension wurde mit 188 mL DMF verdünnt und für 14 h bei RT gerührt.

Die resultierende Lösung wurde filtriert, mit 200 mL EtOAc versetzt und einmal mit verdünnter wässriger NaCl-Lösung extrahiert. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und viermal mit je 100 mL und EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden jeweils zweimal mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung, 1 M H₂SO₄, 5%iger NaHCO₃, 1 M H₂SO₄ und einmal mit verdünnter wässriger NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde separiert, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter Vakuum entfernt (gelber Feststoff, 6.25 g, 98%).

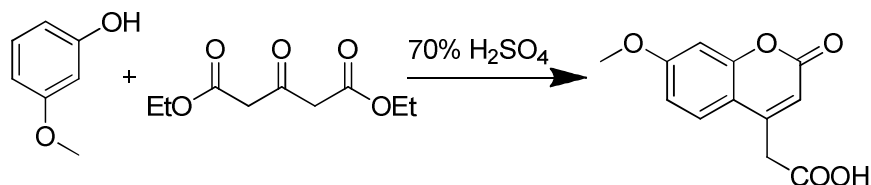
11.4.2.4 *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Anthraniloyl-L-lysin-Hydrochlorid (nach²⁶⁵)



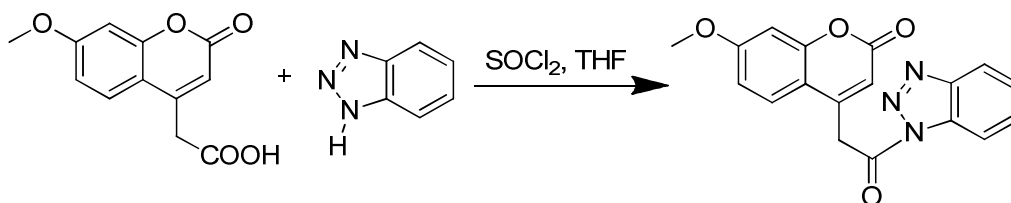
N- α -Fmoc-*N*- ϵ -(Boc-Anthraniloyl)-L-lysin (1.32 g, 2.25 mmol) wurde in 1.7 M EtOAc/HCl gelöst und 19 h bei RT gerührt. Das ausgefallene Rohprodukt wurde filtriert, der Rückstand mit EtOAc gewaschen und der Feststoff unter Vakuum getrocknet (roter Feststoff, 0.88 g, 81%).

11.4.2.5 *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Acetylanthraniloyl-L-lysin(nach³⁶)

Zu *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Anthraniloyl-L-lysin-Hydrochlorid (1.32 g, 2.25 mmol) wurde Essigsäureanhydrid (3.00 mL, 31.71 mmol) gegeben und das Gemisch 2 h bei RT gerührt. Dann wurde die Lösung in Eiswasser gegeben und der resultierende Niederschlag filtriert, mit Wasser gewaschen und gefriergetrocknet (weißer Feststoff, 0.305 g, 75%).

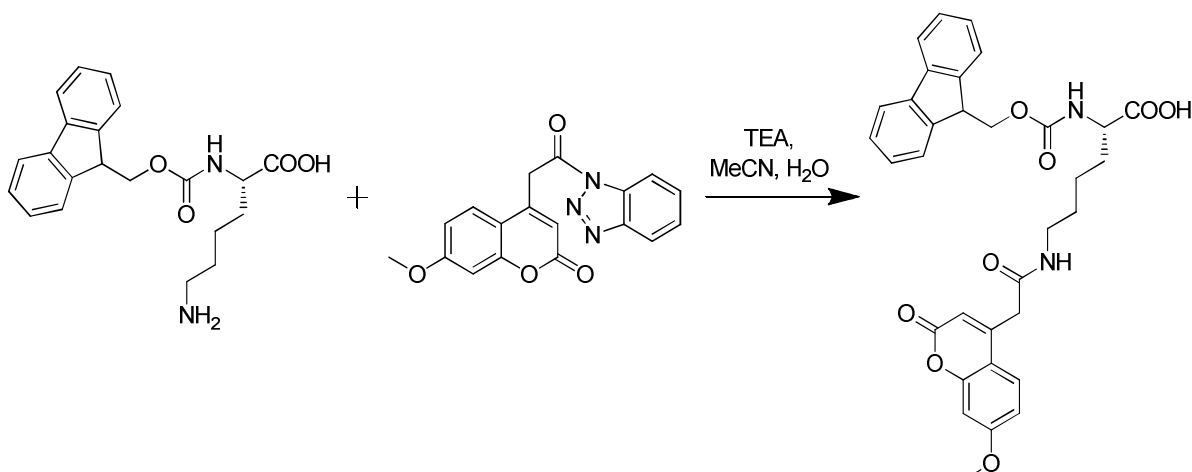
11.4.2.6 7-Methoxycoumarin-4-yl-essigsäure (nach²⁶⁸)

Ein Gemisch aus 3-Hydroxyanisol (6.25 g, 50.4 mmol) und Acetondicarbonsäurediethylester (11.14 g, 55.09 mmol) in 70%iger H₂SO₄ wurde 48 h bei RT gerührt und dann auf 400 mL Eiswasser gegeben. Nach Filtration wurde das Rohprodukt in 5%iger NaHCO₃ gelöst, filtriert und mit konzentrierter HCl gefällt. Nach Filtration wurde das Produkt mit Wasser gewaschen und anschließend gefriergetrocknet (rötlicher Feststoff, 5.98 g, 60%).

11.4.2.7 7-Methoxycoumarin-4-acetyl-1-Benzotriazol (nach²⁶⁹)

Bei 0 °C wurde Thionylchlorid (0.22 mL, 3.0 mmol) zu einer Lösung von 7-Methoxycoumarin-4-yl-essigsäure (0.56 g, 2.4 mmol) in 10 mL trockenem THF gegeben. Das Gemisch wurde 40 min bei 0 °C gerührt. Dann wurde eine Lösung von 1*H*-Benzotriazol (1.22 g, 10.2 mmol) in 10 mL trockenem THF zugegeben und 2 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde entfernt und 40 mL Dichlormethan zugegeben. Unlöslicher Feststoff wurde durch Filtration entfernt und die Lösung mit gesättigter Na₂CO₃ (2 · 50 mL) und gesättigter wässriger NaCl-Lösung (2 · 50 mL) gewaschen. Das Produkt wurde unter Vakuum getrocknet (gelber Feststoff, 628 mg, 78%).

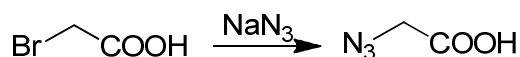
11.4.2.8 *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -(7-Methoxycoumarin-4-acetyl)-L-lysin²⁷⁰



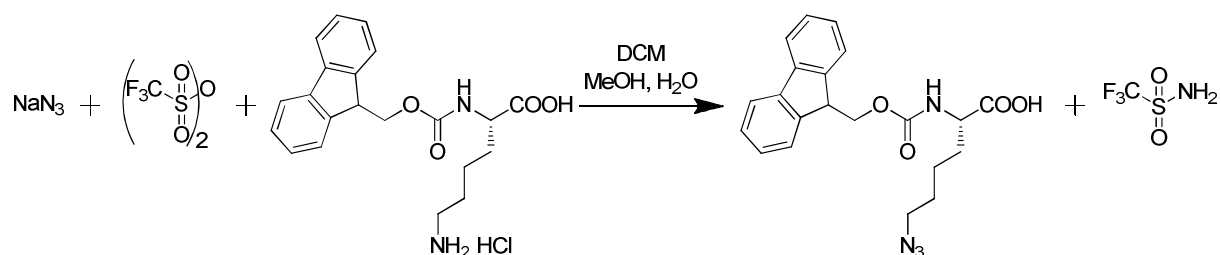
7-Methoxycoumarin-4-acetyl-1-Benzotriazol (0.211 g, 0.90 mmol) in 15 mL THF wurde zu einer Lösung von Fmoc-L-Lys-OH (0.368 g, 1.00 mmol) in 70 mL MeCN:H₂O (7:3) und Triethylamin (141 μ L, 1.00 mmol) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei RT gerührt. 1 mL einer 6 M HCl-Lösung wurde hinzugefügt und Acetonitril unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mit 100 mL EtOAc extrahiert und zweimal mit 6 M HCl-Lösung, gesättigter wässriger NaCl-Lösung sowie Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde separiert, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde nach Umkristallisieren aus THF erhalten (weißer Feststoff, 25 mg, 5%). Der anschließende Ninhydrintest war negativ.

11.4.3 Synthese der Reagenzien zur Verwendung in der Clickchemie

11.4.3.1 Azidoessigsäure²⁷¹



Natriumazid (2.57 g, 39.59 mmol) wurde in 110 mL DMSO 1.5 h bei RT gerührt. Bromoessigsäure (2.62 g, 18.85 mmol) wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch 17 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 125 mL H₂O wurde der pH mithilfe von 2 mL konzentrierter HCl auf 2.5 eingestellt und das Produkt zweimal mit je 200 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit je 200 mL gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Nach Abtrennung der wässrigen Phase wurde die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter Vakuum entfernt (farbloses Öl, 1.46 g, 77%).

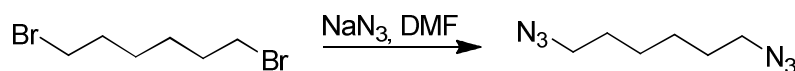
11.4.3.2 *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Azido-L-lysin²⁷²

Da das Zwischenprodukt dieser Reaktion (Triflylazid) explosive Eigenschaften aufweist, wurden fünf separate Ansätze jeweils wie folgt durchgeführt.

Natriumazid (1.45 g, 22.23 mmol) wurde in 4.3 mL Wasser gelöst und nach Zugabe von 7.2 mL Dichlormethan, Trifluormethansulfonsäureanhydrid (1.25 g, 4.45 mmol) langsam zugegeben. Nachdem 2 h bei RT gerührt wurde, trennte man die organische Phase ab und extrahierte die wässrige Phase jeweils zweimal mit 3.6 mL Dichlormethan. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 5%iger NaHCO_3 gewaschen und das so dargestellte Triflylazid ohne weitere Aufreinigung im nächsten Schritt verwendet (ca. 14.4 mL).

Fmoc-L-Lysin-Hydrochlorid (0.90 g, 2.223 mmol), NaHCO_3 (1.87 g, 22.22 mmol) und CuSO_4 (35.5 mg, 0.222 mmol) wurden in 8 mL Wasser und 16 mL Methanol gelöst. Triflylazid in Dichlormethan (14.4 mL) wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch 14 h bei RT gerührt.

Anschließend wurden alle fünf Ansätze vereinigt, das organische Lösemittel unter Vakuum (100 mbar) entfernt, der Rückstand mit 50 mL Wasser verdünnt und der pH-Wert mittels konzentrierter HCl auf den Wert 2 eingestellt. Nach zweimaliger Extraktion mit je 100 mL EtOAc wurden die vereinigten organischen Phasen zweimal mit gesättigter wässriger NaCl -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Kieselgel, Laufmittel: Toluol/EtOAc 3:1 + 1% AcOH) gereinigt und das Lösemittel unter Vakuum entfernt (gelbliches Öl, 3.876 g, 88%).

11.4.3.3 1,6-Diazidohexan²⁷³

Natriumazid (3.96 g, 60.91 mmol) wurde zu einer Lösung von 1,6-Dibromhexan (4.96 g, 20.33 mmol) in 220 mL DMF gegeben und für 19 h bei 60 °C gerührt. Dann wurde 400 mL Wasser zugegeben und das Produkt dreimal mit je 200 mL Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden sechsmal mit je 200 mL Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel unter Vakuum (700 mbar) entfernt (farblose Flüssigkeit, 3.038 g, 89%).

11.4.4 Festphasenpeptidsynthese

11.4.4.1 Allgemeine Vorschrift für die Peptidsynthese

Die Peptidsynthese erfolgte an einem Mikrowellen-basiertem Peptidsynthesizer (Liberty, Discover von CEM). Es wurde die Festphasenpeptidsynthesestrategie unter Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe verwendet. Die Prozesse, die während der Synthese ablaufen, sind in den Abschnitten 2 und 11.2.1 beschrieben. Im Folgenden werden die Schritte zur Synthesevorbereitung detailliert erläutert.

a) Standardprotokoll für die SPPS

Je nach gewünschter Sequenz wurden die benötigten Reagenzien wie folgt vorbereitet. Aus der Harzbeladung und der Größe des gewählten Ansatzes wurde die benötigte Menge an Harz wie folgt berechnet:

Beispiel: *N*-Fmoc-Gly-Wang-Harz

$$\text{Ansatzgröße: } 0.1 \text{ mmol} \quad \text{Harzmenge} = \frac{\text{Ansatzgröße}}{\text{Harz Beladung}} = 0.154 \text{ g}$$

Harz Beladung: 0.65 mmol/g

Das Aminosäure-beladene Harz wurde 1 h vor Reaktionsbeginn durch Zugabe von DMF gequollen. Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde eine 5%ige Piperazinlösung in DMF hergestellt. Für jeden Kupplungsschritt wurde eine 2 M Lösung der gewünschten Fmoc-Aminosäure in DMF bereitgestellt. Als Aktivator diente eine 0.5 M Lösung eines Gemischs von *O*-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) und Ethyl-2-cyano-2-(hydroxyimino)acetat (Oxyma Pure) in DMF (siehe 2.9 und 2.10). Als Aktivatorbase wurde eine 2 M *N,N*-Diisopropylethylamin (DIEA)-Lösung in *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) verwendet.

Für die Synthese der gewünschten Peptidsequenz wurde die in Tabelle 19 angegebene Menge an entsprechenden Aminosäurelösungen (n_i) hergestellt. Außerdem wurden die restlichen in Tabelle 19 angegebenen Reagenzien-Mengen mit der Anzahl der enthaltenen Aminosäuren (n) multipliziert, um so die benötigten Gesamtmengen zu erhalten. Es ist zu beachten, dass die erste (C-terminale) Aminosäure in dieser Rechnung nicht mit einfließt, da in allen Synthesen mit vorbeladenem Harz gearbeitet wurde. Bei gewünschter Entfernung der Fmoc-Gruppe an der N-terminalen Aminosäure muss ein weiterer Entschützungs-schritt eingerechnet werden ($n + 1$).

Tabelle 19: Einwaagen pro eingesetzter Aminosäure und Gesamtmenge bei verschiedenen Ansatzgrößen.

Reagenzien	Reagenzienmenge bei entsprechender Ansatzgröße			Gesamtmenge
	0.1 mmol	0.5 mmol	1 mmol	
0.2 N Fmoc-Aminosäure in DMF	2.5 mL	10 mL	15 mL	$\sum n_i = n$
5%ige Piperazinlösung in DMF	14 mL	30 mL	40 mL	n oder $n + 1$
0.5 M HBTU/Oxyma Pure in DMF	1 mL	4 mL	6 mL	n
2 M DIEA in NMP	0.5 mL	2 mL	3 mL	n

11. Experimenteller Teil

Beispielsequenz: H₂N-GK_{Mca}GFFK_{Dnp}G-OH (0.1 mmol) (Fmoc-Gly-beladenes Harz + Entschützung)

- Vorbeladenes Harz (Beladung: 0.65 mmol/g) → 0.154 g Harz
- Aminosäuren: 2·G, 2·F, 1·K_{Mca}, 1·K_{Dnp} → $n = 6$
- Reagenzien: $n+1 \cdot \text{Dep}$, $n \cdot \text{Ac}$, $n \cdot \text{AcB}$; $n = 6$
- 5 mL G, 5 mL F, 2.5 mL K_{Mca}, 2.5 mL K_{Dnp};
- 98 mL 5%ige Piperazinlösung in DMF, 6 mL 0.5 M HBTU/ HOBt in DMF, 3 mL 2 M DIEA in NMP

Bei Vergrößerung des Maßstabes mussten die Mengen pro Zyklus, wie in Tabelle 19 gezeigt, angepasst werden. Nach beendeter Vorbereitung der Reagenzien wurden diese an den Peptidsynthesizer angeschlossen. Details der Synthese sind in Abschnitt 2 und 11.2.1 erläutert.

Nach erfolgter Reaktion wurde das peptidbeladene Harz filtriert und mit Dichlormethan gewaschen. Zur Abspaltung des Peptids vom Harz wurde das Produkt mit einem Gemisch aus Trifluoressigsäure, Triisopropylsilan und H₂O im Verhältnis 95:2.5:2.5 versetzt und 7 h bei RT geschüttelt. Nach Abfiltrieren des Harzes wurde das Filtrat unter Vakuum eingedampft und das gewünschte Peptid durch Zugabe von kaltem Diethylether ausgefällt, zentrifugiert (3 min, 9000 rpm) und der Überstand abdekantiert. Der Bodensatz wurde noch zweimal in derselben Weise mit kaltem Ether gewaschen und das Produkt unter Vakuum getrocknet. Es resultierte ein Feststoff. Die Produktcharakterisierung erfolgte mittels MALDI TOF-MS, ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie. Die Produktreinheit wurde mittels HPLC verifiziert.

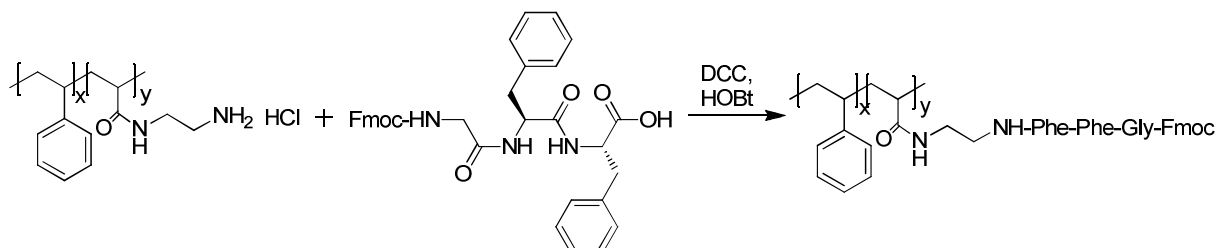
Nach dieser Vorschrift wurden die hier aufgeführten Peptide sowohl in geschützter (Fmoc-Peptid) als auch in entschützter Form (H₂N-Peptid) synthetisiert. Da die NMR- und die Massenspektren bis auf den Unterschied, der auf die Schutzgruppe zurückzuführen war, identisch waren und auch die Ergebnisse der HPLC keine signifikanten Unterschiede ergab, wird hier jeweils nur die Charakterisierung einer Komponente aufgeführt. Die ungeschützten Peptide wurden aufgrund der besseren Löslichkeit für die enzymatischen Spaltungsexperimente des freien Peptids verwendet, die geschützten Peptide wurden zur weiteren Synthese der Konjugate und Nanopartikel eingesetzt. Für den Einsatz in Click-Reaktionen wurden ausschließlich entschützte Peptide verwendet.

Bei der Synthese der K_{Ant}-Peptide wurde *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Methyltrityl-L-lysin eingesetzt.⁹⁷ Nach der Anbindung der Aminosäure an das Harz wurde es entnommen, filtriert und mit DCM gewaschen. Danach wurde das Harz dreimal für jeweils zwei Minuten mit 1% TFA in DCM behandelt, filtriert und mit DCM gewaschen. Nach dieser Behandlung wurde das Harz wieder an den Peptidsynthesizer angeschlossen und im nächsten Reaktionsschritt *N*-Boc-Anthranilsäure eingesetzt. Danach lief die Peptidsequenz wie bereits beschrieben weiter.

Die Analytik der synthetisierten Peptide GFF-OH, AntGFFY_NG-OH, AntRQLRVVGGY_NG-OH, Y_NGFFK_{Ant}G-OH, Y_NQRRK_{Ant}G-OH, Y_NRGFFPK_{Ant}G-OH, Y_NGFFK_{Mant}G-OH, H₂¹⁵N-GY_NGFFK_{Mant}G-OH, GK_{Mant}RQLRVVGGY_NG-OH, H₂¹⁵N-GK_{Mca}GFFK_{Dnp}G-OH, H₂¹⁵N-GK_{Mca}RQLRVVGGK_{Dnp}G-OH, N₃-CH₂-NH-K_{Mca}RQLRVVGGK_{Dnp}K_{N2}G-OH und PraK_{Mca}RQLRVVGGK_{Dnp}Pra-G-OH kann an Abschnitt 13.5 nachvollzogen werden.

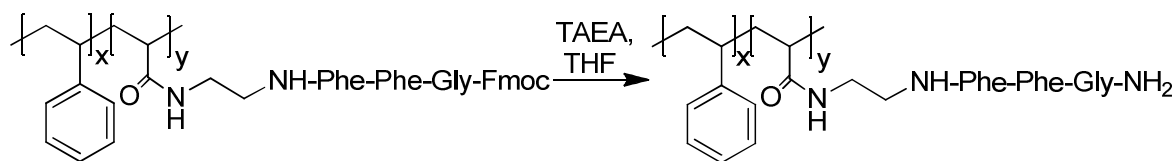
11.4.5 Synthese der Peptid-Polymer-Konjugate

11.4.5.1 (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-FFG-Fmoc



Poly[styrol-*co*-*N*-(2-aminoethyl)acrylamid]-Hydrochlorid (P_A7-166, 1.75 g, 2.71 mmol NH₃⁺), Fmoc-GFF-OH (1.63 g, 2.76 mmol) und HOBT·H₂O (0.40 g, 2.93 mmol) wurde in einem DMF/EtOAc/THF-Gemisch gelöst. Zur Lösung wurde *N,N*-Diisopropylethylamin (0.5 mL, 2.90 mmol) und DCC (2.90 g, 2.90 mmol) in EtOAc zugegeben und 14 h bei RT gerührt. Das ausgefallene Harnstoffaddukt wurde mittels Filtration entfernt. Nach erfolgter Phasenseparation durch Zugabe von gesättigter wässriger NaCl-Lösung wurde die organische Phase abgetrennt und mit 1 M H₂SO₄, Wasser, 5%iger NaHCO₃ und nochmals Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde separiert, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter Vakuum entfernt (weißer Feststoff, 3.14 g, 94%). Ein negativer Ninhydrintest zeigte eine quantitative Kupplung.

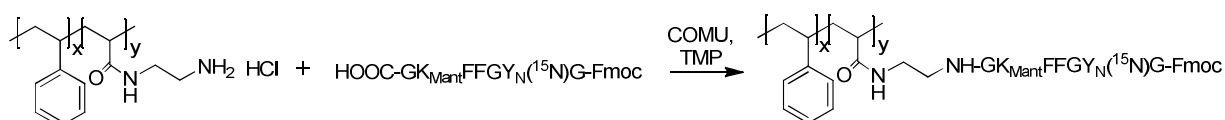
11.4.5.2 (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-FFG-NH₂(nach²⁴⁵)



(PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-FFG-Fmoc (250 mg, 0.22 mmol Fmoc) wurde in THF gelöst, Tris(2-aminoethyl)amin (3.3 mL, 22 mmol) zugegeben und 1 h bei RT gerührt. Dann wurden 32 mL Phosphatpuffer (pH 5.5) zugetropft und das ausgefallene Produkt abzentrifugiert. Nach Abdekantieren des Überstands wurde das Produkt in 10 mL THF gelöst und erneut mit Tris(2-aminoethyl)amin (3.3 mL, 22 mmol) versetzt und 1 h bei RT gerührt. Dann wurde 32 mL Phosphatpuffer (pH 5.5) zugegeben und das ausgefallene Produkt abzentrifugiert. Nach Abdekantieren des Überstands wurde das Produkt in 8 mL THF gelöst und erneut mit 35 mL Phosphatpuffer (pH 5.5) ausgefällt. Nach erneuter Durchführung dieser Reinigungsprozedur mit 5 mL THF und 25 mL Puffer wurde das Produkt mit 25 mL Wasser gewaschen, zentrifugiert, abdekantiert und gefriergetrocknet (weißes Pulver, 113 mg, 56%).

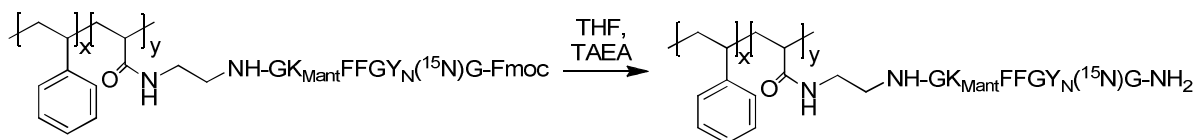
11. Experimenteller Teil

11.4.5.3 (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-GK_{Mant}FFGY_N(¹⁵N)G-Fmoc



Poly[styrol-*co*-N-(2-aminoethyl)acrylamid]-Hydrochlorid (P_A7-104, 342 mg, 0.45 mmol NH₃⁺) und Fmoc-(¹⁵N)GY_NGFFK_{Mant}G-OH (530 mg, 0.45 mmol) wurden in einem Gemisch aus DMF/EtOAc gelöst und auf 0 °C abgekühlt. 2,4,6-Trimethylpyridin (0.29 mL, 1.80 mmol) und COMU (386 mg, 0.90 mmol) wurden zugegeben und die Lösung 1 h bei 0 °C gerührt. Nach weiteren 3 h Rühren bei RT wurde EtOAc zugegeben. Die organische Phase wurde zweimal mit 1 M H₂SO₄, zweimal mit 5%iger NaHCO₃, einmal mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung und einmal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde separiert, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel unter Vakuum entfernt (gelber Feststoff, 0.73 g, 83%). Ein positiver Ninhydrintest zeigte die Anwesenheit von Aminogruppen.

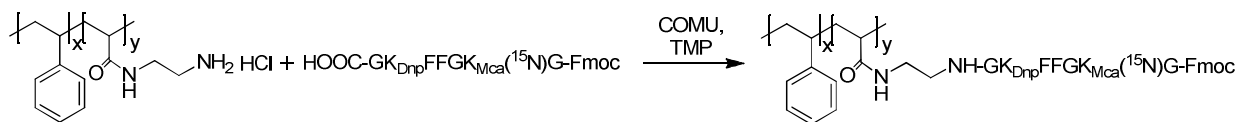
11.4.5.4 (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-GK_{Mant}FFGY_NG-¹⁵NH₂



(PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-GK_{Mant}FFGY_N(¹⁵N)G-Fmoc (250 mg, 0.16 mmol Fmoc) wurde in THF gelöst, Tris(2-aminoethyl)amin (2.4 mL, 16 mmol) zugegeben und 1 h bei RT gerührt. Dann wurde das Produkt in 30 mL Phosphatpuffer (pH 5.5) eingetropfelt, somit ausgefällt und abzentrifugiert. Nach Abdekantieren des Überstands wurde das Produkt in 7.5 mL THF gelöst und erneut mit Tris(2-aminoethyl)amin (2.4 mL, 16 mmol) versetzt und 1 h bei RT gerührt.

Dann wurde das Produkt in Phosphatpuffer (pH 5.5) eingetropfelt und der ausgefallene Feststoff abzentrifugiert. Nach Abdekantieren des Überstands wurde der Feststoff in 5 mL THF gelöst, mit Phosphatpuffer (pH 5.5) ausgefällt und abzentrifugiert. Nach erneuter Durchführung dieser Reinigungsprozedur mit Puffer sowie Wasser wurde das Produkt gefriergetrocknet (gelbes Pulver, 166 mg, 77%).

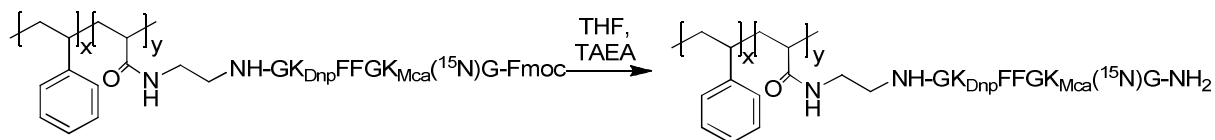
11.4.5.5 (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-GK_{Dnp}FFGK_{Mca}G(¹⁵N)-Fmoc



Poly[styrol-*co*-N-(2-aminoethyl)acrylamid]-Hydrochlorid (P_A7-104, 259 mg, 0.342 mmol NH₂) und Fmoc-(¹⁵N)GK_{Mca}GFFK_{Dnp}G-OH (458 mg, 0.341 mmol) wurden in einem Gemisch aus DMF/EtOAc/THF gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Dann wurde 2,4,6-Trimethylpyridin (0.22 mL, 1.38 mmol) und COMU (0.296 g, 0.692 mmol) zugegeben und 1 h bei 0 °C gerührt. Nach weiteren 3 h bei RT wurde EtOAc zugegeben. Die organische Phase wurde einmal mit gesättigter wässriger NaCl-Lösung, zweimal mit 1 M H₂SO₄, einmal mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung, zweimal mit

5%iger NaHCO₃, einmal mit 1 M H₂SO₄ und einmal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde separiert, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel bei 50 °C unter Vakuum entfernt (gelber Feststoff, 705 mg, 98%).

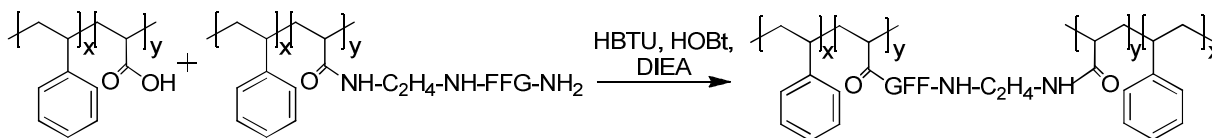
11.4.5.6 (PS-co-PAA)-C₂H₄-NH-GK_{Dnp}FFGK_{Mca}-G-¹⁵NH₂



(PS-co-PAA)-C₂H₄-NH-GK_{Dnp}FFGK_{Mca}G-(¹⁵N)-Fmoc (250 mg, 0.118 mmol Fmoc) wurde in 10 mL THF gelöst. Nach Zugabe von Tris(2-aminoethyl)amin (1.77 mL, 11.8 mmol) wurde das Reaktionsgemisch 1 h bei RT gerührt. Dann wurde das Produkt in 30 mL Phosphatpuffer (pH 5.5) eingetropft, somit ausgefällt und abzentrifugiert. Nach Abdekantieren des Überstands wurde das Produkt in 7.5 mL THF gelöst und erneut mit Tris(2-aminoethyl)amin (1.77 mL, 11.8 mmol) versetzt und 1 h bei RT gerührt. Dann wurde das Gemisch in Phosphatpuffer (pH 5.5) eingetropft und das ausgefallene Produkt abzentrifugiert. Nach Abdekantieren des Überstands wurde das Produkt in wenig THF gelöst, mit Phosphatpuffer (pH 5.5) ausgefällt und abzentrifugiert. Nach erneuter Durchführung dieser Reinigungsprozedur mit Puffer sowie mit Wasser wurde das Produkt gefriergetrocknet (gelbes Pulver, 137 mg, 61%).

11.4.6 Synthese vernetzter Polymernanopartikel in inverser Miniemulsion

11.4.6.1 Synthese enzymatisch spaltbarer Nanopartikel der 1. Generation - (PS-*co*-PAA)-GFF-NH-C₂H₄-(PS-*co*-PAA)-Nanopartikel



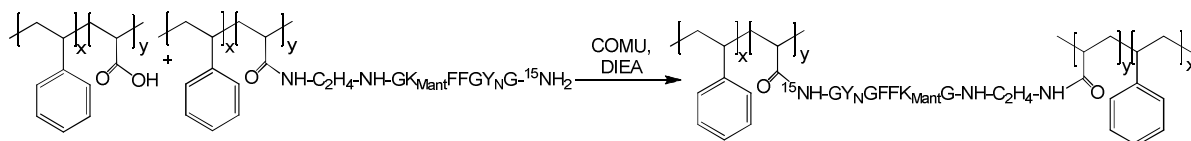
a) Einphasenreaktion

Poly(styrol-*co*-acrylsäure) (P_S7-166, 15.5 mg, 17.6 μmol COOH), (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-FFG-NH₂ (24.2 mg, 17.6 μmol NH₂), HOBT·H₂O (17.2 mg, 112.4 μmol) und HBTU (42.6 mg, 112.4 μmol) wurden in 440 μL DMF und 70 μL *N*-Methyl-2-pyrrolidon gelöst. *N,N*-Diisopropylethylamin (154 μL, 898.8 μmol) wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch durch Schütteln homogenisiert. Die Probe wurde dann 14 h bei RT stehen gelassen, wobei Gelbildung eintrat. Die Probe wurde mit DMF, H₂O, THF, H₂O, THF, NaHCO₃ und H₂O gewaschen und jeweils abdekantiert. Anschließend wurde das Produkt gefriergetrocknet (oranger Feststoff, 37 mg, 88%).

b) Reaktion in Miniemulsion

Für die disperse Phase wurde Poly(styrol-*co*-acrylsäure) (P_S7-166, 15.5 mg, 17.6 μmol COOH), (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-FFG-NH₂ (24.2 mg, 17.6 μmol NH₂), HOBT·H₂O (17.2 mg, 112.4 μmol) und HBTU (42.6 mg, 112.4 μmol) in 440 μL DMF und 70 μL *N*-Methyl-2-pyrrolidon gelöst. Dann wurden 1.53 mL der kontinuierlichen Phase, bestehend aus 1%iger P(B/E-*b*-EO)-Lösung in Isooctan, zugegeben. Das Gemisch wurde ½ h vorhomogenisiert, anschließend unter Eiskühlung mit Ultraschall behandelt (1/8“ Spitze, 70% Amplitude, 3 min Schallzeit, 5 s Puls, 5 s Pause) und dann mit *N,N*-Diisopropylethylamin (154 μL, 898.8 μmol) versetzt. Die Probe wurde 14 h bei 75 °C gerührt. Dann wurde 8.5 mL 0.3%ige SDS Lösung zugegeben, ½ h vorhomogenisiert und erneut mit Ultraschall behandelt (1/2“ Spitze, 70% Amplitude, 3 min Schallzeit, 5 s Puls, 5 s Pause). Isooctan wurde verdampft, indem die Proben offen 48 h bei 75 °C im Ölbad gerührt und immer wieder mit H₂O aufgefüllt wurden. Zur Reinigung der Dispersion wurde die Probe dialysiert (Membranporengröße: 14000 g/mol). Die Partikelgröße wurde vor und nach der Dialyse bestimmt und mit REM-Bildern verglichen. Nachdem ein Teil der Probe gefriergetrocknet wurde, wurde der Erfolg der Vernetzung mittels HPLC und ¹⁵N-Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht.

11.4.6.2 Synthese enzymatisch spaltbarer Nanopartikel der 2. Generation - (PS-*co*-PAA)-GYN_NGFFK_{Mant}G-NH-C₂H₄-(PS-*co*-PAA)-Nanopartikel



a) Einphasenreaktion

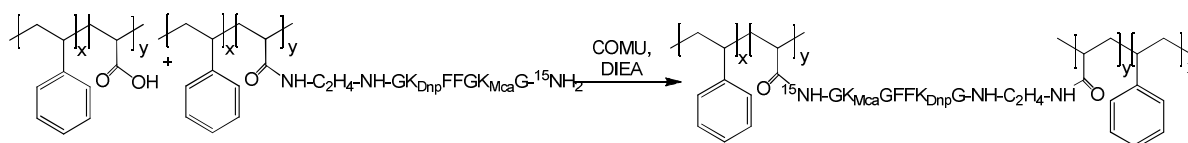
Poly(styrol-*co*-acrylsäure) (P_S7-104, 92.1 mg, 107.9 mmol COOH), (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-GK_{Mant}FFGY_NG-¹⁵NH₂ (156 mg, 107.9 mmol ¹⁵NH₂) und COMU (238.0 mg, 539.7 mmol) wurden in 2.71 mL DMF und 0.43 mL *N*-Methyl-2-pyrrolidon gelöst. *N,N*-Diisopropylethylamin (0.47 mL, 4.32 mol) wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch durch Schütteln homogenisiert. Die Probe wurde dann 12 h bei RT stehen gelassen, wobei Gelbildung eintrat. Die Probe wurde mit DMF, H₂O, THF, H₂O, THF, NaHCO₃ und H₂O gewaschen und jeweils abdekantieren. Anschließend wurde das Produkt gefriergetrocknet (oranger Feststoff, 170 mg, 85%).

b) Reaktion in Miniemulsion

Für die disperse Phase wurde Poly(styrol-*co*-acrylsäure) (P_S7-104, 15.0 mg, 17.6 μmol COOH), (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-GK_{Mant}FFGY_NG-¹⁵NH₂ (25.5 mg, 17.6 μmol ¹⁵NH₂) und COMU (37.6 mg, 87.8 μmol) in 440 μL DMF und 70 μL *N*-Methyl-2-pyrrolidon gelöst. Dann wurden 1.53 mL der kontinuierlichen Phase, bestehend aus 1%iger P(B/E-*b*-EO)-Lösung in Isooctan, zugegeben. Das Gemisch wurde ½ h vorhomogenisiert, anschließend unter Eiskühlung mit Ultraschall behandelt (1/8“ Spitze, 70% Amplitude, 3 min Schallzeit, 5 s Puls, 5 s Pause) und dann mit *N,N*-Diisopropylethylamin (120 μL, 698 μmol) versetzt. Die Probe wurde 12 h bei RT gerührt.

Dann wurden 8.5 mL 0.3%ige SDS Lösung zugegeben, ½ h vorhomogenisiert und erneut mit Ultraschall behandelt (1/2“ Spitze, 70% Amplitude, 3 min Schallzeit, 5 s Puls, 5 s Pause). Isooctan wurde verdampft, indem die Proben offen 48 h bei 75 °C im Ölbad gerührt und immer wieder mit H₂O aufgefüllt wurden. Zur Reinigung der Dispersion wurde die Probe dialysiert (Membranporengröße: 14000 g/mol). Die Partikelgröße wurde vor und nach der Dialyse bestimmt und mit REM-Bildern verglichen. Nachdem ein Teil der Probe gefriergetrocknet wurde, wurde der Erfolg der Vernetzung mittels HPLC und ¹⁵N-Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht.

11.4.6.3 Synthese enzymatisch spaltbarer Nanopartikel der 3. Generation - (PS-*co*-PAA)-¹⁵N)GK_{Mca}GFFK_{Dnp}G-NH-C₂H₄-(PS-*co*-PAA)-Nanopartikel



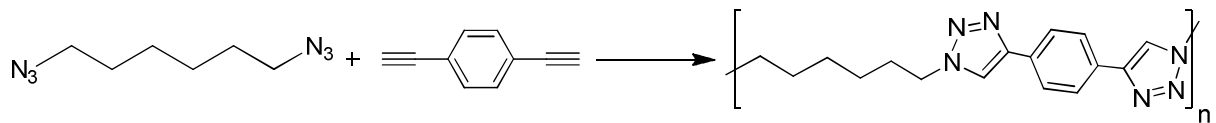
a) Reaktion in Miniemulsion

Für die disperse Phase wurde Poly(styrol-*co*-acrylsäure) (P_S7-104, 13.1 mg, 14.6 μmol COOH) (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-GK_{Dnp}FFGK_{Mca}G-¹⁵NH₂ (38.0 mg, 14.6 μmol ¹⁵NH₂) und COMU (31.8 mg, 73.1 μmol) in 557 μL DMF und 58 μL *N*-Methyl-2-pyrrolidon gelöst. Dann wurden 1.85 mL der kontinuierlichen Phase, bestehend aus 1%iger P(B/E-*b*-EO) und 1%ige RFF-Lösung in Isooctan, zugegeben. Das Gemisch wurde ½ h vorhomogenisiert, anschließend unter Eiskühlung mit Ultraschall behandelt (1/8“ Spitze, 70% Amplitude, 3 min Schallzeit, 5 s Puls, 5 s Pause) und dann mit *N,N*-Diisopropylethylamin (120 μL, 698 μmol) versetzt. Die Probe wurde 15 h bei RT gerührt.

Dann wurden 8.6 mL 0.3%ige SDS Lösung zugegeben, ½ h vorhomogenisiert und erneut mit Ultraschall behandelt (1/2“ Spitze, 70% Amplitude, 3 min Schallzeit, 5 s Puls, 5 s Pause). Isooctan wurde verdampft, indem die Proben offen 48 h bei 75°C im Ölbad gerührt und immer wieder mit H₂O aufgefüllt wurden. Zur Reinigung der Partikel wurde die Probe dialysiert (Membranporengröße: 14000 g/mol). Die Partikelgröße wurde vor und nach der Dialyse bestimmt und mit REM-Bildern verglichen. Nachdem ein Teil der Probe gefriergetrocknet wurde, wurde der Erfolg der Vernetzung mittels HPLC und ¹⁵N-Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht.

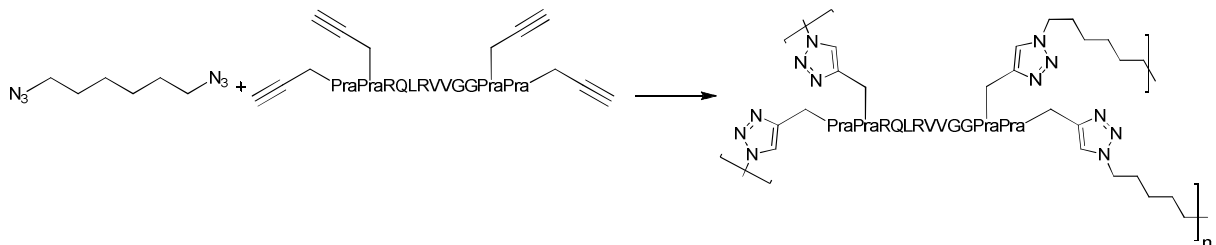
11.4.6.4 Synthese enzymatisch spaltbarer Nanopartikel der 4. Generation - $K_{Mca}RGLRVVGGK_{Dnp}$ Nanokapseln

a) Einphasenreaktion



1,4-Diethinylbenzol (3.75 mg, 29.7 μmol), $\text{CuBr}_2/\text{PMDETA}$ (1 mg, 25.2 mg) und 1,6-Diazidohexan (5 mg, 29.7 μmol) wurden in 0.6 ml DMSO-d_6 gelöst und entgast, indem für 20 min Argon durchgeleitet wurde. Zinn(II)-2-Ethylhexanoat (4.9 mg, 12.1 μmol) wurde vorgelegtentgast, indem für 20 min Argon durchgeleitet wurde, und die erste Lösung zugegeben. Die Reaktionslösung wurde anschließend 19 h bei 50 °C gerührt.

b) Reaktion in Miniemulsion



$\text{Pra}_2\text{-RQLRVVGGPra}_2\text{G}$ (20.0 mg, 13.93 μmol) wurde in 250 μl DMF gelöst und 50 μl 0.9%ige, wässrige NaCl-Lösung zugegeben. Zu dieser Lösung wurde $\text{CuBr}_2/\text{PMDETA}$ (0.8 mg, 2.02 μmol) gegeben (innere Phase). Für die äußere Phase wurde 1,6-Diazidohexan (11.0 mg, 65.40 μmol) in 1%iger P(B/E-*b*-EO)-Lösung in 2.7 g Cyclohexan gelöst. Die äußere Phase wurde zur inneren gegeben, das Gemisch mit Ultraschall behandelt (1/8“ Spitze, 70% Amplitude, 3 min Schallzeit, 5 s Puls, 10 s Pause) und anschließend entgast, indem für 20 min Argon durchgeleitet wurde.

Zinn(II) 2-Ethylhexanoat (4.9 mg, 27.15 μmol) wurde vorgelegt, entgast und unter Luftausschluss die Miniemulsion zugegeben. Die Dispersion wurde anschließend 24 h bei 50 °C gerührt und dann die Partikelgröße bestimmt.

Abschließend wurden 9 mL 0.3%ige SDS Lösung zugegeben, 1/2 h vorhomogenisiert und erneut mit Ultraschall behandelt (1/2“ Spitze, 70% Amplitude, 3 min Schallzeit, 5 s Puls, 10 s Pause). Im Anschluss wurde die Dispersion offen bei 24 h bei 40 °C gerührt. Dann wurde die Partikelgröße bestimmt und mit REM-Bildern verglichen.

12. Zusammenfassung/Summary

12.1 Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit legt, im Rahmen eines interdisziplinären BMBF Projekts, die Grundlage für eine neuartige Früherkennungsmethode für Prostatakrebs. Ausgehend von der Idee, einen sensitiv detektierbaren, hydrophilen Farbstoff in selektiv, Hepsin-spaltbare Kapseln einzubringen, wurde ein Modellsystem erarbeitet. Als Zielsubstrat für Hepsin wurde die Peptidsequenz RQLRVVGG verwendet. Basierend auf dem hier entwickelten Modell könnte in Zukunft eine Detektion von Hepsin und damit von Prostatakrebs im Frühstadium *in vivo* erfolgen.

Um das Konzept der Enzymspaltbarkeit zu zeigen, sollen, basierend auf einem Modellsystem, enzymatisch-spaltbare, polymere Nanopartikel und -kapseln dargestellt werden. Durch diesen dualen Ansatz von Partikeln und Kapseln ist es möglich, sowohl hydrophobe als auch hydrophile Substanzen einzubetten, um das mögliche Anwendungspotential von Anfang an sehr breit zu gestalten.

In dieser Arbeit konnte die Synthese von vier Generationen spezifisch Protease-spaltbarer, hydrophober Nanopartikel gezeigt werden. Die Enzyme Pepsin und Trypsin, die selektiv die Peptidsequenz GFF spalten, wurden als Modellenzyme für das im Prostatakarzinom überexprimierte Hepsin eingesetzt.

Als Ausgangspolymer diente Poly(styrol-*co*-acrylsäure), das in freier radikalischer Polymerisation hergestellt wurde. Das Copolymer konnte mit Molekulargewichten zwischen 8500 und 49400 g/mol und 5, 7 und 16% Säurefunktionalisierung synthetisiert werden. In einer polymeranalogen Reaktion wurden die Säurefunktionen mit einfach Boc-geschütztem Ethylendiamin umgesetzt und durch saure Entschützung Aminogruppen erhalten. Die resultierenden aminofunktionalisierten Polymere wurden unter Einsatz der über Jahrzehnte entwickelten, effektiven Peptidkupplungschemie mit Enzym-spaltbaren Peptiden gekuppelt, um dadurch definierte Peptid-Polymer-Konjugate zu erhalten.

Als enzymatisch spaltbarer Teil des Konjugats, wurden mithilfe der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) Peptide synthetisiert, die auf der Pepsin-spaltbaren Sequenz GFF basierten. Die Charakterisierung der Peptide erfolgte mittels ^1H -, ^{13}C -NMR-Spektroskopie, MALDI TOF-MS und HPLC. Außerdem wurde eine intensive Analyse der Syntheseparameter der SPPS durchgeführt und ihre Auswirkung auf Reinheit und Ausbeute der Peptide studiert. Aus den Polymeren und dem Peptid wurden Peptid-Polymer-Konjugate hergestellt und daraus mithilfe des inversen Miniemulsionsprozesses Nanopartikel formuliert. Die Synthese der Nanopartikel erfolgte durch eine stufenweise Entwicklung über vier Generationen.

In der 1. Generation dieser Nanopartikel wurde Fmoc-GFF-OH mittels DCC an das aminofunktionalisierte Polymer gebunden. Die erfolgreiche Anbindung wurde mittels ^1H -, ^{13}C - und DOSY-NMR-Spektroskopie nachgewiesen. Für die Entwicklung einer effektiven Strategie, die Fmoc-Gruppe in Lösung zu entfernen, wurde die Base Tris(2-aminoethyl)amin verwendet, um (PS-*co*-PAA)- $\text{C}_2\text{H}_4\text{-NH-FFG-NH}_2$, ein neuartiges Peptid-Polymer-Konjugat, herzustellen. Das System konnte in DMF-Tröpfchen einer inversen Miniemulsion mit dem säurefunktionalisierten Polymer

zu Partikeln im Bereich von 200 nm umgesetzt werden. Bei der anschließenden Behandlung der Dispersion mit Trypsinergaben sich durch die Analyse mittels PCCS Hinweise auf eine enzymatische Spaltung. Da mit dem vorliegenden System die Spaltung aber nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, musste eine Möglichkeit zur *in situ*-Detektion der enzymatischen Spaltung eingeführt werden, um so das vorliegende System weiterzuentwickeln.

Aus diesem Grund wurde in der 2. Generation das GFF-Peptid mittels eines FRET-Paares, bestehend aus Anthranilsäure (Donor) und *N*-Fmoc-3-Nitro-L-Tyrosin (Akzeptor), so modifiziert, dass eine enzymatische Spaltung durch einen Anstieg der Fluoreszenzintensität detektiert werden konnte. Dabei wurden die Komponenten des FRET-Paares zu beiden Seiten der Spaltungssequenz eingebaut. Das FRET-Prinzip wurde anhand der Spaltung des Peptids in Lösung gezeigt und somit der Erhalt der Enzymerkennung trotz der Modifikation demonstriert. Mithilfe dieser Methode konnte auch die Hepsin-Spaltbarkeit der Sequenz RQLRVVG gezeigt werden. Für den Erhalt größerer synthetischer Flexibilität wurde das Fluorophor über einen Lysin-Linker an das Peptid gebunden. Damit wurde ein universell, in der SPPS einsetzbares Fluorophor erhalten. Um Nebenreaktionen zu vermeiden, musste die Aminogruppe der Anthranilsäure für weitere Synthesen geschützt werden. Da durch Acetylierung die Fluoreszenz unterdrückt wurde, wurde Methylierung als Schutz gewählt. Somit konnte *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Methylantraniloyl-L-lysin dargestellt und in der Peptidsynthese angewendet werden. Zum Nachweis der Vernetzung der späteren Nanopartikel wurde zusätzlich eine ^{15}N -markierte Aminosäure (Fmoc-(^{15}N)-Glycin) am N-Terminus der Peptide eingebaut, um die Reaktion des Amins zu einem Amid zu verfolgen. So konnte erfolgreich das Peptid Fmoc-(^{15}N)GY_NGFFK_{Man}G-OH synthetisiert werden. Nach Kupplung des Peptids an das aminofunktionalisierte Polymer wurde erneut ein multifunktionales Peptid-Polymer-Konjugat erhalten. Nach Entschützung der ^{15}N -markierten Aminogruppe konnte die Vernetzung bei der Partikelbildung durch die Reaktion des ^{15}N -Amins zu einem ^{15}N -Amid mittels ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektroskopie nachverfolgt werden. Die Charakterisierung der Dispersion erfolgte unter anderem durch PCCS und REM. Die Durchmesser der Partikel in Dispersion wurden damit als 235 nm bestimmt, die Spaltung der Partikel durch Trypsin konnte durch das FRET-Label über einen Anstieg der Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden. Da sich im Laufe der Synthese herausstellte, dass das gewählte Fluorophor zu Nebenreaktionen neigt, wurde nach einer Alternative gesucht. Bei der Synthese der 2. Generation wurde außerdem COMU, ein effektives Kupplungsreagenz eingesetzt, dessen Nebenprodukte durch einfache, wässrige Extraktion entfernt werden konnten.

Als Weiterentwicklung wurden enzymatisch spaltbare Nanopartikel der 3. Generation erhalten. Dazu wurde ein FRET-Paar ohne freie funktionelle Gruppen eingesetzt, um definierte Nanopartikel zu synthetisieren und die enzymatische Spaltung detektieren zu können. Es wurde eine Syntheseroute für das nötige Fluorophor *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -(7-Methoxycoumarin-4-acetyl)-L-lysin gesucht, um schließlich das Peptid Fmoc-(^{15}N)GK_{Mca}GFFK_{Dnp}G-OH zu synthetisieren. Die Synthese des entsprechenden Peptid-Polymer-Konjugats und dessen Entschützung konnte in sehr guten Ausbeuten durchgeführt

werden. Mittels HPLC und DOSY-NMR-Spektroskopie wurde verifiziert, dass in den Partikeln kein freies Peptid mehr vorhanden war. Nach Umsetzung des Konjugats mit dem säurefunktionalisierten Polymer in inverser Miniemulsion konnte erneut ein vernetztes Polymer in nanopartikulärer Form erhalten und zusätzlich ein hydrophober Farbstoff in die Partikel eingebettet werden. Die Vernetzung bei der Partikelbildung konnte erneut durch die Reaktion des ^{15}N -Amins zu einem ^{15}N -Amid mittels ^{15}N -Festkörper-NMR-Spektroskopie nachverfolgt und als $\geq 90\%$ quantifiziert werden. Die 230 nm großen Partikel wurden anschließend mit Trypsin behandelt und die enzymatische Spaltung *in situ* nachgewiesen.

Um das Ziel des Projektes zu erreichen, wurden als 4. Generation Nanokapseln mit einem hydrophilen Farbstoff im Kern synthetisiert. Aufgrund der funktionellen Gruppen in der Zielsequenz RQLRVVGG wurde dazu die chemoselektive [1,3]-dipolare Cycloaddition (Click-Reaktion) eingesetzt. Um dies zu realisieren, wurde die zweifach azido- bzw. propargylfunktionalisierte, Hepsin-spaltbare Sequenz synthetisiert und mit einem alkynyl- bzw. azidofunktionalisierten Monomer in inverser Miniemulsion umgesetzt. Durch Gelbildung der inneren Phase war es schwierig, stabile Dispersionen zu erhalten. Somit war es nur möglich, einen Hinweis auf die Bildung von Nanokapseln mittels PCCS zu erhalten. Obwohl die ersten Synthesen dieses Systems vielversprechende Ergebnisse lieferten, muss die Synthese noch weiter optimiert werden, um die Kapselwand undurchlässig zu gestalten.

Neben dem Potential, dieses Modells als Grundlage für eine neuartige Methode der Früherkennung des Prostatakarzinoms zu nutzen, kann das Konzept Protease-spaltbarer Nanopartikel allgemeiner angewendet werden. So könnten auf diese oder ähnliche Weise eine Vielzahl an medizinisch relevanten Enzymen detektiert werden. Potentiell interessante Enzyme, die z.B. in der Krebsentstehung involviert sind, sind neben Hepsin auch Cathepsin D oder Matrix-Metalloproteasen. Des Weiteren sind Proteasen, wie Proteinase K oder Pronase E, die von Bakterien sekretiert werden, von Interesse, da so antibiotikaresistenten Bakterien in entzündlichem Gewebe nachgewiesen werden könnten.

12.2. Summary and outlook

This work, embedded in an interdisciplinary BMBF project, provides the basis for a new early detection method for prostate cancer. A model system was designed, based on the idea of incorporating a sensitively detectable, hydrophilic dye in selectively hepsin-cleavable nanocapsules. Within the capsule, the fluorescence of the dye is self-quenched due to its high concentration. Upon cleavage of the capsule and release of the dye a fluorescence recovery due to dilution of the dye can be detected. The peptide sequence RQLRVVGG was identified and employed as a substrate for hepsin, an enzyme overexpressed in prostate cancer. Besides enzymatic degradable particles, achieved in the presented work, a further development of this concept could lead to the early detection of prostate cancer.

Within the scope of this thesis, four increasingly complex generations of specific, protease-cleavable hydrophobic nanoparticles are presented. Pepsin and trypsin, cleaving the model sequence GFF, have been chosen as model enzymes for hepsin.

A copolymer - poly(styrene-*co*-acrylic acid) - was synthesized by free radical copolymerization, with molecular weights between 8500 and 49400 g/mol and a degree of acid functionalization of 5, 7 and 16% wt. In a polymer analogous reaction, the acid groups were transformed into amine functionalities by performing a reaction with *N*-Boc-ethylenediamine and consecutive acidic deprotection. Subsequently, peptides were attached to the amino groups of the polymer by employing well established peptide coupling chemistry, obtaining defined peptide-polymer conjugates.

To match the polymeramino groups, the GFF-based peptides were synthesized by solid phase peptide synthesis (SPPS) and characterized by ^1H , ^{13}C NMR spectroscopy, MALDI TOF-MS and HPLC. A detailed analysis of the synthetic parameters and their impact on purity and yield was performed. The polymer and the peptides were covalently linked and the resulting peptide-polymer-conjugates were employed in inverse miniemulsion to obtain nanoparticles.

In the 1st generation, Fmoc-GFF-OH was bound to the aminofunctionalized polymer by DCC-coupling. Success of the reaction was confirmed by ^1H -, ^{13}C -NMR and DOSY-NMR-spectroscopy. As an efficient strategy for Fmoc-deprotection in solution tris(2-aminoethyl)amine was employed, leading to (PS-*co*-PAA)-C₂H₄-NH-FFG-NH₂, a novel peptide-polymer conjugate. This material was reacted with its acid functionalized, polymeric counterpart PS-*co*-PAS in DMF droplets, in an inverse miniemulsion. The dispersion of the resulting 220 nm particles was incubated with trypsin. An indication of enzymatic degradation, such as an increase in the average particle diameter, was obtained by PCCS. As the enzymatic degradation could not be directly confirmed, an *in situ* detection of the cleavage was developed as an improvement of the system.

Consequently, in the 2nd generation of nanoparticles the GFF-peptide was labelled with a FRET-pair, consisting of anthranilic acid (Ant) as donor and 3-nitro-L-tyrosine (Y_N) as acceptor. Thus, it was possible to detect the enzymatic cleavage of the peptide by monitoring the increase of fluorescence. In order to gain more synthetic flexibility, the fluorophore was attached to the peptide by a lysine linker. *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -methylanthraniloyl-L-lysine (K_{Mant}) was obtained and successfully applied in SPPS. In addition, a ^{15}N -labeled amino acid (Fmoc-(^{15}N)-glycine) was incorporated at the peptides' N-terminus, therefore providing the ability to monitor the transformation from amine to amide during the later crosslinking step. Both features were successfully applied in the synthesis of Fmoc-(^{15}N)GY_NGFFK_{Mant}G-OH. After the reaction with the amino functionalized polymer and subsequent Fmoc-deprotection, a multifunctional peptide-polymer-conjugate was obtained. The crosslinking of the polymer was performed in an inverse miniemulsion to obtain nanoparticles with a diameter of 235 nm. The crosslinking was investigated by ^{15}N -solid state-NMR-spectroscopy, HPLC, PCCS and SEM. The aqueous dispersion was mixed with trypsin and by taking advantage of the FRET-system in the peptide, the degradation of the particles was monitored and confirmed by an

increase of fluorescence intensity. During synthesis, however, it became evident that the fluorophore was prone to side reactions, thus requiring an alternative FRET system. During the preparation of this generation of nanoparticles, COMU was identified as an excellent coupling reagent, whose side products could be removed by convenient aqueous extraction.

The 3rd generation of nanoparticles was synthesized by improving the system through the replacement of the FRET-pair. Therefore, the fluorophore *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -(7-methoxycoumarine-4-acetyl)-L-lysine was employed, leading to Fmoc-(¹⁵N)GK_{Mca}GFFK_{Dnp}G-OH, which was coupled to the aminofunctionalized polymer. After successful deprotection of the polymer-coupled peptides, crosslinking of polymer via the peptides was achieved and monitored by ¹⁵N solid-state-NMR spectroscopy and the degree of crosslinking was evaluated as being higher than 90%. This step was conducted in an inverse miniemulsion to obtain nanoparticles with a diameter of 230 nm. Additionally, a hydrophobic dye was incorporated into the nanoparticles. After transfer of the particles into aqueous medium, the peptides were degraded by trypsin, which was monitored and confirmed by fluorescence recovery of the FRET system.

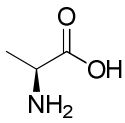
The 4th generation of nanocapsules and the ultimate goal of the project were targeted next through the embedding of a hydrophilic dye in nanocapsules. Due to the functional groups in the Hepsin-cleavable peptide sequence RGLRVVGG, the chemoselective Huisgen [1,3] dipolar cycloaddition (Click reaction) was employed. Therefore, the hydrophilic peptide was bifunctionalized by azide- or alkynyl-groups and was reacted in inverse miniemulsion with an azide or alkynyl-functionalized hydrophobic monomer. This approach showed a hint for successful nanoparticle formation. Despite the very successful synthesis of the monomers, the polymeric system needs further improvement.

Besides the capability of this model, to establish the basis for an early detection method for prostate cancer, a more general concept of protease-cleavable nanoparticles can be employed.

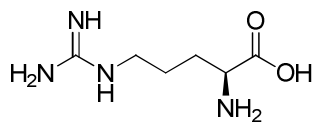
The approach, however, is not limited to the presented systems as the click reaction is highly tolerant to various functional groups, a great variety of peptide sequences can be applied for the synthesis of such systems. Thus, it might be possible to detect a large variety of relevant enzymes, including enzymes involved in cancer growth such as cathepsin D or matrix metalloproteases. Other enzymes of interest might be proteases like proteinase K or pronase E, which is secreted by bacteria. They are especially interesting as it concerns multiresistant super bugs found in inflammatory tissue.

13. Anhang

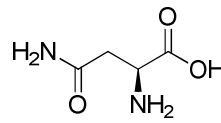
13.1 Die 20 kanonischen Aminosäuren



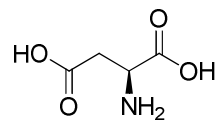
Alanin (Ala, A)



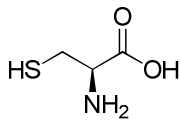
Arginin (Arg, R)



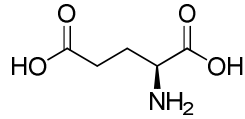
Aspargin (Asn, N)



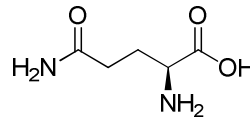
Asparaginsäure (Asp, D)



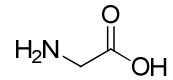
Cystein (Cys, C)



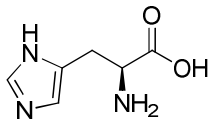
Glutaminsäure (Glu, E)



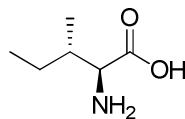
Glutamin (Gln, Q)



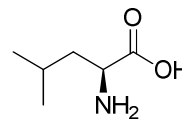
Glycin (Gly, G)



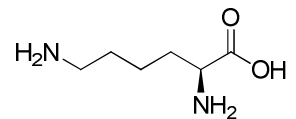
Histidin (His, H)



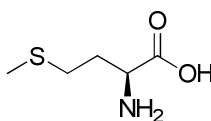
Isoleucin (Ile, I)



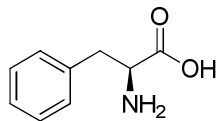
Leucin (Leu, L)



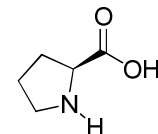
Lysin (Lys, K)



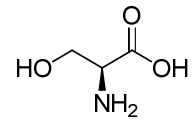
Methionin (Met, M)



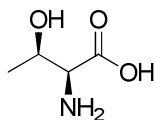
Phenylalanin (Phe, F)



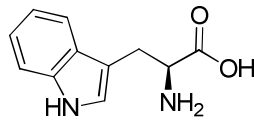
Prolin (Pro, P)



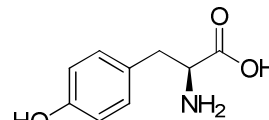
Serin (Ser, S)



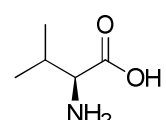
Threonin (Thr, T)



Tryptophan (Trp, W)



Tyrosin (Tyr, Y)



Valin (Val, V)

13.2 Reagenzien basierend auf 1H-Benzotriazol

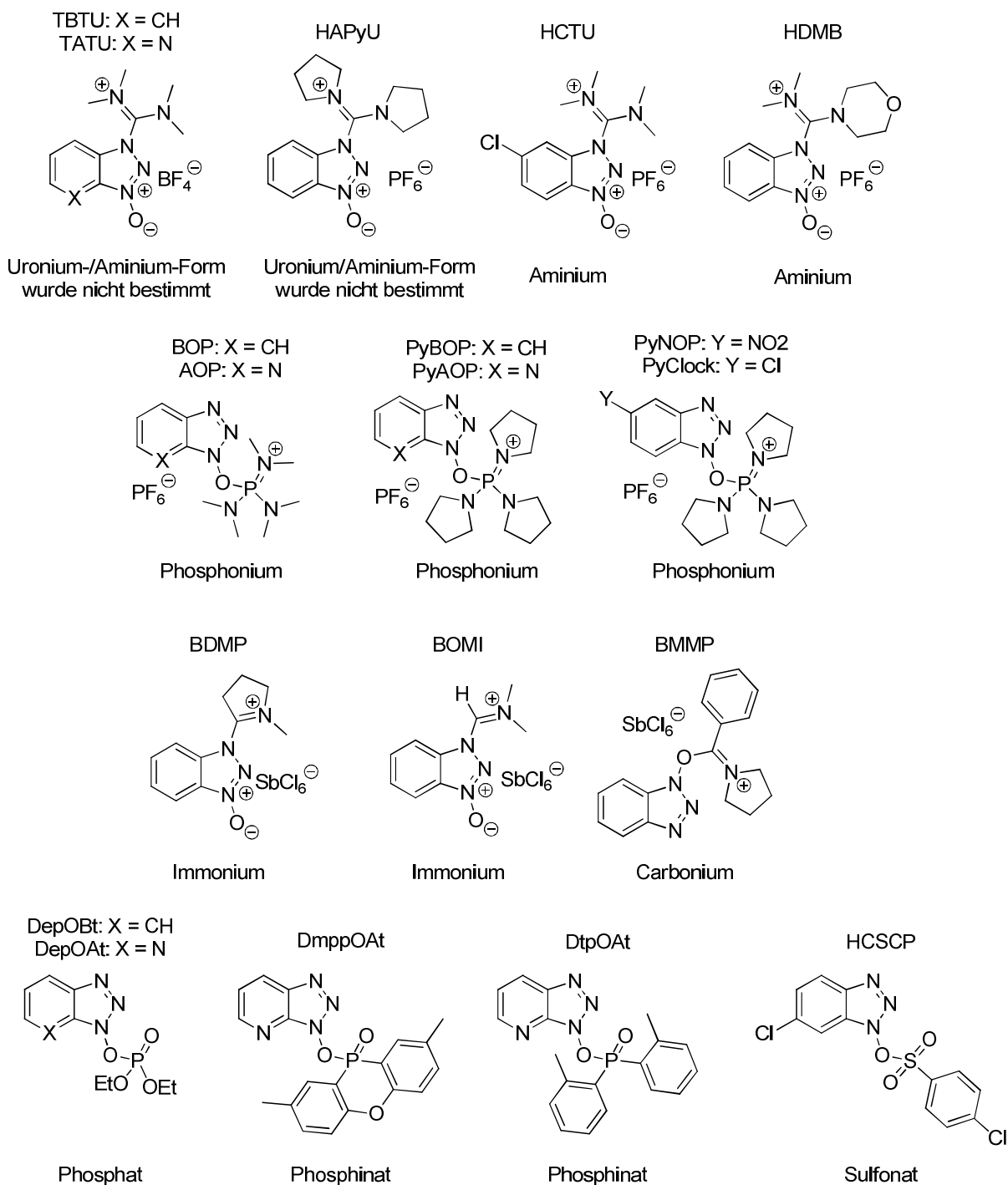


Abbildung 99: Reagenzien basierend auf 1H-Benzotriazol.

13.3 Chemikalienverzeichnis

Ein Überblick über die eingesetzten Chemikalien, kann im Tabelle 20 erhalten werden.

Tabelle 20: Chemikalienverzeichnis.

Reagenz/Lösemittel	Abkürzung	Lieferant	Reinheit
1,6-Dibromhexan	-	Fluka	97%
1-[(1-(Cyano-2-ethoxy-2-oxoethyliden-aminoxy)dimethylaminomorpholino)]-uroniumhexafluorophosphat	COMU	Novabiochem	≥98%
<i>1H</i> -Benzotriazol	BtH	Riedel-de Haen	≥99%
1-Hydroxybenzotriazol-Hydrat	HOBt·H ₂ O	Fluka	≥98%
2,2'-Azo-bis-(isobutyronitril)	AIBN	Sigma Aldrich	98%
2,4,6-Trimethylpyridin	TMP	Merck	≥99%
3-Brompropylammoniumbromid	-	Merck	≥98%
3-Hydroxyanisol	-	Alfa Aesar	97%
4,4-Dimethyl-4-silapentan-1-sulfonsäure-Natriumsalz	DSS	Deutero	99%
Acetondicarbonsäurediethylester	-	Fluka	≥90%
Acetylchlorid	AcOCl	Fluka	≥99%
Acrylsäure	AS	Merck	≥99%
Bromessigsäure	-	Lancaster	≥98%
Chlorameisensäureethylester	-	Sigma Aldrich	≥98%
Essigsäureanhydrid	Ac-O-Ac	Sigma Aldrich	≥98%
Ethyl-2-cyano-2-(hydroxyimino)acetat	Oxyma Pure	Novabiochem	≥98%
Kupfersulfat	CuSO ₄	Sigma Aldrich	98%
Kupferbromid/ <i>N,N,N',N'',N''</i> -Pentamethyldiethylentriamin	CuBr ₂ /PMDETA	Max Siebert	-
<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid	DCC	Sigma Aldrich	99%
<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin	DIEA	Fluka	≥98%
Natriumazid	NaN ₃	Sigma Aldrich	99%
Natriumchlorid	NaCl	VWR	99.9%
Natriumdodecylsulfat	SDS	Carl Roth	≥99%
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	Fisher	99%
Natriumhydroxid	NaOH	Riedel-de Haen	≥85%
Natriumsulfat	Na ₂ SO ₄	Sigma Aldrich	99%
<i>N</i> -Boc-Anthranilsäure	Boc-Ant	Sigma Aldrich	≥98%
<i>N</i> -Boc-Ethylendiamin	Boc-NH-C ₂ H ₄ -NH ₂	Alfa Aesar	98%
<i>N</i> -Fmoc-(¹⁵ N)-Glycin	Fmoc-(¹⁵ N)Gly	Cortecnet	≥98%

<i>N</i> -Fmoc-3-Nitro-L-Tyrosin	Fmoc-L-Tyr(3-NO ₂)-OH	Bachem	≥98%
<i>N</i> -Fmoc-Glycin	Fmoc-Gly-OH	Novabiochem	≥98%
<i>N</i> -Fmoc-Gly-Wang Harz (100-200 mesh), 0.79 mmol/g	Fmoc-Gly-Harz	Novabiochem	-
<i>N</i> -Fmoc-Gly-Wang Harz Low loaded (100-200 mesh), 0.33 mmol/g	Fmoc-Gly-Harz LL	Novabiochem	-
<i>N</i> -Fmoc-L-Leucin	Fmoc-L-Leu-OH	Novabiochem	≥98%
<i>N</i> -Fmoc-L-Phenylalanin	Fmoc-L-Phe-OH	Novabiochem	≥98%
<i>N</i> -Fmoc-L-Prolin	Fmoc-L-Pro-OH	Novabiochem	≥98%
<i>N</i> -Fmoc-L-Propargylglycin	Fmoc-L-Pra-OH	Bachem	98%
<i>N</i> -Fmoc-L-Valin	Fmoc-L-Val-OH	Novabiochem	≥98%
Ninhydrin-Lösung nach Stahl	-	Sigma Aldrich	-
<i>N</i> -Methylantranilsäure	Mant	Alfa Aesar	≥90%
<i>N</i> - α -Fmoc-L-Lysin-Hydrochlorid	Fmoc-L-Lys-OH·HCl	Sigma Aldrich	≥98%
<i>N</i> - α -Fmoc- <i>N</i> ^G -(2,2,4,6,7- Pentamethyldihydrobenzofuran- 5-sulfonyl)-L-Arginin	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	Novabiochem	≥98%
<i>N</i> - α -Fmoc- <i>N</i> - γ -Trityl-L-Glutamin	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	Novabiochem	≥98%
<i>N</i> - α -Fmoc- <i>N</i> - ϵ -2,4-Dinitrophenyl-L-lysin	Fmoc-L-Lys(Dnp)-OH	Bachem	
<i>N</i> - α -Fmoc- <i>N</i> - ϵ -Methoxycoumarin- 4-acetyl-L-lysin	Fmoc-L-Lys(Mca)-OH	Novabiochem	≥97%
<i>N</i> - α -Fmoc- <i>N</i> - ϵ -Methyltrityl-L-lysin	Fmoc-L-Lys(Mtt)-OH	Novabiochem	≥98%
<i>O</i> -(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3- tetramethyluroniumhexafluorophosphat	HBTU	Novabiochem	≥98%
Phenolphthalein	-	Sigma Aldrich	-
Phosphorpentoxid	P ₂ O ₅	Fluka	≥97%
Piperazin	-	Merck	≥99%
Salzsäure, konzentriert	HCl	VWR	36.2%
Schwefelsäure, konzentriert	H ₂ SO ₄	Sigma Aldrich	≥95%
Styrol	S	Merck	>99.5%
Thionylchlorid	SOCl ₂	Merck	≥99%
Triethylamin	TEA	Acros	99%
Trifluoressigsäure	TFA	Acros	99%
Trifluormethansulfonsäureanhydrid	-	Sigma Aldrich	≥99%
Triisopropylsilan	TIS	Alfa Aesar	99%
Zinn(II)-2-Ethylhexanoat	-		≥95%

Acetonitril	MeCN	Fisher	≥99.99%
Dichlormethan	DCM	Fisher	≥99.99%
Diethylether	-	Sigma Aldrich	≥99.5%
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma Aldrich	≥99.9%
Dimethylsulfoxid, deuteriert	DMSO-d ₆	Sigma Aldrich	≥99.9%
Ethanol	EtOH	Merck	≥99.5%
Ethylacetat	EtOAc	Fisher	≥99.99%
Isooctan	-	Applichem	≥99.5%
Methanol	MeOH	Fisher	≥99.99%
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	DMF	Sigma Aldrich	≥99.8%
<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon	NMP	Sigma Aldrich	≥99%
Tetrahydrofuran	THF	Sigma Aldrich	≥99.9%
Tris(2-aminoethyl)amin	TAEA	Acros	96%

13.4 Abkürzungen und Symbole

13.4.1 Abkürzungen

In diesem Abschnitt sind die Abkürzungen aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden und nicht bereits bei den Aminosäuren, im Chemikalienverzeichnis oder bei den Kupplungsreagenzien aufgeführt wurden.

Tabelle 21: Abkürzungsverzeichnis.

Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	NP	Normalphase
Cbz	Carbobenzoxy	PCCS	Photonen-Kreuzkorrelations-Spektroskopie
cmc	kritische Mizellbildungskonzentration		
CP	Kreuzpolarisation	PDI	Polydispersitätsindex
DLS	dynamische Lichtstreuung	PDMA	Poly(dimethylacrylamid)
DRU	digital-rektale Untersuchung	PEG	Poly(ethylenoxid)
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl	PSA	Prostata-spezifisches Antigen
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer	PTFE	Polytetrafluorethylen
GPC	Gelpermeationschromatographie	REM	Rasterelektronenmikroskopie
HF	Fluorwasserstoff	RI	Brechungsindex
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie	RP	Umkehrphase
IR	Infrarot	RT	Raumtemperatur
LCST	Untere kritische Lösungstemperatur	SPOS	Organische Festphasensynthese
MALDI	Matrix-assistierte Laser-Desorptions-Ionisation		
MAS	Rotation im magischen Winkel	SPPS	Festphasenpeptidsynthese
MS	Massenspektrometer	TOF	Flugzeit
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin	TRUS	transrektaler Ultraschall

13.4.2 Symbole

Hier sind die Symbole aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 22: Verzeichnis der Symbole.

Π_0	Osmotischer Druck
A_∞	Formfaktor
B_0	Magnetfeldstärke
D	Diffusionskoeffizient/-konstante
d	dipolare Kopplungskonstante
d_p	hydrodynamische Partikeldurchmesser
$g(t)$	Autokorrelationsfunktion
h	Planck'sches Wirkungsquantum ($6.626075 \cdot 10^{-34}$ J·s)
I	Intensität
k	Geschwindigkeitskonstante
k_B	Boltzmannkonstante ($1.38065 \cdot 10^{-23}$ J/K)
p_L	LaPlace-Druck
q	Streulichtvektor
r_A / r_B	Copolymerisationsparameter
t	Zeit
T	Temperatur
T_1	longitudinale Relaxationszeit
γ	gyromagnetisches Verhältnis
δ	chemische Verschiebung
η	Viskosität
λ	Wellenlänge
ν	Frequenz
τ	Korrelationszeit
ω_0	Resonanzfrequenz (Larmor-Frequenz)

13.5 Analytik der synthetisierten Verbindungen

13.5.1 Polymeranalytik

13.5.1.1 Carboxyfunktionalisierte Polymere

a) Poly(styrol-*co*-acrylsäure)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300.13 MHz), δ [ppm]: 0.69-2.42 (bm 3.6 H), 6.10-7.51 (bm, 5 H), 11.85 (bs, 0.1 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 75.47 MHz), δ [ppm]: 176.62, 144.98, 128.00, 125.72, 43.68, 31.31, 27.23, 26.72, 26.23.

13.5.1.2 Aminofunktionalisierte Polymere

a) Poly[styrol-*co*-*N*-(2-(*tert*-butyloxycarbonylaminoethyl)acrylamid)]

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300.13 MHz), δ [ppm]: 0.66-2.18 (bm, 35 H), 2.63-3.13 (bm, 2 H), 6.06-7.59 (bm, 34 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 75.47 MHz), δ [ppm]: 174.44, 155.53, 144.46, 127.93, 127.22, 125.65, 77.57, 42.62, 40.26, 38.80, 30.41, 28.22.

b) Poly[styrol-*co*-*N*-(2-aminoethyl)acrylamid]-Hydrochlorid

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300.13 MHz), δ [ppm]: 0.72-2.18 (bm, 38 H), 2.80-3.21 (bm, 2 H), 6.13-7.75 (bm, 34 H), 8.13 (bs, 3 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 75.47 MHz), δ [ppm]: 175.22, 145.17, 128.10, 127.32, 125.77, 43.58, 42.61, 38.40, 36.30, 31.31.

13.5.2 Analytik der fluoreszierenden Aminosäuren

13.5.2.1 *N*-Methylisatosäureanhydrid

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300.13 MHz), δ [ppm]: 3.46 (s, 3 H), 7.34 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 1 H), 7.44 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 1 H), 7.86 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, 1 H), 8.00 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, 1 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 75.47 MHz), δ [ppm]: 158.91, 147.68, 142.11, 137.15, 129.26, 123.55, 114.76, 111.40, 31.63.

MALDI TOF-MS: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 178, ($\text{M} [\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}_3+\text{H}]^+ = 178.05$).

13.5.2.2 *N*- α -Fmoc-*N*- ϵ -Methylanthraniloyl-L-lysin

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300.13 MHz), δ [ppm]: 1.29-1.82 (m, 6 H), 2.75 (s, 3 H), 3.13-3.28 (m, 2 H), 3.86-3.99 (m, 1 H), 4.15-4.35 (m, 3 H), 6.51-6.56 (m, 1 H), 6.60 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 1 H), 7.24-7.34 (m, 3 H), 7.39-7.44 (m, 2 H), 7.50-7.52 (m, 2 H), 7.56-7.66 (m, 2 H), 7.72 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 1 H), 7.89 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 1 H), 8.26-8.29 (m, 1 H), 12.55 (bs, 1 H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75.47 MHz), δ [ppm]: 174.08, 169.07, 156.24, 150.06, 143.89, 143.84, 140.76, 140.75, 132.22, 128.17, 127.68, 127.11, 125.33, 120.14, 115.35, 113.91, 110.44, 65.65, 53.85, 46.70, 38.64, 30.54, 29.28, 28.74, 23.25.

MALDI TOF-MS: m/z [M+H]⁺: 502, (M [C₂₉H₃₁N₃O₅+H]⁺ = 502.23).

13.5.2.3N- α -Fmoc-N- ϵ -(Boc-Anthraniloyl)-L-lysin

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300.13 MHz), δ [ppm]: 1.29-1.80 (m, 6 H), 1.46 (s, 9 H), 3.16-3.27 (m, 2 H), 3.87-3.97 (m, 1 H), 4.17-4.33 (m, 3 H), 7.01-7.06 (m, 1 H), 7.27-7.35 (m, 2 H), 7.39-7.48 (m, 3 H), 7.58-7.65 (m, 1 H), 7.69-7.76 (m, 3 H), 7.89 (d, ³J_{HH} = 7.5 Hz, 2 H), 8.20 (d, ³J_{HH} = 8.2 Hz, 1 H), 8.68-8.77 (m, 1 H), 10.72 (s, 1 H), 12.53 (s, 1 H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75.47 MHz), δ [ppm]: 174.06, 169.58, 168.54, 156.25, 143.90, 143.85, 140.77, 140.12, 132.35, 130.47, 127.70, 127.13, 125.35, 122.01, 120.95, 120.15, 118.31, 80.04, 65.68, 53.86, 46.72, 38.66, 30.53, 28.98, 28.47, 23.22.

MALDI TOF-MS: m/z [M+Na+H]²⁺: 611, (M [C₃₃H₃₇N₃O₇+Na+H]²⁺ = 611.26).

13.5.2.4N- α -Fmoc-N- ϵ -Anthraniloyl-L-lysin-Hydrochlorid

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300.13 MHz), δ [ppm]: 1.30-1.81 (m, 6 H), 3.22-3.27 (m, 2 H), 3.90-3.99 (m, 1 H), 4.15-4.32 (m, 3 H), 6.69 (bs, 3 H), 7.05-7.10 (m, 1 H), 7.16-7.18 (m, 1 H), 7.27-7.33 (m, 2 H), 7.34-7.44 (m, 3 H), 7.61-7.74 (m, 4 H), 7.88 (d, ³J_{HH} = 7.4 Hz, 2 H), 8.63-8.69 (m, 1 H), 11.80 (s, 1 H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75.47 MHz), δ [ppm]: 174.06, 166.56, 156.29, 143.92, 143.86, 140.78, 134.88, 132.01, 128.79, 127.72, 127.15, 125.64, 125.39, 125.24, 123.53, 120.18, 65.70, 53.89, 46.74, 38.96, 30.54, 28.46, 23.24.

MALDI TOF-MS: m/z [M+Na+H]²⁺: 511, (M [C₂₈H₃₀N₃O₅+Na+H]²⁺ = 511.21).

13.5.2.5N- α -Fmoc-N- ϵ -Acetylanthraniloyl-L-lysin

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300.13 MHz), δ [ppm]: 1.28-1.86 (m, 6 H), 2.07 (s, 3 H), 3.23-3.29 (m, 2 H), 3.90-3.97 (m, 1 H), 4.19-4.32 (m, 3 H), 7.08-7.13 (m, 1 H), 7.29-7.34 (m, 2 H), 7.39-7.48 (m, 3 H), 7.64-7.73 (m, 4 H), 7.89 (d, ³J_{HH} = 7.4 Hz, 2 H), 8.35 (d, ³J_{HH} = 8.2 Hz, 1 H), 8.70-8.73 (m, 1 H), 11.23 (s, 1 H), 12.46 (s, 1 H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75.47 MHz), δ [ppm]: 174.07, 168.19, 168.18, 156.24, 143.88, 143.84, 140.77, 140.75, 138.94, 131.69, 128.04, 127.67, 127.09, 125.31, 122.49, 121.15, 120.46, 120.13, 65.64, 53.84, 46.71, 38.69, 30.52, 28.46, 24.85, 23.19, 21.08.

MALDI TOF-MS: m/z [M+Na+H]²⁺: 553, (M [C₃₀H₃₁N₃O₆+Na+H]²⁺ = 553.22).

13.5.2.67-Methoxycoumarin-4-yl-essigsäure

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300.13 MHz), δ [ppm]: 3.86 (s, 3 H), 3.87 (s, 2 H), 6.31 (s, 1 H), 6.97 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2.4$ Hz, 1 H), 7.02 (d, $^4J_{\text{HH}} = 2.4$ Hz, 1 H), 7.62 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, 1 H), 12.80 (bs, 1 H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75.47 MHz), δ [ppm]: 170.70, 162.44, 160.17, 155.02, 150.14, 126.62, 112.97, 112.53, 112.28, 100.90, 55.99, 37.30.

MALDI TOF-MS: m/z [M+2H]²⁺: 236, (M [C₁₂H₁₀O₅+2H]²⁺ = 236.07).

13.5.2.77-Methoxycoumarin-4-acetyl-1-Benzotriazol

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300.13 MHz), δ [ppm]: 2.40 (m, 2 H), 3.86 (s, 3 H), 6.20-6.22 (m, 1 H), 6.95-6.99 (m, 2 H), 7.39-7.45 (m, 2 H), 7.69 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, 1 H), 7.87-7.93 (m, 2 H).

MALDI TOF-MS: m/z [M+Na]⁺: 359, (M [C₁₈H₁₄N₃O₄+Na]⁺ = 359.30).

13.5.2.8N- α -Fmoc-N- ϵ -(7-Methoxycoumarin-4-acetyl)-L-lysin

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300.13 MHz), δ [ppm]: 1.20-1.78 (m, 6 H), 3.00-3.11 (m, 2 H), 3.66 (s, 2 H), 3.84 (s, 3 H), 3.88-3.39 (m, 1 H), 4.17-4.32 (m, 3 H), 6.23 (s, 1 H), 6.93-7.02 (m, 2 H), 7.30-7.34 (m, 2 H), 7.39-7.44 (m, 2 H), 7.62 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, 1 H), 7.67 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, 1 H), 7.72 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 2 H), 7.89 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, 2 H), 8.20-8.23 (m, 1 H), 12.59 (s, 1 H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75.47 MHz), δ [ppm]: 174.06, 167.47, 162.38, 160.17, 156.25, 154.98, 151.12, 143.88, 143.85, 140.76, 127.66, 127.09, 126.47, 125.31, 120.13, 112.74, 112.63, 112.06, 100.88, 65.66, 55.90, 53.83, 46.72, 30.49, 28.56, 23.14.

MALDI TOF-MS: m/z [M+Na]⁺: 607, (M [C₃₃H₃₂N₂O₈+Na]⁺ = 607.21).

13.5.3 Analytik der Reagenzien zur Verwendung in der Clickchemie13.5.3.1 Azidoessigsäure

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300.13 MHz), δ [ppm]: 3.99 (s, 2 H), 13.15 (bs, 1 H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75.47 MHz), δ [ppm]: 170.10, 49.45.

MALDI TOF-MS: m/z [M+H]⁺: 102, (M [C₂H₃N₃O₂+H]⁺ = 102.03).

IR (Flüssigkeit, KBr-Platten): 2118 cm⁻¹[ν (N₃)].

13.5.3.2 N- α -Fmoc-N- ϵ -Azido-L-lysin

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300.13 MHz), δ [ppm]: 1.29-1.79 (m, 6 H), 3.32 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, 2 H), 3.90-3.97 (m, 1 H), 4.20-4.30 (m, 3 H), 7.30-7.35 (m, 2 H), 7.66 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, 2 H), 7.73 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 2 H), 7.89 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 2 H), 12.32 (s, 1 H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75.47 MHz), δ [ppm]: 173.89, 156.19, 143.87, 143.82, 140.75, 127.65, 127.07, 125.33, 120.13, 65.61, 53.69, 50.53, 46.68, 30.31, 27.85, 22.93.

MALDI TOF-MS: m/z [M+Na+H]²⁺: 418, (M [C₂₁H₂₃N₄O₂+Na+H]²⁺ = 418.42).

IR (KBr-Pressling): 2098 cm⁻¹[ν (N₃)].

13.5.3.31.6-Diazidohexan

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300.13 MHz), δ [ppm]: 1.30-1.39 (m, 4 H), 1.50-1.59 (m, 4 H), 3.31 (m, 4 H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75.47 MHz), δ [ppm]: 50.55, 28.11, 25.67.

MALDI TOF-MS: m/z [2xM+Na]⁺: 359, (M [2xC₆H₁₂N₆+Na]⁺ = 359.21).

IR (KBr-Pressling): 2097 cm⁻¹[v(N₃)].

13.5.4 Analytik der Peptide aus der Festphasenpeptidsynthese13.5.4.1 Fmoc-GFF-OH

Der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese folgend, resultierte ein weißer Feststoff, 941 mg, 53%.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300.13 MHz), δ [ppm]: 2.71 (dd, ²J_{HH} = 13.8 Hz, ³J_{HH} = 9.5 Hz, 1 H), 2.88-3.10 (m, 3 H), 3.48 (dd, ³J_{HH} = 16.9 Hz, ³J_{HH} = 6.0 Hz, 1 H), 3.61 (dd, ³J_{HH} = 16.8 Hz, ³J_{HH} = 6.1 Hz, 1 H), 4.18-4.27 (m, 3 H), 4.40-4.47 (m, 1 H), 4.52-4.59 (m, 1 H), 7.13-7.29 (m, 10 H), 7.31 (d, ³J_{HH} = 7.4 Hz, ³J_{HH} = 7.2 Hz, 2 H), 7.41 (dd, ³J_{HH} = 7.2 Hz, ³J_{HH} = 7.5 Hz, 2 H), 7.48 (dd, ³J_{HH} = 6.0 Hz, ³J_{HH} = 6.2 Hz, 1 H), 7.70 (d, ³J_{HH} = 7.4 Hz, 2 H), 7.89 (d, ³J_{HH} = 7.4 Hz, 2 H), 7.97 (d, ³J_{HH} = 8.4 Hz, 1 H), 8.38 (d, ³J_{HH} = 7.8 Hz, 1 H), 12.78 (s, 1 H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75.47 MHz), δ [ppm]: 172.71, 171.05, 168.71, 156.42, 143.85, 140.72, 137.63, 137.41, 129.26, 129.13, 128.23, 127.97, 127.63, 127.08, 126.46, 126.23, 125.27, 120.10, 65.78, 53.53, 53.45, 46.62, 43.27, 37.66, 36.72.

MALDI TOF-MS: m/z[M+Na]⁺: 614, (M [C₃₅H₃₃N₃O₆+Na]⁺ = 614.23).

13.5.4.2 AntGFFY_NG-OH

Der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese folgend, resultierte ein gelber Feststoff, 76.4 mg, 88%.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300.13 MHz), δ [ppm]: 2.62-3.06 (m, 6 H), 3.62-3.85 (m, 4 H), 4.45-4.62 (m, 3 H), 6.58 (t, ³J_{HH} = 7.5 Hz, 1 H), 6.75 (d, ³J_{HH} = 8.1 Hz, 1 H), 7.02 (d, ³J_{HH} = 8.5 Hz, 1 H), 7.10-7.27 (m, 11 H), 7.40-7.54 (m, 2 H), 7.79-7.83 (m, 1 H), 7.93 (d, ³J_{HH} = 8.4 Hz, 1 H), 8.10-8.20 (m, 2 H), 8.27-8.43 (m, 2 H), 10.74 (s, 1 H), 12.60 (bs, 1 H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75.47 MHz), δ [ppm]: 171.06, 170.97, 170.90, 170.83, 168.78, 168.42, 152.46, 151.02, 137.72, 137.63, 136.64, 136.12, 129.30, 129.21, 128.83, 128.40, 128.12, 127.97, 126.29, 126.19, 125.62, 118.92, 115.09, 113.49, 109.65, 54.02, 53.57, 53.31, 42.22, 40.69, 37.54, 36.91, 36.60.

MALDI TOF-MS: m/z[M+Na]⁺: 776, (M [C₃₈H₃₉N₇O₁₀+Na]⁺ = 776.27).

13.5.4.3 AntRQLRVVGGY_NG-OH

Der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese folgend, resultierte ein weißer Feststoff, 124 mg, 90%.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300.13 MHz), δ [ppm]: 0.73-0.91 (m, 18 H), 1.36-1.59 (m, 8 H), 1.63-1.79 (m, 4 H), 1.84-2.18 (m, 5 H), 2.68-2.76 (m, 1 H), 2.95-3.16 (m, 5 H), 3.54-3.85 (m, 6 H),

4.14-4.57 (m, 7 H), 6.50-6.59 (m, 1 H), 6.63-7.62 (m, 17 H), 7.62-7.70 (m, 3 H), 7.94-8.24 (m, 7 H), 8.39-8.47 (m, 1 H), 10.75 (bs, 1 H).

MALDI TOF-MS: $m/z[M+H]^+$: 1269, ($M [C_{55}H_{85}N_{19}O_{16}+H]^+ = 1268.65$).

13.5.4.4 Fmoc-Y_NGFFK_{Ant}G-OH

Der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese folgend, resultierte ein gelber Feststoff, 110 mg, 90%.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300.13 MHz), δ [ppm]: 1.27-1.41 (m, 2 H), 1.44-1.77 (m, 4 H), 2.67-3.08 (m, 6 H), 3.15-3.21 (m, 2 H), 3.56-3.83 (m, 4 H), 4.07-4.34 (m, 5 H), 4.49-4.62 (m, 2 H), 6.48 (t, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, 1 H), 6.67 (d, $^3J_{HH} = 8.0$ Hz, 1 H), 7.01 (d, $^3J_{HH} = 8.5$ Hz, 1 H), 7.08-7.30 (m, 13 H), 7.37-7.57 (m, 5 H), 7.58 (d, $^3J_{HH} = 7.3$ Hz, 2 H), 7.67 (d, $^3J_{HH} = 8.8$ Hz, 1 H), 7.81-7.94 (m, 3 H), 8.01-8.39 (m, 7 H), 10.75 (s, 1 H), 12.68 (s, 1 H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75.47 MHz), δ [ppm]: 171.78, 171.46, 171.08, 170.84, 170.73, 168.73, 168.22, 155.89, 150.87, 149.17, 143.77, 143.64, 140.67, 140.63, 137.68, 136.51, 136.06, 131.48, 129.58, 129.25, 128.05, 127.99, 127.62, 127.00, 126.21, 125.49, 125.18, 120.08, 118.84, 116.42, 115.28, 114.79, 65.68, 64.92, 55.98, 53.83, 53.59, 52.42, 46.53, 41.70, 40.61, 37.59, 37.42, 36.12, 31.99, 28.92, 22.75.

MALDI TOF-MS: $m/z[M+2H]^{2+}$: 1105, ($M [C_{59}H_{61}N_9O_{13}+2H]^{2+} = 1105.45$).

13.5.4.5 Fmoc-Y_NGFFK_{Mant}G-OH

Der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese folgend, resultierte ein gelber Feststoff, 84 mg, 75%.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300.13 MHz), δ [ppm]: 1.30-1.41 (m, 2 H), 1.44-1.59 (m, 3 H), 1.63-1.79 (m, 1 H), 2.64-2.87 (m, 6 H), 2.90-3.09 (m, 3 H), 3.13-3.23 (m, 2 H), 3.54-3.80 (m, 4 H), 4.07-4.34 (m, 5 H), 4.48-4.62 (m, 2 H), 6.52 (t, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, 1 H), 6.59 (d, $^3J_{HH} = 8.1$ Hz, 1 H), 7.01 (d, $^3J_{HH} = 8.5$ Hz, 1 H), 7.09-7.32 (m, 13 H), 7.39 (t, $^3J_{HH} = 7.4$ Hz, 3 H), 7.44-7.53 (m, 2 H), 7.58 (d, $^3J_{HH} = 7.5$ Hz, 2 H), 7.67 (d, $^3J_{HH} = 8.8$ Hz, 1 H), 7.81-7.92 (m, 3 H), 8.02 (d, $^3J_{HH} = 8.5$ Hz, 1 H), 8.07-8.14 (m, 2 H), 8.18-8.29 (m, 3 H), 10.75 (s, 1 H), 12.58 (bs, 1 H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75.47 MHz), δ [ppm]: 171.78, 171.46, 171.08, 170.84, 170.73, 169.00, 168.23, 155.89, 150.87, 149.90, 143.77, 143.65, 140.67, 140.63, 137.69, 136.51, 136.06, 132.17, 129.58, 129.25, 129.22, 128.15, 128.05, 127.99, 127.62, 127.01, 126.21, 125.49, 125.18, 120.08, 118.84, 115.43, 114.01, 110.50, 65.69, 64.92, 56.00, 53.86, 53.61, 52.41, 46.54, 41.82, 40.61, 37.57, 37.43, 36.11, 31.98, 29.32, 28.88, 22.72.

MALDI TOF-MS: $m/z[M+Na]^+$: 1140, ($M [C_{60}H_{63}N_9O_{13}+Na]^+ = 1140.44$).

13.5.4.6 H₂¹⁵N-GY_NGFFK_{Mant}G-OH

Der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese folgend, resultierte ein gelber Feststoff, 313 mg, 59%.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300.13 MHz), δ [ppm]: 1.24-1.42 (m, 2 H), 1.43-1.63 (m, 3 H), 1.64-1.79 (m, 1 H), 2.66-2.88 (m, 6 H), 2.94-3.08 (m, 3 H), 3.12-3.23 (m, 2 H), 3.42-3.60 (m, 3 H),

3.67-3.86 (m, 3 H), 4.24-4.37 (m, 1 H), 4.43-4.68 (m, 3 H), 6.53 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, 1 H), 6.60 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 1 H), 7.02 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 1 H), 7.09-7.32 (m, 11 H), 7.39 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 1 H), 7.50 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, 1 H), 7.79 (s, 1 H), 7.89 (bs, 2 H), 8.00-8.17 (m, 3 H), 8.19-8.31 (m, 2 H), 8.34-8.47 (m, 1 H), 8.66 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 1 H), 10.86 (s, 1 H), 12.64 (bs, 1 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 75.47 MHz), δ [ppm]: 171.79, 171.10, 170.93, 170.80, 170.53, 169.05, 168.11, 165.75, 151.01, 150.01, 137.75, 137.70, 136.39, 136.23, 132.20, 129.27, 128.69, 128.17, 128.08, 128.00, 126.28, 126.25, 125.45, 118.93, 115.35, 113.92, 110.41, 53.91, 53.77, 53.59, 52.45, 41.63, 41.59, 40.68, 37.66, 37.45, 36.82, 36.79, 32.02, 29.28, 28.90, 22.75.

MALDI TOF-MS: $m/z[M+2H]^{2+}$: 954, (M [C₆₀H₆₃N₈¹⁵NO₁₃+2H]²⁺ = 954.42).

13.5.4.7 H₂N-GK_{Man}RQLRVVGGY_NG-OH

Der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese folgend, resultierte ein gelber Feststoff, 107 mg, 68%.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300.13 MHz), δ [ppm]: 0.73-0.90 (m, 18 H), 1.23-1.75 (m, 17 H), 1.81-2.18 (m, 6 H), 2.66-2.80 (m, 4 H), 2.93-3.22 (m, 6 H), 3.54-3.81 (m, 8 H), 4.11-4.37 (m, 7 H), 4.53 (dt, $^3J_{\text{HH}} = 4.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 9.2$ Hz, 1 H), 6.52-6.64 (m, 2 H), 6.74-7.54 (m, 15 H), 7.73-7.86 (m, 4 H), 7.92-8.21 (m, 8 H), 8.27 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5.4$ Hz, 1 H), 8.43 (t, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, 1 H), 8.63 (bs, 1 H), 10.79 (bs, 1 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 75.47 MHz), δ [ppm]: 174.40, 172.14, 171.80, 171.49, 171.37, 171.14, 171.10, 170.87, 169.15, 168.96, 168.61, 166.25, 159.25, 158.83, 156.90, 156.81, 150.97, 150.08, 136.55, 136.22, 132.31, 129.05, 128.25, 125.53, 118.93, 115.38, 114.04, 110.50, 57.82, 53.75, 53.25, 52.82, 52.78, 52.24, 51.28, 41.85, 40.74, 40.54, 40.19, 40.18, 39.45, 38.69, 36.57, 31.71, 30.55, 30.49, 29.36, 28.91, 28.90, 25.06, 24.96, 24.17, 23.11, 22.99, 21.60, 19.25, 18.19, 18.09.

MALDI TOF-MS: $m/z[M+2H]^{2+}$: 1469, (M [C₆₄H₁₀₄N₂₂O₁₈+2H]²⁺ = 1468.79).

13.5.4.8 Fmoc-(¹⁵N)GK_{Mea}GFFK_{Dnp}G-OH

Der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese folgend, resultierte ein gelber Feststoff, 933 mg, 69%.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 300.13 MHz), δ [ppm]: 1.13-1.81 (m, 12 H), 2.66 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 9.5$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 13.8$ Hz, 1 H), 2.81 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 9.4$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 14.1$ Hz, 1 H), 2.91-3.07 (m, 4 H), 3.38-3.48 (m, 2 H), 3.51-3.70, (m, 6 H), 3.74-3.78 (m, 2 H), 3.83 (s, 3 H), 4.15-4.25 (m, 4 H), 4.31-4.39 (m, 1 H), 4.44-4.58 (m, 2 H), 6.22 (s, 1 H), 6.93-6.98 (m, 2 H), 7.07-7.42 (m, 17 H), 7.64-7.69 (m, 3 H), 7.87 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 2 H), 7.95 (t, $^3J_{\text{HH}} = 8.6$ Hz, 2 H), 8.07-8.22 (m, 6 H), 8.80-8.85 (m, 2 H), 12.58 (bs, 1 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 75.47 MHz), δ [ppm]: 171.87, 171.69, 171.09, 170.87, 170.77, 169.12, 168.38, 167.38, 162.35, 160.12, 154.93, 151.15, 148.07, 143.82, 140.70, 137.69, 137.65, 134.63, 129.94, 129.55, 129.25, 129.15, 128.08, 127.94, 127.63, 127.07, 126.49, 126.26, 126.16, 125.23, 123.66,

120.09, 115.17, 112.66, 112.60, 112.08, 100.85, 65.73, 55.92, 53.95, 53.71, 52.53, 52.03, 46.61, 42.78, 40.61, 38.85, 37.58, 37.56, 37.34, 31.81, 31.75, 28.60, 27.66, 22.62, 22.37.

MALDI TOF-MS: $m/z[M+Na+H]^{2+}$: 1368, ($M [C_{69}H_{72}N_{10}^{15}NO_{18}+Na+H]^{2+} = 1367.50$).

13.5.4.9 $H_2^{15}N$ -GK_{Mca}RQLRVVGGK_{Dnp}G-OH

Der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese folgend, resultierte ein gelber Feststoff, 151 mg, 86%.

1H -NMR (DMSO- d_6 , 300.13 MHz), δ [ppm]: 0.72-0.96 (m, 18 H), 1.21-1.76 (m, 23 H), 1.81-2.23 (m, 6 H), 2.95-3.16 (m, 6 H), 3.42-3.49 (m, 3 H), 3.57-3.80 (m, 10 H), 3.85 (s, 3 H), 4.09-4.40 (m, 8 H), 6.24 (s, 1 H), 6.73-7.47 (m, 12 H), 7.61 (bs, 1 H), 7.70 (d, $^3J_{HH} = 8.8$ Hz, 1 H), 7.81 (t, $^3J_{HH} = 8.7$ Hz, 2 H), 7.95 (d, $^3J_{HH} = 6.9$ Hz, 2 H), 8.01-8.13 (m, 5 H), 8.81 (t, $^3J_{HH} = 5.4$ Hz, 1 H), 8.21-8.35 (m, 3 H), 8.46 (bs, 1 H), 8.69 (bs, 1 H), 8.84-8.87 (m, 2 H), 11.07 (bs, 1 H),

MALDI TOF-MS: $m/z[M+H]^+$: 1638, ($M [C_{71}H_{109}N_{22}^{15}NO_{22}+H]^+ = 1637.82$).

13.5.4.10 N_3 -CH₂-NH-K_{Mca}RQLRVVGGK_{Dnp}K_{N2}G-OH

Der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese folgend, resultierte ein gelber Feststoff, 50 mg, 28%.

1H -NMR (DMSO- d_6 , 300.13 MHz), δ [ppm]: 0.70-0.94 (m, 18 H), 1.20-1.76 (m, 32 H), 1.80-2.15 (m, 3 H), 2.75-3.16 (m, 8 H), 3.29 (t, $^3J_{HH} = 6.7$ Hz, 2 H), 3.42-3.62 (m, 2 H), 3.62-3.80 (m, 9 H), 3.85 (s, 3 H), 4.14-4.39 (m, 9 H), 6.23 (s, 1 H), 6.53-7.53 (m, 15 H), 7.62-7.72 (m, 1 H), 7.77-7.87 (m, 1 H), 7.89-8.33 (m, 13 H), 8.79-8.92 (m, 3 H), 11.42 (bs, 1 H),

^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 75.47 MHz), δ [ppm]: 174.14, 172.03, 171.81, 171.59, 171.38, 171.24, 171.21, 171.10, 171.11, 170.81, 169.00, 168.64, 167.52, 162.41, 160.17, 156.73, 156.71, 154.97, 151.22, 148.17, 134.68, 130.02, 129.63, 126.59, 123.71, 115.36, 112.64, 112.12, 100.89, 57.78, 57.65, 55.97, 52.72, 52.68, 52.28, 52.23, 52.12, 51.06, 50.58, 42.75, 41.93, 40.76, 40.62, 40.51, 38.84, 31.74, 31.64, 31.57, 31.54, 30.51, 28.99, 28.94, 28.64, 27.89, 27.74, 24.99, 24.14, 23.05, 22.79, 22.52, 22.43, 21.55, 19.20, 18.12, 18.02.

MALDI TOF-MS: $m/z[M+H]^+$: 1817, ($M [C_{77}H_{118}N_{29}O_{23}+H]^+ = 1816.90$).

IR (KBr-Pressling): 2108 cm^{-1} [$\nu(N_3)$].

13.5.4.11 PraK_{Mca}RQLRVVGGK_{Dnp}PraG-OH

Der allgemeinen Vorschrift zur Peptidsynthese folgend, resultierte ein gelber Feststoff, 843.5 mg, 90%.

1H -NMR (DMSO- d_6 , 300.13 MHz), δ [ppm]: 0.70-0.97 (m, 18 H), 1.20-1.78 (m, 25 H), 1.83-2.18 (m, 4 H), 2.82-2.85 (m, 2 H), 2.91-3.16 (m, 10 H), 3.42-3.52 (m, 2 H), 3.61-3.82 (m, 9 H), 3.86 (s, 3 H), 3.97-4.01 (m, 1 H), 4.14-4.50 (m, 10 H), 6.24 (s, 1 H), 6.73-7.43 (m, 13 H), 7.55 (bs, 1 H), 7.70 (d, $^3J_{HH} = 8.8$ Hz, 1 H), 7.78-7.90 (m, 2 H), 7.97-8.10 (m, 4 H), 8.18-8.33 (m, 7 H), 8.64-8.72 (m, 1 H), 8.81-8.88 (bs, 3 H), 10.84 (bs, 1 H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75.47 MHz), δ [ppm]: 174.10, 171.98, 171.49, 171.19, 171.16, 170.91, 170.88, 170.77, 170.74, 170.01, 169.98, 168.94, 168.69, 167.48, 167.46, 162.37, 160.12, 156.75, 156.67, 154.93, 151.24, 148.11, 134.63, 129.98, 129.61, 126.58, 123.70, 115.29, 112.59, 112.54, 112.11, 100.83, 80.51, 77.91, 75.26, 72.92, 57.75, 57.63, 55.95, 53.71, 52.81, 52.66, 52.45, 52.27, 52.06, 51.35, 51.10, 42.70, 41.94, 41.83, 40.74, 40.53, 40.43, 38.81, 31.74, 31.68, 31.52, 30.50, 30.47, 29.01, 28.97, 28.62, 28.12, 27.69, 24.96, 24.76, 24.11, 23.02, 22.61, 22.42, 21.66, 21.62, 21.50, 19.16, 18.08, 17.97.

MALDI TOF-MS: m/z[M+H]⁺: 1770, (M [C₇₉H₁₁₆N₂₄O₂₃+H]⁺ = 1769.87).

13.5.5 Analytik der Peptid-Polymer-Konjugate

13.5.5.1 (PS-co-PAA)-C₂H₄-NH-FFG-Fmoc

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300.13 MHz), δ [ppm]: 0.67-2.11 (bm, 40 H), 2.59-3.14 (bm, 6 H), 3.44-3.68 (bm, 4 H), 4.09-4.31 (bm, 3 H), 4.37-4.64 (bm, 2 H), 6.20-7.59 (bm, 38 H), 7.64-8.08 (bm, 5 H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75.47 MHz), δ [ppm]: 172.85, 171.02, 170.60, 168.68, 156.39, 144.64, 143.82, 140.70, 137.60, 137.49, 129.26, 129.23, 129.17, 129.10, 128.21, 128.17, 128.02, 127.94, 127.89, 127.61, 127.07, 126.49, 126.15, 125.56, 125.25, 120.09, 65.75, 53.46, 53.41, 46.59, 45.00, 43.24, 41.78, 37.98, 37.72, 37.45, 36.68.

13.5.5.2 (PS-co-PAA)-C₂H₄-NH-FFG-NH₂

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300.13 MHz), δ [ppm]: 0.38-2.33 (bm, 52 H), 2.59-3.41 (bm, 10 H), 4.35-4.64 (bm, 2 H), 6.21-7.45 (bm, 41 H), 7.88 (bs, 1 H), 8.22 (bs, 1 H), 8.37 (bs, 1 H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75.47 MHz), δ [ppm]: 174.41, 172.48, 170.59, 144.90, 137.68, 137.45, 129.27, 129.17, 128.02, 127.95, 127.24, 126.27, 126.20, 125.56, 54.05, 53.15, 44.47, 44.32, 41.71, 37.86, 37.84, 37.80, 37.75.

13.5.5.3 (PS-co-PAA)-C₂H₄-NH-GK_{Mant}-FFGY_N(¹⁵N)G-Fmoc

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300.13 MHz), δ [ppm]: 0.67-2.35 (bm, 28 H), 2.60-3.26 (bm, 13 H), 3.45-3.74 (bm, 4 H), 4.06-4.35 (bm, 5 H), 4.44-4.67 (bm, 2 H), 6.17-7.50 (bm, 41 H), 7.57-7.75 (bm, 4 H), 7.78- 7.93 (bm, 3 H), 7.94-8.09 (bm, 2 H), 8.15- 8.44 (bm, 3 H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75.47 MHz), δ [ppm]: 174.69, 171.89, 171.10, 170.21, 169.11, 168.62, 165.45, 156.84, 150.08, 150.06, 144.72, 142.64, 139.50, 137.50, 136.41, 136.10, 132.31, 129.34, 129.03, 128.28, 128.15, 128.06, 127.40, 126.31, 125.68, 124.29, 121.51, 120.99, 120.15, 115.30, 113.97, 109.96, 65.98, 53.97, 53.94, 53.83, 53.78, 46.64, 41.73, 40.11, 38.81, 38.04, 29.32, 28.98, 28.94, 23.88.

13.5.5.4(PS-co-PAA)-C₂H₄-NH-GK_{ManI}-FFGY_NG-¹⁵NH₂

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300.13 MHz), δ [ppm]:0.68-2.32 (bm, 42 H), 2.63-3.11 (bm, 13 H), 3.42-3.96 (bm, 5 H), 4.07-4.35 (bm, 1 H), 4.41-4.67 (bm, 2 H), 6.17-7.53 (bm, 57 H), 7.60-7.77 (bm, 2 H), 7.81- 7.95 (bm, 1 H), 7.96-8.18 (bm, 2 H), 8.23- 8.60 (bm, 3 H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75.47 MHz), δ [ppm]:174.46, 173.22, 171.02, 170.97, 169.03, 168.50, 168.38, 150.00, 149.95, 145.41, 144.56, 137.73, 137.69, 136.20, 135.06, 132.13, 129.25, 129.19, 128.15, 127.95, 127.20, 126.24, 126.18, 125.55, 124.91, 120.34, 115.32, 113.87, 110.35, 54.05, 53.73, 53.52, 53.17, 41.73, 40.55, 38.69, 38.06, 37.41, 37.29, 37.07, 31.29, 29.23, 29.01, 28.84, 22.79.

13.5.5.5(PS-co-PAA)-C₂H₄-NH-GK_{Dnp}-FFGK_{Mca}G-(¹⁵N)-Fmoc

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300.13 MHz), δ [ppm]:0.76-2.20 (bm, 42 H), 2.59-3.12 (bm, 10 H), 3.39-3.54 (bm, 13 H), 4.13-4-38 (bm, 5 H), 4.42-4-61 (bm, 2 H), 6.22 (bs, 1 H), 6.27-7.45 (bm, 48 H), 7.59-7.73 (bm, 3 H), 7.80-7.90 (bm, 2 H), 7.98-8.05 (bm, 4 H), 8.05-8.28 (bm, 5 H), 8.73-8.89 (bm, 2 H).

13.5.5.6(PS-co-PAA)-C₂H₄-NH-GK_{Dnp}-FFGK_{Mca}G-¹⁵NH₂

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300.13 MHz), δ [ppm]:0.61-2.27 (bm, 45 H), 2.61-3.19 (bm, 10 H), 3.29-3.95 (bm, 13 H), 4.12-4-65 (bm, 4 H), 6.08-7.90 (bm, 74 H), 7.98-8.46 (bm, 6 H), 8.72-8.92 (bm, 2 H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75.47 MHz), δ [ppm]:171.98, 171.65, 171.10, 170.99, 170.97, 168.56, 167.37, 162.33, 160.09, 154.91, 151.17, 148.05, 145.13, 137.73, 137.65, 134.60, 129.91, 129.52, 129.24, 129.08, 128.03, 127.92, 127.38, 126.52, 126.21, 126.10, 125.73, 123.63, 115.20, 112.64, 112.59, 112.05, 100.82, 55.88, 54.45, 53.91, 52.72, 52.15, 44.52, 44.34, 42.75, 41.94, 40.59, 37.43, 37.30, 37.24, 37.22, 31.41, 31.29, 28.57, 27.66, 22.56, 22.47.

14. Literaturverzeichnis

1. *Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends*; Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg): Berlin, 2010; Vol. 7.
2. Rohde, V.; Katalinic, A.; Wasem, J. *Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Prostataerkrankungen*; Robert Koch-Institut: Berlin, 2007; Vol. 36.
3. Dhanasekaran, S. M.; Barrette, T. R.; Ghosh, D.; Shah, R.; Varambally, S.; Kurachi, K.; Pienta, K. J.; Rubin, M. A.; Chinnaiyan, A. M. *Nature***2001**, 412, 822.
4. Benoiton, N. L. *Chemistry of peptide synthesis*; CRC Press: New York, 2006.
5. Macias, M. J.; Gervais, V.; Civera, C.; Oschkinat, H. *Nature Structural & Molecular Biology***2000**, 7, 375.
6. Fischer, E.; Fourneau, E. *Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft***1901**, 34, 2868.
7. Bergmann, M.; Zervas, L. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)***1932**, 65, 1192.
8. Vigneaud, V. d.; Ressler, C.; Swan, J. M.; Roberts, C. W.; Katsoyannis, P. G.; Gordon, S. *Journal of the American Chemical Society***1953**, 75, 4879.
9. Merrifield, R. B. *Journal of the American Chemical Society***1963**, 85, 2149.
10. Merrifield, R. B. *Recent Progress in Hormone Research***1967**, 23, 451.
11. Sakakibara, S.; Shimonishi, Y.; Kishida, Y.; Okada, M.; Sugihara, H. *Bulletin of the Chemical Society of Japan***1967**, 40, 2164.
12. Merrifield, R. B.; Stewart, J. M.; Jernberg, N. *Analytical Chemistry***1966**, 38, 1905.
13. Merrifield, B. *Science***1986**, 232, 341.
14. Bayer, E.; Jung, G.; Hagenmaier, H. *Tetrahedron***1968**, 24, 4853.
15. Sano, S.; Kurihara, M. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie***1969**, 350, 1183.
16. Sharp, J. J.; Robinson, A. B.; Kamen, M. D. *Journal of the American Chemical Society***1973**, 95, 6097.
17. Carpino, L. A.; Han, G. Y. *The Journal of Organic Chemistry***1972**, 37, 3404.
18. Barany, G.; Merrifield, R. B. *Solid-phase peptide synthesis. In The Peptides, Vol. 2*; Academic Press: New York, 1979.
19. Atherton, E.; Sheppard, R. C. *The fluorenylmethoxycarbonyl amino protecting group. In The Peptides, Vol. 9* Academic Press: New York, 1987.
20. Fields, G. B.; Noble, R. L. *International Journal of Peptide and Protein Research***1990**, 35, 161.
21. Fields, G. B.; Lauer-Fields, J. L.; Liu, R.-q.; Barany, G. *Principles and practice of solid-phase peptide synthesis. In Synthetic Peptides: A User's Guide, 2nd ed.*; in press. W.H. Freeman: New York, , 2001.
22. Yu, H. M.; Chen, S. T.; Wang, K. T. *The Journal of Organic Chemistry***1992**, 57, 4781.
23. Lindquist, C.; Tedebark, U.; Ersoy, O.; Somfai, P. *Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry***2003**, 33, 2257
24. Adam, D. *Nature***2003**, 421, 571.
25. Ferguson, J. D. *Molecular Diversity***2003**, 7, 281.
26. Lidström, P.; Tierney, J.; Wathey, B.; Westman, J. *Tetrahedron***2001**, 57, 9225.
27. Caddick, S.; Fitzmaurice, R. *Tetrahedron***2009**, 65, 3325.
28. Kappe, C. O. *Angewandte Chemie International Edition***2004**, 43, 6250.
29. Collins, J. M.; Leadbeater, N. E. *Organic & Biomolecular Chemistry***2007**, 5, 1141.
30. Schanche, J.-S. *Molecular Diversity***2003**, 7, 291.
31. Hajek, M. In *Microwaves in Organic Synthesis*; Loupy, A., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2002, 345.
32. Perreux, L.; Loupy, A. *Tetrahedron***2001**, 57, 9199.
33. Palasek, S. A.; Cox, Z. J.; Collins, J. M. *Journal of Peptide Science***2007**, 13, 143.
34. Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*; CRC Press: New York, 1997.
35. Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G. In *Methods in Molecular Biology - Peptide Synthesis and Applications*; Howl, J., Ed.; Humana Press: Totowa, 2005; Vol. 298, 3.

36. Howl, J.; (ed.) *Methods in molecular biology - Peptide Synthesis and applications* Humana Press Inc.: Totowa, 2005; Vol. 298.
37. Mitchell, A. R.; Kent, S. B. H.; Engelhard, M.; Merrifield, R. B. *The Journal of Organic Chemistry***1978**, *43*, 2845.
38. Atherton, E.; Clive, D. L. J.; Sheppard, R. C. *Journal of the American Chemical Society***1975**, *97*, 6584.
39. Arshady, R.; Atherton, E.; Clive, D. L. J.; Sheppard, R. C. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* **1981**, 529.
40. Bayer, E. *Angewandte Chemie International Edition in English***1991**, *30*, 113.
41. *Solid-Phase Organic Synthesis*; Burgess, K., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2000.
42. Wang, S.-S. *Journal of the American Chemical Society***1973**, *95*, 1328.
43. Barlos, K.; Gatos, D.; Kallitsis, J.; Papaphotiu, G.; Sotiriu, P.; Wenqing, Y.; Schäfer, W. *Tetrahedron Letters***1989**, *30*, 3943.
44. Flörsheimer, A.; Riniker, B. *Solid-phase synthesis of peptides with the highly acid-sensitive HMPB linker*; ESCOM: Leiden, 1991.
45. Bernatowicz, M. S.; Daniels, S. B.; Köster, H. *Tetrahedron Letters***1989**, *30*, 4645.
46. Rink, H. *Tetrahedron Letters***1987**, *28*, 3787.
47. Sieber, P. *Tetrahedron Letters***1987**, *28*, 2107.
48. Bowmaker, G. A.; Effendy; Skelton, B. W.; Somers, N.; White, A. H. *Inorganica Chimica Acta***2005**, *358*, 4307.
49. Atherton, E.; Logan, C. J.; Sheppard, R. C. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* **1981**, 538.
50. Carpino, L. A.; Ionescu, D.; El-Faham, A. *The Journal of Organic Chemistry***1996**, *61*, 2460.
51. Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M. *Journal of the American Chemical Society***1967**, *89*, 5012.
52. Carpino, L. A.; El-Faham, A. *The Journal of Organic Chemistry***1994**, *59*, 695.
53. Jursic, B. S.; Zdravkovski, Z. *Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry***1993**, *23*, 2761
54. Jakubke, H. D. *Peptide: Chemie und Biologie*; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 1996.
55. Belleau, B.; Malek, G. *Journal of the American Chemical Society***1968**, *90*, 1651.
56. Meienhofer, J. *The azide method on peptide synthesis*; Academic: New York, 1979.
57. Joullie, M. M.; Lassen, K. M. *Arkivoc*, 189.
58. Nájera, C. *Synlett***2002**, 2002, 1388.
59. Han, S.-Y.; Kim, Y.-A. *Tetrahedron***2004**, *60*, 2447.
60. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. *Tetrahedron***2005**, *61*, 10827.
61. Sheehan, J. C.; Hess, G. P. *Journal of the American Chemical Society***1955**, *77*, 1067.
62. Valeur, E.; Bradley, M. *Chemical Society Reviews***2009**, *38*, 606.
63. Sarantakis, D.; Teichman, J.; Lien, E. L.; Fenichel, R. L. *Biochemical and Biophysical Research Communications***1976**, *73*, 336.
64. Izdebski, J.; Kunce, D. *Journal of Peptide Science***1997**, *3*, 141.
65. Sheehan, J.; Cruickshank, P.; Boshart, G. *The Journal of Organic Chemistry***1961**, *26*, 2525.
66. König, W.; Geiger, R. *Chemische Berichte***1970**, *103*, 788.
67. Carpino, L. A. *Journal of the American Chemical Society***1993**, *115*, 4397.
68. Chen, F. M. F.; Kuroda, K.; Benoiton, N. L. *Synthesis***1978**, *12*, 928.
69. Heimer, E. P.; Chang, C.-D.; Lambros, T.; Meienhofer, J. *International Journal of Peptide and Protein Research***1981**, *18*, 237.
70. Carlquist, M. *Acta Chemica Scandinavica***1987**, *41b*, 494.
71. Bodanszky, M. *Active esters in peptide synthesis*; Academic Press Inc.: New York, 1979; Vol. 1.
72. Nefkens, G. H. L.; Tesser, G. I. *Journal of the American Chemical Society***1961**, *83*, 1263.
73. Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M. *Journal of the American Chemical Society***1964**, *86*, 1839.
74. Kisfaludy, L.; Ceprini, M. Q.; Rakoczy, B.; Kovacs, J. In *Peptides, Prodeedings of the 8th European Peptide Symposium* Amsterdam, Holland, 1967, p 25.

75. Carpino, L. A.; Imazumi, H.; El-Faham, A.; Ferrer, F. J.; Zhang, C.; Lee, Y.; Foxman, B. M.; Henklein, P.; Hanay, C.; Mügge, C.; Wenschuh, H.; Klose, J.; Beyermann, M.; Bienert, M. *Angewandte Chemie International Edition***2002**, *41*, 441.
76. Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. A. *The Journal of Organic Chemistry***1998**, *63*, 9678.
77. Story, S. C.; Aldrich, J. V. *International Journal of Peptide and Protein Research***1994**, *43*, 292.
78. Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gillessen, D. *Tetrahedron Letters***1989**, *30*, 1927.
79. Ehrlich, A.; Rothmund, S.; Brudel, M.; Beyermann, M.; Carpino, L. A.; Bienert, M. *Tetrahedron Letters***1993**, *34*, 4781.
80. Hood, C. A.; Fuentes, G.; Patel, H.; Page, K.; Menakuru, M.; Park, J. H. *Journal of Peptide Science***2008**, *14*, 97.
81. El-Faham, A.; Albericio, F. *The Journal of Organic Chemistry***2008**, *73*, 2731.
82. Castro, B.; Dormoy, J. R.; Evin, G.; Selve, C. *Tetrahedron Letters***1975**, *16*, 1219.
83. Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. *Tetrahedron Letters***1990**, *31*, 205.
84. Hoeg-Jensen, T.; Olsen, C. E.; Holm, A. *The Journal of Organic Chemistry***1994**, *59*, 1257.
85. Subiros-Funosas, R.; Moreno, J. A.; Bayo-Puxan, N.; Abu-Rabeah, K.; Ewenson, A.; Atias, D.; Marks, R. S.; Albericio, F. *Chimica Oggi***2008**, *26*, 10.
86. Li, P.; Xu, J.-C. *Tetrahedron***2000**, *56*, 4437.
87. Kim, S.; Chang, H.; Young, K. K. *Tetrahedron Letters***1985**, *26*, 1341.
88. Carpino, L. A.; Xia, J.; Zhang, C.; El-Faham, A. *The Journal of Organic Chemistry***2004**, *69*, 62.
89. Itoh, M.; Nojima, H.; Notani, J.; Hagiwara, D.; Takai, K. *Tetrahedron Letters***1974**, *15*, 3089.
90. Hachmann, J.; Lebl, M. *Peptide Science***2006**, *84*, 340.
91. Hudson, D. *The Journal of Organic Chemistry***1988**, *53*, 617.
92. Itoh, M. *Bulletin of the Chemical Society of Japan***1973**, *46*, 2219.
93. Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Chemistry - A European Journal***2009**, *15*, 9394.
94. El-Faham, A.; Funosas, R. S.; Prohens, R.; Albericio, F. *Chemistry - A European Journal***2009**, *15*, 9404.
95. Feinberg, R. S.; Merrifield, R. B. *Journal of the American Chemical Society***1975**, *97*, 3485.
96. Kiso, Y.; Ukawa, K.; Akita, T. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications***1980**, 101.
97. Aletras, A.; Barlos, K.; Gatos, D.; Koutsogianni, S.; Mamos, P. *International Journal of Peptide and Protein Research***1995**, *45*, 488.
98. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 2 ed.; Kluwer Academic: New York, 1999.
99. Jabłonski, A. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei***1935**, *94*, 38.
100. Stokes, G. G. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London***1852**, *142*, 463.
101. Persson, A.; Wilson, I. B. *Analytical Biochemistry***1977**, *83*, 296.
102. Matayoshi, E.; Wang, G.; Krafft, G.; Erickson, J. *Science***1990**, *247*, 954.
103. Bech, L. M.; Soerensen, S. B.; Breddam, K. *Biochemistry***1993**, *32*, 2845.
104. Bickett, D. M.; Green, M. D.; Berman, J.; Dezube, M.; Howe, A. S.; Brown, P. J.; Roth, J. T.; McGeehan, G. M. *Analytical Biochemistry***1993**, *212*, 58.
105. Knight, C. G.; Willenbrock, F.; Murphy, G. *FEBS Letters***1992**, *296*, 263.
106. Förster, T. *Annalen der Physik***1948**, *437*, 55.
107. Stryer, L. *Annual Review of Biochemistry***1978**, *47*, 819.
108. Tang, J.; Sepulveda, P.; Marcinišzyn, J.; Chen, K. C. S.; Huang, W.-Y.; Tao, N.; Liu, D.; Lanier, J. P. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America***1973**, *70*, 3437.
109. Fruton, Joseph S. *The Quarterly Review of Biology***2002**, *77*, 127.
110. Falbe, J.; Regitz, M. *Römpp-Lexikon Chemie*; 10 ed. Stuttgart, New York, 1998.
111. Kunitz, M.; Northrop, J. H. *The Journal of General Physiology***1934**, *17*, 591.
112. Tsuji, A.; Torres-Rosado, A.; Arai, T.; Le Beau, M. M.; Lemons, R. S.; Chou, S. H.; Kurachi, K. *Journal of Biological Chemistry***1991**, *266*, 16948.

113. Zhukov, A.; Hellman, U.; Ingelman-Sundberg, M. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology***1997**, 1337, 85.
114. Béliveau, F.; Désilets, A.; Leduc, R. *FEBS Journal***2009**, 276, 2213.
115. Chevillet, J. R.; Park, G. J.; Bedalov, A.; Simon, J. A.; Vasioukhin, V. I. *Molecular Cancer Therapeutics***2008**, 7, 3343.
116. Maier, M. Diplomarbeit, Universität Ulm, 2008.
117. Lechner, M. D.; Gehrke, K.; Nordmeier, E. H. *Makromolekulare Chemie* Birkhäuser Verlag: Basel, 1993.
118. Elias, H.-G. *Macromolecules*; WILEY-VCH Verlag: Weinheim, 2005; Vol. 1.
119. Cowie, J. M. G. *Chemie und Physik der synthetischen Polymeren / Ein Lehrbuch*; Friedrich Vieweg & Sohn: Braunschweig, 1997.
120. Brandrup, J.; Immergut, E. H.; Grulke, E. A. *Polymer Handbook*; 4 ed.; Wiley Interscience: New Jersey, 1999; Vol. 1.
121. Gauthier, M. A.; Klok, H. A. *Chemical Communications***2008**, 23, 2591.
122. Lutz, J.-F.; Börner, H. G. *Progress in Polymer Science***2008**, 33, 1.
123. Krishna, O. D.; Kiick, K. L. *Peptide Science***2010**, 94, 32.
124. Jatzkewitz, H. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie***1954**, 297, 149.
125. Rathore, O.; Sogah, D. Y. *Journal of the American Chemical Society***2001**, 123, 5231.
126. Duncan, R. *Nat Rev Drug Discov***2003**, 2, 347.
127. Kasparová, P.; Antonietti, M.; Cölfen, H. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects***2004**, 250, 153.
128. Klok, H.-A. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry***2005**, 43, 1.
129. Glinel, K.; Jonas, A. M.; Jouenne, T.; Leprince, J.; Galas, L.; Huck, W. T. S. *Bioconjugate Chemistry***2008**, 20, 71.
130. Glangchai, L. C.; Calderera-Moore, M.; Shi, L.; Roy, K. *Journal of Controlled Release***2008**, 125, 263.
131. van Hest, J. C. M. *Polymer Reviews***2007**, 47, 63
132. Robson Marsden, H.; Kros, A. *Macromolecular Bioscience***2009**, 9, 939.
133. Nicolas, J.; Mantovani, G.; Haddleton, D. M. *Macromolecular Rapid Communications***2007**, 28, 1083.
134. Börner, H. G. *Macromolecular Chemistry and Physics***2007**, 208, 124.
135. Thordarson, P.; Le Droumaguet, B.; Velonia, K. *Applied Microbiology and Biotechnology***2006**, 73, 243.
136. Antos, J. M.; Francis, M. B. *Current Opinion in Chemical Biology***2006**, 10, 253.
137. Grieshaber, S. E.; Farran, A. J. E.; Lin-Gibson, S.; Kiick, K. L.; Jia, X. *Macromolecules***2009**, 42, 2532.
138. Shu, J. Y.; Tan, C.; DeGrado, W. F.; Xu, T. *Biomacromolecules***2008**, 9, 2111.
139. Eckhardt, D.; Groenewolt, M.; Krause, E.; Börner, H. G. *Chemical Communications***2005**, 2814.
140. Ehrick, J. D.; Deo, S. K.; Browning, T. W.; Bachas, L. G.; Madou, M. J.; Daunert, S. *Nat Mater***2005**, 4, 298.
141. Ayres, L.; Vos, M. R. J.; Adams, P. J. H. M.; Shklyarevskiy, I. O.; van Hest, J. C. M. *Macromolecules***2003**, 36, 5967.
142. Chen, L.; Kopeček, J.; Stewart, R. J. *Bioconjugate Chemistry***2000**, 11, 734.
143. Lee, H. J.; Lee, J.-S.; Chansakul, T.; Yu, C.; Elisseeff, J. H.; Yu, S. M. *Biomaterials***2006**, 27, 5268.
144. Hern, D. L.; Hubbell, J. A. *Journal of Biomedical Materials Research***1998**, 39, 266.
145. Nori, A.; Jensen, K. D.; Tijerina, M.; Kopečková, P.; Kopeček, J. *Bioconjugate Chemistry***2002**, 14, 44.
146. Becker, M. L.; Liu, J.; Wooley, K. L. *Biomacromolecules***2005**, 6, 220.
147. Ding, H.; Kopečková, P.; Kopeček, J. *Journal of Drug Targeting***2007**, 15, 465.
148. Sanda, F.; Endo, T. *Macromolecular Chemistry and Physics***1999**, 200, 2651.
149. Hirao, A.; Loykulant, S.; Ishizone, T. *Progress in Polymer Science***2002**, 27, 1399.
150. Coessens, V.; Pintauer, T.; Matyjaszewski, K. *Progress in Polymer Science***2001**, 26, 337.
151. Heredia, K. L.; Maynard, H. D. *Organic & Biomolecular Chemistry***2007**, 5, 45.

152. Rösler, A.; Klok, H.-A.; Hamley, I. W.; Castelletto, V.; Mykhaylyk, O. O. *Biomacromolecules***2003**, *4*, 859.
153. Hentschel, J.; Börner, H. G. *Journal of the American Chemical Society***2006**, *128*, 14142.
154. Reynhout, I. C.; Lowik, D. W. P. M.; Hest, J. C. M. v.; Cornelissen, J. J. L. M.; Nolte, R. J. M. *Chemical Communications***2005**, 602.
155. Kinstler, O.; Molineux, G.; Treuheit, M.; Ladd, D.; Gegg, C. *Advanced Drug Delivery Reviews***2002**, *54*, 477.
156. Pons, B.; Mouhoubi, L.; Adib, A.; Godzina, P.; Behr, J.-P.; Zuber, G. *ChemBioChem***2006**, *7*, 303.
157. Kochendoerfer, G. G.; Chen, S.-Y.; Mao, F.; Cressman, S.; Traviglia, S.; Shao, H.; Hunter, C. L.; Low, D. W.; Cagle, E. N.; Carnevali, M.; Gueriguian, V.; Keogh, P. J.; Porter, H.; Stratton, S. M.; Wiedeke, M. C.; Wilken, J.; Tang, J.; Levy, J. J.; Miranda, L. P.; Crnogorac, M. M.; Kalbag, S.; Botti, P.; Schindler-Horvat, J.; Savatski, L.; Adamson, J. W.; Kung, A.; Kent, S. B. H.; Bradburne, J. A. *Science***2003**, *299*, 884.
158. Shao, J.; Tam, J. P. *Journal of the American Chemical Society***1995**, *117*, 3893.
159. Heggli, M.; Tirelli, N.; Zisch, A.; Hubbell, J. A. *Bioconjugate Chemistry***2003**, *14*, 967.
160. Köhn, M.; Breinbauer, R. *Angewandte Chemie International Edition***2004**, *43*, 3106.
161. Cazalis, C. S.; Haller, C. A.; Sease-Cargo, L.; Chaikof, E. L. *Bioconjugate Chemistry***2004**, *15*, 1005.
162. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angewandte Chemie***2001**, *113*, 2056.
163. van Berkel, S. S.; Dirks, A. J.; Debets, M. F.; van Delft, F. L.; Cornelissen, J. J. L. M.; Nolte, R. J. M.; Rutjes, F. P. J. T. *ChemBioChem***2007**, *8*, 1504.
164. Dirks, A. J.; van Berkel, S. S.; Hatzakis, N. S.; Opsteen, J. A.; van Delft, F. L.; Cornelissen, J. J. L. M.; Rowan, A. E.; van Hest, J. C. M.; Rutjes, F. P. J. T.; Nolte, R. J. M. *Chemical Communications***2005**, 4172.
165. Parrish, B.; Breitenkamp, R. B.; Emrick, T. *Journal of the American Chemical Society***2005**, *127*, 7404.
166. Lutz, J.-F.; Börner, H. G.; Weichenhan, K. *Macromolecules***2006**, *39*, 6376.
167. Lutz, J.-F.; Börner, H. G.; Weichenhan, K. *Australian Journal of Chemistry***2007**, *60*, 410.
168. Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *Journal of the American Chemical Society***2004**, *126*, 15046.
169. Li, Z.; Seo, T. S.; Ju, J. *Tetrahedron Letters***2004**, *45*, 3143.
170. Heck, R. F.; Nolley, J. P. *The Journal of Organic Chemistry***1972**, *37*, 2320.
171. Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chemical Reviews***1995**, *95*, 2457.
172. Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. *Tetrahedron Letters***1975**, *16*, 4467.
173. Griffin, B. A.; Adams, S. R.; Tsien, R. Y. *Science***1998**, *281*, 269.
174. Sato, H. *Advanced Drug Delivery Reviews***2002**, *54*, 487.
175. Hooker, J. M.; Esser-Kahn, A. P.; Francis, M. B. *Journal of the American Chemical Society***2006**, *128*, 15558.
176. Braunecker, W. A.; Matyjaszewski, K. *Progress in Polymer Science***2007**, *32*, 93.
177. Georges, M. K.; Hamer, G. K.; Listigovers, N. A. *Macromolecules***1998**, *31*, 9087.
178. Boyer, C.; Stenzel, M. H.; Davis, T. P. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry***2011**, *49*, 551.
179. Mei, Y.; Beers, K. L.; Byrd, H. C. M.; VanderHart, D. L.; Washburn, N. R. *Journal of the American Chemical Society***2004**, *126*, 3472.
180. Becker, M. L.; Liu, J.; Wooley, K. L. *Chemical Communications***2003**, 180.
181. ten Cate, M. G. J.; Rettig, H.; Bernhardt, K.; Börner, H. G. *Macromolecules***2005**, *38*, 10643.
182. Rettig, H.; Krause, E.; Börner, H. G. *Macromolecular Rapid Communications***2004**, *25*, 1251.
183. Ayres, L.; Hans, P.; Adams, J.; Löwik, D. W. P. M.; van Hest, J. C. M. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry***2005**, *43*, 6355.
184. ten Cate, M. G. J.; Börner, H. G. *Macromolecular Chemistry and Physics***2007**, *208*, 1437.
185. Boyer, C.; Bulmus, V.; Liu, J.; Davis, T. P.; Stenzel, M. H.; Barner-Kowollik, C. *Journal of the American Chemical Society***2007**, *129*, 7145.
186. Lele, B. S.; Murata, H.; Matyjaszewski, K.; Russell, A. J. *Biomacromolecules***2005**, *6*, 3380.
187. Burkoth, T. S.; Benzinger, T. L. S.; Jones, D. N. M.; Hallenga, K.; Meredith, S. C.; Lynn, D. G. *Journal of the American Chemical Society***1998**, *120*, 7655.

188. Gravert, D. J.; Janda, K. D. *Chemical Reviews***1997**, *97*, 489.
189. Jahnke, E.; Millerieux, A.-S.; Severin, N.; Rabe, J. P.; Frauenrath, H. *Macromolecular Bioscience***2007**, *7*, 136.
190. Löwik, D. W. P. M.; Shklyarevskiy, I. O.; Ruizendaal, L.; Christianen, P. C. M.; Maan, J. C.; van Hest, J. C. M. *Advanced Materials***2007**, *19*, 1191.
191. Murata, H.; Sanda, F.; Endo, T. *Macromolecular Chemistry and Physics***2001**, *202*, 759.
192. Kasuya, Y.; Lu, Z. R.; Kopecková, P.; Minko, T.; Tabibi, S. E.; Kopecek, J. *Journal of Controlled Release***2001**, *74*, 203.
193. Guo, X.-H.; Yu, S.-H.; Cai, G.-B. *Angewandte Chemie International Edition***2006**, *45*, 3977.
194. Kessel, S.; Börner, H. G. *Macromolecular Rapid Communications***2008**, *29*, 419.
195. Rathore, O.; Sogah, D. Y. *Macromolecules***2001**, *34*, 1477.
196. Hentschel, J.; Börner, H. G. *Macromolecular Bioscience***2009**, *9*, 187.
197. Abuchowski, A.; Van Es, T.; Palczuk, N. C.; Davis, F. F. *Journal of Biological Chemistry***1977**, *252*, 3578.
198. Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M. *Advanced Drug Delivery Reviews***2002**, *54*, 459.
199. Lutolf, M. P.; Weber, F. E.; Schmoekel, H. G.; Schense, J. C.; Kohler, T.; Muller, R.; Hubbell, J. A. *Nat Biotech***2003**, *21*, 513.
200. Dalsin, J. L.; Hu, B.-H.; Lee, B. P.; Messersmith, P. B. *Journal of the American Chemical Society***2003**, *125*, 4253.
201. Mann, B. K.; Gobin, A. S.; Tsai, A. T.; Schmedlen, R. H.; West, J. L. *Biomaterials***2001**, *22*, 3045.
202. Lutolf, M. P.; Raeber, G. P.; Zisch, A. H.; Tirelli, N.; Hubbell, J. A. *Advanced Materials***2003**, *15*, 888.
203. Yokoyama, M.; Fukushima, S.; Uehara, R.; Okamoto, K.; Kataoka, K.; Sakurai, Y.; Okano, T. *Journal of Controlled Release***1998**, *50*, 79.
204. Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Suwa, S.; Kataoka, K. *Journal of Controlled Release***1996**, *39*, 351.
205. Torchilin, V. *The AAPS Journal***2007**, *9*, E128.
206. Wang, C.; Stewart, R. J.; Kopecek, J. *Nature***1999**, *397*, 417.
207. Jing, P.; Rudra, J. S.; Herr, A. B.; Collier, J. H. *Biomacromolecules***2008**, *9*, 2438.
208. Tzokova, N.; Fernyhough, C. M.; Topham, P. D.; Sandon, N.; Adams, D. J.; Butler, M. F.; Armes, S. P.; Ryan, A. J. *Langmuir***2009**, *25*, 2479.
209. Ulijn, R. V. *Journal of Materials Chemistry***2006**, *16*, 2217.
210. Tung, C.-H.; Mahmood, U.; Bredow, S.; Weissleder, R. *Cancer Research***2000**, *60*, 4953.
211. West, J. L.; Hubbell, J. A. *Macromolecules***1998**, *32*, 241.
212. Thornton, P. D.; Mart, R. J.; Ulijn, R. V. *Advanced Materials***2007**, *19*, 1252.
213. Kim, S.; Chung, E. H.; Gilbert, M.; Healy, K. E. *Journal of Biomedical Materials Research Part A***2005**, *75A*, 73.
214. Plunkett, K. N.; Berkowski, K. L.; Moore, J. S. *Biomacromolecules***2005**, *6*, 632.
215. Duncan, R.; Seymour, L. W.; O'Hare, K. B.; Flanagan, P. A.; Wedge, S.; Hume, I. C.; Ulbrich, K.; Strohal, J.; Subr, V.; Spreafico, F.; Grandi, M.; Ripamonti, M.; Farao, M.; Suarato, A. *Journal of Controlled Release***1992**, *19*, 331.
216. Haag, R.; Kratz, F. *Angewandte Chemie***2006**, *118*, 1218.
217. Ugelstad, J.; El-Aasser, M. S.; Vanderhoff, J. W. *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition***1973**, *11*, 503.
218. Chou, Y. J.; El-Aasser, M. S.; Vanderhoff, J. W. *Journal of Dispersion Science and Technology***1980**, *1*, 129.
219. Landfester, K. *Macromolecular Rapid Communications***2001**, *22*, 896.
220. Landfester, K. *Angewandte Chemie International Edition***2009**, *48*, 4488.
221. Landfester, K.; Weiss, C. In *Modern Techniques for Nano- and Microreactors/-reactions*; Caruso, F., Ed.; Springer Berlin / Heidelberg: 2010; Vol. 229, 1.
222. Crespy, D.; Landfester, K. *Beilstein Journal of Organic Chemistry***2010**, *6*, 1132.
223. Landfester, K.; Musyanovych, A.; Mailänder, V. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry***2010**, *48*, 493.
224. Landfester, K.; Bechthold, N.; Förster, S.; Antonietti, M. *Macromolecular Rapid Communications***1999**, *20*, 81.

-
225. Finsy, R. *Langmuir***2004**, *20*, 2975.
226. Mishchuk, N. A.; Verbich, S. V.; Dukhin, S. S.; Holt, Ø.; Sjöblom, J. *Journal of Dispersion Science and Technology***1997**, *18*, 517
227. Boyd, J.; Parkinson, C.; Sherman, P. *Journal of Colloid and Interface Science***1972**, *41*, 359.
228. Landfester, K.; Willert, M.; Antonietti, M. *Macromolecules***2000**, *33*, 2370.
229. Wood, E. W.; Loomis, A. L. *Philosophical Magazine Series 7***1927**, *4*, 417
230. Choi, Y. T.; El-Aasser, M. S.; Sudol, E. D.; Vanderhoff, J. W. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition***1985**, *23*, 2973.
231. Brösel, S.; Schubert, H. *Chemical Engineering and Processing***1999**, *38*, 533.
232. Bondy, C.; Sollner, K. *Transactions of the Faraday Society***1935**, *31*, 835.
233. Landfester, K. *Macromolecular Symposia***2000**, *150*, 171.
234. Bechthold, N.; Tiarks, F.; Willert, M.; Landfester, K.; Antonietti, M. *Macromolecular Symposia***2000**, *151*, 549.
235. Otto, M. *Analytische Chemie*; Wiley-VCH: Weinheim, 2006.
236. Meyer, V. R. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*; 10 ed.; Wiley VCH: Weinheim, 2009.
237. Mori, S.; Barth, H. G. *Size Exclusion Chromatography*; Springer Verlag: Berlin Heidelberg, 2010.
238. Elias, H.-G. *Makromoleküle - Band 2 - Physikalische Strukturen und Eigenschaften*; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, 2001.
239. Dörfler, H. D. *Grenzflächen und Kolloid-Disperse Systeme*; Springer Verlag: Heidelberg, 2002.
240. Laemmle, W. *Nanofair 2008, New Ideas for Industry***2008**, *2027*, 97.
241. Schärtl, W. *Light scattering from polymer solutions and nanoparticle dispersions* Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2007.
242. Laws, D. D.; Bitter, H.-M. L.; Jerschow, A. *Angewandte Chemie International Edition***2002**, *41*, 3096.
243. Inouye, K.; Voynick, I. M.; Delpierre, G. R.; Fruton, J. S. *Biochemistry***1966**, *5*, 2473.
244. Beyermann, M.; Bienert, M.; Niedrich, H.; Carpino, L. A.; Sadat-Aalae, D. *The Journal of Organic Chemistry***1990**, *55*, 721.
245. Carpino, L. A.; Sadat-Aalae, D.; Beyermann, M. *The Journal of Organic Chemistry***1990**, *55*, 1673.
246. Crespy, D.; Landfester, K. *Macromolecules***2005**, *38*, 6882.
247. Crespy, D.; Stark, M.; Hoffmann-Richter, C.; Ziener, U.; Landfester, K. *Macromolecules***2007**, *40*, 3122.
248. Schiller, R.; Weiss, C. K.; Landfester, K. *Nanotechnology***2010**, *21*, 405603.
249. Crespy, D.; Landfester, K. *Polymer***2009**, *50*, 1616.
250. Hyun, J.; Kim, J.; Craig, S. L.; Chilkoti, A. *Journal of the American Chemical Society***2004**, *126*, 4770.
251. Turner, D. C.; Testoff, M. A.; Conrad, D. W.; Gaber, B. P. *Langmuir***1997**, *13*, 4855.
252. Yi, H.; Wu, L.-Q.; Bentley, W. E.; Ghodssi, R.; Rubloff, G. W.; Culver, J. N.; Payne, G. F. *Biomacromolecules***2005**, *6*, 2881.
253. Förster, T. *Naturwissenschaften***1946**, *33*, 166.
254. Eisele, F. Dissertation, Universität Dortmund, 2000.
255. Kuhn, R.; Geider, K. *Chemische Berichte***1968**, *101*, 3587.
256. Lauer-Fields, J. L.; Broder, T.; Sritharan, T.; Chung, L.; Nagase, H.; Fields, G. B. *Biochemistry***2001**, *40*, 5795.
257. Ayman, E.-F.; Fernando, A. *Journal of Peptide Science***2010**, *16*, 6.
258. Nikiforow, I.; Adams, J. r.; König, A. M.; Langhoff, A.; Pohl, K.; Turshatov, A.; Johannsmann, D. *Langmuir***2010**, *26*, 13162.
259. Blunk, T.; Hochstrasser, D. F.; Sanchez, J.-C.; Müller, B. W.; Müller, R. H. *Electrophoresis***1993**, *14*, 1382.
260. Gessner, A.; Lieske, A.; Paulke, B.-R.; Müller, R. H. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A***2003**, *65A*, 319.
261. Huisgen, R.; Szeimies, G.; Möbius, L. *Chemische Berichte***1967**, *100*, 2494.
262. Qiu, Z.; Yu, H.; Li, J.; Wang, Y.; Zhang, Y. *Chemical Communications***2009**, 3342.

-
263. Schlaad, H.; Kukula, H.; Rudloff, J.; Below, I. *Macromolecules***2001**, *34*, 4302.
264. CEM *Liberty Maintenance Procedures*, 2008.
265. Tamiaki, H.; Kiyomori, A.; Maruyama, K. *Bulletin of the Chemical Society of Japan***1994**, *67*, 2478.
266. Papsuevich, O. S.; Chipens, G. I.; Bakharev, V. D.; Petrova, T. A. *Pharmaceutical Chemistry Journal***1985**, *19*, 24.
267. Kramer, R. A.; Bannwarth, W. *Helvetica Chimica Acta***2009**, *92*, 1046.
268. Brubaker, A. N.; De Ruiter, J.; Whitmer, W. L. *Journal of Medicinal Chemistry***1986**, *29*, 1094.
269. Katritzky, A. R.; Ozcan, S.; Todadze, E. *Organic & Biomolecular Chemistry***2010**, *8*, 1296.
270. Katritzky, A. R.; Yoshioka, M.; Narindoshvili, T.; Chung, A.; Johnson, J. V. *Organic & Biomolecular Chemistry***2008**, *6*, 4582.
271. Lundquist; Pelletier, J. C. *Organic Letters***2001**, *3*, 781.
272. Katayama, H.; Hojo, H.; Ohira, T.; Nakahara, Y. *Tetrahedron Letters***2008**, *49*, 5492.
273. Thomas, J. R.; Liu, X.; Hergenrother, P. J. *Journal of the American Chemical Society***2005**, *127*, 12434.

15. Danksagung

Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

AUSBILDUNG

- Seit 12/2008 **Max-Planck-Institut für Polymerforschung**, Mainz
(Promotion in Chemie)
- 09/2003 - 09/2008 **Universität Ulm** (Chemie Diplom)
Studienschwerpunkt: Makromolekulare Chemie

VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONFERENZBEITRÄGE

- Maier, M.; Kotman, N.; Friedrichs, C.; Andrieu, J.; Wagner, M.; Graf, R.; Strauss, W. S. L.; Mailänder, V.; Weiss, C. K.; Landfester, K. „Highly site specific, protease cleavable peptide-polymer nanoparticles”, *Macromolecules* **2011**. DOI: 10.1021/ma201149b
- Andrieu, J.; Kotman, N.; Maier, M.; Mailänder, V.; Weiss, C. K.; Landfester, K. „Live monitoring of cargo release from peptide-based hybrid nanocapsules induced by enzyme cleavage“, *Macromolecular Rapid Communications*, **2011**. Eingereicht
- 6. Zsigmondy Kolloquium, Chemnitz (03/2010), Vortrag: „Synthesis of cleavable hydrophobic nanoparticles in inverse miniemulsion“.
- UK Colloids 2011, London (06/2011), Vortrag: „Highly site specific, protease cleavable, hydrophobic peptide-polymer nanoparticles“.