

Über die kontrollierte, radikalische Synthese reaktiver Triblock-Copolymere zur Bildung von Polyplexen mit Plasmid-DNA

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

Department Chemie
des Fachbereichs FB09 – Chemie, Pharmazie, Geographie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

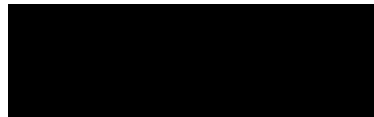
Nicolas Fabian Ritt
Geboren am 26.04.1991
in Wiesbaden

Mainz, März 2022

Diese Doktorarbeit wurde
von Mai 2017 bis September 2021
unter der Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Rudolf Zentel,
im Department Chemie der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

D77 (Dissertation Johannes Gutenberg-Universität Mainz)

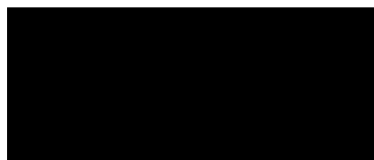
Dekan*in der Fakultät:



1. Gutachter*in:

Prof. Dr. Rudolf Zentel,
Johannes Gutenberg-
Universität Mainz

2. Gutachter*in:



Eingereicht:

29.03.2022

Disputation:

17.05.2022

„Der Beginn aller Wissenschaft ist das Erstaunen,
dass die Dinge sind, wie sie sind.“

– **Aristoteles**

Für meine Eltern

Abstract

Over the course of the last decades the scientific community showed an ever-increasing interest in nanomedical solutions in the field of tumor therapy. In this field, therapeutics based on nucleic acids are of particular interest. These agents can take influence on the genome or proteome of the target cells and thus can induce the body's own mechanisms to fight the tumor tissue from the inside.

The focus of this dissertation was the synthesis of a polymer platform, which is highly flexible and modifiable. Due to a cationic polymer block, this polymer can interact with plasmid DNA (pDNA), leading to the formation of a polyplex. This complex of DNA and polymer, bound by ionic interaction, should protect the pDNA from degradation and should enhance the transfection efficiency of the nucleic acid. Using the RAFT polymerization technique, a tool for controlled radical polymerization, a triblock copolymer, based on different methacrylate derivatives, was synthesized in consecutive polymerization steps. This strategic approach provides the opportunity to use an entire range of reaction conditions that possess a remarkably high control over the polymer composition. In addition to that, RAFT synthesis is highly tolerant to a plethora of different reactive groups. First, the triblock copolymer Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMAEMA) was synthesized by sequential RAFT-copolymerization of (triethyleneglycolmethylether)methacrylate (MEO₃MA), Pyridyldisulfidethyl methacrylate (PDSM), N,N-Dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA), starting with an azide-functionalized chain transfer agent (CTA) for RAFT-Polymerization. After the polymerization, the reactive CTA end-group was cleaved. Both, the polymer and the polyplex can be modified at the azide end-group by copper free 'click'-chemistry to introduce dyes or targeting moieties. The second block, containing PDSM groups was utilized for reductively reversible crosslinking of the polyplex. Different polymers and polyplexes were synthesized and their chemical and physical properties were characterized. For further possibilities of tailor-made polymer modification, a second polymer system was synthesized. The Azide-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) triblock copolymer was synthesized in the same manner as the previously synthesized polymer. Here, the third polymer block was replaced with repetition units of the reactive ester monomer pentafluorophenyl methacrylate (PFPMA), which reacts preferably with primary amines and other 'hard' nucleophiles (after the Pearson principle). By aminolysis of the reactive PFPMA groups with di- or oligoamines the cationic block was synthesized. Aside from chemical and physical characterization of the polyplexes and the polymers they are based on, another focus of this thesis were first, biological evaluations of the system in an *in vitro* environment. The polyplexes were tested regarding their ability as transfection agents and investigations on their toxicity towards the tested cells were conducted.

Kurzdarstellung

Im Verlauf der letzten Jahrzehnte war ein zunehmendes Interesse der Forschenden an nanomedizinischen Lösungen im Bereich der Tumorthherapie zu beobachten. Dabei sind vor allem Therapeutika auf Basis von Nucleinsäuren von Interesse, da diese direkt auf Genom und Proteom der Zielzellen einwirken und somit körpereigene Mechanismen genutzt werden können, um Tumore von innen heraus zu bekämpfen. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag daher auf der Synthese einer Polymerplattform, die sich durch ein hohes Maß an Variabilität und Modifizierbarkeit auszeichnet und durch einen kationischen Polymerblock die Möglichkeit bieten soll, Plasmid-DNA (pDNA) durch Interaktion mit dem anionischen Rückgrat der Nucleinsäure als Polyplex zu binden. Die Darreichungsform des Polyplexes soll dabei die DNA vor Degradation schützen und die Zelltransfektion mit der verwendeten pDNA ermöglichen. Unter Zuhilfenahme der RAFT-Synthesetechnik, einer kontrollierten radikalischen Polymerisationstechnik, wurden in sequenziellen Reaktionen Triblock-Copolymere auf Basis von Methacrylsäurederivaten synthetisiert. Dieser Syntheseansatz bietet dabei die Möglichkeit in einer großen Bandbreite von Reaktionsbedingungen Polymerisationen mit hoher Kontrolle über die Zusammensetzung des Produktpolymers durchführen zu können und besitzt den Vorteil besonders tolerant gegenüber vielen reaktiven Gruppen zu sein. Zunächst wurde das Triblock-Copolymer Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMAEMA) synthetisiert, welches über die sequenzielle Polymerisation der Methacrylat-Monomere (Triethylenglycolmethylether)methacrylat (MEO₃MA), Methacrylsäure-2-(2-pyridyldisulfid)ethylester (PDSM), Methacrylsäure-2-(dimethylamino)ethylester (DMAEMA) mit einem Azid-funktionalisierten Kettenübertragungsagens (CTA) und anschließender radikalischer Deaktivierung der reaktiven CTA-Endgruppe dargestellt wurde. Mittels der Azid-Endgruppe bietet sich die Möglichkeit sowohl das Polymer als auch Polyplexe mit Farbstoffen oder *targeting*-Molekülen über kupferfreie ‚Click‘-Chemie zu modifizieren. Der mittlere PDSM-Block kann zur reduktiv-reversiblen Vernetzung der Polyplexe genutzt werden. Es wurden verschiedene Polymere und Polyplexe synthetisiert und auf ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften hin untersucht. Um weitere Möglichkeiten zur individuellen Anpassung der Polymere zu erhalten, wurde ein zweites Polymersystem synthetisiert. Diese Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymere wurden dabei nach dem gleichen Syntheseprinzip erstellt, der dritte Polymerblock wird jedoch durch Wiederholungseinheiten des Reaktivester-Monomers Pentafluorophenyl Methacrylat (PFPMA) aufgebaut. Diese reagieren bevorzugt mit nach dem Pearson-Prinzip ‚harten‘ Nucleophilen wie primären Aminen. Durch Aminolyse der PFPMA-Einheiten mit Di- oder Oligoaminen erfolgte hier die Synthese des kationischen Blocks zur Komplexierung von pDNA. Neben der Charakterisierung der chemischen und physikalischen Eigenschaften der synthetisierten Polymere und Polyplexe lag hier nun ebenfalls ein Schwerpunkt auf ersten biologischen Tests *in vitro*. Hierdurch sollten erste Untersuchungen zur Eignung der Polymere als Transfektionsagenzien und deren Zell-Verträglichkeit unternommen werden.

Publikationen

Auflistung der Publikationen, welche im Verlauf der Doktorarbeit angefertigt wurden und zu den Ergebnissen dieser Dissertation beigetragen haben.

RAFT Synthesis of Reactive Multifunctional Triblock-Copolymer for Polyplex Formation.

N. Ritt; A. Ayaou; R. Zentel. *Macromol. Chem. Phys.* **2021**; 222 (16), 1-10

Beitrag zu den Ergebnissen aus Teil 1

Versatile, Multifunctional Block Copolymers for the Self-Assembly of Well-Defined, Nontoxic pDNA Polyplexes

N. Ritt; S. Berger; E. Wagner; R. Zentel. *ACS Appl. Polym. Mater.* **2020**, 2 (12), 5469-5481.

Beitrag zu den Ergebnissen aus Teil 2 und Teil 3

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | MOTIVATION UND ZIELSETZUNG..... | 1 |
| 2 | EINLEITUNG..... | 5 |
| 2.1 | NANOMEDIZIN | 5 |
| 2.2 | NUCLEINSÄUREN ALS WIRKSTOFFE IN DER TUMORTHERAPIE..... | 7 |
| 2.3 | NANOSTRUKTUREN UND NANOPARTIKEL..... | 9 |
| 2.4 | POLYPLEXE ALS TRANSPORTSYSTEME FÜR NUCLEINSÄUREN..... | 10 |
| 2.5 | POLYMERSYNTHESE | 12 |
| 2.5.1 | Allgemeines..... | 12 |
| 2.5.2 | Kontrollierte radikalische Polymerisation..... | 13 |
| 2.5.3 | Reversible Additions-Fragmentierungs Kettenübertragungspolymerisation (RAFT) ... | 14 |
| 2.6 | CHARAKTERISIERUNG VON POLYMEREN UND NANOPARTIKELN..... | 15 |
| 2.6.1 | Kernresonanzspektroskopie..... | 15 |
| 2.6.2 | DOSY NMR-Spektroskopie..... | 18 |
| 2.6.3 | UV/VIS-Spektroskopie | 21 |
| 2.6.4 | Größenausschlusschromatographie..... | 22 |
| 2.6.5 | Agarose Gelelektrophorese | 23 |
| 2.6.6 | Zeta-Potential | 25 |
| 2.6.7 | Dynamische Lichtstreuung..... | 27 |
| 2.6.8 | Dynamische Lichtstreuung im Serum..... | 30 |
| 3 | TEIL 1: RAFT SYNTHESE REAKTIVER TRIBLOCK-COPOLYMERE ZUR BILDUNG VON POLYPLEXEN | 33 |
| 3.1 | KURZDARSTELLUNG DER PUBLIKATION..... | 35 |
| 3.2 | EINLEITUNG..... | 36 |
| 3.3 | ERGEBNISSE UND DISKUSSION | 38 |
| 3.3.1 | Allgemeines zur Polymersynthese..... | 38 |
| 3.3.2 | Synthese des chain transfer agent (CTA)..... | 40 |
| 3.3.3 | Synthese von Methacrylsäure-2-(2-pyridyldisulfid)ethylester (PDSM)..... | 41 |
| 3.3.4 | RAFT-Synthese von p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(DMAEMA) Triblock-Copolymeren 43 | |
| 3.3.5 | Deaktivierung der reaktiven CTA-Endgruppe..... | 55 |
| 3.3.6 | Tests zur Selbstassemblierung von pDNA-Polyplexen..... | 59 |
| 3.3.7 | Modifikation der reaktiven Disulfide..... | 62 |
| 3.3.8 | Modifikation der Azid-Endgruppen..... | 63 |
| 3.3.9 | Dynamische Lichtstreuung und Zeta-Potential Messungen | 65 |
| 3.4 | ZUSAMMENFASSUNG | 68 |
| 3.5 | ERGÄNZENDE INFORMATIONEN | 70 |
| 4 | TEIL 2: RAFT SYNTHESE EINES MULTIFUNKTIONELLEN TRIBLOCK-COPOLYMERS ALS ADAPTIVE POLYMER-PLATTFORM..... | 75 |
| 4.1 | KURZDARSTELLUNG DER PUBLIKATION..... | 77 |
| 4.2 | EINLEITUNG..... | 78 |
| 4.3 | ERGEBNISSE UND DISKUSSION..... | 80 |
| 4.3.1 | Synthese des Azid-PEG ₃ -CTAs..... | 80 |
| 4.3.2 | Synthese von PDSM | 81 |
| 4.3.3 | Synthese von PFPMA | 83 |
| 4.3.4 | Synthese von Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(PFPMA) Triblock-Copolymeren..... | 84 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.3.5 | Synthese von Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(DMEDAMA) Triblock-Copolymeren..... | 101 |
| 4.3.6 | Alternative Strukturen zur polymeranalogen Modifikation von p(PFPMA)..... | 106 |
| 4.4 | ZUSAMMENFASSUNG | 114 |
| 4.5 | ERGÄNZENDE INFORMATIONEN | 116 |
| 5 | TEIL 3: SYNTHESE UND EVALUATION VON PDNA-POLYPLEXEN AUF BASIS MULTIFUNKTIONELLER TRIBLOCK-COPOLYMERE..... | 125 |
| 5.1 | EINLEITUNG..... | 127 |
| 5.2 | ERGEBNISSE UND DISKUSSION..... | 127 |
| 5.2.1 | Selbstassemblierung von pDNA-Polyplexen | 127 |
| 5.2.2 | Polyplexcharakterisierung mittels dynamischer Lichtstreuung und Ermittlung des Zeta-Potentials130 | |
| 5.2.3 | Serum-DLS..... | 137 |
| 5.2.4 | Heparin Challenge | 138 |
| 5.2.5 | Biologische <i>in vitro</i> Experimente | 139 |
| 5.3 | ZUSAMMENFASSUNG | 143 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK..... | 145 |
| 7 | EXPERIMENTALTEIL..... | 149 |
| 7.1 | MATERIALIEN..... | 149 |
| 7.2 | INSTRUMENTELLE ANALYTIK | 150 |
| 7.3 | TEIL 1: RAFT SYNTHESE REAKTIVER TRIBLOCK-COPOLYMERE ZUR BILDUNG VON POLYPLEXEN..... | 152 |
| 7.3.1 | Synthese von 1-Azido-25-cyano-22-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-21-azahexadodecan-25-yl Benzothioat (Azid-(PEG) ₆ -CTA)..... | 152 |
| 7.3.2 | Synthese von Methacrylsäure-2-(2-pyridyldisulfid)ethylester (PDSM) | 153 |
| 7.3.3 | Synthese der Azid-PEG ₆ -Triblock-Copolymere..... | 154 |
| 7.3.4 | Modifikation der Triblock-Copolymere..... | 157 |
| 7.3.5 | Polyplexsynthese und Modifikation der Polyplexe | 158 |
| 7.4 | TEIL 2: RAFT SYNTHESE EINES MULTIFUNKTIONELLEN TRIBLOCK-COPOLYMERS ALS ADAPTIVE POLYMER-PLATTFORM | 160 |
| 7.4.1 | Synthese von 1-Azido-16-cyano-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecan-16-yl Benzothioat (Azid-PEG ₃ -CTA) | 160 |
| 7.4.2 | Synthese von Methacrylsäure-2-(2-pyridyldisulfid)ethylester (PDSM) | 161 |
| 7.4.3 | Synthese von Methacrylsäure Pentafluorophenylester (PFPMA) | 162 |
| 7.4.4 | Polymersynthese..... | 162 |
| 7.5 | TEIL 3: SYNTHESE UND EVALUATION VON PDNA-POLYPLEXEN AUF BASIS MULTIFUNKTIONELLER TRIBLOCK-COPOLYMERE..... | 168 |
| 7.5.1 | Polyplexsynthese | 168 |
| 7.5.2 | Biologische <i>in vitro</i> Experimente | 169 |
| 8 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 173 |
| 9 | ANHANG | 177 |
| 9.1 | LITERATURVERZEICHNIS | 177 |
| 9.2 | ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... | 188 |
| 9.3 | TABELLENVERZEICHNIS..... | 192 |

1 Motivation und Zielsetzung

Innerhalb der letzten Jahrzehnte ist im Bereich der pharmazeutischen Chemie und Pharmaindustrie eine deutliche Trendwende erkennbar. Mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms und stetig fortschreitendem Erkenntnisgewinn über den Zusammenhang des Genoms und Proteoms mit verschiedensten Krankheitsbildern, sind Nucleinsäure-basierte Therapeutika immer stärker in das Zentrum des breiten Forschungsinteresses gerückt. Bei Krankheitsbildern, bei denen klassische Wirkstoffmoleküle häufig nur Krankheitssymptome lindern, oder auf Grund eines geringen therapeutischen Fensters nur mit niedriger Effizienz zur Behandlung verschiedener Krankheiten eingesetzt werden können, bietet die Beeinflussung des Genoms oder Proteoms mit Hilfe Nucleinsäure-basierter Therapeutika die Möglichkeit, effizient und am Ursprung der Krankheit zu wirken.^[1-3] Durch stetige Kostensenkung der Nucleinsäure-Synthese und rasantem Fortschritt im Bereich der Nanomedizin, bietet dieses Forschungsfeld die Möglichkeit in naher Zukunft therapeutische Lösungen für Krankheitsbilder mit bisher nur schlechten Heilungsprognosen zu liefern. Dabei haben sich seit Anfang der frühen 1960er Jahre Polymer-basierte Wirkstoffe und Polymer-Wirkstoff Konjugate als neues, vielversprechendes Feld in der medizinischen und pharmazeutischen Forschung etabliert.^[4] Im Laufe der Jahre wurden immer komplexere Polymerstrukturen entwickelt, um die Stabilität und die Halbwertszeit der Wirkstoffe im menschlichen Körper zu erhöhen und ihre pharmakokinetischen Parameter zu verbessern. Dabei sind vielfältige Faktoren wie chemische Zusammensetzung, Größe und Oberflächenladung des Transportsystems zu beachten, welche die Halbwertszeit und Biodistribution beeinflussen.^[5,6] Als konsequente Weiterentwicklung des Gedankens Polymer- und Wirkstoffstrukturen zu verbinden, wuchs vermehrt das Forschungsinteresse an Polymeren Superstrukturen wie Mizellen, Hydrogelen, Polymersomen und Polyplexen im therapeutischen Bereich. Durch die Kombination von Polymerchemie, Nanotechnologie und Medizin wurde das Forschungsfeld der Nanomedizin als Teilbereich der medizinischen Forschung etabliert, um therapeutische Ansätze für Krankheiten zu finden, bei denen bisher lediglich eingeschränkte Behandlungsmöglichkeiten bestehen, oder bei denen die Behandlung bisher mit großen Unannehmlichkeiten für den Patienten verbunden ist.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war, ein vielseitiges, multifunktionelles Polymersystem zur Bildung von Polyplexen mit Plasmid-DNA (pDNA) zu synthetisieren. Dazu sollten Ester-Derivate der Methacrylsäure in einer kontrollierten, radikalischen Reaktion nach dem RAFT-Mechanismus (*reversible addition-fragmentation chain-transfer polymerization*, Reversible Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragungsreaktion) zu Block-Copolymeren verkettet werden. Die RAFT-Methode bietet dabei den Vorteil, dass eine Vielzahl von Monomeren mit reaktiven, funktionellen Gruppen eingesetzt werden können, ohne dass es zu störenden Nebenreaktionen durch die Polymerisation kommt. Das synthetisierte Polymersystem sollte im Anschluss an die Bildung des Polyplexes zur Erhöhung der Stabilität des Polyplexes kovalent vernetzt werden, wobei die Vernetzung

anhand eines Zell-internen Stimulus wieder spaltbar sein sollte. Des Weiteren sollte der Polyplex auf der zum Medium gerichteten Seite über funktionelle Gruppen verfügen, die durch ein hoch effizientes Reaktionssystem modifizierbar sein sollten. Dabei lag das Ziel auf der Anbringung von spezifischen Internalisierungssignalen, die eine Aufnahme des Polyplexes in das Innere einer bestimmten Zellpopulation erleichtern. Die Kombination aus stabilen Polyplexen und Signalen, die eine aktive Aufnahme des Transportsystems ins Zellinnere forcieren, sollte dabei erreichen, dass durch lange Zirkulationszeit und zielgerichteten Transport der Polyplexe, eine besonders hohe Akkumulation des Transportsystems im Zielgewebe erfolgt.

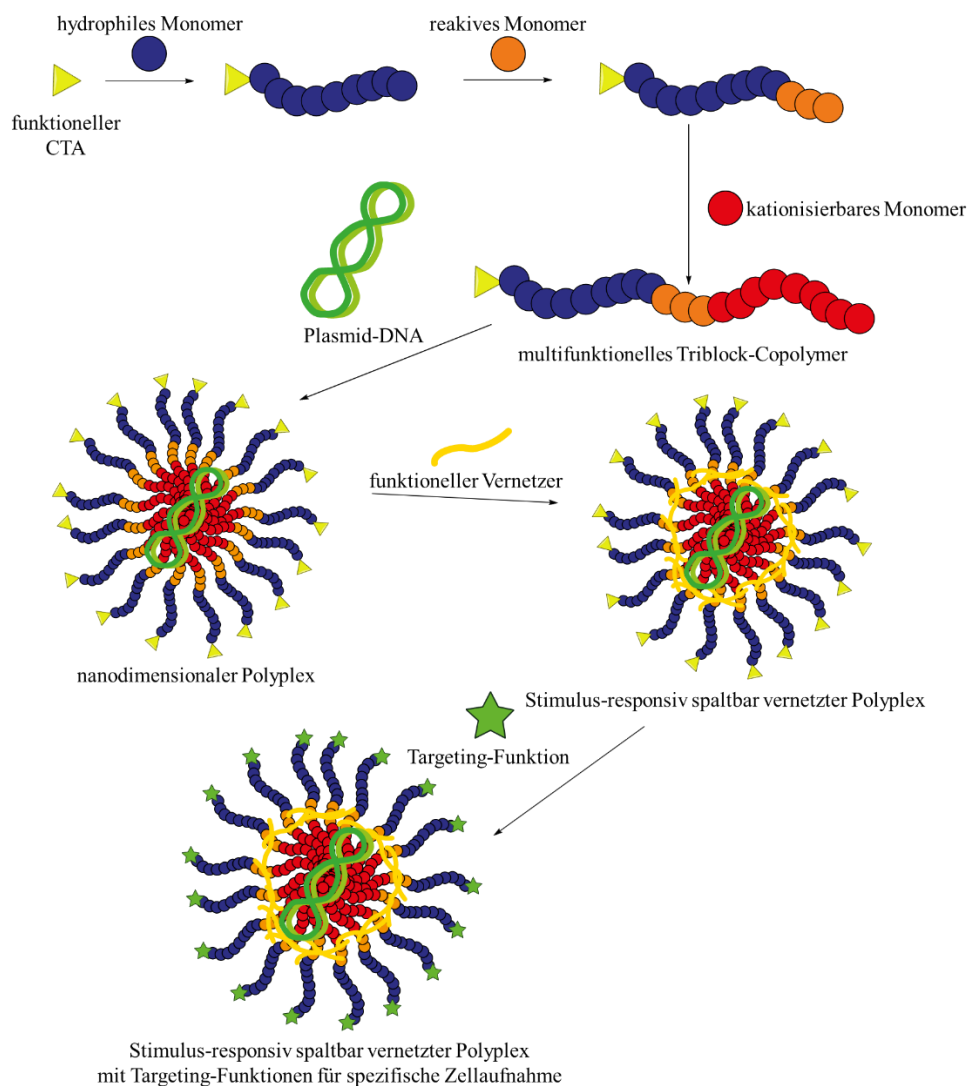


Abbildung 1.1: Konzept der Polymer- und Polyplexsynthese der Dissertation.

Der erste Teil dieser Dissertation befasst sich dahingehend mit der ersten Ausarbeitung einer Syntheseroute für ein Triblock-Copolymer, welches die zuvor genannten Eigenschaften vereinigt. Dieses Polymer basiert dabei auf Wiederholungseinheiten des Oligo-PEG Methacrylat-Monomers MEO₃MA, des reaktiven Disulfid-Monomers PDSM und auf dem Methacrylsäurederivat DMAEMA, welches auf Grund einer tertiären Aminogruppe in der Seitenkettenfunktion im physiologischen Medium protoniert vorliegt und somit die Wechselwirkung mit dem negativ geladenen pDNA-Rückgrat

eingehen kann. Es wurden diesbezüglich erste Tests zur Bildung von Polyplexen und Experimente durchgeführt, um die einzelnen Komponenten des Systems auf ihre konzeptionelle Eignung zur Verwendung in dem angedachten pDNA-Transportsystem zu überprüfen. Dazu wurden Triblock-Copolymer-haltige und pDNA-haltige Lösungen mittels Zentrifugation gemischt und für die Dauer von 45 Minuten inkubiert. Während dieser Zeit bildeten sich die Polyplexe auf Grund von elektrostatischer Interaktion der gegensätzlich geladenen ionischen Gruppen in einem Selbstorganisationsprozess. Nach etwaiger Vernetzung der Polyplexe mit Dithiolen wurden die physikochemischen Parameter betreffend der Partikelgröße und Oberflächenladung bestimmt, um das zugrundeliegende Arbeitskonzept zu überprüfen.

Der zweite Teil dieser Dissertation befasst sich mit einer erweiterten Version des ersten Polymersystems. Hier wurde der DMAEMA-Polymerblock durch einen Block des Reaktivester-Monomers PFPMA ersetzt. Dies bietet den Vorteil, dass mit der Azid-Endgruppe des Polymers und den reaktiven Disulfid-Seitenketten des PDSM-Blocks nunmehr drei reaktive Funktionalitäten im fertigen Triblock-Copolymer vorliegen, welche sich prinzipiell orthogonal reaktiv zueinander verhalten. Als orthogonale funktionelle Gruppen bezeichnet man solche reaktiven Funktionalitäten, die selektiv durch unterschiedliche Reaktanden angesprochen werden können, ohne dass es zu Kreuzreaktionen und Konkurrenz um die Reaktanden kommt. Bei den synthetisierten Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymeren liegt dieser Fall vor, da zum einen die für den Disulfid-Austausch eingesetzten Thiole nach dem Pearson-Prinzip auf Grund ihrer relativ geringen Elektronendichte als „weiche“ nucleophile einzuordnen sind und somit unter den für den Disulfid-Austausch vorherrschenden Bedingungen nicht mit PFPMA reagieren. Gleichzeitig besteht keine Reaktivität an den Azid-Endgruppen. Die bei der Modifikation der PFPMA-Seitenketten eingesetzten Amin-Strukturen sind nach dem Pearson-Prinzip als „harte“ nucleophile einzuordnen und zeigen unter den Reaktionsbedingungen der Amidierungsreaktion keine Kreuzreaktivität an den reaktiven Disulfidgruppen oder der Azidfunktion. Auf die gleiche Weise reagiert die Azidgruppe lediglich mit den eingesetzten Dibenzocyclooctin-substituierten Molekülen, ohne dass Nebenreaktionen der anderen Funktionellen Gruppen auftraten. In diesem Teil der Dissertation konnte die Synthese und selektive polymeranalogue Modifikation dieser Polymere veranschaulicht werden. Dabei wird der große Vorteil dieses modularen Polymersystems erkenntlich, es kann nahezu ohne Einschränkungen modifiziert werden und bietet somit die Möglichkeit das Polymer für den individuellen Gebrauch anzupassen.

Im dritten Teil dieser Dissertation wurden Polymere, welche mit Hilfe der Synthesestrategie aus dem zweiten Teil synthetisiert wurden, zur Bildung von Polyplexen und für erste biologische Tests eingesetzt. Diese wurden, wie die Polyplexe der Polymere aus dem ersten Teil der Arbeit, durch Vereinigung von pDNA-haltiger und Triblock-Copolymer-haltiger Lösungen mittels Zentrifugation synthetisiert. Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten wurden die Polyplexe gegebenenfalls durch Zugabe von Dithiol-Reagenzien vernetzt. Die Charakterisierung der Polyplexe erfolgt mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) und spezieller spektroskopischer Methoden. In diesem Teil der

Arbeit wird anhand von ersten Zellversuchen auf die biologischen Eigenschaften des synthetisierten pDNA-Transportsystem eingegangen und es wird eine Einschätzung der gesammelten Daten in Bezug auf zukünftige Arbeit mit dem Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymersystem vorgenommen.

Im darauffolgenden Abschnitt der Dissertation wird die Vorgehensweise bei den verschiedenen angewendeten Syntheseverfahren und Charakterisierungsmethoden beschrieben.

2 Einleitung

2.1 Nanomedizin

Im Verlauf der letzten Jahrzehnte ist das Forschungsfeld der Nanotechnologie immer stärker in den Fokus der pharmazeutischen und medizinischen Industrie und Forschung gerückt.^[7,8] Dabei hat sich der Terminus „Nanomedizin“ als Bezeichnung für die medizinische Anwendung von Nanopartikeln und nanotechnologischer Methoden etabliert. Die Vorsilbe „Nano“, welche dem griechischen Wort *νάνος* (*nános* = Zwerg) entlehnt wurde, beschreibt dabei die Größendimension von 10^{-9} Metern. Allgemein handelt es sich bei einem Nanopartikeln um ein Teilchen, dessen Durchmesser im nanodimensionalen Raum liegt und damit kleiner als $1 \mu\text{m}$, jedoch größer oder gleich 1 nm ist. Laut Definition der *US National Nanotechnology Initiative* aus dem Jahr 2000 befasst sich die Nanotechnologie mit Materialien und Systemen, deren Strukturen und Komponenten, auf Grund ihrer nanodimensionalen Größe, neue und signifikant verbesserte physikalische, chemische und biologische Eigenschaften, Phänomene und Prozesse aufweisen.^[7]

Nanomedizinische Systeme, die auf biokompatiblen Polymeren basieren sind für viele Anwendungsgebiete von großem Interesse. Durch die große Auswahl an funktionellen Monomeren, Synthesemethoden, Polymer- und Partikelarchitekturen bietet polymerbasierte Nanomedizin eine nahezu unerschöpfliche Quelle für verschiedenste Nano-Konstrukte mit Anwendungsmöglichkeiten als Diagnostika oder Therapeutika. In der Literatur wurde erstmals 1954 durch Horst Jatzkewitz ein Polymer-Wirkstoff-Konjugat mit solchen Eigenschaften beschrieben.^[9] 1975 fasste Helmut Ringsdorf die bisherigen Erkenntnisse zu polymeren Wirkstofftransportsystemen in einem allgemeinen Modell zum Aufbau von Polymeren für den Wirkstofftransport zusammen (siehe Abbildung 2.1).^[10]

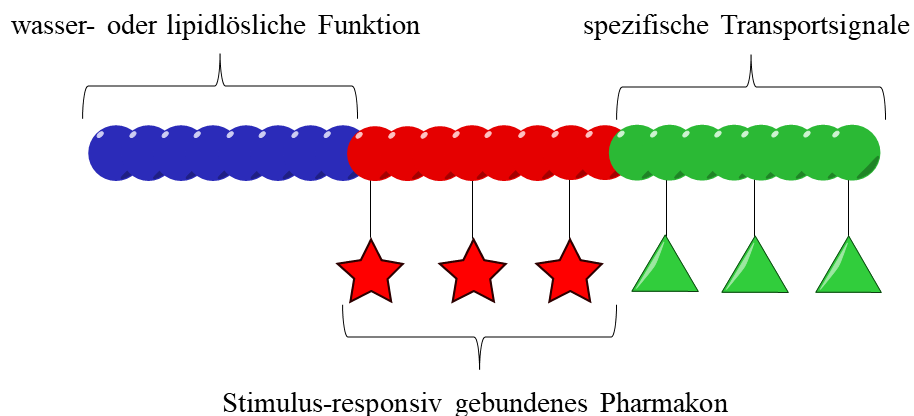


Abbildung 2.1: Schema notwendiger Eigenschaften für polymerbasierte Wirkstofftransportsysteme. Frei nach Ringsdorf et al.^[10]

Als grundlegende Komponenten für ein polymerbasiertes Wirkstofftransportsystem wurden dabei eine Löslichkeitsvermittelnde Kettenfunktion, Wiederholungseinheiten mit der Möglichkeit zur Bindung und Stimulus-responsiven Freisetzung des betreffenden Wirkstoffs und Wiederholungseinheiten eines

Monomers mit *targeting*-Funktionen (spezifischen Transportsignalen), welche beispielsweise eine rezeptorvermittelte Aufnahme in eine bestimmte Zellpopulation ermöglichen.

Ziel der Nutzung biokompatibler Polymere in Systemen zum Wirkstofftransport ist dabei im Allgemeinen, die therapeutische Effektivität des Wirkstoffs zu erhöhen. Dies kann etwa bedeuten, einen Wirkstoff, welcher schlecht in wässrigen Medien löslich ist, zu solubilisieren.^[11,12] Oftmals werden Wirkstoffe auch sehr schnell aus dem Blutkreislauf entfernt. Dies kann zum Beispiel durch eine hohe Akkumulation in bestimmten Organen mit hohen Stoffwechselraten oder Organen des Immunsystems wie der Leber und der Milz, einer hohen Degradationsrate des Wirkstoffs im Blut oder durch schnelle Ausscheidung über die Nieren (renale Ausscheidung) begründet sein.^[13] Polymerbasierte Transportsysteme können durch kovalente Bindung an den Wirkstoff, oder durch nicht-kovalente, auf physikochemischen Effekten beruhende Bindung synthetisiert werden, was idealerweise zu einer Erhöhung der Halbwertszeit des jeweiligen Wirkstoffs im Blut führen kann.^[5,6] Hierdurch resultiert, dass das sogenannte therapeutische Fenster (engl. *therapeutic window*), der Konzentrationsbereich eines Wirkstoffs in dem er einen therapeutischen Effekt erzielt, ohne gleichzeitig eine toxische Wirkung zu entfalten, vergrößert wird. Einerseits bedeutet dies für den Patienten eine mögliche Erhöhung der Wirksamkeit der Behandlung, andererseits besteht die Möglichkeit, die verabreichte Wirkstoffdosis zu verringern, was eine Abmilderung etwaiger Nebenwirkungen der Behandlung zur Folge haben kann.

Daher sind Therapeutika auf Basis biokompatibler Polymere im Bereich der Therapie von Tumoren von besonderem Interesse. Ein Großteil der in Chemotherapien angewendeten Cytostatika weisen schwere Nebenwirkungen wie Übelkeit, Gewichtsverlust, Schädigung verschiedener Organe und Haarausfall auf. Als erstes nanomedizinisches Therapeutikum wurde Doxil[®] im Jahr 1995 von der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) für die Therapie von verschiedenen Krebsarten wie beispielsweise metastasierendem Brustkrebs und dem multiplen Myelom zugelassen.^[14] Das Medikament besteht aus dem Chemotherapeutikum Doxorubicin, welches als kristalliner Kern in einem Liposom vorliegt. Doxil[®] weist eine deutlich höhere Bluthalbwertszeit im Vergleich zu Doxorubicin auf und kann somit in geringeren Dosen verabreicht werden. Neben der Optimierung der pharmakologischen Parameter bereits zugelassener Therapeutika ist in den letzten Jahrzehnten zunehmendes Interesse in der Anwendung von Nucleinsäuren als Therapeutika gerückt.^[15-17] Als Vorbild dienen hier vor allem Viruspartikel, welche durch das Einschleusen von Nucleinsäuren in eine Wirtszelle das Proteom der jeweiligen Zelle verändern. Durch moderne Fertigungsmethoden haben sich die Preise für maßgeschneiderte RNA- oder DNA-Sequenzen über die letzten Jahre stetig verringert, wodurch die Nutzung genetischen Materials in Therapeutika auch im industriellen Maßstab möglich wurde.^[16] Dies ist beispielsweise auch für Krankheitsbilder interessant, welche auf dem angeborenen Mangel bestimmter Schlüsselproteine beruhen. Als aktueller Fall der Forschung kann hier Mukoviszidose benannt werden, eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung bei der es durch Mutation der *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) Chloridkanäle bestimmter Körperzellen zur Verdickung verschiedener Körpersekrete kommt. Bisher ist diese

Krankheit nicht heilbar und die Lebenserwartung betroffener Menschen ist stark eingeschränkt.^[18,19] Aktuell wird an verschiedenen Methoden gearbeitet, um unter anderem durch das Einbringen verschiedener DNA und RNA-Strukturen mittels nanomedizinischer und gentechnischer Methoden die entsprechende Proteinstruktur zu supplementieren.^[20,21] Auf diese Weise sollen die Krankheitssymptome abgeschwächt und die Lebenserwartung erhöht werden. Insgesamt sind bis zum heutigen Tage etwa 100 nanomedizinische Therapeutika durch die amerikanische *Food and Drug Administration* (FDA), die *European Medicines Agency* (EMA) und andere regulatorische Organisationen zur Behandlung verschiedenster Krankheitsbilder zugelassen worden.^[22]

2.2 Nucleinsäuren als Wirkstoffe in der Tumorthherapie

Das Wort Tumor bezeichnet an sich eine örtlich eingegrenzte, allgemeine Zunahme des Gewebevolumens. Im Alltagsgebrauch bezeichnet der Begriff jedoch typischerweise die pathologische, geschwulstartige Vermehrung von Gewebezellen, was in der Regel mit dem unterschiedlich ausgeprägten Verlust der spezifischen Zell- und Gewebefunktionen verbunden ist.^[23] Dieses Krankheitsbild kann dabei verschiedenen Ursachen entstammen, ein gemeinsames Kennzeichen ist dabei jedoch die fehlende Regulation verschiedener Gene.^[24] Sind regulierende Gene des Zellzyklus betroffen, kommt es zur unkontrollierten Gewebsneubildung.

Ist das Tumorgewebe merklich gegenüber dem unauffälligen Wirtsgewebe abgegrenzt und operativ gut zugänglich, wird es üblicherweise per Sektion präpariert und entfernt. Ist dies nicht möglich, oder hat der Tumor Metastasen in anderen Organen gebildet, muss auf eine medikamentöse Therapie oder Strahlentherapie zurückgegriffen werden. Klassische Chemotherapeutika sollen dabei den Tod der Tumorzellen auslösen, prinzipiell findet dabei nur eine geringe Unterscheidung zwischen normalen und entarteten Zellen statt. Die therapeutische Wirkung tritt primär durch die stark erhöhte Stoffwechselaktivität von Tumorzellen ein. Neben der inhärenten Toxizität der Chemotherapeutika ist die Entwicklung von Wirkstoffresistenzen ein großes Problem bei der Therapie von Tumoren.^[25] Das Tumorgewebe kann nicht als unorganisierter Haufen von entarteten Zellen verstanden werden, es handelt sich eher um ein komplexes und hoch organisiertes Gewebe mit einer heterogenen Zusammensetzung von assoziierten Zellen.^[26]

Eine vielversprechende Strategie zur Bekämpfung von Tumoren, die im Verlauf der letzten Jahrzehnte immer mehr Relevanz gewann, ist der Einsatz von Therapeutika auf Basis von Nucleinsäuren.^[17,27-29] Maßgeschneiderte DNA- oder RNA-Sequenzen sollen dabei auf das Proteom der Zielzelle Einfluss nehmen und klassische Chemotherapeutika unterstützen oder ersetzen. Erste klinische Untersuchungen zum Gentransfer in einem *in vivo* Modell gehen dabei auf Nabel et al. im Jahr 1993 zurück.^[30] Es zeigte sich, dass viele Tumore physiologische Effekte auslösen, welche die Erkennung

entarteter Zellen durch das Immunsystem des Patienten verhindern.^[31–33] Der Bereich der Tumorimmuntherapie hat daher in den letzten Jahren stetig an Relevanz gewonnen. Hierbei wird versucht das Immunsystem des Patienten zu stimulieren und Einfluss auf eine immunologische Anti-Tumor-Antwort zu nehmen, um die Bekämpfung des Tumorgewebes durch körpereigene Prozesse zu forcieren.^[34–36] Dabei wird zum einen versucht Immunzellen wie tumorassoziierte Makrophagen (*tumor associated macrophages*, TAM) oder Krebs-assoziierte Fibroblasten (*cancer-associated fibroblasts*, CAF), welche durch das Tumorgewebe rekrutiert wurden, zu reprogrammieren beziehungsweise zu hemmen, die Immunsuppression durch regulatorische T-Zellen (T_{reg}) und myeloide Suppressorzellen (*myeloid-derived suppressor cells*; MDSC) abzuschwächen. Zum anderen wird versucht Antigen-präsentierende Zellen wie dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs) bei der Präsentation tumorspezifischer Antigene zu unterstützen, wodurch eine Erkennung und Zerstörung von Tumorzellen durch T-Effektorzellen (T_{eff}) gefördert wird.^[37–47]

Bei der Nutzung von Nucleinsäuren als Therapeutika gilt es mehrere physiologische Hürden zu überwinden. Dazu gehören bei systemisch applizierten Therapeutika der Transport im Blut, bei topikalen Anwendungen die Überwindung des Epithels sowie generell die Durchquerung der extrazellulären Matrix und die Zellaufnahme.^[48] RNA-basierte Wirkstoffe entfalten ihre Wirkung durch Translationsprozesse im Zytosol, bei der Verwendung von DNA-basierten Wirkstoffen muss zunächst eine Aufnahme in den Zellkern erfolgen.^[49–51] Hier wird die DNA zunächst in RNA transkribiert, welche nach dem Transport ins Zytosol zur Synthese von Proteinen genutzt wird. RNA-basierte Therapeutika entfalten einen zeitlich begrenzten Effekt, da die RNA im Zellstoffwechsel nach einiger Zeit abgebaut wird.

Kommt es zur Aufnahme DNA-basierter Therapeutika in den Zellkern, kann durch wiederholte Transkription der genetischen Information ein längerfristiger Effekt erzielt werden. Eine dauerhafte genetische Modifikation des Zielgewebes ist jedoch auch hier unwahrscheinlich, da hierzu eine stabile Integration der synthetisierten DNA in das Wirtsgenom stattfinden müsste. Verschiedene Studien konnten darlegen, dass in dieser Hinsicht weder eine dauerhafte extrachromosomalen Modifikation der Wirtszellen durch Vermehrung der pDNA, noch eine Integration des Vektors in das Wirtsgenom stattfindet und eine bis zu mehreren Monaten anhaltende Wirkung des aufgenommenen Plasmids erfolgen kann.^[52–56] Ein weiterer großer Vorteil der Nutzung von Plasmid-DNA als Wirkstoff in der Tumorthherapie ist darin begründet, dass zelltypspezifische Promotor-Sequenzen in das Plasmid eingebaut werden können. Dies ermöglicht eine Transkription der genetischen Informationen lediglich in der gewünschten Zellpopulation, wodurch mögliche *off-target*-Wirkungen des Therapeutikums eingeschränkt werden können. Diese Möglichkeit zur Transkriptionsregulierung kann beispielsweise genutzt werden um die Expression der transportierten Gene auf dendritische Zellen und Makrophagen, oder Langerhans-Zellen zu beschränken.^[57–60]

2.3 Nanostrukturen und Nanopartikel

Wie bereits in Kapitel 2.1 erläutert, umfasst die mit der Vorsilbe „Nano“ betitelte Größendimension den Bereich von $1 \cdot 10^{-9} \text{ m} \leq x < 1 \cdot 10^{-6} \text{ m}$. Einfache synthetische Polymere liegen, abhängig von ihrer Interaktion mit dem jeweiligen Medium, in gelöster Form als randomisiert gefaltete (geknäulte) Struktur vor. Typischerweise sind solche Polymerknäule auf der Nanoskala in einem Größenbereich von etwa 1-10 nm anzusiedeln. Aus diesem Grund sind freie Polymerketten im Körper häufig der renalen Exkretion unterworfen.^[61] Bedingt durch attraktive oder repulsive Interaktionen zwischen verschiedenen Struktureinheiten eines Polymers, kann die freie Drehbarkeit der einzelnen Kettenglieder eines Polymers so eingeschränkt werden, dass das Polymer im Ruhezustand eine höhere Raumordnung annimmt. Dies kann beispielsweise eindrucksvoll durch die sogenannten Sekundärstrukturen vieler, natürlich vorkommender Polypeptide gezeigt werden. Dabei bedingen ionische Wechselwirkungen, hydrophile Wechselwirkungen (Wasserstoffbrücken-Bindungen) und hydrophobe Wechselwirkungen eine Struktur mit höherem Ordnungsgrad als das vergleichsweise ungeordnete, randomisierte Knäuel. Hierdurch wird die freie Drehbarkeit der Kettenglieder eingeschränkt und eine bestimmte, im energetischen Gleichgewicht favorisierte, räumliche Anordnung angenommen. Bei synthetischen Polymeren können die genannten Kräfte ebenso formgebend für eine höhere Struktur sein. Der grundlegende Unterschied ist jedoch, dass synthetische Polymere erzeugt werden können, die im Vergleich zu Polypeptiden nicht, oder nur bedingt wasserlöslich sind. Kombiniert man sowohl hydrophile als auch hydrophobe Monomere in einem Polymer können somit, abhängig von der Polymerstruktur, Kettenbereiche erzeugt werden, welche sehr gut oder weniger gut wasserlöslich sind. Sind die Copolymerisationsparameter zweier Monomere bekannt, so kann über den Polymerisationsansatz, die Dauer der Polymerisation und das Mischungsverhältnis der Monomere während der Reaktion die Zusammensetzung des Polymerprodukts bestimmt werden. Man unterscheidet bei der Architektur unverzweigter Ketten zufällige Polymerzusammensetzungen (engl.: *random copolymers*), Gradient-Copolymere (engl.: *gradient copolymers*) Block-Copolymere (engl.: *block copolymers*) und alternierende Copolymere (engl.: *alternating copolymers*) (siehe Abbildung 2.2).

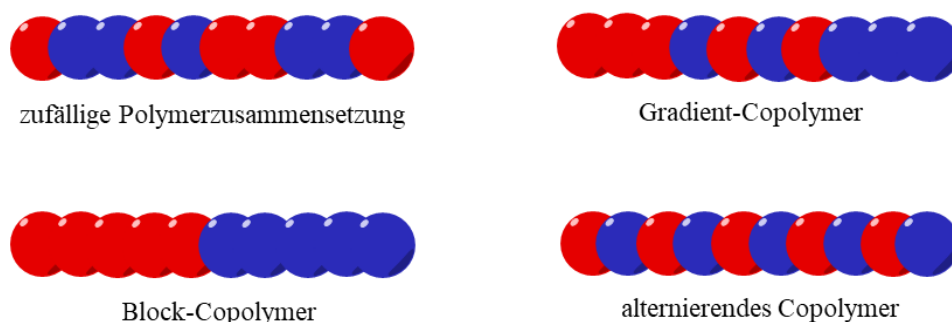


Abbildung 2.2: Architekturen unverzweigter Polymerketten

Abhängig von der Polymerzusammensetzung kann es bei dem Lösen solcher Polymere in wässrigen Medien zu Entmischungseffekten kommen. Es bilden sich aufgrund hydrophiler und hydrophober Wechselwirkungen Polymer-Konstrukte höherer Raumordnung (siehe Abbildung 2.3), vergleichbar

mit, aber häufig weniger komplex als, Tertiär- und Quartärstrukturen diverser Proteine und Enzyme. Hierbei handelt es sich vor allem um verschiedene Arten von Polymernizellen und Polymersomen. Neben der Nutzung dieser synthetischen Konstrukte als Transporter von Wirkstoffen ist ein populärer Ansatz, körperverträgliche Protein- oder Lipidstrukturen für den Wirkstofftransport zu modifizieren. Abbildung 2.3 bietet einen Überblick über diverse als Transportsystem nutzbare Strukturen und ordnet diese in ihren typischen nanodimensionalen Größenbereich ein.

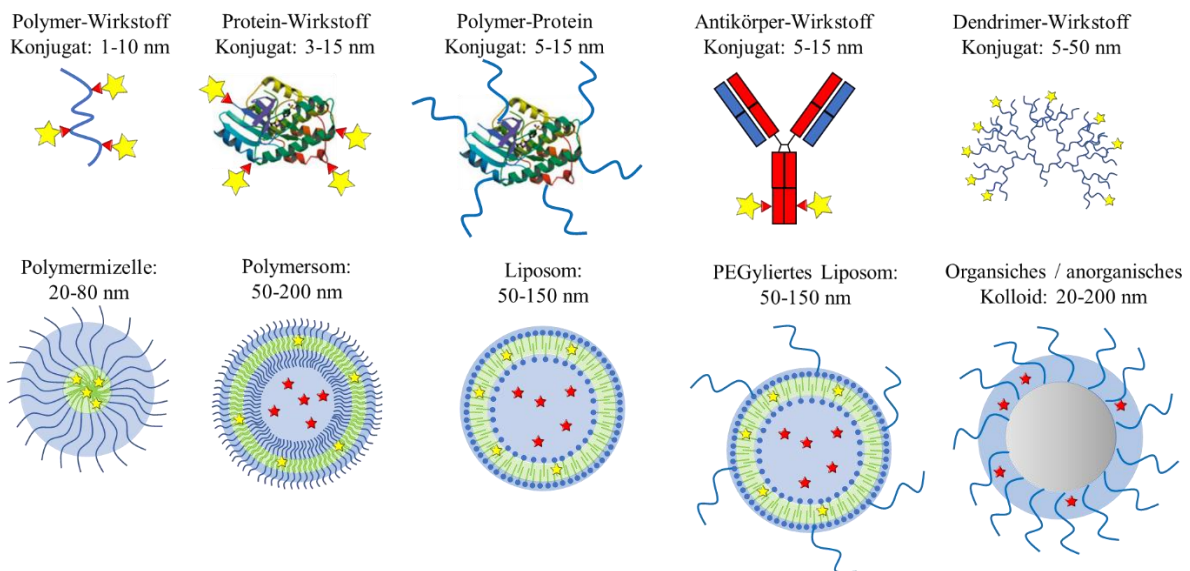


Abbildung 2.3: Verschiedene nanodimensionale Systeme für den Wirkstofftransport. Frei nach Talelli et al.^[62]

Durch kovalente Bindung, durch physikalischen Einschluss oder über attraktive hydrophobe Wechselwirkungen, wird das zu transportierende Effektor-Molekül an die Transportstruktur gebunden. Einen Sonderfall stellt hierbei die Darreichungsform des Polyplexes dar. Hierbei handelt es sich um ein Aggregat, welches durch ionische Wechselwirkungen zwischen dem zu transportierenden Wirkstoff und der polymeren Komponente entsteht. Struktur und Ordnungsgrad der Polyplexe ähneln am stärksten der Polymernizelle, deren Stabilität jedoch ausschließlich auf hydrophober Wechselwirkung beruht. Besonders beim Transport polyanionischer Biomoleküle wie DNA und RNA ist die Struktur des Polyplexes von besonderem Interesse, da diese üblicherweise sehr geringe Halbwertszeiten im Blut besitzen und einer hohen Degradationsrate unterworfen sind.^[48,63]

2.4 Polyplexe als Transportsysteme für Nucleinsäuren

Wie in Kapitel 2.2 beschrieben, bietet die Nutzung von nucleinsäurebasierten Therapeutika sowohl die Möglichkeit bestehende, klassische Therapieansätze zu verbessern als auch die Chance Behandlungsansätze für Krankheiten zu finden, bei denen bisherige Therapiemöglichkeiten limitiert sind oder nur Krankheitssymptome behandelt werden können. Wie bereits erwähnt, ist der Einsatz von Nucleinsäuren in Reinform aber sehr eingeschränkt. Zwar existieren verschiedene Methoden zum

Einbringen von DNA oder RNA in Gewebe, wie beispielsweise Mikroinjektion, Beschuss mit Nanopartikeln, Elektroporation und hydrodynamische Injektion, diese sind jedoch im Maßstab der Arbeit am Patienten nicht praktikabel oder eignen sich zumeist nur für lokale Applikationen.^[64-66] Zudem existieren einige physiologische Hürden, die gegen die Nutzung reiner Nucleinsäuren als Therapeutika sprechen. Zum einen ist der Transport, beziehungsweise die Bewegung, von DNA und RNA im Blut und im interzellulären Raum stark eingeschränkt. Auf Grund ihrer hohen Ladungsdichte kommt es zur Adsorption von Proteinbestandteilen des Bluts. Zudem weist sowohl das Blut als auch der interzelluläre Raum Enzyme auf, welche Nucleinsäuren sehr schnell abbauen.^[67] Ein weiteres Problem ist die Größe und hohe negative Ladung der DNA und RNA Moleküle, welche einen einfachen diffusiven Übertritt durch die ebenfalls negativ polarisierte Zellmembran verhindert. Eine elegante Lösung bietet ein Blick in die Natur. Viren sind hoch variable, sehr effiziente Transportvehikel für DNA und RNA. Viren besitzen alle Eigenschaften, die erwünscht sind, um einen erfolgreichen Transport des genetischen Materials zur Wirtszelle zu gewährleisten. Sie bestehen aus einer Hülle aus Kapsidproteinen und besitzen einen stimuli-responsiven Mechanismus zur Freisetzung der Nucleinsäuren in das Innere der Wirtszelle. Ein Problem, das den Einsatz von modifizierten, sogenannten rekombinanten Viren als Therapeutika stark einschränkt, ist deren hohe immunogene Wirkung und das damit erhöhte Risiko von Nebenwirkungen für den Patienten.^[68,69] Ein Ziel der aktuellen Forschung ist daher, virusähnliche Transportsysteme auf Basis vollsynthetischer Polymerstrukturen herzustellen. Auf Grund der negativen Ladung und der Hydrophilie der Nucleinsäuren kommen als Transportpartikel am ehesten Polymersom- oder Polyplexformulierungen in Betracht. Hierbei ist der Polyplex besonders interessant, da es sich um eine Struktur handelt, die sich unter idealen Bedingungen in Lösung auf Grund der ionischen Wechselwirkungen zwischen polykationischem Polymerteil und polyanionischer Nucleinsäure spontan selbst bilden kann. Zudem kann die Eigenladung der Nucleinsäure durch Interaktion mit dem kationischen Polymer gegenüber dem äußeren Medium abgeschirmt werden. Besitzt der gebildete Polyplex zusätzlich hydrophile Kettenbestandteile mit antiadsorptiven Eigenschaften, kann die Bluthalbwertszeit des Transportsystems erheblich gesteigert werden.

Bei gewissen Krankheitsbildern, wie zum Beispiel chronischen Entzündungen und manchen soliden Tumoren, kann die Erhöhung der Bluthalbwertszeit eines Medikaments einen erhöhten therapeutischen Effekt verursachen. Dies konnte beispielsweise anhand mathematischer Modellierung durch Pang et al. dargelegt werden.^[70] Im Fall verschiedener solider Tumore ist das Tumorgewebe häufig deutlich höher vaskularisiert als das umliegende, nicht pathologisch veränderte Gewebe. Zudem ist die Endothelschicht hier porös und für Partikel eines gewissen Größenbereichs durchlässig. Diese zwei Faktoren bedingen den sogenannten *enhanced permeability and retention effect* (Effekt der erhöhten Permeabilität und Retention; EPR Effekt), welcher zur Folge hat, dass das Tumorgewebe dazu tendiert, im Verlauf der Zeit nanopartikuläre Strukturen anzureichern.^[71-74] Die Strategie der Ausnutzung dieser und anderer physiologischer Effekte wird unter dem Begriff *passive targeting* (passive Zielsuche) zusammengefasst. Dem gegenüber steht das sogenannte *active targeting* (aktive Zielsuche), bei der die verabreichten

Therapeutika gewisse Erkennungsstrukturen präsentieren, die eine gezielte Interaktion mit einer bestimmten Zellpopulation ermöglichen.^[75–77] Dabei handelt es sich in der Regel um Antigen- oder Kohlenhydratstrukturen, die eine bevorzugte Interaktion mit der Zielzelle ermöglichen und entweder direkt als Signal zur Internalisierung des präsentierenden Partikels dienen oder aber, durch die erhöhte Konzentration des Partikels in der Peripherie der Zielzelle, eine passive Aufnahme wahrscheinlicher machen. Dabei muss jedoch klargestellt werden, dass beide Varianten, *active targeting* und *passive targeting*, sehr stark von der Lebensdauer eines verabreichten Nanopartikels abhängig sind. Ein ideales nanodimensionales Transportsystem für Nucleinsäuren, welches auf intravenösem Wege verabreicht wird, enthält deshalb zum einen eine passivierende Hüllschicht, die den Nanopartikel vor unerwünschten Interaktionen mit Epithelzellen und gelösten Bestandteilen des Blutes schützt und befindet sich zum anderen im Größenbereich von etwa 10-200 nm, um die renale Exkretion der Nanopartikel zu verhindern. Hierdurch wird die Halbwertszeit des Transportsystems im Blut maximiert und die Effekte des passiven Targetings so gut wie möglich ausgeschöpft. Befinden sich zudem spezifische Erkennungsstrukturen auf der Oberfläche des Transportsystems, kann durch die Förderung zellspezifischer Interaktion die Transporteffektivität des Nanosystems weiter gesteigert werden.

2.5 Polymersynthese

2.5.1 Allgemeines

Das Wort Polymer ist den griechischen Worten *πολύ* (*polý* = viel) und *μέρος* (*méros* = Teil) entlehnt und beschreibt ein Molekül, welches aus vielen gleichen, sich wiederholenden Untereinheiten aufgebaut ist. Diese Untereinheiten werden als Monomere bezeichnet, wobei der erste Wortteil dem griechischen Wort *μόνος* (*monos* = ein, einzel-) entstammt.

Im Zuge der Herstellung von Polymeren werden in Forschung und Industrie diverse Reaktionen verwendet, die durch die kontinuierliche Reaktion an einer oder mehrerer funktioneller Gruppen ein stetiges Wachstum der polymeren Spezies bis zum Erreichen der gewünschten Produktzusammensetzung ermöglichen. Bei vielen Polymerisationsmethoden besteht die Problematik, dass die Produktzusammensetzung nach dem Ende der Synthese sehr heterogen gestaltet sein kann. Die Länge der einzelnen Polymerketten kann durch unvollständige Reaktion, Kettenübertragung oder Abbruchreaktionen während der Synthese deutliche Unterschiede aufweisen. Während dies für Anwendungen im Bereich der Nanomaterialien häufig ein Problem darstellt, kann dies in anderen industriellen Zweigen teilweise sogar einen Vorteil für das Produkt sein. Es muss hier zwischen mikro- und makroskopischen Materialeigenschaften unterschieden werden. Da im biologischen und pharmazeutischen Kontext jedoch weniger makroskopisch-materialwissenschaftliche, als biologische Struktur-Eigenschafts-Beziehungen relevant sind, ist häufig ein exakt definiertes, möglichst homogen

zusammengesetztes Polymerprodukt erforderlich, um reproduzierbare physiologische Effekte zu erzeugen.

2.5.2 Kontrollierte radikalische Polymerisation

Um eine möglichst homogene Kettenlänge der Polymere zu gewährleisten, muss der Polymerisationsprozess kontrolliert werden. Dies ist vor Allem bei verschiedenen Methoden der kationischen, anionischen und radikalischen Kettenwachstumspolymerisation und Metathese-Reaktionen möglich. Durch die Kontrolle der Anzahl der aktiven, wachsenden Polymerketten, der Vermeidung von Kettenabbruchsreaktionen und der Vermeidung von Übertragung der wachsenden Kettenenden, kann die Homogenität des Polymerprodukts erhöht werden. Die Homogenität, und damit die Breite der Molekulargewichtsverteilung von Polymeren, wird durch den Polydispersitätsindex (PDI; \mathcal{D}), den Quotienten aus dem Massenmittel des Molekulargewichts (M_w) und dem Zahlenmittel des Molekulargewichts (M_n) beschrieben:

$$\mathcal{D} = \frac{M_w}{M_n} \quad (2.1)$$

Dieser liegt bei kontrollierten Polymerisationstechniken üblicherweise zwischen 1,1 und 1,4. Ein Polydispersitätsindex von 1,0 entspricht dabei einer Monodispersen Kettenlängenverteilung. In der Literatur sind mehrere kontrollierte, radikalische Polymerisationstechniken (CRP; *controlled radical polymerization*) ausführlich beschrieben. Diese sind die *atom transfer radical polymerization* (ATRP; Atom-Transfer radikalische Polymerisation), die *nitroxide-mediated radical polymerization* (NMRP; Nitroxid-vermittelte radikalische Polymerisation) und die *reversible-addition-fragmentation chain-transfer radical polymerization* (RAFT; Reversible Additions-Fragmentierungs Kettenübertragungspolymerisation). Alle drei genannten Polymerisationstechniken teilen ein grundlegendes Funktionsprinzip. Durch die Erzeugung eines Reaktionsgleichgewichts zwischen aktiven Radikalspezies und einer unreaktiven, „schlafenden“ Spezies wird pro Zeiteinheit die Anzahl aktiver, wachsender Kettenenden minimiert. Aus reaktionskinetischen Betrachtungen folgt, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Kettenabbruchsreaktionen mit dem Quadrat der Radikalkonzentration wächst.

$$v_t = 2k_t \cdot [P^*]^2 \quad (2.2)$$

Dabei ist v_t die Reaktionsgeschwindigkeit der Terminierungsreaktionen, $[P^*]$ die Konzentration der aktiven Polymerradikale und k_t die Geschwindigkeitskonstante der Terminierung.

Durch die Verringerung der Radikalkonzentration wird daher das Auftreten dieser Reaktionen stark zurückgedrängt, die radikalische Polymerisation erhält ihren kontrollierten Charakter. Bei der ATRP wird das Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Radikalspezies durch einen Halogentransfer zwischen dem wachsenden Kettenende und einem Übergangsmetallkomplex erzeugt.^[78,79] Bei der NMP

erfolgt die Reduzierung der Radikalkonzentration durch den Übertrag des freien Radikal-Elektrons auf eine Nitroxidspezies.^[80,81] Dabei handelt es sich um eine reversible Reaktion, die im Gleichgewicht sehr stark auf der Seite der entstehenden, sehr reaktionsträgen Nitroxidradikalen liegt.

2.5.3 Reversible Additions-Fragmentierungs Kettenübertragungspolymerisation (RAFT)

Die in dieser Arbeit vorgestellten Polymersysteme wurden mittels der RAFT Polymerisationstechnik synthetisiert. Bei dieser Technik wird, durch eine Gleichgewichtsreaktion zwischen dem reaktiven Radikal und einem inaktiven Radikal-Addukt an einer Dithioester- oder Trithiocarbonatfunktion, die Anzahl wachsender Polymerketten verringert und somit die Kontrolle über den radikalischen Polymerisationsprozess gewonnen. Die Komponente, welche die Dithioester- oder Trithiocarbonatfunktion trägt, wird dabei als *chain transfer agent* (CTA; Kettenübertragungsagens) bezeichnet. Als Monomere werden dabei hauptsächlich vinyloge Säureester oder vinyloge Säureamide eingesetzt. Erstmals beschrieben wurde diese Synthesemethode von Moad et al. im Jahr 1998.^[82-84] Gegenüber der vorrangig genannten CRP-Methoden bietet die RAFT-Polymerisation besondere Vorteile für die Synthese von Verbindungen mit Anwendung im pharmazeutischen Kontext. Zum einen müssen, anders als bei der ATRP, keine Übergangsmetall-Komplexe eingesetzt werden, welche teilweise zytotoxische Eigenschaften aufweisen und nur äußerst schwer aus den Polymerprodukten entfernt werden können. Zum anderen toleriert die RAFT-Reaktion diverse Monomer-Verbindungen und funktionelle Seitengruppen. Somit kann eine Vielzahl verschiedener, funktioneller Polymerverbindungen synthetisiert werden. Der allgemeine Mechanismus der RAFT-Polymerisation, in Anlehnung an den durch Moad et al. vorgeschlagenen Mechanismus,^[82] ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

Die Initiierung der Polymerisation erfolgt dabei mittels Zugabe einer Initiatorverbindung, welche beispielsweise durch Thermo- oder Photolyse in zwei Initiatorradikale zerfällt. Die häufigsten verwendeten Initiatoren sind dabei Peroxidverbindungen wie DBPO (Dibenzoylperoxid), oder Diazoverbindungen wie AIBN (Azobis(isobutyronitril)). Die Initiatorradikale können mit Monomermolekülen reagieren, es kommt zu ersten Kettenwachstumsreaktionen. Eine nahezu gleichzeitige Propagation der Polymerketten kann nur stattfinden, wenn die Geschwindigkeit der Initiierungsreaktion deutlich größer als die Polymerisationsgeschwindigkeit ist. Somit gilt für die Geschwindigkeitskonstanten $k_i \gg k_p$. Die RAFT-Reaktion tritt sehr schnell in die Phase des reversiblen Kettentransfers über. Dabei addieren die wachsenden Polymerketten an die CTA-Verbindung.

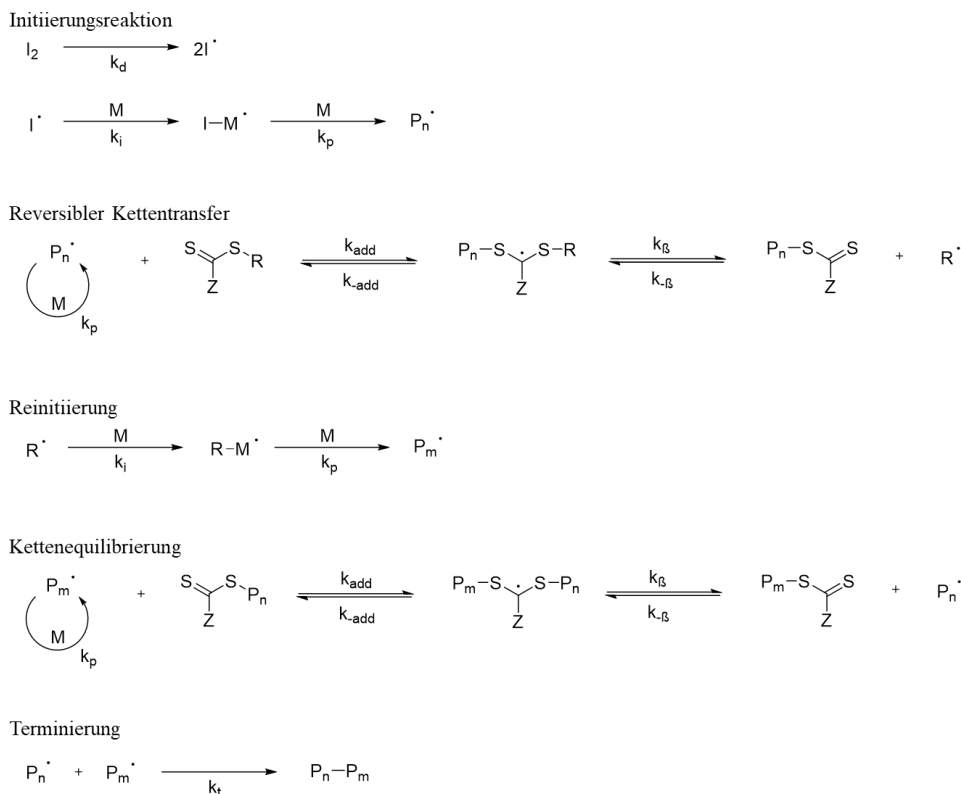


Abbildung 2.4: Mechanismus der RAFT-Polymerisation

Das entstehende Addukt-Radikal weist eine sehr hohe Stabilität auf, die Geschwindigkeitskonstanten der möglichen Dissoziationsreaktionen k_{-add} und $k_{-\beta}$ sind dabei sehr klein gegenüber den Geschwindigkeitskonstanten der möglichen Adduktionsreaktionen k_{add} und k_β . Im Zuge der Kettentransferreaktion kann die Restgruppe R ebenfalls von der Übergangsverbindung dissoziieren und ihrerseits an der Kettenwachstumsreaktion teilnehmen. Durch das Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Spezies sowie den stattfindenden Kettentransferreaktionen kommt es zu einer gleichmäßigen Kettenpropagation. Kommt die Kettenwachstumsreaktion durch Verarmung der Reaktionslösung an Monomermolekülen zum Erliegen oder wird sie durch rapides Abkühlen der Reaktionslösung unterbrochen, können die meisten Polymerketten als CTA-Addukt isoliert werden. Somit können die Reaktionsprodukte der Polymerisation als Makro-CTA-Verbindungen für folgende RAFT-Polymerisationen eingesetzt werden. Werden hierbei unterschiedliche Monomer-Verbindungen verwendet, können Block-Copolymere synthetisiert werden.

2.6 Charakterisierung von Polymeren und Nanopartikeln

2.6.1 Kernresonanzspektroskopie

Eine der am häufigsten verwendeten Methoden für die Charakterisierung von Reaktionsprodukten in der organischen und makromolekularen Chemie ist die *nuclear magnetic resonance spectroscopy* (Kernspinresonanzspektroskopie, NMR Spektroskopie). Diese Analysemethode wird vorrangig zur

Strukturaufklärung und zur Reaktionskontrolle verwendet. Dabei findet der sogenannte „Zeeman-Effekt“ Anwendung, welcher im Jahr 1896 durch Piet Zeeman nachgewiesen wurde und bei der Wechselwirkung bestimmter Atomkerne mit starken Magnetfeldern auftritt.^[85]

Kerne mit ungerader Anzahl an Kernteilchen (Nukleonen, Summe aus Protonen und Neutronen) besitzen einen Gesamt-Kernspin $I \neq 0$ Spinquantenzahl. Diese Atomkerne verfügen über ein magnetisches Drehmoment μ :

$$\mu = \frac{\gamma h [I(I + 1)]^{1/2}}{2\pi} \quad (2.3)$$

Dabei beschreibt γ das gyromagnetische Verhältnis und h die Planck-Konstante.

Isotope mit ungerader Protonen- oder Neutronenzahl besitzen genau einen ungepaarten Nukleonen-Spin und damit einen Gesamt-Kernspin von $I = 1/2$. Dies betrifft unter anderem ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F und ^{31}P , welche für die Kernresonanzspektroskopie relevante Isotope sind, die ebenfalls häufig als Bausteine organisch-chemischer und makromolekularer Verbindungen auftreten. Werden diese Isotope einem externen Magnetfeld B_0 ausgesetzt, so kann der Eigendrehimpuls des jeweiligen Atomkerns $2I + 1$ Orientierungen annehmen. Dies führt zu einer Spaltung der Grundzustandsenergie des Kernes in $2I+1$ Energiezustände:

$$E = -\mu_z B_0 = -\frac{m_l \gamma h B_0}{2\pi} \quad (2.4)$$

Dabei beschreibt m_l die Magnetquantenzahl des entsprechenden Isotops und μ_z das entsprechende magnetische Dipolmoment.

Der jeweils niedrigste Energiezustand entspricht dabei dem magnetischen Drehmoment des Kernes, das am genauesten in Richtung des externen Magnetfelds orientiert ist. Der jeweils höchste Energiezustand entspricht hingegen jenem magnetischen Drehmoment, das am genauesten in Gegenrichtung des externen Magnetfelds orientiert ist. Die Energiedifferenz ΔE der beiden Energiezustände verhält sich proportional zur Feldstärke des externen Magnetfelds B_0 .

$$\Delta E = \frac{h\gamma B_0}{2\pi} \quad (2.5)$$

Wird ein Kern dem magnetischen Feld B_0 ausgesetzt, beginnt er eine Präzessionsbewegung zu vollführen. Wird nun ein elektromagnetisches Feld orthogonal zum Magnetfeld B_0 angelegt, dessen Radiofrequenz der Präzessionsfrequenz (Lamor-Frequenz) entspricht, kann ein Übergang des Kerns vom energetisch niedrigeren, auf den energetisch höheren Spinzustand erfolgen.

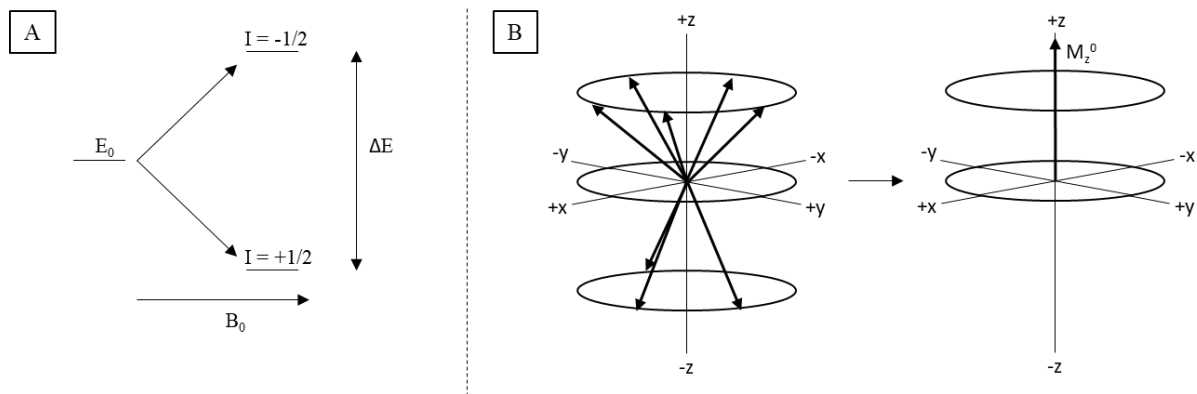


Abbildung 2.5: Spin-Ausrichtung im magnetischen Feld.A: Aufspaltung der Energiezustände unter dem Einfluss des äußeren Magnetfelds B_0 . B: Spin Verteilung eines beispielhaften Kerns mit dem aus dem Boltzmann-Überschuss resultierenden Spinvektor M_z^0 .

Relaxation zum energetisch niedrigeren Zustand kann über thermischen Energietransfer, die sogenannte Spin-Gitter-Relaxation (*spin-lattice-relaxation*; T_1), oder Spin-Spin-Relaxation (*spin-spin-relaxation*; T_2) erfolgen, welche auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen mit benachbarten Kernen beruht. Die Relaxation angeregter Kerne wird als abfallendes, oszillierendes Signal (freier Induktionszerfall; *free induction decay*; FID) detektiert.

Im thermodynamischen Gleichgewicht befindet sich die Mehrzahl der Atomkerne im energetisch niedrigeren Zustand. Das Verhältnis von Kernen im angeregten Zustand (N_β) und Kernen im Grundzustand (N_α) wird durch die Boltzmann-Gleichung bestimmt:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = \exp\left(\frac{-\Delta E}{kT}\right) \quad (2.6)$$

T bezeichnet dabei die Temperatur und k die Boltzmann-Konstante. Da die Signalintensität abhängig vom Verhältnis der Anzahl an Kernen im angeregten Zustand und Grundzustand ist, ergeben sich hohe Signalintensitäten für hohe Feldstärken des externen Magnetfelds B_0 (siehe Formel 2.3).

Es existieren zwei verschiedene Spektrometer-Typen für die Messung von Kernresonanzspektren. Bei dem älteren Messverfahren, dem *continuous-wave* (CW) Verfahren, wird bis zum Eintreten der Kernresonanz die Stärke des externen Magnetfelds B_0 variiert. Dabei wird die Energieaufnahme des jeweiligen Kerns detektiert. Da sich die Larmor-Frequenzen gleicher Atomkerne je nach ihrer chemischen Umgebung unterscheiden, ist der Scanprozess sehr zeitaufwändig. Diese Methode gilt mittlerweile als veraltet. Bei der moderneren Messmethode, dem *Fourier transform* (FT) Verfahren, wird ein starker Breitband-Radioimpuls orthogonal zum statischen Magnetfeld B_0 eingestrahlt, um alle Atomkerne des gleichen Isotops zeitgleich anzuregen. Im Anschluss an die Anregung wird die oszillierende elektromagnetische Energie, die von den Atomkernen beim freien Induktionszerfall emittiert wird, detektiert. Die zeitabhängigen Messfunktion wird durch eine Fourier Transformation mittels des Cooley-Tukey-Algorithmus in eine frequenzabhängige Funktion umgewandelt:

$$f(\omega) = \sum_{-1}^{+1} f(t) \exp(i\omega t) dt \quad (2.7)$$

Praktische Messungen liefern etwas geringere Resonanzfrequenzen, als anhand der Feldstärke des angelegten Magnetfelds zu erwarten wäre. Der Grund hierfür ist, dass durch die Bewegungen der Elektronen um den Atomkern ein Gegenfeld induziert wird, welches dem angelegten Magnetfeld entgegenwirkt.^[86–88] Dieser Abschirmeffekt ist abhängig von der Chemischen Umgebung des jeweiligen Atoms und kann zur Charakterisierung chemischer Verbindungen genutzt werden. Zur Einordnung der Resonanzsignale wird die Frequenzskala in der Skaleneinheit „Chemische Verschiebung“ (δ) angegeben. Dazu werden die Signale auf die Abweichung vom Frequenzmaximum des ^1H -Resonanzsignal einer Referenzverbindung bezogen, wodurch die Signalzuordnung ihre Abhängigkeit von der Stärke des externen Magnetfeldes verliert.^[86–88]

$$\delta = \frac{\Delta\nu}{\nu_r} = \frac{\nu_i - \nu_r}{\nu_r} \quad (2.8)$$

δ wird hierbei in der Einheit *parts per million* (ppm) angegeben. ν_i ist die Frequenz des Resonanzmaximums des jeweiligen ^1H -Signals, ν_r die Frequenz des Referenzsignals. Als Referenzsubstanz wird üblicherweise Tetramethylsilan (TMS) verwendet.

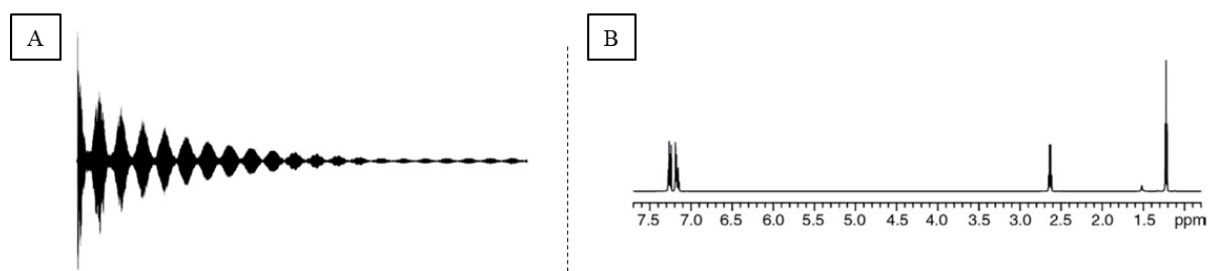


Abbildung 2.6: FID Signal und resultierendes ^1H -NMR-Spektrogramm.^[86] A: FID-Signal der ^1H -NMR Messung eines Beispielmoleküls. B: Resultierendes Spektrogramm nach Fourier-Transformation der Daten und nach Transformation der Frequenzen in die chemische Verschiebung δ .

2.6.2 DOSY NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie bietet verschiedene zusätzliche Möglichkeiten zur strukturellen Charakterisierung chemischer Verbindungen. Seit den 1970er Jahren wurden verschiedene Methoden zur Untersuchung von Spin-Spin Kopplungen, und damit der chemischen Struktur der untersuchten Moleküle, entwickelt.^[89–91] Hierbei handelt es sich um sogenannte zweidimensionale NMR-Methoden. Dabei werden, nachdem der primäre Magnetimpuls zur Anregung der Kerne gegeben wurde, ein oder mehrere, sekundäre Impulse nachgeschaltet. Diese sind zeitlich durch sogenannte Evolutionszeiträume getrennt. Durch die spezifische Spin-Spin-Relaxation können Rückschlüsse auf die chemische Umgebung gleicher oder unterschiedlicher Kerne getroffen werden. Bei der Untersuchung von Makromolekülen mittels magnetresonanzbasierter Methoden, kommt es durch die Anwesenheit vieler,

chemisch nahezu identischer Atome häufig zu starker Überlagerung der Signale. Dies kann die Strukturaufklärung erschweren. Zusätzlich bestehen die meisten Proben synthetisch hergestellter Makromoleküle aus einer heterogenen Mischung von Polymeren verschiedener Kettenlänge. NMR-Untersuchungen können hier nur gemittelte Werte zum Molekulargewicht und den Molekülstrukturen liefern und es ist nahezu unmöglich niedermolekulare, oligomere und polymere Teilspezies zu unterscheiden.

Eine besondere Methode der Kernresonanzspektroskopie, die *diffusion ordered spectroscopy* (diffusionsgeordnete (Kernresonanz-) Spektroskopie; DOSY), bietet eine erweiterte Möglichkeit zur Untersuchung heterogener Probengemische.^[92,93] Bei dieser Methode wird der Unterschied der Diffusionsgeschwindigkeit der verschiedenen Komponenten des Gemischs ausgenutzt. Neben experimentellen Parametern wie der Viskosität der Probelösung und deren Temperatur, ist die Diffusionsgeschwindigkeit von Partikeleigenschaften wie Größe, Form und Molekulargewicht abhängig. Hahn, sowie Carr und Purcell stellten in den 1950er Jahren fest, dass durch Applikation eines intensiven Radioimpulses nach der primären Anregung der Kerne ein Spin-Echo erzeugt wird, dessen Amplitude sich abhängig vom Zeitpunkt des zweiten Radiopulses ändert.^[94-96] Der Grund hierfür ist, dass eine Dämpfung der Spin-Präzession durch Inhomogenitäten im äußeren Magnetfeld auftritt, wenn sich die angeregten Kerne durch Diffusion im äußeren Magnetfeld bewegen.

Bei der einfachsten Variante eines DOSY-Experiments (siehe Abbildung 2.7) wird nach der Anregung der Kerne, mittels eines 90° Radioimpulses in Richtung der x-Achse, ein inhomogenes Magnetfeld in z-Richtung angelegt. Das Ende des inhomogenen Feldimpulses markiert den Beginn der Diffusionszeit Δ . Zum Zeitpunkt $t = \Delta/2$ (nach dem Zeitinkrement τ) wird ein 180° Radioimpuls in Richtung der x-Achse eingestrahlt. Zum Ende der Diffusionszeit Δ wird erneut ein inhomogenes Magnetfeld in z-Richtung angelegt und im Anschluss der FID detektiert.

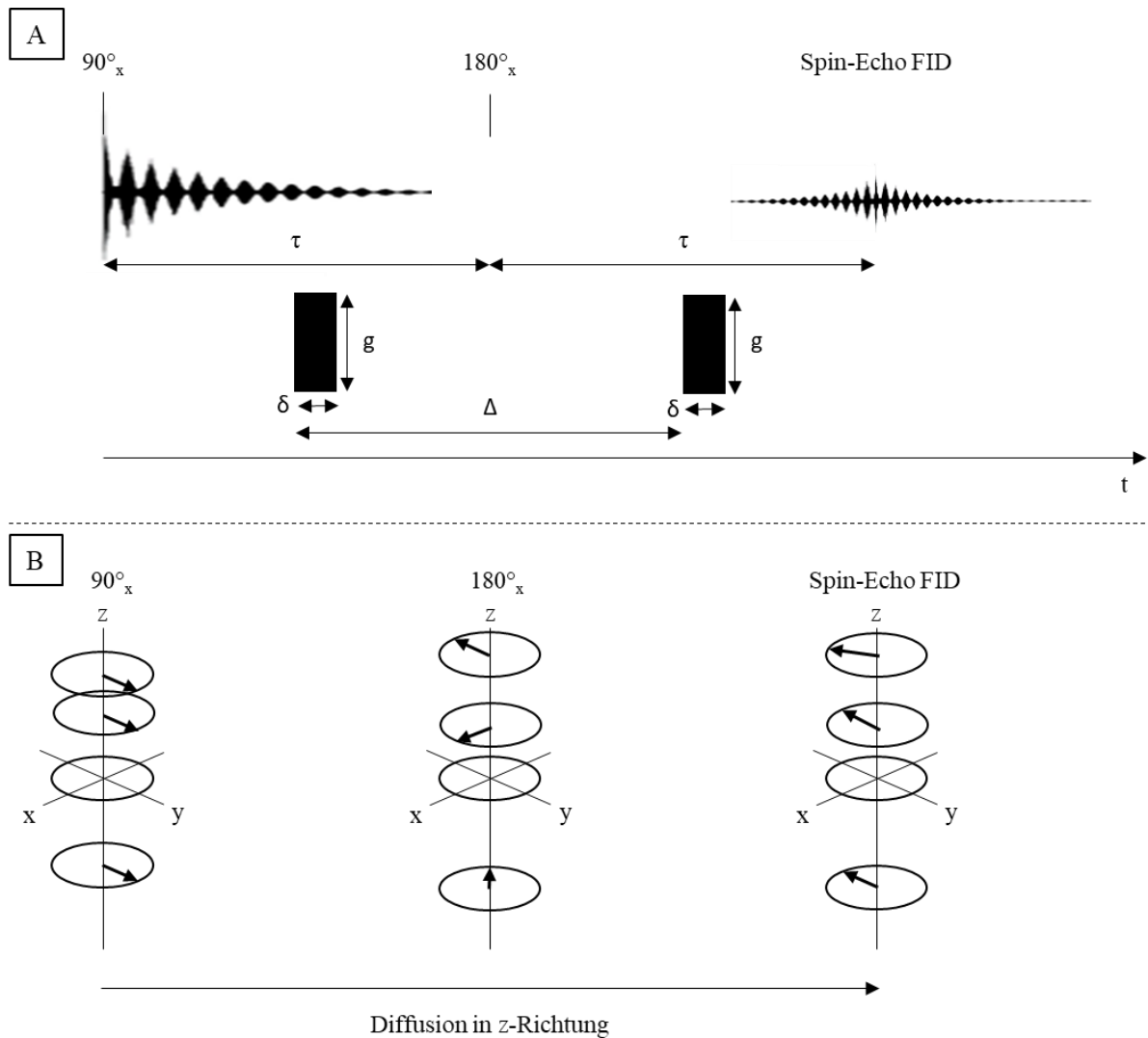


Abbildung 2.7: Experimenteller Verlauf einer DOSY-Messung. A: Reihenfolge und zeitlicher Ablauf der elektromagnetischen Pulse und des inhomogenen Magnetfelds. B: Codierung der z-Koordinaten der Spins durch die Pulsfolge und das inhomogene Magnetfeld.

Durch den initialen 90° Radioimpuls werden die Spins der Kerne, welche die Resonanzbedingung erfüllen, kohärent in die x-y-Ebene gezwungen. In Abhängigkeit von Ihrer Position auf der z-Achse nehmen die Spins unter dem Einfluss des inhomogenen Magnetfelds einen spezifischen Präzessionsvektor in der x-y-Ebene ein. Hierdurch wird die Position der Kerne in z-Richtung codiert. Durch den 180° Radioimpuls kommt es zur Erzeugung des Echosignals nach dem Zeitinkrement 2τ . Aus dem Intensitätsunterschied des primären FID und des Echo-FID kann der Diffusionskoeffizient der jeweiligen diffundierenden Spezies errechnet werden. Während dem Experiment werden entweder die Dauer des angelegten inhomogenen Magnetfelds δ oder des Feldgradienten g variiert. Zur Darstellung der Ergebnisse eines DOSY-Experiments werden die gemessenen Resonanzintensitäten als topologisches Profil mit der chemischen Verschiebung als x-Koordinate und dem Logarithmus des Diffusionskoeffizienten als y-Koordinate aufgetragen.

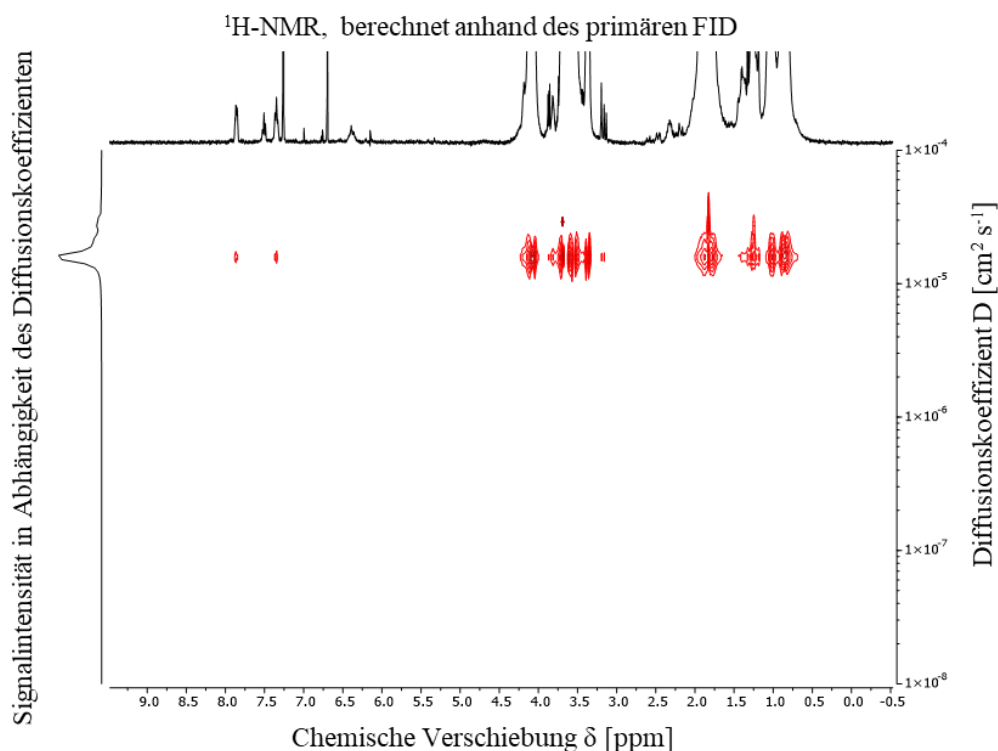


Abbildung 2.8: Beispiel eines DOSY-NMR Spektrums.

2.6.3 UV/VIS-Spektroskopie

Jede chemische Verbindung kann mit elektromagnetischer Energie interagieren. Treffen elektromagnetische Wellen bestimmter Frequenzen auf die Atome eines Moleküls, werden Elektronen in der Hülle der Atome angeregt. Die absorbierte Energie kann auf verschiedene Weise wieder abgegeben werden, beispielsweise durch Wechselwirkung mit anderen Molekülen in Form von kinetischem Energieübertrag, wobei die Erhöhung der kinetischen Energie des Systems als Erhöhung der Temperatur erfahren werden kann. Andererseits können die angeregten Elektronen unter Freisetzung elektromagnetischer Strahlung in einen niedrigeren Energiezustand fallen, was als Fluoreszenz oder Phosphoreszenz der Probe sichtbar wird. Bestimmte chemische Strukturen weisen Absorptionsmuster von elektromagnetischen Wellen auf, welche sich im Bereich des sichtbaren oder des UV-Lichtspektrums befinden. Die Absorption von Licht führt hierbei zu Übergängen der Valenzelektronen, vornehmlich aus p- oder d-Orbitalen in einen höheren Energiezustand.^[97] Dieser Effekt tritt ein, wenn die Wellenlänge des eintreffenden Photons die Resonanzbedingung erfüllt:

$$\Delta E = h \cdot \nu \quad (2.9)$$

Dabei entspricht ΔE der Energiedifferenz der beiden Zustände, h der Planck-Konstante und ν der Wellenlänge des Photons. Die Absorption der elektromagnetischen Energie kann anhand des Intensitätsverlusts des in das Probenvolumen eingeleiteten Lichtstrahles gemessen werden.

Anhand der spezifischen absorbierten Wellenlänge und der Höhe des Intensitätsverlust können Aussagen zur Probenzusammensetzung und Konzentration des Analyten gemacht werden. Die UV/Vis-Spektroskopie eignet sich dabei eher weniger zur Probencharakterisierung, da die chemische Struktur des Analyten nicht eindeutig über das Absorptionsspektrum ermittelt werden kann. Jedoch kann mit dieser Methode zum einen der Verlauf von Reaktionen kontrolliert werden zum anderen kann, durch das Verwenden einer Standardreihe, die Probenkonzentration ermittelt werden. Der schematische Aufbau eines UV/Vis-Spektrometers ist in Abbildung 2.9 dargestellt.

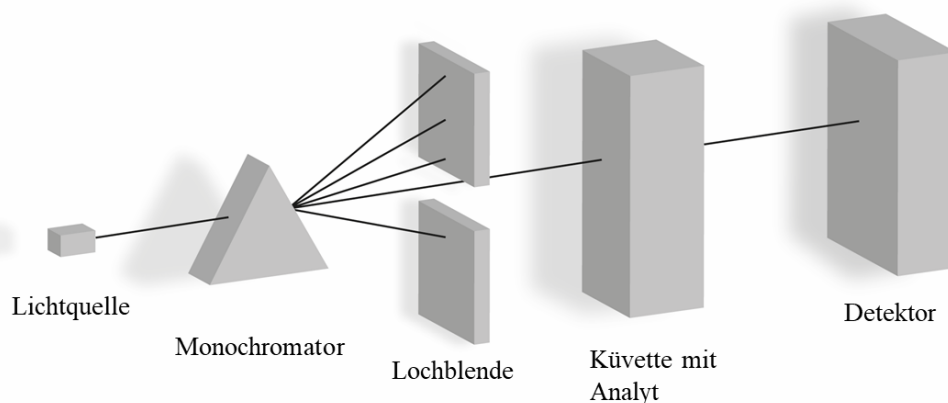


Abbildung 2.9: Schematischer Aufbau eines UV/Vis-Spektrometers

Als Lichtquelle wird bei einem UV/Vis-Spektrometer eine Vollspektrum-Lampe verwendet. Mittels eines Monochromators wird das Licht in sein Spektrum aufgefächert. Zumeist werden hierfür Prismen oder optische Gitter verwendet. Mittels einer Spaltblende wird das Licht der gewünschten Wellenlänge auf eine Küvette mit der zu untersuchenden Probelösung projiziert. Der ausfallende Lichtstrahl trifft auf einen photo-responsiven Detektor, der die optischen Signale in elektrische Signale umwandelt. Diese können durch ein entsprechendes Interface und entsprechende Software interpretiert werden.

2.6.4 Größenausschlusschromatographie

Zur Analyse und Charakterisierung des mittleren molekularen Gewichts von Polymeren und Polymeraggregaten sowie deren Größenverteilung hat sich die Größenausschlusschromatographie (SEC; *size exclusion chromatography*) als probates Mittel in Forschung und Industrie etabliert. Im deutschsprachigen Raum wird sie auch als Gelpermeations-Chromatographie (GPC) bezeichnet. Bei der SEC werden die Bestandteile heterogener Probelösungen anhand ihrer unterschiedlichen hydrodynamischen Radii aufgetrennt. Die Separation erfolgt dabei über eine mit hoch porösem Material gefüllte Säule, welche die Stationäre Phase des Systems darstellt. Mittels Wasser, organischen Lösungsmitteln, oder Lösungsmittelgemischen als mobile Phase, wird eine injizierte Probe mit hohem Druck durch die stationäre Phase geleitet. Abbildung 2.10 legt den schematischen Aufbau einer SEC-Apparatur dar.

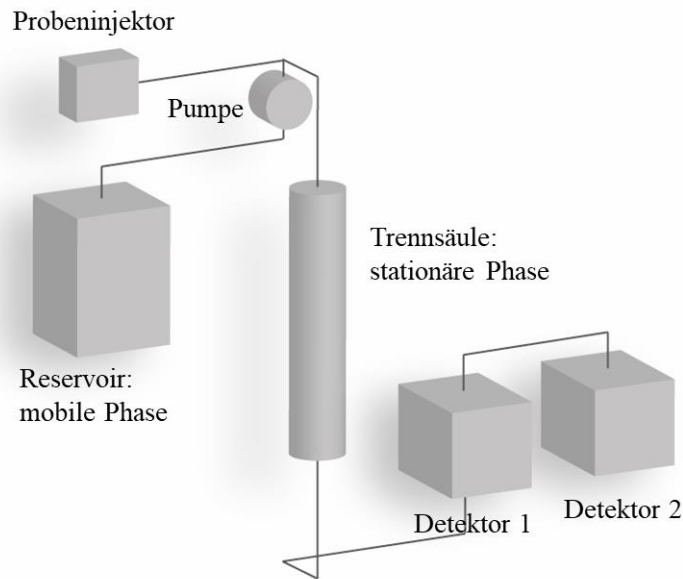


Abbildung 2.10: Schematischer Aufbau einer SEC-Apparatur

Wenn der Analyt nach der Probeninjektion auf das poröse Füllmaterial der Trennsäule trifft, kommt es zu Adsorption und Desorption der Probenbestandteile an der stationären Phase. Üblicherweise werden Mikrogranulate aus Polystyrol, Polyacrylamiden oder Polysacchariden, wie Dextran oder Zellulose, als Füllmaterialien für die Trennsäule verwendet. Analyten-Bestandteile, die ein kleineres hydrodynamisches Volumen aufweisen, können tiefer in die porösen Strukturen eindringen. Es kommt zu vermehrter Wechselwirkung und damit zu erhöhten Retentionszeiten dieser Probenfraktion. Analyten-Bestandteile mit höherem hydrodynamischem Volumen können weniger stark mit der porösen, stationären Phase wechselwirken. Dadurch kommt es zu geringeren Retentionszeiten und somit zu einer früheren Elution dieser Fraktion. Der kontinuierliche Lösungsmittelfluss wird im Anschluss an die Trennsäule durch eine Anordnung von einem oder mehreren Detektoren geleitet. In analytischen Laboren sind meist ein RI-Detektor (*refractive index detector*; Brechungsindex Detektor) und ein Ein- oder Mehrkanal UV-Detektor (*ultraviolet light detector*; Detektor für ultraviolettes Licht) als Detektoren angeschlossen. SEC-Aufbauten können im Allgemeinen jedoch auch semi-präparativ genutzt werden, wodurch sich, durch Fraktionierung des Eluenten, die Möglichkeit zur Präparation einzelner Probenbestandteile und erweiterter Analyse mittels Gaschromatographie (*gas chromatography*; GC), Massenspektroskopie (*mass spectrometry*; MS) oder Kernresonanzspektroskopie ergibt.

2.6.5 Agarose Gelelektrophorese

In einem elektrischen Feld bewegen sich geladene Kolloide entlang der Feldlinien. Auf Grund der Abstoßung gleicher Ladungen und der Anziehung unterschiedlicher Ladungen bewegen sich die negativ geladenen Anionen auf die positiv geladene Anode zu, wohingegen sich die positiv geladenen Kationen auf die negativ geladene Kathode zubewegen. Dieser Effekt wird als Elektrophorese bezeichnet. Auf die Partikel wirkt eine Kraft F , bedingt durch die elektrische Feldstärke E und die Partikelladung q .

$$F = E \cdot q = E \cdot e \cdot z \quad (2.10)$$

Dabei entspricht q dem Produkt aus der Ladungszahl z des Partikels und der Elementarladung e .

Zusätzlich wirkt entgegen der Bewegungsrichtung des Kolloids eine Rückstellkraft F_d , welche dem Reibungswiderstand entstammt. Bei der Annahme eines kugelförmigen Partikels ergibt sich für die Rückstellkraft nach dem Stoke'schen Gesetz:

$$F_d = 6\pi\eta Rv \quad (2.11)$$

Mit der Viskosität des Lösungsmittels η , dem Partikelradius R und der Geschwindigkeit der Bewegung v . Wenn die elektrische Feldstärke so gewählt wird, dass ein Kräftegleichgewicht zwischen der beschleunigenden Kraft F und der rückstellenden Kraft F_d herrscht, ergibt sich:

$$\begin{aligned} F &= F_d \\ E \cdot e \cdot z &= 6\pi\eta Rv \end{aligned} \quad (2.12)$$

Daher zeigt sich, dass die Geschwindigkeit der Bewegung v bei konstanter elektrischer Feldstärke E , lediglich von der Partikelladung z und von dem Partikelradius R abhängig ist:

$$v = \frac{E \cdot e \cdot z}{6\pi\eta R} \quad (2.13)$$

Hierdurch bedingen sich unterschiedliche Bewegungsgeschwindigkeiten für verschiedene kolloidale Probenbestandteile im elektrischen Feld. In Abhängigkeit von der elektrischen Feldstärke wird diese Partikeleigenschaft als elektrophoretische Mobilität U bezeichnet.

$$U = \frac{v}{E} = \frac{e \cdot z}{6\pi\eta R} \quad (2.14)$$

Zur elektrophoretischen Auftrennung einer Probe wird eine Pufferlösung mit exakt eingestelltem pH-Wert und konstanter Ionenstärke als Medium für die elektrophoretische Bewegung verwendet.

Einen Sonderfall stellt nun die Gelelektrophorese dar. Hierbei wird die Probe in ein Trägermedium pipettiert, welches mit dem Puffer durchtränkt ist. Bei dem Trägermedium handelt es sich üblicherweise um Gele aus Polysacchariden wie Stärke, Dextran und Agarose, oder um Gele aus vernetzten, synthetischen Polymeren wie Polyacrylamiden.^[98] Die Gelstruktur beeinflusst zusätzlich die Bewegungsgeschwindigkeit v , da es zum einen zu ladungsbasierten Wechselwirkungen zwischen der Gelstruktur und den Partikeln kommen kann und sie zum anderen einen höheren Widerstand gegen die Bewegung der Partikel darstellt.

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wird zunächst Agarose in der jeweils verwendeten Pufferlösung durch Erhitzen gelöst. Bei Agaroseanteilen von bis zu einem Prozent der Gesamtmasse erstarrt die Mischung beim Abkühlen zu einem transparenten Gel. Durch das Einbetten von sogenannten „Kämmen“ werden Negativräume im Gel erzeugt, in welche die Probenlösung pipettiert werden kann. Man spricht von sogenannten „Geltaschen“. Das Gel wird in eine Flachbett-Elektrophorese-Apparatur gegeben und mit Pufferlösung überschichtet. Der apparative Aufbau ist in Abbildung 2.11 skizziert.

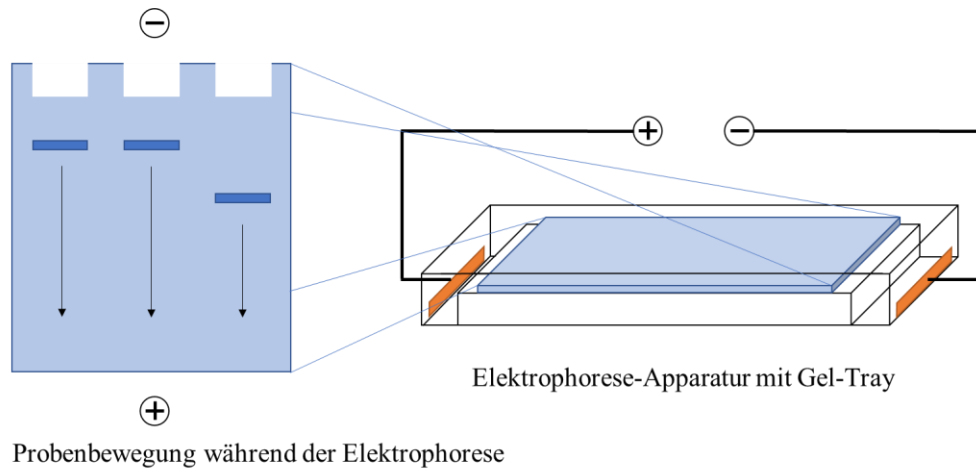


Abbildung 2.11: Apparativer Aufbau der Agarose-Gelelektrophorese.

Werden vornehmlich negativ geladene Biomoleküle, wie beispielsweise DNA oder RNA, untersucht, so wandern diese Makromoleküle in Richtung Anode durch den Gelkörper. Um die Ergebnisse der Auftrennung sichtbar zu machen, werden Farbstoffe verwendet, welche sich an den Kolloid-Bestandteilen anlagern und somit ein Bandenmuster erzeugen. Diese Farbstoffe können entweder beim Gießen des Gels hinzugegeben werden (*pre-staining*) oder sie können nach der Elektrophorese diffusiv eingebracht werden (*staining*). Eine qualitative Auswertung der Ergebnisse der Gelelektrophorese kann dabei durch den Vergleich der Position, Form und Intensität einzelner Banden erfolgen.

2.6.6 Zeta-Potential

Bei geladenen Partikeln, welche in einer Elektrolytlösung suspendiert sind, bildet sich nahezu instantan eine Hülle aus Ionen heraus, die entgegengesetzt zur Partikeloberfläche geladen sind. Diese ist besonders dicht in der Nähe der Partikeloberfläche, mit zunehmendem Abstand nimmt auch die Dichte der Ionen-Hülle ab.^[99] Dies beruht zum einen auf der teilweisen Abschirmung der Partikelladung gegenüber den äußeren Schichten der Hülle, zum anderen auf der Abstoßung der gleich geladenen Ionen untereinander. Es wird zwischen einer kondensierten Hüllenschicht und einer diffusen Hüllenschicht unterschieden.

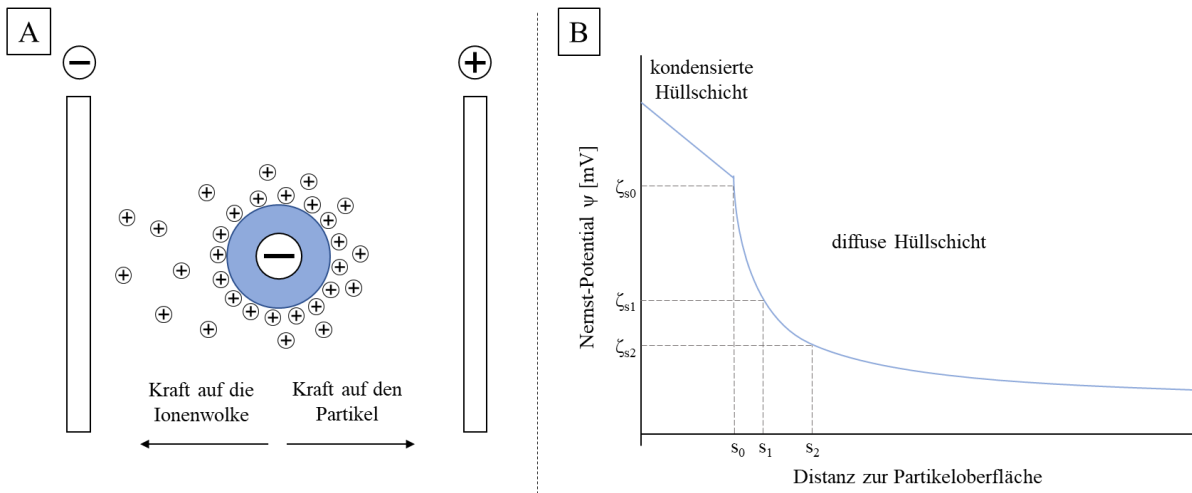


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der Ionenhülle um geladene Partikel. A: Abstreifen der Ionenwolke in Lösung durch den Einfluss des eines elektrischen Feldes. B: Auftragung des Nernst-Potentials gegen die Distanz zur Partikeloberfläche. Frei nach Koetz und Kosmella.^[99]

Wird ein elektrisches Feld angelegt, bewegen sich die Ionen entsprechend ihrer Ladung entweder in Richtung der Kathode oder in Richtung der Anode. Dabei wird die Ionenhülle um den Kolloiden verformt, nur schwach gebundene Ionen werden aus der Hülle gelöst (siehe Abbildung 2.12 A). Dies betrifft vor Allem die Ionen der diffusen Hüllenschicht. In Abhängigkeit von der Ionenkonzentration und der elektrischen Feldstärke werden mehr oder weniger der schwach gebundenen Ionen aus der diffusen Hülle abgestreift. Hierdurch wird die zum äußeren Medium erkennbare, effektive Ladung des Partikels verändert. Die an der Oberfläche des umhüllten Partikels messbare Restladung wird als Zeta-Potential ζ bezeichnet. Dies wird in Abbildung 2.12 B durch die verschiedenen freigelegten Scherebenen s_2 , s_1 und s_0 , sowie den ihnen entsprechenden Zeta-Potentialen ζ_2 , ζ_1 und ζ_0 verdeutlicht.

Zur Messung des Zeta Potentials existieren verschiedene Methoden. Eine sehr einfache und im Labormaßstab praktikable Methode ist die Messung des Zeta-Potentials durch eine Kombination von Elektrophorese und dynamischer Lichtstreuung. Dabei wird während einer Lichtstreuungsmessung ein elektrisches Feld orthogonal zur Einfallrichtung des Lichts angelegt. Durch die elektrophoretische Bewegung wird die Frequenz des Streulichts verändert. Es handelt sich hierbei um eine sehr kleine Dopplerverschiebung auf Grund der Partikelbewegung. Anhand der Frequenzänderung $\Delta\nu$ lässt sich die elektrophoretische Mobilität U der Partikel mit folgendem Zusammenhang bestimmen:^[100]

$$\Delta\nu = \left(\frac{2\eta}{\lambda_0}\right) \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) UE \quad (2.15)$$

Dabei bezeichnet η den Brechungsindex des Lösungsmittels, λ_0 die Wellenlänge des einfallenden Lichtstrahls im Vakuum, θ den Streuwinkel und E die Feldstärke des angelegten elektrischen Felds. Um das Zeta-Potential zu berechnen kann nun eine Modifikation der Formel (2.14) angewendet werden:^[99]

$$U = \frac{v_0}{E_0} = \frac{Q_{pc}}{6\pi \cdot \eta \cdot R} \quad (2.16)$$

Bei Q_{pc} handelt es sich dabei um die Ladung des Partikels. Da nur eine kleine Eigenladung der Partikel angenommen werden kann, kann Q_{pc} durch die Henry-Gleichung ausgedrückt werden.^[99,101] Somit ergibt sich für die elektrophoretische Mobilität:

$$U = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{\eta} \cdot f(\kappa a) \quad (2.17)$$

ε_r bezeichnet dabei die Permissivität der Probelösung, ε_0 die Permissivität im Vakuum und ζ das Zeta-Potential des kolloiden Partikels. Bei κa handelt es sich um ein dimensionsloses Produkt, welches das Verhältnis der Schichtdicke der ionischen Doppelschicht an der Partikeloberfläche zum Partikelradius beschreibt. Ohshima et al. konnten zeigen, dass die Funktion $f(\kappa a)$ mit vernachlässigbar kleinen Fehlern wie folgt approximiert werden kann:^[102]

$$U = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{\eta} \cdot f(\kappa a) = \frac{2\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{3\eta} \cdot \left(1 + \frac{1}{2 \left(1 + \frac{2,5}{\kappa a (1 + 2e^{-\kappa a})} \right)} \right) \quad (2.18)$$

Unter der Annahme, dass das Verhältnis zwischen Partikelgröße und dicke der ionischen Doppelschicht sehr groß ist, nähert sich der der Funktionstherm $f(\kappa a)$ dem Wert 1,5 an. In der Praxis kann so für die Berechnung des Zeta-Potentials die Smoluchowsky-Approximation der Gleichung für die elektrophoretische Mobilität genutzt werden:^[99]

$$U = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{\eta} \Rightarrow \zeta = \frac{\eta U}{\varepsilon_r \varepsilon_0} \quad (2.19)$$

2.6.7 Dynamische Lichtstreuung

Eine häufig genutzte Möglichkeit zur Charakterisierung verschiedener Molekül- und Kolloideigenschaften ist die Methode der Lichtstreuung. Grundsätzlich kann dabei zwischen statischer Lichtstreuung (*static light scattering*; SLS) und dynamischer Lichtstreuung (*dynamic light scattering*; DLS) unterschieden werden, welche im Folgenden genauer erläutert werden.

Elektromagnetische Strahlungen, wie unter anderem auch Lichtwellen, können mit Atomen wechselwirken, wodurch die Ladungsverteilung innerhalb der Atome verändert wird. Da Lichtwellen einer periodischen Modulation ihrer elektrischen und magnetischen Feldstärke unterworfen sind, kommt es zu einer oszillierenden Veränderung der Ladungsverteilung. Ein bestrahltes Atom wirkt hierdurch als elektrischer Oszillator und emittiert eine elektromagnetische Welle, deren Wellenlänge der Wellenlänge der eintreffenden Strahlung gleicht. Diese elektromagnetische Welle breitet sich isotrop in alle Richtungen orthogonal zur Richtungsachse der Oszillation (siehe Abbildung 2.13).^[103]

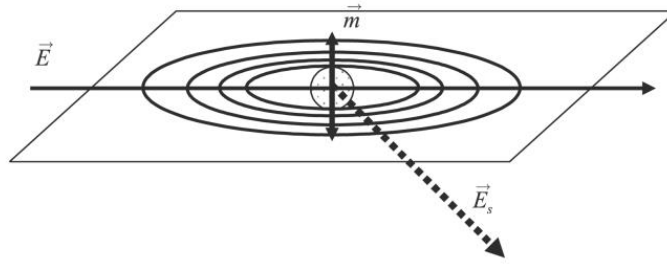


Abbildung 2.13: Induktion eines oszillierenden Dipols durch einfallendes Licht.^[103]

Bei Makromolekülen und größeren Kolloiden werden dementsprechend mehrere oszillierende Dipole zur gleichen Zeit induziert. Hierdurch kommt es zur Interferenz der verschiedenen Emissionswellen. Aus dem Interferenzmuster können Erkenntnisse zu Form und Größe des bestrahlten Partikels gewonnen werden.

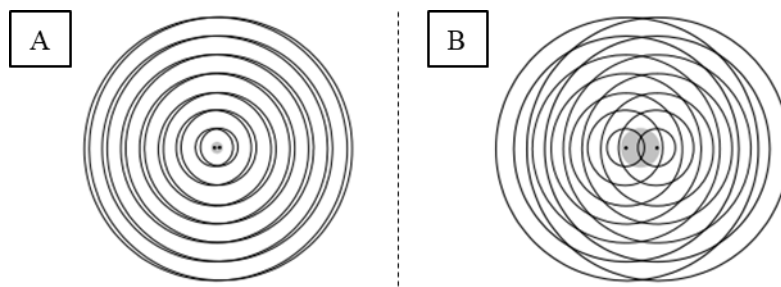


Abbildung 2.14: Mögliche Interferenzmuster der Lichtstreuung.^[103]Links: kleine Partikel. Rechts: große Partikel. Zur Vereinfachung werden nur zwei oszillierende Dipole gezeigt.

Im Fall, dass die Größendimension des bestrahlten Partikels höchstens ein Zwanzigstel der Wellenlänge der eintreffenden elektromagnetischen Strahlung beträgt, kommt es nur zu geringfügiger Interferenz der emittierten elektromagnetischen Wellen (siehe Abbildung 2.14 A). Hierdurch ist die Intensität des Streulichts unabhängig vom Streuwinkel θ . Aus diesem Grund lässt sich bei solchen Partikeln sehr gut das Massenmittel des Molekulargewichts ermitteln, Größe und Form des Partikels können jedoch nicht aufgelöst werden. Bei größeren, nanodimensionierten Partikeln (siehe Abbildung 2.14 B) entstehen durch Interferenz der verschiedenen Emissionswellen eine nicht-isotrope Winkelabhängigkeit der Intensität des Streulichts. Aus dem Interferenzmuster der Emissionswellen kann sowohl Form als auch Größe des Partikels abgeleitet werden. Bei der statischen Lichtstreuung können durch winkelabhängige und konzentrationsabhängige Messung der absoluten Streuintensität, dem sogenannten Rayleigh-Verhältnis R_θ , über die Zimm-Formel Erkenntnisse über das Massenmittel des Molekulargewichts M_w , das Zentrifugenmittel des Trägheitsradius R_g und den Formfaktor $P(q)$ des streuenden Partikels gewonnen werden:^[103,104]

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w \cdot P(q)} + 2A_2c = \frac{1}{M_w} \cdot \left(1 + \frac{1}{3} \langle R_g^2 \rangle_z \cdot q^2 \right) + 2A_2c \quad (2.20)$$

K ist dabei eine Konstante, die unter anderem die Brechungsindices von Lösung und Lösungsmittel enthält, c bezeichnet die Partikelkonzentration und A_2 den zweiten Virialkoeffizienten der

Virialentwicklung des osmotischen Drucks. Durch grafische Extrapolation der Daten für $c \rightarrow 0$ und $\Theta \rightarrow 0$ können M_w , $P(q)$, R_g und A_2 ermittelt werden.

Die dynamische Lichtstreuung befasst sich mit den Fluktuationen der gemessenen absoluten Streuintensität, die in Abhängigkeit der Zeit auftreten (siehe A). Diese Fluktuationen treten durch die brownische Bewegung der streuenden Partikel auf. Zur Analyse wird die von der Zeit t und vom Streuvektor q abhängige Streuintensität $I(q,t)$ nach gewissen Zeitinkrementen τ mit sich selbst multipliziert. Gegen τ aufgetragen beschreibt die sogenannte Autokorrelationsfunktion $\langle I(q,t)I(q,t+\tau) \rangle$ einen exponentiell abfallenden Verlauf (siehe Abbildung 2.15 B).

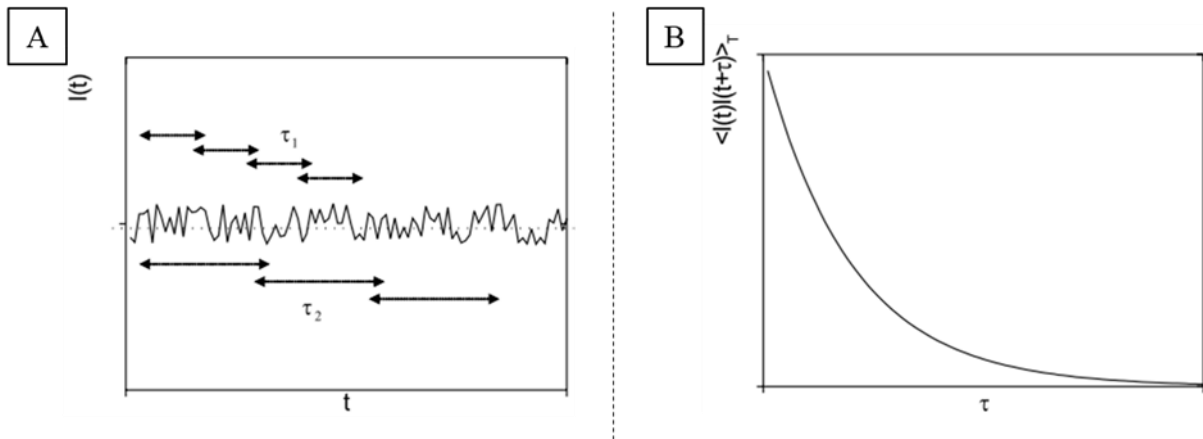


Abbildung 2.15: Prinzip der dynamischen Lichtstreuung.^[103] A: Zeitliche Fluktuation der absoluten Streuintensität $I(t)$. Gezeigt sind verschiedene mögliche Zeitintervalle τ_n . B: Beispiel der entsprechenden Autokorrelationsfunktion $\langle I(t)I(t+\tau) \rangle$ in Abhängigkeit von τ .

Über die sogenannte Siegert-Beziehung steht die Autokorrelationsfunktion in Verbindung zum sogenannten dynamischen Strukturfaktor $F_s(q,\tau)$ und zum Selbstdiffusionskoeffizienten D_s :

$$F_s(q,\tau) = \exp(-D_s q^2 \tau) = \sqrt{\frac{\langle I(q,t) \cdot I(q,t+\tau) \rangle}{\langle I(q,t)^2 \rangle}} - 1 \quad (2.21)$$

Durch die Kenntnis des Selbstdiffusionskoeffizienten D_s kann über die Stokes-Einstein-Gleichung der Wert für den hydrodynamischen Radius R_H des Partikels erhalten werden:

$$D_s = \frac{kT}{f} = \frac{kT}{6\pi\eta R_H} \quad (2.22)$$

Dabei bezeichnet k die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur der Probenlösung. Es muss beachtet werden, dass aus dem Reibungstherm f der hydrodynamische Radius R_H einer dem Partikel äquivalenten Kugel erhalten wird. Bei polydispersen Partikellösungen setzen sich die detektierten Streusignale aus Beiträgen verschieden großer streuender Partikel i mit einer individuellen Anzahl an Partikeln n_i , den zugehörigen molaren Massen M_i und ihrem jeweiligen Formfaktor $P(q)$ zusammen. Die Funktion des dynamischen Streufaktors wird daher aus der Summe der Einzelbeiträge jeder streuenden Spezies gebildet.^[105]

$$F_s(q, \tau) = \frac{\sum_i n_i M_i^2 P_i(q) \cdot \exp(-D_s q^2 \tau)}{\sum_i n_i M_i^2 P_i(q)} \quad (2.23)$$

Wird die Funktion F_s nun über eine Taylor-Reihe im sogenannten Kumulanten-Verfahren entwickelt erhält man:

$$\ln F_s(q, \tau) = -\kappa_1 \tau + \frac{1}{2!} \kappa_2 \tau^2 - \frac{1}{3!} \kappa_3 \tau^3 + \dots \quad (2.24)$$

Die erste Kumulante $\kappa_1 = \langle D_s \rangle q^2$ enthält dabei den durchschnittlichen Diffusionskoeffizienten $\langle D_s \rangle$, welcher mittels der Stokes-Einstein-Gleichung in den durchschnittlichen hydrodynamischen Radius $\langle R_H \rangle$ überführt werden kann. Auf Grund der Abhängigkeit vom Streuwinkel q sind jedoch nur die Mittelwerte für polydisperse Nanopartikel mit einer mittleren Größe von weniger als 10 nm korrekt definiert. Für größere streuende Partikel ist der durchschnittliche Diffusionskoeffizient der von q apparent abhängige Diffusionskoeffizient $D_{app}(q)$:

$$D_{app}(q) = \frac{\sum_i n_i M_i^2 P_i(q) \cdot D_i}{\sum_i n_i M_i^2 P_i(q)} \quad (2.25)$$

Der Formfaktor $P(q)$ kann durch die folgende Entwicklungsreihe ausgedrückt werden:

$$P(q) = 1 - \frac{1}{3} s^2 q^2 + \dots \quad (2.26)$$

Der korrekte Wert für den durchschnittlichen Selbstdiffusionskoeffizienten lässt sich somit durch Extrapolation der Werte für den Fall $q \rightarrow 0$ ermitteln. Hier ergibt sich für die den Formfaktor $P(q) \rightarrow 1$. Wird nun D_{app} gegen q^2 aufgetragen, ergibt sich eine Gerade mit folgender Formel:

$$D_{app}(q) = \langle D_s \rangle_z \cdot (1 + K \langle R_g^2 \rangle_z q^2) \quad (2.27)$$

Für Partikel im Größenbereich von 10 nm < R_H < 100 nm kann das Zentrifugenmittel des Selbstdiffusionskoeffizienten $\langle D_s \rangle_z$ aus dem y-Achsenabschnitt erhalten werden.

2.6.8 Dynamische Lichtstreuung im Serum

Nanodimensionale Partikel und Transportsysteme können in der Regel nicht über orale Aufnahme vom Körper resorbiert werden. Üblicherweise werden solche Partikellösungen durch intramuskuläre, subkutane oder intravenöse Injektion verabreicht.^[106] Der Transport des Nanopartikels mit dem Blutstrom ist somit meist essenziell, damit der Wirkort erreicht werden kann und ein therapeutischer Effekt eintritt. Bei Kontakt mit biologischen Medien wie Blut und Lympflüssigkeit kommt es durch elektrostatische oder hydrophobe Kräfte zur Interaktion der verabreichten Partikel mit diversen Bestandteilen des Mediums, wie beispielsweise Proteinen und Zellen.^[107] Größe und Form der Nanopartikel können sich durch Anlagerung von Proteinen verändern, es kann zudem zur Bildung von größeren Aggregatstrukturen kommen, was einen erheblichen Einfluss auf die Pharmakokinetik und

Biodistribution der Partikel haben und den therapeutischen Effekt der Behandlung erheblich schmälern kann.^[106,108] Die Messung dynamischer Lichtstreuung der Nanopartikel im Serum kann daher erste Hinweise liefern, ob sich ein Transportsystem für eine intramuskuläre oder intravenöse Verabreichung eignet.

Um den Beitrag eventuell vorhandener Proteinaggregate zu ermitteln, werden sowohl Proben des Serums, der Partikel in einer Pufferlösung, als auch der Mischprobe von Serum und Nanopartikel mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht. Der dynamische Strukturfaktor der Serumproteine $g_{1,s}(t)$ kann dabei durch eine Korrelationsfunktion, bestehend aus drei exponentiellen Teilgleichungen dargestellt werden:^[109]

$$g_{1,s}(t) = \alpha_{1,s} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_{1,s}}\right) + \alpha_{2,s} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_{2,s}}\right) + \alpha_{3,s} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_{3,s}}\right) \quad (2.28)$$

Viele der eingesetzten Nanoverbindungen weisen eine mehr oder weniger stark ausgebreitete, inhärente Größenverteilung auf. Der Strukturfaktor einer Mischung von Nanopartikeln kann jedoch sehr gut durch die Summe zweier Exponentialgleichungen beschrieben werden:^[109]

$$g_{1,np}(t) = \alpha_{1,np} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_{1,np}}\right) + \alpha_{2,np} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_{2,np}}\right) \quad (2.29)$$

Kommt es bei der Mischung von Serum und Nanopartikeln zu keinen Aggregationsereignissen, dann kann der gemeinsame Strukturfaktor $g_{1,m}(t)$ durch die Summe der jeweiligen Korrelationsfunktionen $g_{1,s}(t)$ und $g_{1,np}(t)$, unter Zuhilfenahme der Fitparameter f_s und f_{np} beschrieben werden.

$$g_{1,m}(t) = f_s g_{1,s}(t) + f_{np} g_{1,np}(t) \quad (2.30)$$

Für den Fall, dass es durch die Vereinigung von Serum und Partikellösung zu Aggregationsereignissen kommt, muss die Formel (2.30) durch den Aggregationstherm $f_{agg} g_{1,agg}(t)$ ergänzt werden:

$$g_{1,m}(t) = f_s g_{1,s}(t) + f_{np} g_{1,np}(t) + f_{agg} g_{1,agg}(t) \quad (2.31)$$

Die formelbasierte Interpolation der DLS-Daten zeigten Rausch et al. am Beispiel verschiedener PLL-g-PEO basierter Nanopartikel (siehe Abbildung 2.16).^[109]

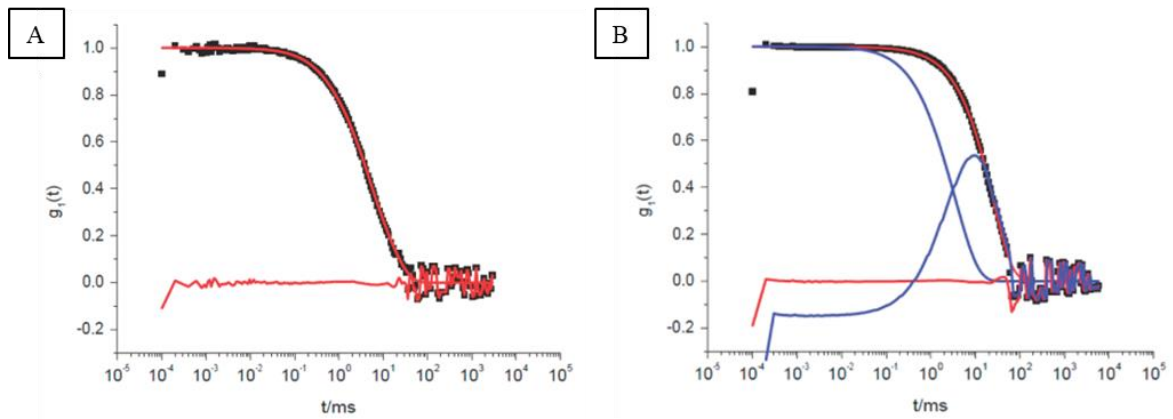


Abbildung 2.16: Autokorrelationskurven von PLL-g-PEO Nanopartikeln in humanem Serum.^[109] A: PLL-g-PEO₂₀ Nanopartikel in Serum. Keine Proteinaggregation. Rote Kurve: Korrelationsfunktion nach Formel (2.30) und das resultierende Residuum. B: PLL-g-PLO₈ Nanopartikel in Serum. Proteinaggregation tritt auf. Blaue Kurve: Korrelationsfunktion nach Formel (2.30) und das resultierende Residuum. Rote Kurve: Korrelationsfunktion nach Formel (2.31) und das resultierende Residuum.

Der Selbstdiffusionskoeffizient, und damit auch der mittlere hydrodynamische Radius der Aggregate, kann durch folgende Funktion ermittelt werden:

$$g_{1,agg}(t) = \alpha_{1,s} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_{1,agg}}\right) \quad (2.32)$$

3 Teil 1: RAFT Synthese reaktiver Triblock-Copolymere zur Bildung von Polyplexen

Die im folgenden Teil besprochenen Ergebnisse wurden in dem Artikel *RAFT Synthesis of Reactive Multifunctional Triblock-Copolymers for Polyplex Formation* von Nicolas Ritt, Amal Ayaou und Rudolf Zentel veröffentlicht.^[110]

3.1 Kurzdarstellung der Publikation

Zu Beginn dieser Arbeit wurde ein Triblock-Copolymer-System synthetisiert, welches über vier grundlegende Charakteristika verfügen sollte. Erstens sollte das Polymer über eine Azid-Endgruppe verfügen, welche es ermöglichen sollte, das Polymersystem über eine bioorthogonale, ringspannungsvermittelte Alkin-Azid-Cycloaddition (*strain promoted azide-alkyne cycloaddition*, SPAAC) chemisch zu modifizieren.^[111,112] Dabei wird die Cycloaddition über die Relaxation der Ringspannung eines Cyclooctinrings irreversibel und es kann auf zytotoxische Kupferkatalysatoren verzichtet werden. Dies sollte die Toxizität modifizierter Polymere verringern. Für die Polymersynthese wurde zunächst ein CTA Molekül hergestellt, welches in konsekutiven RAFT Polymerisationen zur Synthese des Triblock-Copolymers verwendet wurde. Zweitens sollte der primäre Polymerblock aus einem, im physiologischen Medium löslichen, Material bestehen, welches potenziell Wechselwirkungen mit biologischen Komponenten reduziert. Diese Eigenschaft wird in der Fachliteratur als *stealth-like behavior* (tarnkappenähnliches Verhalten) bezeichnet. Sie beruht auf der verminderten beziehungsweise nicht vorhandenen Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen der Polymerkomponente und Lipid-, Kohlenhydrat- und Proteinstrukturen.^[113–115] Hierzu wurde Tri-(ethylenglykol)-methylether-methacrylat (MEO₃MA) in einer RAFT Reaktion mit dem zuvor hergestellten CTA umgesetzt. Drittens sollte der sekundäre Polymerblock reaktive Disulfide als funktionelle Gruppen in der Seitenkette tragen. Diese sollten später die Möglichkeit bieten, die Polymere untereinander zu vernetzen oder niedermolekulare Verbindungen in einer Polymeranalogen Umsetzung mit den Polymeren zu verbinden. Hierzu wurde das zuvor erhaltene Homopolymer, welches in dieser Polymerisation als makromolekularer CTA (Makro-CTA) diente, in einer RAFT-Reaktion mit Methacrylsäure-2-(2-pyridyldithio)-ethylester (*pyridyl dithio ethyl methacrylate*, PDSM) umgesetzt. Zuletzt sollte der tertiäre Polymerblock unter physiologischen Bedingungen, kationische Gruppen als Seitenkettenfunktion tragen, um mit Nucleinsäuremolekülen, wie beispielsweise Plasmid-DNA, nicht-kovalente Bindungen über ionische Wechselwirkungen eingehen zu können. Hierzu wurde der hergestellte Diblock-Copolymer-CTA mittels RAFT-Polymerisation mit Methacrylsäure-2-(dimethylamino)-ethylester (*N,N-dimethyl aminoethyl methacrylate*, DMAEMA) umgesetzt, welches über ein tertiäres Amin verfügt. Unter physiologischen pH-Bedingungen liegt diese in wässrigen Medien nahezu vollständig protoniert vor.^[116]

Das Augenmerk lag bei den Versuchen zur Polymersynthese dabei vor Allem auf der Entwicklung einer Syntheseroute zur Darstellung der Triblock-Copolymere, welche durch eine präzise Kontrolle der individuellen Blocklängen und eine enge Molekulargewichtsverteilung charakterisiert sein sollte. Das synthetisierte Triblock-Copolymer-System sollte im Anschluss für die Herstellung von Polyplexen mit Plasmid-DNA eingesetzt werden. Die Kombination einer kationischen Komponente zur Bildung eines aggregierten Polyplex-Kerns und einer wasserlöslichen Komponente, welche eine Hüllschicht mit *stealth-like behavior* bildet, ist ein häufig angewendetes Prinzip für Systeme, die in Lösung selbstständig zu Polyplexen assemblieren.^[117–121] Zusätzlich zu diesen Strukturen wurde bei dieser Arbeit ein

intermediärer Polymerblock eingefügt, welcher die Stimulus-responsive Modifikation des Polymersystems im wässrigen Medium ermöglicht. Dabei sind zum einen eine intrapartikuläre, reversible Vernetzung der Polyplexe, zum anderen das Einbringen von niedermolekularen, bioaktiven Stoffen mögliche Anwendungen. Die Kombination der vier genannten Polymereigenschaften stellt für die Formulierung von Polyplexen mit pDNA ein Novum dar. Die hergestellten Polyplexe wurden im Verlauf der Arbeit eingehend auf ihre physikochemischen Eigenschaften untersucht. Dabei sollten als erwünschte Eigenschaften der Polyplexe ein hydrodynamischer Durchmesser von weniger als 200 nm und eine enge Größenverteilung generiert werden. Um mögliche Interaktionen mit Proteinen und anderen Bestandteilen biologischer Medien zu minimieren, sollte das Zeta-Potential der Partikel dabei weder deutlich positiv noch deutlich negativ sein. Es konnte gezeigt werden, dass diese Größen- und Ladungsparameter kritische Faktoren für eine längere Zirkulationszeit des Partikels im Blut sind.^[122]

Die zu diesen Thematiken erhobenen Daten und Erkenntnisse wurden in dem Artikel *RAFT Synthesis of Reactive Multifunctional Triblock-Copolymers for Polyplex Formation* veröffentlicht.^[110] Die praktische Umsetzung der ausgearbeiteten Syntheseroute geht dabei zu großen Teilen auf die Arbeit von Frau Amal Ayaou zurück, welche die in der Publikation vorgestellten Polymere im Rahmen ihrer Bachelorthesis synthetisierte. Die vorgestellten Experimente zur Bildung von Polyplexen und deren Modifikation wurde durch Herrn Nicolas Ritt vorgenommen.

3.2 Einleitung

Im Verlauf der letzten Jahrzehnte hat in der klinischen Forschung und Industrie die Bedeutung nanoformulierter Systeme für den Transport von Wirkstoffen stetig zugenommen. Besonders im Bereich der Behandlung geerbter oder erworbener Krankheitsbilder, welche auf genetischen Defekten beruhen, sind Behandlungsmaßnahmen auf Basis non-viraler Wirkstoffe zur Gentherapie ein viel debattierter Begriff.^[123–128] Dabei stellt die Behandlung von Tumor-Erkrankungen auf Grund der hohen Variabilität sowohl von Tumormerkmalen als auch der hohen Heterogenität von Patientengruppen eine besonders große Herausforderung dar.^[129] Nichtsdestotrotz hat stetiger Fortschritt in diesem Forschungsgebiet zur Markteinführung einiger Nanomedizin-basierter Therapeutika geführt. Prominente Beispiele hierfür sind Doxil, Abraxane, Narekt-102 und Paclical.^[130–132]

Die Verwendung nanoformulierter Wirkstofftransportsysteme bietet einige, gewichtige Vorteile gegenüber der Nutzung klassischer, niedermolekularer Wirkstoffe. So können beispielsweise schlecht lösliche Wirkstoffe solubilisiert und in höherer therapeutischer Konzentration für die Behandlung genutzt werden. Zusätzlich können verfrühte renale Filtration, oder auch Abbauprozesse während des intravaskulären Transports reduziert werden. Dies führt zu einer erhöhten Halbwertszeit im Blut und somit zu einer längeren Verfügbarkeit des Therapeutikums.^[4,10]

Besonders bei der intravenösen, therapeutischen Anwendung von DNA- oder RNA-basierten Wirkstoffen ist es notwendig, die Nucleinsäuren in eine Transportstruktur einzubetten, da freie Nucleinsäuren einem schnellen enzymatischen Abbau durch im Blut vorhandene Nucleasen unterworfen sind.^[67] Zudem können Nucleinsäuren auf Grund ihrer Größe und ihres polyanionischen Rückgrads nicht mittels Diffusion die Zellmembran überwinden.

In dieser Hinsicht bieten polykationische Polymersysteme eine elegante Möglichkeit Nucleinsäuren für therapeutische Anwendungen nutzbar zu machen. Polykationische Polymere können über ionische Wechselwirkungen nichtkovalente, elektrostatische Bindungen mit dem polyanionischen Rückgerad der Nucleinsäuren eingehen. Daher assemblieren Polymer-Nucleinsäure-Aggregate, sogenannte Polyplexe, selbstständig aus entsprechenden wässrigen Mischlösungen. Die elektrostatischen Wechselwirkungen können die negative Teilladung der Nucleinsäuren maskieren. Dies führt zu verringerten Wechselwirkungen mit Proteinen des Blut-Plasmas und kann die zelluläre Aufnahme der Nucleinsäuren verbessern. Das Idealbild eines Transportsystems für Nucleinsäuren besteht daher aus einem inneren Kern zur Stabilisierung der DNA und einer wasserlöslichen Schalenstruktur, die antiadsorptive Eigenschaften besitzt und somit den Kern vor ungewollter Interaktion mit Nucleasen und unspezifischer Wechselwirkung mit Plasmaproteinen schützt.^[115] Zusätzlich können funktionelle Gruppen, welche in wässrigem Medium adressiert werden können, zur reversiblen Stabilisierung des Polyplexes beitragen. Aus diesem Grund ist das Einfügen einer funktionellen Zwischenhülle zwischen dem geladenen Polyplex-Kern und der äußeren Hülle von Vorteil. Zudem ist das Anfügen von targeting-Strukturen wie Antikörpern, bestimmte Proteine und Kohlenhydratstrukturen auf der Partikeloberfläche vorteilhaft. Somit kann die Akkumulation des Transportsystems im Zielgewebe gefördert werden und die zelluläre Internalisation des Wirkstoffs erhöht werden.^[75-77]

Zur systematischen Anwendung von polymerbasierten Wirkstofftransportsystemen ist es ebenfalls wichtig, zwischen der Transport-Form und der Wirk-Form des nanomedizinischen Therapeutikums zu unterscheiden. Zwischen der Verabreichung des Therapeutikums und der Ankunft bei der Zielzelle muss das Transportsystem eine hohe Stabilität und eine lange Halbwertszeit während des Transports im Blutstrom aufweisen. Nach der Aufnahme in das Zellinnere muss jedoch eine schnelle und effiziente Freisetzung des Wirkstoffs erfolgen. Die Destabilisierung des Transport-Komplexes muss daher einem intrazellulären Stimulus folgen. Dies kann beispielsweise eine Reaktion auf den sinkenden pH-Wert bei der endosomatischen Aufnahme des Therapeutikums während der Phagozytose darstellen^[133,134] oder durch die Änderung des Redoxpotential beim Übergang des Transportsystems in das Zytosol induziert werden.^[135-139] In diesem Sinne ist die intrapartikuläre, reversible Vernetzung des Transportsystems über Disulfidbindungen von besonderem Interesse, da Disulfidbindungen eine überzeugende Stabilität beim Transport im Blut aufweisen, im Zytosol jedoch durch Glutathion (GSH) reduktiv gespalten werden können.^[140]

Die makromolekulare Chemie bietet vielseitige Techniken zur Synthese von statistischen, Gradient- und (Multi-) Block-Copolymeren. Dazu gesellt sich jeweils eine Vielzahl verschiedener Monomermoleküle, welche als mögliche Bausteine zur Herstellung komplexer Polymerarchitekturen und zur Bildung von Polyplex-Partikeln eingesetzt werden können. Als kationische Komponente zur Polyplexbildung wurden dabei häufig Poly(ethylenimin) (PEI), Poly(N,N-dimethylaminoethyl)-Strukturen, Poly(L-Lysin) und mehrere weitere Komponenten, welche primäre, sekundäre, tertiäre oder quaternisierte Amine enthalten, verwendet.^[117,141–149] Als Löslichkeitsvermittelnde Strukturen im wässrigen Medium und zur Abschirmung vor Wechselwirkungen mit Blutbestandteilen, finden vor allem Poly(ethylenglycol) und davon abgeleitete Strukturen, Poly(2-oxazolin) oder Polysarkosin verbreitete Anwendung.^[67,117–120,150–154]

Bisher wurden diverse statistische Polymere, einfache Block- und Graft-Polymerstrukturen und Kombinationen aus statistischen und Block-Copolymeren für die Komplexierung und den Transport von DNA synthetisiert.^[66,152,155–157] Hinsichtlich der verwendeten Polymerarchitekturen konnten Barz et al. über computergestützte Modellierung ermitteln, dass eine Separierung der funktionellen Gruppen, und somit der Monomereinheiten, in dezidierte Blockstrukturen zu einer erhöhten Polyplexstabilität und Transfektionseffizienz, im Vergleich zu statistischer Verteilung der Wiederholungseinheiten, führen kann.^[158] Das im Modell verwendete Polypept(o)id bestand dabei aus einem kationischen Block, einem intermediären Block mit reaktiven Disulfid-Seitengruppen zur reduktiv-reversiblen Vernetzung und einem abschirmenden Polymerblock aus Polysarkosin.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Polymere synthetisiert, die ebenfalls eine Triblock-Copolymer-Architektur mit einem intermediären, reversibel vernetzbaren Block aufweisen. Als Basis für die Synthese wurden Methacrylat-Monomere eingesetzt, die über eine sequenzielle, kontrollierte radikalische Polymerisation umgesetzt wurden. Dabei wurde sich der RAFT-Polymerisationstechnik bedient.

3.3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.1 Allgemeines zur Polymersynthese

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein Triblock-Copolymersystem zur Bildung von Polyplexen mit Plasmid-DNA synthetisiert, welches in Postpolymerisations-Reaktionen „Stimulus-responsiv“ modifiziert werden kann. Dieses Copolymer sollte dabei einen kationischen Block, der in der Lage ist, polykationische DNA oder RNA zu binden, mit einem antiadsorptiven Block kombinieren, um unspezifische Wechselwirkungen mit Plasmaproteinen zu minimieren. Ähnliche Polymerstrukturen sind bereits gut dokumentiert und werden häufig zur Bildung von Polyplexen eingesetzt.^[117–121] Zusätzlich sollte das hier beschriebene Polymer einen reaktiven Zwischenblock enthalten, der die

Möglichkeit eröffnen soll, das Polymer in wässriger Lösung „Stimulus-responsiv“ zu modifizieren. Dies schließt das Anbinden von bioaktiven Wirkstoffen, oder reversibler Stabilisierung der gebildeten Polyplexe durch Vernetzung ein. Für diese Zwecke ist die Anbindung der Moleküle über reaktive Disulfidbindungen besonders attraktiv. Diese können in einer einfachen Reaktion mit Thiolen umgesetzt werden, bei denen es sich um, nach dem Pearson-Prinzip, „weiche“ Nucleophile handelt. Im Gegensatz dazu besitzen die reaktiven Disulfide eine hohe Stabilität gegenüber, nach dem Pearson Prinzip, „harten“ Nucleophilen wie beispielsweise Hydroxid-Anionen. Die durch den Disulfid-Austausch gebildeten Disulfide können zusätzlich nach der Aufnahme des Polyplex in das Zellinnere durch eine erhöhte Konzentration von GSH gespalten werden. Um eine Möglichkeit für weitere Modifikationen zu bieten, wurde für die Synthese ein CTA mit Azid-Endgruppe verwendet. Hierdurch ist es möglich Targeting-Gruppen oder andere Moleküle in der Peripherie der Polyplex-Corona anzubringen. Zur Darstellung des Triblock-Copolymers wurden drei verschiedene Methacrylsäureester in sequenziellen, kontrollierten, radikalischen Reaktionen mittels des RAFT-Polymerisationsprozess synthetisiert (siehe Abbildung 3.1).

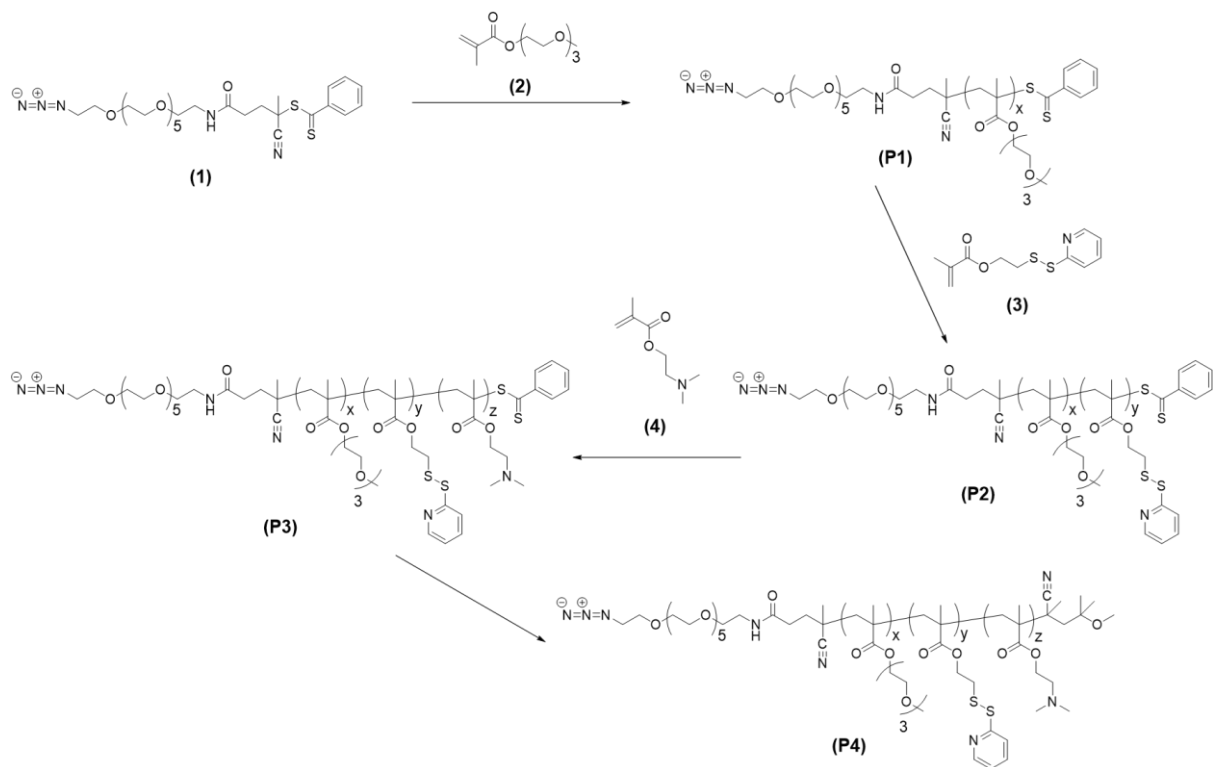


Abbildung 3.1: Reaktionsschema zur Synthese der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMAEMA) Triblock-Copolymere

Die hydrophilen und antiadsorptiven Eigenschaften des Polymers werden durch die Wiederholungseinheiten von Tri-(ethylenglykol)-methylether-methacrylat (MEO₃MA, Abbildung 3.1 (2)) vermittelt. Dieses Monomer wurde bereits in verschiedenen Polymersystemen zur Bildung von Nanopartikeln mit mRNA und siRNA erfolgreich angewandt.^[159,160] Als reaktive Disulfid-Komponente wurde das Monomer Methacrylsäure-2-(2-pyridyldisulfid)ethylester (PDSM, Abbildung 3.1 (3)) eingesetzt. Ähnliche reaktive Disulfide konnten bereits bei der Synthese verschiedener Polypept(o)id- und Polymerstrukturen, in schnellen und quantitativen Disulfid-Austauschreaktionen, verwendet

werden.^[161–164] Die durch den Austausch entstehenden Disulfide können reaktiv gespalten werden. Diese Eigenschaft kann als Stimulus genutzt werden, um die Stabilität von Polyplexen über reversible Vernetzung zu steuern. Zusätzlich könnten kleine Wirkstoffmoleküle kovalent an das Polymer gebunden werden und somit gemeinsam mit dem Nucleinsäure-Kern in die Zielzelle transportiert werden. In der extra- und intrazellulären Umgebung ist GSH die hauptverantwortliche Komponente für die reduktive Spaltung von Disulfidbindungen im physiologischen Kontext. Dabei liegt im Extrazellulären Raum typischerweise eine recht niedrige GSH-Konzentration im Bereich von 2-20 μM vor, im Zellinneren beträgt die GSH-Konzentration hingegen 0,5-10 μM .^[140] Auf Grund dieses großen Gradienten findet die Spaltung von Disulfidbindungen hauptsächlich im Zytosol statt. Über Disulfide vernetzte Polyplexe besitzen daher eine erhöhte Reduktionsstabilität, im Zellinneren wird die Vernetzung jedoch reaktiv gespalten. Dies könnte zu einer verbesserten Bluthalbwertszeit der Polyplexe und gleichzeitig zu einer erhöhten Transfektionseffizienz der Polyplexe führen. Des Weiteren ist die zweite mögliche Modifikation des Polyplexes, die SPAAC-Reaktion an der Azid-Endgruppe der Polymere, orthogonal zu der Disulfid-Austauschreaktion. Dies bedeutet, dass zwischen den vorliegenden reaktiven Gruppen keine konkurrierenden Kreuz-Reaktionen auftreten. Aus diesem Grund können beide Modifikationen, ohne zusätzlichen Schutz der reaktiven Gruppen, am gleichen Molekül durchgeführt werden. Zur Synthese des dritten, polykationischen Blocks wurde das Methacrylsäure-Derivat Methacrylsäure-2-(dimethylamino)-ethylester (DMAEMA, Abbildung 3.1 (4)) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Komponente, die ein tertiäres Amin als Funktionalität der Seitenkette besitzt. Unter physiologischen Bedingungen liegt das tertiäre Amin nahezu vollständig in protonierter Form vor und kann durch attraktive, ionische Wechselwirkung an DNA- oder RNA-Molekülen binden.^[116] Zusätzlich sollte bei der endozytotischen Aufnahme des Polyplexes durch disruptive Interaktion mit der hauptsächlich negativ geladenen Endosomenmembran die Freisetzung der Nucleinsäuren in das Zellinnere begünstigt werden. DMAEMA ist zudem biokompatibel und wurde bereits in anderen Polymeren erfolgreich eingesetzt.^[119,145]

3.3.2 Synthese des chain transfer agent (CTA)

Der für die RAFT-Polymerisationen benötigte CTA wurde durch die Amid-Kupplung von NH_2 -PEG₆-Azid an 4-Cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentansäure Pentafluorophenylester (PFP-CTA) synthetisiert. Dabei wurde Triethylamin eingesetzt, um das bei der Reaktion freiwerdende Pentafluorophenolat zu binden (siehe Abbildung 3.2).

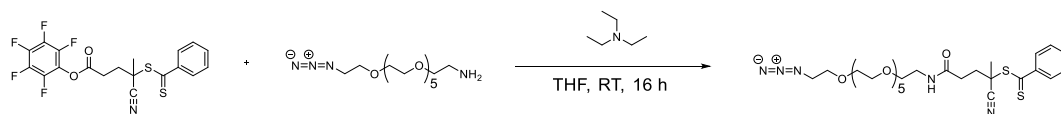


Abbildung 3.2: Reaktionsschema der Synthese des Azid-PEG₆-CTA

Die Synthese wurde in Anlehnung an die durch Nuhn et al. beschriebene Azid-CTA Synthese durchgeführt.^[159] Dabei konnten sowohl Nuhn et al. als auch Kramer et al. nach erfolgreicher Polymersynthese Modifikationen der Endgruppe über Azid-Alkin-Click-Reaktionen vornehmen.^[159,165] Der CTA wurde nach der Synthese und säulenchromatographischer Aufreinigung als dunkelrote, viskose Flüssigkeit erhalten. Die Charakterisierung des Azid-PEG₆-CTA erfolgte mittels ¹H-NMR und IR Spektroskopie (siehe Abbildung 3.3).

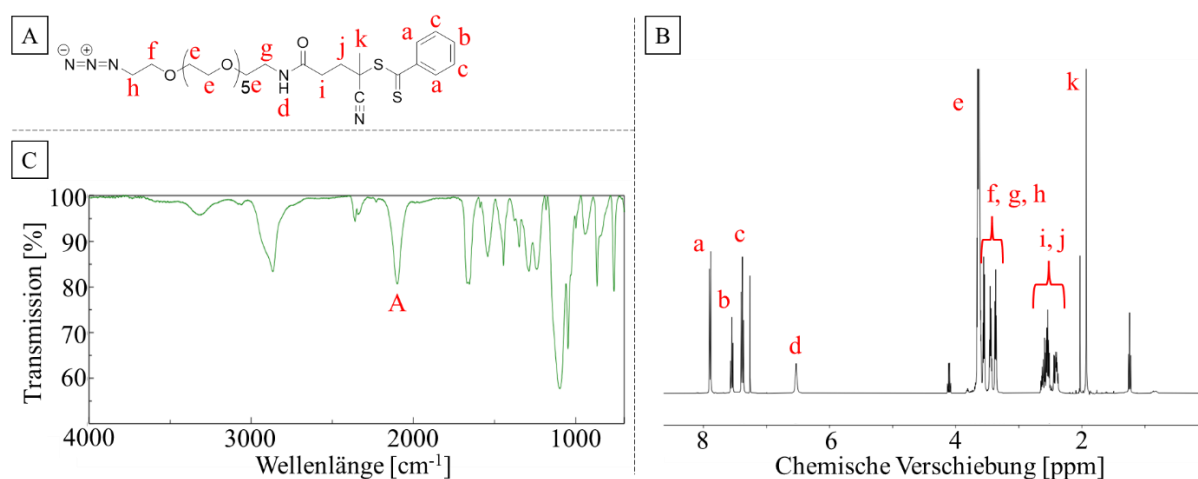


Abbildung 3.3: Charakterisierung des Azid-PEG₆-CTAs. A: Molekülstruktur des Azid-PEG₆-CTA. B: ¹H-NMR-Spektrum des Azid-PEG₆-CTAs mit Zuordnung der Protonensignale. C: FT-IR-Spektrum des Azid-PEG₆-CTAs.

Das ¹H-NMR (siehe Abbildung 3.3, B) zeigt alle erwarteten Signale des Produktmoleküls. Aus dem Integralverhältnis kann zudem geschlossen werden, dass ausschließlich der Produkt-CTA isoliert wurde und keine Restmengen des PFP-CTAs in der Probe verblieben. Zusätzlich ist im FT-IR-Spektrum (siehe Abbildung 3.3 C) bei einer Wellenlänge von 2099 cm⁻¹ das mit *A* markierte Absorptionssignal der Azidgruppe zu finden. Die Ergebnisse zeigen, dass der Azid-PEG₆-CTA erfolgreich hergestellt und isoliert werden konnte. Bis zur Weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung des CTAs bei -20 °C und unter Argon-Atmosphäre.

3.3.3 Synthese von Methacrylsäure-2-(2-pyridyldisulfid)ethylester (PDSM)

Methacrylsäure-2-(2-pyridyldisulfid)ethylester (PDSM), das Monomer zur Synthese des zweiten Polymerblocks, wurde in einem zweistufigen Reaktionsprozess hergestellt. Dabei wurde sich an der von Wong et al. publizierten experimentellen Vorschrift orientiert.^[166]

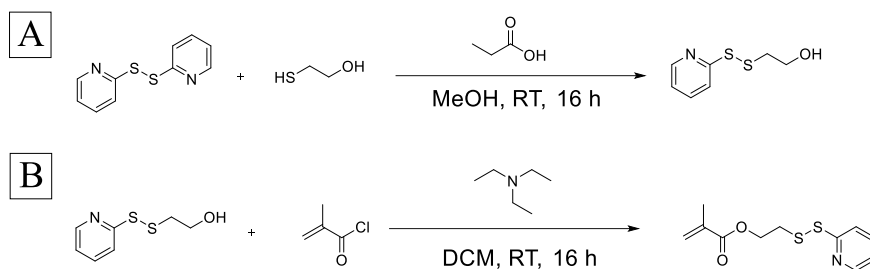


Abbildung 3.4: Reaktionsschema zur Synthese von PDSM. A: Synthese von HPDS, ausgehend von Aldrithiol-2. B: Synthese von PDSM, ausgehend von HPDS.

In der ersten Synthesestufe wurde Aldrithiol-2 mit 2-Mercaptoethanol säurekatalytisch zu Hydroxyethyl-(2-pyridyl)disulfid (HPDS) umgesetzt (siehe Abbildung 3.4). Nach der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie wurde das hellgelbe, leicht viskose HPDS mit Methacryloylchlorid in Dichlormethan (DCM) zu PDSM umgesetzt. Durch die Zugabe stöchiometrischer Mengen an Triethylamin wurde die bei der Reaktion freiwerdende Salzsäure als Triethylammoniumchlorid gebunden. Auch in der zweiten Synthesestufe erfolgte die Aufarbeitung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie. Nach der Trocknung im Vakuum erfolgte die Charakterisierung des hellgelben, viskosen PDSM mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie (siehe Abbildung 3.5).

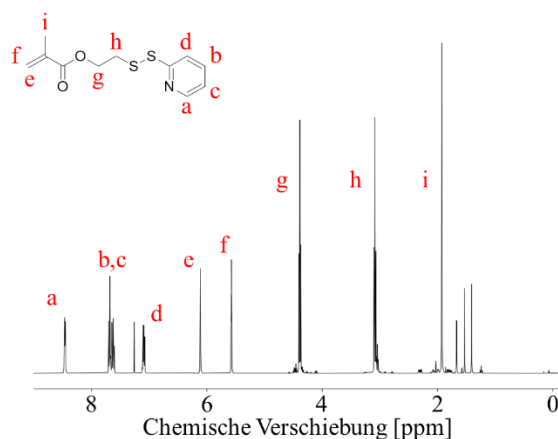


Abbildung 3.5: $^1\text{H-NMR}$ von PDSM mit Zuordnung der Protonensignale.

Da bei einigen Reaktionsansätzen spontane, freie radikalische Polymerisation des Monomers beobachtet werden konnte, wurde PDSM zur Erhöhung der Lagerstabilität als Stammlösung in frisch getrocknetem 1,4-Dioxan und unter Argon-Atmosphäre bei einer Temperatur von $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Das hierfür benötigte 1,4-Dioxan wurde dazu im Vorfeld mit Hilfe des *freeze-pump-thaw* Verfahrens von gelösten Gasen befreit.

3.3.4 RAFT-Synthese von p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMAEMA) Triblock-Copolymeren

Die Herausforderung bestand zunächst darin, den synthetischen Zugang zu einem Triblock-Copolymer-System zu ermöglichen, welches die in Kapitel 3.2 umrissenen, benötigten Eigenschaften für die Assemblierung von reversibel stabilisierten pDNA-Polyplexen vereint.

Um eine gute Solubilisierung der pDNA-Polyplexe zu gewährleisten und um möglichst die Interaktion mit biologischen Bestandteilen des physischen Mediums, wie der unspezifischen Adsorption von Proteinen, zu minimieren, wurde als Monomereinheit für die Synthese des ersten Polymerblocks Tri-(ethylenglycol)-methylether-methacrylat (MEO₃MA) verwendet. Bei MEO₃MA handelt es sich um ein kommerziell erhältliches Methacrylat, welches bereits erfolgreich bei anderen Polymersystemen, die zur Herstellung von mRNA- und siRNA-Transportsystemen verwendet wurden, zur Anwendung kam.^[159,160]

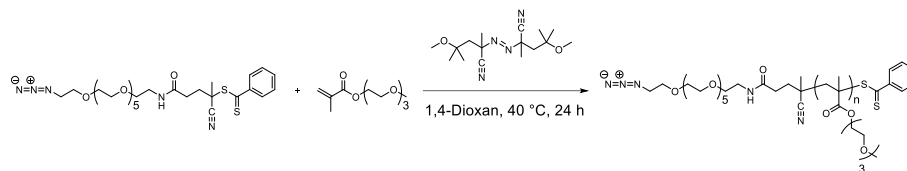


Abbildung 3.6: RAFT-Polymerisation von MEO₃MA mittels Azid-CTA und AMDVN.

Zur Synthese der MEO₃MA Homopolymere wurde eine Lösung des in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Azid-CTAs und MEO₃MA in 1,4-Dioxan bei einer Reaktionstemperatur von 40°C in einer RAFT-Polymerisation umgesetzt. Als Initiator der Reaktion wurde, wie auch in den darauffolgenden Polymerisationsschritten, 2,2'-Azo-di-(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril) (AMDVN) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine äußerst thermosensitive Diazoverbindung, welche schon bei vergleichsweise niedrigen Temperaturen dem homolytischen Radikalzerfall unterworfen ist. So besitzt AMDVN bei einer Temperatur von 30°C eine vergleichbare Zerfalls-Halbwertszeit wie AIBN bei einer Reaktionstemperatur von 80°C.^[159] Durch die niedrige Reaktionstemperatur sollte die Degradation der Azid-Endgruppen des CTAs verhindert werden, gleichzeitig werden somit im weiteren Verlauf der Polymerisation unerwünschte Nebenreaktionen an den Seitengruppen der reaktiven Disulfid-Monomere minimiert. Wenn, wie bei der hier angewandten Herangehensweise, Ether als Lösungsmittel für eine kontrollierte, radikalische Reaktion verwendet werden, muss mit absolutierten und entgasten Lösungsmitteln gearbeitet werden. Ether bilden unter dem Einfluss von Luftsauerstoff mit der Zeit Peroxide, welche bei radikalischen Reaktionen als Co-Initiatoren und Kettenübertragungsagentien reagieren können. Zudem kann etwaig im Lösungsmittel vorhandener Luftsauerstoff in ähnlicher Weise die Reaktion stören. Aus diesem Grund wurde das für die RAFT-Reaktion verwendete 1,4-Dioxan im Vorfeld der Polymerisation frisch über Natrium getrocknet und die jeweils angesetzte Reaktionslösung der RAFT-Synthese wurde nach der Zugabe der Agentien durch zyklisches Einfrieren und Auftauen im Vakuum (engl.: *freeze-pump-thaw degasification*) entgast.

Beim Ansetzen des Reaktionsgemischs wurden CTA und Initiator im Verhältnis von 5:1 vorgelegt. Über den Verlauf mehrerer testweiser Polymerisationen stellte sich heraus, dass sich nach 21-24 h Reaktionszeit ein Umsatz von etwa 60% reproduzierbar einstellte. Aus diesem Grund wurde die Monomer-Äquivalentmenge $e(M_0)$ für die einzelnen Polymerisationen so gewählt, dass der erwünschte Polymerisationsgrad der Homopolymere DP_x jeweils 60% der vorgelegten Monomer-Äquivalente entsprach. Zur Reaktionsverfolgung wurde nach etwa 20 h, und falls notwendig weiter im Abstand von 3-8 h, eine Probe für die Messung eines $^1\text{H-NMRs}$ entnommen. Um ein Eindringen von Sauerstoff über die Kanüle bei der Probenentnahme zu verhindern, wurde das Reaktionsgefäß zuvor mit Argon geflutet und, mittels eines Argon-Vorratsballons eine höherer Gefäßinnendruck erzeugt. Um die Stoffmenge des umgesetzten Monomers mit der Restmenge des verbleibenden Monomers in Verhältnis zu setzen, wurden zur Umsatzkontrolle die Resonanzsignale a und a' miteinander verglichen (siehe Abbildung 3.7).

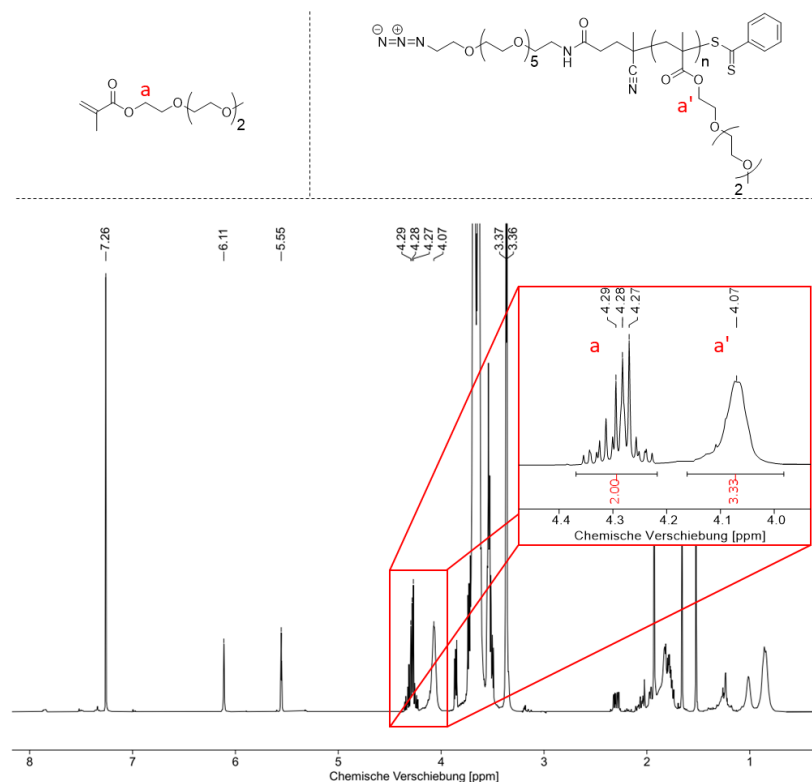


Abbildung 3.7: Umsatz-NMR der Synthese von P1-3

Es handelt sich hierbei um die Signale, welche von der CH_2 -Gruppe in direkter Nachbarschaft zu der Estergruppe im Monomer, beziehungsweise im Polymer, verursacht wurde. Die Summe der Integrale von a und a' entspricht der Menge an Monomer, welche zum Start der Reaktion verfügbar war. Daher ergibt sich der Umsatz P aus dem Quotienten des Signals der Monomereinheiten im Polymer a' und der Summe beider Integralwerte.

$$P = \frac{a'}{a + a'} \quad (3.1)$$

Für Polymer P1-3 (siehe Abbildung 3.7) ergibt sich somit beispielsweise ein Umsatz von 62,5%. Dies entspricht, bei deinem Verhältnis von 75:1 für die initiale Monomer-Menge zur CTA-Menge, einem Polymerisationsgrad DP_x von:

$$DP_x = P \cdot 75 = 0,625 \cdot 75 = 46,875 \approx 47 \quad (3.2)$$

Nach dem Erreichen des erwünschten Polymerisationsgrad wurde das jeweilige Polymer mittels mehrfacher Präzipitation gegen n-Hexan und anschließender Vakuumtrocknung isoliert. Die Charakterisierung der Polymere erfolgte im Anschluss daran mittels $^1\text{H-NMR}$ und DOSY NMR-Spektroskopie. Zudem wurde eine Polymerprobe mittels GPC mit Tetrahydrofuran (THF) als mobile Phase untersucht, um die Größenverteilung der synthetisierten Polymere zu ermitteln (siehe Abbildung 3.8).

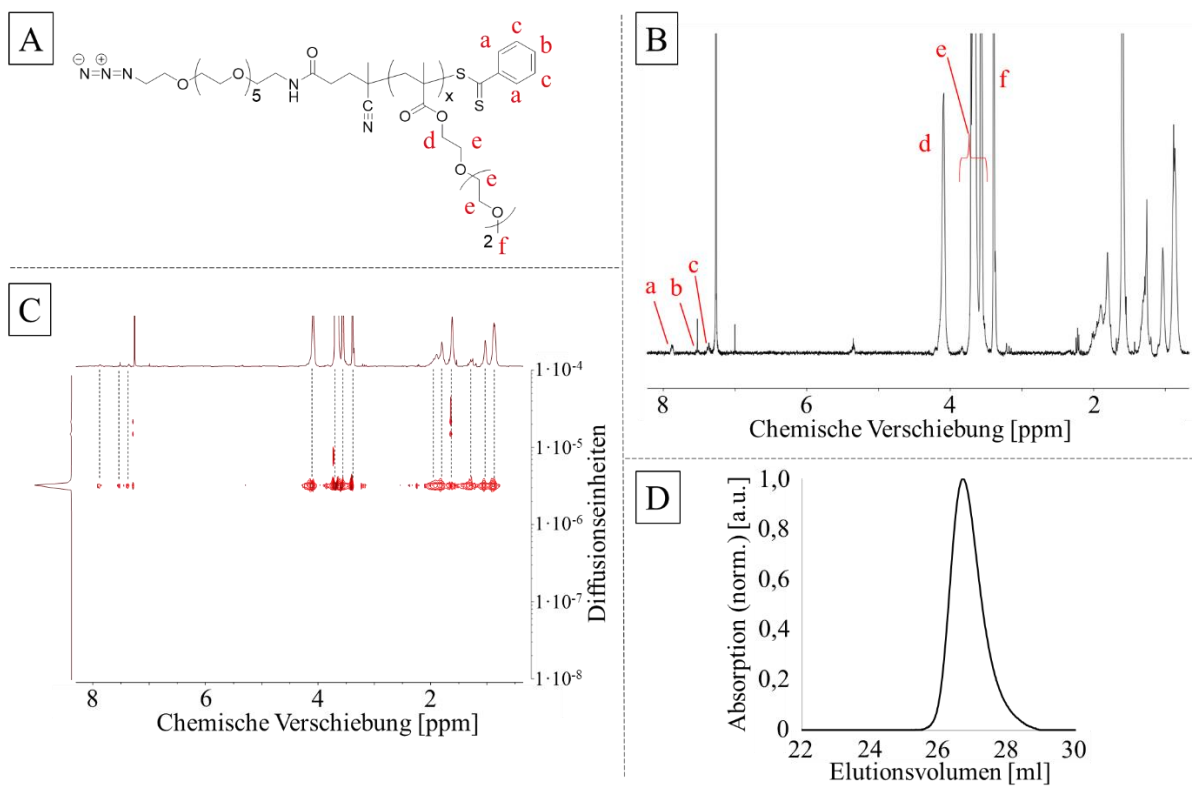


Abbildung 3.8: Charakterisierung der Azid-PEG₆-p(MEO₃MA) Polymere. A: Allgemeine Struktur der Azid-PEG₆-p(MEO₃MA) Polymere mit zugeordneten $^1\text{H-NMR}$ Signalen. B: $^1\text{H-NMR}$ von P1-3 und Zuordnung der NMR-Signale. C: DOSY-NMR von P1-3. D: THF-GPC der Verbindung P1-3.

Bei der Untersuchung der Azid-PEG₆-p(MEO₃MA) Polymere mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie konnten die charakteristischen Signale sowohl der reaktiven Benzothioatgruppe der Polymere als auch der Seitenketten der MEO₃MA-Wiederholungseinheiten zugeordnet werden. Dies wird in der vorangestellten Abbildung anhand des Beispiels von P1-3 veranschaulicht (siehe Abbildung 3.8 A und B). Das Fehlen der beiden charakteristischen Resonanzsignale der geminalen CH₂-Wasserstoffatome der Doppelbindung von MEO₃MA (siehe Abbildung 3.7), welche bei einer chemischen Verschiebung von 5,55 ppm und 6,11 ppm zu finden wären, legt dar, dass der nach der Beendigung der Reaktion übrig

gebliebene Edukt-Überschuss restlos aus dem isolierten Polymer entfernt werden konnte. Durch Vergleich der Integralwerte der ^1H -Signale *a-c*, welche durch die Resonanz der Benzothioat-Wasserstoffatome verursacht wurde, mit den Signalen *d* und *f* der MEO_3MA -Seitenketten, konnte die durchschnittliche Anzahl an MEO_3MA -Wiederholungseinheiten im isolierten Homopolymer ermittelt werden. In der Regel ergaben sich dabei keine nennenswerten Abweichungen zu dem aus der letzten Umsatzkontrolle ermittelten Wert des MEO_3MA -Polymerisationsgrads, wodurch die kernresonanzspektroskopische Untersuchung der Reaktionslösung als probates Mittel zur Prognose des Polymerisationsgrads von MEO_3MA verwendet werden konnte. Durch Aufnahme eines DOSY-NMR Spektrums des Homopolymers (siehe Abbildung 3.8 C) konnten weitere Erkenntnisse gewonnen werden. Da alle charakteristischen Signale des CTAs und der MEO_3MA -Seitenketten auf einer Horizontalen mit eng umgrenzten Diffusionskoeffizienten angeordnet sind, kann geschlossen werden, dass die Polymerisation nach dem RAFT Mechanismus ablief und es nicht zu freier radikalischer Polymerisation kam. In diesem Fall wäre eine Verteilung der Signale über einen größeren Bereich des Diffusionskoeffizienten zu erwarten, da es durch Kettenabbruch- und Kettenübertragungsreaktionen zur Bildung eines Gemischs oligomerer und polymerer Verbindungen gekommen wäre. Durch die Untersuchung einer Polymerprobe mittels Größenausschlusschromatographie wurde zudem die Größenverteilung des Molekulargewichts der Homopolymere bestimmt (siehe Abbildung 3.8 D). Alle untersuchten Polymere wiesen dabei eine enge Molekulargewichtsverteilung auf, die der zu erwartenden Gewichtsverteilung einer kontrollierten radikalischen Polymerisation entsprach. Die gesammelten Ergebnisse der Charakterisierung der Azid- $\text{PEG}_6\text{-p}(\text{MEO}_3\text{MA})$ Homopolymere sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Charakterisierung der $\text{p}(\text{MEO}_3\text{MA})$ Homopolymere

| Polymer | DP_x^a | M_n^b [g/mol] | \mathcal{D}^c |
|----------------|----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| P1-1 | 30 | 7580 | 1,20 |
| P1-2 | 40 | 9900 | 1,17 |
| P1-3 | 47 | 11530 | 1,19 |
| P1-4 | 30 | 7580 | 1,26 |
| P1-5 | 71 | 17100 | 1,24 |

^{a)}Polymerisationsgrad des MEO_3MA Blocks. ^{b)}Zahlenmittel des Molekulargewichts, ermittelt durch NMR-Spektroskopie. ^{c)}Polydispersität der Polymerprobe, ermittelt durch THF-GPC.

Insgesamt kann aus der Untersuchung der Azid- $\text{PEG}_3\text{-p}(\text{MEO}_3\text{MA})$ Polymere geschlossen werden, dass eine Methode etabliert werden konnte, um durch geschickte Wahl des initialen Verhältnisses von Monomer, CTA und der Reaktionszeit Polymerketten spezifischer Länge auf maßgeschneiderte Art und Weise und mit hoher Reproduzierbarkeit zu synthetisieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Polymerisationen dem RAFT-Mechanismus folgten und Benzothioat-funktionalisierte Polymeren mit eng umgrenzter Verteilung des Molekulargewichts generierten. In der folgenden, zweiten Polymersynthese wurden die Azid- $\text{PEG}_3\text{-p}(\text{MEO}_3\text{MA})$ Homopolymere als Makroskopische CTA-Moleküle (Makro-CTAs) für die Synthese der Diblock-Copolymere eingesetzt. Zur Ansatzberechnung

wurden dabei jeweils die mittleren Molekularmassen berücksichtigt, welche aus der Charakterisierung mittels Kernresonanzspektroskopie ermittelt wurden.

Als zweites Monomer wurde PDSM eingesetzt, welches zuvor in einer zweistufigen Synthese (siehe Kapitel 3.3.3) dargestellt wurde. Auf Grund der reaktiven Disulfid-Seitenkette wurde PDSM schon in einigen anderen Polymersystemen als funktionelle Einheit zum Anbinden kleiner Moleküle, oder zur Vernetzung von Polymerketten eingesetzt. Zwar sind für verschiedene Disulfide Kettenübertragungsreaktionen in radikalischen Polymerisationssystemen bekannt,^[167] durch den kontrollierten Charakter der RAFT-Reaktion und eine niedrige Reaktionstemperatur sollte diese Nebenreaktion bei der Polymerisation von PDSM vermieden werden.

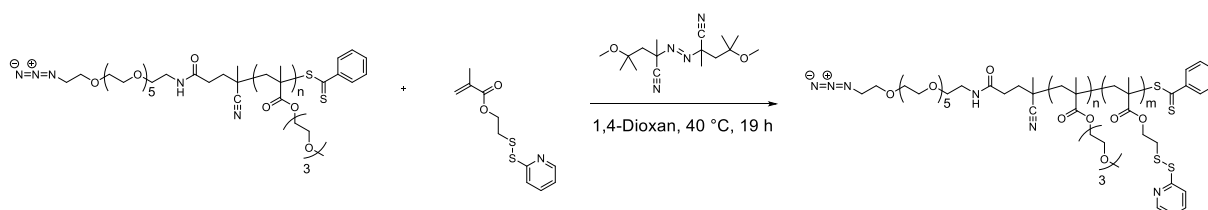


Abbildung 3.9: RAFT-Polymerisation von PDSM mittels Azid-p(MEO₃MA) Makro-CTA und AMDVN.

Wie zuvor bei der Synthese der p(MEO₃MA) Homopolymere beschrieben, wurde mit frisch destilliertem 1,4-Dioxan als Lösungsmittel für die Reaktanden gearbeitet. Auch hier wurden der verwendete (Makro-)CTA und der Initiator AMDVN im Verhältnis von 5:1 in der RAFT Synthese eingesetzt und die Reaktionslösung wurde durch *freeze-pump-thaw degasification* von Gasen befreit, die den Ablauf der RAFT-Reaktion stören könnten. Auf Grund von initialen Tests zur Homo- und Block-Copolymerisation von PDSM wurde ermittelt, dass im Verlauf von 16-19 h ein Umsatz von etwa 40% erreicht werden konnte, bevor das Fortschreiten der Reaktion stagnierte. Daher wurden die Ansätze so berechnet, dass nach etwa 19 h ein Polymerisationsgrad zu erwarten war, welcher 40 % des Monomerumsatzes entsprach (siehe Formel (3.1)).

Nachdem die angestrebte Reaktionszeit abgelaufen war, wurde jeweils eine Probe zur Aufnahme eines ¹H-NMRs entnommen (siehe Abbildung 3.10). Dabei wurde, wie zuvor beschrieben, versucht das Eindringen von Luftsauerstoff zu vermeiden.

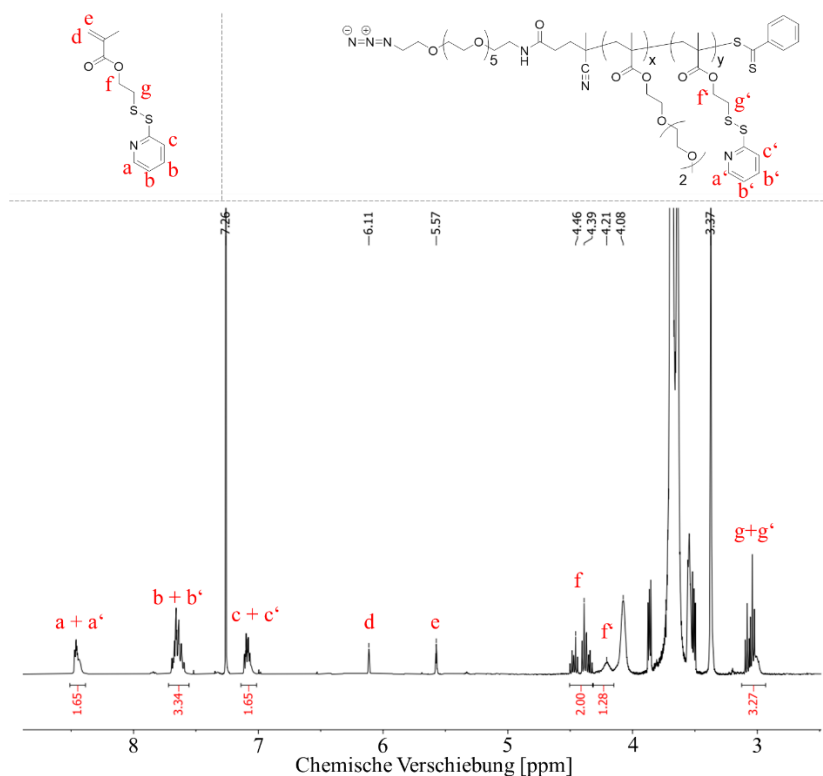


Abbildung 3.10: Umsatz-NMR der Synthese von P2-3.

Auch hier grenzen sich die ^1H -Resonanzsignale, welche durch die CH_2 -Gruppen neben den verbrückenden Ester-Sauerstoffatomen des Monomers (f) und der PDSM-Wiederholungseinheit (f') verursacht wurden, klar voneinander ab. Zusätzlich erkennt man, dass sich die Signale a , b , c und g des Monomers stark mit den ihnen entsprechenden Signalen der PDSM-Wiederholungseinheiten überlagern. Als Strategie zur Umsatzberechnung wurde daher auf den Integralwert des Resonanzsignals f normiert, welcher zwei Wasserstoffatomen entspricht. Der Beitrag der verbliebenen Monomereinheiten zum Integralwert der anderen, stark überlagerten Signale entspricht nun der Anzahl der homologen Wasserstoffatome der jeweiligen Struktureinheit. Somit lässt sich der Wert P für den Umsatz der Reaktion aus der Summe der Beiträge des Integralwerts der jeweiligen Struktureinheit der Wiederholungseinheit zur Summe aller Integrale der Signale von Monomer und Wiederholungseinheit bestimmen. Am Beispiel des Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)- b -p(PDSM) Diblock-Copolymers P2-3, welches auf dem Azid-PEG₆-p(MEO₃MA) Homopolymer P1-3 basiert (siehe Abbildung 3.10) ergibt sich daher ein Umsatz von:

$$P = \frac{I(a + a') - I(a) + I(b + b') - I(b) + I(c + c') - I(c) + I(f') + I(g + g') - I(g)}{I(a + a') + I(b + b') + I(c + c') + I(f') + I(f) + I(g + g')} \quad (3.3)$$

$$P = \frac{1,65 - 1,00 + 3,34 - 2,00 + 1,65 - 1,00 + 1,28 + 3,27 - 2,00}{1,65 + 3,34 + 1,65 + 1,28 + 2,00 + 3,27} = \frac{4,19}{13,19} \approx 0,37$$

Sobald der erwünschte Umsatz erzielt wurde, wurde die RAFT-Polymerisation abgebrochen. Die p(MEO₃MA)- b -p(PDSM) Diblock-Copolymere wurden durch mehrfache Präzipitation gegen n-Hexan

und mehrtägige Trocknung im Hochvakuum isoliert. Zur Bestimmung des Polymerisationsgrads des PDSM-Blocks und zur weiteren Charakterisierung der Diblock-Copolymere wurden jeweils $^1\text{H-NMR}$ und DOSY-NMR Spektren aufgenommen. Zusätzlich wurde mittels THF-GPC die Molekulargewichtsverteilung der Polymere ermittelt (siehe Abbildung 3.11).

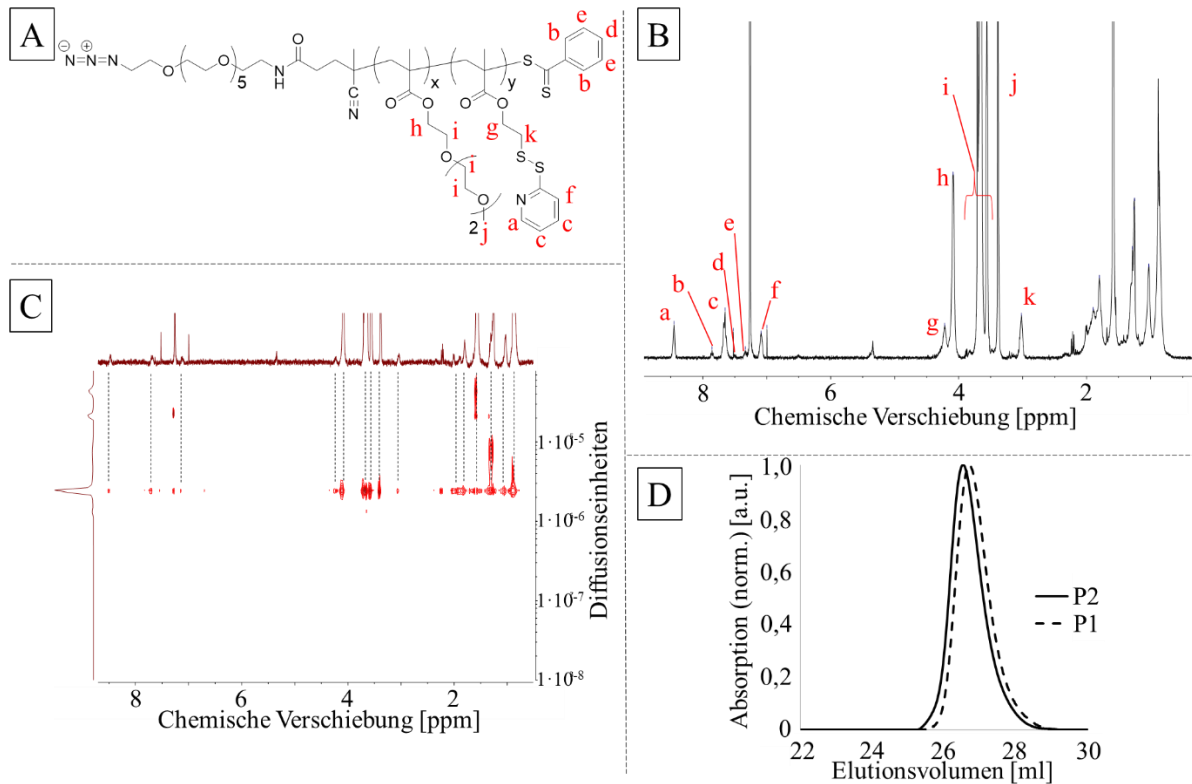


Abbildung 3.11: Charakterisierung der Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM) Diblock-Copolymere. A: Allgemeine Struktur der Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM) Diblock-Copolymere mit Zuordnung der entsprechenden $^1\text{H-NMR}$ Signale. B: $^1\text{H-NMR}$ des Polymers P2-3 mit zugeordneten NMR-Signalen. C: DOSY-NMR von P2-3. D: THF-GPC der Verbindung P2-3 (P2) im Vergleich zur Edukt-Verbindung P1-3 (P1).

Um die Anzahl der PDSM Wiederholungseinheiten aus dem $^1\text{H-NMR}$ des jeweiligen Diblock-Copolymers zu berechnen, wurde das Signal *c* der terminalen Methoxy-CH₃-Gruppe der MEO₃MA-Seitenfunktionen normiert (siehe Abbildung 3.11 B). Dabei wurde der Integralwert so gewählt, dass er der Anzahl der Methoxy-Wasserstoffatome entsprach, die anhand der errechneten MEO₃MA Wiederholungseinheiten des zur Synthese des Diblock-Copolymers verwendeten Azid-PEG₆-p(MEO₃MA) Homopolymers zu erwarten wäre. Bei allen synthetisierten Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM) Diblock-Copolymeren entsprach der aus den $^1\text{H-NMR}$ Signalen *a*, *c*, *f*, *g* und *h* errechnete Polymerisationsgrad des PDSM-Blocks dem aus dem $^1\text{H-NMR}$ der Reaktionslösung berechneten Umsatz. Dies zeigt, dass ähnlich wie bei der Homopolymerisation von MEO₃MA die Umsatzkontrolle sehr gut zur Prognose der finalen Kettenlänge des Polymerblocks verwendet werden konnte. Durch das Fehlen der charakteristischen Resonanzsignale der geminalen Wasserstoffatome der Doppelbindung von PDSM, die typischerweise bei einer chemischen Verschiebung von 5,56 ppm und 6,11 ppm zu beobachten wären, kann geschlossen werden, dass die verbleibende Restmenge des Methacrylat-

Monomers auch in der zweiten Synthesestufe vollständig vom Produktpolymer getrennt werden konnte. Durch die Aufnahme eines DOSY-NMR Spektrums wurden weitere Einblicke in die Produktzusammensetzung gewonnen. Am Beispiel des Diblock-Copolymers P2-3 (siehe Abbildung 3.11 C) zeigt sich, dass sich alle Wasserstoffresonanzsignale, welche den H-Atomen des MEO₃MA-Blocks und des PDSM-Blocks zugeordnet werden können, auf einer Horizontalen mit sehr eng umgrenzter Verteilung des Diffusionskoeffizienten angeordnet sind. Zusätzlich ist keine zweite Signalfraktion erkennbar, die ausschließlich durch die Resonanz von PDSM-Wasserstoffatomen verursacht wurde. Dies lässt darauf rückschließen, dass die Reaktion vollständig nach dem Mechanismus einer RAFT-Polymerisation ablief und es weder zur Homopolymerisation von PDSM kam noch zu detektierbarem Auftreten von Kettenabbruch- und Kettenübertragungsreaktionen. Wie zuvor bei der Charakterisierung der Azid-PEG₆-p(MEO₃MA) Homopolymere beschrieben, wäre bei diesem Fall eine Verteilung der Polymersignale über einen größeren Bereich des Diffusionskoeffizienten zu erwarten gewesen. Weiterhin wurden die synthetisierten Diblock-Copolymere mittels Größenausschlusschromatographie untersucht, um die Größenverteilung des Molekulargewichts des jeweiligen Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM) Copolymers zu ermitteln. Anhand der in Abbildung 3.11 D beispielhaft abgebildeten Überlagerung der THF-GPC Messdaten der Polymere P2-3 (P2) und P1-3 (P1) lässt sich erkennen, dass es durch das Anfügen des zweiten Polymerblocks zu einer Verschiebung des Kurvenmaximums zu einem niedrigeren Elutionsvolumen kam. Diese Beobachtung hängt mit der Zunahme der Polymerkette und einem daraus resultierenden, größeren Hydrodynamischen Volumen des Polymerknäuels zusammen. Hierdurch kommt es zu einer früheren Elution der Polymerprobe. Im Allgemeinen muss jedoch beachtet werden, dass abseits der Kettenlänge zwei weitere Faktoren das Knäuelverhalten des Polymers beeinflussen. Zum einen spielt die Flexibilität des Polymerrückgrats und der Seitenketten eine Rolle. Raumnehmende Substituenten und Bindungen mit partiellem Doppelbindungscharakter, wie zum Beispiel häufig bei Polypeptiden zu beobachten, können hier die Anzahl an Freiheitsgraden reduzieren und zu einem eher voluminösen Polymerknäuel führen. Zum anderen spielt, gerade bei Block-Copolymeren, die Polarität der Seitenkettenfunktionen der Polymerblöcke eine Rolle. So kann es bei amphiphilen Block-Copolymeren zu einer intramolekularen Phasenseparation zwischen dem hydrophilen und dem hydrophoben Block kommen, was zu einer zusätzlichen Erhöhung des hydrodynamischen Volumens führen kann. Aus diesem Grund muss die GPC-Analyse von Block-Copolymer-Systemen stets kritisch betrachtet werden. In Systemen, bei denen lediglich geringe Einflüsse dieser zwei zusätzlichen Faktoren angenommen werden können, liefern die ermittelten Molekulargewichte und der PDI als Maß für die Größenverteilung jedoch aussagekräftige Einblicke in die Polymereigenschaften. Da die Synthetisierten Polymersysteme jeweils nur mit einem vergleichbar kleinen Massenanteil an PDSM copolymerisiert wurden, kann angenommen werden, dass die THF-GPC ausreichend gute Daten für eine qualitative Beschreibung der Polymerprodukte liefern kann. Die gesammelten Daten zur Charakterisierung der Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM) Diblock-Copolymere sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.2: Charakterisierung der Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM) Diblock-Copolymere.

| Polymer | DP_x^a | DP_y^b | M_n^c [g/mol] | \mathcal{D}^d |
|---------|----------|----------|--------------------|-----------------|
| P2-1 | 30 | 4 | 8600 | 1,18 |
| P2-2 | 40 | 4 | 10925 | 1,19 |
| P2-3 | 47 | 10 | 14080 | 1,18 |
| P2-4 | 30 | 6 | 9620 | 1,15 |
| P2-5 | 71 | 11 | 19910 | 1,13 |

^a) Polymerisationsgrad des MEO₃MA Blocks. ^b) Polymerisationsgrad des PDSM Blocks. ^c) Zahlenmittel des Molekulargewichts, ermittelt durch NMR-Spektroskopie. ^d) Polydispersität der Polymerprobe, ermittelt durch THF-GPC.

Die Ergebnisse der Diblock-Copolymersynthese zeigen, dass es möglich war, den zuvor synthetisierten Makro-CTA erfolgreich in einer RAFT-Polymerisation einzusetzen. Dabei konnte belegt werden, dass auch der zweite Polymerblock über die Wahl des Verhältnisses von CTA zu Monomer und die Wahl der Reaktionszeit mit hoher Kontrolle über den Polymerisationsgrad des PDSM-Blocks hergestellt werden konnte. Alle Polymere verfügten dabei über eine sehr enge Verteilung des Molekulargewichts.

Die synthetisierten Diblock-Copolymere wurden ihrerseits wieder als makro-CTA Moleküle in der RAFT-Polymerisation von DMAEMA eingesetzt. Der dritte Polymerblock, bestehend aus Wiederholungseinheiten mit einem tertiären Amin in der Seitenkette, sollten als einfaches Modellsystem, erste Aufschlüsse über die Eignung des Triblock-Copolymersystems zur Komplexierung von Plasmid-DNA liefern. Auf Grund der Azid-Endgruppen und der PDSM-Seitengruppen wurde die RAFT-Synthese ebenfalls mit AMDVN als Initiator und bei niedrigen Reaktionstemperaturen durchgeführt, um unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden.

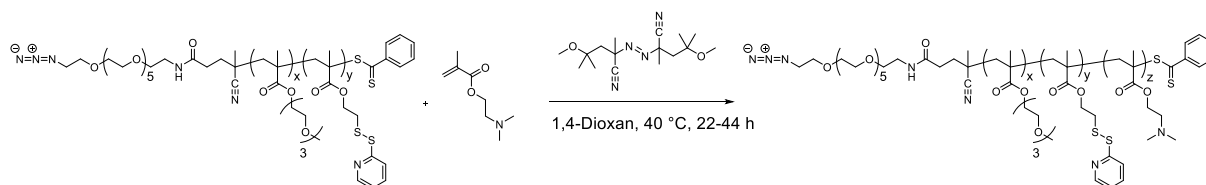


Abbildung 3.12: RAFT-Polymerisation von DMAEMA mittels Azid-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM) Makro-CTA und AMDVN.

Wie bei den beiden zuvor durchgeführten Reaktionsstufen wurde die Polymerisation mit frisch destilliertem 1,4-Dioxan als Lösungsmittel für die Edukte durchgeführt. Die Reaktionslösung wurde mittels *freeze-pump-thaw degasification* entgast. Die Ansätze der RAFT-Polymerisationen wurden so gewählt, dass nach etwa 24 h Reaktionszeit ein Monomerumsatz von etwa 50% erzielt wurde. Zur Reaktionskontrolle wurde, wie zuvor beschrieben, das Reaktionsgefäß mit Argon belüftet. Durch die Messung eines ¹H-NMR Spektrums konnte anschließend jeweils der Umsatz bestimmt werden (siehe Abbildung 3.13).

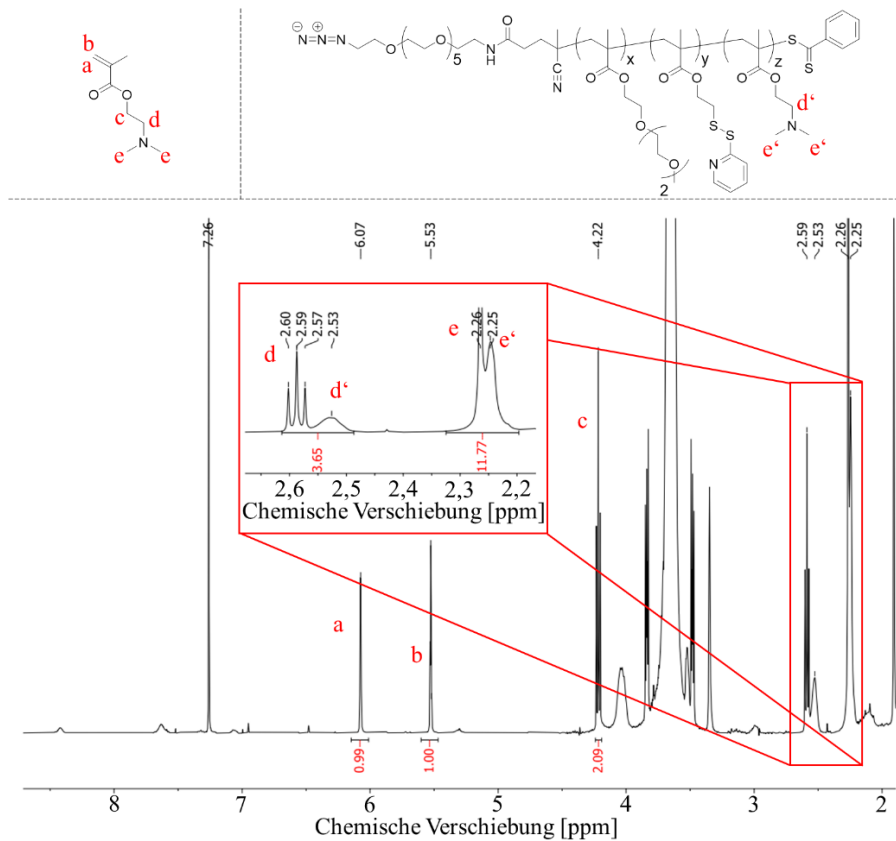


Abbildung 3.13: Umsatz-NMR der Synthese von P3-3.

Ähnlich wie bei den beiden vorangegangenen Polymerisations-Reaktionen, können bei der RAFT-Polymerisation von DMAEMA ^1H -Resonanzsignale des Monomers und charakteristische Signale der Wiederholungseinheit zur Berechnung des Umsatzes benutzt werden. Hierfür eignen sich vor Allem die Resonanzsignale d und d' der CH_2 -Gruppe sowie e und e' der beiden CH_3 -Gruppen, welche an das tertiäre Stickstoffatom gebunden sind. Zur Bestimmung des Umsatzes wurde das mittlere Verhältnis der Integralwerte der Signale d' und e' zur Summe der Signale d , d' , e und e' gebildet. Da die Resonanzsignale der jeweiligen Wasserstoffatome des Monomers und der Wiederholungseinheit starker Überlagerung unterworfen sind, wurde durch vorherige Signalnormierung auf den Resonanzbeitrag des Monomers ein Integralwert von $I(d) = 2$ und $I(e) = 6$ angenommen. Am Beispiel des Polymers P3-3, welches durch RAFT-Polymerisation von P2-3 mit DMAEMA erhalten wurde, ergibt sich somit ein Umsatz von:

$$P = \frac{I(d') + I(e')}{I(d) + I(d') + I(e) + I(e')} = \frac{1,65 + 5,77}{3,65 + 11,77} \approx 0,48 \quad (3.4)$$

Die Reaktion wurde jeweils fortgeführt, bis der erwünschte Umsatz von etwa 50% erzielt werden konnte. Durch mehrmalige Fällung gegen n-Hexan und mehrtägige Trocknung im Hochvakuum, wurde das Triblock-Copolymer erhalten. Die weitere Charakterisierung der synthetisierten Triblock-Copolymere erfolgte mittels NMR-Spektroskopie und THF-GPC (siehe Abbildung 3.14).

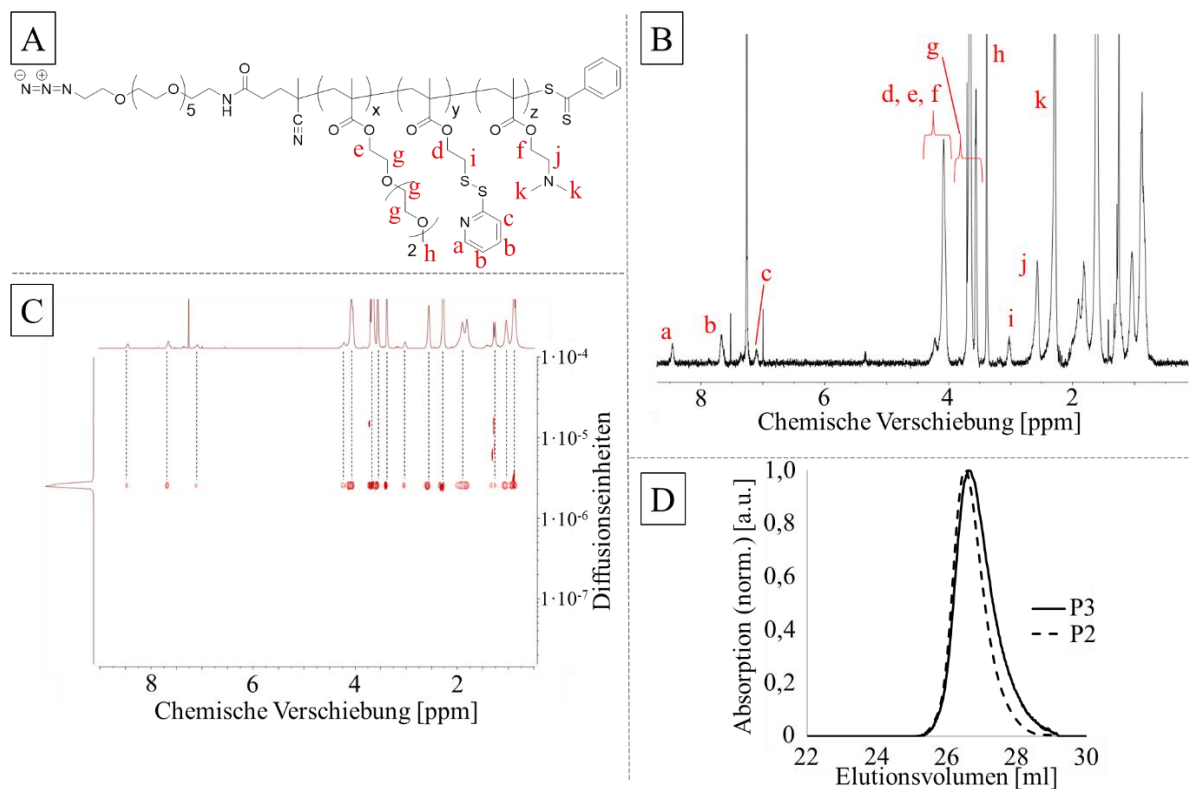


Abbildung 3.14: Charakterisierung der Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMAEMA) Triblock-Copolymere. A: Allgemeine Struktur der Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMAEMA) Triblock-Copolymere mit Zuordnung der entsprechenden ¹H-NMR Signale. B: ¹H-NMR der Verbindung P3-4 mit zugeordneten NMR-Signalen. C: DOSY-NMR von P3-4. D: THF-GPC des Polymers P3-4 (P3) im Vergleich zur entsprechenden Edukt-Verbindung P2-3 (P2).

Die exakte Kettenlänge des dritten Polymerblocks wurde durch die Analyse des ¹H-NMR Spektrums des jeweiligen Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMAEMA) Triblock-Copolymers bestimmt (siehe Abbildung 3.14 A und B). Hierzu wurde zunächst jeweils das Integral des Resonanzsignals *h*, welches den Methoxy-Wasserstoffatomen der MEO₃MA-Wiederholungseinheiten zugeordnet werden kann, auf den Integralwert normiert, der bei der Charakterisierung des entsprechenden Azid-PEG₆-p(MEO₃MA) berechnet wurde. Diese Vorgehensweise erwies sich als sehr zuverlässig, da auf Grund des teilweise großen Verhältnisses zwischen Gesamtzahl an resonanzfähigen ¹H-Atomen und der Anzahl an Wasserstoffatomen der reaktiven RAFT-Endgruppe, eine quantitative Endgruppenanalyse im Rahmen der Messgenauigkeit der Methode nicht mehr möglich war. Bei der Integration der weiteren, bereits zugeordneten Signale des ersten und zweiten Polymerblocks zeigte sich, dass es zu keinen signifikanten Abweichungen der ermittelten Integralwerte von den Erwartungswerten kam, die aus der Charakterisierung des Diblock-Copolymers erhalten wurden. Hieraus kann geschlossen werden, dass es während der dritten RAFT-Polymerisationsstufe zu keinen detektierbaren Nebenreaktionen an den PDSM Seitengruppen kam, da es andernfalls zu einer merklichen Abweichung der Integralwerte der Resonanzsignale der aromatischen PDSM-Wasserstoffatome gekommen wäre. Da sich die Signale *d*, *e*, und *f*, welche durch die Resonanz der ¹H-Atome der CH₂-Gruppen in Nachbarschaft der verbrückenden Ester-Sauerstoffatome der jeweiligen Wiederholungseinheiten entstanden, stark überlagern, kann aus dem Integral dieses Signalbereichs nur mit unzureichender Genauigkeit der Polymerisationsgrad des

dritten Polymerblocks bestimmt werden. Ähnlich zu der zuvor beschriebenen Umsatzbestimmung der Reaktion, wurden zur Ermittlung des Polymerisationsgrads die Integralwerte der Signale j und k ermittelt, summiert und durch die Entsprechende Zahl der jeweiligen Wasserstoffatome einer Wiederholungseinheit geteilt. Um weitere Einblicke in die Produktstruktur zu gewinnen, wurde eine Polymerprobe mittels DOSY-NMR Spektroskopie untersucht (siehe Abbildung 3.14 C). Dabei waren die charakteristischen Signale der Seitengruppen der verschiedenen Polymerblöcke stets auf einer Horizontalen mit eng umgrenzter Verteilung des Diffusionskoeffizienten angeordnet. Durch die Abwesenheit von weiteren Signalen, welche DMAEMA zugeordnet werden könnten, kann ausgeschlossen werden, dass es durch freie radikalische Polymerisation zu spontaner Oligomerisierung oder Polymerisation von DMAEMA kam. Die Polymerisation des dritten Polymerblocks ist demnach nach dem RAFT-Mechanismus abgelaufen. Durch die Beschränkung der Signale auf einem eng umgrenzten Bereich des Diffusionskoeffizienten kann zudem abgeleitet werden, dass es in keinem detektierbaren Maßstab zu radikalischen Nebenreaktionen an den PDSM-Seitengruppen kam. In diesem Fall wäre durch Vernetzungsreaktionen oder durch sekundäre freie radikalische Reaktionen eine starke Verbreiterung der Signale über einen größeren Diffusionskoeffizienten-Bereich zu erwarten gewesen. Um die Größenverteilung des Molekulargewichts der Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMAEMA) Triblock-Copolymere zu ermitteln wurden die Polymere über THF-GPC vermessen. Zur Veranschaulichung zeigt dabei Abbildung 3.14 D eine überlagerte Darstellung der Messergebnisse des Triblock-Copolymers P3-4 (P3) und der entsprechenden Diblock-Copolymer Vorstufe P2-3 (P2). Entgegen der naheliegenden Vermutung ist dabei keine Verschiebung der Verteilungskurve zu Werten geringerer Elutionsvolumina zu erkennen, was auf eine Erhöhung des Molekulargewichts und daher geringerer Interaktion mit dem Säulenmaterial und einer folglich früheren Elution hinweisen würde. Es muss beachtet werden, dass es sich bei der Größe, welche bei der Größenausschlusschromatographie für die Auftrennung der heterogenen Probe verantwortlich ist, um das Hydrodynamische Volumen handelt. Polaritätsunterschiede in den Seitenketten von Block-Copolymeren können durch Aggregationsverhalten oder intramolekulare Phasenseparation dazu führen, dass keine Proportionalitätsbeziehung zwischen der Erhöhung des Molekulargewichts im Verlauf der Block-Copolymerisation und der Veränderung des hydrodynamischen Volumens der Polymerketten hergestellt werden kann. Durch das Einbringen von DMAEMA als Komponente mit hydrophoben Eigenschaften scheinen die Polymerketten des Triblock-Copolymers einer dichtere Knäuelkonfiguration in der mobilen Phase des Messsystems (THF) anzunehmen als das entsprechende Diblock-Copolymer. Dies resultiert in einem geringeren hydrodynamischen Volumen, welches folglich zu einer Elution führt, die bei geringeren als den erwartbaren Elutionsvolumina auftritt. Eine Möglichkeit, um Interpretationsfehler der GPC-Daten vorzubeugen, wäre in diesem Fall eine Kalibration des Messsystems auf standardisierte Proben der synthetisierten Triblock-Copolymere. Diese Kalibrierung ist mit Block-Copolymeren im Allgemeinen jedoch nur unter Zugeständnissen großer Fehlertoleranz durchzuführen, da neben der chemischen Natur der jeweiligen Monomerkomponenten, deren prozentualer Anteil einen erheblichen

Einfluss auf das Knäuelverhalten der Block-Copolymere nehmen kann. Entsprechend schwierig gestaltet sich die Kalibration des Messsystems, wenn statt einem Diblock-Copolymer-System ein Triblock-Copolymer-System beachtet werden muss. Nichtsdestotrotz können aus den GPC-Messungen wertvolle qualitative Daten gewonnen werden. Da im idealen Fall bei einer kontrollierten radikalischen Polymerisation geringe Variabilität über den Polymerisationsgrad der einzelnen Ketten bestehen sollte, sollten innerhalb einer Polymerprobe die Unterschiede der Polymer-Knäuelung und damit die Variabilität der Größenverteilung des hydrodynamischen Volumens, recht eingeschränkt sein. Demnach waren, wenn überhaupt, nur geringe zunahmen der Polydispersität der Polymerproben durch die dritte Synthesestufe zu erwarten.

Die jeweiligen Ergebnisse der Charakterisierung der synthetisierten Triblock-Copolymere sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst:

Tabelle 3.3: Charakterisierung der p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMAEMA) Triblock-Copolymere.

| Polymer | DP_x^a | DP_y^b | DP_z^c | M_n^d [g/mol] | \mathcal{D}^e |
|-------------|----------|----------|----------|--------------------|-----------------|
| P3-1 | 30 | 4 | 25 | 12530 | 1,24 |
| P3-2 | 40 | 4 | 11 | 12650 | 1,25 |
| P3-3 | 47 | 10 | 16 | 16600 | 1,19 |
| P3-4 | 47 | 10 | 47 | 21470 | 1,16 |
| P3-5 | 30 | 6 | 35 | 14610 | 1,26 |
| P3-6 | 71 | 11 | 23 | 23530 | 1,18 |

^{a)}Polymerisationsgrad des MEO₃MA Blocks. ^{b)}Polymerisationsgrad des PDSM Blocks. ^{c)}Polymerisationsgrad des DMAEMA Blocks.

^{d)}Zahlenmittel des Molekulargewichts, ermittelt durch NMR-Spektroskopie. ^{e)}Polydispersität der Polymerprobe, ermittelt durch THF-GPC.

Insgesamt kann aus der Charakterisierung der verschiedenen Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMAEMA) Triblock-Copolymere geschlossen werden, dass die zuvor synthetisierten Diblock-Copolymere erfolgreich als CTAs für die Polymerisation des DMAEMA-Blocks verwendet werden konnten. Ein besonderes Augenmerk lag hier auch auf dem Erhalt der reaktiven Disulfid-Seitengruppen des Diblock-Copolymers. Hier weisen die Ergebnisse der NMR-Untersuchungen darauf hin, dass im Rahmen der Messgenauigkeit der Methode kein Verlust der funktionellen Gruppen, oder Nebenreaktionen an selbigen festgestellt werden konnten. Auch in dieser Synthesestufe konnte durch das geschickte Einstellen des Verhältnisses von Monomer und CTA und der Reaktionszeit eine verlässliche und reproduzierbare Syntheseroute zur Darstellung von Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMAEMA) Triblock-Copolymeren etabliert werden.

3.3.5 Deaktivierung der reaktiven CTA-Endgruppe

Im Anschluss an die drei konsekutiven RAFT-Syntheseschritte wurde in einem vierten Reaktionsschritt die reaktive CTA-Endgruppe entfernt. Dies sollte verhindern, dass an der reaktiven Benzothioat-Gruppe unkontrollierten Reaktionen mit Bestandteilen des biologischen Mediums

stattfinden. Zu diesem Zweck wurde das Triblock-Copolymer mit einem großen molaren Überschuss des Initiators AMDVN bei einer Ölbadtemperatur von 40 °C umgesetzt (siehe Abbildung 3.15).

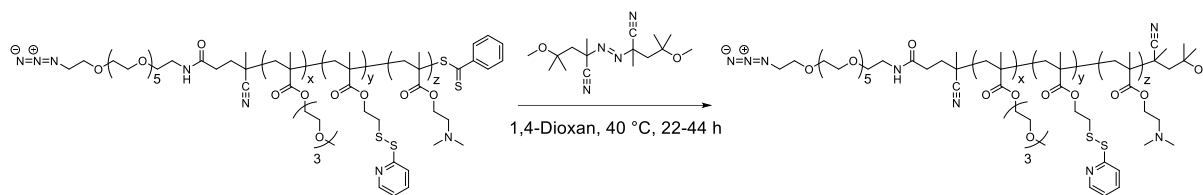


Abbildung 3.15: Deaktivierung der reaktiven CTA-Endgruppe mittels AMDVN

In der Vorbereitung der Reaktion wurde das Polymer in trockenem 1,4-Dioxan gelöst. Nach der Zugabe von AMDVN wurde die Reaktionslösung durch Anwendung des freeze-pump-thaw Verfahrens von allen gelösten Gasen befreit. Die Reaktion wurde so lange durchgeführt, bis sich die hellrote Reaktionslösung vollständig entfärbt hatte. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie überprüft (siehe Abbildung 3.16).

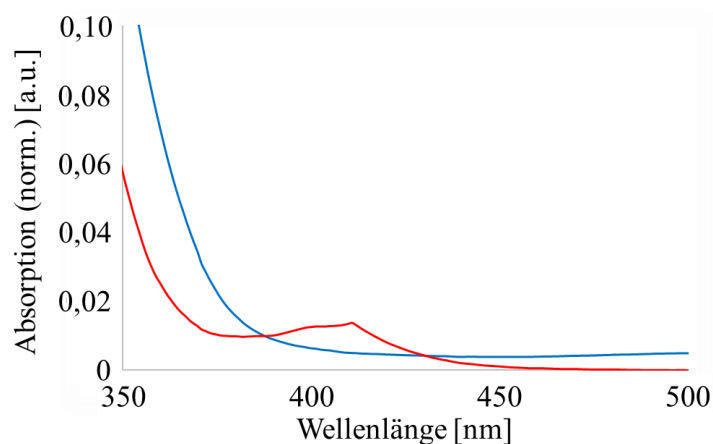


Abbildung 3.16: UV/Vis-Spektroskopische Reaktionskontrolle der Deaktivierung der reaktiven Benzothioatgruppe. Rot: Absorptionsverlauf der spektroskopischen Untersuchung des Triblock-Copolymers P3-4 (aktive Benzothioatgruppe). Blau: Absorptionsverlauf der spektroskopischen Untersuchung des Polymers P4-4 (nach Deaktivierung der Endgruppe).

Durch den fortschreitenden Verlust der Benzothioatgruppe war eine graduelle Abnahme des charakteristischen Absorptionsmaximums bei einer Wellenlänge von 411 nm im Verlauf der Reaktion zu erwarten. Das in diesem Wellenlängenbereich absorbierte Licht wird vom menschlichen Auge als bläulich wahrgenommen, womit die hellrote Farbe des Eduktpolymers erklärt werden kann. Das Produktpolymer weist in diesem Wellenlängenbereich keine messbare Lichtabsorption auf, das Polymer wirkt in Lösung farblos. In der Regel konnte nach einer Reaktionsdauer von 24 bis 48 Stunden kein Absorptionssignal der Benzothioatgruppe im UV/Vis-Spektrum der Reaktionslösung nachgewiesen werden, woraufhin die Synthese beendet wurde. Durch mehrmaliges Fällen gegen n-Hexan und mehrtägiger Trocknung im Hochvakuum wurde das Triblock-Copolymer isoliert. Die weitere Charakterisierung des Polymers erfolgte durch NMR-Spektroskopie und THF-GPC (siehe Abbildung 3.17).

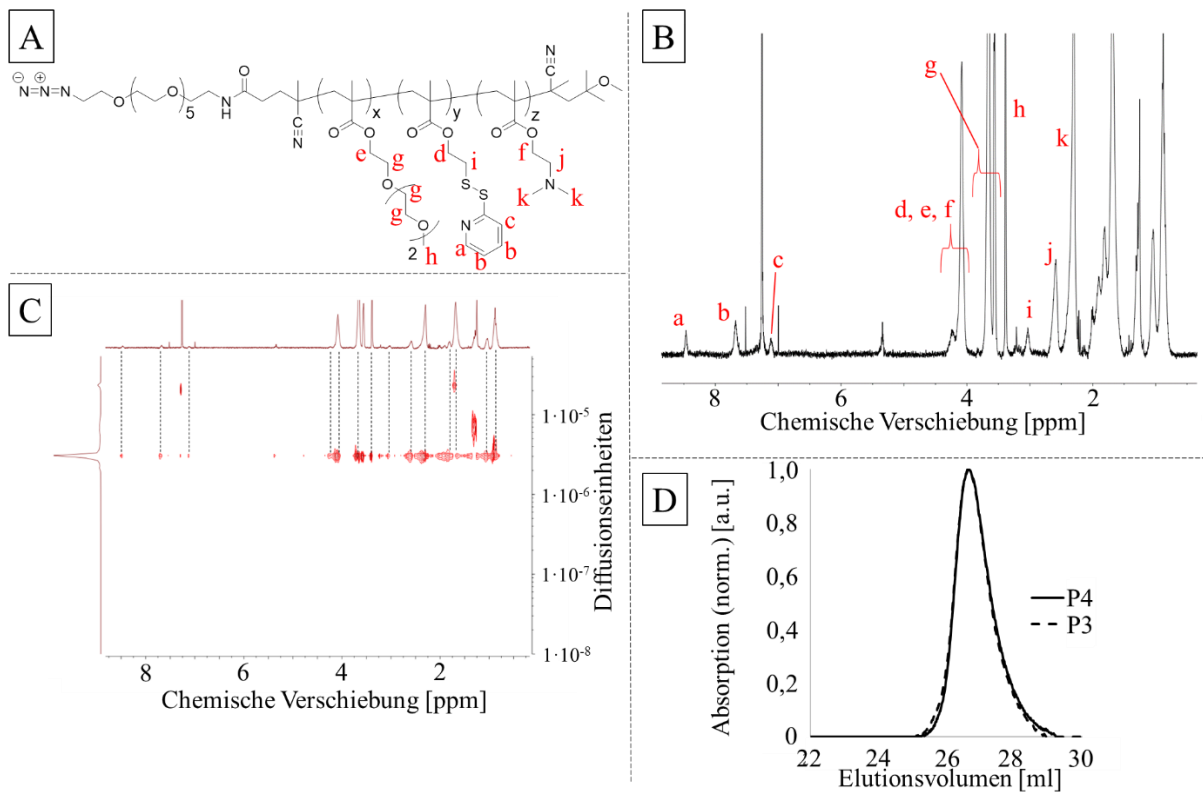


Abbildung 3.17: Charakterisierung der Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMAEMA) Triblock-Copolymere nach der Deaktivierung der reaktiven Benzothioatgruppe. A: Allgemeine Struktur der Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMAEMA) Triblock-Copolymere mit der Zuordnung der entsprechenden ¹H-NMR Signale. B: ¹H-NMR des Polymers P4-4 mit zugeordneten NMR Signalen. C: DOSY-NMR von P4-4. D: THF-GPC der Verbindung P4-4 (P4) im Vergleich zum entsprechenden Eduktpolymer P3-4 (P3).

Wie auch bei der RAFT-Synthese der einzelnen Polymerblöcke wurden die Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMAEMA) Triblock-Copolymere zunächst mittels ¹H-NMR Spektroskopie charakterisiert. Dabei wurde zunächst das Resonanzsignal der Methoxy-Wasserstoffatome *h* (siehe Abbildung 3.17 A und B) der MEO₃MA Seitenketten auf den Wert normiert, der dem erwarteten Integralwert des jeweiligen hydrophilen Polymerblocks entsprach. Im Anschluss daran erfolgte die Zuordnung und Integration der weiteren, charakteristischen Signale der Wasserstoffatome der verschiedenen Seitenketten. Dabei lag ein besonderes Augenmerk darauf, ob es zu signifikanten Abweichungen des Integralverhältnisses zwischen den Resonanzsignalen, welche dem PDSM-Block zugeordnet werden konnten und den Signalen der zwei anderen Polymerblöcke kam. Da bei der Deaktivierung der Benzothioat-Endgruppen eine überstöchiometrische Menge des Radikalinitiators AMDVN eingesetzt wurde, war das Auftreten von radikalischen Angriffen an der reaktiven Disulfidbindung der PDSM-Seitengruppen eine denkbare Nebenreaktion. Der durch Spaltung der Disulfidbindungen bedingte Verlust der Thiopyridin-Gruppe wäre somit in einer deutlichen Abnahme der Integralwerte der Resonanzsignale *a*, *b* und *c* im Vergleich zu dem, aus der Anzahl der Wiederholungseinheiten berechneten Erwartungswert, erkennbar. In der Tat kam es bei einigen der ersten Reaktionsreihen zum anteiligen Verlust von PDSM-Seitenketten. Dieser Umstand deckt sich mit bereits dokumentierter Beobachtung von radikalischen Nebenreaktionen an Disulfid-Molekülen, welche diesen Befund möglicherweise erklären.^[167] Durch Anpassung der experimentellen Vorgehensweise bei

der Reaktion wurde der Verlust der Verlust jedoch stark zurückgedrängt und konnte bei späteren Versuchsreihen nicht mehr im Rahmen der Messgenauigkeit der Kernresonanzspektroskopie nachgewiesen werden. Im Speziellen wurde darauf geachtet, das Lösungsmittel 1,4-Dioxan sorgfältig zu entgasen und die Reaktionszeit möglichst gering zu halten. Es zeigte sich, dass durch beständiges durchspülen der Reaktionslösung mit trockenem Stickstoff die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht werden konnte, was wahrscheinlich auf der Erhöhung der Grenzfläche der Flüssigkeit zum Gasraum beruht und somit einen schnellen Phasenaustausch des bei der thermischen Radikalinitiation freigesetzten, naszierenden Stickstoffs ermöglichte. Zusätzlich wurde die Menge des zugegebenen AMDVN angepasst. So wurde die Äquivalentzahl von AMDVN im Ansatz späterer Synthesen von 30 Äquivalenten auf 15 Äquivalente (im Vergleich zur molaren Menge des eingesetzten Triblock-Copolymers) reduziert und die Zugabe auf mehrere Zeitpunkte verteilt, um die Konzentration an Initiatorradikalen in der Reaktionslösung zu reduzieren. Auf Grund der getroffenen Maßnahmen konnte, durch Integration der Seitenketten-Signale, die Polymerisationsgrade jedes einzelnen Polymerblocks bestätigt werden. Zur erweiterten Charakterisierung der Triblock-Copolymere nach der Deaktivierung der Benzothioatgruppe wurde ebenfalls DOSY-NMR Spektroskopie eingesetzt (siehe Abbildung 3.17 C). Auch hier zeigte sich bei allen Triblock-Copolymeren, dass die charakteristischen Resonanzsignale der Seitenketten alle gemeinsam auf einer Horizontalen angeordnet waren. Zudem ist festzustellen, dass die Resonanzsignale alle in einem sehr eng umgrenzten Bereich des Diffusionskoeffizienten angesiedelt sind. Demnach ist anzunehmen, dass es durch den stöchiometrischen Einsatz von AMDVN bei der Deaktivierung der reaktiven Benzothioat-Endgruppe weder zur Bildung von Addukten oder anderen Nebenreaktionen, welche durch die reaktiven Polymerradikale hervorgerufen werden könnten, kam. Zusätzlich gibt es keinen Hinweis auf die Dimerisierung oder Vernetzung durch Reaktionen der reaktiven Disulfid-Seitenketten des PDSM-Blocks. Alle genannten Fälle hätten zu einer verbreiterten Verteilung der Signale über einen größeren Bereich des Diffusionskoeffizienten geführt, da die größeren Strukturen einen, im Vergleich zum ausgehenden Triblock-Copolymer, deutlich veränderten Diffusionskoeffizienten aufweisen müssten. Aus dieser Feststellung kann die qualitative Erkenntnis getroffen werden, dass unter milden Reaktionsbedingungen eine selektive Deaktivierung der Benzothioatgruppe möglich ist. Diese These wird zusätzlich durch den Vergleich der GPC-Daten des jeweiligen Polymers vor und nach der vierten Reaktionsstufe unterstützt. Beispielhaft wurde in Abbildung 3.17 D der Kurvenverlauf der Absorptionssignale des Polymers P3-4 (P3) mit den Daten der THF-GPC von P4-4 (P4) überlagert. Der nahezu deckungsgleiche Kurvenverlauf unterstreicht, dass im Großen und Ganzen keine grundlegende Veränderung der Zusammensetzung des Polymers stattfand. Di- oder Oligomerisierung von Bestandteilen der Probe kann auf Grund der fehlenden Verschiebung der Absorptionskurve zu niedrigeren Elutionsvolumina ausgeschlossen werden. Dass insgesamt kaum ein Unterschied im Kurvenverlauf zu erkennen ist, ist zudem darin begründet, dass die chemische Natur der Endgruppe nur einen sehr kleinen Einfluss auf das Knäuelverhalten der Triblock-Copolymere haben

sollte und somit nur kaum messbare Veränderungen des Hydrodynamischen Volumens der Polymere erwartet wurden.

Die Zusammenfassung der durch die Charakterisierung der Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMAEMA) Triblock-Copolymere erhobenen Daten wird in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tabelle 3.4: Charakterisierung der Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMAEMA) Triblock-Copolymere nach der Deaktivierung der reaktiven RAFT-Endgruppe.

| Polymer | DP_x^a | DP_y^b | DP_z^c | M_n^d [g/mol] | \mathcal{D}^e |
|-------------|----------|----------|----------|--------------------|-----------------|
| P4-1 | 30 | 4 | 25 | 12520 | 1,24 |
| P4-2 | 40 | 4 | 11 | 12640 | 1,23 |
| P4-3 | 47 | 10 | 16 | 16585 | 1,25 |
| P4-4 | 47 | 10 | 47 | 21460 | 1,25 |
| P4-5 | 30 | 6 | 35 | 16000 | 1,27 |

^{a)}Polymerisationsgrad des MEO₃MA Blocks. ^{b)}Polymerisationsgrad des PDSM Blocks. ^{c)}Polymerisationsgrad des DMAEMA Blocks. ^{d)}Zahlenmittel des Molekulargewichts, ermittelt durch NMR-Spektroskopie. ^{e)}Polydispersität der Polymerprobe, ermittelt durch THF-GPC.

Beim Vergleich der Polydispersitäten, die aus den Daten der Größenausschlusschromatographie gewonnen wurden, mit den entsprechenden Polydispersitäten der Eduktpolymere ist teilweise eine leichte Erhöhung zu registrieren. Da, wie zuvor angeführt, keine Nebenreaktionen durch die radikalische Reaktion und keine Prozesse zur Oligomerisierung der Polymere nachgewiesen werden konnten, könnte dieser Befund durch die veränderte Polymer-Endgruppe erklärt werden. Besonders für den Polymeranteil mit geringer molekularer Masse, könnte die chemische Natur der Endgruppe entscheiden, wie raumgreifend oder kompakt das Polymerknäuel in seiner stabilsten Konformation ausfällt. Durch die neue, deutlich hydrophobere Endgruppe könnten solche Polymere eine kompaktere Konformation eingenommen haben, welche zu einer Reduktion des hydrodynamischen Volumens führte und somit zu einer leichten Verbreiterung der Absorptionskurve der Messung führte. Alles in Allem kann nach der Deaktivierung der reaktiven Benzothioat-Endgruppe der Triblock-Copolymere geschlossen werden, dass über den Verlauf von drei RAFT-Polymerisationsschritten und einer polymeranalogen Umsetzung multifunktionelle Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMAEMA) Triblock Copolymere mit einer überzeugenden Kontrolle über das Molekulare Gewicht der einzelnen Polymerblöcke und mit enger Polydispersitätsverteilung synthetisiert werden konnten. Die synthetisierten Polymere wurden im weiteren Verlauf zunächst auf die Fähigkeit zur Bildung von Polyplexen und den Erhalt und die Adressierbarkeit der Azid-Endgruppen und reaktiven Disulfide, in polymeranalogen Reaktionen untersucht.

3.3.6 Tests zur Selbstassemblierung von pDNA-Polyplexen

Um die Fähigkeit der synthetisierten Triblock-Copolymere zur Bildung von Polyplexen mit pDNA zu überprüfen, wurden zunächst DNA-Retentionsassays durchgeführt. Dazu wurden Mischungen von Polymerproben und Plasmid-DNA hergestellt. Ausschlaggebender Faktor für das Mischungsverhältnis

zwischen Polymer und pDNA war dabei das Verhältnis aus der Anzahl der Aminogruppen des Polymers zur Anzahl der Phosphatgruppen des Phosphatrückgrats der Plasmid-DNA. Dieses Verhältnis wird auch als N/P-Verhältnis genannt und ist ein Maß für die Relation zwischen Polymer- und DNA-Molekülen in der Lösung. Durch die spontane Wechselwirkung der attraktiven ionischen Kräfte sollten sich Polyplexe mit, in Abhängigkeit des jeweiligen N/P-Verhältnisses, unterschiedlichen Anteilen des Polymers bilden. Um die Stabilität der ionischen Wechselwirkung zwischen Polymer und DNA-Rückgrat zu testen, wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese Versuche zur Retention der pDNA durchgeführt. Dazu wurden zunächst Polymerstammlösungen der Konzentration 1 mg/ml in *phosphate buffered saline* (phosphatgepufferte Salzlösung; PBS Puffer) hergestellt. Gleichzeitig wurden Aliquote des Plasmidvektors pGL3-BASIC zu einer Konzentration von jeweils 100 ng/μL in sterilem, entionisierten und RNase- beziehungsweise DNase-freiem Wasser angesetzt. Bei pGL3-BASIC handelt es sich um einen kommerziell erhältlichen, 4818 Basenpaare umfassenden, zirkulären DNA-Vektor, der unter anderem ein Gen trägt, welches für das Enzym Luciferase codiert.^[168] Für die Elektrophorese wurden Polyplex-Proben mit jeweils 100 ng DNA und der, dem erwünschten N/P-Verhältnis entsprechenden, Menge der Polymerlösungen angesetzt. Zur Berechnung der N/P-Verhältnisse wurde zunächst die Anzahl an Phosphateinheiten in 100 ng pDNA über das mittlere molekulare Gewicht der Nucleotide bestimmt. Dies gibt eine hinreichende Näherung an die exakte Anzahl der Phosphatgruppen, da anhand der hohen Anzahl an Basenpaaren angenommen werden kann, dass eine im Mittel nahezu identische Anzahl aller vier Nucleotide vorliegt. Anhand der aus den spektroskopischen Untersuchungen ermittelten Anzahl an Amin-Gruppen der Polymere konnte jeweils die nötige Polymermenge zur Bildung der verschiedenen N/P-Verhältnisse berechnet werden. In der Vorbereitung der Elektrophorese-Experimente wurden Agarosegele mit einem Agarosegehalt von 0,80 % des Gesamtgewichts hergestellt. Dazu wurde die pulverförmige Agarose in Tris-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure Puffer (TBE Puffer) in der Siedehitze der Pufferlösung vollständig aufgelöst. Zur Anfärbung der pDNA wurden 16 μL 10000x GelRed® als fluoreszenter Interkalationsfarbstoff der gelösten Agarose beigelegt. Während der elektrophoretischen Trennung der Probe wirkt durch das elektrische Feld eine Kraft auf die gegensätzlich geladenen ionischen Bestandteile des Polyplexes. Überschreitet diese Kraft die attraktiven ionischen Wechselwirkungen, wird der Polyplex teilweise oder vollständig aufgelöst, wobei die Abschirmung der negativen Ladung des Phosphatrückgrats der DNA aufgehoben wird. Hieraus resultiert eine Bewegung der DNA im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Durch die Wechselwirkung von Interkalationsfarbstoff und pDNA kann die Bewegung der DNA im Gel nachvollzogen werden. Unter dem Licht einer UV-Lampe ruft die Verbindung des Farbstoffs und der DNA eine deutliche, hellrote Fluoreszenz hervor. Liegt eine stabile Verbindung von pDNA und Polymer vor kommt es nicht zur Wechselwirkung zwischen Plasmid-DNA und Interkalationsfarbstoff. In diesem Fall ist keine Bewegung der gefärbten Fluoreszenzbande in Richtung der Anode zu erkennen. Abbildung 3.18 zeigt beispielhaft die Ergebnisse der

elektrophoretischen Untersuchung verschiedener Polyplexe des Polymers P4-1, an denen das experimentelle Vorgehen verdeutlicht werden kann.

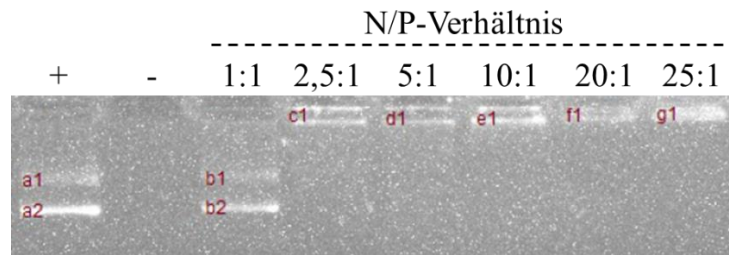


Abbildung 3.18: pDNA-Retentionsassay verschiedener Polyplexe des Polymers P4-1 und pGL3-BASIC pDNA.

Abbildung 3.18 zeigt dabei in zwei Kontrollspuren und 6 Probenspuren die Ergebnisse der Elektrophorese von P4-1-Polyplexen mit einem N/P-Verhältnis zwischen 1:1 und 25:1. Bei der ersten Spur des Agarosegels (+) handelt es sich um die Positivkontrolle. Hier wurde eine Probe aufgetragen, die lediglich 100 ng der pDNA enthielt. In die zweite Spur des Gels (-) wurde als Negativkontrolle eine Probe der PolymerstammLösung aufgetragen, die der Polymermenge beim höchsten untersuchten N/P-Verhältnis (25:1) entsprach. Entsprechend dieser Auftragungen spiegeln Position und Intensität der Banden *a1* und *a2* den Erwartungswert vollständig ungebundener pDNA wider. Dabei kann das Fluoreszenzsignal *a1* der *nicked-circled* Konformation des Plasmids zugeordnet werden. Dabei handelt es sich um eine raumgreifende zirkuläre Konformation des Plasmids, welche beispielsweise bei Einzelstrangbrüchen eingenommen wird. Die Bande *a2* entspricht der linearen Plasmidkonformation, welche etwas weniger voluminös ist und deswegen mit geringerem Widerstand das Gel durchwandern kann. Die fehlenden Fluoreszenzsignale in der Spur der Negativkontrolle verdeutlichen, dass das Polymer keine Wechselwirkung mit dem Interkalationsfarbstoff eingehen kann, welche zu einem falsch positiven Fluoreszenzsignal führen könnte. In die sechs weiteren Geltaschen, welche rechts der Kontrollspuren folgen, wurde jeweils eine Probe der zuvor angesetzten Polyplexlösungen pipettiert. Anhand der Intensität der Banden *b1* und *b2*, welche im Allgemeinen etwas weniger stark scheint als die Intensität der Banden *a1* und *a2*, kann gemutmaßt werden, dass bei einem N/P-Verhältnis von 1:1 zumindest ein untergeordneter Teil der pDNA durch das Polymer gebunden werden konnte. Der Großteil wurde jedoch, wie die freie Plasmid-DNA, durch den Einfluss des elektrischen Feldes in Richtung Anode bewegt. Beim Vergleich der anderen Spuren des Gels kann geschlossen werden, dass ab einem N/P-Verhältnis der Partikelansätze von 2,5:1 eine stabile Bindung der pDNA und damit eine Retention der DNA in den Taschen des Gels erfolgte. Da hier lediglich innerhalb der Geltasche Fluoreszenz sichtbar ist, kann geschlossen werden, dass die negative Teilladung des Phosphatrückgrads vollständig, oder zumindest annähernd vollständig gegenüber dem äußeren Medium abgeschirmt werden konnte.

Insgesamt konnte durch die DNA-Retentionsversuche gezeigt werden, dass alle untersuchten Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMAEMA) Triblock-Copolymere ab einem N/P-Verhältnis von etwa 2:1 Polyplexe bildeten, welche die pDNA während der Elektrophorese stabil einschließen konnten.

Aus diesem Grund wurden für die weiteren Versuche zur Bildung von Polyplexen Ansätze bei einem N/P-Verhältnis von mindestens 3:1 angesetzt, um für die weitere Untersuchung der Polyplexe von einem einheitlichen Wert auszugehen.

3.3.7 Modifikation der reaktiven Disulfide

Um das Konzept der Postpolymerisationsmodifikation der reaktiven PDSM-Disulfidgruppen zu testen, wurde eine Polymerprobe in entgastem 1,4-Dioxan gelöst. Die Probe wurde mit einem Überschuss einer Lösung von 1,6-Hexandithiol (HDT) in 1,4-Dioxan, mit einer Konzentration von 4 mg/ml, versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Polymer durch die Zugabe von n-Hexan gefällt. Die Probe wurde zentrifugiert, um das Polymer am Boden des Gefäßes zu pelletieren. Der Überstand wurde mit einer Pipette aufgenommen und mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht. Zur Reaktionskontrolle wurde eine Probe des eingesetzten Polymers in entgastem 1,4-Dioxan gelöst und ohne weitere Zugaben gefällt und zentrifugiert. Abbildung 3.19 zeigt den Vergleich der UV/Vis-Absorptionsspektren der Zentrifugate der beiden Proben.

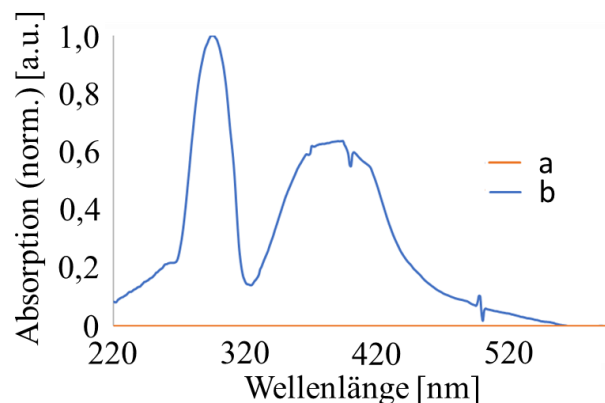


Abbildung 3.19: Modifikationstest der PDSM-Seitengruppen: UV/Vis-Spektrum. a: UV/Vis-Spektrum des Zentrifugats vor der Modifikation mit HDT. b: UV/Vis-Spektrum des Zentrifugats nach der Modifikation mit HDT.

Durch die Reaktion von 1,6-Hexandithiol an der reaktiven Disulfidgruppe der PDSM Seitenkette, kam es zu einem Disulfidaustausch. Infolgedessen wurde 2-Mercaptopyridin als Nebenprodukt freigesetzt, welches anhand seiner charakteristischen Absorptionsmaxima bei 294 nm und 370 nm in der Probe nachgewiesen werden konnte (Lösungsmittel: n-Hexan). Im Zentrifugat des unbehandelten Polymers konnte 2-Mercaptopyridin nicht nachgewiesen werden, was verdeutlicht, dass die Abspaltung des 2-Mercaptopyridins nicht auf Grund oxidativer Prozesse, sondern durch den Disulfid-Austausch mit HDT stattfand. Dieses Experiment zeigt, dass die Triblock-Copolymere prinzipiell durch Zugabe von Sulfiden bei Raumtemperatur an den PDSM-Seitenketten modifiziert werden können. Dies könnte praktisch genutzt werden, um einerseits die Polymere durch Di- oder Oligothiolen zu vernetzen, oder aber Farbstoffmoleküle oder niedermolekulare, Thiol-modifizierte Wirkstoffe kovalent an das Polymer zu binden.

3.3.8 Modifikation der Azid-Endgruppen

Als zweiter konzeptioneller Test wurde überprüft, ob die synthetisierten Triblock-Copolymere in einer Postpolymerisationsmodifikation an der Azid-Endgruppe modifiziert werden können. Um ohne Zusatz von Kupfer als Katalysator eine Cycloaddition von Alkinen an der Azid-Endgruppe der Polymere zu ermöglichen, wurde auf die *strain promoted azide-alkyne cycloaddition* (ringspannungsvermittelte Alkin-Azid-Cycloaddition; SPAAC) zurückgegriffen.^[111] Dabei handelt es sich um eine konzertierte Cycloaddition, bei der der Angriff der Azid-Gruppe an einem Cyclooctinring stattfindet, der auf Grund seiner Substituenten unter einer hohen Ringspannung steht (siehe Abbildung 3.20). Dabei läuft die Cycloaddition nicht regioselektiv ab und führt zur Bildung zweier Produkte mit 1,2,3-Triazolring. Die Bildung des 1,2,3-Triazolrings führt zur Abnahme der Ringspannung des achtegliedrigen Ringsystems. Diese Auflösung der Ringspannung verhindert eine spontane Umkehrung der Cycloaddition. Generell können SPAAC-Reaktionen unter milden Reaktionsbedingungen und mit hohen Umsatzeffizienzen durchgeführt werden.

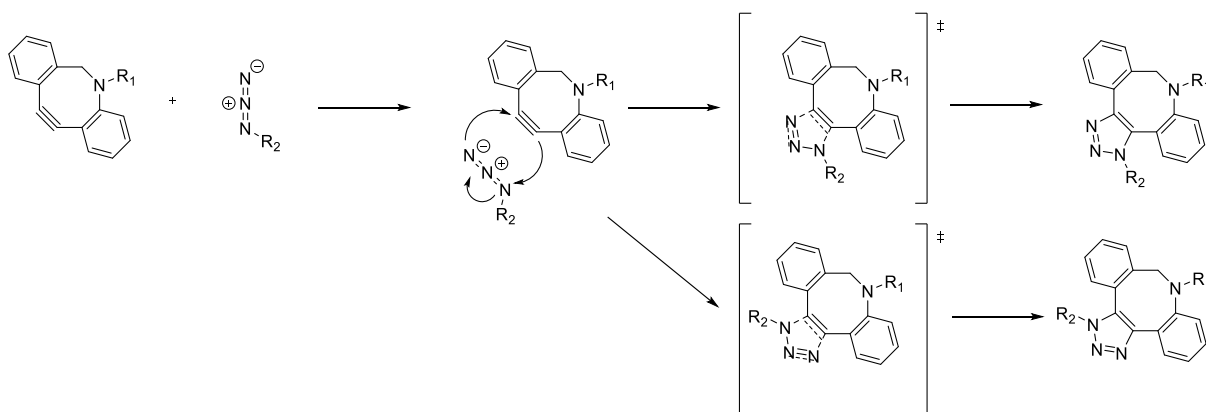


Abbildung 3.20: Allgemeines Reaktionsschema einer *strain promoted azide-alkyne cycloaddition*.

Durch den vergleichsweise geringen molaren Anteil der Azidgruppe am gesamten Molekulargewicht des Polymers, konnten die Azid-Endgruppen nicht mehr eindeutig mittels IR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Um den Erfolg der Postpolymerisationsmodifikation belegen zu können, wurde als DBCO-Komponente der mit DBCO modifizierte Farbstoff IR dye CW800[®] der Firma Lumiprobe verwendet. Dieser besitzt in PBS-Puffer ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 774 nm. Diese Modellreaktion dient zusätzlich ebenfalls als konzeptioneller Beleg für alle anderen Modifikationen der Azid-Endgruppen, um die Möglichkeiten zur Reinigung und Isolation des modifizierten Polymers zu testen. Für die Modifikation der Azidgruppe wurde eine Lösung des Polymers P4-4 in trockenem Dimethylsulfoxid (DMSO) mit einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt. Es folgte die Zugabe einer 1 mg/ml Lösung des Fluoreszenzfarbstoffs IR dye 800CW[®] in trockenem DMSO. Dabei entsprach die zugegebene Farbstoffmenge einer Funktionalisierung von 10% der theoretisch vorhandenen Azid-Gruppen. Die SPAAC Reaktion wurde für 16 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Durch Dialyse gegen entionisiertes Wasser und anschließende Gefriertrocknung wurde das modifizierte Polymer aufgereinigt. Das Dialysat wurde im

Rotationsverdampfer aufkonzentriert und mittels Gefriertrocknung bis zur Trockenheit eingengt. Durch exzessives Rückspülen mit 1 ml entionisiertem Wasser wurden etwaig verbliebene Rückstände freien Farbstoffs aufgenommen. Sowohl das Polymer als auch das Konzentrat des Dialysats wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht (siehe Abbildung 3.21).

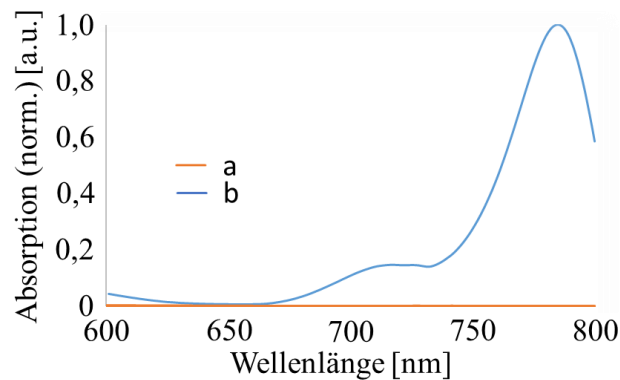


Abbildung 3.21: Modifikation des Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMAEMA) Triblock-Copolymers mit IR dye CW800®. a: UV/Vis-Spektrum des Dialysats. b: UV/Vis-Spektrum des dialysierten Polymers P4-4 nach SPAAC-Reaktion.

Vergleicht man die Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchung der beiden Proben, so ist erkenntlich, dass die Probe des Dialysats (a) keine Absorptionsmaxima in dem für den Farbstoff typischen Absorptionsbereich aufweist. Daher kann geschlussfolgert werden, dass, im Rahmen der Messgenauigkeit, der gesamte Farbstoff kovalent an die Polymerendgruppe gebunden werden konnte. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass mindestens 10% der Azid-Endgruppen für die Modifikation in SPAAC-Reaktionen genutzt werden können. Dies stellt eine, für die später angedachte Nutzung zur Anbindung von Targeting-Molekülen oder Farbstoffen, ausreichende Menge an Azidgruppen dar.

In einem zweiten Schritt galt es nun zu überprüfen, ob die Modifikation in gleicher Weise auch an bereits selbstassemblierten Polyplexen durchgeführt werden kann. Aus diesem Grund wurde eine Polyplexprobe, welche aus dem Polymer P4-1 und pGL3-BASIC (N/P = 3) formuliert wurde, auf die im vorangegangenen Abschnitt beschriebene Weise mit dem Fluoreszenzfarbstoff IR dye 800CW® modifiziert. Die Aufreinigung erfolgte hier jedoch durch mehrere konsekutive Zentrifugationsschritte durch die Membran eines Spinfilters mit einer Ausschlussgröße von 10000 g/mol (Amicon® Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheit, Ultracel-10 *regenerated cellulose membrane*; AMICON). Dabei wurden die Zentrifugate gesammelt und mittels Gefriertrocknung bis zur Trockenheit aufkonzentriert, im Anschluss wurde der Kolben mit 1 ml entionisiertem Wasser gespült. Durch UV/Vis-Spektroskopie wurden Proben der Polyplex-Lösung und des konzentrierten Filtrats verglichen (siehe Abbildung 3.22).

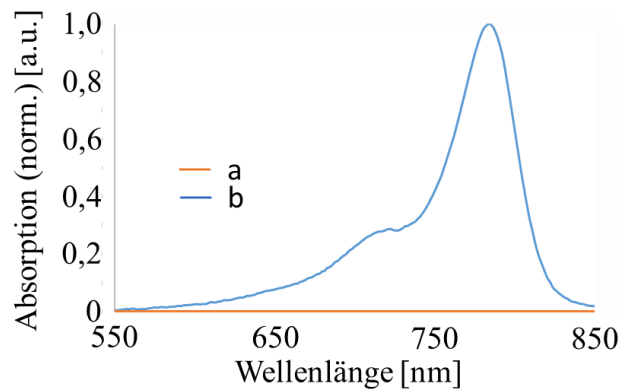


Abbildung 3.22: Modifikation von P4-1 pDNA Polyplexen mit IR dye CW800®. a: UV/Vis-Spektrum des Filtrats. b: UV/Vis-Spektrum des modifizierten P4-1 pDNA Polyplex.

Wie bei der Modifikation des freien Polymers konnten im Konzentrat des Filtrats (*a*) keine Reste des Fluoreszenzfarbstoffs mittels UV/Vis-Spektroskopie detektiert werden. Die Messung des Filtrerrückstands zeigt jedoch die typischen Absorptionssignale des Fluoreszenzfarbstoffs IR dye CW800®. Daraus kann geschlossen werden, dass bei der Modifikation der Polyplexe, wie auch zuvor bei der Modifikation des freien Triblock-Copolymers, mindestens 10% der Azid-Endgruppen für SPAAC-Reaktionen zugänglich sind. Im Prinzip können somit diverse polymeranaloge Umsetzungen zur kovalenten Anbindung von Farbstoffen oder Targeting-Agentien über konzertierte Alkin-Azid Cycloadditionen mittels DBCO-Substituenten an den pDNA-Polyplexen durchgeführt werden. Der Vorteil liegt hier bei milden Reaktionsbedingungen und der Möglichkeit zur einfachen Aufarbeitung der modifizierten Polyplexe.

3.3.9 Dynamische Lichtstreuung und Zeta-Potential Messungen

Um die Fähigkeit der Polymere zur Bildung von Polyplexen weiter zu untersuchen, wurden die Größe der Polyplexe und deren Oberflächenpotential über Dynamische Lichtstreuung und Messung des Zeta-Potentials charakterisiert. Hierfür wurden Polyplexe mit pGL3-BASIC Plasmid-DNA in einer 10 mmol/l NaCl-Lösung synthetisiert. Dabei wurden pro Probe jeweils 3 µg DNA eingesetzt. Da bei den DNA-Retentionsuntersuchungen alle Polymere bei einem N/P-Verhältnis von über 2,5:1 die pGL3-BASIC pDNA stabil binden konnten, wurde für die Untersuchungen mittels dynamischer Lichtstreuung und für die Messungen des Zeta-Potentials ein N/P-Verhältnis von 3:1 für das Ansetzen der Polyplexe gewählt. Um den Einfluss der Vernetzung der Polymere auf die Größe der Polyplexe zu untersuchen, wurden zusätzlich Proben der Jeweiligen Polyplexe mit HDT inkubiert und somit über die PDSM-Seitengruppen vernetzt. Vor der Jeweiligen Messung wurden die Polyplexproben zunächst mit Hilfe eines Spritzenfilters mit GHP-Membran (Porenweite von 0,45 µm) von Staub befreit. Die Messung der dynamischen Lichtstreuung erfolgte in Einmal-Küvetten aus Polystyrol. Die Ergebnisse für die Messung des mittleren hydrodynamischen Durchmessers verschiedener Polyplexe der Triblock-Copolymere P4-1, P4-2 und P4-4 sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Tabelle 3.5: Größenbestimmung der Polyplexe mittels dynamischer Lichtstreuung.

| Polymer | Unvernetzte Polyplexe ^a | | Vernetzte Polyplexe ^b | |
|-------------------------|---|----------------------|---|----------------------|
| | Mittlerer hydrodynamischer Durchmesser [nm] | Mittlerer <i>PDI</i> | Mittlerer hydrodynamischer Durchmesser [nm] | Mittlerer <i>PDI</i> |
| P4-1 | 64,4 | 0,153 | 59,2 | 0,139 |
| P4-2^c | 97,9 | 0,239 | 103,4 | 0,235 |
| P4-4 | 70,3 | 0,239 | 74,4 | 0,253 |

^aUnvernetzte Polyplexes wurden mit einem N/P-Verhältnis von 3:1 synthetisiert. ^bVernetzte Polyplexe wurden mit einem N/P-Verhältnis von 3:1 synthetisiert. Es wurde eine HDT-Menge zugegeben, die einer theoretischen Vernetzungsdichte von 100% entsprach.

Alle Polyplexe, welche mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht wurden, wiesen einen sehr geringen hydrodynamischen Durchmesser von etwa 65 nm bis 100 nm auf. Dabei ist zu beobachten, dass die Polyplexe der Polymere P4-1 und P4-4, welche über ein besonders hohen prozentualen Massenanteil des kationischen Blocks an ihrer Gesamtmasse besitzen, einen geringeren hydrodynamischen Durchmesser aufweisen als der Polyplex des Polymers P4-2 (siehe Tabelle 3.4). Dieser Effekt könnte mehrere Ursachen haben. Zum einen könnte bei einer höheren Anzahl an kationischen Ladungen pro Polymer ein zusätzlicher additiver Effekt bei der ionischen Wechselwirkung wirken, da mehr positive Ladungsträger in die Nähe des DNA-Rückgrats gebracht werden, sobald eine ionische Wechselwirkung eintritt, was eine schnellere Bildung von ionischen Bindungen fördert und eine höhere Kompaktierungsrate der pDNA zur Folge haben könnte. Zum anderen bedeutet eine höhere Ladungsdichte pro Polymereinheit, dass bei gleichem N/P-Verhältnis jeder Polyplex einen geringeren Massenanteil an Polymer enthält. Somit befinden sich in der Peripherie des Polyplexes weniger Polymerketten, welche miteinander interagieren. Daher ist es weniger wahrscheinlich, dass diese Polymerketten eine energetisch ungünstige, elongierte Konformation annehmen, da hierdurch mehr Freiheitsgrade der Kettenglieder eingeschränkt werden würden. Bei einer geringeren Kettenlänge des kationischen Blocks enthält ein Polyplex bei gleichem N/P-Verhältnis im Umkehrschluss einen höheren Massenanteil des Polymers. Dementsprechend interagieren mehr Polymerketten auf der Oberfläche des Polyplex miteinander und die Tendenz zur Ausbildung elongierter Polymerkonformationen ist höher. Die beiden genannten Effekte würden beide dazu führen, dass Polymere mit einem geringeren Massenanteil des kationischen Polymerblocks einen tendenziell größeren hydrodynamischen Durchmesser bei der Bildung von Polyplexen aufweisen als entsprechende Polymere mit höherem Massenanteil des kationischen Blocks. Betrachtet man die Unterschiede der Messdaten zwischen unvernetzten und vernetzten Polyplexen, so ist ein messbarer Unterschied der hydrodynamischen Durchmesser feststellbar. Bei den Polyplexen von P4-2 und P4-4 drückt sich dieser Unterschied als leichte Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers aus, bei P4-1 ist hingegen eine leichte Abnahme des hydrodynamischen Durchmessers zu beobachten. Dieser Umstand könnte damit zu erklären sein, dass die Kettenlänge des hydrophilen Blocks bei P4-1 deutlich kleiner ist als bei den Polymeren P4-2 und P4-4. Demnach könnten die PDSM-Seitengruppen bei P4-1 leichter durch Diffusion des Vernetzers erreichbar sein, wodurch die Polyplexe von P4-1 tendenziell dichter vernetzt werden könnten. Dem

Entgegen spricht die hohe Anzahl an potenziellen Vernetzungsstellen von P4-4, die eine dichte Vernetzung auch bei einer vergleichsweise niedrigen Anzahl an zugänglichen PDSM-Seitenketten ermöglichen sollten. Da es nicht möglich ist den tatsächlichen Vernetzungsgrad zweifelsfrei zu bestimmen, kann hier kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Vernetzung und der Größenänderung des Polyplexes hergestellt werden. Insgesamt kann jedoch geschlossen werden, dass alle verwendeten Polymere nanodimensionale Polyplexe mit einer sehr engen Größenverteilung bildeten und ein messbarer, physischer Einfluss der Vernetzung auf den hydrodynamischen Durchmesser der Polyplexe festzustellen war.

Um eine erste Abschätzung des Interaktionsverhaltens der Polyplexe im physiologischen Medium vornehmen zu können, wurde das Zeta-Potential (ζ) der assemblierten Polyplexe bestimmt. Dazu wurden die Polyplexproben nach der Größenbestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung in eine DTS1070 Zeta-Küvette (Malvern Panalytical GmbH) überführt und vermessen. Die Ergebnisse der Bestimmung des Zeta-Potentials sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Tabelle 3.6: Bestimmung der Oberflächenladung der Polyplexe durch Messung des ζ -Potentials.

| Polymer | Unvernetzte Polyplexe ^a | | Vernetzte Polyplexe ^b | |
|-------------------------|------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| | Mittl. ζ -Potential [mV] | ζ -Stand.-Abweichung [mV] | Mittl. ζ -Potential [mV] | ζ -Stand.-Abweichung [mV] |
| P4-1^c | +7,9 | ±8,8 | +10,3 | ±14,5 |
| P4-2^c | -9,4 | ±7,4 | -12,3 | ±5,2 |
| P4-4 | +17,5 | ±12,1 | +3,6 | ±7,2 |

^aUnvernetzte Polyplexes wurden mit einem N/P-Verhältnis von 3:1 synthetisiert. ^bVernetzte Polyplexe wurden mit einem N/P-Verhältnis von 3:1 synthetisiert. Es wurde eine HDT-Menge zugegeben, die einer theoretischen Vernetzungsdichte von 100% entsprach.

Besitzen Nanopartikel eine hohe Oberflächenladung, so können unspezifische elektrostatische Interaktionen mit den geladenen Bestandteilen biologischer Systeme auftreten.^[169–171] Dies kann zu einer verringerten Halbwertszeit im Blut führen und verhindern, dass intravenös administrierte Nanopartikel an ihren Wirkort gelangen können. Bei neutraler Oberflächenladung treten diese elektrostatischen Interaktionen nicht auf. Aus diesem Grund ist das Zeta-Potential ein guter Index, um auf potenzielle elektrostatische Wechselwirkung mit biologischen Systemen rückschließen zu können. Im Allgemeinen spricht man bei der Betrachtung des Zeta-Potentials von elektrischer Neutralität der Partikel, wenn das Oberflächenpotential im Mittel zwischen -10 mV und +10 mV zu verorten ist.^[172] Gleichzeitig wäre ein stark negativ ausgeprägtes Zeta-Potential ein deutlicher Hinweis darauf, dass die aggregierte pDNA durch das Polymer nicht vollständig gegen das äußere Medium abgeschirmt wird. Generell kann bei den Dargestellten Polyplexen ein leicht positives Zeta-Potential erwartet werden, da bei der Assemblierung der Polyplexe ein Ungleichgewicht zwischen positiven Amin-Gruppen des Polymers und negativen Phosphatgruppen der Plasmid-DNA eingesetzt wurde (N/P = 3). Die Abschirmung des allgemeinen positiven Ladungsüberschuss wird demnach über die elektrisch neutralen Kettenglieder des ersten und

zweiten Polymerblocks vermittelt, die eine Assoziierung von freien Ionen in der Peripherie des Polyplex-Kerns verhindern.

Vergleicht man in dieser Hinsicht die gemessenen Zeta-Potentiale der Partikel von P4-1, P4-2 und P4-4 kann geschlossen werden, dass lediglich die Probe unvernetzter Polyplexe des Polymers P4-4 eine ausgeprägte, leicht positive mittlere Oberflächenladung besitzt. Im Vergleich dazu ist die Oberflächenladung des vernetzten Polyplex von P4-4 deutlich geringer und kann als neutral betrachtet werden. Im Allgemeinen zeigt keines der anderen Polyplex-Paare einen deutlichen Unterschied der Oberflächenladung. Insgesamt können die vernetzten Polyplexe auf Grund ihrer mittleren Oberflächenladung als elektrisch neutral betrachtet werden. Bei diesen Polyplexen scheint demnach die Kombination aus der elektrisch neutralen p(MEO₃MA)-Hülle und der Vernetzung über die PDSM-Seitenketten eine ausreichende Abschirmung des geladenen Polyplex-Kerns vom äußeren, wässrigen Medium zu bieten.

3.4 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass mit konsekutiven RAFT-Polymerisationen auch bei niedriger Reaktionstemperatur ein flexibles und hoch modifizierbares, Triblock-Copolymer synthetisiert werden konnte, welches sich mit pDNA zu nanodimensionalen Polyplex-Partikeln mit enger Größenverteilung selbstständig assembliert. Das Polymer ist dabei charakterisiert durch eine Azid-Endgruppe, einen hydrophilen Block aus MEO₃MA-Wiederholungseinheiten, einem mittleren Block, bestehend aus den Wiederholungseinheiten des reaktiven Disulfids PDSM und einem polykationischen Block auf Basis von p(DMAEMA).

Die drei zur Synthese notwendigen, konsekutiven Polymerisationsschritte konnten mit einer hohen Kontrolle über das Molekulargewicht des jeweiligen Polymerblocks durchgeführt werden. Insgesamt konnten die Triblock-Copolymere maßgeschneidert und mit enger Verteilung des Molekulargewichts synthetisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die reaktiven Disulfidgruppen von PDSM als auch die Azid-Endgruppe durch einfache Postpolymerisationsreaktionen modifiziert werden konnten. Durch die Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffs IR dye 800CW[®] über eine *strain promoted azide-alkyne cycloaddition* (SPAAC) konnte gezeigt werden, dass sowohl einzelne Polymerketten als auch Polyplex-Partikel an der Azid-Gruppe modifiziert werden können. Dies ist eine wichtige Erkenntnis für darauffolgende Projekte, da eine schnelle und quantitative Farbstoffmarkierung, und/oder die Anbindung von *targeting*-Funktionen an die assemblierten Polyplexe möglich ist. Über dynamische Lichtstreuung und Messung des Zeta-Potentials der Polyplex-Partikel konnte gezeigt werden, dass hoch definierte Polyplexe mit einer engen Größenverteilung und einem hydrodynamischen Durchmesser von etwa 65 bis 100 nm hergestellt werden konnten. Zudem konnte bei den synthetisierten Polyplexen ein

neutrales Zeta-Potential festgestellt werden. Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass die negative Teilladung der Plasmid-DNA sehr gut von den gebundenen Polymeren gegen das äußere Medium abgeschirmt werden konnte. Dies könnte zu einer drastischen Reduzierung der Wechselwirkung mit Bestandteilen biologischer Lösungen führen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die bisherigen Ergebnisse, die bei der Synthese des genannten Triblock-Copolymersystems gesammelt werden konnten, die Vielseitigkeit des Polymersystems beleuchten. Die Azid-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMAEMA) Polymere können in ihrer Zusammensetzung beliebig variiert werden und bilden schnell und spontan Polyplexe mit pDNA. Zudem können die Polymere und Polyplexe in einfachen Reaktionen bei Raumtemperaturen modifiziert werden. Auf Grund dieser Faktoren könnte das Polymersystem ein vielversprechender Kandidat für ein pDNA-Transportsystem sein, das entsprechend seiner gewünschten Anwendung, im diagnostischen Bereich, zur Therapie mit maßgeschneiderten DNA-Sequenzen und zum gemeinsamen Transport verschiedener Wirkstoffe angewendet werden kann. Hierfür sind jedoch weitere Untersuchungen zur Polyplex-Bildung und Stabilität, zur biologischen Verträglichkeit und zur Transfektionseffizienz nötig.

3.5 Ergänzende Informationen

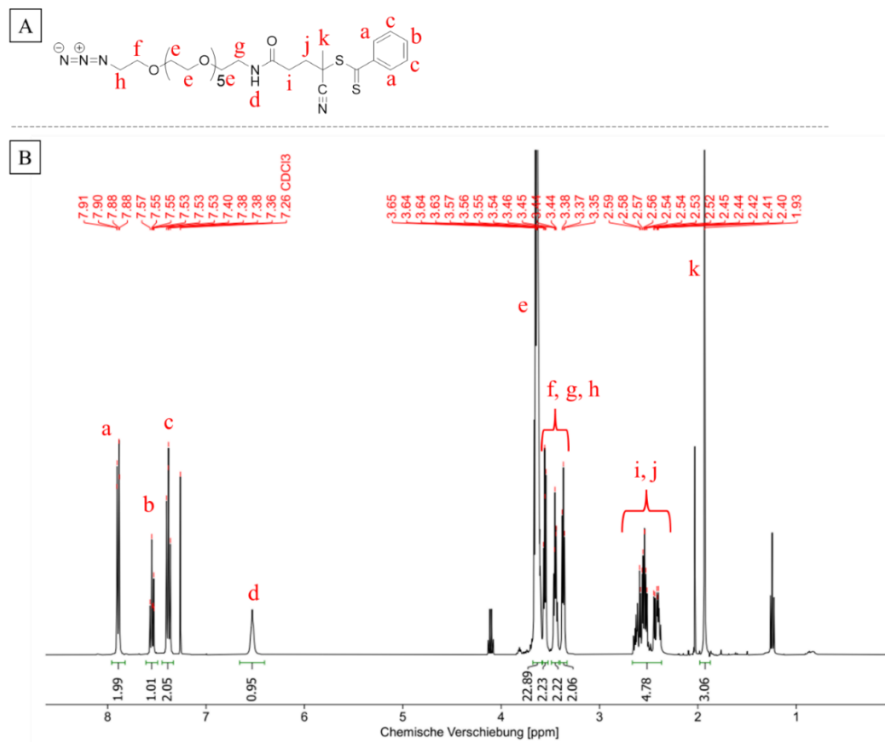


Abbildung 3.23: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Azid-PEG₆-CTAs. A: Molekülstruktur des Azid-PEG₆-CTAs. B: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Azid-PEG₆-CTAs mit zugeordneten ^1H -Resonanzsignalen.

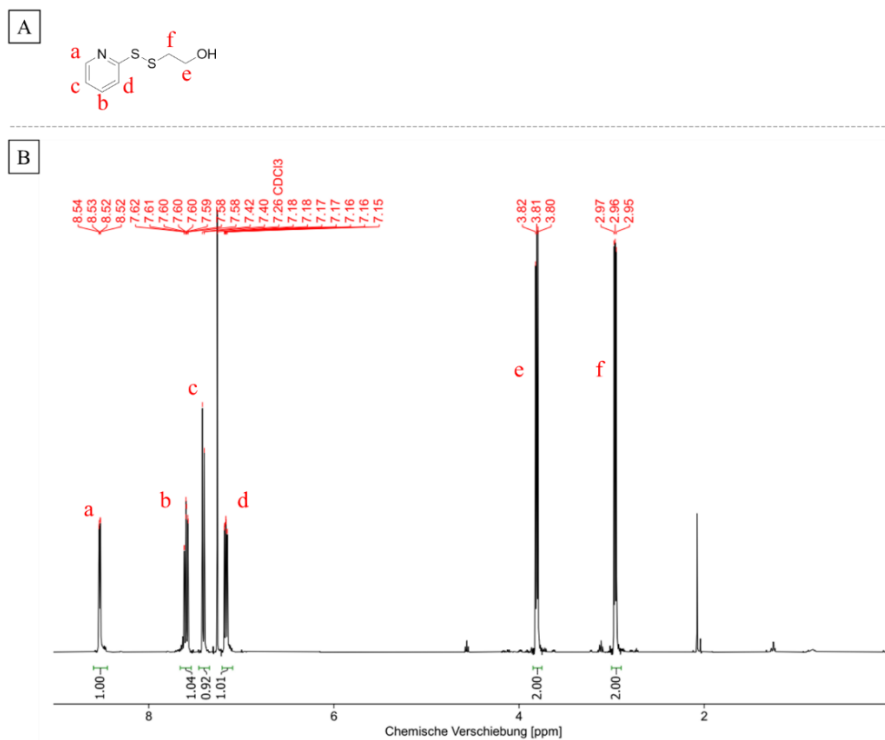


Abbildung 3.24: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von HPDS. A: Molekülstruktur von HPDS. B: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von HPDS mit Zuordnung der ^1H -Resonanzsignale.

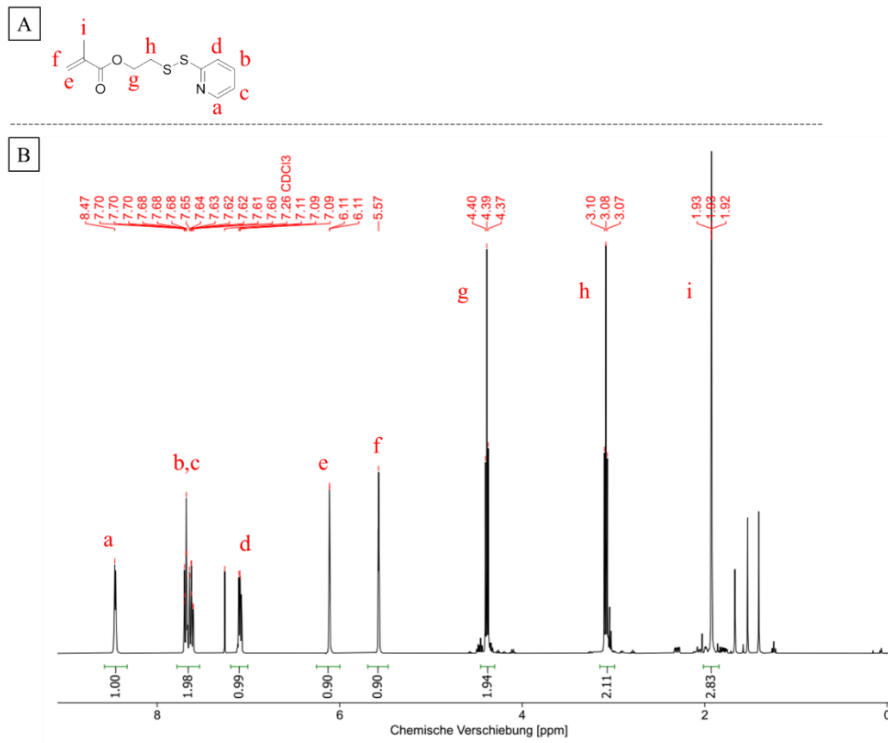


Abbildung 3.25: ^1H -NMR-Spektrum von PDSM. A: Molekülstruktur von PDSM. B: ^1H -NMR Spektrum von PDSM mit Zuordnung der ^1H -Resonanzsignale.

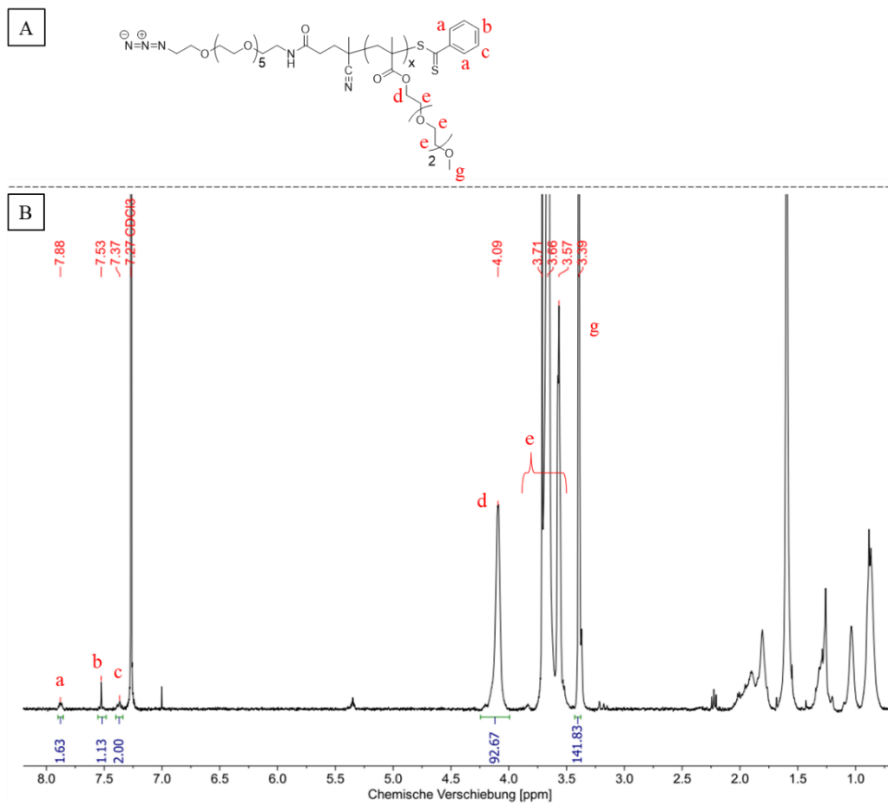


Abbildung 3.26: ^1H -NMR von P1-3. A: Allgemeine Molekülstruktur von P1. B: ^1H -NMR Spektrum von P1-3 mit Zuordnung der Resonanzsignale.

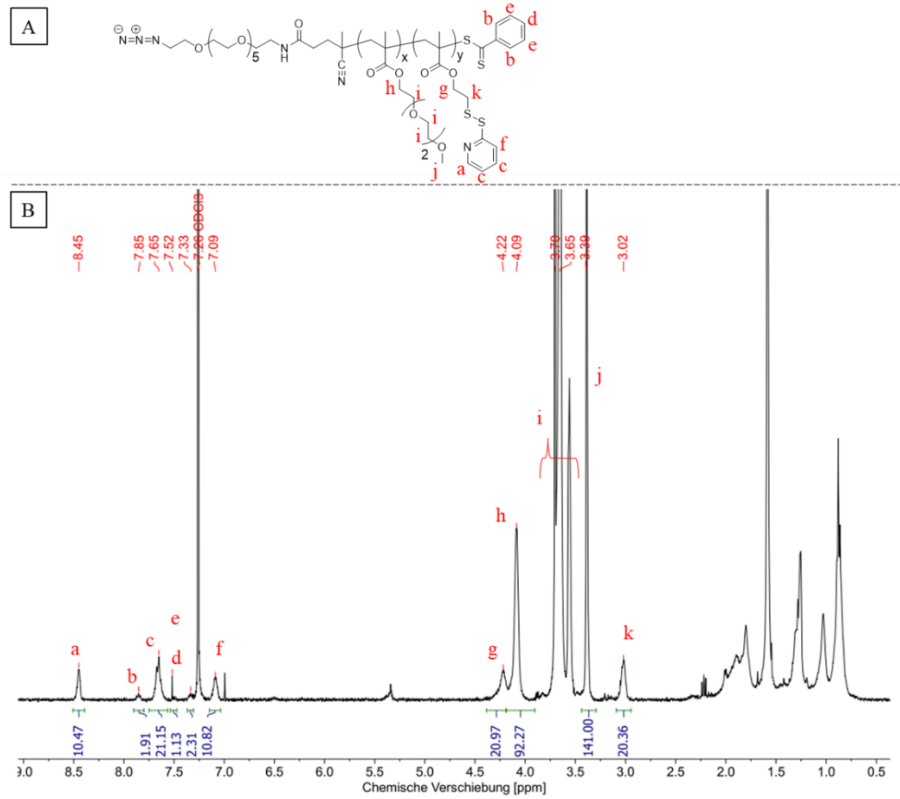


Abbildung 3.27: $^1\text{H-NMR}$ von P2-3. A: Allgemeine Molekülstruktur von P2. B: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von P2-3 mit Zuordnung der Resonanzsignale.

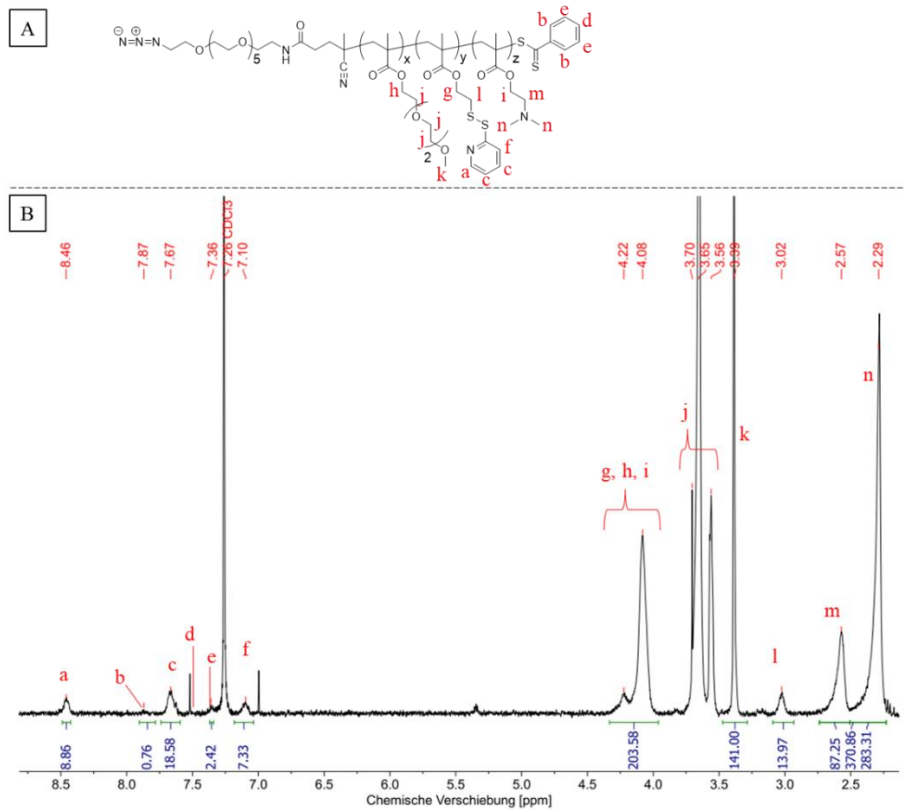


Abbildung 3.28: $^1\text{H-NMR}$ von P3-4. A: Allgemeine Molekülstruktur von P3. B: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von P3-4 mit Zuordnung der Resonanzsignale.

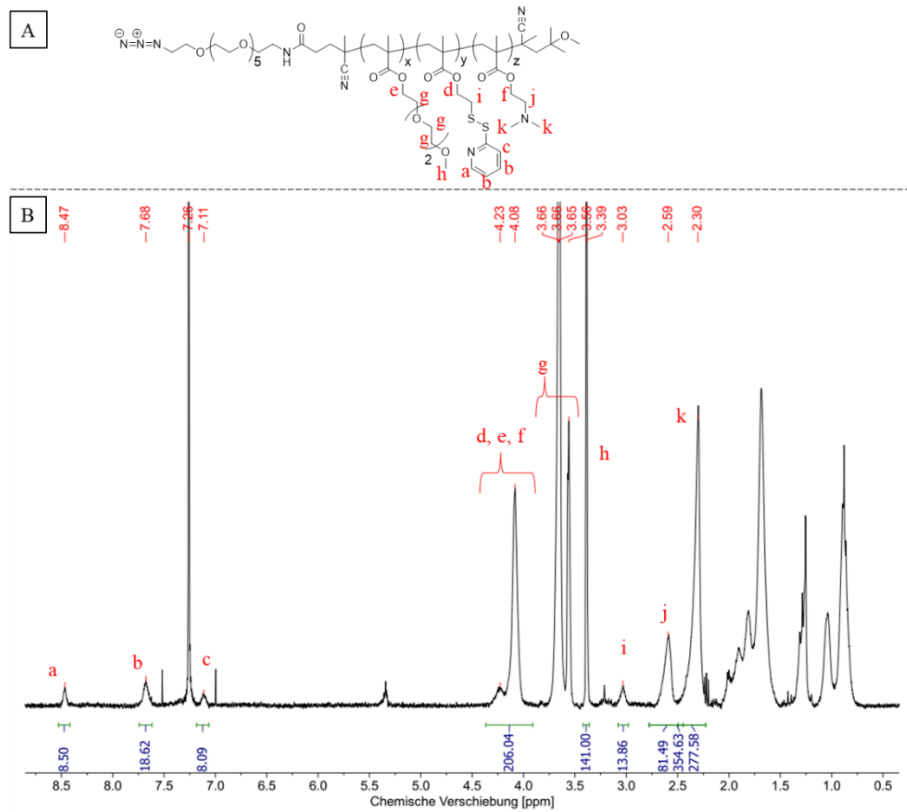


Abbildung 3.29: $^1\text{H-NMR}$ von P4-4. A: Allgemeine Molekülstruktur von P4. B: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von P4-4 mit Zuordnung der Resonanzsignale.

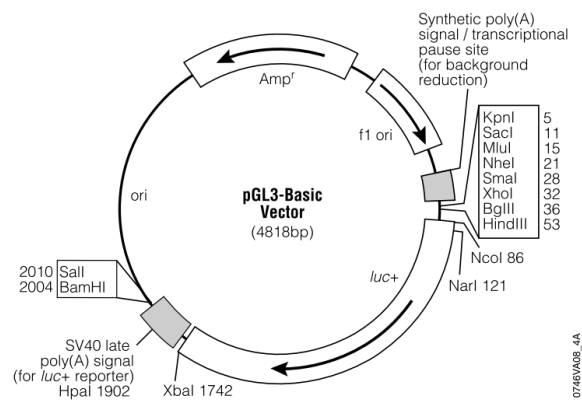


Abbildung 3.30: Vektorkarte von pGL3-Basic. Zusätzliche Beschreibung: luc+, cDNA welche für die modifizierte Glühwürmchen-Luciferase codiert; Amp^r, Gen welches *E. coli* Ampicillinresistenz verleiht; f1 ori, Replikationsursprung des Filamentösen Bakteriophagen; ori, Replikationsursprung von *E. coli*. Die Pfeile innerhalb von luc+ und Amp^r geben die Transkriptionsrichtung an. Der Pfeil in f1 ori zeigt die Richtung der ssDNA Synthese an.

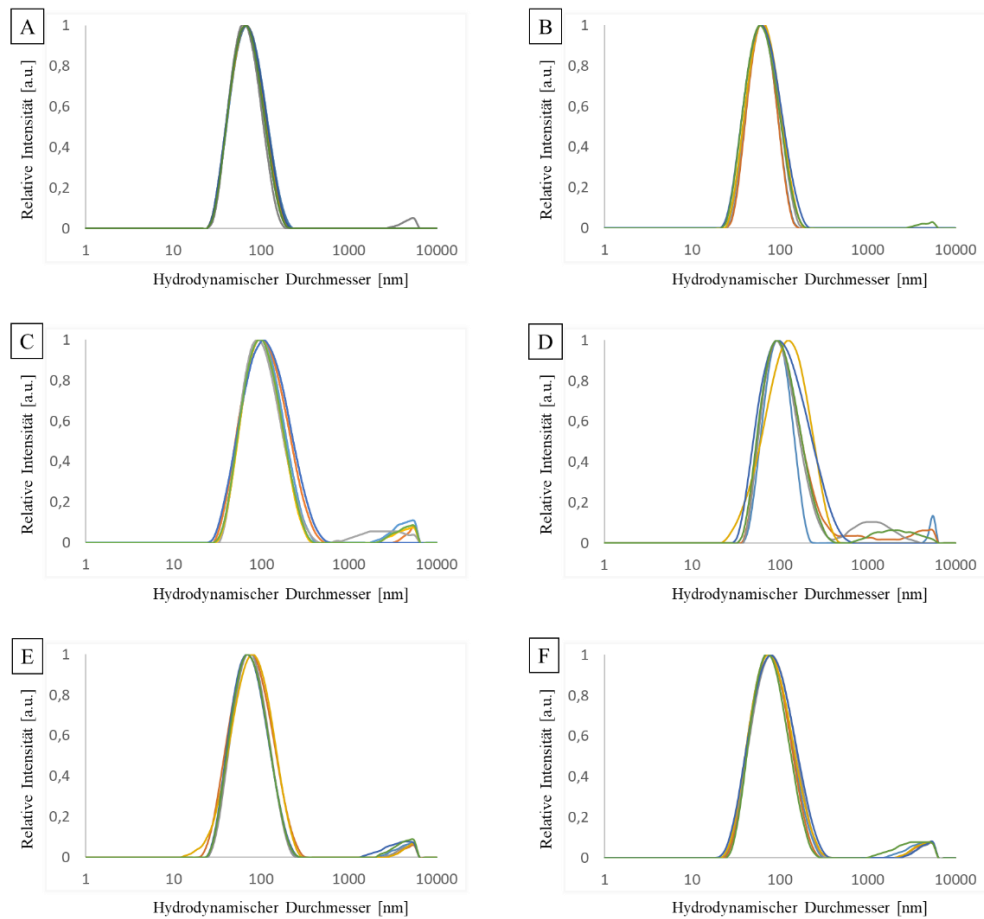


Abbildung 3.31: Ergebnisse der DLS-Untersuchung verschiedener Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMAEMA) Polyplexe. Die Polyplexe wurden mit einem N/P-Verhältnis von 3:1 angesetzt. Bei Vernetzten Polyplexen wurde der Vernetzer in der Menge, die einer theoretischen Vernetzung von 100% entsprach, eingesetzt. A: Polyplex auf Basis von P4-1. B: Polyplex auf Basis von P4-1, vernetzt mit HDT. C: Polyplex auf Basis von P4-2. D: Polyplex auf Basis von P4-2, vernetzt mit HDT. E: Polyplex auf Basis von P4-4. F: Polyplex auf Basis von P4-4, vernetzt mit HDT.

4 Teil 2: RAFT Synthese eines multifunktionalen Triblock-Copolymers als adaptive Polymer-Plattform

Die im Folgenden Teil besprochenen Ergebnisse wurden im Rahmen des Artikels „*Versatile, Multifunctional Block Copolymers for the Self-Assembly of Well-Defined, Nontoxic pDNA Polyplexes*“ publiziert.^[161] Der Artikel beruht auf der kooperativen Arbeit von Frau Simone Berger und Herrn Nicolas Ritt.

4.1 Kurzdarstellung der Publikation

Die Ergebnisse der vorigen Arbeit zur Synthese von multifunktionellen Triblock-Copolymeren, welche durch Vermischen mit pDNA-haltigen, wässrigen Lösungen spontan Polyplexe bilden, belegen die Umsetzbarkeit des Synthesekonzepts. Es konnten über kontrollierte, einfache synthetische Schritte sehr gut charakterisierbare Triblock-Copolymere hergestellt werden, die zum einen stabile Polyplexe bilden konnten und zum anderen über reaktive Disulfid-Gruppen vernetzt und funktionalisiert werden konnten. Weiterhin konnten die Azid-Endgruppen, welche am Anfang der Polymersynthese über den CTA in das Polymer eingebracht wurden, zur weiteren Funktionalisierung des Polymers und der Polyplexe genutzt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass die zwei reaktiven Funktionen des Triblock-Copolymers zur maßgeschneiderten Modifikation des Polymers und der Polyplexe genutzt werden können.

Es ergab sich im weiteren Verlauf der Arbeit die Frage, ob eine dritte reaktive, funktionelle Untereinheit eingefügt werden könnte, welche, in einer zur Azid-Endgruppe und zu den PDSM-Seitengruppen orthogonalen Reaktion, eine zusätzliche Möglichkeit zur Modifikation des Triblock-Copolymers bieten könnte. Aus diesem Grund wurde ein neues Polymersystem synthetisiert, bei dem der dritte, polykationische Polymerblock durch Wiederholungseinheiten des Monomers Pentafluorophenyl Methacrylsäureester (PFPMA) ersetzt wurde. Bei PFPMA handelt es sich um eine Phenylester-Verbindung, welche auf Grund der induktiven Effekte der Fluorsubstituenten und des mesomeren Effektes des Phenylrings sehr leicht in Umesterungs- oder Amidierungsreaktionen am Carbonyl-Kohlenstoff substituiert werden kann. Durch teilweise oder vollständige Substitution der Seitenketten des PFPMA-Blocks sollten kationisierbare Aminogruppen in einer polymeranalogen Reaktion eingebracht werden. Dies ermöglicht die individuelle Anpassung der Kationizität des dritten Polymerblocks und die kovalente Verbindung mit anderen kleinen Molekülen, wie zum Beispiel Farbstoffen oder niedermolekularen Therapeutika. Das auf diese Weise synthetisierte Triblock-Copolymer besitzt eine höhere Funktionalität als das im ersten Teil beschriebene Polymer und bietet durch den modularen Charakter viele denkbare Einsatzgebiete im Bereich der Nanomedizin.

In dem folgenden Teil der Dissertation wird zunächst die Synthese des Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymers beschrieben. Dabei ist die spätere Nutzung als Polymersystem zur Bildung von Polyplexen mit pDNA ins Auge gefasst. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde das synthetisierte Polymer mit dem asymmetrischen Amin N,N-Dimethylethylendiamin (DMEDA) umgesetzt. Somit entspricht der dritte Block dieser Polymere dem Amid-Analogon des dritten Polymerblocks der Polymere aus dem ersten Teil dieser Dissertation. Auf diese Weise sollten vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf die Bildung und physikochemischen Eigenschaften der Polyplexe erzielt werden. Gleichzeitig sollte mit ersten biologischen Tests in der Zellkultur die Bioverträglichkeit der Polyplexe und ihre Transfektionseffizienz überprüft werden.

Die Ergebnisse und Daten, welche in den Kapiteln 4.2 bis 4.4 vorgestellt werden, wurden in dem Artikel *Versatile, Multifunctional Block Copolymers for the Self-Assembly of Well-Defined, Nontoxic pDNA Polyplexes* veröffentlicht.^[161] Alle in diesem Teil vorgestellten Daten zur Synthese der Polymere, deren Charakterisierung und Modifikation, sowie der Polyplexsynthese und deren Charakterisierung wurden dabei durch die Arbeit von Herrn Nicolas Ritt gewonnen. Durch die kooperative Arbeit mit Frau Simone Berger wurden die Daten zu biologischen Experimenten beigetragen. Dabei war sie für die Durchführung der Zelleexperimente und die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse verantwortlich.

4.2 Einleitung

Innerhalb der letzten Jahrzehnte ist ein zunehmendes Interesse der wissenschaftlichen Gemeinde am Bereich der Nanomedizin entstanden. Dabei ist vor allem das Feld der Tumorthherapie in das Zentrum des Interesses gerückt. Ein Vorteil nanodimensionaler Wirkstofftransportsysteme ist, dass schwer lösliche Wirkstoffe durch die Aufnahme in ein solches Transportsystem solubilisiert werden können, wodurch deren Halbwertszeit im Blut deutlich erhöht werden kann.^[4,10] Aus diesem Grund sind über die letzten Jahre bereits viele verschiedene, nanopartikuläre Wirkstofftransportsysteme in klinischen Studien untersucht worden und einige Systeme wurden bereits durch die entsprechenden Regulatorbehörden für den therapeutischen Gebrauch zugelassen. Beispielsweise können hier Doxil, Abraxane oder Narek-102, Paclital und andere genannt werden.^[14,22,130–132] Der gerichtete Transport dieser Formulierungen beruht dabei in den meisten Fällen auf dem sogenannten *enhanced permeability and retention effect* (Effekt der erhöhten Permeabilität und Retention, EPR Effekt), wodurch eine Akkumulation der Transportverbindung in vielen soliden Tumoren festzustellen ist.^[71,72] Neben einigen soliden Tumoren besitzen ebenso andere Arten von Gewebe, wie zum Beispiel die Leber und die Milz eine erhöhte Vaskularisation und können teilweise Nanopartikel akkumulieren. Besonders in Hinblick auf immuntherapeutische Ansätze ist daher eine Adressierung der Milz interessant.^[173]

Neben klassischen zytostatischen Therapeutika hat sich die Anwendung von verschiedenen Arten von DNA und RNA als Wirkstoff als attraktiv erwiesen, um beispielsweise das Immunsystem für bestimmte tumorspezifische Antigenstrukturen zu sensibilisieren, was vor allem im wachsenden Forschungsfeld der personalisierten Tumorthherapie einen entscheidenden Vorteil darstellt.^[173–175] Systemische Verabreichung von DNA und RNA ohne ein Wirkstofftransportsystem ist auf Grund der starken Wechselwirkungen mit Proteinen und anderen Bestandteilen des Blutes und dem schnellen Abbau durch Nukleasen im Blut und anderen Körperflüssigkeiten schwer durchführbar.^[67] Zudem ist es für polyanionische Biomoleküle wie Nucleinsäuren nicht möglich die Zellmembran über Diffusion zu durchqueren. Trotzdem existieren einige Methoden zur Verabreichung von Nucleinsäuren als eigenständiges Therapeutikum, wie zum Beispiel Partikelbeschuss, Elektroporation und

hydrodynamische Injektion. Diese Methoden sind jedoch in ihrer therapeutischen Anwendung entweder auf lokale Therapien oder extrem hohe Injektionsvolumina beschränkt, zudem wird ihr Potential in der klinischen Praxis durch weitere Beschränkungen stark vermindert.^[66] Eine elegante Alternative bietet hier die intravenöse Injektion von DNA-Nanoformulierungen, welche eine schützende Hüllschicht zur Erhöhung der Bluthalbwertszeit der Nucleinsäure-Verbindung und Targeting-Strukturen zur aktiven Aufnahme des Partikels in das Zellinnere besitzen. Zu diesem Zweck werden häufig Polyplexe verwendet, die durch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem polyanionischen Rückgerad der Oligonukleotide und einer polykationischen, polymeren Komponente gebildet werden. Die elektrostatischen Wechselwirkungen führen zu einer Abschirmung der negativen Teilladung der Nucleinsäuren und erleichtert somit die Aufnahme der Oligonukleotide in das Zellinnere. Des Weiteren werden die Wechselwirkungen mit Proteinen und anderen Bestandteilen des Bluts vermindert, besonders wenn die polykationische Polymerkomponente mit einem zweiten, wasserlöslichen und antiadsorptiven Polymer wie Polyethylenglycol (PEG), Poly(2-Oxazolin), oder Polysarkosin verbunden wird.^[67] Im Laufe der Jahre wurden viele verschiedene Polymersysteme zum Transport von Nucleinsäuren vorgeschlagen.^[66,152,155–157]

Bei der Fragestellung, welche Voraussetzungen das Polymersystem für den Transport der DNA oder RNA *in vivo* aufweisen muss, zeigt sich, dass der Polyplex zwei ineinander transformierbare Formen besitzen muss. Um die Halbwertszeit für den Transport im Blut und durch das Gewebe zu erhöhen, wird eine stabile Transportform benötigt, welche die Nucleinsäuren vor Abbau schützt und geringe unspezifische Wechselwirkungen mit Proteinen und Zellmembranen aufweist. Nach der endozytotischen Aufnahme in die Zielzelle muss das Transportsystem in eine Freisetzungsform überführt werden, bei der die Bindung der Nucleinsäuren schwächer ausgeprägt ist als bei der Transportform. Zudem muss eine destabilisierende Interaktion des Polyplexes mit der Membran des Endosoms stattfinden, welche die Freisetzung der DNA oder RNA in das Zytosol ermöglicht. Die Zersetzung des Polyplexes und die Wechselwirkung des polykationischen Polymers mit der endosomalen Membran kann dabei die Freisetzung fördern. Aus diesen Gründen wird ein Stimulus-responsives System benötigt, welches seine physikochemischen Eigenschaften ändert, je nachdem ob es sich im extrazellulären Raum, oder im Endosom einer Zelle befindet. Diese Idee geht auf die Anfänge der polymeren Therapeutika zurück und wurde bereits 1975 in der Publikation von Ringsdorf et al. vorgestellt.^[10]

In diesem Kontext haben sich Disulfid-Verbindungen als besonders interessant erwiesen, da sie durch das reduzierte Reduktionspotential im Blutplasma stabil sind, innerhalb der Zelle jedoch reaktiv gespalten werden können. Im physiologischen Umfeld ist Glutathion (GSH) hauptverantwortlich für die reduktive Spaltung von Disulfidbindungen. Im Blutplasma und der extrazellulären Matrix beträgt die Konzentration von GSH etwa 2 – 20 μM . Im Zellinneren hingegen liegt die Konzentration zwischen 0,5 und 10 mM.^[140] Aus diesem Grund können Polyplexe durch die reversible Vernetzung über reduzierbare Disulfidbindungen stabilisiert werden.^[162,176,177] Hierfür wird jedoch ein Triblock-Copolymer benötigt,

welches aus einem wasserlöslichen, antiadsorptiven Block, einem reversibel vernetzbaren Block zur Stabilisierung der Transport-Form und einem polykationischen Block, zur Komplexierung der polyanionischen Nucleinsäuren als Polyplex, besteht. Ähnliche Polymerstrukturen wurden bereits erfolgreich auf Basis von Polypept(o)id-Strukturen hergestellt.^[156,162,178] In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese von Triblock-Copolymeren auf Basis von Methacrylsäure-Derivaten mittels kontrollierter, radikalischer RAFT-Polymerisation beschrieben. Block-Copolymere bieten dabei den Vorteil, dass verschiedene, funktionelle Monomere in hoher struktureller Ordnung miteinander kombiniert werden können. In dieser Hinsicht konnte durch Barz et al. gezeigt werden, dass Polyplexe auf Basis kationischer Block-Copolymere eine erhöhte Stabilität im Vergleich zu Polyplexen auf Basis statistischer Copolymere aufweisen.^[158]

Wie bereits gezeigt werden konnte, ist die direkte Polymerisation von Amin-funktionalisierten Methacrylaten mittels RAFT-Polymerisation möglich.^[110,179,180] Die Analyse solcher Strukturen kann sich jedoch durch Varianz des hydrodynamischen Radius und / oder starker elektrostatischer Wechselwirkungen als schwierig gestalten. Aus diesen Gründen kann es von Vorteil sein, den kationischen Block in einer polymeranalogen Modifikation aus einem gut löslichen, reaktiven Vorläuferpolymer zu bilden.^[181,182] Das reaktive Methacrylsäureester-Monomer Methacrylsäure Pentafluorophenylester (PFPPMA) ist eine geläufige und bereits gut dokumentierte Komponente für die Anwendung als Monomer in RAFT-Polymerisationen und kann sehr effektiv durch primäre Amine in einer Amidierungsreaktion umgesetzt werden.^[181-184] PFPPMA wurde auch bereits für die Einführung kationischer Gruppen in Polymere über die Umsetzung mit asymmetrischen Diaminen verwendet.^[159,185] Hierdurch bietet sich die Möglichkeit zur Variation der kationischen Ladungsdichte und der Hydrophobizität des Kerns des Polyplexes. Zusätzlich bietet sich eine Vielzahl an Variationsmöglichkeiten zur Anbindung von kleinen Molekülen, wie zum Beispiel Farbstoffen. Es ergeben sich jedoch auch verschiedene Fragestellungen: Wie effektiv können die Triblock-Copolymere synthetisiert werden? Können die verschiedenen funktionellen Gruppen selektiv durch spezifische Reaktionen modifiziert werden?

4.3 Ergebnisse und Diskussion

4.3.1 Synthese des Azid-PEG₃-CTAs

Zur Durchführung der Polymersynthese nach dem RAFT-Verfahren wurde ein *chain transfer agent*, welcher mit einer Azid-Gruppe funktionalisiert ist, synthetisiert. Dazu wurde 4-Cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentansäure Pentafluorophenylester (PFP-CTA) mit einem entsprechenden, primären Amin unter Zuhilfenahme von Triethylamin in einer Amidierungsreaktion umgesetzt (siehe Abbildung 4.1).

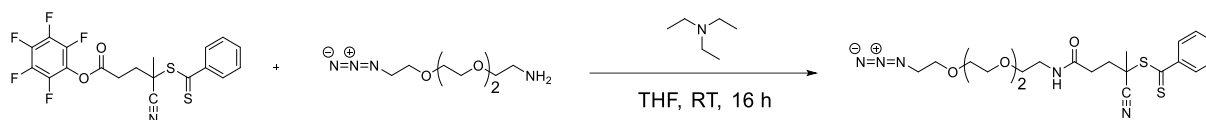


Abbildung 4.1: Synthese des Azid-PEG₃-CTAs.

Das experimentelle Vorgehen orientierte sich dabei an der bereits durch Nuhn et al. berichteten Syntheseroute und wurde im Detail angepasst.^[159] Nach der Isolierung des Azid-PEG₃-CTAs durch Aufarbeitung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie und dem Entfernen von Lösungsmittelresten im Hochvakuum, wurde der CTA mittels NMR- und IR Spektroskopie charakterisiert (Abbildung 4.2).

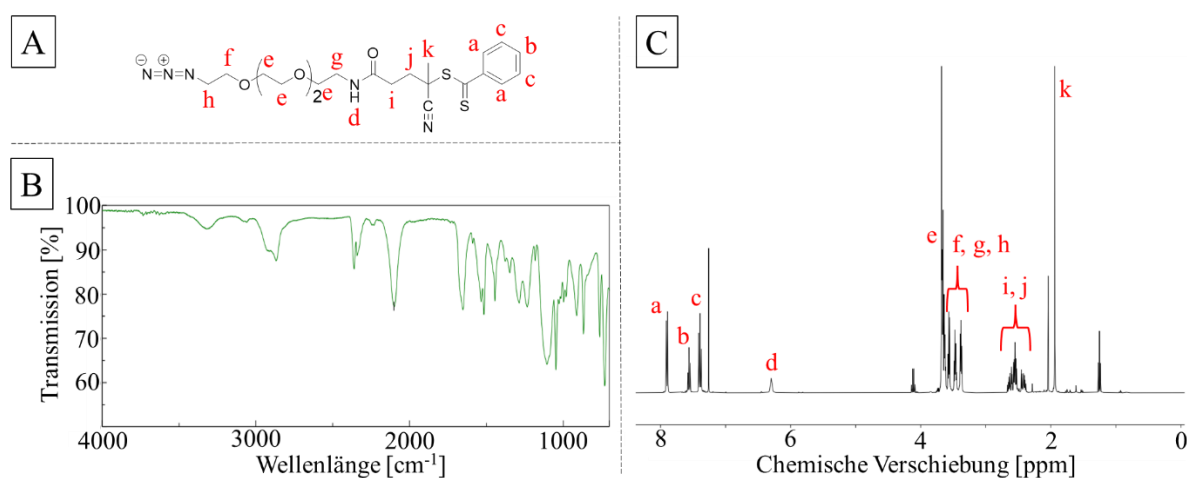


Abbildung 4.2: Charakterisierung des synthetisierten Azid-PEG₃-CTAs. A: Struktur des Azid-PEG₃-CTAs. B: IR Spektrum des Azid-PEG₃-CTAs. C: ¹H-NMR des Azid-PEG₃-CTAs mit Signalzuordnung.

Im UV-Vis Spektrum (Abbildung 4.2 B) ist das Absorptionssignal der Azid-Gruppe bei einer Wellenlänge von 2100 cm⁻¹ zu erkennen. Ausgehend von der Zuordnung der Wasserstoff-Signale des ¹H-NMRs kann somit geschlossen werden, dass der Azid-PEG₃-CTA erfolgreich synthetisiert werden konnte.

4.3.2 Synthese von PDSM

Als Monomer-Molekül, welches zur Synthese des zweiten Blocks des Triblock-Copolymersystems verwendet werden sollte, wurde Methacrylsäure-2-(2-pyridyldisulfid)ethylester (PDSM) in einer zweistufigen Synthese, ausgehend von Aldrithiol-2, hergestellt (siehe Abbildung 4.3).

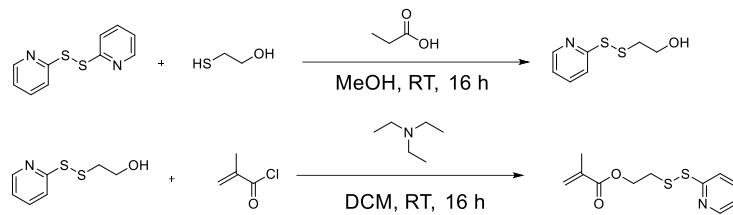


Abbildung 4.3: Synthese von Methacrylsäure-2-(2-pyridyl)disulfidethylester (PDSM).

Zunächst erfolgte dabei die Umsetzung von Aldrithiol-2 mit Mercaptoethanol in einer säurekatalysierten Disulfid-Austauschreaktion in Methanol (MeOH). Das erhaltene Zwischenprodukt Hydroxyethyl-(2-pyridyl)disulfid) (HPDS) wurde in der zweiten Synthesestufe mit Methacryloylchlorid, unter Zuhilfenahme von Triethylamin, zu PDSM umgesetzt. Auf Grund der reaktiven Disulfid-Funktion der PDSM Seitenkette musste das Monomer stets unter Schutzgas-Atmosphäre gehandhabt werden. Nach der Aufarbeitung des Rohprodukts mittels Säulenchromatographie und Trocknung im Vakuum wurde das Monomer mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie charakterisiert (Abbildung 4.4)

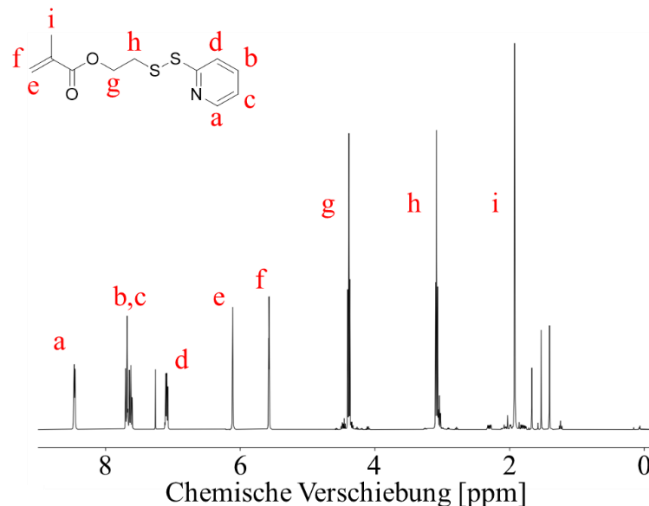


Abbildung 4.4: $^1\text{H-NMR}$ von PDSM mit zugeordneten Signalen.

Um die Handhabung für spätere Polymerisationsreaktionen zu vereinfachen, wurde PDSM als Stammlösung in 1,4-Dioxan gelagert. Dazu wurde zunächst eine größere Menge 1,4-Dioxan über Natrium getrocknet. Im Anschluss daran wurde das frisch destillierte Lösungsmittel, unter Anwendung des zyklischen *freeze-pump-thaw* Verfahrens zur Vakuumentgasung, von allen gelösten Gasen befreit. Hierbei ist insbesondere gelöster Sauerstoff ein Problemfaktor, da dieser durch Oxidation der Disulfidgruppen zur Degradation der Monomermoleküle oder zu spontaner freien radikalischen Polymerisation des Monomers führen kann.

Die mit dem trockenen, entgasten 1,4-Dioxan angesetzte Stammlösung wurde zudem unter Argon-Atmosphäre gesetzt und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Auf Grund des hohen Gefrierpunkts des Lösungsmittels, erstarrte die Stammlösung, wodurch die Lagerfähigkeit des Monomers vermutlich zusätzlich erhöht wurde.

4.3.3 Synthese von PFPMA

Für die Synthese des dritten Polymerblocks wurde Methacrylsäure Pentafluorophenylester (PFPMA) als Monomer eingesetzt. Die Synthese von PFPMA erfolgte mittels Veresterung von Pentafluorophenol (PFP) an Methacryloylchlorid. Zur Vermittlung der Reaktion wurde die Base Triethylamin verwendet (siehe Abbildung 4.5).

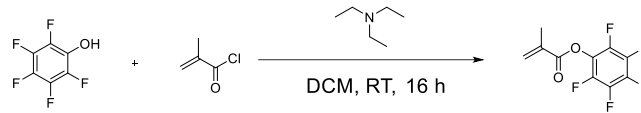


Abbildung 4.5: Synthese von Methacrylsäure Pentafluorophenylester (PFPMA).

Nach dem Einengen der gefilterten Reaktionslösung und fraktionierter Destillation des Rohprodukts, wurde PFPMA erhalten. Die Charakterisierung des Monomers erfolgte mittels ^1H - und ^{19}F -NMR Spektroskopie (siehe Abbildung 4.6).

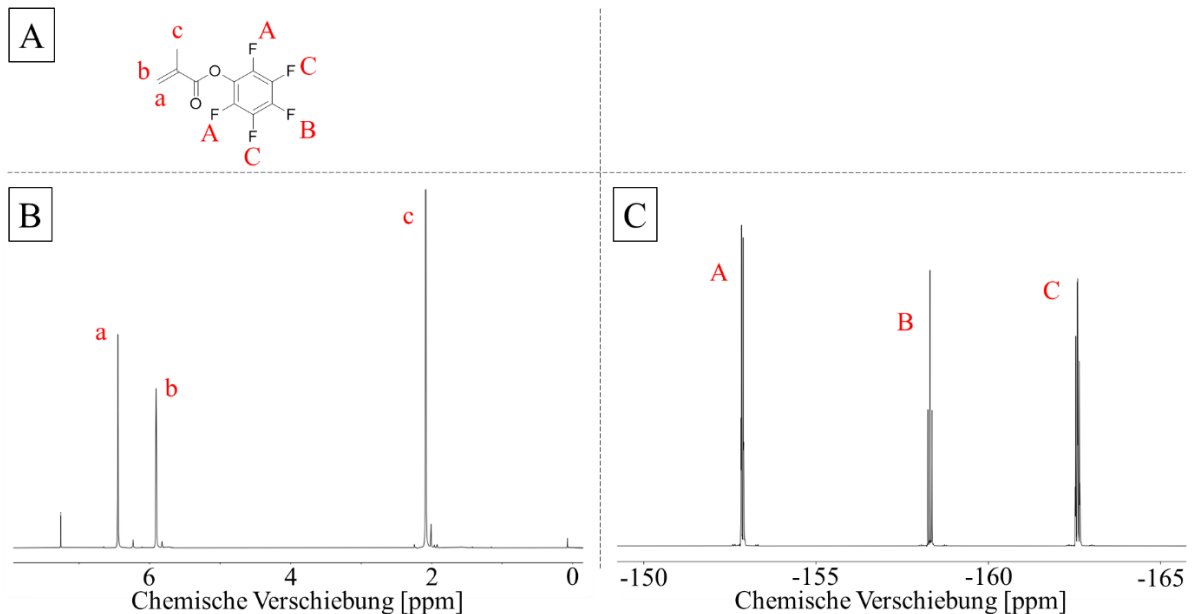


Abbildung 4.6: Charakterisierung von PFPMA. A: Struktur von PFPMA. B: ^1H -NMR von PFPMA mit zugeordneten Signalen. C: ^{19}F -NMR mit zugeordneten Signalen.

Das ^1H -NMR zeigt dabei die erwarteten Signale der geminalen Wasserstoffatome der Doppelbindung *a* und *b*, sowie das Resonanzsignal der Methylgruppe *c*. Da sowohl das ^1H -NMR als auch das ^{19}F -NMR Spektrum jeweils nur Resonanzsignale aufweisen, die dem Monomer zugeordnet werden können, wurde das Reaktionsprodukt bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ und unter Argon-Atmosphäre gelagert.

4.3.4 Synthese von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymeren

Bei der Synthese, der in diesem Teil der Dissertation vorgestellten Triblock-Copolymere, konnte auf die Erfahrungen bei der Synthese der Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMAEMA) Block-Copolymere zurückgegriffen werden. Analog zu diesen wurden die Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Polymere durch sukzessive RAFT Polymerisation, ausgehend von einem Azid-Funktionalisierten CTA, hergestellt. Auf diese Weise wurden zunächst drei funktionelle Polymerblöcke synthetisiert, in einem vierten Reaktionsschritt wurde anschließend die reaktive Benzothioatgruppe durch einen Überschuss des Initiators AMDVN entfernt (siehe Abbildung 4.7).

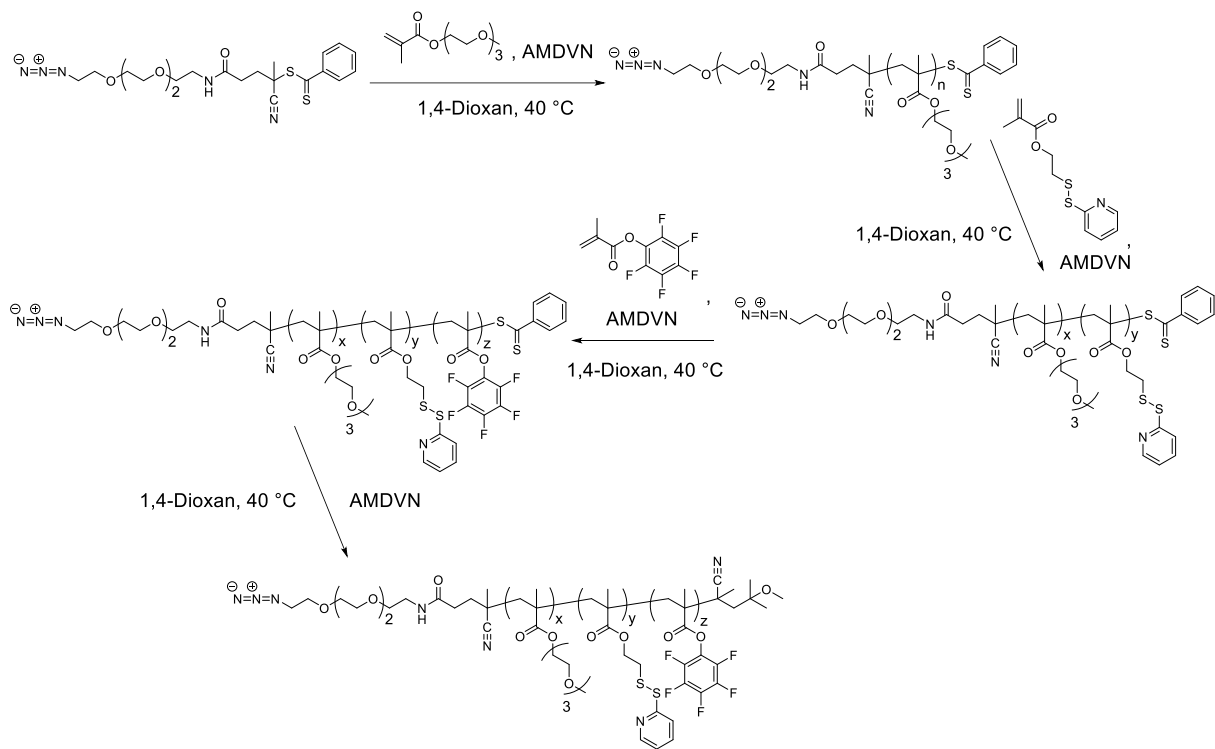


Abbildung 4.7: Syntheschema der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymere.

Im ersten Schritt der Synthese wurde der Azid-PEG₃-CTA mit MEO₃MA umgesetzt, um den ersten, hydrophilen Block aufzubauen. Hierfür wurde eine wasserfreie und entgaste Lösung des CTAs und des Monomers in 1,4-Dioxan mit dem Initiator 2,2'-Azo-di-(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril) (AMDVN) bei einer Reaktionstemperatur von 40 °C umgesetzt (siehe Abbildung 4.8).

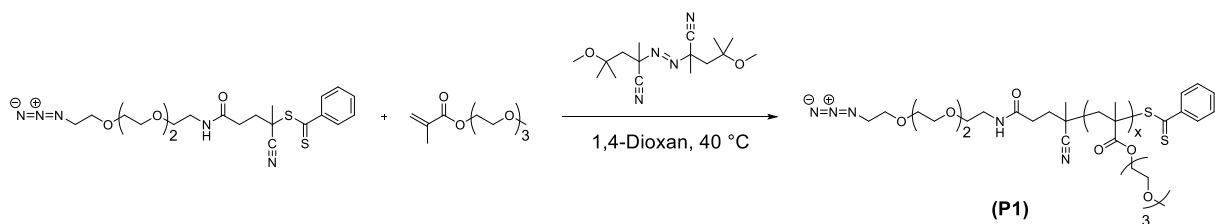


Abbildung 4.8: RAFT-Polymerisation von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA).

Im Vorfeld durchgeführte Testpolymerisationen ergaben, dass nach einer Reaktionszeit von 20-24 h im Durchschnitt etwa 85 % der Monomermoleküle in der Kettenwachstumsreaktion umgesetzt wurden. Entsprechend dieser Feststellung wurden die Ansätze für die Synthese von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA) Polymeren so gewählt, dass die erwünschte Kettenlänge in etwa einem Monomerumsatz von 85% entsprach. Zur Ansatzberechnung wurde somit eine Abwandlung der Formel (3.1) angewandt:

$$DP_x = e(M_0) \cdot 0,85 \quad (4.1)$$

Wobei $e(M_0)$ der für den Ansatz benötigten Äquivalentmenge an MEO₃MA Monomer und DP_x dem gewünschten Polymerisationsgrad des hydrophilen Blocks entspricht. Um ein Spektrum verschiedener Triblock-Copolymere zu erhalten, wurden Polymerisationsgrade des MEO₃MA-Blocks von 30-70 MEO₃MA-Wiederholungseinheiten synthetisiert. Zur Kontrolle des Umsatzes wurde jeweils nach etwa 20 h Reaktionszeit eine Probe der Reaktionslösung zur Durchführung eines ¹H-NMRs entnommen (siehe Abbildung 4.9).

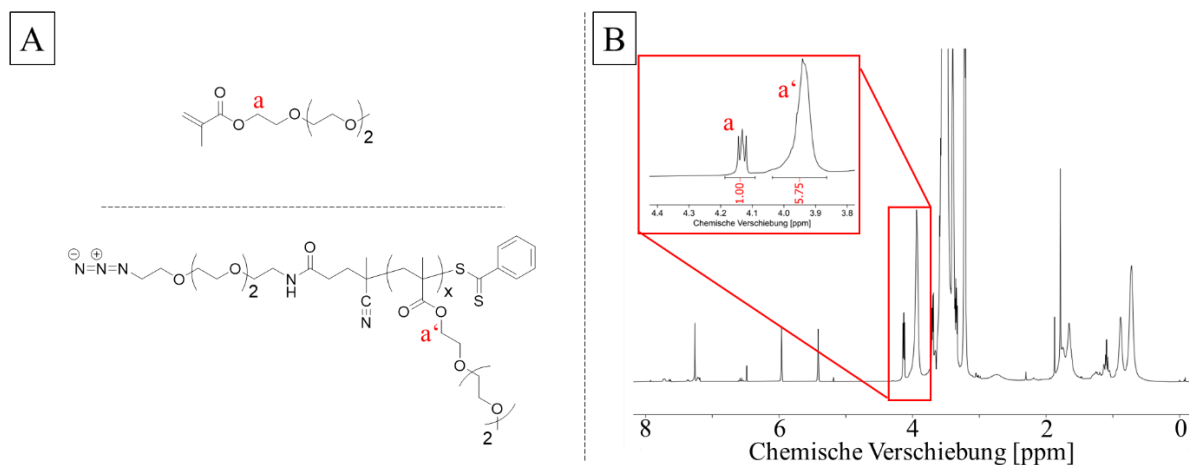


Abbildung 4.9: Umsatz-NMR von P1-1. A: Molekülstruktur von MEO₃MA und allgemeine Struktur von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA). B: Umsatz-NMR von P1-1 mit zugeordneten Resonanzsignalen.

Der Umsatz wurde, analog zu der in Kapitel 3.3.4 genannten Vorgehensweise, durch Bildung des Verhältnisses des Integralwertes des Signals der CH₂-Gruppe a' aus dem Polymer, zur Summe der Integralwerte, welche durch die Signale a und a' verursacht wurden, bestimmt. Anhand des beispielhaft abgebildeten Umsatz-NMRs aus Abbildung 4.9 ergibt sich somit ein Umsatz P von:

$$P = \frac{I(a')}{I(a) + I(a')} = \frac{5,75}{5,75 + 1,00} \approx 0,85 \quad (4.2)$$

Nach dem Erreichen des gewünschten Umsatzes wurde die Reaktion beendet und das Produkt durch Präzipitation gegen n-Hexan erhalten. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das Polymer mittels NMR Spektroskopie und THF-GPC charakterisiert (siehe Abbildung 4.10).

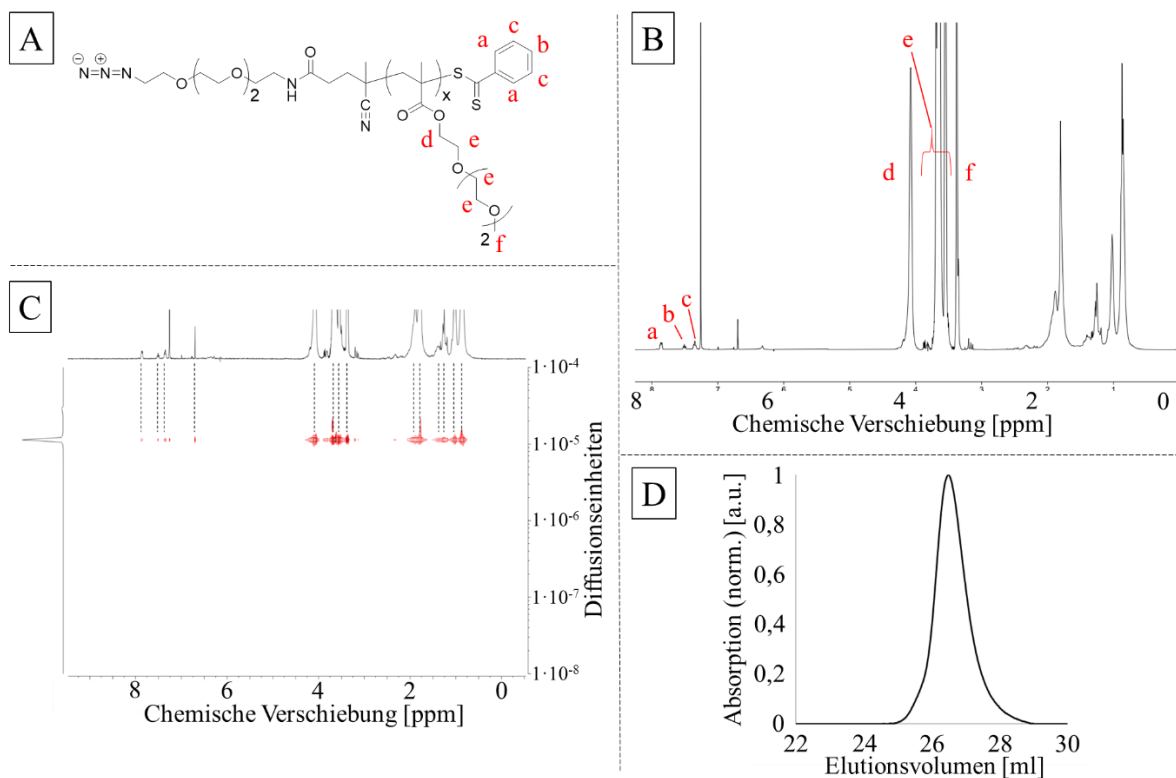


Abbildung 4.10: Charakterisierung der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA) Polymere. A: Allgemeine Struktur der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA) Polymere. B: ¹H-NMR von P1-1 mit zugeordneten Signalen. C: DOSY-NMR von P1-1. D: THF-GPC von P1-1.

Da bei der Charakterisierung der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-Polymere sowohl die Protonensignale der CTA-Endgruppe *a-c* als auch die Resonanzsignale *d* und *f* der MEO₃MA-Wiederholungseinheiten keine Überlagerung mit anderen Wasserstoffsignalen im ¹H-NMR Spektrum aufweisen (Abbildung 4.10 B), konnten diese, wie auch zuvor bei den entsprechenden Azid-PEG₆-p(MEO₃MA) Polymeren (siehe Kapitel 3.3.4), zur Berechnung des exakten Polymerisationsgrad verwendet werden. Dazu wurden die Signale der Benzothioatgruppe normiert, der Polymerisationsgrad berechnete sich durch die Integralwerte der Signale *d* und *f*. Das Spektrum weist im Bereich zwischen 5 ppm und 6ppm keine Spuren der geminalen Wasserstoffatome der Doppelbindung von MEO₃MA auf, wodurch verdeutlicht wird, dass die bei Reaktionsabbruch verbliebene Restmenge des Monomers vollständig entfernt werden konnte. Bei Betrachtung des DOSY-NMR Spektrums (Abbildung 4.10 C) ist nur eine diffundierende Spezies erkennbar, welche sowohl die Signale des CTAs als auch die Resonanzsignale der MEO₃MA-Wiederholungseinheiten vereint. Zusätzlich befinden sich die Signale der p(MEO₃MA)-Wiederholungseinheiten in einem eng umgrenzten Bereich des Diffusionskoeffizienten, wodurch geschlossen werden kann, dass die Polymerisation vollständig nach dem RAFT-Mechanismus ablief. Das Auftreten oligomerer Strukturen würde sich in einer stärkeren Verteilung der Signale auf der y-Achse äußern, da durch die breitere Größenverteilung eine Mischung von Produktstrukturen mit stark unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten existieren würden. Freie radikalische Polymerisation würde zudem dazu führen, dass zusätzliche Signale der p(MEO₃MA)-Wiederholungseinheit im Spektrum zu finden wären, welche nicht auf einer Horizontalen mit Resonanzsignalen der Benzothioat-Endgruppe

angeordnet sind. Die Bildung von oligomeren Bestandteilen, welche auf Kettenabbruchsreaktionen oder freie radikalische Polymerisation zurückgehen, kann somit im Rahmen der Messgenauigkeit der Kernresonanzspektroskopie ausgeschlossen werden. Diese Feststellung wird zudem durch die enge Molekulargewichtsverteilung untermauert, welche aus dem Kurvenverlauf der THF-GPC Messung (Abbildung 4.10 D) abgeleitet werden kann. Die gewonnenen analytischen Daten zur Synthese der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA) Homopolymere sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Synthetisierte Azid-PEG₃-p(MEO₃MA) Polymere.

| Polymer | Zusammensetzung | M ₀ : CTA: AMDVM | P [%] ^a | M _N ^b [g/mol] | M _N ^c [g/mol] | M _w ^d [g/mol] | Đ ^e |
|---------|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|--|--|--|----------------|
| P1-1 | P(MEO ₃ MA) ₄₂ | 46:1:0.2 | 85 | 10240 | 7650 | 9390 | 1,23 |
| P1-2 | P(MEO ₃ MA) ₄₂ | 46:1:0.2 | 84 | 10240 | 7620 | 9240 | 1,21 |
| P1-3 | P(MEO ₃ MA) ₅₂ | 62:1:0.2 | 83 | 12560 | 9410 | 11280 | 1,20 |
| P1-4 | P(MEO ₃ MA) ₅₂ | 62:1:0.2 | 83 | 12560 | 9510 | 11350 | 1,19 |

^a Umsatz der RAFT-Polymerisation. ^b Zahlenmittel des Molekulargewichts, berechnet anhand des ¹H-NMR-Spektrums. ^c Zahlenmittel des Molekulargewichts, ermittelt anhand der THF-GPC-Daten. ^d Gewichtsmittel des Molekulargewichts, ermittelt anhand der THF-GPC-Daten. ^e Polydispersität des Polymers, berechnet anhand der THF-GPC-Daten.

Insgesamt kann gesagt werden, dass die Synthese einer Vielzahl verschiedener Azid-PEG₃-p(MEO₃MA) Homopolymere, mit präziser Bestimmung der Kettenlänge, mittels der RAFT-Polymerisationsmethode durchgeführt werden konnte. Die Polymere konnten dabei anhand des Monomer- zu CTA-Verhältnisses mit sehr hoher Kontrolle über die resultierende durchschnittliche Kettenlänge dargestellt werden. Zudem wiesen die Azid-PEG₃-p(MEO₃MA) Homopolymere jeweils eine sehr enge Molekulargewichtsverteilung auf, was den kontrollierten Charakter der Synthese verdeutlicht. Die synthetisierten Homopolymere wurden anschließend als Makro-CTA-Verbindungen zur Darstellung von Diblock-Copolymeren verwendet. Zur Ermittlung der jeweiligen Syntheseansätze wurde, die aus der Kernresonanzspektroskopie berechnete, mittlere Molekularmasse berücksichtigt.

In der zweiten Reaktionsstufe der Polymersynthese wurden die Azid-PEG₃-p(MEO₃MA) Homopolymere mit dem Monomer PDSM umgesetzt. Genau wie bei der vorangegangenen Polymerisationsstufe wurde dabei das RAFT-Verfahren angewendet (siehe Abbildung 4.11).

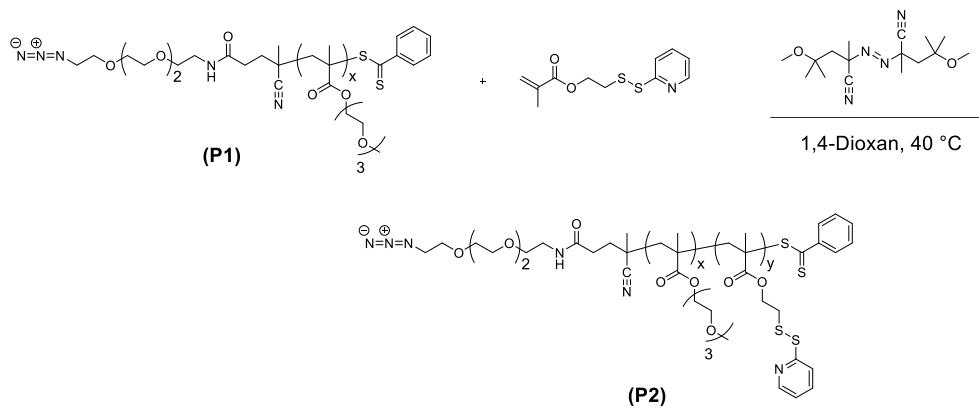


Abbildung 4.11: RAFT-Polymerisation von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM).

Wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben, wurde zur Vermeidung von Nebenreaktionen an den PDSM-Seitenketten die RAFT-Polymerisation bei vergleichsweise niedrigen Reaktionstemperaturen und unter Verwendung des Initiators AMDVN durchgeführt. Auf Grund von im Vorfeld durchgeführten Testreaktionen wurde ermittelt, dass nach einer Reaktionszeit von 18-24 h ein durchschnittlicher Umsatz von 75 % erzielt werden konnte. Daher wurde das Verhältnis von PDSM-Monomer zu Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-CTA so gewählt, dass nach Ende der angesetzten Reaktionszeit die gewünschte Anzahl an PDSM-Wiederholungseinheiten dem erwarteten Monomerumsatz von 75 % entsprach. Hierzu wurde, wie bei der vorangegangenen Reaktionsstufe eine Abwandlung der Formel (3.1) verwendet. Vor dem Hintergrund einer möglichen Nutzung der reaktiven Disulfid-Seitenketten für das Vernetzen der Polymerketten oder zur Modifikation mit Farb- oder Wirkstoffen ist eine gewisse Mindestanzahl an PDSM-Einheiten erforderlich. Daher wurde, um eine ausreichende Anzahl von reaktiven Disulfiden im Triblock-Copolymer zu gewährleisten eine Mindestblocklänge von sieben Wiederholungseinheiten angestrebt. Je nach angestrebter Polymerlänge und Gewichtung des Anteils des jeweiligen Polymerblocks an der molekularen Gesamtmasse, sollten PDSM-Blöcke von 8-15 PDSM-Wiederholungseinheiten synthetisiert werden. Die Kontrolle des Umsatzes erfolgte durch die Messung eines ¹H-NMRs einer Probe der entsprechenden Reaktionslösung (siehe Abbildung 4.12).

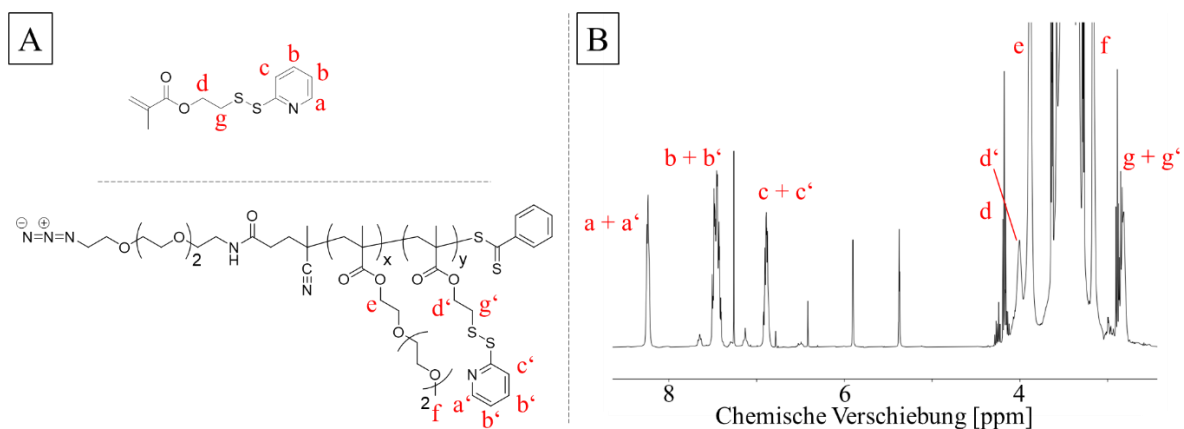


Abbildung 4.12: Umsatz-NMR von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM) (P2-1). A: Molekülstruktur von PDSM und allgemeine Struktur von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM). B: Umsatz-NMR von P2-1 mit zugeordneten Resonanzsignalen.

Viele der Signale aus dem Umsatz-NMR, welche dem verbliebenen PDSM-Monomer oder der PDSM-Wiederholungseinheit zugeordnet werden können, sind starker Signalüberlagerung unterworfen. Dies ist beispielsweise sehr deutlich an den Resonanzsignalen der aromatischen Pyridyl-Gruppe $a - c$ und $a' - c'$ zu erkennen. Auf Grund des großen Unterschieds der chemischen Verschiebung der Resonanzsignale von d beziehungsweise d' konnte jedoch eine Normierung der Signalintensitäten des Monomers vorgenommen werden. Der Umsatz ließ sich am verlässlichsten durch die Bildung des Durchschnitts über alle Signale einer Spezies bestimmen. Dabei wurden, auf Grund der vorgenommenen Normierung, ganze Zahlen als Integralwerte der überlagerten Monomer-Signale, entsprechend der Anzahl der jeweiligen chemisch gleichen H-Atome, eingesetzt. Demnach ergibt sich für die Berechnung des Umsatzes folgende Formel:

$$P = \frac{I(a + a') - I(a) + I(b + b') - I(b) + I(c + c') - I(c) + I(d) + I(g + g') - I(g)}{I(a + a') + I(b + b') + I(c + c') + I(d) + I(d') + I(g + g')} \quad (4.3)$$

Nachdem der erwünschte Umsatz erreicht wurde, wurde die RAFT-Polymerisation beendet und das Produkt durch mehrere, konsekutive Präzipitationsschritte gegen n-Hexan isoliert und aufgereinigt. Nach dem Trocknen des Diblock-Copolymers im Hochvakuum erfolgte die eingehendere Charakterisierung mittels NMR-Spektrometrie und THF-GPC (siehe Abbildung 4.13).

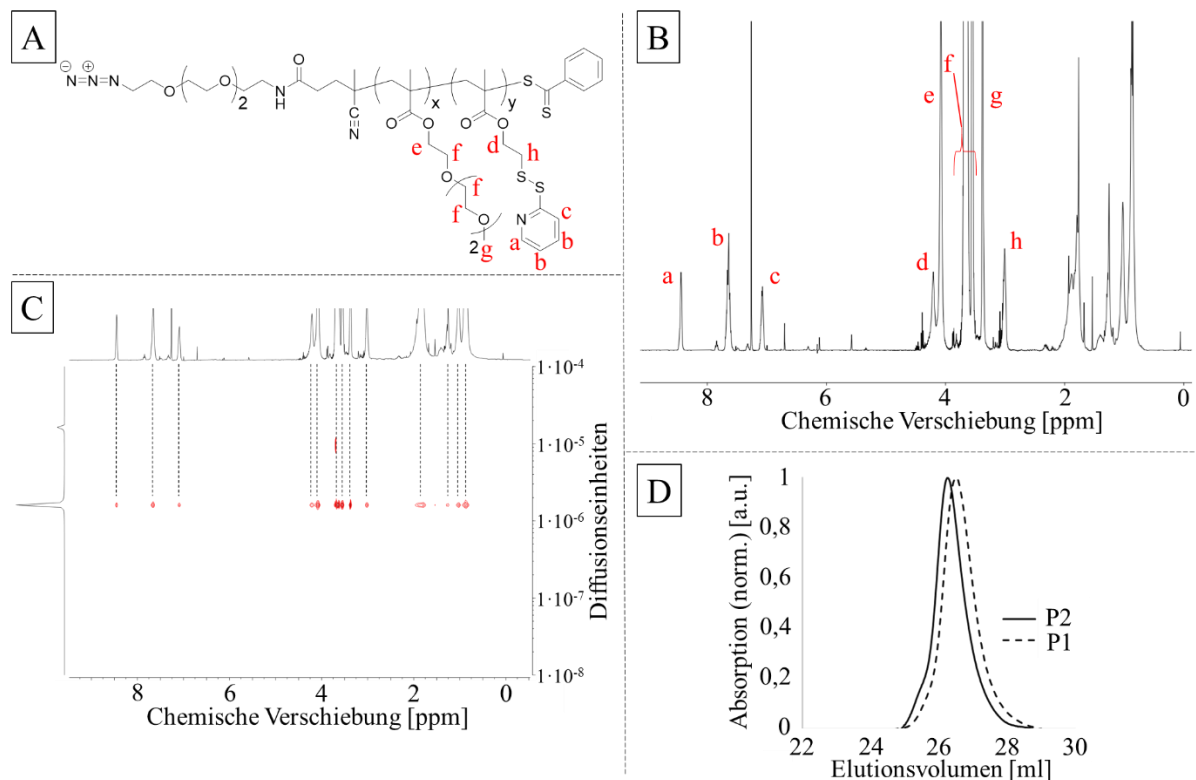


Abbildung 4.13: Charakterisierung der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM) Diblock-Copolymere. A: Allgemeine Struktur von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM). B: ¹H-NMR der Verbindung P2-1 mit zugeordneten Resonanzsignalen. C: DOSY-NMR Spektrum der Verbindung P2-2. D: THF-GPC des Diblock-Copolymers P2-1 (P2) im Vergleich zum eingesetzten Makro-CTA P1-2 (P1).

Zur Berechnung des exakten Polymerisationsgrads des PDSM-Blocks wurde das Protonensignal der Methoxy-Gruppe der MEO₃MA-Wiederholungseinheiten auf den Wert normiert, der der Anzahl an Methoxy-H-Atome des jeweiligen Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-Vorläuferpolymer entsprach. Im Anschluss daran wurde der Polymerisationsgrad des PDSM-Blocks durch Bildung des Durchschnitts über die Integralwerte der PDSM-Signale berechnet. Dazu wurde die Summe der Integralwerte durch die Anzahl der jeweiligen H-Atome pro PDSM-Wiederholungseinheit geteilt.

$$DP_y = \frac{I(a) + I(b) + I(c) + I(d) + I(h)}{8} \quad (4.4)$$

Beide Methoden, die Berechnung des Polymerisationsgrads anhand des Umsatzes der Monomereinheiten und die Berechnung des PDSM-Polymerisationsgrad durch die Analyse des Produkts, lieferten mit hoher Übereinstimmung gleiche Werte für den tatsächlich erzielten Polymerisationsgrad. Das Fehlen der Resonanzsignale der geminalen Wasserstoffatome der PDSM-Doppelbindung, welche typischerweise bei einer chemischen Verschiebung von 5,90 ppm und 5,37 ppm zu finden wären, weist darauf hin, dass die nach dem Ende der Reaktion verbleibende Restmenge des Monomers erfolgreich mittels Präzipitation abgeschieden werden konnte. Um die Diblock-Copolymere weitergehend zu charakterisieren, wurden Polymerproben mittels DOSY-Kernresonanzspektroskopie untersucht. Für das Polymer P2-1 ist das DOSY-Spektrum beispielhaft in Abbildung 4.13 C angeführt. Es ist erkennbar, dass sich alle relevanten Signale, welche den Seitenkettenfunktionen der p(MEO₃MA)- und p(PDSM)-Wiederholungseinheiten zugeordnet werden können, gemeinsam auf einer Horizontalen in einem eng umgrenzten Bereich des Diffusionskoeffizienten befinden. Wie zuvor bei der Synthese des p(MEO₃MA) Homopolymers kann somit eine freie, radikalische Polymerisation von PDSM ausgeschlossen werden, da in diesem Fall Signale der PDSM-Wiederholungseinheit zu erwarten wären, welche nicht auf einer Horizontalen mit den Resonanzsignalen der MEO₃MA-Wiederholungseinheiten angeordnet wären. Wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben, könnten potenzielle radikalische Nebenreaktionen an den PDSM Seitenketten zu Kettenübertragungs- und Kettenabbruchreaktionen und somit ebenfalls zu unerwünschten Nebenprodukten führen. Da jedoch der berechnete Polymerisationsgrad des p(PDSM) Blocks mit dem Erwartungswert übereinstimmt und die Polymersignale des DOSY-Spektrums nur eine kleine Streuung des Wertes des Diffusionskoeffizienten zeigen, kann gefolgert werden, dass auch diese möglichen Nebenreaktionen nicht stattfanden. Anhand von Größenausschlusschromatographie wurde zusätzlich der Umfang der Größenverteilung des jeweiligen Polymers ermittelt. Abbildung 4.13 D zeigt beispielhaft die Überlagerung der Messdaten der THF-GPC des Diblock-Copolymers P2-1 (P2) mit den GPC-Messdaten des zugehörigen Eduktpolymers P1-2 (P1). Beim Vergleich der Elugramme zeigt sich bei dem Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM) Diblock-Copolymer eine Verschiebung der gemessenen Absorption zu niedrigeren Elutionsvolumina. Dies deckt sich mit der erwarteten Beobachtung, da im Allgemeinen eine Zunahme der Kettenlänge eines Polymers zu einer Erhöhung des hydrodynamischen Volumens des Polymerknäuel führt. Hierdurch kann das Polymerknäuel weniger stark mit dem porösen

Säulenmaterial der GPC-Säule interagieren und eluiert zu einem früheren Zeitpunkt. Wie zuvor in Kapitel 3.3.4 beschrieben, kann es durch Polaritätsunterschiede der verschiedenen Polymerblöcke zu abweichendem Knäuelverhalten bei Block-Copolymeren kommen. Da es sich hierdurch sehr schwierig gestaltet eine korrekte Kalibration des Messsystems vorzunehmen, wurde die THF-GPC Messung lediglich zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung der einzelnen Polymer-Proben verwendet. In Tabelle 4.2 sind die Ergebnisse der verschiedenen Methoden der Charakterisierung der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM) Diblock-Copolymere aufgeführt.

Tabelle 4.2: Synthetisierte Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM) Diblock-Copolymere.

| Polymer | Zusammensetzung | M ₀ : CTA: AMDVN | P [%] ^a | M _N ^b [g/mol] | M _N ^c [g/mol] | M _w ^d [g/mol] | Đ ^e |
|-------------|--|-----------------------------------|--------------------|--|--|--|----------------|
| P2-1 | P(MEO ₃ MA) ₄₂ - <i>b</i> -(PDSM) ₁₂ | 15:1:0.2 | 78 | 13300 | 9490 | 11300 | 1,19 |
| P2-2 | P(MEO ₃ MA) ₄₂ - <i>b</i> -(PDSM) ₁₃ | 15:1:0.2 | 82 | 13370 | 8970 | 12090 | 1,18 |
| P2-3 | P(MEO ₃ MA) ₅₂ - <i>b</i> -(PDSM) ₉ | 14:1:0.2 | 61 | 12410 | 10900 | 13120 | 1,20 |
| P2-4 | P(MEO ₃ MA) ₅₂ - <i>b</i> -(PDSM) ₁₀ | 14:1:0.2 | 72 | 12650 | 11080 | 12990 | 1,17 |

^a Umsatz der RAFT-Polymerisation. ^b Zahlenmittel des Molekulargewichts, berechnet anhand des ¹H-NMR-Spektrums. ^c Zahlenmittel des Molekulargewichts, ermittelt anhand der THF-GPC-Daten. ^d Gewichtsmittel des Molekulargewichts, ermittelt anhand der THF-GPC-Daten. ^e Polydispersität des Polymers, berechnet anhand der THF-GPC-Daten.

Die Ergebnisse der Synthese des zweiten Polymerblocks zeigen, dass die Synthese der Diblock-Copolymere unter RAFT-Bedingungen mit einer hohen Kontrolle über die Polymerzusammensetzung durchgeführt werden konnte. Durch geschickte Wahl der Reaktionszeit und des Verhältnisses von CTA zu Monomer konnten die Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM) Diblock-Copolymere auf maßgeschneiderte Art und Weise synthetisiert werden. Es wurden Polymere mit einer sehr engen Verteilung des Molekulargewichts erhalten, welche für die Synthese der Triblock-Copolymere als Makro-CTA eingesetzt werden konnten.

Für die Synthese der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-PFPPMA Triblock-Copolymere wurde wie bei den beiden zuvor durchgeführten Polymerisationsstufen das RAFT-Verfahren angewendet. Auf Grund des eingesetzten Reaktivester-Monomers PFPPMA war hierbei, neben der Entfernung von Sauerstoff aus der Reaktionslösung, das Arbeiten in vollständig trockenem Lösungsmittel essenziell, um die Hydrolyse der Reaktivester-Verbindungen zu unterbinden. Gleichzeitig wurde, ebenso wie zuvor, zum Schutz der Azid-Endgruppe und der reaktiven Disulfid-Seitenketten, mit dem Initiator AMDVN bei einer Reaktionstemperatur von 40 °C gearbeitet.

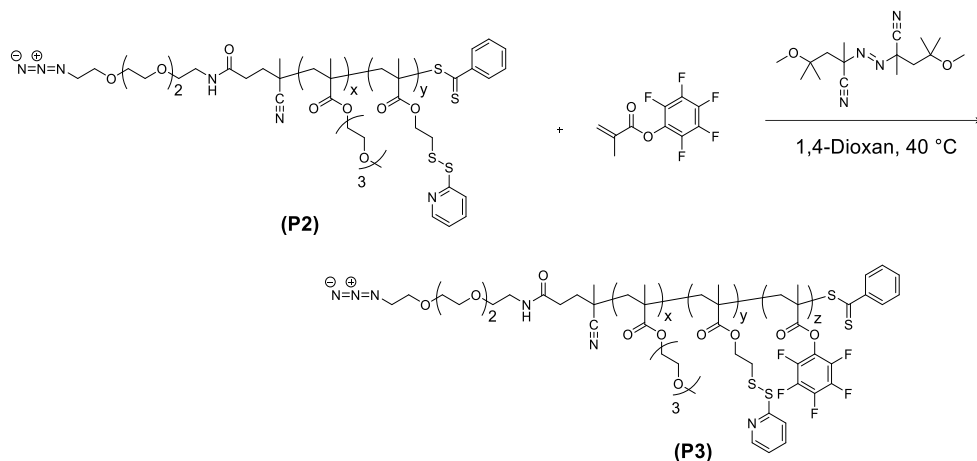


Abbildung 4.14: RAFT-Polymerisation von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA).

Zur Berechnung des jeweiligen Syntheseansatzes wurde, je nach dem Molekulargewicht des eingesetzten Makro-CTAs und des angestrebten Verhältnisses des Anteils des MEO₃MA-Blocks zum PFPMA-Block am gesamten Molekulargewicht, individuell ein erwünschter Monomerumsatz zwischen 40 % und 60 % festgelegt. Erfahrungsgemäß war hierdurch mit Reaktionszeiten zwischen 24 und 48 h zu rechnen. Um den jeweiligen Monomerumsatz im Verlauf der Reaktion zu kontrollieren, wurde in regelmäßigen Abständen eine Probe zur Durchführung eines ¹⁹F-NMRs entnommen (siehe Abbildung 4.15).

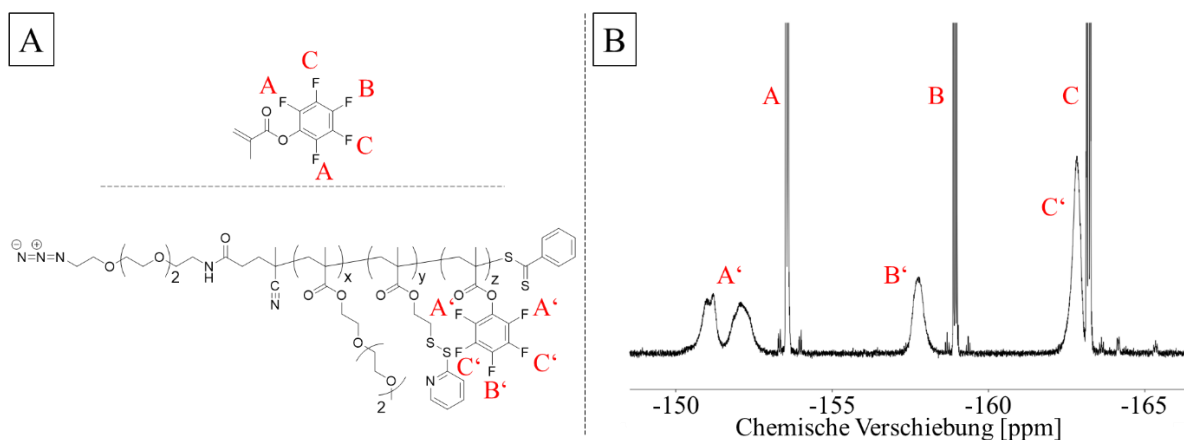


Abbildung 4.15: ¹⁹F-NMR zur Bestimmung des PFPMA-Umsatzes. A: Molekülstruktur von PFPMA und allgemeine Struktur von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA). B: Umsatz-NMR der Verbindung P3-2 mit zugeordneten Fluor-Resonanzsignalen.

Hierbei konnte sehr gut zwischen den Signalen der Verbleibenden Monomer-Moleküle (*A-C*) und den überlagerten Einzelsignalen der PFPMA-Wiederholungseinheiten (*A'-C'*) unterschieden werden. Zur Bestimmung des Umsatzes *P* wurden zunächst die Resonanzsignale, welche den verbliebenen Monomermolekülen zugeordnet werden können, auf die jeweilige Anzahl an Fluoratomen der chemischen Untereinheit des Monomers normiert. Der Umsatz berechnete sich infolgedessen aus dem Quotienten der Summe der Integralwerte der Signale der PFPMA-Wiederholungseinheiten und der Summe aller Integralwerte der ¹⁹F-Resonanz aus Monomer und Polymer.

$$P = \frac{I(A') + I(B') + I(C')}{I(A) + I(A') + I(B) + I(B') + I(C) + I(C')} \quad (4.5)$$

Nach dem Erreichen des gewünschten Umsatzes wurde die Reaktion beendet und das Triblock-Copolymer durch mehrmalig Präzipitation der Reaktionslösung gegen eine Mischung aus n-Hexan und Diethylether isoliert und anschließend im Hochvakuum von Lösungsmittelresten befreit. Wie in den zuvor durchgeführten Synthesestufen erfolgte die Charakterisierung der Polymere mittels verschiedener Methoden der NMR-Spektroskopie und mittels THF-GPC (siehe Abbildung 4.16).

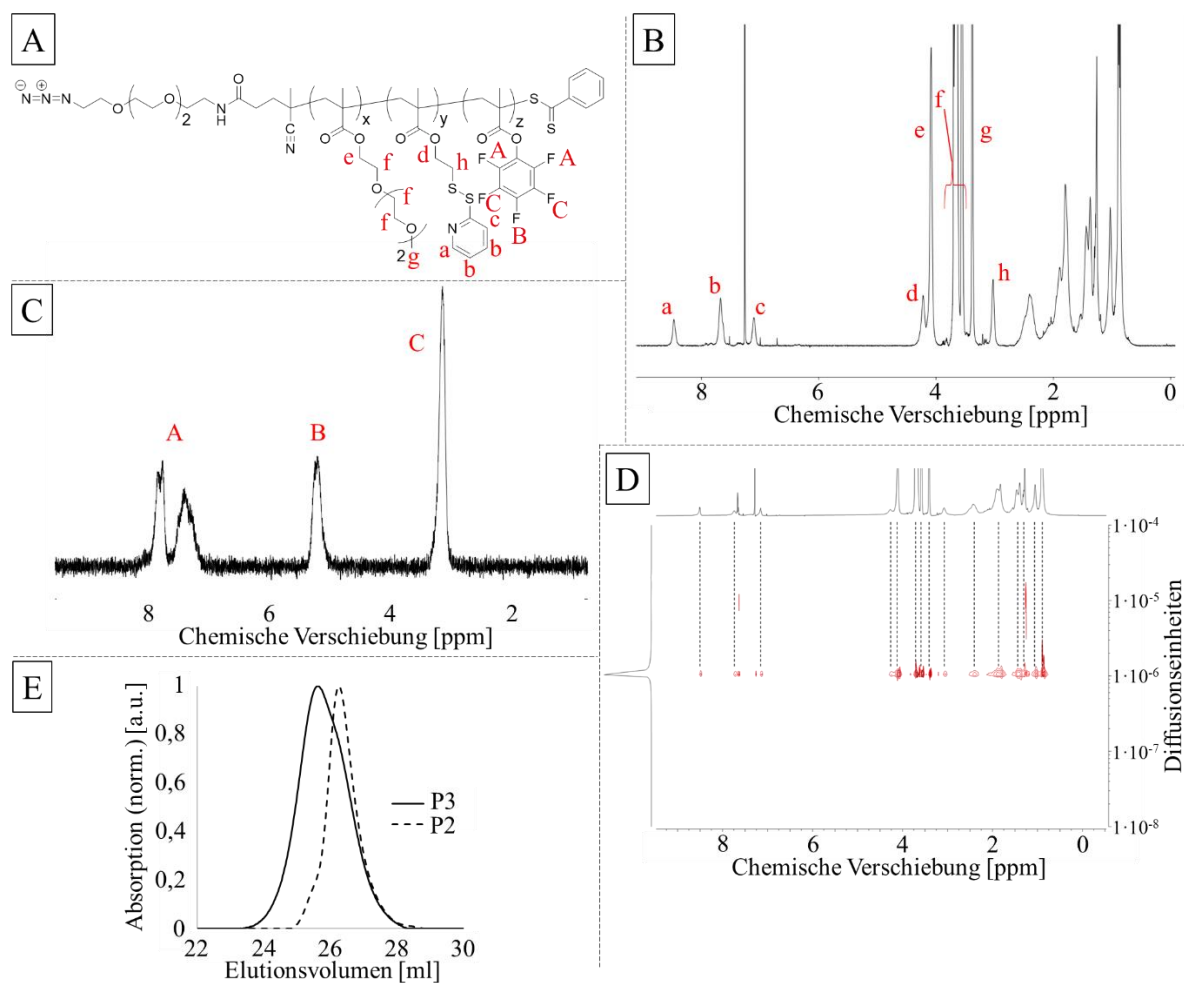


Abbildung 4.16: Charakterisierung der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(PFPMA) Triblock-Copolymere. A: Allgemeine Struktur der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(PFPMA) Polymere. B: ¹H-NMR von P3-2 mit Signalzuordnung. C: ¹⁹F-NMR der Verbindung P3-2 mit Signalzuordnung. D: DOSY-NMR Spektrum von P3-2. E: THF-GPC des Triblock-Copolymers P3-2 (P3) im Vergleich zum eingesetzten Makro-CTA P2-1 (P2).

Abbildung 4.16 B zeigt das ¹H-NMR Spektrum der Triblock-Copolymer-Verbindung P3-2. Es konnte auf Grund der Überlagerung der Signale des Polymerrückgrats und der fehlenden Wasserstoffatome der PFPMA-Seitenkette mit dieser Messmethode zwar keine Berechnung des Polymerisationsgrads vorgenommen werden. Es war jedoch möglich zu kontrollieren, ob das Verhältnis zwischen den Signalen der Seitenketten des ersten und des zweiten Blocks mit den aus der Diblock-Copolymerisation berechneten Werten übereinstimmte oder ob es zu großen anteiligen Verlusten der PDSM-Seitenkettenfunktion kam. Hierzu wurde das Signal g auf den Integralwert normiert, welcher der

numerischen Anzahl an Wasserstoffatomen der Methoxy-Funktionen des jeweiligen p(MEO₃MA)-Blocks entsprach. Bei allen untersuchten Polymeren zeigte die Integration der weiteren Signale der p(MEO₃MA)-Seitenkettenfunktionen, dass im Rahmen der Messgenauigkeit der Kernresonanzspektroskopie keine Abnahme der Anzahl der PDSM-Seitenkettenfunktionen messbar war. Dies gibt einen guten Hinweis darauf, dass es während der RAFT-Synthese des dritten Polymerblocks ebenfalls zu keinen relevanten Nebenreaktionen an den PFPMA-Seitenketten kam. Das Fehlen der zwei charakteristischen Resonanzsignale der geminalen Wasserstoffatome an der Doppelbindung von PFPMA zeigt zudem, dass mittels der konsekutiven Präzipitationsschritte die nach dem Ende der Reaktion verbliebene, nicht umgesetzte Restmenge an PFPMA vollständig aus dem Produktpolymer entfernt werden konnte. Diese Vermutung wird ebenso durch das ¹⁹F-NMR der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymere belegt, was in Abbildung 4.16 C beispielhaft durch das ¹⁹F-NMR des Polymers P3-2 verdeutlicht wird. Hier können keine Fluor-Resonanzsignale gefunden werden, welche den Seitengruppen des Monomers PFPMA zugeordnet werden könnten. Das entsprechende DOSY-NMR dieser Verbindung (siehe Abbildung 4.16 D) zeigt zudem, dass sich alle Signale, die den Seitengruppen des ersten und zweiten Polymerblocks zuzuordnen sind, auf einer Horizontalen mit nur enger Verteilung der Resonanzsignale über einen kleinen Bereich des Diffusionskoeffizienten angeordnet sind. Da zusätzlich keine weiteren Resonanzsignale zu finden sind, welche einem oligomeren p(PFPMA)-Methacrylat-Rückgrat zugeordnet werden könnten, kann ausgeschlossen werden, dass es zu einer konkurrierenden Polymerisationsreaktion des Monomers auf Grund von freier, radikalischer Polymerisation kam. Auf Grund der engen Signalverteilung kann zudem das Auftreten von Vernetzungs- und Kettenübertragungsreaktionen ausgeschlossen werden. Da das DOSY-NMR keine eindeutig identifizierbaren Resonanzsignale des PFPMA-Blocks abbilden kann, drückt sich der Kettenzuwachs des Polymers lediglich in einer detektierbaren Veränderung der Diffusionskoeffizienten der Verbindung aus, wenn man die DOSY-NMRs des Triblock-Copolymers und des entsprechenden Eduktpolymers einander gegenüberstellt (siehe Abbildung 4.17)

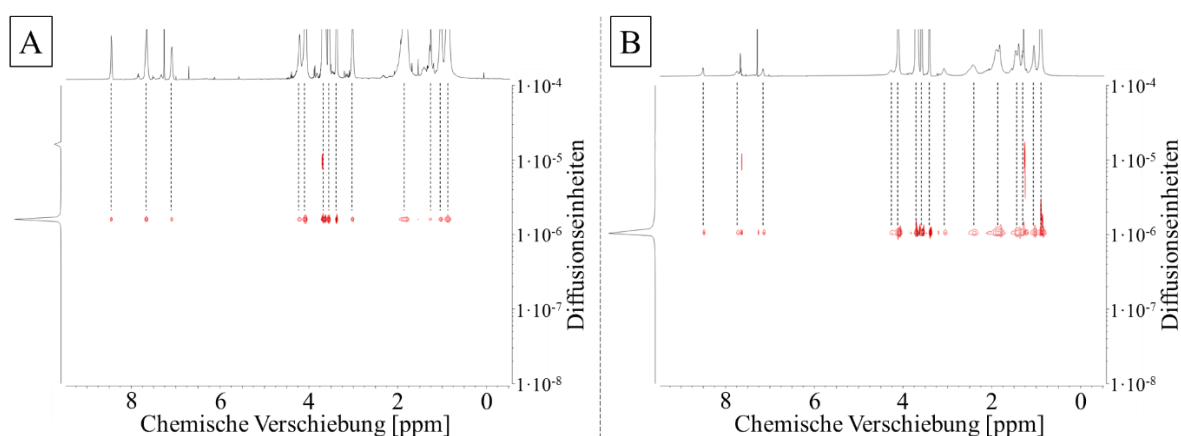


Abbildung 4.17: Vergleich der DOSY-NMRs eines Di- und Triblock-Copolymers. A: DOSY-NMR des Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM) Diblock-Copolymers P2-1. B: DOSY-NMR des Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymers P3-2.

Da im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des Polymers keine Signale eindeutig den PFPMA-Wiederholungseinheiten zugeordnet werden können und das $^{19}\text{F-NMR}$, mangels zur Referenz nutzbarer Fluor-Signale keine Möglichkeit zur Berechnung des Polymerisationsgrads des dritten Blocks zulässt, wurde zur Bestimmung des Polymerisationsgrads DP_z der aus dem Umsatz-NMR berechnete Monomerumsatz P herangezogen:

$$DP_z = e(M_0) \cdot P \quad (4.6)$$

Dabei bezeichnet $e(M_0)$ die für die Reaktion eingesetzte Äquivalentzahl des Monomers PFPMA, bezogen auf die eingesetzte Menge des Makro-CTAs. Zur weiteren Charakterisierung der synthetisierten Triblock-Copolymere wurden Polymerproben mittels THF-GPC untersucht. Abbildung 4.16 E verdeutlicht anhand der Überlagerten Elugramme des Triblock-Copolymers P3-2 und des zugehörigen Eduktpolymers P2-1 beispielhaft den unterschiedlichen Verlauf der beiden Messkurven. Es ist erkennbar, dass der Verlauf der Absorptionskurve des Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymers zu deutlich kleineren Elutionsvolumina verschoben ist. Wie bereits bei der Charakterisierung der Diblock-Copolymere erläutert, bedeutet dies, dass eine allgemeine Zunahme des hydrodynamischen Volumens des Polymers durch die Synthese des p(PFPMA)-Blocks messbar ist. Dies entspricht auch der intuitiven Erwartung. Betrachtet man den Kurvenverlauf des Elugramms von P3-2 genauer, so lässt sich erkennen, dass, genau wie bei der entsprechenden polymeren Vorstufe, weder ein ausgeprägtes, flaches Auslaufen der Kurve bei hohen Elutionsvolumina, noch eine Schulter oder zweite Mode bei niedrigen Elutionsvolumina auftritt. Dies verdeutlicht erneut, dass es bei der Polymerisation nicht zur Bildung von Oligomeren kam, die eine Ausdehnung des Kurvenverlaufs in den Bereich hoher Elutionsvolumina zur Folge hätten. Ebenso kam es nicht zu Dimerisierung oder Vernetzungsreaktionen an den PDSM-Seitengruppen, was zu einer deutlichen, anteiligen Verbreiterung des Kurvenverlaufs zu einer Schulter oder einem zweiten Absorptionsmaximum im Bereich sehr niedriger Elutionsvolumina geführt hätte. Wie bereits bei der zweiten Reaktionsstufe angeführt, können die Messdaten der THF-GPC auf Grund der fehlenden Möglichkeit zur Kalibrierung auf das Triblock-Copolymer-System keine verlässlichen Daten zu den tatsächlichen mittleren Molekulargewichten liefern. Aus diesem Grund wurde lediglich die berechnete Polydispersität als Bewertungskriterium der GPC-Daten näher betrachtet. Zusammengefasst werden die Ergebnisse der Charakterisierung der hergestellten Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymere in Tabelle 4.3 aufgeführt.

Tabelle 4.3: Synthetisierte Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymere.

| Polymer | Zusammensetzung | M ₀ : CTA: AMDVN | P [%] ^a | M _N ^b [g/mol] | M _N ^c [g/mol] | M _w ^d [g/mol] | Đ ^e |
|-------------|--|-----------------------------------|--------------------|--|--|--|----------------|
| P3-1 | P(MEO ₃ MA) ₄₂ - <i>b</i> -P(PDSM) ₁₂ - <i>b</i> -P(PFPMA) ₃₃ | 92:1:0.2 | 36 | 21620 | 14890 | 18840 | 1,27 |
| P3-2 | P(MEO ₃ MA) ₄₂ - <i>b</i> -P(PDSM) ₁₂ - <i>b</i> -P(PFPMA) ₃₅ | 92:1:0.2 | 38 | 22120 | 15350 | 19860 | 1,29 |
| P3-3 | P(MEO ₃ MA) ₄₂ - <i>b</i> -P(PDSM) ₁₂ - <i>b</i> -P(PFPMA) ₃₃ | 92:1:0.2 | 36 | 21620 | 13440 | 17710 | 1,32 |
| P3-4 | P(MEO ₃ MA) ₄₂ - <i>b</i> -P(PDSM) ₁₂ - <i>b</i> -P(PFPMA) ₂₈ | 92:1:0.2 | 31 | 20360 | 14800 | 19750 | 1,33 |
| P3-5 | P(MEO ₃ MA) ₄₂ - <i>b</i> -P(PDSM) ₁₃ - <i>b</i> -P(PFPMA) ₄₉ | 116:1:0.2 | 42 | 25650 | 15930 | 21600 | 1,36 |
| P3-6 | P(MEO ₃ MA) ₄₂ - <i>b</i> -P(PDSM) ₁₃ - <i>b</i> -P(PFPMA) ₅₀ | 116:1:0.2 | 44 | 25910 | 16040 | 20930 | 1,31 |
| P3-7 | P(MEO ₃ MA) ₄₂ - <i>b</i> -P(PDSM) ₁₃ - <i>b</i> -P(PFPMA) ₈₈ | 203:1:0.2 | 43 | 35490 | 19800 | 26760 | 1,35 |
| P3-8 | P(MEO ₃ MA) ₄₂ - <i>b</i> -P(PDSM) ₁₃ - <i>b</i> -P(PFPMA) ₁₀₁ | 240:1:0.2 | 42 | 38770 | 23420 | 32300 | 1,38 |

^a Umsatz der RAFT-Polymerisation. ^b Zahlenmittel des Molekulargewichts, berechnet anhand des ¹H-NMR-Spektrums. ^c Zahlenmittel des Molekulargewichts, ermittelt anhand der THF-GPC-Daten. ^d Gewichtsmittel des Molekulargewichts, ermittelt anhand der THF-GPC-Daten.

^e Polydispersität des Polymers, berechnet anhand der THF-GPC-Daten.

Vergleicht man die anhand der THF-GPC ermittelten Daten für die Polydispersität der Triblock-Copolymere mit den Polydispersitäten der jeweiligen Eduktpolymere (siehe Tabelle 4.2), so deuten die Messdaten zunächst auf eine merkliche Erhöhung der Molekulargewichtsverteilung nach der Synthese des dritten Polymerblocks. Da sich die unterschiedlichen Polymerblöcke jedoch chemisch sehr stark unterscheiden, bedarf dieser Sachverhalt einer näheren Betrachtung. Zum einen kann es durch Unterschiede in der Polarität der verschiedenen Polymerblöcke zu einer Intramolekularen Phasenseparation kommen. Abhängig von der jeweiligen Zusammensetzung des Polymers beeinflusst dieser Faktor den hydrodynamischen Radius des gelösten Polymerknäuels. Zum anderen besitzen die

PFPPMA-Wiederholungseinheiten die Möglichkeit, über die Wechselwirkung der delokalisierten π -Elektronen zweier oder mehrerer aromatischer Pentafluorphenyl-Ringe, das sogenannte π - π -stacking, stabilisierte Sekundärstrukturen zu bilden. Dies führt ebenfalls zu einer Veränderung des Knäuelverhaltens des Triblock-Copolymers und somit zu einer Entwicklung des hydrodynamischen Radius, welche nicht zwingend proportional zum Polymerisationsgrad des dritten Polymerblocks verlaufen muss. Diese Faktoren könnten einzeln, oder gemeinschaftlich dafür verantwortlich sein, dass eine entsprechende Erhöhung der Polydispersität gemessen wurde. Ob die getroffene Beobachtung lediglich auf die angeführten Effekte zurückgeht, oder es tatsächlich durch unbekannte Faktoren zu einer erheblichen Erhöhung der Polydispersität kam, wurde anhand der THF-GPC Messungen nach der Substitution der PFPPMA-Seitengruppen im späteren Verlauf dieser Arbeit aufgeklärt.

Insgesamt kann jedoch geschlossen werden, dass anhand der verschiedenen Methoden der Kernresonanzspektroskopie dargelegt werden konnte, dass die Polymerisation des dritten Blocks mit einer sehr hohen Kontrolle über den Monomerumsatz vollzogen werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass durch entsprechende Wahl der Reaktionsparameter reproduzierbare Ergebnisse erzielt und eine große Anzahl verschiedener Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymere auf maßgeschneiderte Art und Weise hergestellt werden konnten.

Als nächster Syntheseschritt folgte die Deaktivierung der reaktiven Benzothioat-Endgruppen der synthetisierten Triblock-Copolymere. Dies wurde als unerlässlicher Schritt erachtet, da es durch Degradation der reaktiven Benzothioat-Endgruppe zur Bildung von Thiol-terminierten Triblock-Copolymeren kommen kann, welche mit den reaktiven Disulfid-Gruppen der PDSM-Wiederholungseinheiten in einer vernetzenden Disulfid-Austauschreaktion reagieren könnten. Zudem kann es an der reaktiven RAFT-Endgruppe durch Redox-Reaktionen in nachfolgenden biologischen Experimenten zu einer Erhöhung der Toxizität kommen. Aus diesen Gründen wurde in einer ersten polymeranalogen Modifikation die Benzothioat-Endgruppe in einer radikalischen Reaktion deaktiviert. Hierfür wurde, wie bereits im ersten Teil dieser Dissertation beschrieben, das Triblock-Copolymer mit einem Überschuss von AMDVN umgesetzt (siehe Abbildung 4.18).

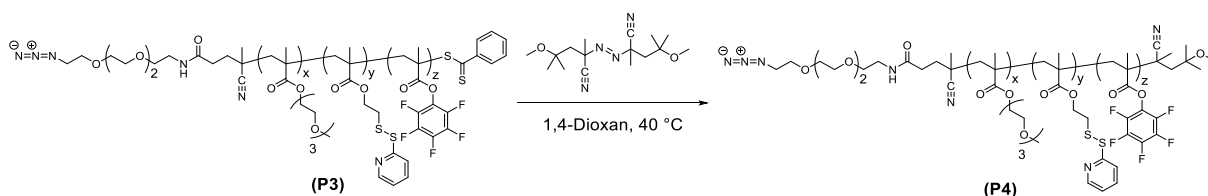


Abbildung 4.18: Deaktivierung der reaktiven RAFT-Endgruppe mittels AMDVN.

Das jeweilige Triblock-Copolymer wurde in frisch über Natrium getrocknetem 1,4-Dioxan unter Argon-Atmosphäre gelöst. Nach der Zugabe von 15 molaren Äquivalenten AMDVN wurde die Reaktionslösung mit Hilfe des *freeze-pump-thaw* Verfahrens entgast. Die Reaktion wurde bei einer Temperatur von 40 °C durchgeführt und mittels UV/Vis-Spektroskopie kontrolliert. Anhand der Erfahrungen der Triblock-Copolymersynthese, die im ersten Teil dieser Dissertation beschrieben wurde,

um das Risiko für Nebenreaktionen weiter zu senken, die Zugabe von AMDVN gestaffelt. Bei Reaktionsstart wurden etwa zwei Drittel der Gesamtmenge an AMDVN zugegeben, nach etwa 12-14 Stunden erfolgte die Zugabe der Restmenge.

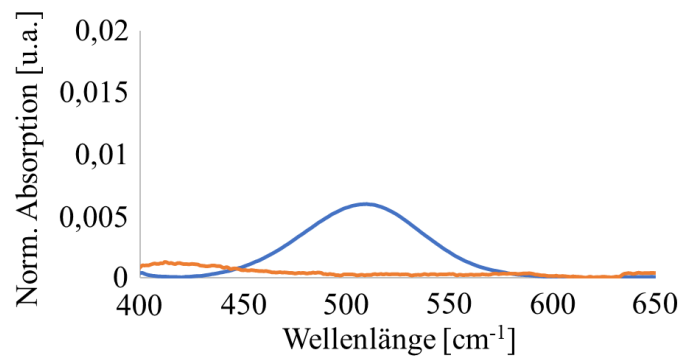


Abbildung 4.19: UV/Vis-Spektrogramm der 1,4-Dioxan haltigen Polymerlösungen. Rote Kurve: Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymer vor der Substitution der reaktiven Benzothioat-Endgruppe. Blaue Kurve: Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymer nach der Substitution der reaktiven Benzothioat-Endgruppe.

Abbildung 4.19 zeigt den Vergleich der UV/Vis-Absorptionssignale vor (rote Kurve) und nach (blaue Kurve) der Deaktivierung der reaktiven Benzothioat-Endgruppe. Im Verlauf von 14-48 h entfärbte sich die zunächst hellrote Reaktionslösung. Dies äußerte sich im Spektrogramm der Reaktionslösung mit dem Verschwinden der charakteristischen Absorptionsbande der Benzothioatgruppe bei einer Wellenlänge von 510 nm. Die Reaktion wurde jeweils so lange durchgeführt, bis mittels UV/Vis-Spektroskopie kein Beitrag der RAFT-Endgruppe zur Lichtabsorption mehr nachgewiesen werden konnte. Die Reaktion wurde daraufhin beendet und das Polymer durch Präzipitation gegen n-Hexan und anschließende Vakuumtrocknung isoliert. Anhand von Kernresonanzspektroskopie und THF-GPC erfolgte im Anschluss die Charakterisierung der Triblock-Copolymere (siehe Abbildung 4.20).

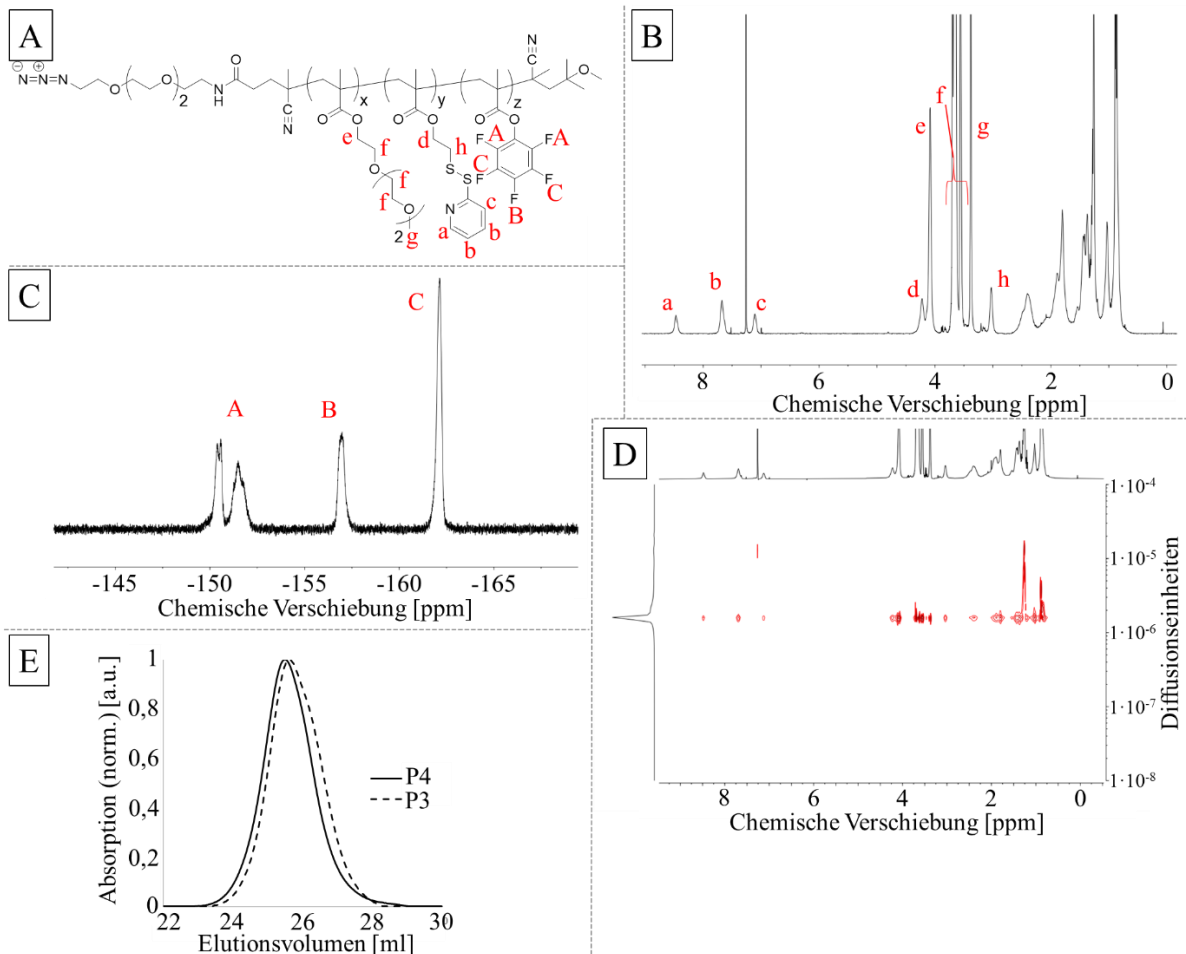


Abbildung 4.20: Charakterisierung der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(PFPMA) Triblock-Copolymere nach der Deaktivierung der reaktiven Benzothioat-Endgruppe. A: Allgemeine Struktur der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(PFPMA) Polymere mit substituiertes Endgruppe. B: ¹H-NMR Spektrum der Verbindung P4-2 mit Signalzuordnung. C: ¹⁹F-NMR Spektrum der Verbindung P4-2 mit Signalzuordnung. D: DOSY-NMR Spektrum von P4-2. E: THF-GPC der Verbindung P4-2 (P4) im Vergleich zu der Triblock-Copolymer-Verbindung P3-2 (P3) vor der Deaktivierung der reaktiven RAFT-Endgruppe.

Zunächst wurde eine Charakterisierung des Triblock-Copolymers mittels ¹H-NMR Spektroskopie vorgenommen (siehe Abbildung 4.20 B). Bedingt durch die hohe Konzentration an AMDVN, kann es bei dieser Reaktion theoretisch zu Nebenreaktionen der AMDVN-Radikale an den Disulfid-Seitenketten der Triblock-Copolymere kommen. Um dies auszuschließen, wurde das Integral des Resonanzsignals g, welches durch die Resonanz der Wasserstoffatome der Methoxy-Gruppen der MEO₃MA-Wiederholungseinheiten verursacht wird, normiert. Dabei wurde, wie zuvor bereits beschrieben, der Integralwert auf die Anzahl der Entsprechenden Wasserstoffatome normiert, die anhand des berechneten Polymerisationsgrad des dritten Blocks zu erwarten war. Die Integration der anderen Resonanzsignale, welche den Seitenkettenfunktionen des ersten und zweiten Polymerblock zugeordnet werden können, zeigte, dass einige Polymere eine Verringerung des mittleren Integralwerts der Signale des zweiten Blocks aufwiesen. Dieser entsprach in etwa dem Erwartungswert von 1-3 PDSM-Seitenketten. Durch engere Reaktionskontrolle und Erhöhung der Staffelung der Zugabe konnte diese Beobachtung bei den jüngeren Reaktionsansätzen nicht mehr gemacht werden. Es ist jedoch auch fraglich, inwiefern im Rahmen der Messgenauigkeit der Kernresonanzspektroskopie ein relativer Fehler bei der nachträglichen

Berechnung der Kettenlänge miteinbezogen werden muss. Die Untersuchung der Polymerproben mittels DOSY-NMR Spektroskopie (siehe als Beispiel Abbildung 4.20 D) ergab, dass auch hier, wie bei der vorherigen Reaktionsstufe, alle Signale der Polymerseitenkettenfunktionen auf einer Horizontalen mit sehr eng umgrenzter Verteilung des Diffusionskoeffizienten angeordnet waren. Die allgemein sehr geringe Signalstreuung deutete darauf hin, dass es bei der Deaktivierung der reaktiven Benzothioatgruppen zu keiner detektierbaren Di- oder Oligomerisierung über die reaktiven Disulfid-Funktionen des PDSM-Blocks kam. Anhand von THF-GPC Messungen wurde im weiteren Verlauf der Polymercharakterisierung die Größenverteilung der Polymere gemessen. Abbildung 4.20 E zeigt die Überlagerung der THF-GPC Messdaten des Polymers P4-2 (P4) und dem entsprechenden Eduktpolymer P3-2 (P3). Man kann erkennen, dass es beim Vergleich der Triblock-Copolymere vor und nach der Deaktivierung der reaktiven Benzothioatgruppen lediglich zu einer geringfügigen Verschiebung des Kurvenverlaufs kam. Dies zeigt, dass die Endgruppe der Polymere wie zu erwarten lediglich einen geringfügigen Einfluss auf das hydrodynamische Volumen des Polymerknäuels hat. Die hohe Homologie der beiden Elugramme von P3-2 und P4-2 belegt des Weiteren, dass es durch die hohe Konzentration an AMDVN zu keiner Messbaren Di- oder Oligomerisierung kam. Tabelle 4.4 zeigt die Ergebnisse der Charakterisierung der verschiedenen Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymere nach der Deaktivierung der reaktiven Benzothioatgruppe.

Tabelle 4.4: Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymere nach Deaktivierung der CTA-Endgruppe.

| Polymer | DP _x ^a | DP _y ^b | DP _z ^c | M _N ^d [g/mol] | M _N ^e [g/mol] | M _w ^f [g/mol] | Đ ^g |
|-------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------|
| P4-1 | 42 | 12 | 33 | 21610 | 15590 | 21360 | 1,37 |
| P4-2 | 42 | 12 | 35 | 22110 | 17480 | 22930 | 1,31 |
| P4-3 | 42 | 12 | 33 | 21610 | 14800 | 20210 | 1,37 |
| P4-4 | 42 | 12 | 28 | 20350 | 13150 | 19390 | 1,47 |
| P4-5 | 42 | 13 | 49 | 25640 | 16770 | 22960 | 1,37 |
| P4-6 | 42 | 13 | 50 | 25890 | 16070 | 21860 | 1,36 |
| P4-7 | 42 | 13 | 101 | 38750 | 21810 | 31210 | 1,43 |

^a Polymerisationsgrad des p(MEO₃MA)-Blocks. ^b Polymerisationsgrad des p(PDSM)-Blocks. ^c Polymerisationsgrad des p(PFPMA)-Blocks. ^d Zahlenmittel des Molekulargewichts, berechnet anhand des ¹H-NMR-Spektrums. ^e Zahlenmittel des Molekulargewichts, ermittelt anhand der THF-GPC-Daten. ^f Gewichtsmittel des Molekulargewichts, ermittelt anhand der THF-GPC-Daten. ^g Polydispersität des Polymers, berechnet anhand der THF-GPC-Daten.

Beim Vergleich der Ergebnisse der Charakterisierung der Polymere vor und nach der Deaktivierung der Benzothioatgruppe (P3 und P4) ist im Allgemeinen eine leichte Erhöhung des Polydispersitätsindex erkennbar (vergl. Tabelle 4.3 und Tabelle 4.4).

Dies könnte darauf hinweisen, dass es vereinzelt zu Nebenreaktionen der reaktiven Disulfidgruppen gekommen sein könnte, wodurch die Größenverteilung leicht beeinflusst wurde. Zudem würde diese Beobachtung die Ergebnisse der ¹H-NMR-Spektroskopie stützen, wonach ein leichter Verlust der PDSM-Seitengruppen bei einigen Polymeren messbar war. Andererseits könnte die leichte Erhöhung

des PDI auch mit der Veränderung der Polymer-Endgruppe und damit Änderungen im Knäuelverhalten zusammenhängen. Da der Effekt der Erhöhung des PDI insgesamt jedoch nur in sehr geringem Maße auftrat, wurden die beim Ansatz und der Reaktionsführung getroffenen Maßnahmen zur Vermeidung der Nebenreaktionen wie beschrieben geändert und anderweitig als ausreichend betrachtet. Zudem zeigte das DOSY-NMR Spektrum der Triblock-Copolymere (siehe Abbildung 4.20 D) jeweils lediglich eine identifizierbare, diffundierende Polymerspezies. Der Einfluss etwaiger radikalischer Degradation oder Dimerisierungen kann demnach als verschwindend gering eingestuft werden. Die leichte Verbreiterung des PDI kann zudem auch mit dem zu erwartenden, geringfügig geänderten Knäuelverhalten der Polymere in THF zusammenhängen.

Insgesamt kann geschlossen werden, dass mittels dreier sukzessiver RAFT-Polymerisationsstufen und der Deaktivierung der reaktiven RAFT-Endgruppe Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymere mit sehr hoher Kontrolle über die Zusammensetzung und das Molekulargewicht synthetisiert werden konnten. Dieses neue Polymersystem besitzt durch seine drei reaktiven Untereinheiten, der Azid-Endgruppe, reaktiven Disulfid-Seitenketten und Reaktivester-Seitenketten eine hohe Modifizierbarkeit und kann nach Wunsch an den entsprechenden Kettenfunktionen durch einfache Reaktionen angepasst werden. Dabei verhalten sich die jeweiligen reaktiven Gruppen orthogonal zueinander und können ohne die Gefahr von Kreuzreaktivität individuell modifiziert werden. Diese Kombination reaktiver Funktionalitäten ist ein Novum und bietet nahezu endlose Möglichkeiten zur maßgeschneiderten, individuellen Anpassung des jeweiligen Triblock-Copolymers. Da für die weitere Verwendung zur Assemblierung von Polyplexen polykationische Triblock-Copolymere benötigt wurden, wurde der p(PFPMA)-Block in polymeranalogen Reaktionen mit asymmetrischen Di- und Triaminen umgesetzt.

4.3.5 Synthese von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA) Triblock-Copolymeren

Zur Modifikation des p(PFPMA)-Blocks wurden die synthetisierten Triblock-Copolymere mit verschiedenen Aminen zur Reaktion gebracht. Da zur Bildung von Polyplexen eine Polymerstruktur benötigt wird, welche unter physiologischen Bedingungen teilweise oder vollständig protoniert vorliegt, wurden hierfür ein asymmetrisches Diamin verwendet. Dieses wurde bei einer moderaten Reaktionstemperatur von 40°C und unter Einsatz stöchiometrischer Mengen an TEA mit dem jeweiligen Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Polymer umgesetzt. Um ein Polymer zu erhalten, welches ähnliche Eigenschaften wie das im ersten Teil dieser Dissertation dargestellte Triblock-Copolymer haben sollte, wurde zunächst das asymmetrische Diamin N,N-Dimethylethylendiamin (DMEDA) eingesetzt (siehe Abbildung 4.21). Unter physiologischen pH-Bedingungen liegen die tertiären Aminogruppen von DMEDA unter nahezu vollständig protoniert vor. Dies sollte eine effektive

Komplexierung von Nukleinsäuren ermöglichen und dient als Vergleichsgröße zu den in Teil 1 synthetisierten Polymeren.

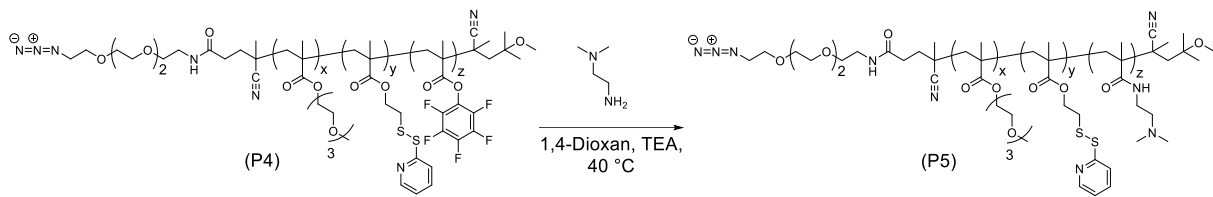


Abbildung 4.21: Amidierungsreaktion der PFPMA-Seitengruppen mit DMEDA.

Durch die Amidierungsreaktion wurde somit als dritte Untereinheit des Copolymers ein Block mit der Wiederholungseinheit N-[2-(N,N-Dimethylethylendiamino)] Methacrylamide (DMEDAMA) erhalten, welcher analog zu dem dritten Block der Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMAEMA) Triblock-Copolymere in physiologischen Medien als polykationischer Block vorliegt. Hierfür wurde das jeweilige Triblock-Copolymer in frisch getrocknetem und entgastem 1,4-Dioxan unter Argon-Atmosphäre gelöst. Nach der Zugabe von DMEDA und TEA wurde nach 14-18 h der Reaktion eine Probe zur Messung eines ¹⁹F-NMRs entnommen, um den Umsatz der Amidierungsreaktion berechnen zu können. Nach Bedarf erfolgte die weitere Zugabe von DMEDA und TEA und weitere Umsatzkontrollen mittels ¹⁹F-Kernresonanzspektroskopie. (siehe Abbildung 4.22).

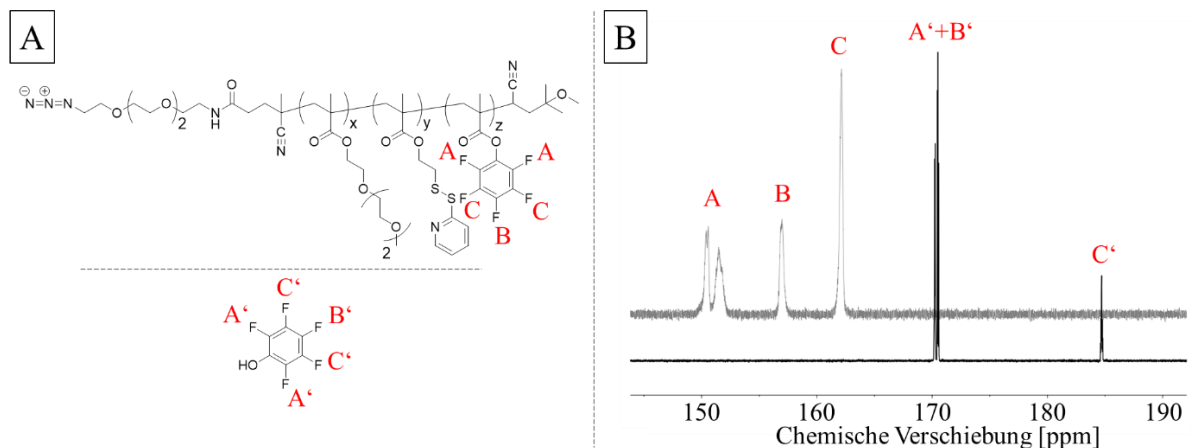


Abbildung 4.22: ¹⁹F-NMR zur Kontrolle des Umsatzes der PFPMA-Seitenketten. A: Allgemeine Struktur der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymere und von Pentafluorophenol. B: Überlagerung der ¹⁹F-NMRs der Reaktionslösung von P5-1 zu Beginn und am Ende der Reaktion.

Dabei entsprechen die Resonanzsignale A-C den Fluoratomen der PFPMA-Seitenkette und die Signale A'-C' den Fluoratomen des Spaltprodukts Pentafluorophenol. Nachdem im Umsatz-NMR ein vollständiger Umsatz der PFPMA-Seitenketten festgestellt werden konnte, wurde die Reaktion beendet und das Polymer durch mehrere, sukzessive Präzipitationsschritte und anschließender Lyophilisation isoliert und aufgereinigt. Die Charakterisierung der Polymere erfolgte mittels NMR-Spektroskopie und THF-GPC.

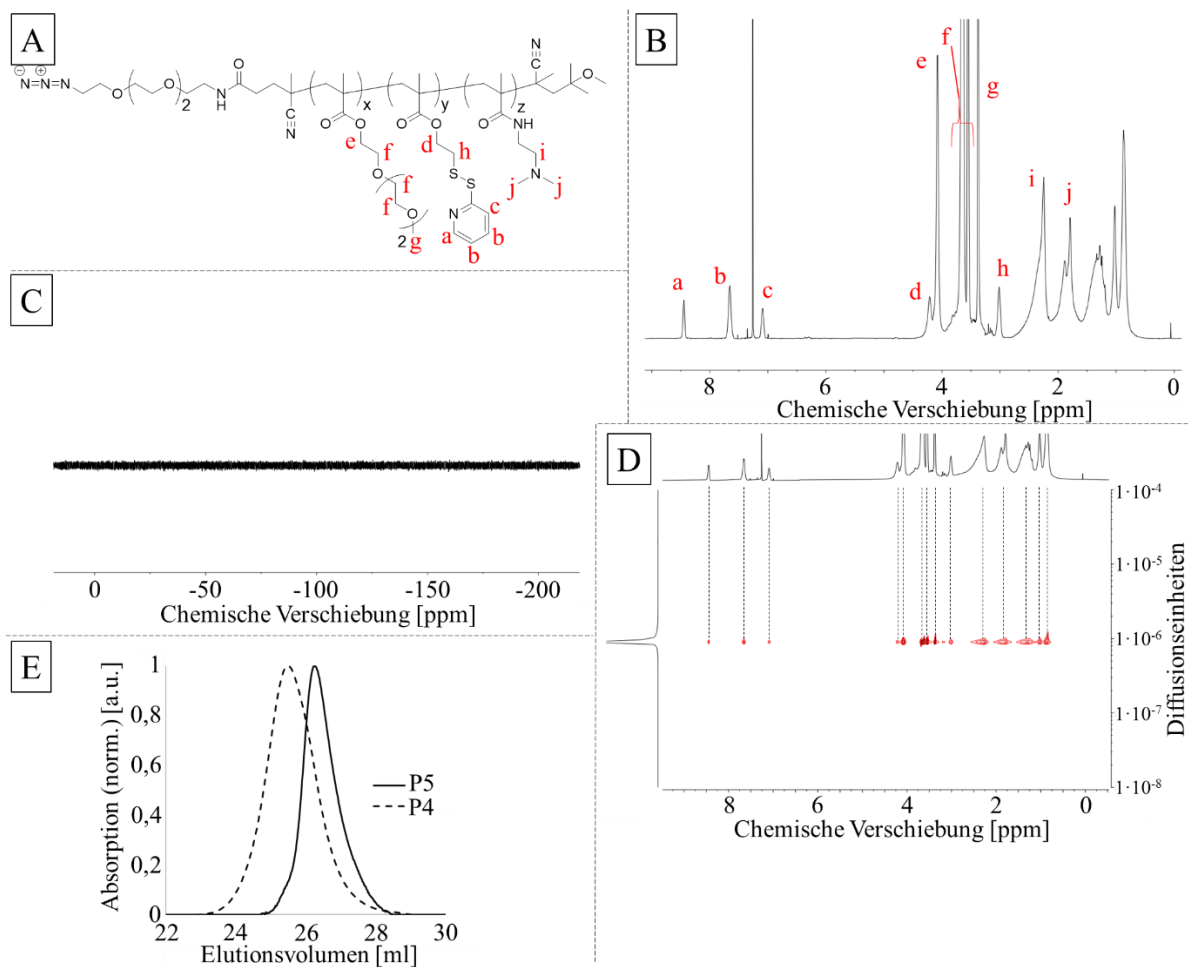


Abbildung 4.23: Charakterisierung der synthetisierten Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA) Triblock-Copolymere. A: Allgemeine Struktur der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA) Triblock-Copolymere. B: ¹H-NMR Spektrum der Verbindung P5-1 und Zuordnung der Resonanzsignale. C: ¹⁹F-NMR Spektrum der Verbindung P5-1. D: DOSY-NMR Spektrum des Triblock-Copolymers P5-1. E: Eluogramm der THF-GPC der Verbindung P5-1 (P5) im Vergleich zur entsprechenden Eduktverbindung P4-3 (P4).

In Abbildung 4.23 wird die Charakterisierung der synthetisierten Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA) Triblock-Copolymere beispielhaft anhand des Polymer P5-1 dargelegt. Abbildung 4.23 A zeigt dabei das ¹H-NMR der Verbindung. Im Vergleich zum ¹H-NMR des Eduktpolymers ist im Bereich von etwa 1,50 ppm bis etwa 2,75 ppm das Auftauchen der zusätzlichen Resonanzsignale *i* und *j* zu beobachten, welche den Wasserstoffatomen der CH₂-Gruppe in Nachbarschaft des Stickstoffatoms und den CH₃-Substituenten am Stickstoffatom zugeordnet werden können. Da sich in diesem Bereich die Signale des Polymerrückgrats anteilig mit den Signalen der p(DMEDAMA)-Seitenketten überlagern, liefert die Integration dieses Bereichs lediglich eine grobe Abschätzung über die Anzahl der Wiederholungseinheiten des tertiären Amins. Hierfür wurde, wie zuvor bereits beschrieben, das Signal *g* auf die Anzahl an Methoxy-Wasserstoffatomen des p(MEO₃MA)-Blocks normiert. Die Integration der Wasserstoffatome, welche der Seitenkettenfunktion von PDSM zugeordnet werden können, ergab dabei, dass keine detektierbare Veränderung der Anzahl an PDSM-Wasserstoffatomen im Vergleich zur jeweiligen Vorstufe erkennbar war. Dies ist eine bedeutende Feststellung, und zeigt, dass die Substitution der Seitenketten des PFPMA-Blocks vollständig orthogonal zu den PDSM-Seitenketten

durchgeführt werden konnte, ohne Einfluss auf die reaktiven Disulfidbindungen zu nehmen. Um die Deutung des, begleitend zur Substitution erstellten, Umsatz-NMRs zu untermauern, wurde jeweils ein ^{19}F -NMR Spektrum der Produktverbindung aufgenommen (siehe Abbildung 4.23 C). Auch bei starker Vergrößerung der Resonanz-Basislinie ist im Detektionsbereich weder ein Signal der PFPMA-Seitenkettenfunktion noch ein Signal, welches freiem Pentafluorophenol zugeordnet werden könnte, zu erkennen. Dies bedeutet zum einen, dass die PFPMA-Wiederholungseinheiten vollständig in der Reaktion umgesetzt werden konnten und zum anderen, dass durch die Aufreinigung des Produkts alle Spuren des freigesetzten Pentafluorophenols restlos entfernt werden konnten. Zur weiteren Charakterisierung der Triblock-Copolymere wurden Polymerproben mittels DOSY-NMR Spektroskopie untersucht (siehe Abbildung 4.23 D). Wie bereits auch bei den Eduktpolymeren beobachtet, befinden sich hier alle Signale, welche den verschiedenen Seitenkettenfunktionen des Triblock-Copolymers zugeordnet werden können, auf einer Horizontalen. Die Signalstreuung umfasst dabei lediglich einen sehr kleinen Bereich der Auftragung der Diffusionskoeffizienten auf der y-Achse. Dies weist darauf hin, dass es während der Reaktion zu keiner messbaren Di- oder Oligomerisierung durch Nebenreaktionen an den reaktiven Disulfidgruppen kam und unterstützt somit die Interpretation des ^1H -NMR Spektrums. Mittels THF-GPC wurden im Anschluss die Verteilungen des Molekulargewichts bestimmt. Als Beispiel zeigt Abbildung 4.23 E die Überlagerung der Elugramme des Polymers P5-1 (P5) und des entsprechenden Eduktpolymers P4-3 (P4). Durch die Substitution der Seitenketten des PFPMA-Blocks kommt es zu einer Verschiebung der Absorptionskurve zu höheren Elutionsvolumina, was einer deutlichen Abnahme des hydrodynamischen Volumens entspricht. Wie bereits zuvor besprochen haben intra- und intermolekulare, attraktive und repulsive Kräfte einen hohen Einfluss auf das Knäuelverhalten von Polymeren. Da durch die Amidierungsreaktion die chemische Natur der Seitenkettenfunktion des dritten Polymerblocks grundlegend verändert wurde, kommt es zu einer starken Veränderung des Knäuelverhaltens des Polymers in THF. Die starke Reduktion des hydrodynamischen Volumens könnte zum einen darin begründet sein, dass die Kettenflexibilität des dritten Blocks durch die Substitution der starren und raumgreifenden Pentafluorophenyl-Substituenten mit den, in ihrer Bindungsrotation deutlich freieren, DMEDA-Substituenten deutlich erhöht wurde. Zum anderen können im Produktpolymer keine attraktiven intra- oder intermolekularen Effekte über die Wechselwirkung delocalisierter p-Orbitale (π -stacking) auftreten. Trotzdem ist auch bei diesen Messungen, auf Grund der fehlenden Möglichkeit zur Kalibrierung, die Messung der exakten Molekulargewichte stark fehlerbehaftet. Aus diesem Grund wurde als qualitativer Wert der Polydispersitätsindex zum Vergleich der verschiedenen Polymere ermittelt. Die vollständigen Ergebnisse der Charakterisierung der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMEDAMA) Triblock-Copolymere sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

Tabelle 4.5: Synthetisierte Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA) Triblock-Copolymere.

| Polymer | DP_x^a | DP_y^b | DP_z^c | hydrophil/vern./ kation. Block [%:%] | M_N^d [g/mol] | M_N^e [g/mol] | M_w^f [g/mol] | Đ^g |
|----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---|--|--|--|----------------------|
| P5-1 | 42 | 12 | 33 | 54 / 17 / 29 | 18750 | 9160 | 10750 | 1,17 |
| P5-2 | 42 | 12 | 35 | 53 / 17 / 30 | 18440 | 8740 | 10570 | 1,20 |
| P5-3 | 42 | 12 | 49 | 48 / 15 / 37 | 20940 | 8800 | 10320 | 1,17 |
| P5-4 | 42 | 12 | 49 | 48 / 15 / 37 | 20940 | 8890 | 10260 | 1,15 |

^a Polymerisationsgrad des p(MEO₃MA)-Blocks. ^b Polymerisationsgrad des p(PDSM)-Blocks. ^c Polymerisationsgrad des p(DMEDAMA)-Blocks. ^d Zahlenmittel des Molekulargewichts, berechnet anhand des ¹H-NMR-Spektrums. ^e Zahlenmittel des Molekulargewichts, ermittelt anhand der THF-GPC-Daten. ^f Gewichtsmittel des Molekulargewichts, ermittelt anhand der THF-GPC-Daten. ^g Polydispersität des Polymers, berechnet anhand der THF-GPC-Daten.

Bei der Betrachtung der anhand der Daten der Größenausschlusschromatographie berechneten Polydispersitäten fällt direkt auf, dass sich diese sehr stark von den Polydispersitäten der entsprechenden Eduktpolymere P4 unterscheiden (siehe Tabelle 4.4). Es kann vermutet werden, dass die PFPMA-basierten Triblock-Copolymere tatsächlich anhand von starken intra- und / oder intermolekularen Wechselwirkungen in THF, der mobilen Phase der Messapparatur, eine auffällig breite Größenverteilung der hydrodynamischen Volumina zeigten.

Vergleicht man anhand der mittels Kernresonanzspektroskopie bestimmten Polymerisationsgrade den Massenanteil der verschiedenen Polymerblöcke am Gesamtgewicht der Polymere, so zeigt sich, dass für alle synthetisierten Polymere der zuvor angedachte prozentuale Massenanteil des p(MEO₃MA)-Blocks am Gesamtgewicht von etwa 50% für alle synthetisierten Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA) Triblock-Copolymere erzielt werden konnte. Dies unterstreicht die hohe Präzision, mit der jeder einzelne Polymerblock über die verschiedenen RAFT-Synthesestufen polymerisiert werden konnte. Da jede einzelne Synthesestufe mit einer Vielzahl verschiedener Polymerisationsgrade auf maßgeschneiderte Art und Weise durchgeführt werden konnte, ist die Synthese vieler weiterer Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA) Triblock-Copolymere mit verschiedensten Molekulargewichten und Massenanteilen der drei Polymerblöcke denkbar. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden die synthetisierten Polymere in Versuchen zur Selbstassemblierung von Polyplexen eingesetzt. Da das Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymersystem eine nahezu unbegrenzte Freiheit zur Darstellung verschiedener, strukturell unterschiedlicher, kationischer Triblock-Copolymere bietet wurden weitere Amin-Strukturen zur Amidierung des PFPMA-Blocks eingesetzt.

4.3.6 Alternative Strukturen zur polymeranalogen Modifikation von p(PFPMA)

Insgesamt wurden drei Klassen kationischer Triblock-Copolymere (P5-P7) durch die Amidierung der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Polymere (P4) synthetisiert (siehe Abbildung 4.24). Dabei wurde im Vorangegangenen Kapitel bereits die Synthese der Polymere P5 besprochen.

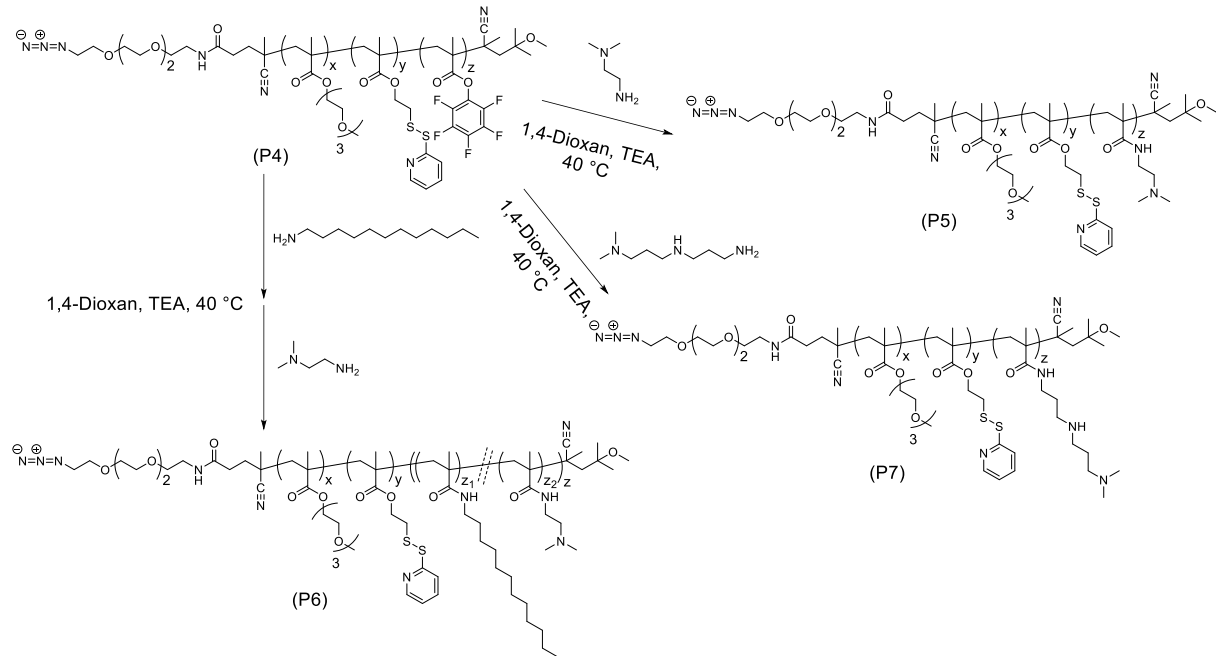


Abbildung 4.24: Durch Amidierung der PFPMA-Gruppen synthetisierte kationische Triblock-Copolymere

Die Triblock-Copolymere P6 zeichnen sich durch einen kationischen Block aus, bei dem die Seitenketten des PFPMA-Blocks durch eine statistisch verteilte Kombination aus DMEDA und Dodecylamin ersetzt wurden. Neben DMEDAMA Einheiten entstanden somit Wiederholungseinheiten von Dodecylmethacrylamid (DMA). Hierbei sollte durch Beimischung geringer Mengen an Dodecylamin die Hydrophobizität des Polyplex-Kerns erhöht werden. Hierdurch sollte zum einen die Bindungsstärke der Polymere an der pDNA etwas verringert werden, was die Freisetzung der pDNA im Zytosol begünstigen könnte, zum anderen könnte durch die hydrophoben Dodecylamin-Einheiten ein stärker destabilisierender Effekt auf die endosomale Membran erwirkt werden.^[153,186,187]

Bei der Synthese der Polymerreihe P7 wurde hingegen der dritte Polymerblock durch Substitution der PFPMA-Seitenketten mit N,N-Dimethyldipropylentriamin (DMDPTA) gebildet. Diese Polymere besitzen eine zusätzliche, sekundäre Amin-Funktion. DMDPTA-basierte Strukturen wurden ebenfalls bereits erfolgreich in verschiedenen Studien zum Transport und dem Transfer genetischer Informationen verwendet.^[188,189] Die DMDPTA-Seitenketten verfügen auf Grund der Kombination sekundärer und tertiärer Amin-Strukturen über eine hohe Pufferkapazität im Bereich physiologischer pH-Werte. Diese Variabilität der Anzahl an protonierten Aminogruppen könnte einen Vorteil für die Freisetzung des Transportsystems aus Endosomen bieten. So könnte durch Ausnutzung des *proton sponge effect* die endosomale Membran destabilisiert werden, wodurch die Freisetzung der Polyplexe in das Zytosol erleichtert wird.^[190,191] Zusätzlich könnte durch die sterisch anspruchsvolleren, kationischen

Seitenketten und die etwas hydrophobere Propylen-Verbindung der Aminogruppen, eine effektivere Freisetzung der DNA erreicht werden.

Bei der Umsetzung der Polymere P4 zu Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA-*stat*-DMA) wurde das Eduktpolymer zunächst mit einer geringen Menge Dodecylamin unter Zuhilfenahme von TEA bei einer Reaktionstemperatur von 40°C umgesetzt. Nachdem der gewünschte Umsatz an PFPMA-Seitenketten mittels ¹⁹F-NMR Spektroskopie bestätigt werden konnte, wurde ein Überschuss an DMEDA und stöchiometrische Mengen an TEA zugegeben und die Reaktion weitergeführt. Auch hier erfolgte die Umsatzkontrolle über ¹⁹F-NMR Spektroskopie. Die Reaktion wurde so lange weitergeführt, bis die Fluor-Signale der PFPMA-Seitenketten nicht mehr mittels Kernresonanzspektroskopie nachgewiesen werden konnten. Üblicherweise konnte die Reaktion nach etwa 72 h beendet werden. Durch mehrfache Präzipitation und Trocknung im Hochvakuum, wurde das Polymer aufgereinigt. Die synthetisierten Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA-*stat*-DMA) Triblock-Copolymere wurden mittels Kernresonanzspektroskopie und Größenausschlusschromatographie charakterisiert, wie im Folgenden anhand des Polymer P6-3 dargelegt (siehe Abbildung 4.25).

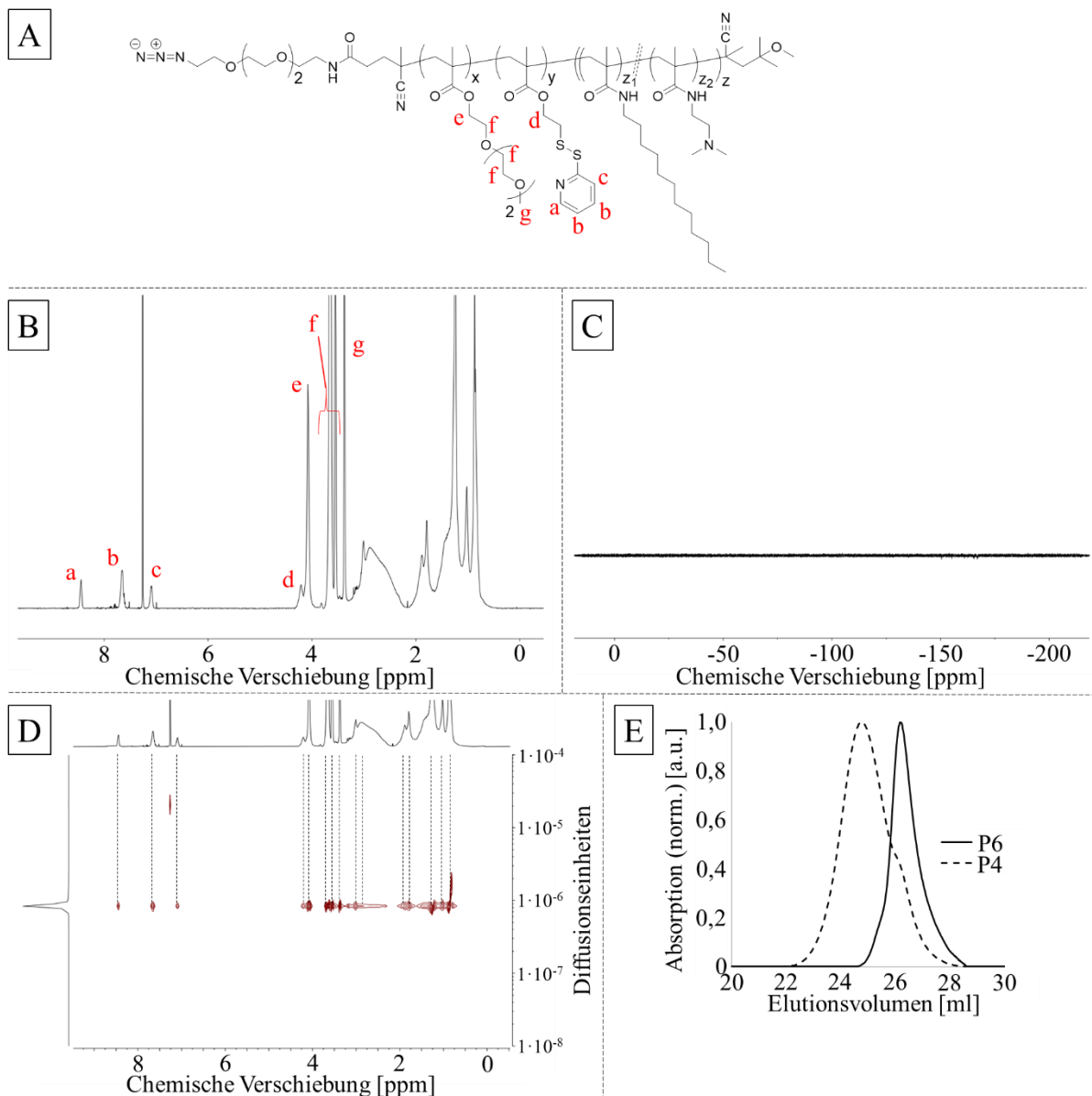


Abbildung 4.25: Charakterisierung der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMEDAMA-*stat*-DMA) Triblock-Copolymere. A: Allgemeine Struktur der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMEDAMA-*stat*-DMA) Triblock-Copolymere. B: ¹H-NMR Spektrum der Verbindung P6-3 mit Zuordnung der Resonanzsignale. C: ¹⁹F-NMR Spektrum des Triblock-Copolymers P6-3. D: DOSY-NMR der Verbindung P6-3. E: Überlagerte Elugramme der Verbindung P6-3 (P6) und der entsprechenden Edukt-Verbindung P4-7 (P4).

Bei der Untersuchung der Triblock-Copolymere mittels ¹H-NMR Spektroskopie zeigte sich bei allen untersuchten Proben eine extrem starke Überlagerung der Resonanzsignale im Bereich zwischen einer chemischen Verschiebung von 1 ppm bis etwa 3 ppm. Dies wird bei Betrachtung des ¹H-NMR Spektrums des Polymers P6-3 (siehe Abbildung 4.25 B) ersichtlich, bei dem die Seitenkettensignale des dritten Polymerblocks weder voneinander noch von den Signalen des Polymerrückgrats abgegrenzt werden können. Da keine individuelle Signalzuweisung möglich war, musste für die Berechnung der Zusammensetzung des dritten Polymerblocks auf die Messwerte der Umsatzberechnungen zurückgegriffen werden. Dies bedeutete für die Reaktionsdurchführung eine besonders genaue Kontrolle des Reaktionsumsatzes, wobei die Reaktion während den Messungen der Umsatz-NMRs

durch Verfestigen der Reaktionslösung mittels Eintauchen in flüssigen Stickstoff unterbrochen wurde, um große Abweichungen des aktuellen vom gemessenen Umsatz zu unterbinden. Da zunächst die Amidierungsreaktion von Dodecylamin an den PFPMA-Seitengruppen durchgeführt wurde, wurde nach dem Erzielen des gewünschten Umsatzes eine überproportional hohe Zugabe an DMEDA und TEA getätigt. Hierdurch wurde der weitere Umsatz des verbliebenen Dodecylamins unwahrscheinlicher gestaltet. Zum Zeitpunkt der Zugabe betrug so die verbleibende Äquivalentzahl an Dodecylamin in der Reaktionslösung stets weniger als 1% der Äquivalentmenge an DMEDA. Da im Nachhinein keine aussagekräftige Spektroskopische Analyse des dritten Polymerblocks vorgenommen werden konnte, wurde der Umsatz an Dodecylamin zum Zeitpunkt der DMEDA-Zugabe als statistischer Anteil am dritten Polymerblock angenommen. Da im Allgemeinen die Polymere P6 die längste Reaktionszeit aller synthetisierten Polymere aufwiesen und es zu mehreren gestaffelten Zugaben von Edukten und der Entnahme von Proben zur Umsatzberechnung kam, lag ein besonderes Augenmerk bei der Spektroskopischen Untersuchung der Triblock-Copolymere auf dem Erhalt der reaktiven Disulfidgruppen. Durch Integration und Normierung der Resonanzsignale *e* und *g* des ersten Polymerblocks, konnte ein Vergleich der Integralwerte der Signale des zweiten Polymerblocks mit den entsprechenden Integralwerten des Eduktpolymers vorgenommen werden. Es zeigte sich, dass bei allen Polymeren der P6-Reihe im Rahmen der Messgenauigkeit der Kernresonanzspektroskopie keine Veränderung der Integralwerte festgestellt werden konnte. Dementsprechend ist zu vermuten, dass unter vollem Erhalt der PDSM Gruppen des Eduktpolymers gearbeitet werden konnte. Um zu bestätigen, dass bei der Amidierungsreaktion alle PFPMA-Einheiten des Eduktpolymers umgesetzt werden konnten, wurde das Produktpolymer mittels ¹⁹F-NMR Spektroskopie untersucht (siehe Abbildung 4.25 C). Es zeigte sich, dass in den ¹⁹F-NMR Spektren der Polymere keine Signale gefunden werden konnten, welche man der PFPMA-Wiederholungseinheit oder dem Spaltprodukt Pentafluorphenol zuordnen könnte. Dies legt einerseits dar, dass die Amidierungsreaktion im Rahmen der Messgenauigkeit vollständig durchgeführt werden konnte, andererseits dass durch Präzipitation die verbliebenen Reste an Pentafluorphenol entfernt werden konnten. Anhand von DOSY-NMR Spektroskopie sollte im Anschluss überprüft werden, ob es während der Reaktion zu Di- oder Oligomerisierung durch Nebenreaktionen an den reaktiven Disulfidgruppen des PDSM-Blocks kam (siehe Abbildung 4.25 D). Am Beispiel des Polymers P6-3 ist erkennbar, dass alle Resonanzsignale des Polymers auf einer Horizontalen angeordnet sind und die Verteilung der Messwerte lediglich einen kleinen Bereich der y-Achse betrifft. Dies lässt vermuten, dass es, im Rahmen der Messgenauigkeit der Methode, zu keinen vernetzenden Nebenreaktionen an den reaktiven Disulfiden kam und untermauert die Ergebnisse der ¹H-NMR Spektroskopie, nach der keine Abnahme der Anzahl reaktiver PDSM-Seitenketten detektiert werden konnte. Zur weiteren Untersuchung dieses Sachverhalts und zur Bestimmung der Größenverteilung der Polymere, wurden im weiteren Verlauf der Charakterisierung Polymerproben mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie untersucht. Für das Polymer P6-3 (siehe Abbildung 4.25 E) zeigt die Überlagerung der Elugramme der THF-GPC-Untersuchung des Eduktpolymers P4-7 (P4)

und des Polymers P6-3 (P6) eine deutliche Verschiebung des Kurvenverlaufs zu höheren Elutionsvolumina, was einer Abnahme des hydrodynamischen Volumens des Polymerknäuels entspricht. Gleichzeitig ist, wie auch bei der Polymerreihe P5 eine Abnahme der Verteilungsbreite zu beobachten, was sich in einer Reduktion des berechneten Wertes der Polydispersität äußert. Der Verlauf der Absorptionskurve des Polymers P6-3 ist monomodal und weist nicht auf die Anwesenheit von Di- oder Oligomerisierungsprodukten des Polymers hin. Dementsprechend kann angenommen werden, dass die Modifikation der PFPMA-Gruppen mittels Dodecylamin und DMEDA ohne Interferenz mit den reaktiven Disulfid-Seitenketten des PDSM-Blocks durchgeführt werden konnte. Dies belegt den orthogonalen Charakter dieser Polymermodifizierung und unterstreicht die Vielseitigkeit der Polymerplattform. Die Ergebnisse der Charakterisierung der verschiedenen Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA-*stat*-DMA) Triblock-Copolymere wurden in der Tabelle 4.6 zusammengefasst.

Tabelle 4.6: Messdaten zur Charakterisierung der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA-*stat*-DMA) Triblock-Copolymere.

| Polymer | DP _x ^a | DP _y ^b | DP _{z1} ^c | DP _{z2} ^d | hydrophil/vern./hydrokation. Block [%:%] | hydrophob. [%] | M _N ^e [g/mol] | M _N ^f [g/mol] | M _w ^g [g/mol] | Đ ^h |
|---------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------|
| P6-1 | 42 | 12 | 6 | 22 | 55 / 17 / 28 | 31 | 18240 | 5410 | 6460 | 1,19 |
| P6-2 | 42 | 12 | 9 | 19 | 54 / 17 / 29 | 43 | 18540 | 4670 | 5590 | 1,20 |
| P6-3 | 42 | 12 | 10 | 91 | 33 / 10 / 57 | 15 | 30040 | 6240 | 8690 | 1,39 |
| P6-4 | 42 | 12 | 21 | 80 | 32 / 10 / 58 | 30 | 31110 | 7790 | 9840 | 1,26 |

^a Polymerisationsgrad des p(MEO₃MA)-Blocks. ^b Polymerisationsgrad des p(PDSM)-Blocks. ^c Polymerisationsgrad des DMA-Blockteils.

^d Polymerisationsgrad des DMEDAMA-Blockteils. ^e Zahlenmittel des Molekulargewichts, berechnet anhand des ¹H-NMR-Spektrums.

^f Zahlenmittel des Molekulargewichts, ermittelt anhand der THF-GPC-Daten. ^g Gewichtsmittel des Molekulargewichts, ermittelt anhand der THF-GPC-Daten. ^h Polydispersität des Polymers, berechnet anhand der THF-GPC-Daten.

Vergleicht man die aus den Messdaten der THF-GPC berechneten Werte für den Polydispersitätsindex der Polymere P6 miteinander so zeigt sich, dass für die Triblock-Copolymere mit hohem absolutem Anteil des lipophilen DMA eine breitere Molekulargewichtsverteilung aufweisen. Es kann vermutet werden, dass der dritte Polymerblock auf Grund seines höheren Massenanteils einen größeren Einfluss auf das Knäuelverhalten dieser Polymere hat und eine Änderung der Polaritätsverhältnisse innerhalb dieses Blocks zu einer größeren Variabilität im Knäuelverhalten der einzelnen Polymerketten führt.

Im Rückblick auf diese Modifikationsvariante des PFPMA-Blocks kann gesagt werden, dass es möglich war, durch sequenzielle Zugabe verschiedener Amin-Strukturen, eine statistische Modifikation der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymere durchzuführen. Trotz der hohen Reaktionszeit konnte unter Erhalt der reaktiven Disulfid-Einheiten gearbeitet werden, wodurch sich die weitere Modifikation des Polymers mit Thiol-modifizierten Vernetzern, Farbstoffen und kleinen Wirkstoffmolekülen anbietet.

Als eine weitere Modifikationsvariante der PFPMA-basierten Triblock-Copolymere wurde versucht, die Reaktivester-Funktionen der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-

Copolymere mit N,N-Dimethyldipropylentriamin (DMDPTA) umzusetzen. Theoretisch wäre hier eine Amidierungsreaktion sowohl des primären Amins als auch des sekundären Amins an der Reaktivesterfunktion möglich. Auf Grund der großen sterischen Hinderung der sekundären Amin-Funktion und der höheren Reaktivität des primären Amins findet die Amidierung nahezu ausschließlich über das primäre Amin statt, wodurch eine Deaktivierung des sekundären Amins mit Hilfe einer Schutzgruppe entfallen kann. Die Reaktion ähnelt somit in Grundzügen der durch Kataoka et al. beschriebenen Einführung von Diethyltriämin (DET) als Polymerseitenkette via Ester-Aminolyse.^[192,193]

Die Synthese der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMDPTAMA) Triblock-Copolymere wurde analog zur Umsetzung der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymere mit DMEDA durchgeführt. Bei einer moderaten Reaktionstemperatur von 40°C wurden die Reaktivestergruppen des Polymers mit DMDPTA unter Einsatz stöchiometrischer Mengen von TEA, im Verlauf von 24-40 h umgesetzt. Die Umsatzkontrolle erfolgte dabei ebenfalls über die Entnahme von Proben der Reaktionslösung, welche mittels ¹⁹F-NMR Spektroskopie untersucht wurden. Nachdem die vollständige Amidierung der PFPMA-Gruppen anhand des Umsatz-NMRs bestätigt werden konnte, wurde die Reaktion abgebrochen und das Polymer durch mehrfache Präzipitation gegen n-Hexan und mehrtägiger Trocknung im Hochvakuum aufgereinigt. Mittels ¹H-, ¹⁹F- und DOSY-NMR Spektroskopie, sowie mittels THF-GPC wurde die Charakterisierung der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMDPTAMA) Triblock-Copolymere durchgeführt. Abbildung 4.26 erläutert dies am Beispiel des Polymers P7-2.

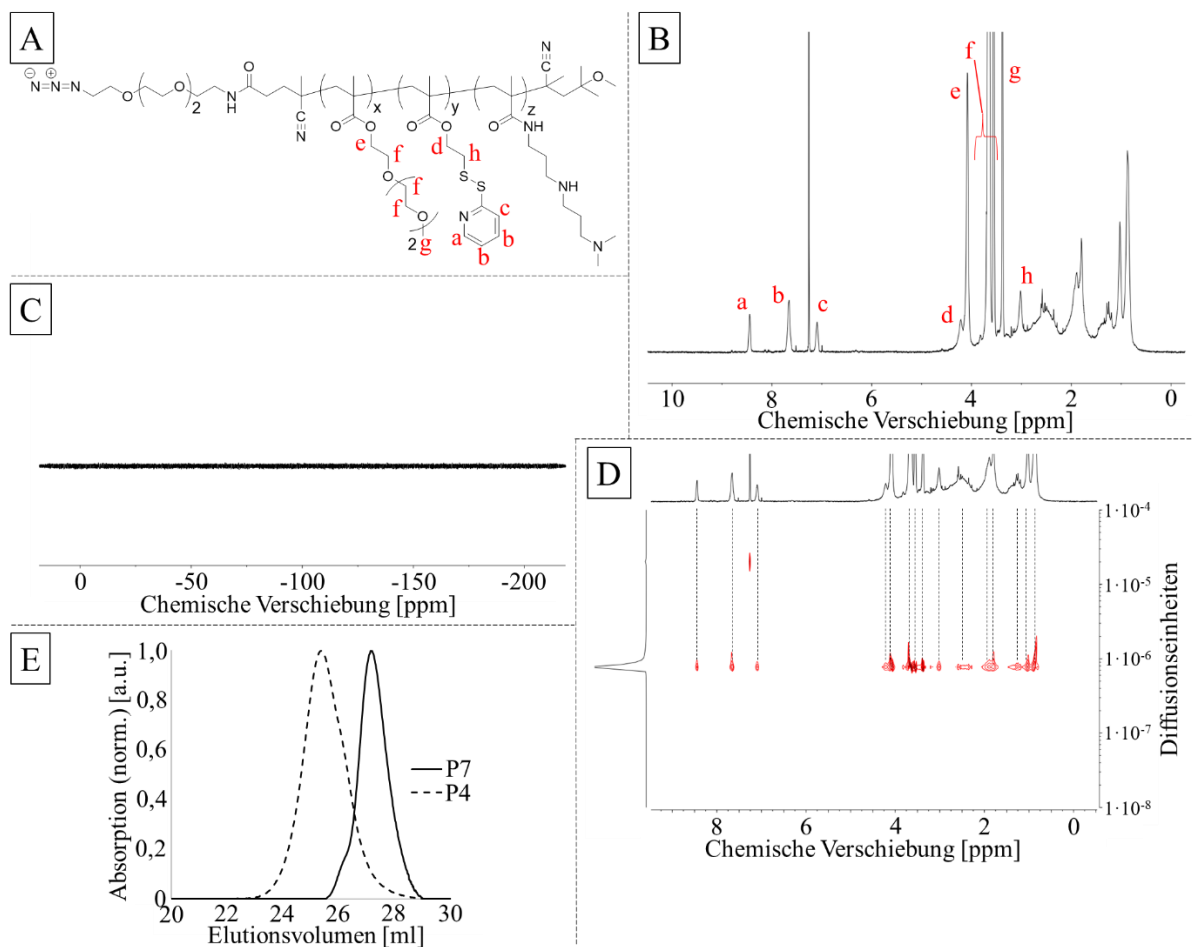


Abbildung 4.26: Charakterisierung der synthetisierten Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMDPTAMA) Triblock-Copolymere. A: Allgemeine Struktur der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMDPTAMA) Triblock-Copolymere. B: ¹H-NMR der Polymerverbindung P7-2 und Zuordnung der identifizierbaren Resonanzsignale. C: ¹⁹F-NMR Spektrum der Verbindung P7-2. D: DOSY-NMR Spektrum des Triblock-Copolymers P7-2. E: Vergleich der THF-GPC Elugramme von P7-2 (P7) mit der entsprechenden Eduktverbindung (P4).

Bei der Betrachtung des ¹H-NMR Spektrums der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMDPTAMA) Triblock-Copolymere fällt, ähnlich wie bei der Polymerreihe P6, die starke Überlagerung der Resonanzsignale bei einer chemischen Verschiebung im Bereich zwischen 1 ppm und 3 ppm auf. Hier überlagern sich die Signale der DMDPTA-Seitenketten so stark mit den Resonanzsignalen des Polymerrückgrats, dass keine sinnvolle Signalzuordnung möglich ist. Zur Kontrolle des Erhalts der reaktiven Disulfid-Seitenketten der Polymere wurden die Integralwerte der Signale *e* und *g* des p(MEO₃MA)-Blocks auf die, dem Polymerisationsgrad des ersten Blocks entsprechenden, Werte normiert. Die Integration der Signale *a*, *b*, *c*, *d* und *h* zeigte, dass im Rahmen der Messgenauigkeit keine relevante Abweichung von den aus dem jeweiligen Polymer P4 erhaltenen Erwartungswerten für die Integralwerte festgestellt werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass auch diese Variante der Amidierungsreaktion unter vollständigem Erhalt der reaktiven PDSM-Seitenketten durchgeführt werden konnte. Durch die Polymeranalyse mittels ¹⁹F-NMR Spektroskopie wurde der vollständige Umsatz der PFPMA-Seitenketten überprüft. Abbildung 4.26 C zeigt dazu das entsprechende Spektrogramm der Verbindung P7-2. Hier ist erkennbar, dass kein Fluor-Resonanzsignal

detektiert werden konnte, welches der PFP-Seitenkette des dritten Polymerblocks, oder freiem Pentafluorphenolat zugeordnet werden könnte. Daher kann angenommen werden, dass zum einen eine vollständige Amidierung des Reaktivester-Blocks durchgeführt werden konnte und zum anderen das Spaltprodukt der Amidierung restlos aus dem Polymerprodukt entfernt werden konnte. Die Untersuchung des Polymers P7-2 mit der Methode der DOSY-NMR Spektroskopie (siehe Abbildung 4.26 D) zeigt, dass keine Hinweise auf vernetzende Reaktionen vorliegen, welche zur Di- oder Oligomerisierung des Polymers geführt haben könnten. Diese Schlussfolgerung lässt sich treffen, da alle Wasserstoff-Resonanzsignale, welche dem Polymer zugeordnet werden können auf einer eng umgrenzten Horizontalen angeordnet sind. Dies bedeutet, dass sich die einzelnen Diffusionskoeffizienten der polymeren Probe ähneln und keine Nebenverteilungen der Resonanzintensitäten bei anderen Werten des Diffusionskoeffizienten zu finden sind. Somit wird die durch ¹H-NMR Spektroskopie getroffene Beobachtung des Erhalts der PDSM-Seitengruppen gestützt. Abbildung 4.26 E zeigt den Vergleich der anhand von THF-GPC-Messungen ermittelten Elugramme des Polymers P7-2 (P7) und dem entsprechenden Ausgangspolymer vor der Amidierungsreaktion. Wie bei den Amidierungsreaktionen der Polymerverbindungen P5 und P6 ist eine deutliche Verschiebung der Absorptionskurve zu höheren Elutionsvolumina erkennbar, einhergehend mit einer Abnahme der Verteilungsbreite, was einer Verringerung des Polydispersitätsindex entspricht. Tabelle 4.7 fasst die kombinierten Ergebnisse der verschiedenen Charakterisierungsmethoden zusammen.

Tabelle 4.7: Synthetisierte Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMDPTAMA) Triblock-Copolymere.

| Polymer | DP _x ^a | DP _y ^b | DP _z ^c | hydrophil/vern./ kation. Block [%:%] | M _N ^d [g/mol] | M _N ^e [g/mol] | M _w ^f [g/mol] | Đ ^g |
|---------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--|--|--|--|----------------|
| P7-1 | 30 | 6 | 33 | 37 / 8 / 55 | 16470 | 4340 | 5300 | 1,22 |
| P7-2 | 30 | 6 | 19 | 54 / 12 / 34 | 13290 | 4110 | 5170 | 1,26 |

^a Polymerisationsgrad des p(MEO₃MA)-Blocks. ^b Polymerisationsgrad des p(PDSM)-Blocks. ^c Polymerisationsgrad des p(DMDPTAMA)-Blocks. ^d Zahlenmittel des Molekulargewichts, berechnet anhand des ¹H-NMR-Spektrums. ^e Zahlenmittel des Molekulargewichts, ermittelt anhand der THF-GPC-Daten. ^f Gewichtsmittel des Molekulargewichts, ermittelt anhand der THF-GPC-Daten. ^g Polydispersität des Polymers, berechnet anhand der THF-GPC-Daten.

Die Messergebnisse der THF-GPC-Experimente der Polymerreihe P7 zeigen im Vergleich mit den entsprechenden Ausgangsverbindungen der Polymerreihe P4 ebenfalls eine deutliche Verringerung des Polydispersitätsindex. Da die Amidierung hier im Vergleich zur Polymerreihe P6 zu einer homogenen Zusammensetzung des dritten Blocks führt, ist lediglich eine leichte Variation der Größenverteilung der verschiedenen Polymerproben zu beobachten.

Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass die Substitution der PFPMA-Gruppen der P4 Triblock-Copolymere durch DMDPTA erfolgreich durchgeführt werden konnte. Die Reaktion verlief dabei unter ähnlichen Bedingungen wie die Modifikationsreaktion der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(PFPMA) Triblock-Copolymere mit DMEDA. Es konnte durch den Erhalt der Disulfid-Einheiten gezeigt werden, dass auch bei dieser Reaktion, bei der sowohl die nach dem Pearson-Prinzip

„harten“ (mit sehr hoher Elektronendichte) primären Aminogruppen, als auch die etwas „weicheren“ sekundären Aminogruppen von DMDPTA vorlagen, eine orthogonale Funktionalisierung der Reaktivester-Einheiten des p(PFPMA)-Blocks vorgenommen werden konnte. Die hierdurch synthetisierten Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMDPTAMA) Triblock-Copolymere bieten für die Synthese von Polyplexen interessante Möglichkeiten, da über die Pufferkapazität der sekundären Amin-Einheiten eine Variabilität der Anzahl kationischer Gruppen besteht und durch erhöhte Interaktion mit der endosomalen Membran sowie einem möglicherweise induzierten Proton-Sponge-Effekt eine erhöhte Transfektionseffizienz im Vergleich zu den Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA) Triblock-Copolymeren erzielt werden könnte.

4.4 Zusammenfassung

Die im zweiten Teil der Dissertation vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass ein neues, multifunktionelles Polymersystem, bestehend aus drei sukzessiven Polymerblöcken synthetisiert werden konnte. Die Polymerisation wurde dabei in drei sukzessiven Stufen durchgeführt, die sich durch eine gute Kontrolle über den jeweiligen Polymerisationsgrad der Polymerblöcke und die Polymerzusammensetzung auszeichnen. Die somit erhaltenen Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymere zeichnen sich durch drei reaktive Funktionen aus, welche durch selektive Reaktionen modifiziert werden können. Hierbei handelt es sich zum einen um eine Azid-Endgruppe, welche durch eine SPAAC-Reaktion mit DBCO-modifizierten Molekülen in einer irreversiblen Cycloaddition umgesetzt werden kann. Zum anderen verfügen die Triblock-Copolymere, mit einem Polymerblock aus Wiederholungseinheiten des Monomers PDSM, über reaktive Disulfid-Seitenketten, welche Thiol-modifizierte Moleküle spontan durch eine Disulfid-Austauschreaktion kovalent binden können. Des Weiteren verfügt das Triblock-Copolymer mit dem dritten Polymerblock aus Wiederholungseinheiten des Reaktivestermonomers PFPMA über reaktive, funktionelle Gruppen, die durch, nach dem Pearson-Prinzip, „harte“ nucleophile Agenzien wie primäre Amine oder Alkoholate in einer Amidierungs- oder Umesterungsreaktion angegriffen werden können. Es konnte dargelegt werden, dass die drei konsekutiven RAFT-Reaktionsschritte unter Erhalt der reaktiven Funktionen durchgeführt werden konnten. In einer ersten polymeranalogen Reaktion wurden die reaktiven CTA-Endgruppen deaktiviert. Bei einigen Polymeren ist während der Charakterisierung der Polymere ein leichter Rückgang der Integralwerte der Resonanzsignale, welche den Seitenketten von PDSM zugeordnet werden können, festgestellt worden. Hierbei ist jedoch fraglich, inwieweit sich der anscheinend detektierte Verlust im Interpretationsspielraum und der Fehlertoleranz der Messmethode bewegt. Bei jüngeren Polymeransätzen konnte im Rahmen der Messgenauigkeit darüber hinaus kein eindeutiger Verlust von PDSM-Seitenketten detektiert werden. Da alle weiteren Charakterisierungsmethoden die Anwesenheit von Oligomeren widerlegten, wurde diese mögliche

Nebenreaktion als vernachlässigbar beziehungsweise durch die getroffenen Maßnahmen gut kontrollierbar erachtet.

Durch die insgesamt drei verschiedenen reaktiven Funktionalitäten weisen die Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymere eine sehr hohe Modifizierbarkeit auf. So kann eine bestehende, einfach zu synthetisierende Polymerplattform genutzt werden um, je nach Anforderung an die gewünschten Einsatzbereiche des Polymers, durch einfache und effiziente chemische Reaktionen, kovalente Modifikationen an der Polymerstruktur vorzunehmen. Primär war dabei die Verwendung solcher Triblock-Copolymere als kationische Polymerverbindungen zur Selbst-Assemblierung von Polyplexen mit pDNA angedacht. Aus diesem Grund wurden die Triblock-Copolymere in einer weiteren polymeranalogen Reaktion umgesetzt. Die Reaktivester-Einheiten des dritten Polymerblocks wurden mit verschiedenen asymmetrischen Di- oder Triaminen umgesetzt, um einen Polymerblock mit Amin-Funktionen zu erhalten, welche unter physiologischen Bedingungen in wässrigen Lösungen in protonierter Form vorliegen. Anhand der verschiedenen Methoden zur Polymercharakterisierung konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Amidierungsreaktionen unter vollständigem Erhalt der reaktiven Disulfidgruppen des PDSM-Blocks durchgeführt werden konnten. Ausgehend von dem Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymer kann somit eine Vielzahl verschiedener kationischer Polymere synthetisiert werden, welche zur Bildung von Polyplexen verwendet werden können.

4.5 Ergänzende Informationen

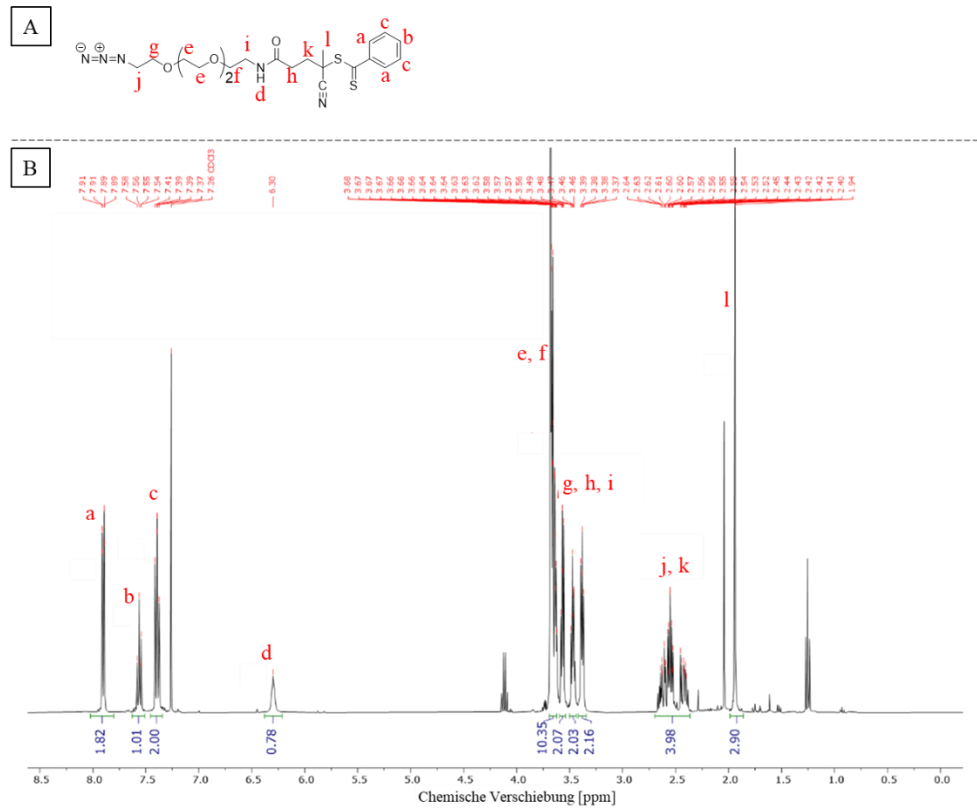


Abbildung 4.27: $^1\text{H-NMR}$ des Azid-PEG₃-CTA. A: Molekülstruktur des Azid-PEG₃-CTA. B: $^1\text{H-NMR}$ der CTA-Verbindung mit zugeordneten Signalen.

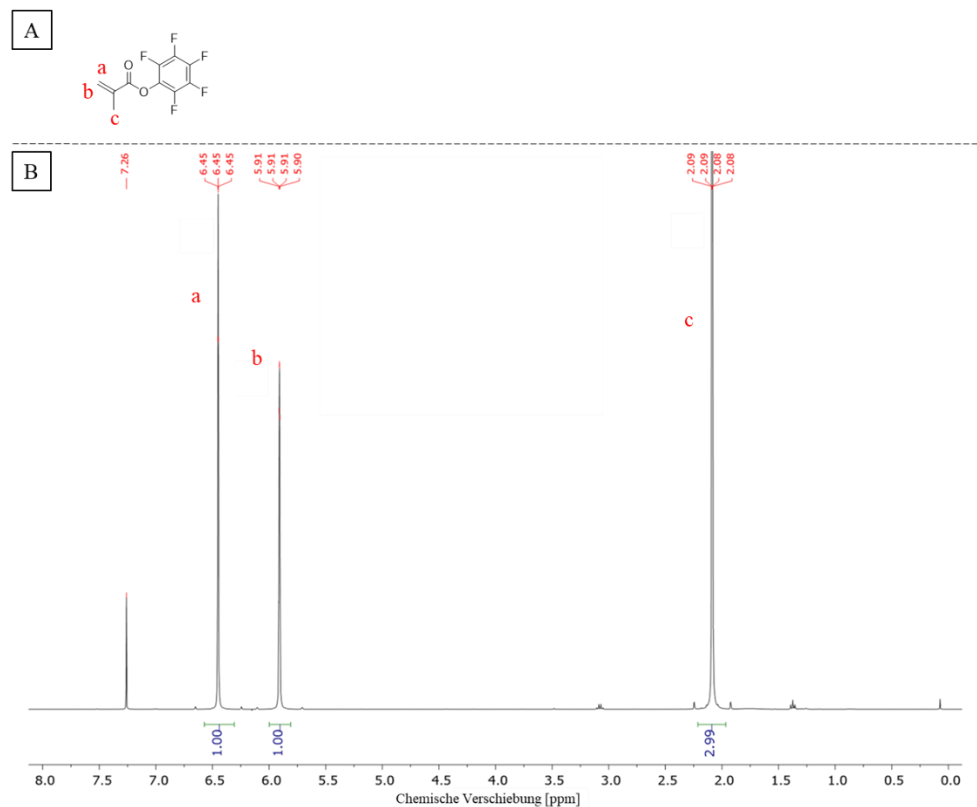


Abbildung 4.28: $^1\text{H-NMR}$ von PFPMA. A: Molekülstruktur von PFPMA. B: $^1\text{H-NMR}$ von PFPMA mit zugeordneten Resonanzsignalen.

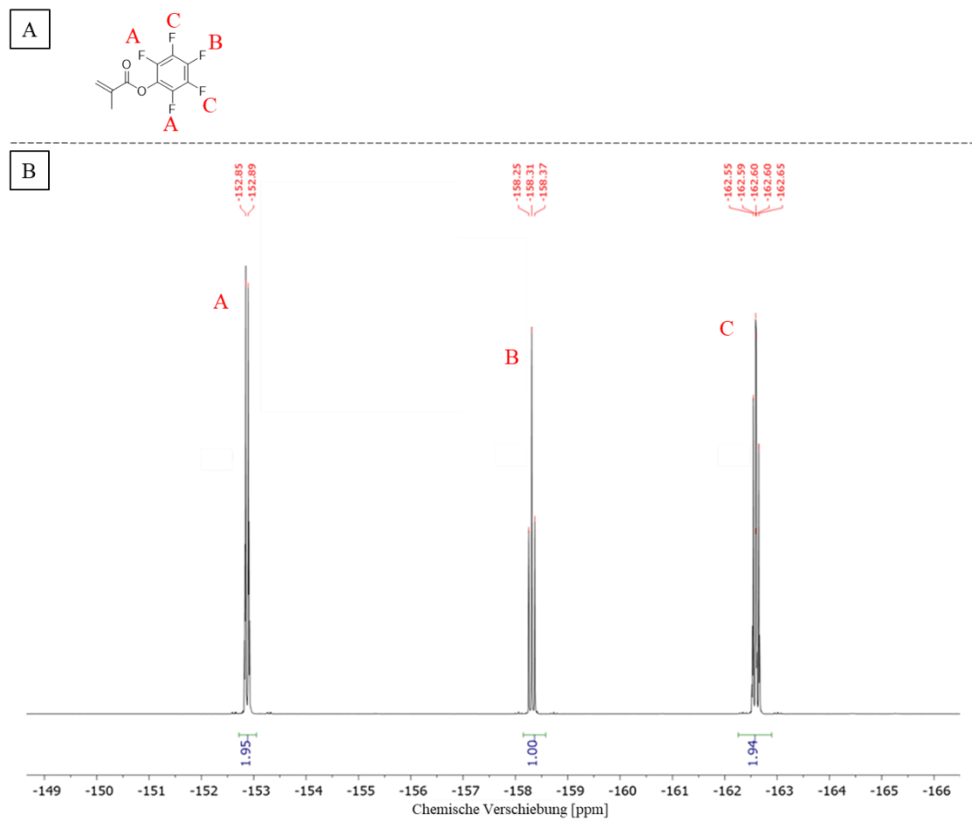


Abbildung 4.29: ^{19}F -NMR von PFPMA. A: Molekülstruktur von PFPMA. B: ^{19}F -NMR von PFPMA mit Signalzuordnung.

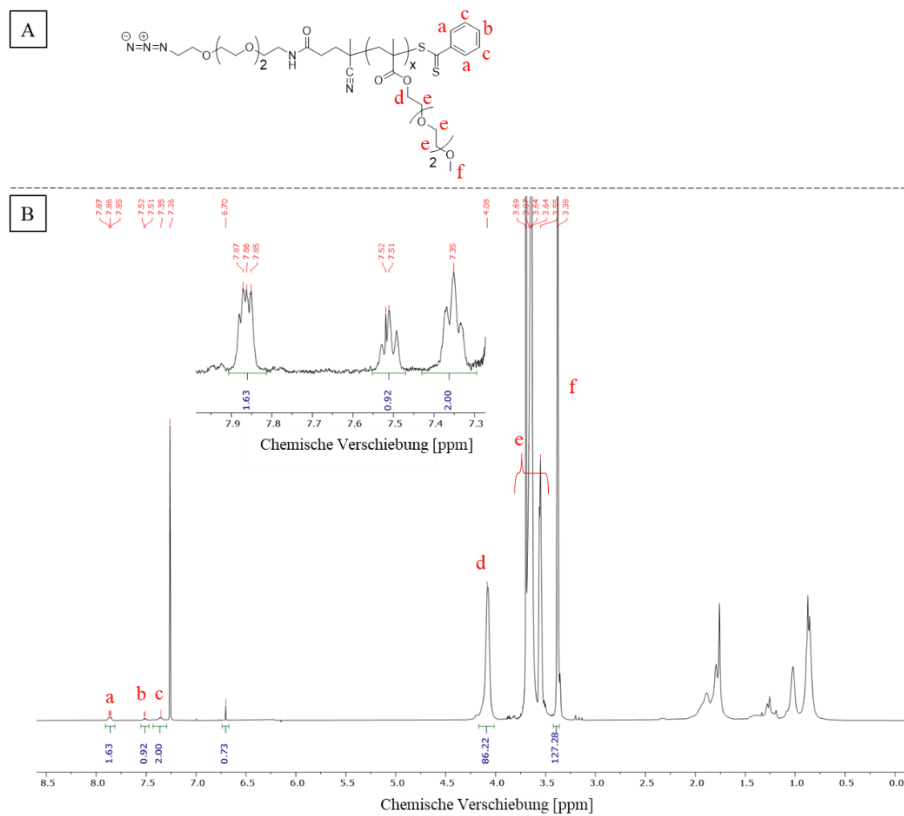


Abbildung 4.30: ^1H -NMR von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA) (P1-1). A: Allgemeine Strukturformel von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA). B: ^1H -NMR mit zugeordneten Resonanzsignalen.

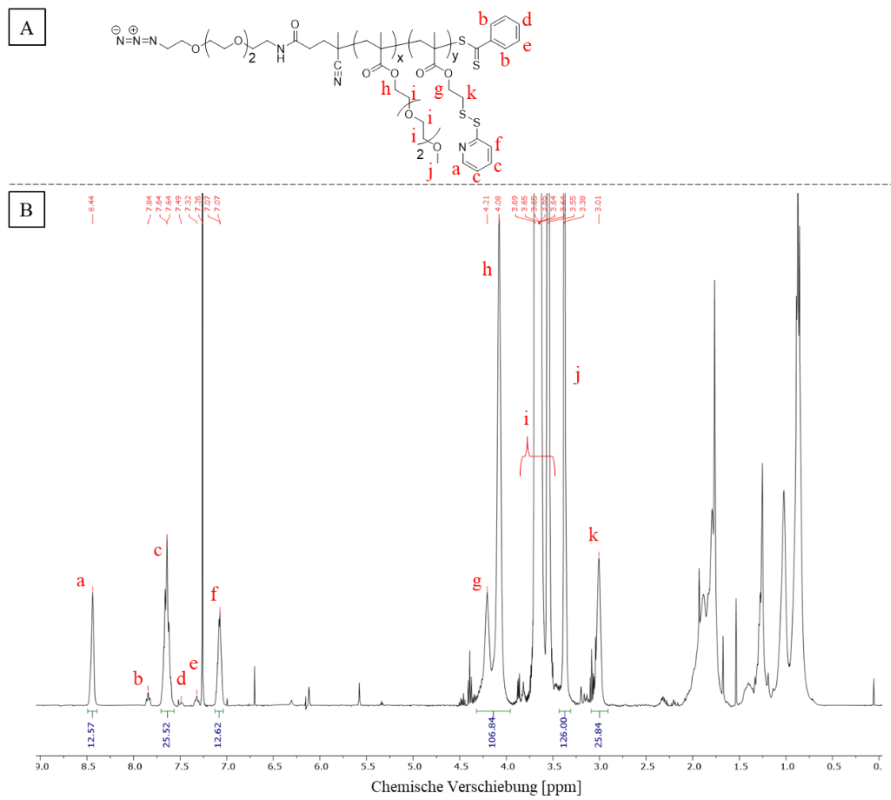


Abbildung 4.31: $^1\text{H-NMR}$ von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM) (P2-1). A: Allgemeine Strukturformel von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM). B: $^1\text{H-NMR}$ der Verbindung mit zugeordneten Resonanzsignalen.

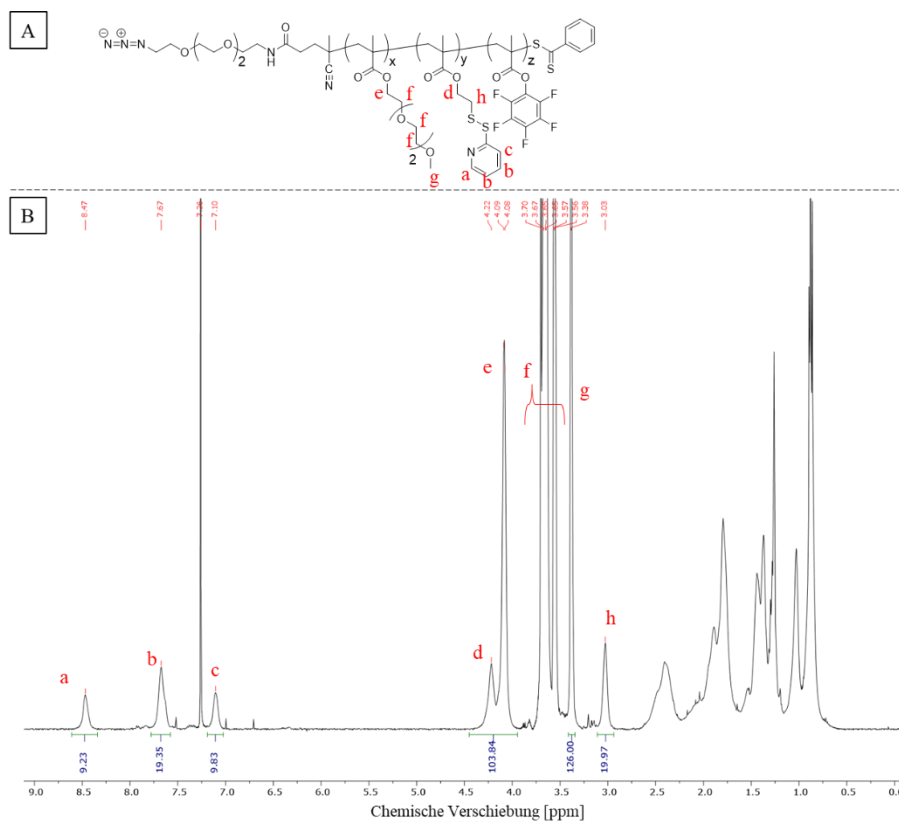


Abbildung 4.32: $^1\text{H-NMR}$ von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) (P3-2). A: Allgemeine Molekülstruktur von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA). B: $^1\text{H-NMR}$ mit zugeordneten Resonanzsignalen.

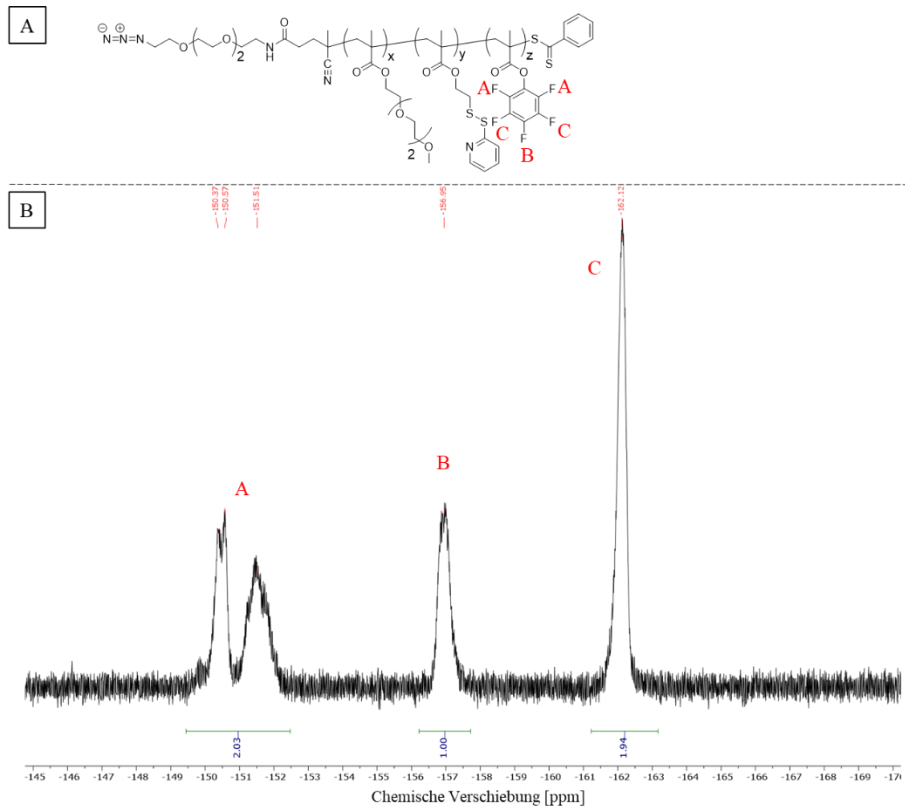


Abbildung 4.33: ^{19}F -NMR von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(PFPMA) (P3-2). A: Allgemeine Strukturformel von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(PFPMA). B: ^{19}F -NMR von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(PFPMA) mit Signalzuordnung.

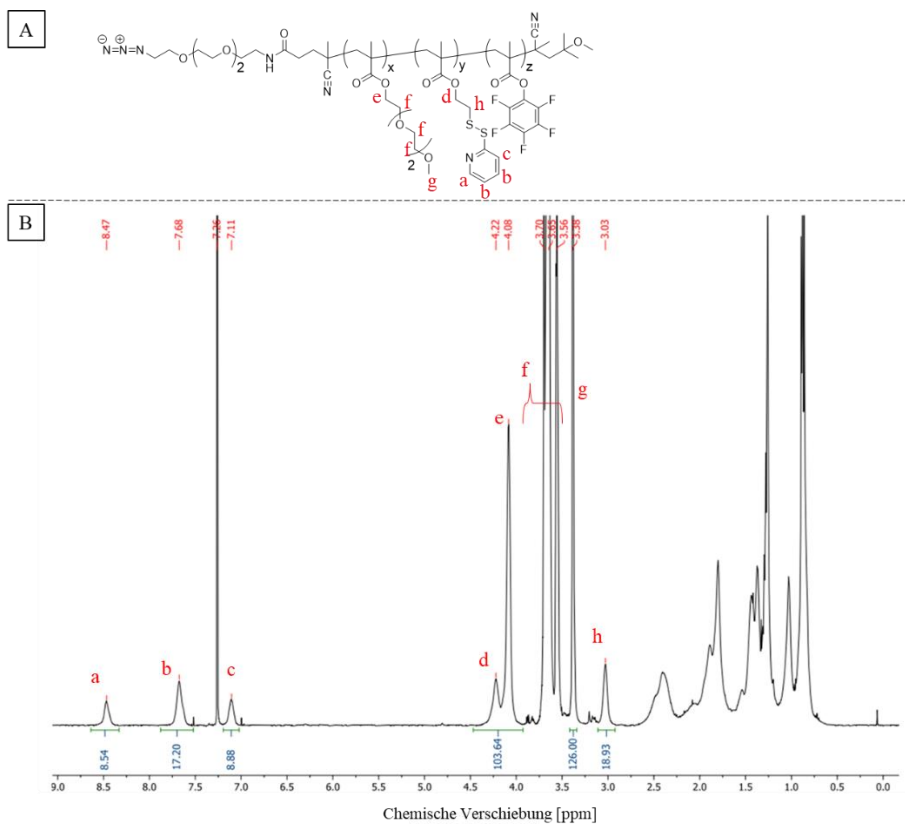


Abbildung 4.34: ^1H -NMR von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(PFPMA) nach der Deaktivierung der CTA-Endgruppe (P4-2). A: Allgemeine Molekülstruktur des Reaktionsprodukts. B: ^1H -NMR der Verbindung nach der Deaktivierung der CTA-Endgruppe mit Signalzuordnung.

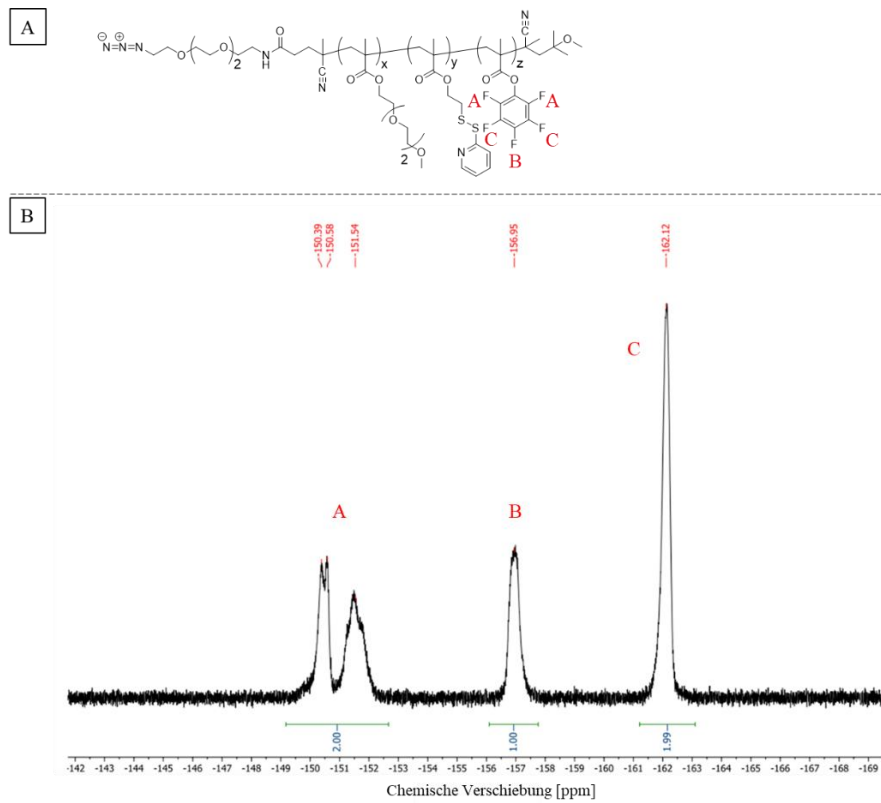


Abbildung 4.35: ^{19}F -NMR von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) nach der Deaktivierung der CTA-Endgruppe (P4-2). A: Allgemeine Molekülstruktur des Reaktionsprodukts. B: ^{19}F -NMR der Verbindung nach der Deaktivierung der CTA-Endgruppe mit Signazuordnung.

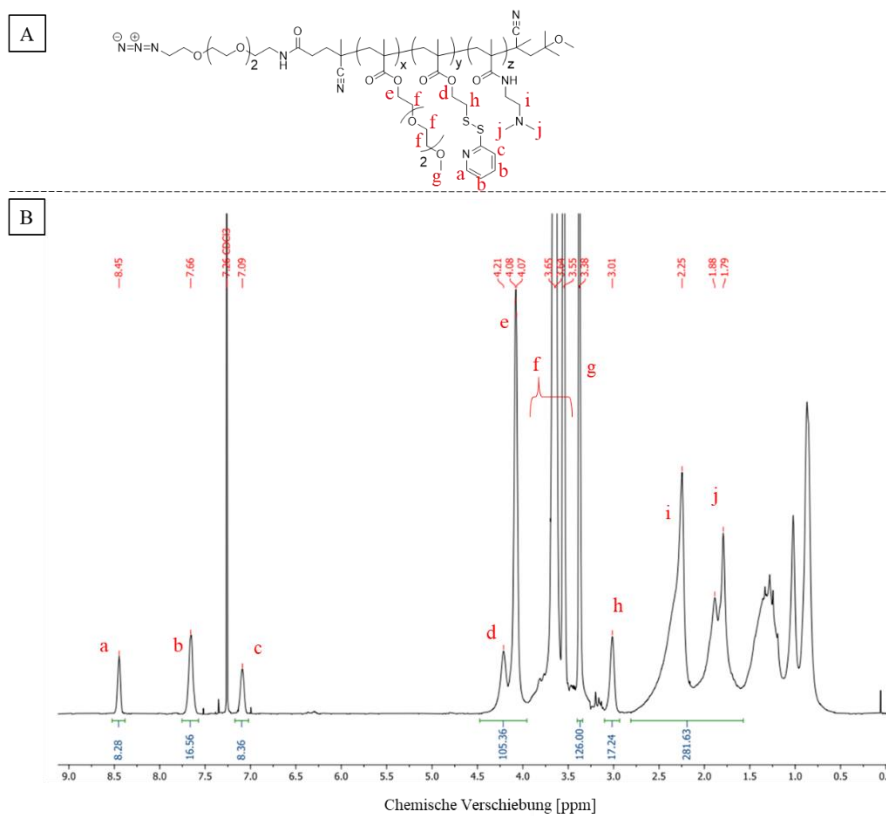


Abbildung 4.36: ^1H -NMR von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA) nach erfolgreicher Substitution der PFPMA-Seitengruppen (P5-2). A: Allgemeine Molekülstruktur von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA). B: ^1H -NMR der Verbindung mit zugeordneten Resonanzsignalen.

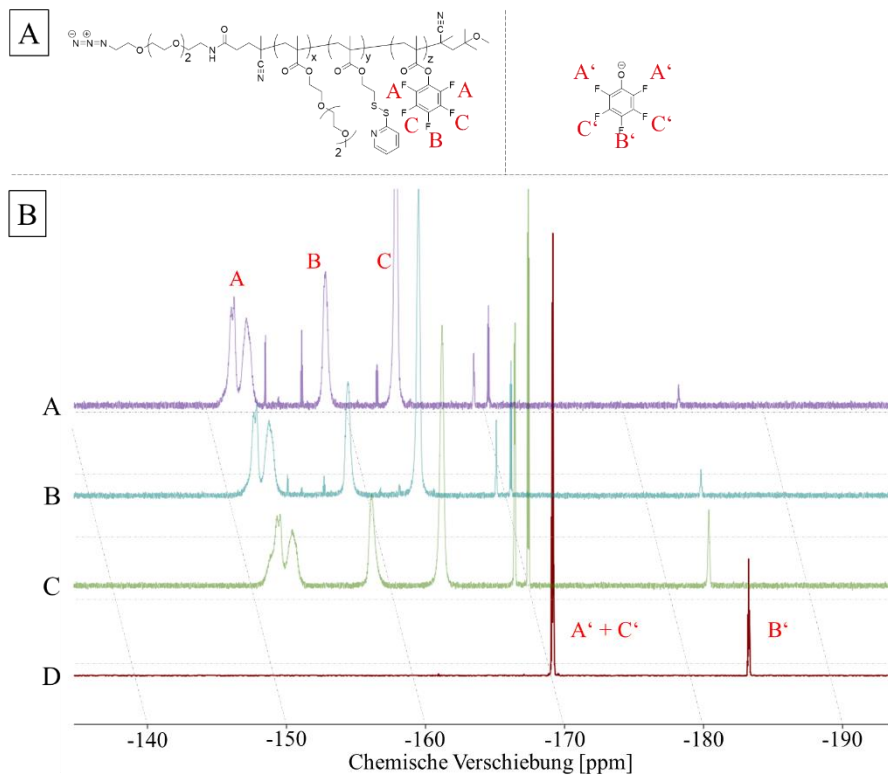


Abbildung 4.37: Überlagerung der ^{19}F -Umsatz-NMRs der Synthese von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMEDAMA-*stat*-DMA) (P6-3). A: Allgemeine Strukturformeln des Edukts und des Spaltprodukts. B: Umsatz-NMRs nach 22 h (A), 43 h (B), 64 h (C), 93 h (D).

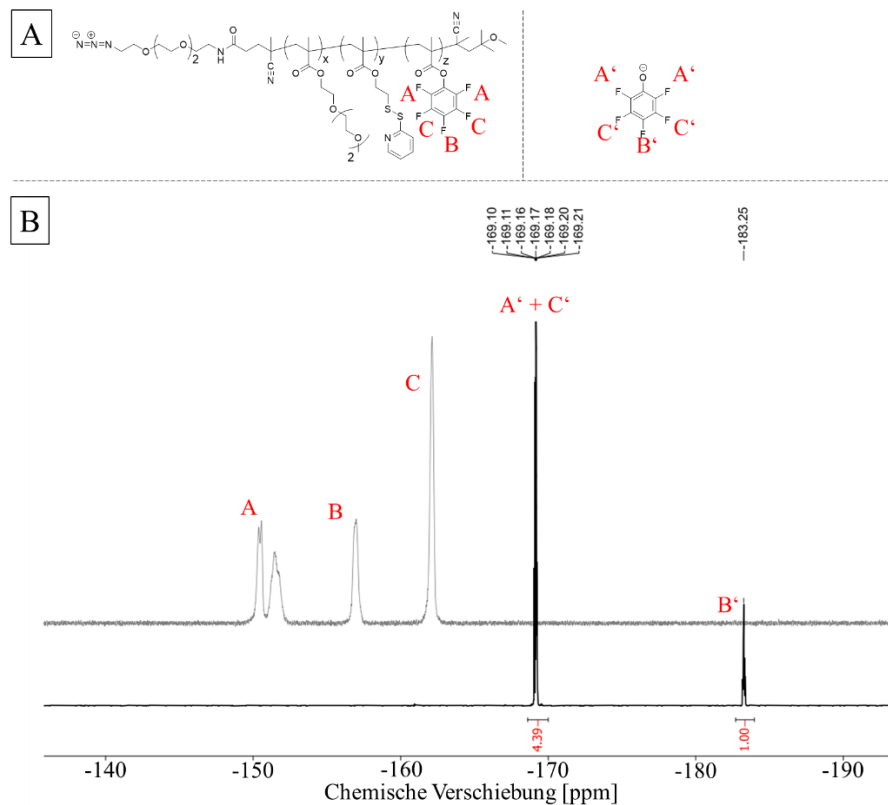


Abbildung 4.38: Überlagerung der ^{19}F -NMRs des Edukts (P4) und der Reaktionslösung von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMDPTAMA) (P6-3) nach der Amidierungsreaktion. A: Allgemeine Strukturformel des Edukts und des Spaltprodukts. B: Überlagerung der ^{19}F -Spektrogramme des Edukts und der Reaktionslösung nach beendeter Reaktion.

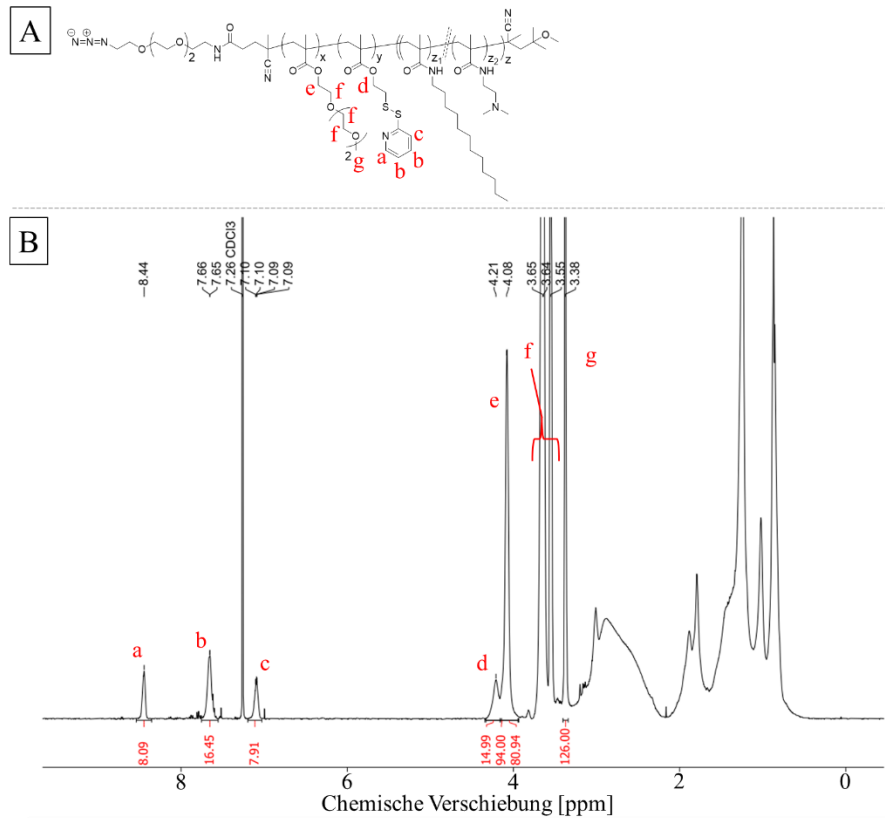


Abbildung 4.39: ^1H -NMR von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA-*stat*-DMA) (P4-2). A: Allgemeine Strukturformel des Produktpolymers mit zugeordneten Resonanzsignalen. B: ^1H -NMR des Block-Copolymers P6-3.

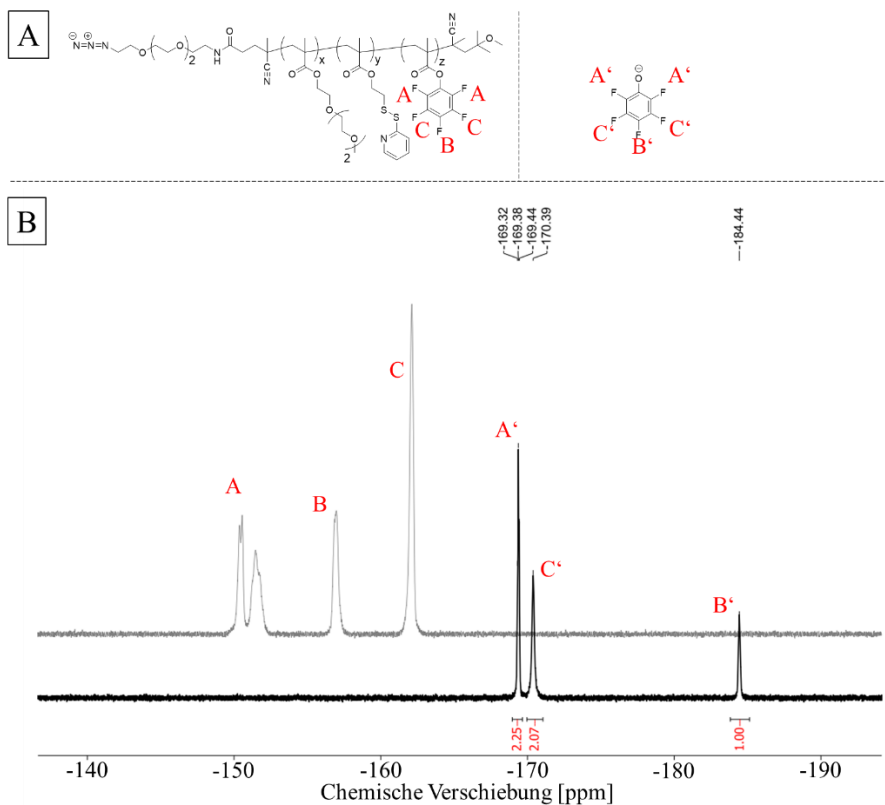


Abbildung 4.40: Überlagerung der ^{19}F -NMRs des Edukts P4-1 und der Reaktionslösung von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMDPTAMA) (P7-1) nach vollständigem Umsatz. A: Allgemeine Strukturformel des Eduktpolymers und des Spaltprodukts. B: Überlagerung der ^{19}F -NMRs des Edukts und der Reaktionslösung am Ende der Reaktion.

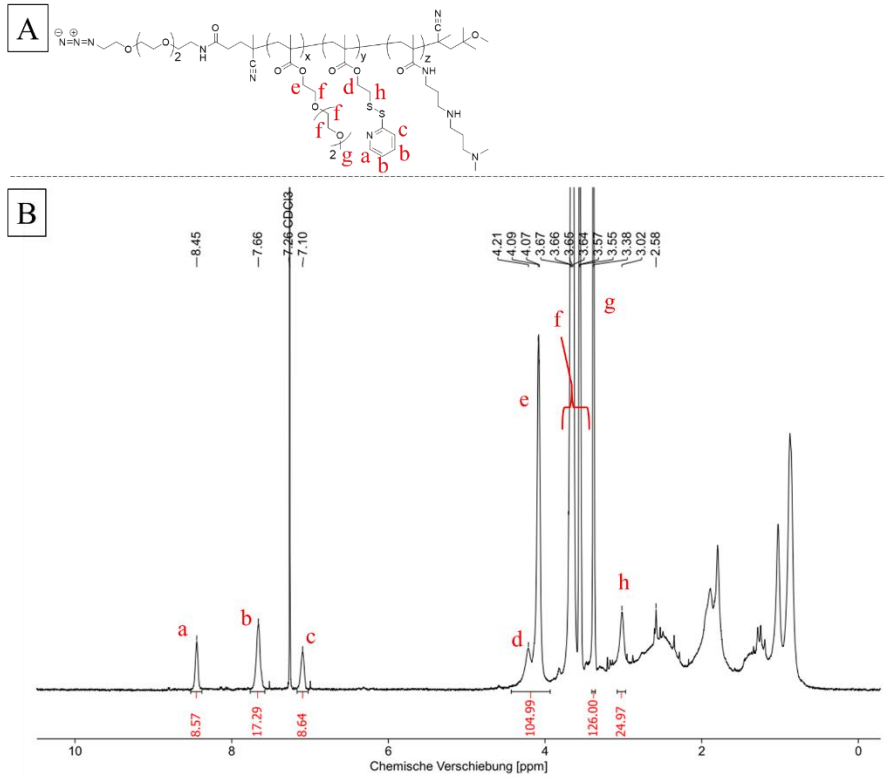


Abbildung 4.41: $^1\text{H-NMR}$ von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMDPTAMA) (P7-1). A: Allgemeine Strukturformel des Produktpolymers mit Zuordnung der Resonanzsignale. B: $^1\text{H-NMR}$ des Triblock-Copolymers P7-1.

5 Teil 3: Synthese und Evaluation von pDNA-Polyplexen auf Basis multifunktionaler Triblock-Copolymere

Die in dem folgenden, dritten Teil besprochenen Ergebnisse beziehen sich zum Teil auf den zweiten Teil des Artikels *Versatile, Multifunctional Block Copolymers for the Self-Assembly of Well-Defined, Nontoxic pDNA Polyplexes*, der auf der kooperativen Arbeit von Frau Simone Berger und Herrn Nicolas Ritt beruht.^[161]

5.1 Einleitung

Im dritten Teil der vorliegenden Dissertation wird über die Eigenschaften der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA) Triblock-Copolymere bei der Bildung von Polyplexen und erste Erkenntnisse zu deren physikochemischen Eigenschaften und Ergebnissen biologischer Untersuchungen berichtet. Durch die bestehende Ähnlichkeit dieser Triblock-Copolymere zu dem Polymersystem, über das im ersten Teil dieser Arbeit berichtet wurde, konnte auf die Erfahrungen bei der Bildung von Polyplexen auf Basis der Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMAEMA) Triblock-Copolymere zurückgegriffen werden.

Die durch Selbst-Assemblierung hergestellten Polyplexe wurden dabei hinsichtlich physikochemischer Parameter wie hydrodynamischer Durchmesser, Zeta-Potential und Lagerstabilität untersucht. Dabei wurden Polyplexproben zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers und der Größenverteilung des Polyplex-Durchmessers mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht. Zusätzlich sollten die Polyplexe durch Untersuchungen mit dynamischer Lichtstreuung in humanem Serum auf eventuelles Aggregationsverhalten mit Serumproteinen getestet werden. Hierdurch sollte abgeschätzt werden, ob sich die Triblock-Copolymere prinzipiell zur Anwendung *in vivo* eignen könnten. In dieser Hinsicht wurden erste Zelleexperimente in einem *in vitro* Modell vorgenommen um einerseits die Polyplexe auf eventuell vorliegende, unspezifische Zytotoxizität zu testen und andererseits die Transfektionseffizienz des Systems in einer Gentransfer-Studie zu untersuchen.

5.2 Ergebnisse und Diskussion

5.2.1 Selbstassemblierung von pDNA-Polyplexen

Zunächst wurde die Fähigkeit der synthetisierten Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA) Triblock-Copolymere Polyplexe mit pDNA zu bilden überprüft. Aus diesem Grund wurden Polyplex-Ansätze zu verschiedenen N/P-Verhältnissen des Polymers und des verwendeten Plasmids pGL3-BASIC hergestellt, welche im Anschluss mittels Agarose-Gelelektrophorese in einem DNA-Retentionsassay eingesetzt werden sollten. Hierzu wurden zunächst Stammlösungen der Polymere in der Konzentration 1 mg/mL in PBS-Puffer hergestellt. Anhand der berechneten mittleren Molekulargewichte der Polymere und der Anzahl der DMEDAMA-Wiederholungseinheiten konnte jeweils die mittlere Anzahl an Aminogruppen der tertiären Amin-Seitenketten des Polymers pro μL der Stammlösung berechnet werden. Durch die bekannte Anzahl an Basenpaaren des Plasmids und der bekannten Konzentration der pGL3-BASIC Stammlösung, konnte auf gleiche Weise die durchschnittliche Anzahl an Phosphatgruppen pro μL der pDNA-Stammlösung berechnet werden. Die Selbstassemblierung der Polyplexe erfolgte bei diesen Versuchen in aliquotierten pDNA-Lösungen zu

jeweils 100 ng pGL3-BASIC. Abhängig vom angestrebten N/P-Verhältnis wurden entsprechende Mengen des jeweiligen Polymers mittels Zentrifugation mit der DNA-haltigen Lösung gemischt.

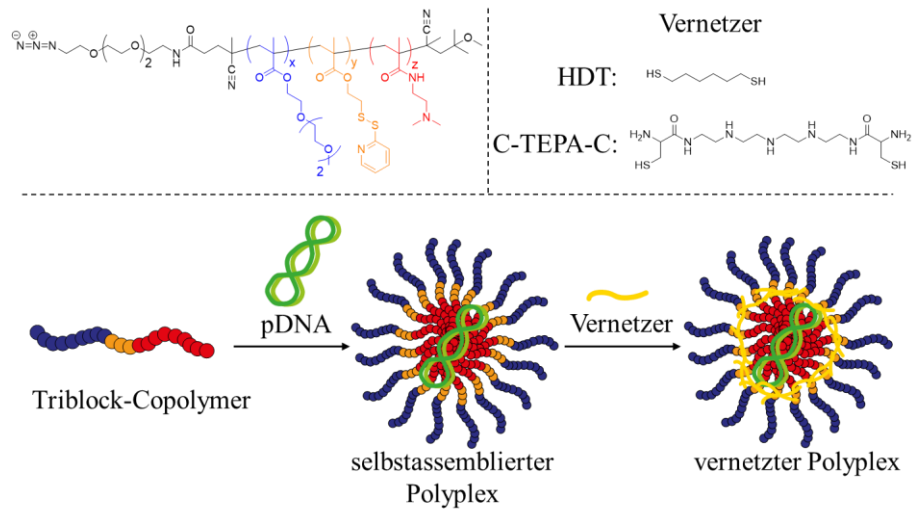


Abbildung 5.1: Konzeptionelles Schema der Darstellung von unvernetzten und vernetzten Polyplexen der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA) Triblock-Copolymere.

Die Agarose-Gele wurden jeweils zu einem Massenanteil von 0,8 % Agarose mit TBE-Puffer angesetzt. Zur Visualisierung freier pDNA wurde den Gelansätzen jeweils der fluoreszente Interkalationsfarbstoff GelRed[®] beigefügt. Dieser sollte bei der Elektrophorese frei diffundierende pDNA sichtbar machen, welche den Widerstand durch die elektrostatische Interaktion mit dem Triblock-Copolymer überwunden hatte und im elektrischen Feld in Richtung der Anode gewandert war. Bei erfolgreicher Interkalation des Farbstoffes in die Basenpaarsequenz des Plasmids, kann der Farbstoff unter einer UV-Lampe durch sein hellrotes Fluoreszenzlicht sichtbar gemacht werden. Durch mehrere DNA-Retentionsassays wurde die Stabilität unvernetzter und vernetzter Polyplexe gegenüber dem Einfluss des elektrischen Feldes gemessen und miteinander verglichen. Als Beispiel hierfür wurden in Abbildung 5.2 die Gelbilder der DNA-Retentionsassays des Polymers P5-1 gegenübergestellt.

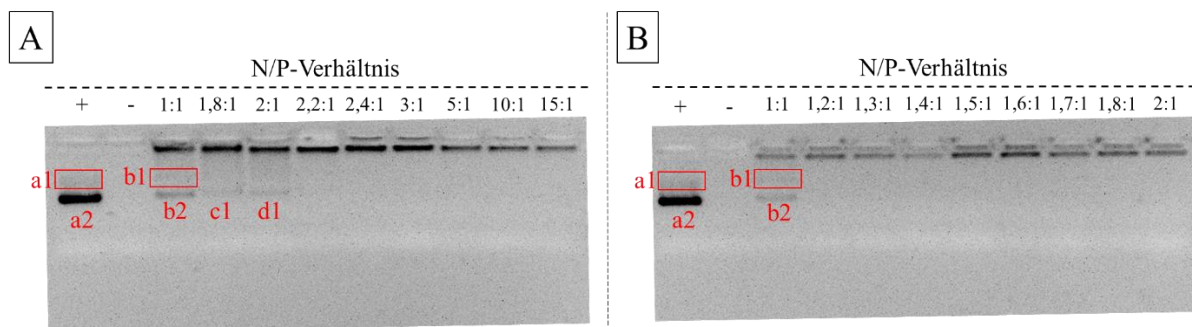


Abbildung 5.2: DNA-Retentionsassays der Polyplexe von pGL3-Basic und Polymer P5-1. A: DNA-Retentionsassay unvernetzter Polyplexe von P5-1. B: DNA-Retentionsassay von P5-1 Polyplexen nach Inkubation mit HDT.

In die Geltaschen der Agarosegele wurde dabei jeweils in der ersten Spur eine Probe der freien Plasmid-DNA als Positivkontrolle (+) aufgetragen. Diese kann mit dem Interkalationsfarbstoff, welcher im Gel eingelagert wurde ungehindert interagieren. Dabei entsprechen Position und Intensität der

Bandenanordnung von *a1* und *a2* dem Erwartungswert, der auftritt, wenn die eingesetzte pDNA ohne Interaktion mit dem Polymer frei durch das elektrische Feld in Richtung der Anode bewegt wird. Als Negativkontrolle (-) des Experiments diente eine Probe des Polymers (höchste eingesetzte Polymerkonzentration, entsprechend $N/P = 15$), welche in die Geltasche der zweiten Spur aufgetragen wurde. Hier wurde erwartet, dass es nicht zum Auftreten von Fluoreszenzbanden kommt, da die kationischen Polyplexe erwartungsgemäß nicht mit dem Interkalationsfarbstoff interagieren sollten. In die verbliebenen Geltaschen wurden jeweils Polyplexproben in aufsteigendem N/P-Verhältnis pipettiert. Der Vergleich der Gelbilder A und B in Abbildung 5.2 zeigt, dass ein sichtbarer Einfluss der Vernetzung der Polyplexe festzustellen war. Bei der elektrophoretischen Untersuchung der unvernetzten Polyplexe (Abbildung 5.2 A) sind sowohl in der Spur der Positivkontrolle (+) als auch in der ersten, zweiten und dritten Probenspur deutlich die Fluoreszenzbanden *a1*, *a2*, *b1*, *b2*, *c1* und *d1*, welche dem Plasmid zugeordnet werden können, erkennbar. Die detektierten Banden *a2*, *b2*, *c1* und *d1* entsprechen dabei der linearen Konformation des Plasmids. Als undeutliche, schattenartige Struktur ist zudem in der Spur der Positivkontrolle die Bande *a1* und in der ersten Polyplex-Spur die Bande *b1* erkennbar, wobei es sich hier jeweils um das Plasmid in *nicked-circled* Konformation handelt, welche, durch Einzelstrangbrüche entsteht und etwas voluminöser ist, wodurch sich Plasmide dieser Konformation langsamer durch das Agarosegel bewegen. Anhand der Intensität der Fluoreszenzsignale kann abgeleitet werden, dass ein großer Anteil der pDNA bereits bei einem N/P-Verhältnis von 1:1 in den Taschen des Gels zurückgehalten wird. Die Intensität der Fluoreszenzbanden nimmt bei Polyplexen höherer N/P-Verhältnisse stetig ab und kann ab einem N/P-Verhältnis von etwa 2,2:1 nicht mehr nachgewiesen werden. Dementsprechend kann gefolgert werden, dass die unter dem Einfluss des elektrischen Feldes bestehende, gerichtete Diffusion der pDNA aus dem Polyplex durch N/P-Verhältnisse von 2,2:1 und höher gestoppt werden kann. Hieraus kann abgeleitet werden, dass die Eigenladung des Plasmids ab diesem N/P-Verhältnis vollständig durch die Bildung des Polyplexes gegen das äußere magnetische Feld abgeschirmt werden konnte. Der Vergleich mit der Agarose-Gelelektrophorese vernetzter Polyplexe des Polymers P5-1 (siehe Abbildung 5.2 B) zeigt, dass hier deutlich weniger Fluoreszenzbanden auftreten. Neben den Banden *a1* und *a2* der Positivkontrolle (+) in der ersten Spur sind lediglich in der ersten Polyplex-Spur die Banden *b1* und *b2* zu erkennen, welche, wie zuvor beschrieben, der *nicked-circled* Konformation und der linearen Konformation des Plasmids zugeordnet werden können. Auch hier ist eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten, was für eine zumindest anteilige Retention der DNA in der Geltasche der Spur spricht. Bereits bei einem N/P-Verhältnis von 1,2:1 kann keine Fluoreszenz außerhalb der Geltaschen der Polyplex-Spuren festgestellt werden. Dementsprechend konnte durch den Einfluss des Vernetzers HDT der Widerstand gegen die gerichtete Diffusion der pDNA im elektrischen Feld erhöht werden. Dieser Effekt liegt darin begründet, dass teilweise oder vollständige Vernetzung der reaktiven Disulfid-Gruppen des jeweiligen Polyplex-Ansatzes zu einer Erhöhung der Diffusionsbarriere führt, sodass ein physikalischer Widerstand erzeugt wird, der die gerichtete Diffusion der pDNA behindert. Es kann festgehalten werden, dass im Allgemeinen die

Vernetzung des Polyplexes dazu führt, dass bei deutlich geringeren N/P-Werten als bei unvernetzten Polyplexen eine effektive Retention der pDNA im Polyplex aufweisen. Dies ist ein für den Transport von pDNA interessanter Effekt, da dies einen ersten Hinweis darauf liefert, dass eine geringere Interaktion vernetzter Polyplexe mit dem physiologischen Medium zu erwarten ist als bei unvernetzten Polyplexen. Im Umkehrschluss sollte die reduktive Spaltung der Disulfid-Vernetzung dazu führen, dass die Möglichkeit zur Interaktion mit dem physiologischen Medium erhöht wird, wodurch sich der Stimulus-responsive Charakter dieser Vernetzungsmethode zeigt.

Dieser Effekt der Vernetzung war für alle untersuchten Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA) Triblock-Copolymere zu beobachten. Da für alle untersuchten Polymere ein stabiler Einschluss der pDNA bei vernetzten Polyplexen mit einem N/P-Wert <2,5:1 vorlag, wurden für die weiteren Versuche zur Charakterisierung der Polyplexe ein N/P-Verhältnis von 3:1 als Mindestwert für die Selbstassemblierung der pDNA-Polyplexe verwendet. Somit ergaben sich insgesamt ähnliche Ergebnisse der Charakterisierung des mindest-N/P-Verhältnisses für einen erfolgreichen Einschluss der pDNA, wie bei der Untersuchung der Polyplexe auf Basis der Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMAEMA) Triblock-Copolymere aus dem ersten Teil dieser Dissertation. Im weiteren Verlauf wurden die physikochemischen Eigenschaften der Polyplexe eingehender untersucht, um Erkenntnisse über die Größe der Partikel und deren Oberflächenladung zu gewinnen.

5.2.2 Polyplexcharakterisierung mittels dynamischer Lichtstreuung und Ermittlung des Zeta-Potentials

Zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius und des Zeta-Potentials der Polyplexe wurden Polyplexproben verschiedener Triblock-Copolymere mit einem N/P-Verhältnis von 3:1 in PBS-Puffer angesetzt und mittels DLS und Zeta-Potentialmessung untersucht. Durch seinen pH-Wert von 7,4 und dem isotonischen Salzgehalt entspricht PBS-Puffer in diesen Eigenschaften denen des menschlichen Blutes und dient somit als adäquates Mittel zur Simulation des physiologischen Mediums. Die angesetzten Polyplexproben wurden jeweils in zwei Aliquote aufgeteilt, wovon ein Aliquot zusätzlich mit dem Vernetzer HDT inkubiert wurde. Unmittelbar vor der Messung wurde jede Probe durch einen GHP-Spritzenfilter mit einem Größenausschluss der Filtermembran von 400 nm gefiltert, um die Probe von Staub zu befreien, der bei den Messungen stören könnte. Die Zusammenfassung der Messergebnisse ist in Tabelle 5.1 aufgeführt.

Tabelle 5.1: Ergebnisse der DLS-Messungen und der Bestimmung des Zeta-Potentials unvernetzter und vernetzter Polyplexe der Polymerreihe P5, angesetzt in PBS-Puffer.

| Unvernetzte Polyplexe ^a | | | Vernetzte Polyplexe ^b | |
|------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|---------------|
| | mittlerer hydrodynamischer | | mittlerer hydrodynamischer | |
| Polymer | Durchmesser [nm] | mittlerer PDI ^c | Durchmesser [nm] | mittlerer PDI |
| P5-1^c | 230,8 | 0,200 | 237,6 | 0,212 |
| P5-2^c | 187,2 | 0,151 | 213,3 | 0,230 |
| P5-3^c | 256,1 | 0,217 | 224,4 | 0,201 |
| P5-4^c | 258,1 | 0,179 | 231,4 | 0,206 |

| Polymer | mittleres Zeta-Potential [mV] | mittleres Zeta-Potential [mV] |
|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| P5-1^c | -2 | +1 |
| P5-2^c | -2 | +3 |
| P5-3^c | ±0 | ±0 |
| P5-4^c | +1 | +1 |

^aDie unvernetzten Polyplexe wurden mit einem N/P-Verhältnis von 3:1 angesetzt. ^bDie vernetzten Polyplexe wurden mit einem N/P-Verhältnis von 3:1 und mit 1,6-Hexandithiol als Vernetzer angesetzt. ^cAngesetzt in 1x PBS-Puffer.

Die Messung des hydrodynamischen Durchmessers mittels dynamischer Lichtstreuung ergab einen Größenbereich von etwa 180-260 nm für den mittleren hydrodynamischen Durchmesser der gebildeten Polyplexe. Gleichzeitig ist die mittlere Polydispersität der Partikel mit Werten zwischen 0,15 und 0,23 sehr niedrig. Die Synthese der Polyplexe führte somit zu wohl definierten Nanopartikeln mit enger Größenverteilung. Weder mehrmalige DLS-Messungen der Proben über einen Verlauf von mehreren Stunden noch die Messung von Polyplexproben, welche nicht mittels eines GHP-Spritzenfilters gereinigt wurden, ließen auf ein Aggregationsverhalten der Polyplexe schließen, da sich die ermittelten Werte lediglich Schwankungen im Rahmen der Messgenauigkeit aufwiesen und keine Tendenz zur Vergrößerung der ermittelten, mittleren hydrodynamischen Durchmesser bestand. Beim Vergleich der unvernetzten und vernetzten Polyplexe untereinander, kann auf den ersten Blick kein einheitlicher Einfluss der Vernetzung abgeleitet werden. Bei einigen Proben führt die Vernetzung zu einer leichten Zunahme des hydrodynamischen Durchmessers, bei anderen Proben zu einer leichten Verkleinerung des hydrodynamischen Durchmessers. Bei den Polymeren, bei denen sich der Durchmesser durch die Vernetzung leicht erhöhte handelt es sich mit P5-1 und P5-2 um Polymere mit vergleichsweise geringerem Massenanteil des polykationischen Blocks, bei den Polyplexen der Polymere P5-3 und P5-4, bei denen sich das hydrodynamische Volumen durch Vernetzung verringerte, handelt es sich um Polymere mit einem vergleichsweise höheren Massenanteil des polykationischen Blocks. Diese Tendenz zur Volumenkompression durch Vernetzung ist zunächst als positiv zu betrachten, da angenommen werden kann, dass die Kompression der vernetzten Transportform des Polyplexes einen Stabilitätsgewinn für den Polyplex bedeutet.

Durch die hohe Salzkonzentration des PBS-Puffers musste das Messsystem zur Bestimmung des Zeta-Potentials angepasst werden, da durch die hohe Stromspannung der Messung und den, durch die hohe Salzkonzentration gegebenen, hohen Leitwert der Polyplex-Lösung, eine oxidative Degradation der Messelektroden der Zeta-Küvetten drohte. Die Degradation der Messelektroden hätte zu unzuverlässigen Werten für das Zeta-Potential geführt. Aus diesem Grund wurden die Messdaten anhand von Einzelmessungen ermittelt. Durch die fehlende, aussagekräftige Datenakkumulation aus dutzenden von Messungen konnte somit keine aussagekräftige statistische Streuung der ermittelten Zeta-Potentiale berechnet werden. Die gemessenen, mittleren Zeta-Potentiale sind daher mit einer statistischen Ungenauigkeit behaftet. Insgesamt zeigt sich jedoch, dass alle ermittelten Einzelwerte deutlich kleiner als +10 mV und deutlich größer als -10 mV waren. Wie schon im ersten Teil dieser Dissertation berichtet, gilt ein Potential von weniger als ± 10 mV als neutral. Dies gibt einen guten Hinweis darauf, dass die synthetisierten Polyplex-Nanopartikel wahrscheinlich nur in sehr geringfügigem Maße unspezifische, durch ionische Wechselwirkung bedingte, Interaktionen mit Proteinen und anderen Bestandteilen des Blutes eingehen werden. Um die Parameter für den hydrodynamischen Durchmesser und das Zeta-Potential in einem Medium mit geringerer Ionenstärke und Leitfähigkeit zu ermitteln, wurden Polyplexe der Polymerreihe P5 in einer 10 mM NaCl-Lösung angesetzt. Die Ionenstärke der Lösung ist hier zwar geringer, die Polyplex-Lösung wies jedoch zum Zeitpunkt der Messung einen ebenfalls neutralen pH-Wert auf. Die Ergebnisse der DLS-Messungen und der Bestimmung des Zeta-Potentials sind in der Tabelle 5.2 zusammengefasst.

Tabelle 5.2: Ergebnisse der DLS-Messungen und der Bestimmung des Zeta-Potentials unvernetzter und vernetzter Polyplexe der Polymerreihe P5, angesetzt in 10 mM NaCl-Lösung.

| Polymer | Unvernetzte Polyplexe ^a | | Vernetzte Polyplexe ^b | |
|-------------------|---|----------------------------|---|---------------|
| | mittlerer hydrodynamischer Durchmesser [nm] | mittlerer PDI ^c | mittlerer hydrodynamischer Durchmesser [nm] | mittlerer PDI |
| P5-1 ^c | 136,0 | 0,171 | 140,9 | 0,179 |
| P5-2 ^c | 112,7 | 0,173 | 115,6 | 0,192 |
| P5-3 ^c | 116,4 | 0,148 | 120,9 | 0,149 |
| P5-4 ^c | 126,7 | 0,149 | 150,5 | 0,170 |

| Polymer | Standard- mittleres Zeta-Potential [mV] | | Standard- mittleres Zeta-Potential [mV] | |
|-------------------|---|--------------------------|---|--------------------------|
| | mittleres Zeta-Potential [mV] | Standard-abweichung [mV] | mittleres Zeta-Potential [mV] | Standard-abweichung [mV] |
| P5-1 ^c | ±0 | ±6,8 | +2 | ±6,9 |
| P5-2 ^c | +3 | ±5,6 | +3 | ±7,1 |
| P5-3 ^c | +3 | ±7,1 | +4 | ±8,2 |
| P5-4 ^c | +4 | ±6,1 | +1 | ±7,1 |

^aDie unvernetzten Polyplexe wurden mit einem N/P-Verhältnis von 3:1 angesetzt. ^bDie vernetzten Polyplexe wurden mit einem N/P-Verhältnis von 3:1 und mit 1,6-Hexandithiol als Vernetzer angesetzt. ^cAngesetzt in 10 mM NaCl-Lösung.

Der Vergleich der Daten der DLS-Messungen in der 10 mM NaCl-Lösung mit den Daten, die aus den in PBS-Puffer angesetzten Polyplexlösungen ermittelt wurden, zeigt, dass alle in der 10 mM NaCl-Lösung einen deutlich kleineren, mittleren hydrodynamischen Durchmesser besaßen. Dieser lag im Bereich von etwa 110-150 nm. Zusätzlich ist im Allgemeinen auch eine engere Größenverteilung der Polyplexe zu beobachten, welche in einem PDI-Bereich von 0,14-0,19 lag. Der größere hydrodynamische Durchmesser der in PBS angesetzten Polyplexe kann mit dem höheren Salzgehalt des Puffers erklärt werden. Die gelösten Ionen wechselwirken mit den Phosphat- und Aminogruppen der DNA und des Polymers. Hierdurch entsteht ein osmotischer Gradient, der Polyplex quillt durch nachdiffundierendes Wasser auf. Vergleicht man die unvernetzten und vernetzten Polyplexe, welche in der 10 mM NaCl-Lösung synthetisiert wurden untereinander, so ist im Allgemeinen bei den vernetzten Polyplexen eine leichte Erhöhung des hydrodynamischen Durchmessers festzustellen, ebenso eine leichte Verbreiterung des Polydispersitätsindex der Polyplexprobe. Dies lässt vermuten, dass die Vernetzung nicht zu einer weiteren Komprimierung der aggregierten pDNA führte.

Bei den in der NaCl-Lösung hergestellten Polyplexen ist auf Grund der geringeren Leitfähigkeit der Polyplex-Lösung eine ausgiebige Charakterisierung durch Bestimmung des Zeta-Potentials möglich. Da keine oxidative Degradation der Elektroden drohte, wurden die Messdaten durch Akkumulierung und statistische Auswertung hunderter Einzelmessungen gewonnen, wodurch eine verlässliche Bestimmung des Zeta-Potentials und der Standardabweichung des Potentialwerts möglich war. Insgesamt kann bei der Betrachtung der gemessenen Zeta-Potentiale der verschiedenen Polyplexproben, im Rahmen der

Messgenauigkeit, kein relevanter Unterschied zwischen vernetzten und unvernetzten Proben festgestellt werden. Sowohl die unvernetzten als auch die vernetzten Polyplexe zeichneten sich durch ein sehr niedriges mittleres Zeta-Potential von maximal +4 mV aus. Wie bereits im ersten Teil dieser Dissertation erörtert wird bei einem Zeta-Potential im Bereich von ± 10 mV von einem neutralen Oberflächenpotential gesprochen.^[172] Daher ergibt sich aus den Messdaten, dass alle untersuchten Polyplexe ein neutrales Oberflächenpotential aufwiesen. Da die aus den Polyplex-Ansätzen, die in PBS-Puffer synthetisiert wurden, die gleichen Tendenzen aufweisen, bekräftigt dies den Verdacht, dass in physiologischen Medien geringe elektrostatische Interaktionen der Nanopartikel mit gelösten Bestandteilen des Bluts zu erwarten sind. Im Allgemeinen kann hierdurch eine höhere Halbwertszeit der Partikel beim Transport im Blut, im Vergleich zu Partikeln mit deutlich messbarer Oberflächenladung, erwartet werden. Durch Faktoren wie den EPR-Effekt, könnte somit eine passive Akkumulation der Partikel im Zielgewebe gefördert werden.

Anhand des kleinen hydrodynamischen Durchmessers und der geringen Größenverteilung der vernetzten Polyplexe kann angenommen werden, dass es durch die Vernetzung lediglich zu intrapartikulärer Vernetzung und nicht zu einem Übermaß an interpartikulären Vernetzungen kam. Dies kann unter anderem dadurch erklärt werden, dass die Bildung der Polyplexe zu einer ungleichen Verteilung der reaktiven Disulfid-Gruppen führt. Hat sich ein Gleichgewicht zwischen Aggregat und freiem Unimer eingestellt, so enthält die Reaktionslösung einen nur sehr geringen Gehalt an freiem Polymer, das Gros ist an die pDNA gebunden. Im Polyplex selbst liegen die reaktiven Disulfidgruppen in hoher Konzentration und damit relativer räumlicher Nähe zueinander vor. Da die dynamische Lichtstreuung zeigen konnte, dass keiner der unvernetzten Polyplex-Ansätze zur Bildung von großen Aggregaten neigt, kann daraus geschlossen werden, dass eine homogene Verteilung der Nanopartikel in der Polymerlösung vorliegt. Kommt es zur Reaktion mit einem vernetzenden Molekül, so ist die Vernetzung innerhalb der Polyplexe deutlich wahrscheinlicher als die Vernetzung zweier, sich zufällig begegnender Polyplexe. Es ergeben sich bei der Quantifizierung des Vernetzungsgrads darüber hinaus jedoch einige Schwierigkeiten, da anzunehmen ist, dass eine vollständige Vernetzung der Polymere des Polyplexes nicht möglich ist. Zum einen sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit der Vernetzung mit der abnehmenden Konzentration freier Vernetzer-Moleküle, zum anderen sinkt mit steigendem Vernetzungsgrad die Zugänglichkeit der reaktiven Disulfid-Seitenketten. Zur Bestimmung des maximalen Vernetzungsgrads einer Polyplexprobe wurde stellvertretend ein Polyplex des Polymers P5-3 mit einem N/P-Verhältnis von 3:1 hergestellt und der Verlauf der Vernetzungsreaktion des Polyplexes mittels UV-Vis Spektroskopie der Reaktionslösung verfolgt (siehe Abbildung 5.3).

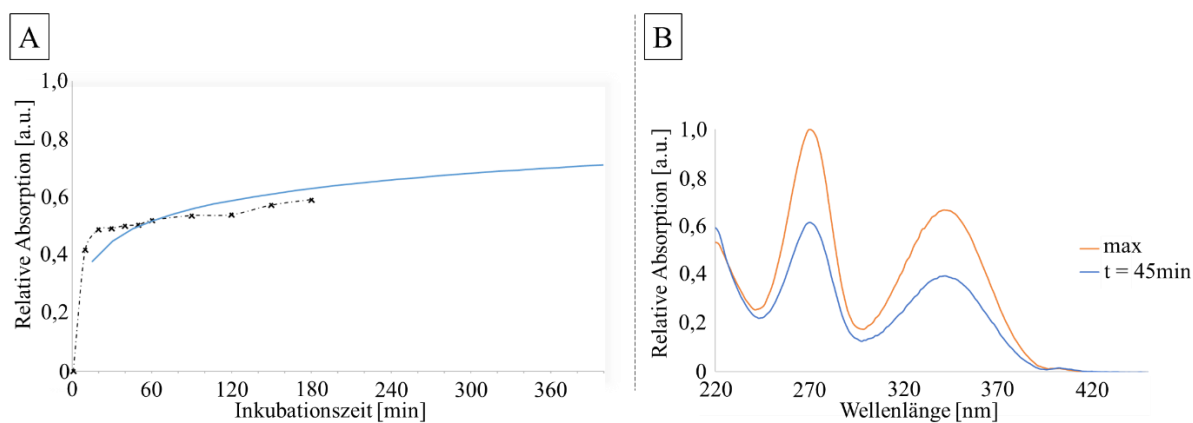


Abbildung 5.3: Ermittlung der Vernetzungseffizienz der PDSM-Seitengruppen. A: Relativer Reaktionsumsatz der HDT-Vernetzungsreaktion, aufgetragen gegen die Reaktionszeit. Blaue Kurve: approximierter Reaktionsverlauf. B: Beispielhafter Reaktionsumsatz der Vernetzung durch C-TEPA-C. Vergleich des maximalen PDSM-Umsatzes mit dem Umsatz nach 45 Minuten Inkubationszeit, Als Messgrößen dienten die relative Absorption der Filtrate nach Spin-Zentrifugation.

Abbildung 5.3 A zeigt dabei eine grafische Auftragung des Umsatzes der PDSM-Gruppen gegen die Reaktionszeit der Vernetzung. Die Daten wurden dabei anhand von kinetischen Untersuchungen mittels UV/Vis-Spektroskopie erhoben. Als Lösungsmittel für die Polyplexsynthese und anschließende Vernetzung wurde PBS-Puffer verwendet. Die eingesetzte Menge 1,6-Hexandithiol entsprach einer theoretischen Vernetzungsdichte von 100% und die Vernetzungsreaktion wurde für die Dauer von drei Stunden spektroskopisch verfolgt. Um eine Größe für den maximal erreichbaren Umsatz zu erhalten, wurde nach Ende des Messzeitraums die Polyplexprobe für 15 Stunden mit einer HDT-Menge inkubiert, welche der 25-fachen Anzahl der PDSM-Äquivalentmenge des Ansatzes entsprach. Es wurde angenommen, dass das gemessene Absorptionssignal in diesem Fall dem maximal erzielbaren PDSM-Umsatz der Vernetzungsreaktion entsprach. Durch Interpolation der Messergebnisse konnte eine Approximation des Reaktionsverlaufs getroffen werden. Es zeigt sich, dass nach wenigen Minuten der Inkubation bereits etwa 40% der vorhandenen PDSM-Gruppen mit HDT reagiert hatten. Ein Umsatz von 50% wurde bereits zwischen 40 und 50 Minuten nach Inkubationsbeginn erzielt. Aus der Messung des Reaktionsverlaufs kann zwar keine Aussage über die tatsächliche Anzahl der geknüpften Vernetzungen getroffen werden, da lediglich der relative Umsatz bestimmt werden kann. Die sehr hohe Reaktionsgeschwindigkeit in den ersten Minuten der Reaktion lässt jedoch einen Bulk-Effekt vermuten, bei dem durch die lokal sehr hohe Konzentration der PDSM-Seitengruppen im Polyplex die zweite Disulfid-Austauschreaktion durch die erste Substitution gefördert wird. Um einen Einblick in die Vernetzungsreaktion von C-TEPA-C an den PDSM-Seitengruppen zu gewinnen wurde der Umsatz der Reaktion nach 45 Minuten gemessen, da dies der üblichen Mindest-Inkubationszeit der Vernetzung entsprach (siehe Abbildung 5.3 B). Hierfür wurde ein Polyplex-Ansatz in PBS-Puffer vor der Inkubation mit C-TEPA-C in zwei Aliquots aufgeteilt. Eines wurde mit der C-TEPA-C-Menge, welche einer 100%igen Vernetzungsdichte entsprechen würde, für 45 Minuten inkubiert, das andere Aliquot wurde mit der 25-fachen Äquivalentmenge der Anzahl an PDSM-Seitengruppen des Ansatzes für 24 Stunden inkubiert. Die Reaktion wurde jeweils durch Spin-Filtration unterbrochen, die Ermittlung der UV/Vis-

Absorption erfolgte aus dem jeweiligen Zentrifugat. Es zeigte sich, dass bei der Vernetzung mit C-TEPA-C nach 45 Minuten ein Umsatz von etwa 50% erzielt werden konnte. Damit lag dieser im Umsatzbereich, der bereits bei der Vernetzung mit HDT ermittelt werden konnte. Dies lässt darauf schließen, dass eine ähnlich schnelle initiale Disulfid-Austauschreaktion wie bei der Vernetzung mit HDT stattfindet.

Die Methode der dynamischen Lichtstreuung wurde unter anderem auch dazu verwendet die Lagerfähigkeit hergestellter Partikellösungen zu beurteilen. So wurde die Probe eines Polyplex-Partikels für mehrere Wochen bei 3 °C unter Argon-Atmosphäre gelagert, um zu überprüfen, ob die lange Lagerungszeit einen messbaren Einfluss auf den Hydrodynamischen Durchmesser und die Größenverteilung der Polyplexprobe hatte. Eine Zusammenfassung der Messergebnisse ist in Abbildung 5.4 aufgeführt.

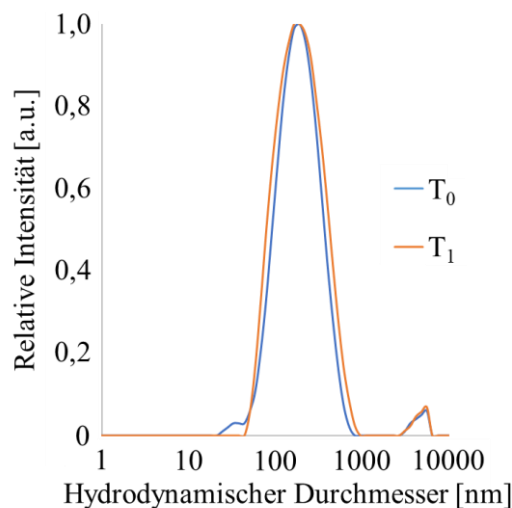


Abbildung 5.4: Polyplex-Stabilitätsuntersuchung mittels Dynamischer Lichtstreuung. T₀: Größenverteilung des Polyplexes unmittelbar nach der Synthese und Vernetzung mittels HDT (Vernetzungsdichte approx. 50%). T₁: Größenverteilung des Polyplexes nach insgesamt 4 Wochen Lagerung bei 3 °C unter Argon-Schutzatmosphäre.

Es zeigte sich, dass die Polyplexprobe nach der erstmaligen Ermittlung des hydrodynamischen Durchmessers über den Verlauf von einem Monat in einer wässrigen Lösung bei 3 °C gelagert werden konnte, ohne dass eine große Veränderung des hydrodynamischen Durchmessers oder der Größenverteilung der Polyplexprobe detektiert werden konnte. Die Unterschiede im hydrodynamischen Durchmesser bewegten sich dabei im Bereich der Messungenauigkeit der DLS, womit davon ausgegangen werden kann, dass in Bezug auf den mittleren hydrodynamischen Durchmesser und die berechnete Polydispersität, keine Unterscheidung der Proben möglich war. Damit konnte gezeigt werden, dass die angesetzten Polyplexe prinzipiell eine hohe theoretische Lagerstabilität aufweisen. Generell kann keine Aussage über den funktionellen Erhalt der komplexierten pDNA über den langen Lagerzeitraum getroffen werden. Da die Herstellung der Polyplexe schnell und unkompliziert durchführbar war, wurden alle Ansätze für den Gebrauch in physikochemischen und biologischen

Versuchsreihen jedoch unmittelbar vor den jeweiligen Experimenten synthetisiert, um etwaige Qualitätsverluste durch längere Lagerung sicher ausschließen zu können.

5.2.3 Serum-DLS

Um das Verhalten der Polyplex-Nanopartikel in biologischen Systemen besser einschätzen zu können, wurde die Methode der Serum-DLS angewendet. Diese Arbeitsmethode kann einen guten Eindruck davon vermitteln, ob sich das untersuchte, partikuläre System grundsätzlich für den Einsatz als intravenöses Therapeutikum eignet. Ziel der Serum-DLS ist dabei herauszufinden, ob es durch die Mischung des Proteinhaltigen Blutserums und der Nanopartikel zur Aggregation von Serumproteinen kommt. Zum einen kann eine übermäßige Aggregatbildung toxisch für den Organismus sein, zum anderen führt die Bildung von Aggregaten des Nanopartikels mit Serumproteinen zu einer Verringerung der Anzahl an Partikeln, welche zum Wirkort gelangen können. Hierdurch sinkt die Bluthalbwertszeit des Partikelsystems.

Abbildung 5.5 zeigt beispielhaft die Ergebnisse der Serum DLS eines Polyplexes des Polymers P5-4.

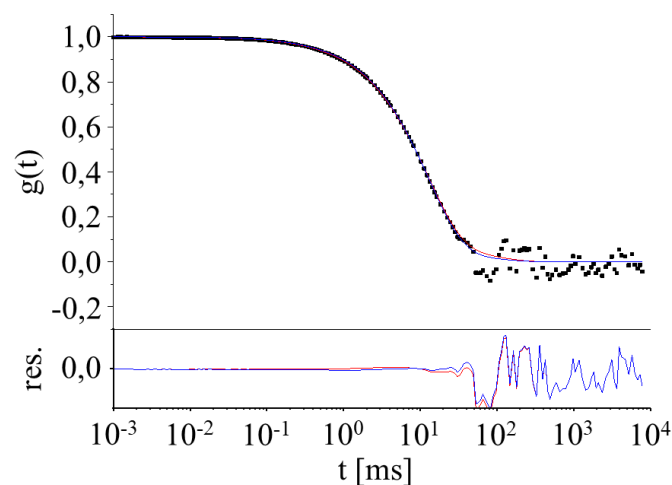


Abbildung 5.5: Beispiel der DLS-Messungen in Citrat-Serum. Blau: Korrelationsfunktion ohne Einbeziehung des Aggregatterms. Rot: Korrelationsfunktion unter Einbeziehung des Aggregatterms.

Hierbei ergab die DLS-Messung, dass sowohl die Korrelationsfunktion, die den Beitrag eines Aggregationsterms einbezieht als auch die Korrelationsfunktion, welche keinen Beitrag eines Aggregationsterms mit einbezieht, die Messdaten der Lichtstreuungsmessung beschreiben konnten. Dies ist auch daran zu erkennen, dass das resultierende Residuum beider Funktionen nahezu deckungsgleich verläuft. Hieraus lässt sich folgern, dass es durch die Mischung der synthetisierten Polyplexe mit Citrat-Serum zu keinem nachweisbaren Aggregationsverhalten der Serumproteine kam. Für alle untersuchten Polymere der Polymerreihe P5 konnte keine Aggregation von Serumproteinen

detektiert werden. Dies weist darauf hin, dass zumindest eine grundlegende Eignung der Polyplexe zum Transport von pDNA im Blut vorliegt.

5.2.4 Heparin Challenge

Um weitere Hinweise auf das mögliche Verhalten der Polyplexe im physiologischen Medium gewinnen zu können, wurden Polyplexproben mit verschiedenen Konzentrationen des polyanionischen Biomoleküls Heparin versetzt, um einen Einblick in die Stabilität der pDNA-Komplexierung zu gewinnen. Heparin ist ein stark negativ geladenes Glycosaminoglykan und ist Bestandteil der extrazellulären Matrix verschiedener Gewebestrukturen.^[194] Die Polyplexe wurden in PBS Puffer angesetzt, welcher in Salzkonzentration und pH-Wert Blut- und Gewebsflüssigkeiten entspricht. Zur Überprüfung der Integrität der Polyplexe wurde der jeweiligen Polyplexlösung der Interkalationsfarbstoff GelRed[®] beigefügt. Die Proben wurden im Anschluss für 45 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen von Heparin inkubiert und nach der Inkubationszeit mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht (siehe Abbildung 5.6).

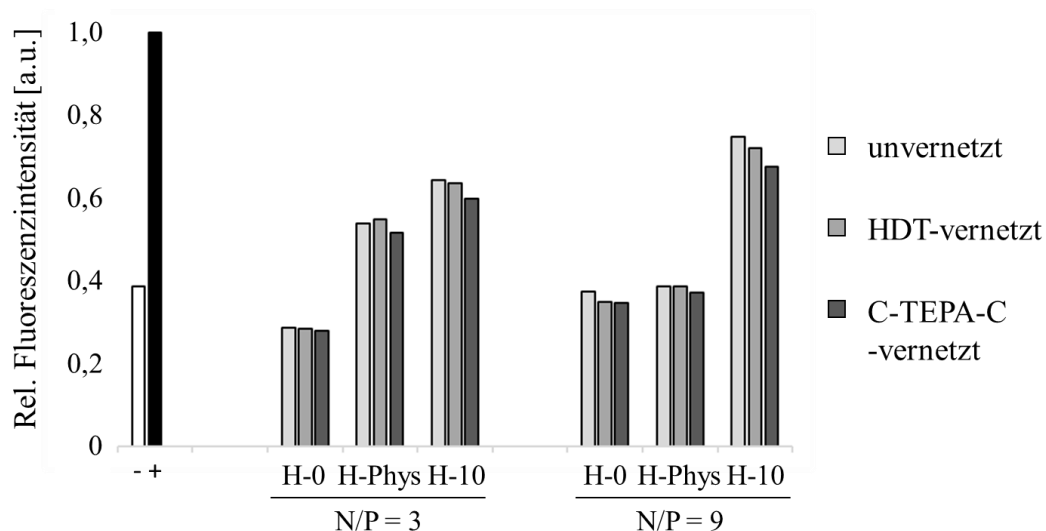


Abbildung 5.6: Heparin-Challenge der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMEDAMA) Polyplexe. Die verwendeten Polyplexe wurden mit dem Polymer P5-2 und pGL3-Basic bei N/P-Verhältnissen von 3:1 und 9:1 hergestellt. Es wurden jeweils unvernetzte, mit HDT vernetzte und mit C-TEPA-C vernetzte Polyplexe eingesetzt. Jeweils 3 Aliquote der Polyplexlösungen wurden mit Heparin in physiologischer Konzentration (H-Phys) und mit Heparin in der 10-fachen physiologischen Konzentration (H-10) inkubiert. Jeweils 3 Aliquote wurden zur Kontrolle unbehandelt vermessen (H-0). Die UV/Vis-Spektroskopie erfolgte nach 45 Minuten Inkubationszeit.

Es wurden jeweils Triplikate der verschiedenen Polyplexlösungen auf einer 96 well Platte ausgebracht und in einem Plate-Reader spektroskopisch untersucht. Proben die nicht mit Heparin behandelt wurden, wurden als Negativkontrolle verwendet. Die physiologische Konzentration von Heparin im Plasma beträgt zwischen 1,2 µg/mL und 1,8 µg/mL.^[195] Es wurden bei diesem Experiment die physiologische Heparinkonzentration und die 10-fache physiologische Konzentration eingesetzt. Die Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchung der Proben zeigen, dass es bei den Polyplexen mit einem N/P-

Verhältnis von 3:1 bereits bei physiologischen Heparinkonzentrationen zu einer Interaktion des Farbstoffs mit der pDNA und daher einer Zunahme des Fluoreszenzlichts des Farbstoffs kam. Für alle Polyplexe, die mit einem N/P-Verhältnis von 9:1 angesetzt wurden ist hingegen keine Zunahme der Fluoreszenzintensität bei physiologischen Heparinkonzentrationen zu beobachten. Erst bei der 10-fachen physiologischen Heparinkonzentration kann die pDNA mit dem Interkalationsfarbstoff wechselwirken. Aus diesem Experiment kann geschlossen werden, dass sich vor allem Polyplexe höherer N/P-Verhältnisse für systemische Applikationen eignen werden, da diese besonders robust gegenüber polyanionischen Biopolymeren sind und somit wahrscheinlich eine längere Zirkulationszeit im Blut aufweisen werden. Ein Stabilitätsunterschied zwischen vernetzten und unvernetzten Polyplexen konnte im Rahmen dieser Untersuchung jedoch nicht festgestellt werden.

5.2.5 Biologische *in vitro* Experimente

Die synthetisierten Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA) Triblock-Copolymere wurden als aussichtsreiche Kandidaten für erste biologische *in vitro* Testungen des neuen, multifunktionellen Polymersystems erachtet. Hierfür wurden durch Frau Simone Berger an der Ludwig-Maximilian-Universität München verschiedene Tests hinsichtlich der Zellviabilität, Zellaufnahme und Transfektionseffizienz synthetisierter Polyplexe vorgenommen. Die Polyplexe wurden hierbei mit den Polymeren P5-1 bis P5-4 und der Plasmid-DNA pCMV-Luc hergestellt.

Um zu überprüfen, ob die Polyplexe eine unspezifische, toxische Wirkung auf Zellen besitzen, wurde ein MTT-Assay zur Kontrolle der Zellviabilität durchgeführt. Hierfür wurden Zellen der Zelllinie N2a, einer murinen Neuroblastom-Zelllinie, verwendet. Diese wurden auf einer 96 well Zellkulturplatte ausgesät und für 24 h mit den Polyplexproben inkubiert. Für den Test wurden Polyplexe zu verschiedenen N/P-Verhältnissen angesetzt und jeweils unvernetzt, mit HDT vernetzt und mit C-TEPA-C vernetzt, verwendet. Der Viabilitätstest wurde durch den Zusatz des Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), welcher von lebenden Zellen zu einem Formazan reduziert werden kann, durchgeführt. Die Auswertung der Untersuchung wurde spektroskopisch vorgenommen. Abbildung 5.7 zeigt die Ergebnisse der Zellviabilitätsuntersuchung.

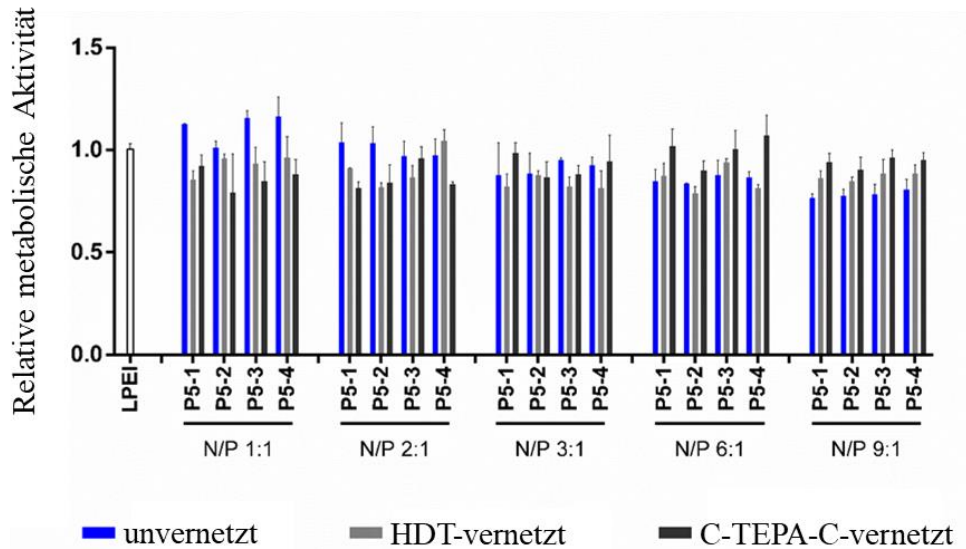


Abbildung 5.7: MTT-Assay der Polyplexe der Polymerreihe P5. Der MTT-Assay wurde mit Zellen der murinen Zelllinie N2a durchgeführt. Der MTT-Assay wurde in Triplikaten durchgeführt. Die metabolische Aktivität ist in Relation zu mit PBS-inkubierten Zellen angegeben.

Alle Daten zur relativen metabolischen Zellaktivität beziehen sich dabei auf N2a-Zellen, die als Negativkontrolle mit PBS-Puffer behandelt wurden. Als Vergleichsgröße dient die relative metabolische Aktivität von N2a-Zellen, die mit dem Transfektionsagens LPEI inkubiert wurden. Vergleicht man die errechneten metabolischen Aktivitäten der Messreihen, so kann abgeleitet werden, dass keiner der untersuchten Polyplex-Ansätze eine extensive toxische Wirkung im MTT-Assay aufweist. Aus den gegebenen Messdaten kann zudem kein Systematischer Unterschied zwischen unvernetzten oder vernetzten Polyplexen gefunden werden, sowohl unvernetzte Polyplexe als auch solche die mit HDT oder C-TEPA-C vernetzt wurden, weisen kaum bis keine messbare toxische Wirkung auf die Zellen auf. Lediglich bei den Polyplex-Ansätzen mit N/P-Verhältnissen von 6:1 und 9:1 scheinen jeweils die mit C-TEPA-C vernetzten Polyplexe den geringsten Einfluss auf die relative metabolische Aktivität der N2a-Zellen auszuüben. Alles in allem kann geschlossen werden, dass die mit den Triblock-Copolymeren der Reihe P5 hergestellten Polyplexe alle in keiner der untersuchten Zusammensetzungen toxisch reagierten. Dies legt dar, dass das Polymer-System biokompatibel ist und daher bedenkenlos für *in vitro* Versuche an eingesetzt werden kann.

Als nächstes sollte die Effizienz der Polyplexe bei der Transfektion von N2a-Zellen untersucht werden. Hierzu wurden erneut Polyplexe mit der Plasmid-DNA pCMV-Luc synthetisiert. Der Vektor pCMV-Luc codiert dabei unter anderem für das Enzym Luciferase. Um die Transfektionseffizienz der hergestellten Polyplexe zu testen, wurde daher ein Luciferin / Luciferase-Assay durchgeführt. Hierzu wurden in einer Zellkulturplatte ausgesäte Zellen mit den Polyplexlösungen inkubiert. Bei erfolgreicher Transfektion der N2a-Zellen mit der im Polyplex gebundenen pDNA sollten die inkubierten Zellen das Enzym Luciferase translatieren können. Durch die Zugabe von Luciferin kann dies überprüft werden, da dieses durch Luciferase abgebaut wird, wobei Lumineszenzlicht abgestrahlt wird. Positiv transfizierte

Zellen führen demnach zum Abbau des Luciferins und zur Emission von Lumineszenzlicht in der entsprechenden Probenlösung. Je mehr positiv Transfizierte Zellen vorliegen, desto höher ist die Intensität des Lichtsignals der Probe. Die Ergebnisse der Transfektionsuntersuchung sind in Abbildung 5.8 aufgeführt.

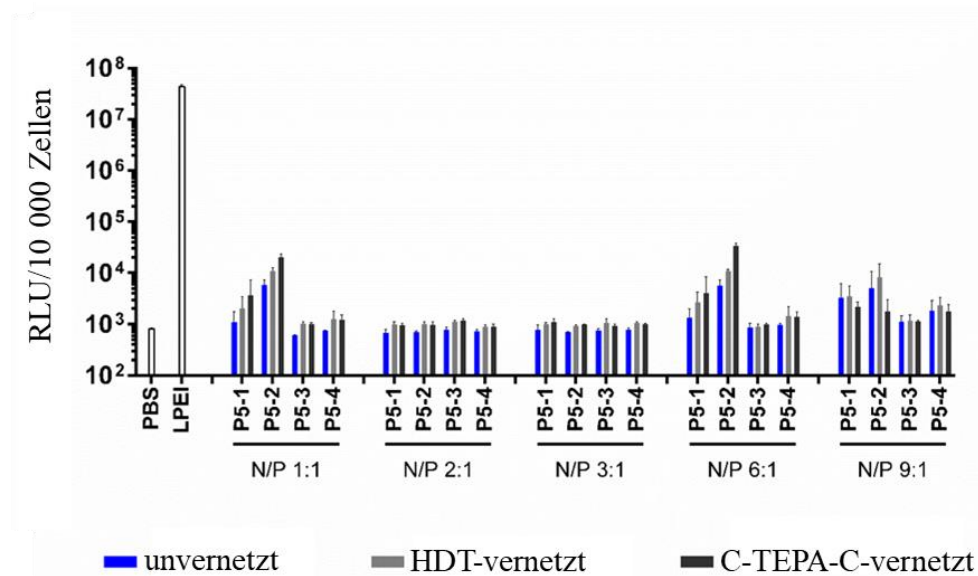


Abbildung 5.8: Versuche zum Luciferase Gen-Transfer. Die verwendeten Polyplexe wurden aus den Polymeren P5-1 bis P5-4 und pCMV-Luc pDNA synthetisiert und mit HDT oder C-TEPA-C vernetzt. Die Zellversuche zum Luciferase Gen-Transfer wurden mit der murinen Zelllinie N2a durchgeführt. Die Gen-Transfer-Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

Als Messgröße des emittierten Lumineszenzlichts sind die relativen Lichteinheiten (RLU) pro 10000 Zellen angeführt. Mit PBS-Puffer inkubierte Zellen wurden zur Negativkontrolle bei den Transfektionsversuchen verwendet. Als Positivkontrolle diente die Lumineszenz von N2a-Zellen, welche mit LPEI-Polyplexen der pCMV-Luc pDNA inkubiert wurden. Vergleicht man die Ergebnisse der Versuche zum Luciferase Gen-Transfer, so ist zu erkennen, dass sowohl bei den meisten der unvernetzten, mit HDT vernetzten und mit C-TEPA-C vernetzten Polyplexen kein Lichtsignal detektiert werden konnte, welches deutlich größer ist als das Signal der Negativkontrolle. Hier kann nicht davon ausgegangen werden, dass es zu einer erfolgreichen Transfektion der N2a-Zellen mit dem für Luciferase codierenden pCMV-Luc Plasmid kam. Bei einigen Ansätzen zum Luciferase Gen-Transfer wurde hingegen ein Lichtsignal detektiert, welches bis zu zwei Größenordnungen intensiver ist als das Basissignal. Dies weist auf vereinzelt erfolgreiche Transfektion der N2a-Zellen hin. Hierbei ist zu beobachten, dass jeweils die höchsten gemessenen Lumineszenzwerte auf Ansätze zurückgehen, bei denen die Polyplexe mit C-TEPA-C vernetzt wurden. Es muss jedoch betont werden, dass bei keinem der Gen-Transfer-Versuche die Effizienz von LPEI näherungsweise erreicht werden konnte. Prinzipiell scheint der Transfer des Luciferase-Gens zwar möglich, es scheinen jedoch Faktoren vorzuliegen, die eine effiziente Transfektion verhindern. Dies könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnten die Polyplex-Partikel nur sehr schlecht von den ausgesäten Zellen aufgenommen werden, zum anderen könnte die Freisetzung der Partikel aus dem Endosom ineffizient sein, sodass die pDNA nur mit geringer

Wahrscheinlichkeit in das Zytosol übergeht. Um eine Einsicht in den vorliegenden Sachverhalt zu gewinnen, wurden die synthetisierten Polyplexe in Durchflusszytometrie-Studien mit der Zelllinie Huh7 eingesetzt. Hierbei handelt es sich um humane Leberkarzinom-Zellen. Ziel war es dabei zu überprüfen, ob die eingesetzte pDNA in die Zellen aufgenommen werden konnte. Hierzu wurden Polyplexe der Polymere P5-1 bis P5-4 mit fluoreszenzmarkierter Plasmid-DNA angesetzt. Die Polyplexproben wurden jeweils in zwei Aliquote aufgeteilt. Hiervon wurde ein Aliquot unvernetzt eingesetzt, ein Aliquot wurde vor der Transfektion mit dem Vernetzer C-TEPA-C vernetzt. Nach der Inkubation ausgesäeter Huh7-Zellen wurden die Zellproben mittels Fluoreszenz-aktiviertem Zell-Scanning (*fluorescence activated cell scanning*; FACS) in einem Durchflusszytometer untersucht. Die Ergebnisse der FACS-Messungen sind in Abbildung 5.9 dargelegt. Als Negativkontrolle wurden Huh7-Zellen verwendet, die mit PBS-Puffer behandelt wurden. Zur Kontrolle positiver Transfektion wurden Huh7-Zellen mit LPEI-Polyplexen der eingesetzten pDNA inkubiert.

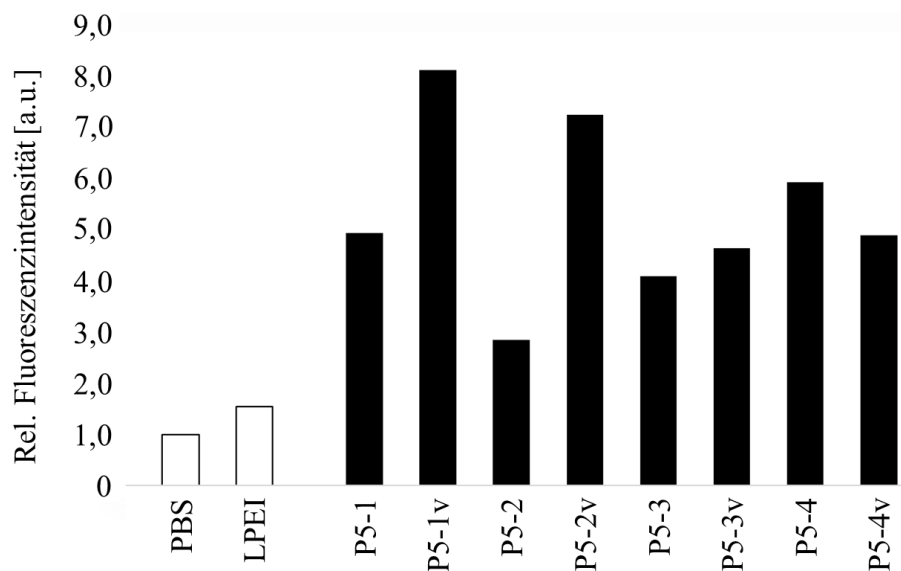


Abbildung 5.9: Untersuchung transfizierter Huh7-Zellen mittels FACS.

Die Auswertung der Messdaten der Durchflusszytometrie zeigt, dass bei allen eingesetzten Polyplexen eine hohe Aufnahme der fluoreszenten pDNA in die untersuchten Huh7-Zellen stattfand. Beim Vergleich der verschiedenen Polyplexe untereinander besteht jedoch eine erhebliche Schwankung der Aufnahmeeffizienz. Bei den Polyplexen der Polymere P5-1, P5-2 und P5-3 scheinen die vernetzten Polyplexe besser durch die untersuchten Zellen aufgenommen worden zu sein als die unvernetzten Polyplexe. Bei den Polyplexen des Polymers P5-4 scheinen die unvernetzten Polymere eine bessere Aufnahme zu zeigen. Insgesamt lässt sich aus den Ergebnissen keine eindeutige Aussage treffen, ob die Vernetzung der Polyplexe mit C-TEPA-C zu einer grundlegenden Erhöhung der Aufnahme führt. Im Allgemeinen kann jedoch geschlussfolgert werden, dass eine deutliche Aufnahme der Polyplexe in die inkubierten Huh7-Zellen stattfand. Hieraus lässt sich hinsichtlich der Ergebnisse der zuvor durchgeführten Gen-Transfer-Experimente folgern, dass nicht die Zellaufnahme der limitierende Faktor für die Transfektionseffizienz zu sein scheint. In diesem Fall könnte der limitierende Faktor der

Transport der pDNA ins Zytosol sein, wobei hier zwischen der Freisetzung der pDNA aus dem Endosom und der Freisetzung der pDNA aus dem Polyplex unterschieden werden muss. Es könnte sein, dass die ionische Wechselwirkung zwischen Polymer und pDNA zu hoch ist und daher die pDNA nicht für den Translationsprozess ihrer genetischen Informationen zur Verfügung steht. In diesem Fall führt auch eine Vernetzung zu einem zusätzlichen Stabilitätsgewinn mit sich bringen, der sich für eine erfolgreiche, funktionelle Transfektion eher kontraproduktiv auswirkt. Dieses Problem ist bereits aus anderen Arbeiten zur Transfektion mittels Polyplexen bekannt und könnte hier ebenso eine Rolle spielen.^[196] Um dem Effekt der zu hohen Polyplexstabilität entgegenzuwirken müsste versucht werden, den Anteil kationischer Gruppen am gesamten Polymer zu verringern, was jedoch die generelle Stabilität des Nanopartikels negativ beeinflusst. Eine Möglichkeit zur Freisetzung der DNA wäre, das Einbringen von pH-responsiven Gruppen, wie beispielsweise Ketal-Gruppen, welche Stimulus-responsiv eine Spaltung der kationischen Seitenketten nach der endosomalen Aufnahme hervorrufen könnten.^[197,198] Für den Fall, dass der Austritt der pDNA aus dem Endosom in das Zytosol nur in geringem Maße abläuft, könnte das Einbringen von Strukturen, die die endosomale Membran schwächen den Übertritt der DNA in das Zytosol erleichtern. Hierfür kommen beispielsweise gesättigte Kohlenwasserstoffketten im Bereich von 7-18 Kohlenstoffeinheiten, oder das pH-abhängige, lytische Influenza-Peptid INF-7 in Frage.^[153,186,187] Zudem besteht die Möglichkeit durch das Einbringen von pH-Puffernden sekundären Aminen über lineare Oligoamine, Histidin-Seitenketten oder andere Strukturen, den Proton-Sponge Effekt zu nutzen, bei dem durch die Pufferung des endosomalen pH-Werts und subsequenter Erhöhung des osmotischen Drucks innerhalb des Endosoms, eine Porosität der endosomalen Membran auftritt, die es auch größeren Molekülen erlaubt ins Zytosol überzutreten.

5.3 Zusammenfassung

Um die Eignung der synthetisierten Polyplex-Systeme als intravenös applizierbares DNA-Transportsystems initial einschätzen zu können wurde zunächst das Oberflächenpotential der Partikel bestimmt. Dabei besaßen alle untersuchten Polyplexproben ein neutrales Zeta-Potential, was auf eine vollständige Abschirmung der kationischen Funktionen des Polymers und des negativen Phosphatrückgrads der pDNA durch den hydrophilen p(MEO₃MA) Polymerblock schließen lässt. Auf Grund der kaum messbaren Oberflächenladung der Polyplexe kann vermutet werden, dass die Partikel nur in sehr geringem Ausmaß unspezifische Wechselwirkungen mit Proteinen und anderen Bestandteilen des Blutes eingehen und daher bei intravenöser Applikation eine höhere Halbwertszeit im Blut besitzen als vergleichbare Polyplexe mit höherem Zeta-Potential. Um diesen Sachverhalt weitergehend zu überprüfen, wurden Polyplexproben mit Citrat-Serum inkubiert und mittels dynamischer Lichtstreuung auf das Auftreten von Proteinaggregation getestet. Es konnte gezeigt

werden, dass die Anwesenheit der Polyplexe zu keiner Aggregatbildung im Serum führten, was einen weiteren Hinweis für die Eignung der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA)-basierten Polyplexe als systemisch appliziertes pDNA-Transportsystem liefert.

Erste, vorläufige *in vitro* Experimente zeigen das Potential der Triblock-Copolymere bei der Nutzung als Transfektionsagenzien. Anhand von Zellviabilitätsuntersuchungen konnte die zelluläre Biokompatibilität für alle untersuchten Polyplexe nachgewiesen werden. Nichtsdestotrotz muss die Effizienz des Gentransfers deutlich erhöht werden, da der Luciferase-Gentransfer kaum zu positiven Transfektionsereignissen führte. Es konnte jedoch anhand von FACS-Messungen mit einer fluoreszenzmarkierten pDNA nachgewiesen werden, dass der Polyplex in großem Maße von den untersuchten N2a-Zellen aufgenommen wurde. Als Hürde für die erfolgreiche Transfektion könnten somit lediglich eine zu hohe Stabilität des Komplexes oder eine unzureichende Freisetzung der pDNA aus dem Endosom bestehen.

In diesem Sinne muss jedoch auf die vielseitige Modifizierbarkeit des Polymersystems hingewiesen werden. So ist es möglich durch die Verknüpfung von *targeting*-Strukturen über die Azid Endgruppe und alternative Funktionalisierung des zweiten und dritten Polymerblocks eine erhöhte Zahl an kationischen Gruppen, endosomolytische Einheiten und andere Funktionalitäten in das Polymer zu integrieren. Dabei kann vorteilhaft ausgenutzt werden, dass durch die reduktive Spaltbarkeit der Disulfidgruppen des Polymers ein bioresponsiver Auslöser besteht, der eine Reaktion des Polymers im Zellinneren verursachen kann. Die bisherige Arbeit zeigt, dass das vorgestellte Triblock-Copolymer ein vielversprechender Kandidat für ein einfach modifizierbares, vielseitiges pDNA-Transportsystem sein könnte.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Synthese eines multifunktionellen und hochgradig adaptiven Polymersystems zur Darstellung nanodimensionaler Polyplexe mit Plasmid-DNA. Diese sollten hinsichtlich ihrer potenziellen Eignung als intravenös applizierte Transportsysteme in der Tumorummuntherapie untersucht werden. Basis dieses Systems sollte ein Triblock-Copolymer bilden, welches unter anderem aus modifizierbaren Monomeren aufgebaut sein sollte. Um das Synthesekonzept und die konzeptionelle Eignung dieser Polymere zu überprüfen, wurden zunächst, wie im ersten Teil dieser Dissertation beschrieben, Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMAEMA) Triblock-Copolymere synthetisiert. Diese verfügten bereits über die wesentlichen Komponenten, die das angestrebte Polymersystem enthalten sollte. Es handelt sich dabei zum einen um eine Azid-Endgruppe, die mittels ringspannungsvermittelter Alkin-Azid Cycloaddition (SPAAC) mit DBCO-modifizierten Molekülen kovalent verknüpft werden kann. Zum anderen handelt es sich um einen Polymerblock mit reaktiven Disulfid-Seitenketten, die mit Thiolen spontan in einer Disulfid-Austauschreaktion reagieren und somit eine Vernetzung des Polymers oder zusätzliche Anbindung kleiner Moleküle ermöglicht. Um durch ionische Wechselwirkungen die Komplexierung von DNA zu ermöglichen, wurde der dritte Block des Polymers modellhaft aus Wiederholungseinheiten des Monomers DMAEMA aufgebaut. Hierbei handelt es sich um ein Methacrylat mit einem tertiären Amin in der Seitenkette. Dieses liegt unter physiologischen Bedingungen vollständig protoniert vor und ermöglicht somit die Aggregation mit dem Phosphatrückgrad der Nucleinsäuren. Versuche zur Bildung von Polyplexen zeigten, dass bereits bei niedrigen Verhältnissen der polymeren Aminogruppen zur Anzahl der Phosphatgruppen der DNA (N/P-Verhältnis) nanodimensionale Polyplexe mit enger Größenverteilung synthetisiert werden konnten. Die Prinzipien der polymeranalogen Modifizierung der PDSM-Seitenketten und der Azid-Endgruppe konnten durch entsprechende Experimente erfolgreich überprüft werden. Messungen des Oberflächenpotentials der Polyplexe wiesen zudem auf eine sehr gute Abschirmung des ionischen Kerns der Polyplexe vom äußeren Medium hin. Somit konnte gezeigt werden, dass es möglich war, variable und durch mehrere, reaktive Gruppen modifizierbare Triblock-Copolymere, durch sequenzielle RAFT-Polymerisation zu synthetisieren. Diese konnten mit pDNA Polyplexe mit vielversprechenden physikochemischen Eigenschaften bilden.

Um eine noch höhere Variabilität der Polymerplattform zu erzielen, wurde im nächsten Schritt der Arbeit versucht, ein Polymersystem zu synthetisieren, dessen dritter Polymerblock aus reaktiven Einheiten besteht, welche in einer polymeranalogen Reaktion adressiert werden können, um einen für die Polyplexbildung geeigneten, kationischen Block zu bilden. Dabei konnte auf die Erfahrung aus der Polymersynthese des zuvor hergestellten Triblock-Copolymers zurückgegriffen werden. Die Basis des neuen Triblock-Copolymers bildete erneut ein Azid-CTA. Als Monomerkomponenten des ersten und zweiten Polymerblocks wurde ebenfalls auf MEO₃MA und PDSM zurückgegriffen. Als Monomer des

dritten Blocks wurde das Reaktivester-Monomer PFPMA eingesetzt, welches durch Nucleophile mit hoher Elektronendichte in einer Amidierungsreaktion umgesetzt werden kann. Somit besteht das Polymersystem aus drei verschiedenen reaktiven, funktionellen Gruppen, die selektiv durch spezifische Reaktionen modifiziert werden können. Es handelt sich dabei zum einen um eine Azid-Endgruppe, die mittels ringspannungsvermittelter Alkin-Azid Cycloaddition (SPAAC) mit DBCO-modifizierten Molekülen kovalent verknüpft werden kann. Zum anderen können die reaktiven Disulfidgruppen des p(PDSM)-Blocks mit Thiolen spontan in einer Disulfid-Austauschreaktion reagieren und somit eine Vernetzung des Polymers oder zusätzliche Anbindung kleiner Moleküle ermöglicht. Als dritte Funktion dienen die Reaktivestergruppen von PFPMA, um durch polymeranaloge Amidierung kationisierbare Seitenketten in das Polymer einzubringen.

Diese neue Polymerplattform wurde durch drei konsekutive Schritte der kontrollierten radikalischen Polymerisation nach dem RAFT-Prozess synthetisiert, wobei durch Isolation und Aufreinigung jeder Polymerstufe Block-Copolymere mit sehr hoher Kontrolle über den Polymerisationsgrad des jeweiligen Polymerblocks und mit sehr enger Verteilung des Molekulargewichts synthetisiert werden konnten. In einer anschließenden polymeranalogen Reaktion wurde die reaktive RAFT-Endgruppe des Polymers in einer radikalischen Reaktion deaktiviert, wodurch das angestrebte Triblock-Copolymer erhalten wurde.

Das synthetisierte Triblock-Copolymersystem sollte zur Bildung von Polyplexen mit pDNA eingesetzt werden. Aus diesem Grund wurden die Reaktivestergruppen des p(PFPMA)-Blocks genutzt, um durch Amidierung der Pentafluorophenylester-Gruppen mit asymmetrischen Di- beziehungsweise Tri-Aminen tertiäre und, in letzterem Fall, sekundäre und tertiäre Aminogruppen in die Polymerstruktur einzuführen. Diese Aminogruppen liegen in physiologischen Medien teilweise, oder vollständig protoniert vor. Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit der ionischen Wechselwirkung mit dem polyanionischen Phosphatrückgrad der pDNA. Es konnte gezeigt werden, dass durch Amidierung der PFPMA-Gruppen kationische Triblock-Copolymere dargestellt werden konnten, die nanodimensionale Polyplexe mit geringer Größenverteilung schon bei kleinen Verhältnissen der vorhandenen Aminogruppen zu den vorhandenen Phosphatgruppen (N/P-Verhältnis) bildeten. Dabei konnte gezeigt werden, dass es möglich war, die Stabilität der Polyplexe durch Vernetzung der Triblock-Copolymere mit Dithiolen zu erhöhen. Diese reagierten in Disulfid-Austauschreaktionen mit den reaktiven Disulfiden der PDSM-Seitengruppen. Ebenso war es möglich, die Azid-Endgruppen der Polymere auch im Polyplex durch Moleküle mit DBCO-Funktion über SPAAC-Reaktionen zu modifizieren. Es konnte dargelegt werden, dass diese verschiedenen Modifikationsreaktionen sequenziell, ohne Beeinträchtigung der anderen funktionellen Gruppen durchgeführt werden konnten und somit nahezu endlose Variationsmöglichkeiten des Basis-Polymers bestehen.

In ersten *in vitro* Untersuchungen von Polyplexen auf Basis der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(DMEDAMA) Triblock Copolymere konnte dargelegt werden, dass sowohl die unvernetzten Polyplexe als auch Polyplexe, die durch HDT oder C-TEPA-C vernetzt wurden, keine

signifikante Zelltoxizität aufweisen und daher als kompatibel für alle zellbiologischen Anwendungsgebiete betrachtet werden können. Die Durchführung von Luciferase-Gentransfer Untersuchungen zeigte jedoch, dass bei allen untersuchten Polyplexen die Transfektionseffizienz noch deutlich verbessert werden muss. Um einschätzen zu können, ob eine effektive Zellaufnahme der Polyplexe bestand, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Diese ergab, dass die Aufnahme der Polyplexe in die Zelle im großen Maße erfolgreich war und somit vermutlich andere Gründe die geringe Transfektionseffizienz verursachen.

Auf Grund des modularen Charakters des synthetisierten Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-*b*-p(PDSM)-*b*-p(PFPMA) Triblock-Copolymersystems und der hohen Kontrolle über die Polymerzusammensetzung bei der RAFT-Synthese, stellt diese Verbindung ein vielversprechende Basispolymer für zukünftige Block-Copolymere mit Anwendung im Bereich der Nanomedizin da. Prinzipiell ist durch entsprechende Modifikation des Basispolymers eine Anwendung in der Darstellung von Polymermizellen oder auch Polymersomen denkbar. Dies würde die Bandbreite der zum Transport geeigneten Strukturen auf Basis dieses Polymers deutlich erhöhen. Durch die hohe Modifizierbarkeit und die Orthogonalität der vorhandenen funktionellen Gruppen sind sowohl Anwendungen im therapeutischen als auch im diagnostischen Bereich denkbar. Für die Synthese von kationischen Triblock-Copolymeren für die Selbstassemblierung von Polyplexen mit DNA oder RNA wäre es zukünftig interessant, durch Amidierung der PFPMA-Gruppen mit verschiedenen anderen asymmetrischen Aminen eine Polymerbibliothek aufzubauen, die hinsichtlich ihrer Eigenschaften bei der Synthese der Polyplexe als auch bei der Transfektion von verschiedenen Testzellen getestet werden könnte. Die bisherigen Ergebnisse mit dem beschriebenen Polymersystem zeigen, dass es sich bei dem Triblock-Copolymer um eine interessante Plattform handelt, die im Feld der Entwicklung von Transport- und Transfektionsagenzien für Nucleinsäure-basierte Therapeutika für die Tumor- oder Tumorummuntherapie ein hohes Potential zeigt.

7 Experimententeil

7.1 Materialien

Alle verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel wurden, sofern nicht anders beschrieben, aus kommerziellen Quellen (Merck, Fisher Scientific, TCI, Acros Organics) bezogen und, sofern nicht anders vermerkt, ohne zusätzliche Aufreinigung verwendet. Vor dem Gebrauch wurden technische Lösungsmittel (Cyclohexan und Essigsäureethylester) destilliert. Alle andere Lösungsmittel wurden im Reinheitsgrad p.a. (*pro analysi*, zur Analyse) erworben.

Dichlormethan wurde zur Trocknung für mehrere Stunden über Calciumhydrid (CaH_2) und unter Stickstoffatmosphäre unter Rückfluss erhitzt und unter Stickstoffatmosphäre bis zum Gebrauch gelagert. Bei Bedarf wurde Dichlormethan erneut für mehrere Stunden unter Rückfluss über CaH_2 und unter Stickstoffatmosphäre erhitzt und frisch destilliert.

Tetrahydrofuran (THF) und 1,4-Dioxan wurden jeweils zur Trocknung mehrere Stunden über Natrium und unter Stickstoffatmosphäre unter Rückfluss erhitzt. Die Lagerung bis zum Gebrauch erfolgte ebenfalls über Natrium und unter Stickstoffatmosphäre. Bei Bedarf wurde das jeweilige Lösungsmittel über Natrium und unter Stickstoffatmosphäre unter Rückfluss erhitzt und frisch destilliert.

Triethylamin wurde zur Trocknung für mehrere Stunden über Natriumhydroxid (NaOH) und unter Stickstoff-Atmosphäre unter Rückfluss erhitzt. Im Anschluss daran wurde der Überstand dekantiert und auf gleiche Weise über frischem NaOH für eine weitere Stunde unter Rückfluss erhitzt. Im Anschluss daran wurde das Triethylamin fraktioniert destilliert und über frisch getrocknetem Molsieb (3 \AA) und unter Argon-Atmosphäre in einem Braunglasgefäß gelagert.

Tris-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure (TBE) Puffer wurde durch Lösen von 10,8 g 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Trizma[®]; Sigma Aldrich / Merck), 5,5 g Borsäure (Sigma Aldrich / Merck) und 0,7 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; Sigma Aldrich / Merck) in einem Liter Milli-Q Wasser hergestellt.

7.2 Instrumentelle Analytik

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

^1H -, ^{19}F -, ^{13}C -, DOSY-, HSQC- und HMBC-NMR Spektren wurden bei Raumtemperatur mit einem Bruker Avance II 400 NMR Spektrometer bei einer Messfrequenz von 400 MHz aufgenommen. Als interne Standards und Lösungsmittel wurden deuterierte Lösungsmittel der Firma Deutero GmbH eingesetzt. Zur Datenauswertung wurde das Programm MestReNova 14.1.0 verwendet. Die Angabe der Chemischen Verschiebung (δ) erfolgte in der Einheit *parts per million* (ppm), in Relation zu Tetramethylsilan.

UV/Vis-Spektroskopie

Zur Untersuchung von Probelösungen mittels UV/Vis-Spektroskopie wurde ein JASCO V-630 Spektrometer verwendet. Probenmessungen erfolgten in 10 mm Quarz-Mikroküvetten. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Spectra Manager 2.04.

FT-IR-Spektroskopie

Spektroskopische Messungen im Infrarotbereich wurden mit Hilfe eines JASCO FT/IR-4100, ausgestattet mit einem MIRacleTM ATR-Probenstisch der Firma Pike Technologies, durchgeführt. Zur Datenanalyse wurde das Programm JASCO Spectra Manager IITM verwendet.

Gelpermeationschromatographie (GPC)

Für die Untersuchung polymerer Proben mittels GPC wurde eine modulare Apparatur der Firma JASCO eingesetzt. Diese bestand aus einem AS1555 Autosampler, einer PU1580 HPLC-Pumpe, einem UV1575 UV-Detektor und einem RI1530 Brechungsindex-Detektor. Die Verwendete Trennsäulen MZ-Gel SDplus 102 Å, MZ-Gel SDplus 104 Å und MZ-Gel SDplus 106 Å wurden von der Firma MZ-Analysetechnik erworben. Die Kalibration der Anlage wurde mittels Polymethylmethacrylat-Standards (PMMA-Standards) der Firma PSS durchgeführt. Zur Steuerung der GPC-Apparatur und zur Datenaufnahme wurde das Programm WinGPC UniChrome 8.00 der Firma PSS verwendet.

Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung der 0,8 %-igen Agarose-Gele wurden 1,2 g Agarose in der Siedehitze von 160 mL 1x TBE Puffer gelöst. Zur Färbung der Nucleinsäure-Banden wurden 16 µL (0,01 Vol.-%) 10000x GelRed® Interkalationsfarbstoff der Agarose-Lösung beigelegt. Nach dem Erstarren des Agarosegels wurde das Gel für 45 Minuten in TBE Puffer suspendiert.

Zur Herstellung der Polyplexe wurden die Proben jeweils mit einem Endvolumen von 17,5 µL in 1,5 mL Eppendorf-Gefäßen angesetzt. Dazu wurde die jeweils für den Ansatz berechneten Mengen der Polymer- und PBS-Pufferlösung in dem Gefäß vorgelegt. Bei jeder Probe wurden 100 ng pDNA als Tropfen an die Gefäßwand pipettiert. Durch Zentrifugation für 20 Sekunden bei 3500 rpm, anschließender turbulenter Vermischung und erneuter Zentrifugation für 20 Sekunden bei 3500 rpm wurden die Proben homogenisiert. Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten bei 25 °C erfolgte die etwaige Zugabe eines Vernetzers, indem die entsprechende Menge der Vernetzer-Stammlösung an die Wand des Gefäßes pipettiert wurde. Die Vermischung von Polyplexlösung und Vernetzer erfolgte wie zuvor beschrieben. Nach weiteren 45 Minuten der Inkubation bei 25 °C erfolgte die Zugabe von jeweils 1,5 µL eines Auftragspuffers. Die Polyplexproben wurden im Anschluss in die Geltaschen des vorbereiteten Agarosegels pipettiert.

Die Elektrophorese wurde bei 120 V und 300 mA für die Dauer von 30 Minuten durchgeführt. Um die Nucleinsäure-Banden sichtbar zu machen, wurde das Gel bei einer Wellenlänge von 312 nm durch einen UST-20M-8E Bio View Transilluminator der Firma Biostep beleuchtet.

Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Messung des Zeta-Potential

Zur Messung der Größe und des Oberflächenpotentials von Nanopartikeln wurde ein Zetasizer Nano ZS der Firma Malvern Instruments Ltd. verwendet. Als Lichtquelle wurde dabei ein He/Ne-Laser eingesetzt, der einen Lichtstrahl mit einer Wellenlänge von 633 nm erzeugt. Die Experimente wurden bei 25 °C und einem Winkel von 173 ° durchgeführt. Im Falle der Größenbestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung erfolgte die Messung in Einmalküvetten aus Polystyrol. Bei der Messung des Oberflächenpotentials der Partikel wurden DTS1070 Zeta-Küvetten der Firma Malvern Instruments Ltd. verwendet.

Zur Probenvorbereitung wurden die Polyplexe in einer 10 mM NaCl-Lösung, oder in 1x PBS-Puffer angesetzt. Dazu wurden entsprechende Mengen der Salzlösung oder des Puffers mit der jeweils berechneten Polymermenge in einem 1,5 mL Eppendorf-Gefäß vorgelegt. Im Anschluss daran wurden 3 µg pDNA an die Wand des Gefäßes pipettiert. Mittels Zentrifugation für 20 Sekunden bei 3500 rpm, anschließender turbulenter Vermischung und erneuter Zentrifugation für 20 Sekunden bei 3500 rpm wurden die Polyplexproben homogenisiert. Nach 45 Minuten Inkubation bei 25 °C wurden die Polyplexproben gegebenenfalls vernetzt. Hierzu wurde die entsprechend berechnete Menge der

Vernetzer-Stammlösung an die Gefäßwand des Eppendorf-Gefäßes pipettiert. Die Vermischung der Polyplex-Lösung und des Vernetzers erfolgten wie zuvor beschrieben. Nach weiteren 45 Minuten der Inkubation bei 25 °C wurden die Proben zur Größenbestimmung und zur Bestimmung des Zeta-Potentials verwendet. Das Endvolumen jeder Polyplexprobe betrug dabei 900 µL.

Dynamische Mehrwinkel-Lichtstreuung in Serum

In Vorbereitung der Messung wurden die zu untersuchenden Polyplexproben, wie bereits zuvor bei der Probenvorbereitung der Dynamischen Lichtstreuung beschrieben, angesetzt. Um die Probenkonzentration zu erhöhen, wurden die Polyplexproben mittels Zentrifugation gegen einen Amicon® Ultra 2 mL Zentrifugen-Filter mit einer Molekularen Ausschlussgröße von 50000 kDa bei 3500 rpm zentrifugiert. Dabei wurde die Probenkonzentration jeweils auf etwa 1 mg/mL erhöht. Die Messungen der dynamischen Mehrwinkellichtstreuung in Serum wurden durch Frau Christine Rosenauer vom Max-Planck-Institut für Polymerchemie in Mainz durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 20 µL der Probe mit 200 µL Citrat-Plasma, welches mit einem Spritzenfilter der Firma Pall Life Science mit einer Porengröße von 0,2 µm gefiltert wurde, vermischt und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der Versuchsaufbau der Messung umfasste einen Uniphase He/Ne Laser (632,8 nm Wellenlänge, 22 mW Leistung) ein ALV-SP125 Goniometer, eine ALV/High QE APD-Avalanche Photodiode, einen ALV500/E/PCI-Korrelator und einer Lauda RC-6 Thermostateinheit. Die Messungen wurden bei Winkeln von 30°, 60°, 90°, 120° und 135° durchgeführt. Die Auswertung der Daten wurde nach der von Rausch et al. beschriebenen Methode durchgeführt.^[109,199]

7.3 Teil 1: RAFT Synthese reaktiver Triblock-Copolymere zur Bildung von Polyplexen

7.3.1 Synthese von 1-Azido-25-cyano-22-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-21-azahexadodecan-25-yl Benzothioat (Azid-(PEG)₆-CTA)

1-Azido-25-cyano-22-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-21-azahexadodecan-25-yl Benzothioat (Azid-(PEG)₆-CTA)

1-Azido-25-cyano-22-oxo-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-21-azahexadodecan-25-yl Benzothioat (Azid-(PEG)₆-CTA) wurde, in Anlehnung an eine durch Nuhn et al. veröffentlichte Vorschrift zur Synthese eines ähnlichen *chain transfer agents*, hergestellt.^[159] Dazu wurden in einem 100 ml Rundkolben 500,0 mg (1,123 mmol) 4-Cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentansäure Pentafluorophenylester

(PFP-CTA) und 131,1 mg (1,296 mmol) Triethylamin in 20 mL trockenem THF unter Argon-Atmosphäre vorgelegt. Der Kolbeninhalt wurde unter lebhaftem Rühren mittels eines Eis-/Wasserbads gekühlt. Über den Verlauf von 25 Minuten wurde mittels eines Tropftrichters eine Lösung von 302,6 mg (0,864 mmol) NH₂-PEG₆-Azid und 20 mL trockenem THF zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung für weitere 30 Minuten unter Eiskühlung gerührt. Anschließend wurde das Eis-Wasser-Bad entfernt und für 16 h bei Raumtemperatur weiter gerührt. Im Anschluss daran wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Mittels Säulenchromatographie (Lösungsmittelgradient von 20:1 zu 10:1 Ethylacetat und Methanol) wurde das Rohprodukt aufgereinigt. Nach dem Einengen und Trocknen des Produkts im Hochvakuum, wurden 312,5 mg (0,511 mmol) Azid-PEG₆-CTA als hellrote, viskose Flüssigkeit erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7,90 (d, 2 H, a); 7,56 (t, 1 H, b); 7,40 (t, 2 H, c); 6,58 (t, 1 H, d); 3,65 (m, 22 H, e, f, g); 3,57 (t, 2 H, h); 3,47 (q, 2 H, i); 3,38 (t, 2 H, j); 2,56 (m, 4 H, k, l); 1,95 (s, 3 H, m).

7.3.2 Synthese von Methacrylsäure-2-(2-pyridyldisulfid)ethylester (PDSM)

Die Synthese von PDSM erfolgte in zwei Reaktionsstufen, ähnlich zu der durch Wong et al. publizierten Synthese.^[166]

Hydroxyethyl-(2-pyridyldisulfid) (HPDS)

Hydroxyethyl-(2-pyridyldisulfid) (HPDS) wurde ausgehend von Aldrithiol-2 synthetisiert. Dazu wurden 10,06 g (45,66 mmol) Aldrithiol-2 in einem 250 mL Rundkolben in 54 mL Methanol und unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst. Nach der Zugabe von 0,80 mL Essigsäure und dem Kühlen der Lösung in einem Eis-/Wasserbad, wurde eine Lösung von 2,35 g (30,08 mmol) 2-Mercaptoethanol in 26 mL Methanol über einen Tropftrichter im Verlauf von 30 Minuten zugegeben. Im Anschluss daran wurde die Reaktionslösung für 18 h weiter bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Einengen der Reaktionslösung im Rotationsverdampfer wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Dazu wurde ein Laufmittelgemisch von Essigsäureethylester und Cyclohexan im Verhältnis 1:2 verwendet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels konnten 2,69 g (14,36 mmol) HDPS als viskose, blassgelbe Flüssigkeit erhalten werden.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8,52 (d, J = 5 Hz, 1 H); 7,62-7,58 (m, 1 H); 7,41 (d, J = 8 Hz, 1 H); 7,18-7,15 (m, 1 H); 3,81 (t, J = 5 Hz, 2 H); 2,96 (t, J = 5 Hz, 2 H).

Methacrylsäure-2-(2-pyridyldisulfid)ethylester (PDSM)

Methacrylsäure-2-(2-pyridyldisulfid)ethylester (PDSM) wurde, ausgehend von dem zuvor synthetisierten HPDS, hergestellt. Hierfür wurden zunächst 50 mL trockenes Dichlormethan, durch Einleiten von Stickstoff für die Dauer von 1 h, entgast. Danach wurden 2,69 g (14,36 mmol) HPDS und 1,78 g (17,59 mmol) Triethylamin in 15 mL des entgasten Dichlormethans unter Argon-Atmosphäre in einem 100 mL Rundkolben vorgelegt. Unter Kühlung in einem Eis/Wasserbad wurden 1,80 g (17,22 mmol) Methacryloylchlorid in 15 mL des entgasten Dichlormethans, über einen Tropftrichter im Verlauf von 30 Minuten, zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde eine Spatelspitze 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) der Reaktionslösung hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde für eine weitere Stunde unter Kühlung im Eis-/Wasserbad, anschließend für 17 h bei Raumtemperatur, weiter gerührt. Die Reaktionslösung wurde gefiltert, das Filtrat wurde 3-mal mit jeweils 15 mL Wasser gewaschen. Die gesammelten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und mittels Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Dazu wurde ein Lösungsmittelgemisch von Cyclohexan und Essigsäureethylester im Verhältnis von 10:1 verwendet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurden 2,55 g (9,99 mmol) PDSM als viskose, blassgelbe Flüssigkeit erhalten.

FT-IR: ν [cm^{-1}] = 3045 w; 2955 w; 1714 s; 1573 m; 1446 m; 1426 s; 1318 m; 1294 m; 1151 ss; 1116 m; 941 m; 759 s.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8,47 (m, 1 H); 7,70-7,68 (m, 1 H); 7,65-7,60 (m, 1 H); 7,11-7,09 (m, 1 H); 6,11 (m, 1 H); 5,57 (m, 1 H); 4,39 (t, $J = 6$ Hz, 2 H); 3,08 (t, $J = 6$ Hz, 2 H); 1,93 (m, 3 H).

7.3.3 Synthese der Azid-PEG₆-Triblock-Copolymere

Allgemeines zur Polymersynthese

Insbesondere bei der Synthese des dritten Polymerblocks und der damit verbundenen Anwesenheit von Aminen in der Reaktionslösung, musste darauf geachtet werden die RAFT-Reaktionen in wasserfreiem Medium durchzuführen, um unerwünschte Nebenreaktionen am Polymer zu vermeiden. Aus diesem Grund wurde 1,4-Dioxan, welches bei allen Polymerisationen als Lösungsmittel eingesetzt wurde, vor dem Gebrauch getrocknet. Hierfür wurde 1,4-Dioxan unter Stickstoffgegenstrom für die Mindestdauer von 5 h über Natrium unter Rückfluss erhitzt. Für die Reaktionen benötigte Mengen des Lösungsmittels wurden frisch vom Vorrat destilliert. Bis zum erneuten Gebrauch wurde die Vorratslösung unter über Natrium und unter Stickstoff-Atmosphäre gelagert.

Um Nebenreaktionen mit im Lösungsmittel gelösten Gasen, wie Sauerstoff, zu vermeiden, wurde die jeweils angesetzte Reaktionslösung vor der Initiation der RAFT-Polymerisation entgast. Dabei wurde das sogenannte *freeze-pump-thaw* Verfahren angewendet. Zunächst wurde dabei das Reaktionsgefäß unter Argon-Atmosphäre gesetzt und die Reaktionslösung durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff verfestigt. Anschließend wurde der Gasraum durch ein angelegtes Hochvakuum vollständig evakuiert und das Gefäß wieder gegenüber dem Vakuum verschlossen. Das Reaktionsgefäß wurde so lange bei Raumtemperatur gelagert, bis sich der Inhalt vollständig verflüssigte. Im Anschluss daran wurde das Gefäß erneut, bis zum vollständigen Erstarren der Reaktionslösung, in flüssigen Stickstoff getaucht. Danach wurde der Gasraum erneut evakuiert, um den ersten Zyklus der Vakuumentgasung abzuschließen. Drei weitere Zyklen der Vakuumentgasung wurden durchgeführt, wobei der mit flüssigem Stickstoff gekühlte Kolbeninhalt erst 5, dann 10 und schließlich 15 Minuten dem Hochvakuum ausgesetzt wurde. Nachdem sich anschließend die Reaktionslösung wieder vollständig verflüssigt hatte, wurde die RAFT-Polymerisation thermisch initiiert.

Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)

1000 mg (4,305 mmol) MEO₃MA wurden in 1,5 mL 1,4-Dioxan in einem 25 mL Schlenkrohr unter Argon-Atmosphäre vorgelegt. Anschließend wurde 57,20 mg (0,093 mmol) des Azid-PEG₆-CTAs in 0,5 mL 1,4-Dioxan und 5,76 mg (0,019 mmol) des Initiators AMDVN hinzugefügt. Hierauf folgte die Entgasung der Reaktionslösung nach dem zuvor genannten *freeze-pump-thaw* Verfahren. Die Polymerisationsreaktion wurde bei 40 °C Ölbadtemperatur durchgeführt. Nach 20 h wurde der Monomerumsatz mittels ¹H-NMR Spektroskopie ermittelt. Die RAFT-Reaktion wurde durch Eintauchen des Schlenkrohres in flüssigen Stickstoff, bis zum vollständigen Erstarren der Reaktionslösung, unterbrochen. Das p(MEO₃MA) Homopolymer wurde durch konsekutive, dreimalige Präzipitation gegen n-Hexan erhalten. Das Produkt wurde im Anschluss daran für mehrere Tage im Hochvakuum getrocknet. Auf diese Weise wurden 698,6 mg (0,092 mmol) des Polymers als rotes, viskoses Öl erhalten. Bis zur Verwendung des Polymers als makro-CTA in darauffolgenden RAFT-Polymerisationen, wurde es bei -20 °C und unter Argon-Atmosphäre gelagert.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7,87-7,85 (m, 2 H); 7,51 (m, 1 H); 7,35 (m, 2 H); 4,08 (m, X_n(x)·2 H); 3,38 (m, X_n(x)·3 H).

Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)

Die Synthese des Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM) Diblock-Copolymers erfolgte durch das Lösen von 675,9 mg (0,089 mmol) Azid-PEG₆-p(MEO₃MA) in 1,0 mL 1,4-Dioxan. Nach dem Vorlegen dieser Lösung in einem 25 mL Schlenkrohr unter Argon-Atmosphäre, wurden 204,6 mg (0,801 mmol) PDSM in 1,0 mL 1,4-Dioxan und 5,49 mg (0,018 mmol) AMDVN in 0,5 mL 1,4-Dioxan beigefügt. Im

Anschluss daran wurde die Reaktionslösung mittels des *freeze-pump-thaw* Verfahrens von gelösten Gasen befreit. Bei einer Ölbadtemperatur von 40 °C wurde die RAFT-Polymerisation durchgeführt. Nach der Dauer von 17,5 h wurde eine Probe zur Kontrolle des Umsatzes entnommen. Dieser wurde anhand einer ¹H-NMR Messung berechnet. Zum Abbruch der Reaktion wurde das Schlenkgefäß so lange in flüssigen Stickstoff getaucht, bis der Inhalt vollständig erstarrt war. Anschließend wurde das Diblock-Copolymer durch dreimalige Präzipitation gegen n-Hexan isoliert. Durch mehrtägige Trocknung des Produkts im Hochvakuum wurden 782,1 mg (0,086 mmol) Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM) als rotes, hochviskoses Öl erhalten. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Produkt bei -20 °C und unter Argon-Atmosphäre gelagert.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8,67-8,50 (m, X_n(y)·1 H); 7,87-7,84 (m, X_n(y)·2 H); 7,71 (m, 2 H); 7,50 (m, 1 H); 7,35 (m; X_n(y)·1 H +2H); 4,42-4,18 (m, X_n(y)·2 H); 4,17-3,93 (X_n(x)·2 H); 3,41-3,31 (m, X_n(x)·3 H); 3,22-3,02 (m, X_n(y)·2 H).

Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMAEMA)

243,9 mg (0,027 mmol) Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM) und 2,0 mL 1,4-Dioxan wurden in einem 25 mL Schlenkrohr unter Argon-Atmosphäre vorgelegt. 234,8 mg (1,4938 mmol) DMAEMA und 1,67 mg (0,005 mmol) AMDVN wurden jeweils in 0,5 mL 1,4-Dioxan gelöst und dem Reaktionsgefäß hinzugefügt. Im Anschluss daran wurde die Reaktionslösung mittels des *freeze-pump-thaw* Verfahrens entgast. Die RAFT-Polymerisation wurde daraufhin bei einer Reaktionstemperatur von 40 °C durchgeführt. Nach 22 h wurde eine Probe, zur Bestimmung des Monomerumsatzes anhand einer ¹H-NMR Messung, entnommen. Anschließend wurde die Reaktion durch Eintauchen des Schlenkrohres, bis zum Erstarren der Reaktionslösung, beendet. Durch dreimalige Präzipitation gegen eine Mischung aus einem Teil Diethylether und zwei Teilen n-Hexan wurde das Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMAEMA) Triblock-Copolymer isoliert. Nach mehrtägiger Trocknung im Hochvakuum wurden 377,6 mg (0,026 mmol) des Polymers als hellroter, wachsartiger Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8,51-8,39 (m, X_n(y)·1 H); 7,83 (m, 2 H); 7,74-7,57 (m, X_n(y)·2 H); 7,52 (m, 1 H); 7,35 (2 H); 7,18-7,03 (m, X_n(y)·1 H); 4,54-4,13 (m, X_n(y)·2 H + X_n(z)·2 H); 4,12-3,95 (X_n(x)·2 H); 3,41-3,30 (m, X_n(x)·3 H); 3,22-2,97 (X_n(y)·2 H); 2,96-1,60 (m, X_n(z)·8 H).

Deaktivierung der reaktiven CTA-Endgruppe von Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMAEMA)

Zur Deaktivierung der reaktiven CTA-Endgruppe des Triblock-Copolymers wurden zunächst 5,0 mL 1,4-Dioxan durch die *freeze-pump-thaw* Methode entgast. Daraufhin wurde 358,1 mg (0,025 mmol) Azid-PEG₆-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMAEMA) in 2,0 mL des entgasten 1,4-Dioxans gelöst und in einem 25 mL Schlenkrohr unter Argon-Atmosphäre vorgelegt. Im Anschluss daran wurde 113,3 mg (0,3675 mmol) AMDVN in 1,0 mL des entgasten 1,4-Dioxans hinzugefügt. Die Reaktion wurde bei 40 °C Ölbadtemperatur durchgeführt. Währenddessen wurde über eine Glaskapillare für die Dauer von einer Stunde ein kontinuierlicher Argon-Strom durch die Lösung geleitet. Im Verlauf von 15 h entfärbte sich die hellrote Reaktionslösung vollständig. Durch drei konsekutive Präzipitationsschritte gegen eine Mischung aus zwei Teilen n-Hexan und einem Teil Diethylether wurde das Polymer erhalten. Nach mehrtägiger Trocknung des Produkts im Hochvakuum wurden 298,6 mg (0,020 mmol) des Triblock-Copolymers erhalten. Zur Kontrolle der vollständigen Deaktivierung der CTA-Endgruppe wurde ein UV-Vis Spektrum des Polymers gemessen.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8,52-8,39 (m, X_n(y)·1 H); 7,75-7,59 (m, X_n(y)·2 H); 7,18-7,04 (X_n(y)·1 H); 4,53-4,14 (m, X_n(y)·2 H + X_n(z)·2 H); 4,13-3,92 (X_n(x)·2 H); 3,41-3,31 (m, X_n(x)·3 H); 3,22-2,94 (m, X_n(y)·2 H); 2,92-1,58 (m, X_n(z)·8 H).

7.3.4 Modifikation der Triblock-Copolymere

Test zur Modifikation der reaktiven Disulfide

Um die Modifizierbarkeit der reaktiven PDSM-Seitenketten zu testen wurden 1,5 mL frisch getrocknetes 1,4-Dioxan mit Hilfe des *freeze-pump-thaw* Prozesses entgast. 2 mg des Triblock-Copolymers wurden in 200 μ L des getrockneten und entgasten 1,4-Dioxan gelöst. Die Polymerlösung wurde in 2 Aliquote von jeweils 100 μ L aufgeteilt. Nach der Zugabe von 20 μ L einer Stammlösung von 50 ng/mL 1,6-Hexandithiol in vollentsalztem, Protease und DNase freiem Wasser in eines der Aliquote, wurden die Polymerlösungen für 10 Minuten bei 25 °C inkubiert. Beide Polymerlösungen wurden jeweils in 900 μ L n-Hexan pipettiert, wobei das Polymer jeweils als farbloser Feststoff präzipitierte. Nach 15 Minuten Zentrifugation bei 4500 rpm wurden jeweils 800 μ L des Überstands mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht.

SPAAC-Modifikation der Triblock-Copolymere

Um die Adressierbarkeit der Endständigen Azid-Gruppen der Triblock-Copolymere zu testen, wurden sowohl Proben des Polymers als auch der Polyplexe in einer SPAAC-Reaktion mit dem Farbstoff IRDye 800CW DBCO (Li-Cor) umgesetzt. Zur Modifikation des Triblock-Copolymers

wurden 50 mg des Polymers P4-4 in 1 mL vollentsalztem, Protease- und DNase-freiem Wasser gelöst. 3,10 µL einer 1 mg/mL Stammlösung des reaktiven Farbstoffs in trockenem DMSO wurden zugegeben und die Polymerlösung für 17 h bei 25 °C bei kontinuierlicher Durchmischung mittels eines Orbitalrührers inkubiert. Die zugegebene Farbstoffmenge entsprach dabei 10% der Anzahl der theoretisch vorhandenen Azid-Gruppen. Im Anschluss an die Inkubation erfolgte eine mehrtägige Dialyse des Polymers gegen vollentsalztes, Protease- und DNase-freies Wasser (Ausschlussgröße des Molekulargewichts: 10000 g/mol). Das modifizierte Polymer wurde mittels Lyophilisation isoliert. Das gesammelte Dialysat wurde im Rotationsverdampfer eingengt. Eine 1 mg/mL Stammlösung des modifizierten Polymers und 1 mL des aufkonzentrierten Dialysats wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht.

7.3.5 Polyplexsynthese und Modifikation der Polyplexe

Polyplexsynthese

Als wichtige Orientierungsgröße für die Synthese von Polyplexen dient das N/P-Verhältnis, das Verhältnis zwischen den kationischen Aminogruppen der Polymere und den anionischen Phosphatgruppen des Rückgrats der Nucleinsäuren. Die Anzahl an Phosphatgruppen N_P der eingesetzten pDNA lässt sich anhand der verwendeten DNA-Menge m_{DNA} berechnen. Hierfür kann für die das Molekulargewicht einer Nucleotid-Base M_{DNA} der Mittelwert über das Molekulargewicht der vier codierenden Basen angenommen werden. Mit der Avogadro-Konstante N_A ergibt sich:

$$N_P = \frac{m_{DNA}}{M_{DNA}} \cdot N_A$$

Die für das jeweils angesetzte N/P-Verhältnis x benötigte Anzahl an Aminogruppen N_N ergibt sich zu:

$$N/P = x \Rightarrow \frac{N_N}{N_P} = x \Rightarrow N_N = x \cdot N_P$$

Hieraus kann die benötigte Polymermenge m_{Poly} wie folgt berechnet werden:

$$N_N = x \cdot N_P = \frac{m_{Poly}}{M_{Poly}} \cdot N_A \cdot N_{Amino} \Rightarrow m_{Poly} = \frac{x \cdot N_P \cdot M_{Poly}}{N_A \cdot N_{Amino}}$$

Dabei bezeichnet M_{Poly} das mittlere Molekulargewicht des Polymers und N_{Amino} die Anzahl kationischer Einheiten pro Polymerkette. Zur Selbstassemblierung von Polyplexen wurden dem N/P-Verhältnis entsprechende Mengen von Polymer-Stammlösung oder pDNA-Stammlösung an die Wände eines Eppendorf-Gefäßes pipettiert und durch Zentrifugation bei 3500 rpm vereint. Nach dem lebhaften Mischen der Reaktionslösung, erneuter kurzer Zentrifugation und Inkubation bei Raumtemperatur für 45-60 min konnten die Polyplexe für Folgeexperimente angewandt werden.

Vernetzung der Polyplexe

Zur Vernetzung der Polyplexe musste zunächst die für den erwünschten Vernetzungsgrad benötigte Menge des Vernetzers m_{link} ermittelt werden. Diese ergibt sich aus molaren Anzahl an Polymermolekülen n_{poly} , die bei dem entsprechenden N/P-Verhältnis vorliegt und der Anzahl vernetzbarer Gruppen pro Polymerkette N_{link} . Wenn bifunktionelle Vernetzer verwendet werden, fällt nur die Hälfte der theoretisch vorhandenen vernetzbaren Gruppen ins Gewicht und es muss der Gewichtungsfaktor $\frac{1}{2}$ mit einbezogen werden:

$$m_{link} = n_{poly} \cdot \frac{1}{2} N_{link} \cdot M_{link} = \frac{m_{poly}}{M_{poly}} \cdot \frac{1}{2} N_{link} \cdot M_{link}$$

M_{link} ist dabei das Molekulargewicht des Vernetzers. Je nach erwünschtem Vernetzungsgrad kann die eingesetzte Menge des Vernetzers reduziert werden. Die Synthese der vernetzten Polyplexe erfolgte durch Pipettieren der berechneten Menge an Vernetzer an den Rand eines Eppendorf-Gefäßes, in dem die jeweilige Lösung unvernetzter Polyplexe vorgelegt wurde. Durch Zentrifugation bei 3500 rpm, lebhafter Mischung und Inkubation für mindestens 45 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Intramolekulare Vernetzung der Polyplexe vollzogen.

SPAAC-Modifikation der Polyplexe

Zur Überprüfung der Modifizierbarkeit der Polyplexe mit dem reaktiven Infrarotfarbstoff wurden Polyplexe des Polymers P4-1 auf die bei der Messung von DLS und Zeta-Potential beschriebene Weise synthetisiert. Dabei wurden 6 μg pDNA eingesetzt, das N/P-Verhältnis der Polyplexe sollte dem Wert 6:1 entsprechen. Insgesamt wurden 900 μL Polyplex-Lösung erhalten. Es erfolgte die Zugabe von 3,29 μL einer 0,1 mg/mL Stammlösung von IRDye 800CW DBCO in trockenem DBCO. Die eingesetzte Farbstoffmenge entsprach dabei 10 % der Anzahl theoretisch vorhandener Azid-Gruppen. Für die Dauer von 16 h wurde die Reaktionslösung bei einer Temperatur von 25 °C und kontinuierlicher Bewegung mittels eines Orbitalrührers inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Aufreinigung der markierten Polyplexe mittels Spin-Filtration. Dazu wurde die Reaktionslösung in einen Zentrifugen-Filter mit einer molekularen Ausschlussgröße von 10000 g/mol und einem Filtervolumen von 2 mL (Amicon® Ultra-2 Zentrifugen-Filtereinheit, Ultracel-10 *regenerated cellulose membrane*; AMICON) pipettiert und bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Filtrerrückstand wurde dabei immer wieder mit vollentsalztem, Protease- und DNase-freiem Wasser überschichtet und mittels Zentrifugation erneut aufkonzentriert. Nachdem die Reaktionslösung mit insgesamt 15 mL Wasser gewaschen wurde, wurde der Filtrerrückstand abgenommen. Der Filtrerrückstand wurde auf ein Gesamtvolumen von 900 μL mit vollentsalztem, Protease- und DNase-freiem Wasser aufgefüllt, die Waschlösung wurde im Rotationsverdampfer fast bis zur Trockenheit eingengt. Die Polyplex-Lösung und die konzentrierte Waschlösung wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht.

7.4 Teil 2: RAFT Synthese eines multifunktionellen Triblock-Copolymers als adaptive Polymer-Plattform

7.4.1 Synthese von 1-Azido-16-cyano-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecan-16-yl Benzothioat (Azid-PEG₃-CTA)

Die Synthese des Azid-PEG₃-CTAs wurde in einer zweistufigen Synthese, in Anlehnung an die durch Nuhn et al. publizierte Syntheseroute durchgeführt.^[159] Die erste Stufe der Reaktion, die Synthese von 4-Cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentansäure Pentafluorophenylester (PFP-CTA) wurde durch Herrn Dr. Benjamin Klöckner durchgeführt, der freundlicherweise 4,1 g (9,2 mmol) des PFP-CTAs zur Verfügung stellte.

1-Azido-16-cyano-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecan-16-yl Benzothioat (Azid-PEG₃-CTA)

1-Azido-16-cyano-13-oxo-3,6,9-trioxa-12-azaheptadecan-16-yl Benzothioat (Azid-PEG₃-CTA) wurde auf Basis von 4-Cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentansäure Pentafluorophenylester (PFP-CTA) hergestellt. Hierfür wurden 1184,0 mg (2,6582 mmol) PFP-CTA und 310,4 mg (3,0675 mmol) Triethylamin in 30 mL trockenem Tetrahydrofuran unter Argon-Atmosphäre gelöst. Unter Kühlung in einem Eis-/Wasserbad wurden, mittels eines Tropftrichters, 446,7 mg (2,0467 mmol) 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin in 30 mL trockenem THF im Verlauf von 25 Minuten hinzugegeben. Nach Beendigung der Zugabe wurde das Eis-Wasserbad entfernt und die Reaktionslösung für weitere 17 h gerührt. Im Anschluss daran wurde das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Dazu wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Essigsäureethylester und Methanol im Verhältnis von 20:1 verwendet. Im Verlauf der chromatographischen Auftrennung wurde das Mischungsverhältnis von Essigsäureethylester und Methanol auf 10:1 angepasst. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurden 867,1 mg (1,8079 mmol) des Azid-PEG₃-CTAs als viskose, intensiv rot gefärbte Flüssigkeit erhalten.

FT-IR: 3317 w; 2912 m; 2868 m; 2369 m; 2099 s; 1653 s; 1516 s; 1286 m; 1234 m, 1106 ss; 912 m; 868 m; 763 m; 730 s.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7,91-7,89 (m, 2 H); 7,58-7,54 (m, 1 H); 7,41-7,37 (m, 2 H); 6,30 (s, 1 H); 3,68-3,56 (m, 10 H); 3,49-3,47 (m, 2 H); 3,46-3,45 (m, 2 H); 3,39-3,37 (m, 2 H); 2,64-2,40 (m, 4 H); 1,94 (s, 3 H).

7.4.2 Synthese von Methacrylsäure-2-(2-pyridyldisulfid)ethylester (PDSM)

Die zweistufige Synthese von PDSM erfolgte in Anlehnung an die durch Wong et al. veröffentlichte Synthese.^[166]

Hydroxyethyl-(2-pyridyldisulfid) (HPDS)

Hydroxyethyl-(2-pyridyldisulfid) (HPDS) wurde ausgehend von Aldrithiol-2 synthetisiert. 10,00 g (45,39 mmol) Aldrithiol-2 und 54 mL Methanol wurden unter Stickstoff-Atmosphäre in einem 250 mL Rundkolben vorgelegt. Die Lösung wurde in einem Eis-Wasserbad gekühlt und es wurden 0,80 mL Eisessigsäure zugegeben. Über einen Tropftrichter wurden im Verlauf von 30 Minuten eine Lösung von 2,29 g (29,31 mmol) 2-Mercaptoethanol in 26 mL Methanol zugegeben. Danach wurde die Reaktionslösung für weitere 18 h bei Raumtemperatur weiter gerührt. Im Anschluss daran wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Dazu wurde ein Laufmittelgemisch von Essigsäureethylester und Cyclohexan im Verhältnis 1:2 verwendet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum konnten 4,99 g (26,65 mmol) HDPS als viskose, blassgelbe Flüssigkeit erhalten werden.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8,52 (d, J = 5 Hz, 1 H); 7,62-7,58 (m, 1 H); 7,41 (d, J = 8 Hz, 1 H); 7,18-7,15 (m, 1 H); 3,81 (t, J = 5 Hz, 2 H); 2,96 (t, J = 5 Hz, 2 H).

Methacrylsäure-2-(2-pyridyldisulfid)ethylester (PDSM)

Methacrylsäure-2-(2-pyridyldisulfid)ethylester (PDSM) wurde, ausgehend von dem zuvor synthetisierten HPDS, hergestellt. Zunächst wurden 50 mL trockenes Dichlormethan, durch Einleiten von Stickstoff für die Dauer von 1 h, entgast. In einem 100 mL Rundkolben wurden 4,99 g (26,65 mmol) HPDS und 25 mL des entgasten Dichlormethans vorgelegt. 3,31 g (32,71 mmol) Triethylamin wurden zugegeben und die Reaktionslösung wurde unter Rühren in einem Eis-/Wasserbad gekühlt. Über einen Tropftrichter wurden nun 3,42 g (32,72 mmol) Methacryloylchlorid in 25 mL des entgasten Dichlormethans über einen Tropftrichter im Verlauf von 30 Minuten zugetropft. Nach beendeter Zugabe wurde eine Spatelspitze 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) der Reaktionslösung hinzugefügt. Nachdem die Reaktionslösung für eine weitere Stunde gerührt wurde, wurde das Eis-/Wasserbad entfernt und für 17 h bei Raumtemperatur weiter gerührt. Im Anschluss daran wurde die Reaktionslösung gefiltert. Das Filtrat wurde 3-mal mit 20 mL Wasser gewaschen und 3-mal mit 20 mL Brine extrahiert. Die gesammelten wässrigen Phasen wurden 3-mal mit jeweils 30 mL DCM extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum aufkonzentriert. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Dazu wurde

zunächst ein Lösungsmittelgemisch von Cyclohexan und Essigsäureethylester im Verhältnis von 10:1 verwendet. Im Verlauf der Chromatographischen Trennung wurde der das Verhältnis von Cyclohexan und Essigsäureethylester auf 3:1 angepasst. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels mittels eines Rotationsverdampfers und dem Trocknen des Produkts im Vakuum wurden 5,49 g (21,50 mmol) PDSM als viskose, blassgelbe Flüssigkeit erhalten.

FT-IR: ν [cm^{-1}] = 3045 w; 2955 w; 1714 s; 1573 m; 1446 m; 1426 s; 1318 m; 1294 m; 1151 ss; 1116 m; 941 m; 759 s.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8,47 (m, 1 H); 7,70-7,68 (m, 1 H); 7,65-7,60 (m, 1 H); 7,11-7,09 (m, 1 H); 6,11 (m, 1 H); 5,57 (m, 1 H); 4,39 (t, $J = 6$ Hz, 2 H); 3,08 (t, $J = 6$ Hz, 2 H); 1,93 (m, 3 H).

7.4.3 Synthese von Methacrylsäure Pentafluorophenylester (PFPPMA)

Methacrylsäure Pentafluorophenylester (PFPPMA) wurde ausgehend von Pentafluorophenol und Methacryloylchlorid synthetisiert. Dazu wurden in einem 250 mL Rundkolben 10,10 g (54,87 mmol) Pentafluorophenol und 5,53 g (54,65 mmol) Triethylamin in 65 mL trockenem Dichlormethan unter Argon-Atmosphäre gelöst. Die Lösung wurde mittels eines Eis-/Wasserbads gekühlt. Unter lebhaftem Rühren wurden 5,11 g (48,89 mmol) Methacryloylchlorid in 35 mL Trockenem Dichlormethan, im Verlauf von 30 Minuten über einen Tropftrichter hinzugefügt. Nach beendeter Zugabe wurde das Eis-/Wasserbad entfernt und die Reaktion für 17 h weitergeführt. Im Anschluss daran wurde der Kolbeninhalt filtriert. Der Filterkuchen wurde mehrmals mit trockenem Dichlormethan gewaschen. Die gesammelten organischen Phasen wurden mit Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum aufkonzentriert. Das Rohprodukt wurde mittels fraktionierter Destillation aufgereinigt. 7,26 g (28,79 mmol) PFPPMA wurden als farblose Flüssigkeit erhalten.

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

$^{19}\text{F-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -152,89-(-152,89) (d, $J = 17$ Hz, 2 F); -158,31 (t, $J = 22$ Hz, 1 F); -162,6 (dd, $J_1 = 22$ Hz, $J_2 = 17$ Hz, 2 F)

7.4.4 Polymersynthese

Allgemeines zur Polymersynthese

Um zu gewährleisten, dass insbesondere bei Synthesestufen in denen mit PFPPMA oder den Triblock-Copolymer mit PFPPMA-Blöcken gearbeitet wurde, die Verunreinigungen der Reaktionslösung mit

Wasser möglichst gering war, wurde das Lösungsmittel für die RAFT-Polymerisationen vor dem Gebrauch getrocknet. Dazu wurde das verwendete 1,4-Dioxan unter Stickstoff-Gegenstrom für mindestens 5 Stunden über Natrium unter Rückfluss erhitzt. Die Benötigten Lösungsmittelmengen wurden frisch destilliert. Die Vorratslösung wurde über Natrium und unter Stickstoff-Atmosphäre bis zum erneuten Gebrauch gelagert.

Zur Vermeidung von Nebenreaktionen mit Luftsauerstoff wurden die angesetzten Reaktionslösungen vor der thermischen Initiation der RAFT-Polymerisation entgast. Dazu wurde das sogenannte *freeze-pump-thaw* Verfahren angewendet. Hierzu wurde das jeweilige Reaktionsgefäß zunächst mit Argon geflutet und in flüssigen Stickstoff getaucht, bis die Reaktionslösung komplett erstarrt war. Im Anschluss daran wurde, unter Kühlung des Gefäßinhalts in flüssigem Stickstoff, ein Hochvakuum angelegt und die Argon-Atmosphäre entfernt. Nachdem der Gasraum des Reaktionsgefäß vollständig evakuiert war, wurde das Gefäß verschlossen. Das Schlenkgefäß wurde aus dem Kühlmittel genommen und der Inhalt bei Raumtemperatur vollständig aufgetaut. Im Anschluss daran wurde der Kolben wieder, bis zum Erstarren der Lösung, in flüssigen Stickstoff getaucht, das Hochvakuum wurde wieder angelegt. Diese zyklische Vakuumentgasung wurde insgesamt dreimal wiederholt, wobei der Kolbeninhalt erst 5, dann 10 und schließlich 15 Minuten dem Hochvakuum ausgesetzt wurde.

Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)

Zur Synthese des p(MEO₃MA) Homopolymers wurden 1000,0 mg (4,305 mmol) MEO₃MA Monomer in 1,5 mL 1,4-Dioxan gelöst und in ein 25 mL Schlenkrohr überführt. Im Anschluss daran wurden 44,8 mg (0,094 mmol) des Azid-PEG₃-CTAs in 0,5 mL 1,4-Dioxan und 5,77 mg (0,019 mmol) AMDVN in 0,5 mL 1,4-Dioxan hinzugefügt. Danach wurde, wie zuvor beschrieben, das *freeze-pump-thaw* Verfahren angewendet, um die Reaktionslösung zu entgasen. Die RAFT-Polymerisation wurde bei einer Ölbadtemperatur von 40 °C durchgeführt. Nach 20 h erfolgte die Kontrolle des Umsatzes durch ¹H-NMR-Spektroskopie. Bei einem Umsatz von etwa 84% wurde die Reaktion beendet. Dazu wurde das Reaktionsgefäß in flüssigen Stickstoff getaucht, bis der gesamte Gefäßinhalt erstarrt war. Zur Isolation des Produkts wurde die Reaktionslösung mehrmals gegen n-Hexan gefällt. Die Wiederaufnahme des Rückstands erfolgte dabei jeweils mit 4,0 mL 1,4-Dioxan. Der Niederschlag wurde anschließend für mehrere Tage im Vakuum getrocknet. 927,4 mg (0,091 mmol) Azid-PEG₃-p(MEO₃MA) wurden als hochviskoses, rotes Öl erhalten und als makro-CTA für nachfolgende Synthesen eingesetzt. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde das Produkt bei -20 °C und unter Argon-Schutzatmosphäre gelagert.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7,88-7,85 (m, 2 H); 7,52-7,49 (m, 1 H); 7,37-7,33 (m, 2 H); 4,08 (m, X_{n(x)}·2 H); 3,69-3,64 (m, X_{n(x)}·8 H); 3,55 (m, X_{n(n)}·2 H); 3,38 (m, X_{n(x)}·3 H).

Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)

Ausgehend von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA) wurden Diblock-Copolymere mit PDSM synthetisiert. Dazu wurden 927,4 mg (0,091 mmol) der Makro-CTA Verbindung in 1,0 mL 1,4-Dioxan gelöst und in ein 25 mL Schlenkrohr überführt. 356,0 mg (1,394 mmol) PDSM in 1,0 mL 1,4-Dioxan und 5,55 mg (0,018 mmol) AMDVN wurden hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Entgasung der Reaktionslösung mittels *freeze-pump-thaw* Verfahren, wie im Punkt *Allgemeines zur Polymersynthese* beschrieben. Die RAFT-Polymerisation wurde bei einer Reaktionstemperatur von 40 °C durchgeführt. Nach einer Reaktionszeit von 23 h wurde der Umsatz des Monomers mittels ¹H-NMR Spektroskopie überprüft. Die Isolation des Produktes erfolgte mittels Präzipitation gegen n-Hexan, wobei der Rückstand nach der Zentrifugation erneut in 4 mL 1,4-Dioxan aufgenommen wurde. Die Präzipitation wurde mit dieser Lösung erneut durchgeführt. Nach insgesamt dreimaliger Präzipitation wurde der Rückstand im Hochvakuum für mehrere Tage getrocknet. Auf diese Weise konnten 1153,5 mg (0,087 mmol) des Diblock-Copolymers als rotes, hoch viskoses Öl erhalten werden, welches bis zur Verwendung als CTA in der Synthese von Triblock-Copolymeren bei -20 °C und unter Argon-Atmosphäre gelagert wurde.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8,44 (m, X_n(y)·1 H); 7,84 (m, 2 H); 7,64 (m, X_n(y)·2 H); 7,49 (m, 1 H); 7,32 (m, 2 H); 7,07 (m, X_n(y)·1 H); 4,34-3,95 (m, (X_n(x) + X_n(y))·2 H); 3,69-3,64 (m, X_n(x)·8 H); 3,55 (m, X_n(x)·2 H); 3,38 (m, X_n(x)·3 H); 3,01 (m, X_n(y)·2 H).

Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(PFPMA)

Zur Synthese der Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(PFPMA) Triblock-Copolymere wurden 200,0 mg (0,015 mmol) des entsprechenden Diblock-Copolymers in 2,0 mL 1,4-Dioxan gelöst und in einem 25 mL Schlenkrohr vorgelegt. Nach der Zugabe von 46,3 µL (0,003 mmol) einer 20,0 mg/ml Stammlösung von AMDVN in 1,4-Dioxan, wurde die Reaktionslösung mittels *freeze-pump-thaw* Verfahren entgast. Nachdem sich die Reaktionslösung wieder vollständig verflüssigt hatte, wurde die RAFT-Polymerisation bei einer Ölbadtemperatur von 40 °C durchgeführt. Nach einer Reaktionsdauer von 19 h wurde der Umsatz des PFPMA Monomers mittels ¹⁹F-NMR Spektroskopie ermittelt. Die Reaktion wurde durch Eintauchen des Schlenkrohrs in flüssigen Stickstoff, abgebrochen. Das synthetisierte Triblock-Copolymer wurde durch dreimalige Präzipitation gegen n-Hexan isoliert. Dabei erfolgte die Wiederaufnahme des Präzipitats mit 4,0 mL 1,4-Dioxan. Nach mehrtägiger Trocknung des Rückstands im Hochvakuum wurden 271,0 mg (0,013 mmol) Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(PFPMA) als hellroter, wachsartiger Feststoff erhalten. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Polymer bei -20 °C und unter Argon-Atmosphäre gelagert.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8,47 (m, X_n(y)·1 H); 7,67 (m, X_n(y)·2 H); 7,10 (m, X_n(y)·1 H); 4,34-3,95 (m, (X_n(x) + X_n(y))·2 H); 3,70-3,65 (m, X_n(x)·8 H); 3,56 (m, X_n(x)·2 H); 3,38 (m, X_n(y)·3 H); 3,03 (m, X_n(y)·2 H).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -149,96(-152,31) (m, $X_n(z)\cdot 2$ F); -156,95 (m, $X_n(z)\cdot 1$ F); -162,12 (m, $X_n(z)\cdot 2$ F)

Deaktivierung der Reaktiven CTA-Endgruppe von Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(PFPMA)

Um die reaktive CTA-Endgruppe des Polymers zu entfernen, wurden zunächst 3,0 mL 1,4-Dioxan mittels des *freeze-pump-thaw* Verfahrens entgast. 256,6 mg (0,012 mmol) des Triblock-Copolymers wurden in 1,5 mL des entgasten 1,4-Dioxans in einem 25 mL Schlenkrohr unter Argon Atmosphäre gelöst. Daraufhin wurden 55,1 mg (0,179 mmol) AMDVN in 1,0 mL des entgasten 1,4-Dioxan der Reaktionslösung beigelegt. Unter lebhaftem Rühren wurde die Reaktion bei einer Temperatur von 40 °C durchgeführt. Währenddessen wurde über eine Glaskapillare für die Dauer von einer Stunde ein kontinuierlicher Argon-Strom durch die Reaktionslösung geleitet. Im Verlauf von 14 h entfärbte sich die hellrote Reaktionslösung vollständig. Durch dreimalige Präzipitation gegen n-Hexan wurde das Triblock-Copolymer isoliert. Die Wiederaufnahme des Präzipitats erfolgte mit 4,0 mL 1,4-Dioxan. Das Produkt wurde im Anschluss daran für mehrere Tage im Hochvakuum getrocknet. Auf diese Weise wurden 227 mg (0,011 mmol) Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(PFPMA) als farbloser, wachsartiger Feststoff erhalten. Die Abwesenheit der reaktiven CTA-Endgruppe wurde mittels UV-Vis Spektroskopie kontrolliert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 8,47 (m, $X_n(y)\cdot 1$ H); 7,68 (m, $X_n(y)\cdot 2$ H); 7,11 (m, $X_n(y)\cdot 1$ H); 4,34-3,95 (m, $(X_n(x) + X_n(y))\cdot 2$ H); 3,70-3,65 (m, $X_n(x)\cdot 8$ H); 3,56 (m, $X_n(x)\cdot 2$ H); 3,38 (m, $X_n(x)\cdot 3$ H); 3,03 (m, $X_n(y)\cdot 2$ H).

$^{19}\text{F-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = -149,58(-152,47) (m, $X_n(z)\cdot 2$ F); -156,95 (m, $X_n(z)\cdot 1$ F); -162,12 (m, $X_n(z)\cdot 2$ F).

Substitution von PFPMA mit N,N-Dimethylethylendiamin (DMEDA)

Die PFPMA-Seitenketten des dritten Polymerblocks wurden in einer Amidierungsreaktion mit N,N-Dimethylethylendiamin (DMEDA) zum entsprechenden Amid umgesetzt. Das freiwerdende Pentafluorphenol wurde durch Triethylamin gebunden.

Zunächst wurden 200,0 mg (9,256 μmol) des Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(PFPMA) Triblock-Copolymers mit deaktivierter, reaktiver RAFT-Endgruppe wurde in einem 25 mL Schlenkrohr in 2,0 mL frisch getrocknetem 1,4-Dioxan unter Argon-Atmosphäre gelöst. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 52,6 mg (0,520 mmol) Triethylamin (TEA) in 250 μL trockenem 1,4-Dioxan und von 38,4 mg (0,436 mmol) N,N-Dimethylethylendiamin (DMEDA) in weiteren 250 μL trockenem 1,4-Dioxan. Die Reaktionslösung wurde mit Hilfe des *freeze-pump-thaw* Verfahrens von gelösten Gasen befreit. Die Reaktion wurde bei einer Ölbadtemperatur von 40 °C über Nacht durchgeführt. Nach 14 h

wurden zusätzlich 16,3 mg (0,185 mmol) DMEDA in 250 μ L trockenem 1,4-Dioxan und 26,1 mg TEA in 250 μ L trockenem 1,4-Dioxan zugegeben. Nach weiteren 22 h wurde zur Kontrolle des vollständigen Umsatzes eine Probe entnommen und mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie charakterisiert. Nachdem die Vollständigkeit des Umsatzes bestätigt werden konnte, wurde die Polymerlösung drei Mal gegen n-Hexan gefällt. Die Wiederaufnahme des Präzipitats erfolgte dabei durch Zugabe von 4,0 mL trockenem 1,4-Dioxan. Nach der Aufnahme des Produkts in 10 mL MilliQ-Wasser wurde es über mehrere Tage gefriergetrocknet. Auf diese Weise wurden 132,4 mg (7,179 μ mol, 78% Ausbeute der Theorie) Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMEDAMA) als farbloser, wachsartiger Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl₃): δ [ppm] = 8.45 (m, X_n(y)·1 H); 7.66 (m, X_n(y)·2 H); 7.09 (m, X_n(y)·1 H); 4.34-3.95 (m, (X_n(x) + X_n(y))·2 H); 3.70-3.64 (m, X_n(x)·8 H); 3.55 (m, X_n(x)·2 H); 3.38 (m, X_n(x)·3 H); 3.01 (m, X_n(y)·2 H); 2.80-1.60 (m, X_n(z)·8 H).

Substitution von PFPMA mit N,N-Dimethyldipropylentriamin

Über eine Amidierungsreaktion wurden die PFPMA-Seitenketten durch N,N-Dimethyldipropylentriamin (DMDPTA) substituiert. Dazu wurden zunächst einige Milliliter trockenem 1,4-Dioxan mit Hilfe des *freeze-pump-thaw* Verfahrens von gelösten Gasen befreit. 104,2 mg (7,574 μ mol) eines Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(PFPMA) mit deaktivierter RAFT-Endgruppe wurden in 2 mL des entgasten 1,4-Dioxans in einem 25 ml Schlenkrohr unter Argon-Atmosphäre vorgelegt. Im Anschluss wurden sowohl 24,8 mg (0,245 mmol) TEA in 0,25 mL 1,4-Dioxan als auch 29,8 mg (0,187 mmol) DMDPTA in 0,25 mL 1,4-Dioxan der Reaktionslösung beigefügt. Die Reaktion wurde bei einer Ölbadtemperatur von 40 °C durchgeführt. Nach 22 h Reaktionszeit erfolgte die Entnahme von 150 μ L der Lösung zur Bestimmung des Umsatzes anhand eines $^{19}\text{F-NMR}$ s. Da noch kein vollständiger Umsatz erzielt wurde, wurden der Reaktionslösung erneut 7,5 mg (74,118 μ mol) TEA und 8,9 mg (55,876 μ mol) DMDPTA in jeweils 100 μ L trockenem, entgastem 1,4-Dioxan hinzugefügt. Nach weiteren 18 h wurde die Reaktion durch Eintauchen des Schlenkrohrs in flüssigen Stickstoff beendet. Dabei wurde das Gefäß bis zum Erstarren der Reaktionslösung eingetaucht. Durch dreimalige Präzipitation gegen ein Gemisch aus 6 Teilen n-Hexan und 4 Teilen Diethylether wurde das Produktpolymer isoliert und aufgereinigt. Die Wiederaufnahme des Polymers erfolgte dabei in trockenem und entgastem 1,4-Dioxan. Durch mehrtägige Trocknung im Hochvakuum wurden 84,2 mg (6,337 μ mol; 84% Ausbeute der Theorie) Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMDPTAMA) als farbloser, wachsartiger Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl₃): δ [ppm] = 8,45 (m, X_n(y)·1 H); 7,66 (m, X_n(y)·2 H); 7,10 (m, X_n(y)·1 H); 4.46-3.93 (m, (X_n(x) + X_n(y) + X_n(z))·2 H); 3,78-3,48 (m, X_n(x)·8 H); 3,55 (m, X_n(x)·2 H); 3,38 (m, X_n(x)·3 H); 3,02 (m, X_n(y)·2 H); 2,90-1,53 (m, X_n(z)·13 H); 3,29-1,65 (m, X_n(y)·2 H + X_n(z₂)·8 H).

Substitution von PFPMA mit N,N-Dimethylethylendiamin und Dodecylamin

Um die PFPMA-Seitenketten des Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(PFPMA) Triblock-Copolymers durch N,N-Dimethylethylendiamin (DMEDA) und Dodecylamin zu substituieren, wurden 148,4 mg (3,829 μ mol) Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)₄₂-b-p(PDSM)₁₂-b-p(PFPMA)₁₀₁ mit nach der beschriebenen Vorschrift deaktivierter Benzothioat-Gruppe in einem 25 mL Schlenkrohr vorgelegt. Hierfür wurden zunächst einige Milliliter frisch getrocknetem 1,4-Dioxan mit Hilfe des *freeze-pump-thaw* Verfahrens von gelösten Gasen befreit. Im Anschluss daran wurde das Polymer gelöst und in insgesamt 1,0 mL 1,4-Dioxan im Reaktionsgefäß unter Argon-Atmosphäre vorgelegt. 17,9 mg (96,501 μ mol) Dodecylamin und 66,5 mg (0,658 mmol) Triethylamin (TEA) wurden in jeweils 250 μ L des entgasten 1,4-Dioxans gelöst und der Reaktionslösung beigelegt. Die zugegebene Menge an Dodecylamin Die Reaktion wurde bei einer Ölbadtemperatur von 40 °C durchgeführt. Nach 23 h erfolgte die Entnahme von 150 μ L zur Reaktionskontrolle mittels eines ¹⁹F-NMRs. Da noch kein vollständiger Umsatz erzielt wurde, wurden weitere 9,4 mg (92,895 μ mol) TEA der Reaktionslösung beigelegt. Nach weiteren 20,5 h wurden erneut 150 μ L der Reaktionslösung zur Bestimmung des Umsatzes entnommen. Da der gewünschte Umsatz an Dodecylamin erzielt werden konnte, wurden 39,2 mg (0,450 mmol) DMEDA in 250 μ L trockenem, entgastem 1,4-Dioxan und 13,1 mg (0,129 mmol) TEA in 100 μ L trockenem, entgastem 1,4-Dioxan der Reaktionslösung beigelegt. Nach weiteren 36 h wurde der Umsatz wie zuvor beschrieben durch die Messung eines ¹⁹F-NMRs bestimmt. Da der vollständige Umsatz aller PFPMA-Seitengruppen erzielt war, wurde die Reaktion durch rapides Abkühlen der Reaktionslösung beendet. Dazu wurde das Gefäß bis zum Erstarren der Reaktionslösung in flüssigen Stickstoff getaucht. Die Reaktionslösung wurde dreimal gegen n-Hexan gefällt. Dabei wurde das Präzipitat jeweils mit trockenem, entgastem 1,4-Dioxan wieder aufgenommen. Das isolierte und aufgereinigte Polymer wurde über mehrere Tage im Hochvakuum getrocknet. Insgesamt wurden 67,5 mg (2,170 μ mol; 57 % Ausbeute der Theorie) Azid-PEG₃-p(MEO₃MA)-b-p(PDSM)-b-p(DMEDAMA-*stat*-C₁₂AMA) als farbloser, wachsartiger Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ [ppm] = 8,44 (m, X_n(y)·1 H); 7,65 (m, X_n(y)·2 H); 7,09 (m, X_n(y)·1 H); 4,48-3,84 (m, (X_n(x) + X_n(y) + X_n(z₁) + X_n(z₂))·2 H); 3,76-3,58 (m, X_n(x)·8 H); 3,55 (m, X_n(x)·2 H); 3,38 (m, X_n(x)·3 H).

7.5 Teil 3: Synthese und Evaluation von pDNA-Polyplexen auf Basis multifunktionaler Triblock-Copolymere

7.5.1 Polyplexsynthese

Synthese der Polyplexe

Die Synthese der Polyplexe erfolgte zu verschiedenen Verhältnissen der Anzahl an Phosphatgruppen N_P der eingesetzten pDNA und der Anzahl an Aminogruppen N_N des eingesetzten Polymers. N_P lässt sich anhand der verwendeten DNA-Menge m_{DNA} berechnen. Hierfür wurde das gemittelte Molekulargewicht der Nucleotid-Basen M_{DNA} angewendet:

$$N_P = \frac{m_{DNA}}{M_{DNA}} \cdot N_A$$

Bei N_A handelt es sich um die Avogadro-Konstante. Mit N_P ergibt sich für das jeweils angesetzte N/P-Verhältnis x benötigte Anzahl an Aminogruppen N_N zu:

$$N/P = x \Rightarrow \frac{N_N}{N_P} = x \Rightarrow N_N = x \cdot N_P$$

Hieraus kann die benötigte Polymermenge m_{poly} wie folgt berechnet werden:

$$N_N = x \cdot N_P = \frac{m_{poly}}{M_{poly}} \cdot N_A \cdot N_{Amino} \Rightarrow m_{poly} = \frac{x \cdot N_P \cdot M_{poly}}{N_A \cdot N_{Amino}}$$

Dabei bezeichnet M_{poly} das mittlere Molekulargewicht des Polymers und N_{Amino} die Anzahl kationischer Einheiten pro Polymerkette. Zur Synthese der Polyplexen wurden den berechneten Werten entsprechende Mengen von Polymer-Stammlösung oder pDNA-Stammlösung an die Wände eines Eppendorf-Gefäßes pipettiert und durch Zentrifugation bei 3500 rpm vereint. Nach dem lebhaften Mischen der Reaktionslösung, erneuter kurzer Zentrifugation und Inkubation bei Raumtemperatur für 45-60 min konnten die Polyplexe für Folgeexperimente angewandt werden.

Vernetzung der Polyplexe

Um die Polyplexe vernetzen zu können wurde zunächst die für den erwünschten Vernetzungsgrad benötigte Menge des Vernetzers m_{link} berechnet. Mit einem Gewichtungsfaktor von $\frac{1}{2}$ für bifunktionelle Vernetzer ergibt sich:

$$m_{link} = n_{poly} \cdot \frac{1}{2} N_{link} \cdot M_{link} = \frac{m_{poly}}{M_{poly}} \cdot \frac{1}{2} N_{link} \cdot M_{link}$$

n_{poly} ist dabei die zur Synthese des Polyplexes verwendete molare Anzahl an Polymermolekülen, N_{link} ist die durchschnittliche Anzahl vernetzbarer Gruppen pro Polymerkette und M_{link} ist das Molekulargewicht des Vernetzers. Je nach erwünschtem Vernetzungsgrad kann der Gewichtungsfaktor angepasst werden. Im Anschluss erfolgte die Synthese der vernetzten Polyplexe durch Pipettieren der berechneten Menge an Vernetzer an den Rand eines Eppendorf-Gefäßes, in dem die jeweilige Lösung unvernetzter Polyplexe vorgelegt wurde. Durch Zentrifugation bei 3500 rpm, lebhafter Mischung und Inkubation für mindestens 45 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Intramolekulare Vernetzung der Polyplexe durchgeführt.

7.5.2 Biologische *in vitro* Experimente

Die folgenden Experimente wurden, in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Ernst Wagner, durch Frau M.Sc. Simone Berger im Institut für Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität in München durchgeführt.

Zellkultur

Die murine Neuroblastom-Zelllinie Neuro2a (N2a) wurde von der *American Type Culture Collection* (Manassas, Virginia) bezogen. Als Nährmedium wurde *low-glucose* (1 g/L Glukose) *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM, bezogen von: Merck / Sigma Aldrich) verwendet, welches mit 10 Vol.-% *fetal bovine serum* (FBS, Fötale Kälberserum, bezogen von: Merck / Sigma Aldrich), 100 U/mL Penizillin (Merck / Sigma Aldrich) und 100 µg/mL Streptomycin (Merck / Sigma Aldrich) versetzt wurde.

Luciferase-Gentransfer Versuche

Zur Durchführung der Versuche zum Luciferase-Gentransfer wurden zunächst am Vortag des Versuchs N2a-Zellen mit einer Dichte von etwa 10000 Zellen/well in einer 96-well-Platte (Faust Lab Science) ausgesät. Vor dem Transfektionsversuch wurde das Nährmedium gegen ein frisches Medium mit 10 Vol.-% FBS ausgetauscht. Die Versuche wurden mit 200 ng pCMV-Luc (Plasmid Factory GmbH) pDNA durchgeführt, mit der Polyplexlösungen zu verschiedenen N/P-Verhältnissen in 20 µL Aliquote vorbereitet wurden. Als Negativkontrolle wurde PBS-Puffer verwendet, als Positivkontrolle diente lineares Polyethylenimin (LPEI) Polyplexe (N/P = 6). Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Die 96-well-Platte wurde für 24 h bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit einem Lysis Reagenz, bestehend aus 12,5 mM Tris(hydroxymethyl)aminoethan Puffer (pH = 7,8) mit Phosphorsäure, 1 mM Dithiothreitol (DTT), 2 mM 1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure (CDTA), 5% Glycerol und 0,5% Triton X-100® (Promega) für 45 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Die Aktivität der Luciferase im

Zellysate wurden mittels eines *luciferase assay kit* (Promega) und eines Centro LB 960 Mikroplatten Luminometer (Berthold Technologies) bestimmt. Die Transfektionseffizienz wurde in der Einheit *relative light units* (RLUs; relative Lichteinheiten) pro *well* (entspricht 10000 Zellen) angegeben.

Zellviabilitätsassay (MTT-Assay)

Die Transfektionsversuche wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt. Nach 24 h wurden 10 µL einer 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Lösung (MTT; 5 mg/ml; Merck / Sigma Aldrich) jedem *well* hinzugefügt. Die Konzentration von MTT betrug somit 0,5 mg / mL pro *well*. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei einer Temperatur von 37 °C wurde der Überstand entfernt. Die 96-*well* Platten wurden für mindestens eine Stunde bei -80 °C gelagert. Im Anschluss daran wurden 100 µL Dimethylsulfoxid (DMSO) in jedes *well* gegeben. Nach einer Inkubation von zwei Stunden bei 37 °C unter ständiger Bewegung wurde die Platte mittels eines Tecan Mikroplatten-Reader (Spectrafluor Plus, Tecan) photometrisch ausgewertet. Absorptionmessungen wurden bei einer Wellenlänge von 590 nm, unter einer Hintergrund-Korrektur bei einer Wellenlänge von 630 nm, durchgeführt. Die Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Die relative metabolische Aktivität der Zellen $[A]_{rel}$ wurde berechnet, indem das Verhältnis aus der Gemessenen metabolischen Aktivität $[A]_{test}$ im zur metabolischen Aktivität $[A]_{control}$ der Kontrollzellen, welche mit PBS-Puffer behandelt wurden, gebildet wurde. Dazu wurde folgende Formel angewandt:

$$[A]_{rel} = \frac{[A]_{test}}{[A]_{control}} \quad (7.1)$$

Fluss-Zytometrie Messung

Huh7 Zellen wurden mit einer Dichte von 75000 Zellen pro Vertiefung in einer 24-Well Platte ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Nährmedium jeweils mit 400 µL frischem Medium mit einem Anteil von 10 % (V/V) FBS ersetzt. Das Experiment wurde in technischen Duplikaten durchgeführt. Die Vertiefungen der 24-well Platte wurde mit 100 µL Polyplex-Lösungen (unvernetzt oder vernetzt mit 1,6-Hexandithiol) versetzt, welche insgesamt 1 µg pDNA (20% Cy5-markiert) enthielt. Als Negativkontrolle wurde PBS verwendet. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit LPEI-Polyplexen eines N/P-Verhältnisses von N/P = 6 versetzt. Die Zellen wurden für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, im Anschluss mit 500 µL PBS, welches 1000 IU Heparin (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) versetzt und für 15 Minuten mit Eis gekühlt. Durch diese Vorgehensweise sollten Polyplexe, welche unspezifisch an die Zelloberfläche gebunden waren, entfernt werden. Die ausgesäten Zellen wurden mit 500 µL PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA von den Wänden der 24-well Platte gelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Zell-Pellets in 600 µL PBS mit (10% (V/V) FBS aufgenommen. 0,6 µL 4',6-Diamino-2-phenylindol (DAPI) wurde zur Detektion toter Zellen hinzugefügt. Zur

Detektion der Zellaufnahme wurde eine Wellenlänge von 635 nm zur Anregung des Farbstoffs Cy5 verwendet, die Messung des emittierten Fluoreszenzlichts erfolgte bei einer Wellenlänge von 665 nm. Duplets sowie Zellbestandteile wurden während der Messung aussortiert. Die Aufnahme der Messdaten erfolgte mit einem CytoFLEX S Fluss Zytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) mit 5000 Messereignissen pro Probe. Die Datenanalyse erfolgte mit der Fluss-Zytometrie Analysesoftware FlowJo[®]7.6.5 (FlowJo, Ashland, OR, USA)

8 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| AIBN | Azobis(isobutyronitril) |
| AMDVN | 2,2'-Azo-di-(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril) |
| ATRP | <i>atom transfer radical polymerization</i> ; Atom-Transfer radikalische Polymerisation |
| BHT | 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol |
| CAF | <i>cancer-associated fibroblasts</i> , krebsassoziierte Fibroblasten |
| CDTA | 1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| CRP | <i>controlled radical polymerization</i> ; kontrollierte radikalische Polymerisation |
| CTA | <i>chain transfer agent</i> ; Kettenübertragungsagens |
| CW | <i>Continuous wave</i> |
| DAPI | 4',6-Diamino-2-phenylindol |
| DBPO | Dibenzoylperoxid |
| DET | Diethylentriamin |
| DLS | <i>dynamic light scattering</i> ; Dynamische Lichtstreuung |
| DMA | Dodecylmethacrylamid |
| DMAEMA | <i>N,N-dimethyl aminoethyl methacrylate</i> ; Methacrylsäure-2-(dimethylamino)-ethylester |
| DMDPTA | N,N-Dimethyldipropylentriamin |
| DMEDA | N,N-Dimethylethylendiamin |
| DMEM | <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DOSY | <i>diffusion ordered spectroscopy</i> ; diffusionsgeordnete (Kernresonanz-) Spektroskopie |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |

| | |
|---------------------------|--|
| EPR Effekt | <i>enhanced permeability and retention effect</i> , Effekt der verstärkten Permeabilität und Retention |
| FACS | <i>fluorescence-activated cell sorting / cell scanning</i> , Fluoreszenz-aktivierte/r Zellsortierung / Zell-Scan |
| FBS | <i>fetal bovine serum</i> ; fötales Kälberserum |
| FDA | <i>food and drug administration</i> ; amerikanische Zulassungsbehörde für Nahrungsmittel und Medikamente |
| FID | <i>free induction decay</i> ; Freier Induktionszerfall |
| FT | <i>Fourier transform</i> |
| GSH | Glutathion |
| GPC | Gel-Permeations-Chromatographie |
| HPDS | Hydroxyethyl-(2-pyridyldisulfid) |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| LPEI | lineares Polyethylenimin |
| MDSC | <i>myeloid-derived suppressor cells</i> , myeloide Suppressorzellen |
| MEO₃MA | Tri-(ethylenglykol)-methylether-methacrylat |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| NMP | <i>nitroxide mediated polymerization</i> ; Nitroxid-vermittelte Polymerisation |
| NMR | <i>nuclear magnetic resonance (spectroscopy)</i> ; Kernresonanzspektroskopie |
| pDNA | Plasmid-DNA |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PDSM | <i>pyridyl disulfide ethyl methacrylate</i> ; Methacrylsäure-2-(2-pyridyldisulfid)ethylester |
| PEI | Poly(ethylenimin) |
| PF₅-CTA | 4-Cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentansäure Pentafluorphenylester |

| | |
|---------------|---|
| PFPPMA | <i>pentafluorophenyl methacrylate</i> (PFPPMA), Methacrylsäure Pentafluorophenylester |
| PMMA | Polymethylmethacrylat |
| RAFT | <i>reversible addition-fragmentation chain-transfer polymerization</i> ; Reversible Additions-Fragmentierungs Kettenübertragungsreaktion |
| RI | <i>refractive index</i> ; Brechungsindex |
| SEC | <i>size exclusion chromatography</i> ; Größenausschluss- chromatographie |
| SLS | <i>static light scattering</i> ; statische Lichtstreuung |
| SPAAC | <i>strain promoted alkyne-azide cycloaddition</i> , ringspannungsvermittelte Alkin-Azid-Cycloaddition |
| TAM | <i>tumor associated macrophages</i> , tumorassoziierte Makrophagen |
| TBE | Tris-Borate-Ethylendiamintetraessigsäure Puffer |
| THF | Tetrahydrofuran |
| TMS | Tetramethylsilan |
| UV | <i>ultraviolet light</i> ; ultraviolettes Licht |

9 Anhang

9.1 Literaturverzeichnis

- [1] C. E. Dunbar; K. A. High; J. K. Joung; D. B. Kohn; K. Ozawa; M. Sadelain. *Science* (80-.). **2018**, 359 (6372).
- [2] A. C. Yadav; M. G. Gopisankar. *Introd. to Basics Pharmacol. Toxicol. Vol. 1 Gen. Mol. Pharmacol. Princ. Drug Action* **2019**, No. Figure 1, 319–328.
- [3] A. I. S. van den Berg; C. O. Yun; R. M. Schiffelers; W. E. Hennink. *J. Control. Release* **2021**, 331 (December 2020), 121–141.
- [4] R. Duncan. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2 (5), 347–360.
- [5] F. Alexis; E. Pridgen; L. K. Molnar; O. C. Farokhzad. *Mol. Pharm.* **2008**, 5 (4), 505–515.
- [6] N. Hoshyar; S. Gray; H. Han; G. Bao. *Nanomedicine* **2016**, 11 (6), 673–692.
- [7] K. Riehemann; S. W. Schneider; T. A. Luger; B. Godin; M. Ferrari; H. Fuchs. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, 48 (5), 872–897.
- [8] M. J. Vicent; H. Ringsdorf; R. Duncan. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, 61 (13), 1117–1120.
- [9] H. Jatzkewitz. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiol. Chemie* **1954**, 297 (Jahresband), 149–156.
- [10] H. Ringsdorf. *J. Polym. Sci.* **1975**, 153 (1), 135–153.
- [11] C. Lipinski. *Am. Pharm. Rev.* **2002**, 5 (3), 82–85.
- [12] M. Kakran; L. Li; R. H. Müller. *Pharm. Eng.* **2012**, 32 (4), 82–89.
- [13] N. Bertrand; J. C. Leroux. *J. Control. Release* **2012**, 161 (2), 152–163.
- [14] Y. Barenholz. *J. Control. Release* **2012**, 160 (2), 117–134.
- [15] T. Niidome; L. Huang. *Gene Ther.* **2002**, 9 (24), 1647–1652.
- [16] Y. S. Sanghvi. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2011**, No. SUPPL.46, 1–22.
- [17] S. L. Ginn; A. K. Amaya; I. E. Alexander; M. Edelstein; M. R. Abedi. *J. Gene Med.* **2018**, 20 (5), 1–16.
- [18] F. Ratjen; S. C. Bell; S. M. Rowe; C. H. Goss; A. L. Quittner; A. Bush. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2015**, 1 (1), 15010.
- [19] J. S. Elborn. *Lancet* **2016**, 388 (10059), 2519–2531.
- [20] L. I. Marquez Loza; E. C. Yuen; P. B. McCray. *Genes (Basel)*. **2019**, 10 (3).

- [21] K. Mention; L. Santos; P. T. Harrison. *Genes (Basel)*. **2019**, *10* (5), 1–17.
- [22] S. Đorđević; M. M. Gonzalez; I. Conejos-Sánchez; B. Carreira; S. Pozzi; R. C. Acúrcio; R. Satchi-Fainaro; H. F. Florindo; M. J. Vicent. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2022**, *12* (3), 500–525.
- [23] W. Pschyrembel. *Klinisches Wörterbuch mit klinischen Syndromen und Nomina Anatomica*; De Gruyter, **1982**.
- [24] J. E. Bradner; D. Hnisz; R. A. Young. *Cell* **2017**, *168* (4), 629–643.
- [25] K. Bukowski; M. Kciuk; R. Kontek. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (9).
- [26] F. R. Balkwill; M. Capasso; T. Hagemann. *J. Cell Sci.* **2012**, *125* (23), 5591–5596.
- [27] E. Wagner; R. Kircheis; G. F. Walker. *Biomed. Pharmacother.* **2004**, *58* (3), 152–161.
- [28] D. Hobernik; M. Bros. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (11), 1–28.
- [29] W. Sun; Q. Shi; H. Zhang; K. Yang; Y. Ke; Y. Wang; L. Qiao. *Discov. Med.* **2019**, *27* (146), 45–55.
- [30] G. J. Nabel; E. G. Nabel; Z. Y. Yang; B. A. Fox; G. E. Plautz; X. Gao; L. Huang; S. Shu; D. Gordon; A. E. Chang. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90* (23), 11307–11311.
- [31] L. Van Parijs; A. K. Abbas. *Science (80-.)*. **1998**, *280* (5361), 243–248.
- [32] G. L. Beatty; W. L. Gladney. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21* (4), 687–692.
- [33] M. Angelova; B. Mlecnik; A. Vasaturo; G. Bindea; T. Fredriksen; L. Lafontaine; B. Buttard; E. Morgand; D. Bruni; A. Jouret-Mourin; C. Hubert; A. Kartheuser; Y. Humblet; M. Ceccarelli; N. Syed; F. M. Marincola; D. Bedognetti; M. Van den Eynde; J. Galon. *Cell* **2018**, *175* (3), 751-765.e16.
- [34] M. S. Goldberg. *Nat. Rev. Cancer* **2019**, *19* (10), 587–602.
- [35] X. Zang; X. Zhao; H. Hu; M. Qiao; Y. Deng; D. Chen. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *115*, 243–256.
- [36] M. Yang; J. Li; P. Gu; X. Fan. *Bioact. Mater.* **2021**, *6* (7), 1973–1987.
- [37] Y. Komohara; Y. Fujiwara; K. Ohnishi; M. Takeya. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *99*, 180–185.
- [38] C. B. Rodell; S. P. Arlauckas; M. F. Cuccarese; C. S. Garris; R. Li; M. S. Ahmed; R. H. Kohler; M. J. Pittet; R. Weissleder. *Nat. Biomed. Eng.* **2018**, *2* (8), 578–588.
- [39] C. Qiao; J. Liu; J. Yang; Y. Li; J. Weng; Y. Shao; X. Zhang. *Biomaterials* **2016**, *85*, 1–17.
- [40] Q. Qiu; C. Li; Y. Song; T. Shi; X. Luo; H. Zhang; L. Hu; X. Yan; H. Zheng; M. Liu; M. Liu;

- M. Liu; S. Yang; X. Liu; G. Chen; Y. Deng. *Acta Biomater.* **2019**, *92*, 184–195.
- [41] B. Chen; Z. Wang; J. Sun; Q. Song; B. He; H. Zhang; X. Wang; W. Dai; Q. Zhang. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2016**, *12* (1), 131–141.
- [42] R. F. Wang. *Semin. Cancer Biol.* **2006**, *16* (1), 73–79.
- [43] H. Conroy; K. C. Galvin; S. C. Higgins; K. H. G. Mills. *Cancer Immunol. Immunother.* **2012**, *61* (3), 425–431.
- [44] S. Kang; J. Xie; S. Ma; W. Liao; J. Zhang; R. Luo. *Immunobiology* **2010**, *215* (2), 153–162.
- [45] J. Kao; E. C. Ko; S. Eisenstein; A. G. Sikora; S. Fu; S. hsia Chen. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2011**, *77* (1), 12–19.
- [46] B. Shao; X. Wei; M. Luo; J. Yu; A. Tong; X. Ma; T. Ye; H. Deng; Y. Sang; X. Liang; Y. Ma; Q. Wu; W. Du; J. Du; X. Gao; Y. Wen; P. Fu; H. Shi; S. Luo; Y. Wei. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (September 2014), 1–13.
- [47] Q. Wang; W. Cao; Z. G. Yang; G. F. Zhao. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **2015**, *8* (10), 17565–17577.
- [48] A. Kustanovich; R. Schwartz; T. Peretz; A. Grinshpun. *Cancer Biol. Ther.* **2019**, *20* (8), 1057–1067.
- [49] S. Oh; J. A. Kessler. *Methods* **2018**, *133*, 29–43.
- [50] H. Bai; G. M. S. Lester; L. C. Petishnok; D. A. Dean. *Biosci. Rep.* **2017**, *37* (6), 1–17.
- [51] K. Miyata; N. Nishiyama; K. Kataoka. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2562–2574.
- [52] J. A. Wolff; J. J. Ludtke; G. Acsadi; P. Williams; A. Jani. *Hum. Mol. Genet.* **1992**, *1* (6), 363–369.
- [53] S. Jiao; G. Acsadi; A. Jani; P. L. Felgner; J. A. Wolff. *Exp. Neurol.* **1992**, *115* (3), 400–413.
- [54] W. W. NICHOLS; B. J. LEDWITH; S. V. MANAM; P. J. TROILO. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1995**, *772* (1 DNA Vaccines), 30–39.
- [55] L. Lunsford; U. McKeever; V. Eckstein; M. L. Medley. *J. Drug Target.* **2000**, *8* (1), 39–50.
- [56] Z. Wang; P. J. Troilo; X. Wang; T. G. Griffiths; S. J. Pacchione; A. B. Barnum; L. B. Harper; C. J. Pauley; Z. Niu; L. Denisova; T. T. Follmer; G. Rizzuto; G. Ciliberto; E. Fattori; N. L. Monica; S. Manam; B. J. Ledwith. *Gene Ther.* **2004**, *11* (8), 711–721.
- [57] M. Bros; X.-L. Ross; A. Pautz; A. B. Reske-Kunz; R. Ross. *J. Immunol.* **2003**, *171* (4), 1825–1834.
- [58] R. Ross; S. Sudowe; J. Beisner; X. L. Ross; I. Ludwig-Portugall; J. Steitz; T. Tüting; J. Knop;

- A. B. Reske-Kunz. *Gene Ther.* **2003**, *10* (12), 1035–1040.
- [59] A. Lopes; K. Vanvarenberg; V. Pr at; G. Vandermeulen. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2017**, *8* (September), 404–415.
- [60] M. Bonkobara; P. K. Zukas; S. Shikano; S. Nakamura; P. D. Cruz; K. Ariizumi. *J. Immunol.* **2001**, *167* (12), 6893–6900.
- [61] M. Longmire; P. L. Choyke; H. Kobayashi. *Nanomedicine* **2008**, *3* (5), 703–717.
- [62] M. Talelli; M. Barz; C. J. F. Rijcken; F. Kiessling; W. E. Hennink; T. Lammers. *Nano Today* **2015**, *10* (1), 93–117.
- [63] J. Goodchild; B. Kim; P. C. Zamecnik. *Antisense Res. Dev.* **1991**, *1* (2), 153–160.
- [64] J. Villemejane; L. M. Mir. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157* (2), 207–219.
- [65] Y. T. Le Guen; T. Le Gall; P. Midoux; P. Gu egan; S. Braun; T. Montier. *J. Gene Med.* **2020**, *22* (2).
- [66] U. L chelt; E. Wagner. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (19), 11043–11078.
- [67] D. N. Nguyen; J. J. Green; J. M. Chan; R. Langer; D. G. Anderson. *Adv. Mater.* **2009**, *21* (8), 847–867.
- [68] S. Nayak; R. W. Herzog. *Gene Ther.* **2010**, *17* (3), 295–304.
- [69] J. L. Shirley; Y. P. de Jong; C. Terhorst; R. W. Herzog. *Mol. Ther.* **2020**, *28* (3), 709–722.
- [70] L. Pang; L. Shen; Z. Zhao. *Comput. Math. Methods Med.* **2016**, *2016*.
- [71] Y. Matsumura; H. Maeda. *Cancer Res.* **1986**, *46* (8), 6387–6392.
- [72] H. Maeda; H. Nakamura; J. Fang. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65* (1), 71–79.
- [73] S. K. Golombek; J.-N. May; B. Theek; L. Appold; N. Drude; F. Kiessling; T. Lammers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *130*, 17–38.
- [74] H. Maeda. *J. Pers. Med.* **2021**, *11* (3).
- [75] Y. Zhong; F. Meng; C. Deng; Z. Zhong. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (6), 1955–1969.
- [76] R. Bazak; M. Hourri; S. El Achy; S. Kamel; T. Refaat. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2015**, *141* (5), 769–784.
- [77] W. Gu; F. Meng; R. Haag; Z. Zhong. *J. Control. Release* **2021**, *329*, 676–695.
- [78] J. S. Wang; K. Matyjaszewski. *Macromolecules* **1995**, *28* (23), 7901–7910.
- [79] K. Matyjaszewski. *J. Macromol. Sci. - Pure Appl. Chem.* **1997**, *34* (10), 1785–1801.

- [80] M. K. Georges; R. P. N. Veregin; P. M. Kazmaier; G. K. Hamer. *Macromolecules* **1993**, *26* (11), 2987–2988.
- [81] J. Nicolas; Y. Guillaneuf; C. Lefay; D. Bertin; D. Gigmes; B. Charleux. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38* (1), 63–235.
- [82] J. Chiefari; Y. K. Chong; F. Ercole; J. Krstina; J. Jeffery; T. P. T. Le; R. T. A. Mayadunne; G. F. Meijs; C. L. Moad; G. Moad; E. Rizzardo; S. H. Thang. *Macromolecules* **1998**, *31* (16), 5559–5562.
- [83] G. Moad; E. Rizzardo; S. H. Thang. In *Australian Journal of Chemistry*; 2005; Vol. 58, pp 379–410.
- [84] G. Moad; E. Rizzardo; S. H. Thang. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (9), 1133–1142.
- [85] Atta-ur-Rahman; M. I. Choudhary; Atia-tul-Wahab. In *Solving Problems with NMR Spectroscopy*; Elsevier, 2016; pp 1–34.
- [86] Atta-ur-Rahman; M. I. Choudhary; Atia-tul-Wahab. In *Solving Problems with NMR Spectroscopy*; Elsevier, 2016; pp 35–98.
- [87] J. B. Lambert; S. Gronert; H. F. Shurvell; D. A. Lightner. *Spektroskopie - Strukturaufklärung in der Organischen Chemie*; Pearson Deutschland, **2012**.
- [88] G. de los Santos-Villarreal; L. E. Elizalde. *Handbook of Polymer Synthesis, Characterization, and Processing*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, **2013**.
- [89] J. Jeener. *Ampère International Summer School*; Basko Polje, Yugoslavia, **1971**.
- [90] J. Keeler; D. Neuhaus. *J. Magn. Reson.* **1985**, *63* (3), 454–472.
- [91] F. A. Bovey; P. A. Mirau. *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21* (1), 37–43.
- [92] Atta-ur-Rahman; M. I. Choudhary; Atia-tul-Wahab. In *Solving Problems with NMR Spectroscopy*; Elsevier, 2016; pp 415–429.
- [93] W. S. Price. *Modern Magnetic Resonance*; Springer Netherlands: Dordrecht, **2006**.
- [94] E. L. Hahn. *Phys. Rev.* **1950**, *77* (2), 297–298.
- [95] E. L. Hahn. *Phys. Rev.* **1950**, *80* (4), 580–594.
- [96] H. Y. Carr; E. M. Purcell. *Phys. Rev.* **1954**, *94* (3), 630–638.
- [97] F. Hinderer. *Prinzip der UV/Vis-Absorptions- und Fluoreszenz-Spektroskopie*; **2020**.
- [98] F. Caron. *Electrophoresis in practice*; **1993**; Vol. 75.

- [99] J. Koetz; S. Kosmella. *Polyelectrolytes and Nanoparticles; Springer Laboratory*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2007**.
- [100] T. F. Tadros. *Emulsions*; De Gruyter: Berlin, Boston, **2016**.
- [101] K. Makino; H. Ohshima. *Langmuir* **2010**, *26* (23), 18016–18019.
- [102] H. Ohshima. *J. Colloid Interface Sci.* **1994**, *168* (1), 269–271.
- [103] W. Schärtl. *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions; Springer Laboratory*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2007**.
- [104] R. Alexander-katz. 1st ed.; *Handbook of Polymer Synthesis, Characterization, and Processing*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, **2013**.
- [105] W. Schärtl. *Physikalische Chemie -Fortgeschrittenen Praktikum-*; Mainz, **2016**.
- [106] R. Duncan. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6* (9), 688–701.
- [107] J. H. van den Berg; K. Oosterhuis; W. E. Hennink; G. Storm; L. J. van der Aa; J. F. J. Engbersen; J. B. A. G. Haanen; J. H. Beijnen; T. N. Schumacher; B. Nuijen. *J. Control. Release* **2010**, *141* (2), 234–240.
- [108] M. E. Davis; Z. Chen; D. M. Shin. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7* (9), 771–782.
- [109] K. Rausch; A. Reuter; K. Fischer; M. Schmidt. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (11), 2836–2839.
- [110] N. Ritt; A. Ayaou; R. Zentel. *Macromol. Chem. Phys.* **2021**, *222* (16), 1–10.
- [111] J. Dommerholt; F. P. J. T. Rutjes; F. L. van Delft. *Top. Curr. Chem.* **2016**, *374* (2), 1–20.
- [112] M. F. Debets; S. S. Van Berkel; J. Dommerholt; A. J. Dirks; F. P. J. T. Rutjes; F. L. Van Delft. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (9), 805–815.
- [113] J. S. Suk; Q. Xu; N. Kim; J. Hanes; L. M. Ensign. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *99*, 28–51.
- [114] C. Hörtz; A. Birke; L. Kaps; S. Decker; E. Wächtersbach; K. Fischer; D. Schuppan; M. Barz; M. Schmidt. *Macromolecules* **2015**, *48* (7), 2074–2086.
- [115] I. Alberg; S. Kramer; M. Schinnerer; Q. Hu; C. Seidl; C. Leps; N. Drude; D. Möckel; C. Rijcken; T. Lammers; M. Diken; M. Maskos; S. Morsbach; K. Landfester; S. Tenzer; M. Barz; R. Zentel. *Small* **2020**, *16* (18).
- [116] E. Karjalainen; V. Aseyev; H. Tenhu. *Macromolecules* **2014**, *47* (6), 2103–2111.
- [117] Y. Wang; H. H. Su; Y. Yang; Y. Hu; L. Zhang; P. Blancafort; L. Huang. *Mol. Ther.* **2013**, *21* (2), 358–367.

- [118] R. Laga; R. Carlisle; M. Tangney; K. Ulbrich; L. W. Seymour. *J. Control. Release* **2012**, *161* (2), 537–553.
- [119] S. Venkataraman; W. L. Ong; Z. Y. Ong; S. C. Joachim Loo; P. L. Rachel Ee; Y. Y. Yang. *Biomaterials* **2011**, *32* (9), 2369–2378.
- [120] K. Tappertzhofen; F. Weiser; E. Montermann; A. Reske-Kunz; M. Bros; R. Zentel. *Macromol. Biosci.* **2015**, *15* (8), 1159–1173.
- [121] E. Haladjova; V. Chrysostomou; M. Petrova; I. Ugrinova; S. Pispas; S. Rangelov. *Macromol. Biosci.* **2020**, *2000352*, 1–13.
- [122] C. He; Y. Hu; L. Yin; C. Tang; C. Yin. *Biomaterials* **2010**, *31* (13), 3657–3666.
- [123] S. C. De Smedt; J. Demeester; W. E. Hennink. *Pharm. Res.* **2000**, *17* (2), 113–126.
- [124] T. G. Park; J. H. Jeong; S. W. Kim. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58* (4), 467–486.
- [125] S. Y. Wong; J. M. Pelet; D. Putnam. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32* (8–9), 799–837.
- [126] M. A. Mintzer; E. E. Simanek. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (2), 259–302.
- [127] Y. Xiang; N. N. L. Oo; J. P. Lee; Z. Li; X. J. Loh. *Drug Discov. Today* **2017**, *22* (9), 1318–1335.
- [128] Z. Zhou; X. Liu; D. Zhu; Y. Wang; Z. Zhang; X. Zhou; N. Qiu; X. Chen; Y. Shen. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *115*, 115–154.
- [129] P. L. Bedard; A. R. Hansen; M. J. Ratain; L. L. Siu. *Nature* **2013**, *501* (7467), 355–364.
- [130] T. Sun; Y. S. Zhang; B. Pang; D. C. Hyun; M. Yang; Y. Xia. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53* (46), 12320–12364.
- [131] Y. Matsumura; K. Kataoka. *Cancer Sci.* **2009**, *100* (4), 572–579.
- [132] A. Kakkar; G. Traverso; O. C. Farokhzad; R. Weissleder; R. Langer. *Nat. Publ. Gr.* **2017**, *1*, 1–18.
- [133] C. L. Grigsby; K. W. Leong. *J. R. Soc. Interface* **2010**, *7* (SUPPL. 1), 67–82.
- [134] C. Cheng; A. J. Convertine; P. S. Stayton; J. D. Bryers. *Biomaterials* **2012**, *33* (28), 6868–6876.
- [135] L. Zhang; W. Liu; L. Lin; D. Chen; M. H. Stenzel. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (11), 3321–3331.
- [136] Z. Jia; L. Wong; T. P. Davis; V. Bulmus. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (11), 3106–3113.

- [137] T. Yildirim; A. Traeger; E. Preussger; S. Stumpf; C. Fritzsche; S. Hoepfner; S. Schubert; U. S. Schubert. *Macromolecules* **2016**, *49* (10), 3856–38368.
- [138] A. Ardana; A. K. Whittaker; K. J. Thurecht. *Macromol. Res.* **2017**, *25* (6), 599–614.
- [139] P. Huang; J. Liiu; W. Wang; C. Li; J. Zhou; X. Wang; L. Deng; D. Kong; J. Liu; A. Dong. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6* (16), 14631–14643.
- [140] F. Meng; W. E. Hennink; Z. Zhong. *Biomaterials* **2009**, *30* (12), 2180–2198.
- [141] S. Agarwal; Y. Zhang; S. Maji; A. Greiner. *Mater. Today* **2012**, *15* (9), 388–393.
- [142] R. J. Christie; N. Nishiyama; K. Kataoka. *Endocrinology* **2010**, *151* (2), 466–473.
- [143] T. Hyeon; V. Rotello. **2012**, No. 7.
- [144] D. Fischer; Y. Li; B. Ahlemeyer; J. Krieglstein; T. Kissel. **2003**, *24*, 1121–1131.
- [145] O. Samsonova; C. Pfeiffer; M. Hellmund; O. M. Merkel; T. Kissel. *Polymers (Basel)*. **2011**, *3* (2), 693–718.
- [146] J. Li; J. Zhao; J. Gao; J. Liang; W. Wu; L. Liang. *New J. Chem.* **2016**, *40* (8), 7222–7228.
- [147] X. Zheng; T. Zhang; X. Song; L. Zhang; C. Zhang; S. Jin; J. Xing; X. J. Liang. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (19), 4027–4035.
- [148] M. Ahmed; R. Narain. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38* (5), 767–790.
- [149] W. T. Godbey; K. K. Wu; A. G. Mikos. *J. Control. Release* **1999**, *60* (2–3), 149–160.
- [150] R. Hoogenboom. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48* (43), 7978–7994.
- [151] K. Kunath; A. von Harpe; H. Petersen; D. Fischer; K. Voigt; T. Kissel; U. Bickel. *Pharm. Res.* **2002**, *19* (6), 810–817.
- [152] E. Haladjova; M. Smolíček; I. Ugrinova; D. Momekova; P. Shestakova; Z. Kroneková; J. Kronek; S. Rangelov. *J. Appl. Polym. Sci.* **2020**, *137* (45).
- [153] W. Zhang; K. Müller; E. Kessel; S. Reinhard; D. He; P. M. Klein; M. Höhn; W. Rödl; S. Kempter; E. Wagner. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5* (12), 1493–1504.
- [154] I. Martin; C. Dohmen; C. Mas-Moruno; C. Troiber; P. Kos; D. Schaffert; U. Lächelt; M. Teixidó; M. Günther; H. Kessler; E. Giralt; E. Wagner. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (16), 3258–3268.
- [155] Q. Chen; K. Osada; Z. Ge; S. Uchida; T. A. Tockary; A. Dirisala; A. Matsui; K. Toh; K. M. Takeda; X. Liu; T. Nomoto; T. Ishii; M. Oba; Y. Matsumoto; K. Kataoka. *Biomaterials* **2017**, *113*, 253–265.

- [156] P. Heller; A. Birke; D. Huesmann; B. Weber; K. Fischer; A. Reske-Kunz; M. Bros; M. Barz. *Macromol. Biosci.* **2014**, *14* (10), 1380–1395.
- [157] Y. Cheng; R. C. Yumul; S. H. Pun. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *55* (39), 12013–12017.
- [158] P. Heller; J. Zhou; B. Weber; D. Hobernik; M. Bros; F. Schmid; M. Barz. *Small* **2017**, *13* (17), 1–9.
- [159] L. Nuhn; L. Kaps; M. Diken; D. Schuppan; R. Zentel. *Macromol. Rapid Commun.* **2016**, *37* (11), 924–933.
- [160] L. Kaps; N. Leber; A. Klefenz; N. Choteschovsky; R. Zentel; L. Nuhn; D. Schuppan. *Cells* **2020**, *9* (8).
- [161] N. Ritt; S. Berger; E. Wagner; R. Zentel. *ACS Appl. Polym. Mater.* **2020**, *2* (12), 5469–5481.
- [162] P. Heller; D. Hobernik; U. Lächelt; M. Schinnerer; B. Weber; M. Schmidt; E. Wagner; M. Bros; M. Barz. *J. Control. Release* **2017**, *258* (May), 146–160.
- [163] T. Yildirim; A. Traeger; E. Preussger; S. Stumpf; C. Fritzsche; S. Hoepfener; S. Schubert; U. S. Schubert. *Macromolecules* **2016**, *49* (10), 3856–38368.
- [164] L. Sun; J. Liu; H. Zhao. *Polym. Chem.* **2014**, *5* (22), 6584–6592.
- [165] S. Kramer; J. Langhanki; M. Krumb; T. Opatz; M. Bros; R. Zentel. *Macromol. Biosci.* **2019**, *19* (6), 1–10.
- [166] L. Wong; C. Boyer; Z. Jia; H. M. Zareie; T. P. Davis; V. Bulmus. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (7), 1934–1944.
- [167] K. Shanmugananda Murthy; K. Ganesh; K. Kishore. *Polymer (Guildf)*. **1996**, *37* (24), 5541–5543.
- [168] Promega. pGL3 Luciferase Reporter Vectors Protocol
<https://www.promega.es/products/luciferase-assays/genetic-reporter-vectors-and-cell-lines/pgl3-luciferase-reporter-vectors/?catNum=E1751#resources>. (Zugriff: März 2021)
- [169] R. A. Hartvig; M. Van De Weert; J. Østergaard; L. Jorgensen; H. Jensen. *Langmuir* **2011**, *27* (6), 2634–2643.
- [170] S. D. Li; L. Huang. *Mol. Pharm.* **2008**, *5* (4), 496–504.
- [171] M. J. Ernsting; M. Murakami; A. Roy; S. D. Li. *J. Control. Release* **2013**, *172* (3), 782–794.
- [172] M. C. Smith; R. M. Crist; J. D. Clogston; S. E. McNeil. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409* (24), 5779–5787.

- [173] R. Zentel. *Nanomedicine (Lond)*. **2016**, *11* (20), 2619–2620.
- [174] U. Sahin; K. Karikó; Ö. Türeci. *Nat. Rev. Drug Discov*. **2014**, *13* (10), 759–780.
- [175] U. Sahin; Ö. Türeci. *Science (80-.)*. **2018**, *359* (6382), 1355–1360.
- [176] J. O. Kim; G. Sahay; A. V. Kabanov; T. K. Bronich. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (4), 919–926.
- [177] S. Matsumoto; R. J. Christie; N. Nishiyama; K. Miyata; A. Ishii; M. Oba; H. Koyama; Y. Yamasaki; K. Kataoka. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (1), 119–127.
- [178] R. Holm; D. Schwiertz; B. Weber; J. Schultze; J. Kuhn; K. Koynov; U. Lächelt; M. Barz. *Macromol. Biosci*. **2020**, *20* (1), 1–17.
- [179] L. Lauber; J. Santarelli; O. Boyron; C. Chassenieux; O. Colombani; T. Nicolai. *Macromolecules* **2017**, *50* (1), 416–423.
- [180] A. K. McClellan; T. Hao; T. A. Brooks; A. E. Smith. *Macromol. Biosci*. **2017**, *17* (12), 1–9.
- [181] Q. Zhang; P. Schattling; P. Theato; R. Hoogenboom. *Polym. Chem*. **2012**, *3* (6), 1418–1426.
- [182] L. Nuhn; M. Barz; R. Zentel. *Macromol. Biosci*. **2014**, *14* (5), 607–618.
- [183] M. Barz; R. Luxenhofer; R. Zentel; A. V. Kabanov. *Biomaterials* **2009**, *30* (29), 5682–5690.
- [184] N. Mohr; M. Barz; R. Forst; R. Zentel. *Macromol. Rapid Commun*. **2014**, *35* (17), 1522–1527.
- [185] L. Nuhn; L. Braun; I. Overhoff; A. Kelsch; D. Schaeffel; K. Koynov; R. Zentel. *Macromol. Rapid Commun*. **2014**, *35* (24), 2057–2064.
- [186] D. Schaffert; C. Troiber; E. Wagner. *Bioconjug. Chem*. **2012**, *23* (6), 1157–1165.
- [187] T. Fröhlich; D. Edinger; R. Kläger; C. Troiber; E. Salcher; N. Badgular; I. Martin; D. Schaffert; A. Cengizeroglu; P. Hadwiger; H. P. Vornlocher; E. Wagner. *J. Control. Release* **2012**, *160* (3), 532–541.
- [188] J. Chen; C. Wu; D. Oupický. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (10), 2921–2927.
- [189] X. B. Xiong; H. Uludağ; A. Lavasanifar. *Biomaterials* **2009**, *30* (2), 242–253.
- [190] A. K. Varkouhi; M. Scholte; G. Storm; H. J. Haisma. *J. Control. Release* **2011**, *151* (3), 220–228.
- [191] H. K. Shete; R. H. Prabhu; V. B. Patravale. *J. Nanosci. Nanotechnol*. **2014**, *14* (1), 460–474.
- [192] K. Miyata; M. Oba; M. R. Kano; S. Fukushima; Y. Vachutinsky; M. Han; H. Koyama; K. Miyazono; N. Nishiyama; K. Kataoka. *Pharm. Res*. **2008**, *25* (12), 2924–2936.

- [193] J. Li; Q. Chen; Z. Zha; H. Li; K. Toh; A. Dirisala; Y. Matsumoto; K. Osada; K. Kataoka; Z. Ge. *J. Control. Release* **2015**, *209*, 77–87.
- [194] M. Ruponen; S. Rönkkö; P. Honkakoski; J. Pelkonen; M. Tammi; A. Urtti. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (36), 33875–33880.
- [195] H. ENGELBERG. *Circulation* **1961**, *23* (4), 573–577.
- [196] P. M. Klein; K. Müller; C. Gutmann; P. Kos; A. Krhac Levacic; D. Edinger; M. Höhn; J. C. Leroux; M. A. Gauthier; E. Wagner. *J. Control. Release* **2015**, *205*, 109–119.
- [197] S. Hager; E. Wagner. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2018**, *15* (11), 1067–1083.
- [198] N. Leber; L. Kaps; M. Aslam; J. Schupp; A. Brose; D. Schäffel; K. Fischer; M. Diken; D. Strand; K. Koynov; A. Tuettenberg; L. Nuhn; R. Zentel; D. Schuppan. *J. Control. Release* **2017**, *248*, 10–23.
- [199] K. Mohr; M. Sommer; G. Baier; S. Schöttler; P. Okwieka; S. Tenzer; K. Landfester; V. Mailänder; M. Schmidt; R. G. Meyer. *J. Nanomedicine Nanotechnol.* **2014**, *5* (2).

9.2 Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1.1: Konzept der Polymer- und Polyplexsynthese der Dissertation. | 2 |
| Abbildung 2.1: Schema notwendiger Eigenschaften für polymerbasierte Wirkstofftransportsysteme.... | 5 |
| Abbildung 2.2: Architekturen unverzweigter Polymerketten..... | 9 |
| Abbildung 2.3: Verschiedene nanodimensionale Systeme für den Wirkstofftransport. | 10 |
| Abbildung 2.4: Mechanismus der RAFT-Polymerisation..... | 15 |
| Abbildung 2.5: Spin-Ausrichtung im magnetischen Feld. | 17 |
| Abbildung 2.6: FID Signal und resultierendes ¹ H-NMR-Spektrogramm. | 18 |
| Abbildung 2.7: Experimenteller Verlauf einer DOSY-Messung..... | 20 |
| Abbildung 2.8: Beispiel eines DOSY-NMR Spektrums. | 21 |
| Abbildung 2.9: Schematischer Aufbau eines UV/Vis-Spektrometers | 22 |
| Abbildung 2.10: Schematischer Aufbau einer SEC-Apparatur | 23 |
| Abbildung 2.11: Apparativer Aufbau der Agarose-Gelelektrophorese..... | 25 |
| Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der Ionenhülle um geladene Partikel. | 26 |
| Abbildung 2.13: Induktion eines oszillierenden Dipols durch eintreffendes Licht. | 28 |
| Abbildung 2.14: Mögliche Interferenzmuster der Lichtstreuung. | 28 |
| Abbildung 2.15: Prinzip der dynamischen Lichtstreuung..... | 29 |
| Abbildung 2.16: Autokorrelationskurven von PLL-g-PEO Nanopartikeln in humanem Serum..... | 32 |
| Abbildung 3.1: Reaktionsschema zur Synthese der Azid-PEG ₅ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> - p(DMAEMA) Triblock-Copolymere..... | 39 |
| Abbildung 3.2: Reaktionsschema der Synthese des Azid-PEG ₆ -CTA..... | 40 |
| Abbildung 3.3: Charakterisierung des Azid-PEG ₆ -CTAs. | 41 |
| Abbildung 3.4: Reaktionsschema zur Synthese von PDSM..... | 42 |
| Abbildung 3.5: ¹ H-NMR von PDSM mit Zuordnung der Protonensignale..... | 42 |
| Abbildung 3.6: RAFT-Polymerisation von MEO ₃ MA mittels Azid-CTA und AMDVN..... | 43 |
| Abbildung 3.7: Umsatz-NMR der Synthese von P1-3..... | 44 |
| Abbildung 3.8: Charakterisierung der Azid-PEG ₆ -p(MEO ₃ MA) Polymere..... | 45 |
| Abbildung 3.9: RAFT-Polymerisation von PDSM mittels Azid-p(MEO ₃ MA) Makro-CTA und AMDVN. | 47 |
| Abbildung 3.10: Umsatz-NMR der Synthese von P2-3..... | 48 |
| Abbildung 3.11: Charakterisierung der Azid-PEG ₆ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM) Diblock-Copolymere. | 49 |
| Abbildung 3.12: RAFT-Polymerisation von DMAEMA mittels Azid-p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM) Makro-CTA und AMDVN..... | 51 |
| Abbildung 3.13: Umsatz-NMR der Synthese von P3-3..... | 52 |
| Abbildung 3.14: Charakterisierung der Azid-PEG ₆ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(DMAEMA) Triblock-Copolymere. | 53 |
| Abbildung 3.15: Deaktivierung der reaktiven CTA-Endgruppe mittels AMDVN..... | 56 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 3.16: UV/Vis-Spektroskopische Reaktionskontrolle der Deaktivierung der reaktiven Benzothioatgruppe..... | 56 |
| Abbildung 3.17: Charakterisierung der Azid-PEG ₆ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(DMAEMA) Triblock-Copolymere nach der Deaktivierung der reaktiven Benzothioatgruppe..... | 57 |
| Abbildung 3.18: pDNA-Retentionsassay verschiedener Polyplexe des Polymers P4-1 und pGL3-BASIC pDNA. | 61 |
| Abbildung 3.19: Modifikationstest der PDSM-Seitengruppen: UV/Vis-Spektrum..... | 62 |
| Abbildung 3.20: Allgemeines Reaktionsschema einer <i>strain promoted azide-alkyne cycloaddition</i> | 63 |
| Abbildung 3.21: Modifikation des Azid-PEG ₆ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(DMAEMA) Triblock-Copolymers mit IR dye CW800®..... | 64 |
| Abbildung 3.22: Modifikation von P4-1 pDNA Polyplexen mit IR dye CW800®..... | 65 |
| Abbildung 3.23: ¹ H-NMR-Spektrum des Azid-PEG ₆ -CTAs. | 70 |
| Abbildung 3.24: ¹ H-NMR-Spektrum von HPDS..... | 70 |
| Abbildung 3.25: ¹ H-NMR-Spektrum von PDSM..... | 71 |
| Abbildung 3.26: ¹ H-NMR von P1-3. | 71 |
| Abbildung 3.27: ¹ H-NMR von P2-3. | 72 |
| Abbildung 3.28: ¹ H-NMR von P3-4. | 72 |
| Abbildung 3.29: ¹ H-NMR von P4-4. | 73 |
| Abbildung 3.30: Vektorkarte von pGL3-Basic. | 73 |
| Abbildung 3.31: Ergebnisse der DLS-Untersuchung verschiedener Azid-PEG ₆ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(DMAEMA) Polyplexe. | 74 |
| Abbildung 4.1: Synthese des Azid-PEG ₃ -CTAs..... | 81 |
| Abbildung 4.2: Charakterisierung des synthetisierten Azid-PEG ₃ -CTAs..... | 81 |
| Abbildung 4.3: Synthese von Methacrylsäure-2-(2-pyridyldisulfid)ethylester (PDSM). | 82 |
| Abbildung 4.4: ¹ H-NMR von PDSM mit zugeordneten Signalen. | 82 |
| Abbildung 4.5: Synthese von Methacrylsäure Pentafluorophenylester (PFPPMA). | 83 |
| Abbildung 4.6: Charakterisierung von PFPPMA. | 83 |
| Abbildung 4.7: Syntheschema der Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(PFPMA) Triblock-Copolymere..... | 84 |
| Abbildung 4.8: RAFT-Polymerisation von Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA). | 84 |
| Abbildung 4.9: Umsatz-NMR von P1-1. | 85 |
| Abbildung 4.10: Charakterisierung der Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA) Polymere..... | 86 |
| Abbildung 4.11: RAFT-Polymerisation von Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM). | 88 |
| Abbildung 4.12: Umsatz-NMR von Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM) (P2-1). | 88 |
| Abbildung 4.13: Charakterisierung der Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM) Diblock-Copolymere. | 89 |
| Abbildung 4.14: RAFT-Polymerisation von Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(PFPMA)..... | 92 |
| Abbildung 4.15: ¹⁹ F-NMR zur Bestimmung des PFPPMA-Umsatzes..... | 92 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 4.16: Charakterisierung der Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(PFPMA) Triblock-Copolymere. | 93 |
| Abbildung 4.17: Vergleich der DOSY-NMRs eines Di- und Triblock-Copolymers..... | 94 |
| Abbildung 4.18: Deaktivierung der reaktiven RAFT-Endgruppe mittels AMDVN..... | 97 |
| Abbildung 4.19: UV/Vis-Spektrogramm der 1,4-Dioxan haltigen Polymerlösungen. | 98 |
| Abbildung 4.20: Charakterisierung der Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(PFPMA) Triblock-Copolymere nach der Deaktivierung der reaktiven Benzothioat-Endgruppe. | 99 |
| Abbildung 4.21: Amidierungsreaktion der PFPMA-Seitengruppen mit DMEDA..... | 102 |
| Abbildung 4.22: ¹⁹ F-NMR zur Kontrolle des Umsatzes der PFPMA-Seitenketten..... | 102 |
| Abbildung 4.23: Charakterisierung der synthetisierten Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> - p(DMEDAMA) Triblock-Copolymere. | 103 |
| Abbildung 4.24: Durch Amidierung der PFPMA-Gruppen synthetisierte kationische Triblock- Copolymere..... | 106 |
| Abbildung 4.25: Charakterisierung der Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(DMEDAMA- <i>stat</i> -DMA) Triblock-Copolymere..... | 108 |
| Abbildung 4.26: Charakterisierung der synthetisierten Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> - p(DMDPTAMA) Triblock-Copolymere..... | 112 |
| Abbildung 4.27: ¹ H-NMR des Azid-PEG ₃ -CTA. | 116 |
| Abbildung 4.28: ¹ H-NMR von PFPMA..... | 116 |
| Abbildung 4.29: ¹⁹ F-NMR von PFPMA. | 117 |
| Abbildung 4.30: ¹ H-NMR von Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA) (P1-1). | 117 |
| Abbildung 4.31: ¹ H-NMR von Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM) (P2-1)..... | 118 |
| Abbildung 4.32: ¹ H-NMR von Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(PFPMA) (P3-2). | 118 |
| Abbildung 4.33: ¹⁹ F-NMR von Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(PFPMA) (P3-2)..... | 119 |
| Abbildung 4.34: ¹ H-NMR von Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(PFPMA) nach der Deaktivierung der CTA-Endgruppe (P4-2)..... | 119 |
| Abbildung 4.35: ¹⁹ F-NMR von Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(PFPMA) nach der Deaktivierung der CTA-Endgruppe (P4-2)..... | 120 |
| Abbildung 4.36: ¹ H-NMR von Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(DMEDAMA) nach erfolgreicher Substitution der PFPMA-Seitengruppen (P5-2). | 120 |
| Abbildung 4.37: Überlagerung der ¹⁹ F-Umsatz-NMRs der Synthese von Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(DMEDAMA- <i>stat</i> -DMA) (P6-3). | 121 |
| Abbildung 4.38: Überlagerung der ¹⁹ F-NMRs des Edukt (P5-x) und der Reaktionslösung von Azid- PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(DMDPTAMA) (P6-3) nach der Amidierungsreaktion. | 121 |
| Abbildung 4.39: ¹ H-NMR von Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(DMEDAMA- <i>stat</i> -DMA) (P4-2). | 122 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 4.40: Überlagerung der ^{19}F -NMRs des Edukts P5-1 und der Reaktionslösung von Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(DMDPTAMA) (P7-1) nach vollständigem Umsatz. | 122 |
| Abbildung 4.41: ^1H -NMR von Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(DMDPTAMA) (P7-1).... | 123 |
| Abbildung 5.1: Konzeptionelles Schema der Darstellung von unvernetzten und vernetzten Polyplexen der Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(DMEDAMA) Triblock-Copolymeren. | 128 |
| Abbildung 5.2: DNA-Retentionsassays der Polyplexe von pGL3-Basic und Polymer P5-1. | 128 |
| Abbildung 5.3: Ermittlung der Vernetzungseffizienz der PDSM-Seitengruppen. | 135 |
| Abbildung 5.4: Polyplex-Stabilitätsuntersuchung mittels Dynamischer Lichtstreuung. | 136 |
| Abbildung 5.5: Beispiel der DLS-Messungen in Citrat-Serum. | 137 |
| Abbildung 5.6: Heparin-Challenge der Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(DMEDAMA) Polyplexe. | 138 |
| Abbildung 5.7: MTT-Assay der Polyplexe der Polymerreihe P5. | 140 |
| Abbildung 5.8: Versuche zum Luciferase Gen-Transfer. | 141 |
| Abbildung 5.9: Untersuchung transfizierter Huh7-Zellen mittels FACS. | 142 |

9.3 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 3.1: Charakterisierung der p(MEO ₃ MA) Homopolymere | 46 |
| Tabelle 3.2: Charakterisierung der Azid-PEG ₆ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM) Diblock-Copolymere. | 51 |
| Tabelle 3.3: Charakterisierung der p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(DMAEMA) Triblock-Copolymere..... | 55 |
| Tabelle 3.4: Charakterisierung der Azid-PEG ₆ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(DMAEMA) Triblock-Copolymere nach der Deaktivierung der reaktiven RAFT-Endgruppe..... | 59 |
| Tabelle 3.5: Größenbestimmung der Polyplexe mittels dynamischer Lichtstreuung. | 66 |
| Tabelle 3.6: Bestimmung der Oberflächenladung der Polyplexe durch Messung des ζ-Potentials..... | 67 |
| Tabelle 4.1: Synthetisierte Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA) Polymere..... | 87 |
| Tabelle 4.2: Synthetisierte Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM) Diblock-Copolymere. | 91 |
| Tabelle 4.3: Synthetisierte Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(PFPMA) Triblock-Copolymere..... | 96 |
| Tabelle 4.4: Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(PFPMA) Triblock-Copolymere nach Deaktivierung der CTA-Endgruppe. | 100 |
| Tabelle 4.5: Synthetisierte Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(DMEDAMA) Triblock-Copolymere..... | 105 |
| Tabelle 4.6: Messdaten zur Charakterisierung der Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(DMEDAMA- <i>stat</i> -DMA) Triblock-Copolymere..... | 110 |
| Tabelle 4.7: Synthetisierte Azid-PEG ₃ -p(MEO ₃ MA)- <i>b</i> -p(PDSM)- <i>b</i> -p(DMDPTAMA) Triblock-Copolymere..... | 113 |
| Tabelle 5.1: Ergebnisse der DLS-Messungen und der Bestimmung des Zeta-Potentials unvernetzter und vernetzter Polyplexe der Polymerreihe P5, angesetzt in PBS-Puffer..... | 131 |
| Tabelle 5.2: Ergebnisse der DLS-Messungen und der Bestimmung des Zeta-Potentials unvernetzter und vernetzter Polyplexe der Polymerreihe P5, angesetzt in 10 mM NaCl-Lösung. | 133 |

Danksagung

(Zur Wahrung der Privatsphäre des Autors und der hier erwähnten Personen, wurde dieser Teil der Dissertation aus dieser Version des Schriftstücks entfernt.)

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „*Über die kontrollierte, radikalische Synthese reaktiver Triblock-Copolymere zur Bildung von Polyplexen mit Plasmid-DNA*“ selbstständig, ohne Zuhilfenahme unzulässiger Externer Hilfe verfasst habe und nur die in der vorliegenden Arbeit benannten Hilfsmittel und Referenzen verwendet habe. Alle Textpassagen, welche wörtlich oder sinngemäß aus anderen publizierten oder nicht publizierten Texten übernommen wurden, wurden unter der Einhaltung der allgemein anerkannten Regeln zur Zitation wissenschaftlicher Referenzen indiziert und in Reihenfolge ihrer Benennung aufgelistet.

Oppenheim, März 2022

Nicolas Ritt

