

Synthese und Charakterisierung von polymerbasierten Trägersystemen für biomedizinische Anwendungen

Dissertation

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

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

vorgelegt von

Sonja Alena Abé

geboren in Mainz

Mainz, 2014

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2011 bis September 2014 am Institut für Physikalische Chemie unter der Betreuung von [REDACTED] [REDACTED] angefertigt.

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

Mainz, 25.09.2014

*Versuche nicht zu bewirken,
dass die Ergebnisse so eintreten,
wie du willst,
sondern wolle sie so, wie sie eintreten.*

Epiktet

Zusammenfassung

Polymer-Therapeutika spielen im Bereich der Arzneimittelforschung eine immer größere Rolle. Benötigt werden dafür Trägersysteme für die gewünschten Wirkstoffe. Durch den Einsatz von wasserlöslichen biokompatiblen Polymeren werden mehrere entscheidende Vorteile erhalten. Beispielsweise verlängert sich durch die höhere Molmasse die Zirkulationszeit im Blutkreislauf. Zudem ermöglicht die Anbindung von Targetmolekülen den gezielten Wirkstofftransport zum Zielort.

Die vorliegende Arbeit behandelt die Synthese und Charakterisierung von polymer-basierten Trägersystemen für biomedizinische Anwendungen.

Als erstes Teilprojekt wurde die Synthese einer Polymerbürste gewählt, deren Seitenketten aus Polymer-Oligonucleotid (ODN)-Konjugaten bestehen. Als Polymer wurde Poly(*N*-Isopropylacrylamid) gewählt, welches per RAFT-Polymerisation synthetisiert wurde. Die Bürste sollte mittels „Grafting Through“-Technik hergestellt werden. Dafür wurden zuerst das Polymer-Oligonucleotid-Konjugat und daraus anschließend das entsprechende Makromonomer gebildet. Die Synthese und Charakterisierung des Konjugats sowie des Makromonomers wurden erfolgreich durchgeführt, jedoch war die Aufreinigung des Makromonomers nicht möglich.

Im zweiten Teilprojekt war das Ziel Polyion-Komplex-Mizellen als Trägersysteme herzustellen. Benötigt wurden dazu ein Polymer bestehend aus einem kationischen und einem biokompatiblen Block sowie eine ODN-Sequenz zur Komplexbildung des kationischen Blocks. Im ersten Ansatz wurde als Polymerisationsmethode die RAFT-Polymerisation und Mono-*N*-*boc*-1,3-diaminopropanmethylmethacrylat als kationisches Monomer sowie α - bzw. ϵ -Lysinmethylmethacrylat als zwitterionisches Monomer verwendet. Jedoch war die Herstellung der Blockcopolymere nicht möglich. Im zweiten Ansatz wurde deshalb Poly-2-oxazolin als biokompatibler Block gewählt. Mit Poly-L-lysin als kationischen Block und CpG war eine Bildung und Charakterisierung von Polyion-Komplex-Mizellen in 15mM PBS-Puffer möglich.

Im dritten Teilprojekt wurden biomedizinisch relevante Verbindungen mittels kupferfreier Clickchemie an eine ELP-Bürste gebunden und charakterisiert.

Summary

Polymer therapeutics have become a topic of great interest in gene and drug delivery research. Therefore carriers for the desired agents are necessary.

The use of water soluble biocompatible polymers obtains several significant advantages. For example, the circulation time is increased by higher molecular weight.

In addition, the conjugation of target molecules enables specific drug delivery to the destination.

The present work deals with the synthesis and characterization of polymer-based carriers for biomedical applications.

As a first project, the synthesis of a polymer brush with polymer oligonucleotide side chains was selected. Poly(*N*-isopropylacrylamide) was chosen which was polymerized by RAFT-polymerization. The polymer brush should be prepared by “grafting through” technique. Therefore the polymer-oligonucleotide-conjugate and hence the corresponding macromonomer were synthesized. The synthesis and characterization of the conjugate and the macromonomer were successful. But the purification of the macromonomer was not possible.

The aim of the second part of the project was the synthesis of polyion-complex-micelles. Here polymers consisting of cationic and biocompatible blocks as well as ODN-sequences for complexation of the cationic block are necessary.

In the first approach mono-*N*-*boc*-1,3-diaminopropanemethylmethacrylate as cationic and α - or ϵ -lysinemethylmethacrylate as zwitterionic monomer and the RAFT-polymerization as method were used. But the preparation of blockcopolymers was not possible.

In the second approach poly-2-oxazoline was chosen as biocompatible polymer. With poly-*L*-lysine as cationic block and CpG the formation and characterization of polyion-complex-micelles in 15mM PBS-buffer was possible.

In the third project biomedical relevant compounds were bound through copper free click chemistry to an ELP-brush and characterized.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zielsetzung	3
1.2	Literaturverzeichnis Kapitel 1	5
2	Theoretische Grundlagen.....	7
2.1	Polymer-Wirkstoff-Therapeutika	8
2.2	Oligonucleotid (ODN)-Polymer-Konjugate	11
2.2.1	Oligonucleotid-Synthese	12
2.2.2	Konjugationsmethoden von Oligonucleotiden und Polymeren	14
2.3	Zwitterionische Polymere	16
2.4	Polyoxazoline	18
2.5	RAFT-Polymerisation	22
2.6	Literaturverzeichnis Kapitel 2	25
3	Charakterisierungsmethoden	29
3.1	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	29
3.2	Gelpermeationschromatografie.....	31
3.3	NMR-Spektroskopie	33
3.4	IR-Spektroskopie	35
3.5	Elektrophorese	37
3.5.1	Kapillarelektrophorese	39
3.5.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
3.6	Lichtstreuung.....	44
3.6.1	Statische Lichtstreuung.....	44
3.6.2	Dynamische Lichtstreuung.....	47
3.6.3	Aufbau der Lichtstreuanlage	49
3.7	Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie.....	50
3.8	Literaturverzeichnis Kapitel 3	53
4	Diskussion und Ergebnisse.....	55
4.1	Polymer-ODN-Konjugat-Bürste	55
4.1.1	Synthese des α -, ω -aminofunktionalisierten Polymers.....	58
4.1.2	Synthese des Polymer-ODN-Konjugats	64
4.1.3	Synthese des Polymer-ODN-Makromonomers	69

4.1.4	Zusammenfassung von Kapitel Polymer-ODN-Konjugat-Bürste	75
4.2	Polyion-Komplex-Mizellen (PIC) mit zwitterionischer Schale und kationischem Kern.....	76
4.2.5	Vorversuche zur Bildung von Polyion-Komplexen durch Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) und Poly-L-Lysin bei der Zugabe von Polyacrylsäure	78
4.2.6	Synthese der benötigten Monomere	80
4.2.7	Synthese der benötigten Polymere	82
4.2.8	Zusammenfassung von Kapitel Polyion-Komplex-Mizellen (PIC) mit zwitterionischer Schale und kationischem Kern	94
4.3	Polyion-Komplex-Mizellen (PIC) mit Poly(oxazolin)-Schale.....	95
4.3.9	Synthese des benötigten Blockcopolymers	96
4.3.10	Komplexierung von Poly(iPrOx+EtOx)-b-(Lys) mit siRNA.....	102
4.3.11	Komplexierung von Poly(iPrOx+EtOx)-b-(Lys) mit siRNA bei pH = 11,5	104
4.3.12	Polyoxazolin mit Spermin-Endfunktionalisierung	107
4.3.13	Zusammenfassung von Kapitel Polyion-Komplex-Mizellen (PIC) mit Poly(oxazolin)-Schale	116
4.4	Biofunktionalisierung einer ELP-Bürste	117
4.4.14	Konjugation von Farbstoff	117
4.4.15	Konjugation von Antikörper	119
4.4.16	Konjugation von CpG	120
4.4.17	Reduktion der Azidgruppen zu Amingruppen mit TCEP	121
4.4.18	Zusammenfassung von Kapitel Biofunktionalisierung einer ELP-Bürste... ..	122
4.5	Literaturverzeichnis Kapitel 4	123
5	Zusammenfassung.....	125
6	Experimentaltel.....	129
6.1	Informationen zu verwendeten Chemikalien und Materialien	129
6.2	Standardmäßige Mess- und Analysemethoden.....	131
6.3	Synthesevorschriften	135
6.4	Literaturverzeichnis Kapitel 6	150
7	Anhang.....	152

1 Einleitung

Das primäre Ziel in der modernen Arzneimittelentwicklung ist die Steigerung des therapeutischen Indexes von Wirkstoffen. Der therapeutische Index eines Wirkstoffes gibt das Verhältnis zwischen der letalen Dosis eines Medikaments und der wirksamen Dosierung an^[1].

Erreicht werden kann eine Verbesserung durch höhere Wirksamkeit der Medikamente bei gleichzeitiger Verringerung der Nebenwirkungen^[2].

In der klinischen Anwendung werden meistens Pharmazeutika mit geringer Molmasse (kleiner als $500 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) eingesetzt. Dadurch besitzen die Wirkstoffe eine kurze Halbwertszeit im Blutkreislauf und diffundieren zudem sowohl in gesunde als auch in kranke Zellen. Damit verteilt sich der Wirkstoff gleichmäßig auf den gesamten Körper und nur wenige Wirkstoffmoleküle erreichen den gewünschten Zielort. Dies ist besonders bei Medikamenten mit niedrigem therapeutischem Index problematisch^[1].

Eine Verbesserung kann durch den Einsatz von makromolekularen Trägersystemen erreicht werden. Dies können entweder partikuläre Trägersysteme oder Polymer-Wirkstoffkonjugate sein^[1].

Natürliche Polymere werden bereits seit Jahrtausenden in Form von pflanzlichen Heilmitteln eingenommen^[3]. Synthetische Polymere als Bestandteil von Therapeutika wurden jedoch erstmals in den 1940er Jahren als Wundauflage oder während des zweiten Weltkrieges als Plasmaexpander – wie beispielsweise Pervilon – eingesetzt^[4].

Die ersten synthetischen polymerbasierenden Wirkstoffe wurden in den 1960er Jahren entwickelt. Ein Beispiel hierfür ist das Krebsmittel Divinylether-Maleimidanhydrid-Copolymer, welches sich aber in klinischen Tests als toxisch herausgestellt hat^[3].

Ringsdorf^[5] synthetisierte als Erster in den 1970er Jahren ein Polymer-Wirkstoff-Konjugat. Zeitgleich entwickelte Davis^[6] das erste PEG-Protein-Konjugat, wodurch das Interesse an Polymer-Therapeutika stark gesteigert wurde.

In der klinischen Routine wurden die ersten Polymer-Therapeutika wie beispielsweise Adagen[®] in den 1990er Jahren eingesetzt^[7].

Seit dem expandiert der Markt für polymerbasierende Arzneimittel und die Forschung wird weiter vorangetrieben, denn jedes Polymer-Therapeutikum muss speziell für seine jeweilige Anwendung entwickelt werden^[7].

In den letzten 20 Jahren sind mehr als 40 Arzneimittel beruhend auf Polymer-Therapeutika für die humane Anwendung zugelassen worden und weitere sind bereits in klinischen Studien^{[8] [9]}.

Mittlerweile gibt es verschiedene Systeme zur Bildung von Polymer-Therapeutika, wobei besonders auf die definierte chemische Zusammensetzung und Größe sowie auf die Multifunktionalität Wert gelegt wird^[2].

1.1 Zielsetzung

Ziel dieser Dissertation ist die Synthese und Charakterisierung von Trägermaterialien für die biomedizinische Anwendung.

Zum einen wird ein System mit bürstenartiger Polymerstruktur gewählt, zum anderen sollen Polyion-Komplex-Mizellen hergestellt werden.

Als erstes System soll eine Polymerbürste unter Verwendung des „grafting through“-Ansatzes mit Seitenketten bestehend aus Polymer-Oligonucleotid(ODN)-Konjugaten hergestellt werden, wobei die ODN-Sequenz den äußeren Block bildet.

Dafür wird ein Diblock bestehend aus Polymer und einer ODN-Sequenz benötigt, welcher durch Umsetzung mit Methylmethacryl-*N*-hydroxysuccinimidester zum Makromonomer umgesetzt werden kann. Durch die radikalische Polymerisation des Makromonomers soll eine Polymerbürste mit Polymer-ODN-Konjugat-Seitenketten erhalten werden.

Die Bürste kann anschließend mit einem komplementären, funktionalisierten ODN-Strang hybridisiert werden.

Ziel des zweiten Projekts ist die Herstellung von Polyion-Komplex-Mizellen, die eine Azidfunktionalisierung zur kupferfreien Clickchemie tragen. Damit besitzen diese die Möglichkeit zur weiteren biomedizinisch relevanten Funktionalisierung mit beispielsweise Farbstoff, Antikörper und Antigen.

Zur Bildung der Polyion-Komplex-Mizellen wird ein Blockcopolymer benötigt, welches einen kationischen Block trägt. Dieser kann mit Nucleinsäuren – wie siRNA oder CpG – komplexieren und so den Kern der Polyion-Komplex-Mizelle bilden. Der zweite Polymerblock bildet die Schale der Polyion-Komplex-Mizelle und soll keine Aggregation in humanem Blutserum zeigen.

Einerseits kann als zweiter Polymerblock ein zwitterionisches Polymer eingesetzt werden. Dafür muss ein α - bzw. ϵ -Lysinmethylmethacrylat hergestellt und mittels RAFT-Polymerisation polymerisiert werden. Der kationische Block soll aus Mono-*N*-*boc*-1,3-diaminopropanmethylmethacrylat hergestellt werden.

Andererseits kann Polyoxazolin verwendet werden. Dieses wird durch kationische ringöffnende Polymerisation mit einem azidfunktionalisierten Initiator hergestellt und

durch ringöffnende NCA-Polymerisation von Lysin-TFA-NCA soll anschließend der kationische Block gebildet werden.

Charakterisiert werden sollen die synthetisierten Monomere und Polymere mittels NMR-Spektroskopie, MALDI-TOF-Spektroskopie, dynamischer und statischer Lichtstreuung sowie Kapillarelektrophorese.

Die Polymer-ODN-Konjugate und deren Makromonomere können mit Hilfe der Kapillarelektrophorese und Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht werden.

Die Bildung der Polyion-Komplex-Mizellen kann durch dynamische Lichtstreuemessungen sowie Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert werden.

1.2 Literaturverzeichnis Kapitel 1

- [1] R. Haag, F. Kratz, *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, 45, 1198-1215.
- [2] R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2, 347-360.
- [3] R. Duncan, H. Ringsdorf, R. Satchi-Fainaro, *Journal of Drug Targeting* **2006**, 14, 337-341.
- [4] A. Gresser, *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **1963**, 88, 2217-&.
- [5] H. Ringsdorf, *Journal of Polymer Science Part C-Polymer Symposium* **1975**, 135-153.
- [6] F. F. Davis, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, 54, 457-458.
- [7] M. J. Vicent, H. Ringsdorf, R. Duncan, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, 61, 1117-1120.
- [8] A. Z. Wang, R. Langer, O. C. Farokhzad, *Annual Review of Medicine, Vol 63* **2012**, 63, 185-198.
- [9] R. Duncan, *Current Opinion in Biotechnology* **2011**, 22, 492-501.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Polymer-Wirkstoff-Therapeutika

In der biomedizinischen Anwendung werden biokompatible Materialien als Trägersysteme für den gezielten Wirkstofftransport zum Zielort sowie die dortige Freisetzung des Wirkstoffes benötigt^[1].

Biokompatibilität beschreibt dabei die Unterdrückung der Immunantwort. Dies wird realisiert durch geringe bzw. nicht vorhandene Wechselwirkungen des Trägermaterials mit biologischen Materialien wie Proteinen oder Membranwänden durch hydrophobe und elektrostatische Kräfte sowie durch Wasserstoffbrückenbindungen. Eine weitere Voraussetzung ist ein nicht toxisches Verhalten der Materialien. Toxizität wird beispielsweise durch kationische Ladungen verursacht, die mit den anionisch geladenen Phospholipiden der Zellmembran wechselwirken, wodurch unspezifische Organakkumulationen entstehen^[2].

Weiter ist die Stabilität gegenüber Makrophagen und anderen Komponenten des retikuloendothelialen Systems (RES) nötig^[3].

Das erste Polymer-Carrier-System wurde mit einer ersten theoretischen Erschließung des Themas von Ringsdorf 1975 publiziert^[4]. Die Vorteile von polymerbasierten Trägersystemen werden im Folgenden erläutert.

Manche Wirkstoffe sind im wässrigen Medium nur begrenzt bzw. nicht löslich. Durch die Verknüpfung des Wirkstoffes mit einem speziell darauf zugeschnittenen Polymer wird die Löslichkeit stark erhöht und damit die biologische Verfügbarkeit des Wirkstoffes verlängert^[5].

Der zweite Nutzen des Polymers ist die Abschirmung des Wirkstoffes vor der Deaktivierung durch intrazelluläre Wechselwirkungen^[6]. Dadurch verlängert sich die Zirkulationszeit im Blutkreislauf und die Effektivität des Transports zum Zielort wird verbessert^{[7] [8]}.

Des Weiteren wird durch bestimmte Polymere die Opsonierung der Moleküle verhindert. Diese wichtigste Eigenschaft wird auch als Stealth-Effekt bezeichnet und be-

schreibt die Unterdrückung aller Wechselwirkungen mit körpereigenen Verbindungen^[9]. Dies beinhaltet beispielsweise Interaktionen mit Proteinen und dem Immunsystem. Erreicht wird dieser Effekt dadurch, dass das Polymer durch sterische Hinderung und Maskierung vorhandene Ladungen abschirmt^[10].

Auch dadurch wird wieder die Zirkulationszeit im Blutkreislauf erhöht und weiter die Immunogenität – Auslösung einer Immunantwort – verringert, die durch den Wirkstoff alleine ausgelöst werden würde^[11].

Als dritten Vorteil kann auf verschiedene Polymere durch externe Stimulierung wie beispielsweise die Änderung des pH-Wertes oder der Temperatur auf das Polymerverhalten Einfluss genommen werden^[12]. Genauso kann durch Variation des Molekulargewichts die Größe des Moleküls variiert werden. Definierte Strukturen wie beispielsweise Mizellen oder bürstenartige Strukturen können durch die architektonische Beschaffenheit des Polymers erreicht werden^[13].

Die multifunktionellen Kopplungsstellen der Polymere erlauben mehrere Möglichkeiten zur Konjugation von biomedizinisch relevanten Molekülen oder der Farbstoffmarkierung. Durch Anbindung von Targeting-Molekülen – wie beispielsweise Antikörper

– wird die spezifische Zellaufnahme aktiviert^[14] ^[15]. Durch eine große Zahl an Wirkstoffen pro Polymer wird zudem die absolute Zahl an Wirkstoffen, die in die Zelle gelangen gesteigert^[16].

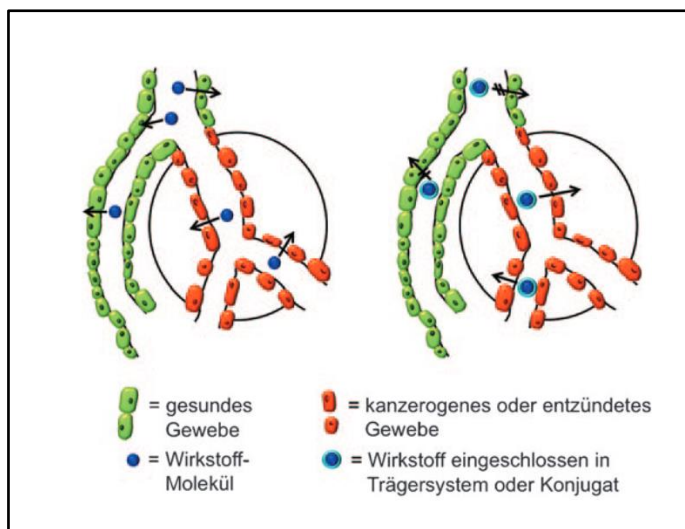


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des EPR-Effekts^[17]

be dagegen liegen die Endothelzellen durch Hypervaskularisation nur locker verbunden vor und besitzen damit eine Porengröße zwischen 40-80 nm. Dies erlaubt das Eindringen des Trägersystems mit eingeschlossenem Wirkstoff und die konzentrierte Anlagerung im entzündeten Gewebe (Abbildung 2.1).

Zudem ist in dem kanzerogenen Gewebe die Lymphdrainage verringert und damit verbleiben die Partikel im interzellulären Raum. Verstärkt wird dies durch die Vergrößerung des interstitiellen Volumens von kanzerogenen Zellen im Vergleich zu gesunden Zellen. Dies bedeutet, dass in der Zelle mehr Platz für Polymer-Therapeutika vorhanden ist. Von Maeda wurde ein solches Verhalten als erhöhte Permeabilität und Retention (EPR) beschrieben, wobei der Effekt auch als passives Targeting bezeichnet wird ^[10].

Durch die Verwendung als Trägersysteme für die biomedizinische Anwendung werden mehrere Voraussetzungen an das Polymer gestellt.

Um die Polymere in den Körper einführen zu können, müssen diese wasserlöslich sein ^[2].

Dieses muss, wie bereits für die Biomaterialien beschrieben, biokompatibel sein, eine geringe Toxizität sowie keine Aggregation im konzentrierten menschlichen Blutserum aufweisen ^[18]. Für die Bildung von Polymertherapeutika müssen zudem multifunktionale Gruppen für chemische Konjugationsreaktionen vorhanden sein und das Polymer darf keine spezifische Aufnahme in Zellen zeigen.

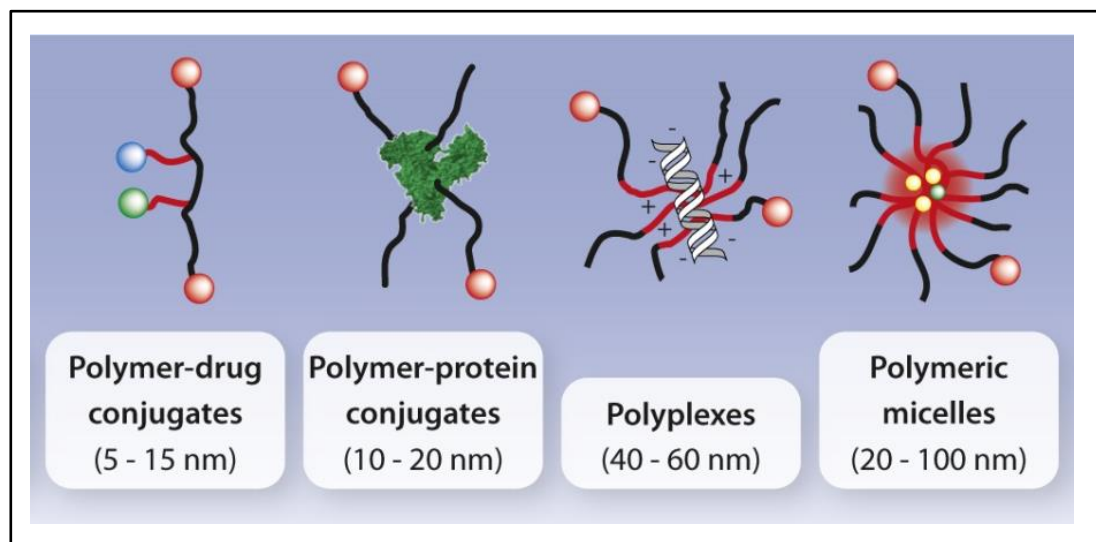


Abbildung 2.2: Darstellung von verschiedenen Gruppen der Polymer-Therapeutika. Die roten Kugeln stehen für freie funktionelle Gruppen des Polymers, blaue, grüne und gelbe Kugeln für verschiedene Wirkstoffe. Bei den Polymer-Protein-Konjugaten ist in grün das Protein dargestellt und bei den Polyplexen in weiß eine DNA-Sequenz ^[19].

Mit diesen Voraussetzungen an potentielle Trägersysteme für die biomedizinische Anwendung sind verschiedene Arten von Polymertherapeutika möglich ^[19]. In Abbildung 2.2 sind verschiedene Möglichkeiten dargestellt.

Zum einen ist es möglich verschiedene Wirkstoffe und Moleküle zum Targeting kovalent an ein Polymer zu binden und dadurch Polymer-Wirkstoff-Konjugate zu bilden^[20]^[21]. Eine Weiterführung dieser Konjugate sind die Protein-Polymer-Konjugate, bei denen speziell Proteine bzw. DNA-Sequenzen an das Polymer gebunden werden^[13]. Eine weitere Variante der Herstellung von Polymertherapeutika ist die Bildung von Polyplexen aus DNA bzw. Proteinen und einem Blockcopolymer bestehend aus einem kationischen und hydrophilen Block^[22]. Mittels amphiphilen Polymeren ist zudem der Einschluss von hydrophoben Wirkstoffen unter Bildung von Mizellen, Aggregaten oder Nanopartikeln möglich^[16] ^[23].

Die Größe der verwendeten Polymer-Therapeutika muss an verschiedene Faktoren angepasst werden. Zum einen besitzt der Körper eine renale Ausschlussgrenze, da das Blut durch die Nieren mit einer Porengröße von 4-14 nm fließt. Dort werden Abfallprodukte, Wasser sowie gelöste Stoffe, welche durch diese Poren passen, ausgeschieden^[24].

Zudem erfolgt eine Ausscheidung von Partikeln, die größer als 200 nm sind durch die Leber und das Retikuloendotheliale System (RES). Diese Partikel werden von Opsoninproteinen gebunden und damit die Aufmerksamkeit der Makrophagen erhöht. Die Opsoninproteine binden bevorzugt an hydrophobe und geladene Partikel. Das RES entfernt diese Partikel indirekt durch Degradation der Peptid- und Esterbindungen^[25].

Bei der Größenwahl der Partikel muss somit die renale Ausschlussgrenze, Aufnahme in das Tumorgewebe und Entfernung der Partikel durch Leber und RES berücksichtigt werden.

Im Vergleich zu flexiblen Polymeren ist die Entfernung von starren sphärischen Partikeln über die Nierenausschlussgrenze verringert.

Bürstenartige Polymere vereinen diese Eigenschaften und zeigen eine höhere Anreicherung im Tumorgewebe^[17].

2.2 Oligonucleotid (ODN)-Polymer-Konjugate

Der Vorteil eines Oligonucleotid(ODN)-Polymer-Konjugats – gegenüber beispielsweise der siRNA alleine – ist die verlängerte Halbwertszeit im Blutkreislauf durch ein verringertes Ausscheiden über die Niere. Weiter vermindern die negativen Ladungen der siRNA die zügige Aufnahme in die Zelle. Zudem besitzt die siRNA in Plasma und im Zellinneren eine geringe Stabilität gegenüber Nukleasen. Wird statt der reinen siRNA ein ODN-Polymer-Konjugat eingesetzt, werden die negativen Ladungen maskiert und gleichzeitig die Stabilität gegenüber dem enzymatischen Abbau erhöht. Dies führt zu einer besseren Zellpenetration.

Die Idee ist die Synthese einer Polymerbürste deren Seitenketten aus Oligonucleotid(ODN)-Polymer-Konjugaten bestehen. Durch ihre Größe und anisotrope Form wird hier eine Bürstenform gegenüber einem linearen Oligonucleotid(ODN)-Polymer-Konjugat bevorzugt. Weitere Vorteile der Bürstenstruktur werden in Abschnitt 4.1 beschrieben.

Durch die Hybridisierung der ODN-Sequenzen mit einem komplementären funktionalisierten ODN-Strang können biomedizinisch relevante Verbindungen an die Bürste gebunden werden.

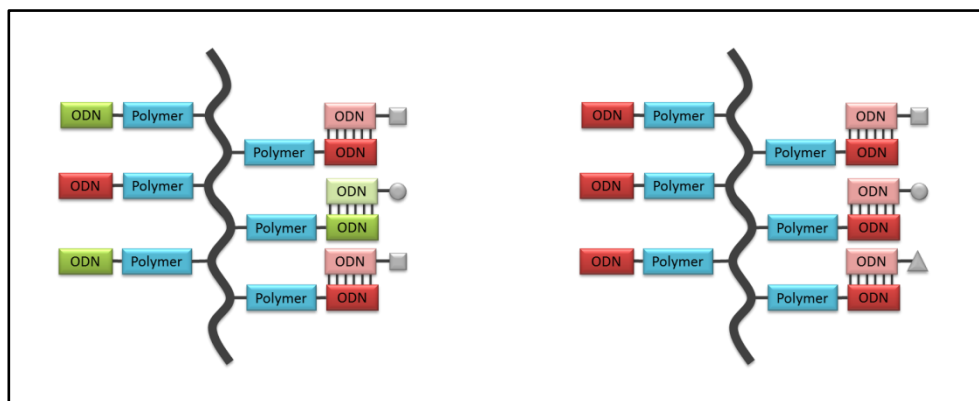


Abbildung 2.3: Polymerbürsten mit Seitenketten aus Oligonucleotid(ODN)-Polymer-Konjugaten mit unterschiedlichen ODN-Sequenzen (links) oder gleichen ODN-Sequenzen (rechts), deren komplementäre Stränge jedoch unterschiedlich funktionalisiert sind. In grau sind verschiedene Wirkstoffe dargestellt.

Zum einen ist es denkbar eine Polymerbürste mit Seitenketten aus ODN-Polymer-Konjugaten mit verschiedenen ODN-Sequenzen herzustellen (Abbildung 2.3 links). Durch Zugabe der jeweiligen komplementären Einzelstränge, die unterschiedliche

Modifizierungen tragen, ist eine Funktionalisierung mit verschiedenen Stoffen möglich.

Zum anderen kann nur eine ODN-Sequenz verwendet werden, wobei deren komplementäre Sequenz dann mit unterschiedlichen Stoffen modifiziert werden kann und damit wiederum verschiedene Verbindungen eingeführt werden können (Abbildung 2.3 rechts).

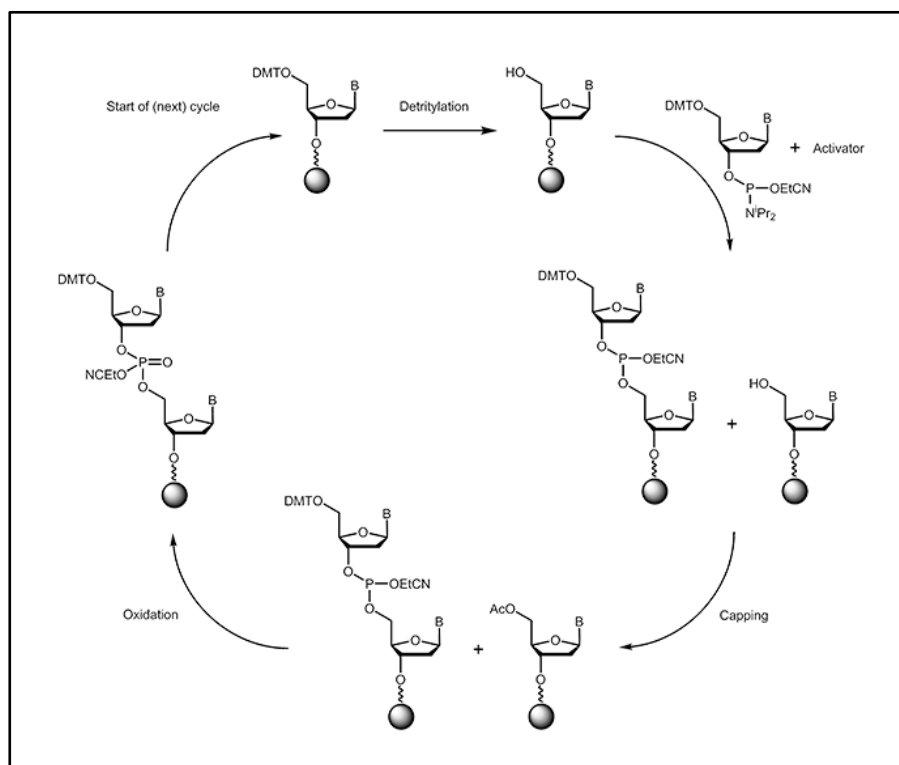
Zudem können ODN-Sequenzen verwendet werden, die bereits selbst biologisch aktiv sind. Durch den Einbau eines schwerabbaubaren Thiol-Linkers zwischen Seiten- und Hauptkette wäre eine biologische Abbaubarkeit möglich.

Beachtet werden muss bei der Synthese des ODN-Polymer-Konjugats, dass die benötigten Eigenschaften des ODNs durch die Kopplung oder Funktionalisierung mit anderen Molekülen nicht verändert werden dürfen.

2.2.1 Oligonucleotid-Synthese

Die Synthese von Oligonucleotiden wird an der Festphase durchgeführt. Der Ablauf der Synthese ist in Abbildung 2.4 dargestellt. Benötigt wird ein 3'-Nucleosid, welches an das Trägermaterial - meistens controlled pore glass (CPG) - gebunden ist. Die 5'-OH-Gruppe ist mit einer Dimethoxytrityl-Schutzgruppe (DMT) geschützt. Durchgeführt wird die Synthese in 3'-5'-Richtung. Der erste Schritt ist die Entschützung der 5'-OH-Gruppe. Im zweiten Schritt wird an die freie 5'-OH-Gruppe das zugegebene Phosphoramidit gekoppelt, welches zuvor mit einer schwachen Säure aktiviert wird. Da der Umsatz der Kopplung nur 99% beträgt, werden die verbliebenen freien OH-Gruppen nach der Kopplung durch Acetylierung maskiert, so dass durch dieses „Capping“ kürzere Fehlsequenzen nicht weiter funktionalisiert bzw. bei der Synthese nicht weiter verlängert werden.

Durch Oxidation mit Iodlösung der entstandenen Phosphitgruppe zum entsprechenden Phosphat ist der Kopplungszyklus beendet und das nächste Nucleosid kann an die Sequenz gebunden werden.

Abbildung 2.4: ODN-Synthese^[26]

Nach Beendigung der Synthese wird das Oligonucleotid mit konzentrierter Ammoniaklösung vom Träger abgespalten. Dabei werden auch die Schutzgruppen der Nucleoside entfernt^[26].

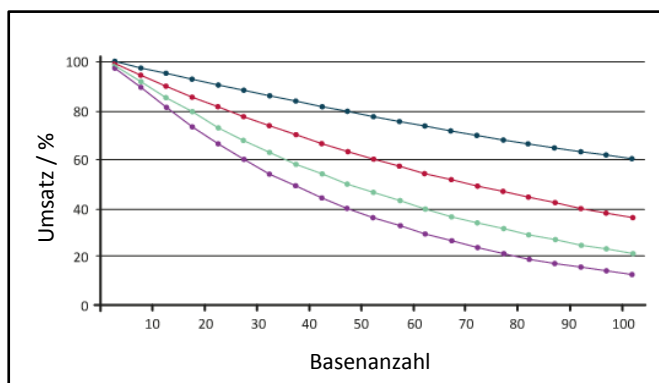


Abbildung 2.5: Darstellung des Umsatzverlustes bei der Festphasensynthese eines ODNs in Abhängigkeit von der Basenlänge des ODNs bei 98,0% Kopplungsumsatz (violett), 98,5% Kopplungsumsatz (grün), 99,0% Kopplungsumsatz (rot) und 99,5% Kopplungsumsatz (blau)^[26]

Die Auswirkung der Fehlsequenzen auf die Ausbeute ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Bei der Synthese einer Sequenz bestehend aus 23 Basen und einer Kuppelungsausbeute von 98% hat man einen Ausbeuteverlust von circa 30% (violette Kurve in Abbildung 2.5). Jedoch ist dies bezogen auf die benötigten 100 Reaktionsschritte sowie 98% bei vier Elementarschritten eine gute Ausbeute.

2.2.2 Konjugationsmethoden von Oligonucleotiden und Polymeren

Für ein Polymer-ODN-Konjugat ist als Topologie beispielsweise ein lineares Blockcopolymer oder eine Bürstenstruktur möglich.

Lineare Blockcopolymere können durch Pfropfreaktionen z.B. mittels Kopplung eines aminofunktionalisierten ODNs mit einem Polymer mit Carbonsäurefunktionalisierung (Abbildung 2.5 a) hergestellt werden^[27]. Alternativ kann statt der Säurefunktionalisierung auch ein Aktivester-Ende verwendet werden^{[28] [29] [30]}.

Die zweite Möglichkeit ist die Kopplung durch Disulfidbrückenbildung (Abbildung 2.5 b), dafür müssen ODN und Polymer eine Thiofunktionalisierung aufweisen^[31]. Weiter ist es möglich, thiofunktionalisierte ODNs per Michael-Addition an ein Maleimid funktionalisiertes Polymer zu binden (Abbildung 2.6 c)^[32].

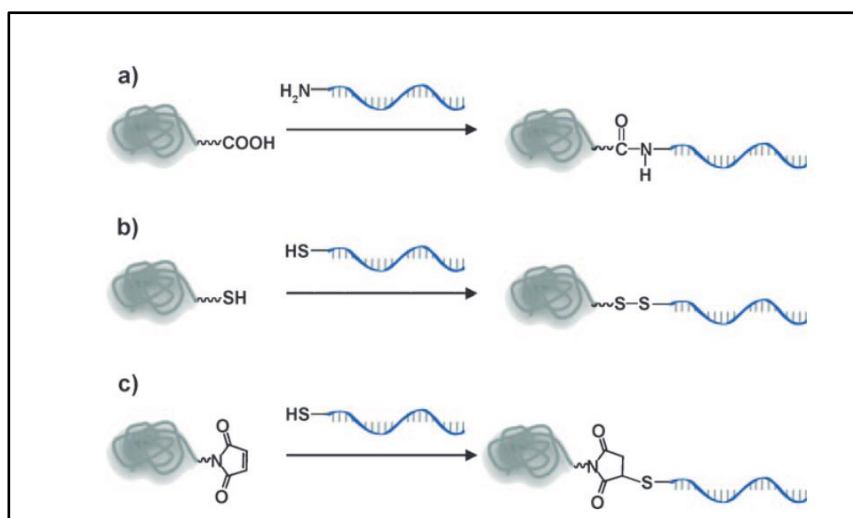


Abbildung 2.6: Kopplungsmethoden von ODN und Polymer in Lösung mit a) säurefunktionalisierten Polymer und aminofunktionalisierten ODN; b) thiofunktionalisierten Polymer und ODN und c) maleimidfunktionalisierten Polymer und thiofunktionalisierten ODN^[33]

Die Kopplung kann einerseits in wässriger Lösung durchgeführt werden. Dies hat aber den Nachteil, dass der Umsatz bei hydrophoben Polymeren sehr schlecht ist^[33]. Andererseits kann die Kopplung auch an der Festphase erfolgen, an der das ODN synthetisiert worden ist. Die Kopplung an der Festphase hat mehrere Vorteile. Zum einen kann die Kopplung im organischen Milieu durchgeführt werden. Dadurch kön-

nen auch Polymere zur Kopplung verwendet werden, die schlechter in Wasser löslich sind. Durch die Schutzgruppen sind zudem keine Nebenreaktionen der exozyklischen Aminogruppen möglich^[34]. Zum anderen ist eine bessere und einfachere Aufreinigung des Produktes durch Waschen praktisch durchführbar.

Jedoch ist es nur möglich kurze ODNs und Polymere mit kleinem Molekulargewicht zu verwenden, da die Diffusion in die Poren der Festphase limitiert ist.

Drei Synthesewege sind möglich (Abbildung 2.7). Der einfachste Weg ist die Überführung eines OH-funktionalisierten Polymers in das entsprechende Phosphoramidit

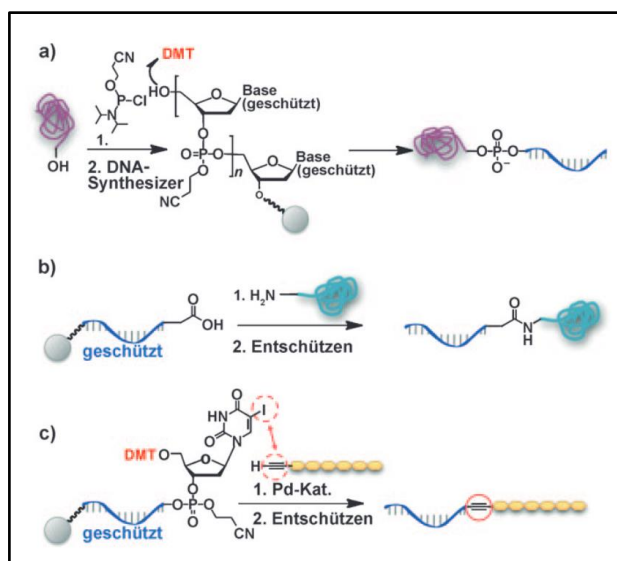


Abbildung 2.7: Kopplung von ODN und Polymer an der Festphase: a) durch Überführung von hydroxyfunktionalisiertem Polymer in ein Phosphoramidit und Verknüpfung mit 5'-OH-Gruppe des ODNs; b) mittels säurefunktionalisierten ODN und aminofunktionalisiertem Polymer; c) durch Sonogashira-Hagihara-Kupplung mit einem Polymer mit Dreifachbindung und einem iodfunktionalisierten ODN^[33].

und anschließend die Kopplung an die 5'-OH-Gruppe des ODNs^[35]. Weiter kann ein ODN mit Aktivester- oder Säurefunktionalisierung am 5'-Ende mit einem aminofunktionalisierten Polymer umgesetzt werden^[36]. Die dritte Möglichkeit ist die Palladium katalysierte Sonogashira-Hagihara-Kupplung, bei der das Polymer eine Dreifachbindung besitzt und das ODN mit einer Iodgruppe funktionalisiert wurde^[37].

2.3 Zwitterionische Polymere

Ionische Polymere kommen einerseits in der Natur vor wie beispielsweise Proteine und Nucleotide, können aber andererseits auch synthetisch hergestellt werden wie Polyelektrolytgele und Seifen.

Es gibt als ionische Polymere Polyelektrolyte, welche anionische oder kationische Gruppen tragen, und zwitterionische Polymere.

Zwitterionen haben sowohl anionische als auch kationische Gruppen und werden z.B. als Ionenaustauscher, zur Abwasserbearbeitung und als Inhaltsstoffe von Shampoo und Haarfestiger verwendet^[38].

Bei den Zwitterionen wiederum werden Polyampholyte, die die Ladung an verschiedenen Wiederholungseinheiten tragen, und Polybetaine, die beide Ladungen an einer Wiederholungseinheit tragen, unterschieden.

Im Vergleich zu Polyelektrolyten zeigen Polyzwitterionen oft ein entgegengesetztes Lösungsverhalten. Durch die Ausbildung von intra- und intermolekularen ionischen Wechselwirkungen sind sie teilweise nicht wasserlöslich. Bei Salzzugabe werden diese Wechselwirkungen gestört und die Polymere lösen sich im wässrigen Medium. Dieses Verhalten wird als Antipolyelektrolyteffekt bezeichnet^[38].

Jedes Polyzwitterion besitzt einen isoelektrischen Punkt, der anzeigt, bei welchem pH-Wert das Polymer elektrisch neutral vorliegt^[39].

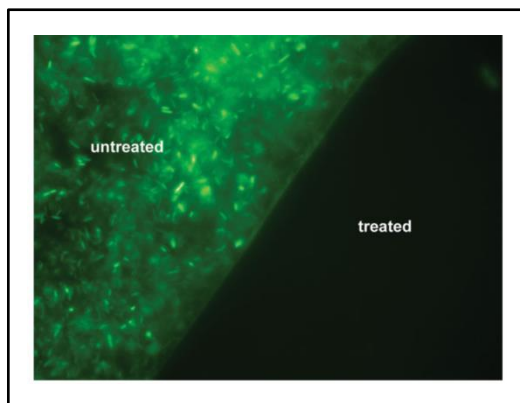


Abbildung 2.8: Nicht spezifische Proteinadsorption an unbehandelten Oberflächen (links) und mit zwitterionischen Polymeren behandelten Oberflächen (rechts)^[43]

Polybetaine besitzen als kationische Gruppen quartäre Ammoniumgruppen. Als anionische Gruppen werden meist Sulfonate^[40], Carboxylate^[41] oder Phosphate/Phosphonate/Phosphinate^[42] verwendet. Die Polybetaine werden nach ihrem Anion entsprechend als Sulfobetain, Carbo- oder Carboxybetain und Phosphobetain bezeichnet.

Ein Beispiel für die biomedizinische Wirkung von Zwitterionen zeigt Abbildung 2.8. Generell adsorbieren Proteine innerhalb weniger Minuten an Materialien wie beispielsweise Implantatoberflächen, wenn diese Materialien mit Körperflüssigkeiten wie Blut, Plasma oder Tränen in Kontakt kommen.

Behandelt man jedoch die Oberfläche zuerst mit zwitterionischem Polymer, so findet wie in Abbildung 2.8 rechts zu sehen keine Proteinadsorption statt^[43]. Zudem wird die zelluläre Adhäsion vermindert und die Bildung von Thrombosen verhindert. Diese für die biomedizinische Anwendung sehr wichtigen Eigenschaften nennt man non fouling Verhalten der Zwitterionen^[44].

2.4 Polyoxazoline

Oxazoline sind heterozyklische Verbindungen. Sie bestehen aus einem Fünfring, welcher in 1,3-Stellung je ein Sauerstoff und ein Stickstoffatom trägt. Das häufigste verwendete Isomer ist das 2-Oxazolin, wo sich die Doppelbindung zwischen Stickstoff- und Kohlenstoffatom in 2-Stellung befindet.

Konstitutionsisomere Formen von Polyoxazolin sind Polyacrylamide und Polypeptide, welche in Abbildung 2.9 dargestellt sind. Deshalb werden Polyoxazoline auch als

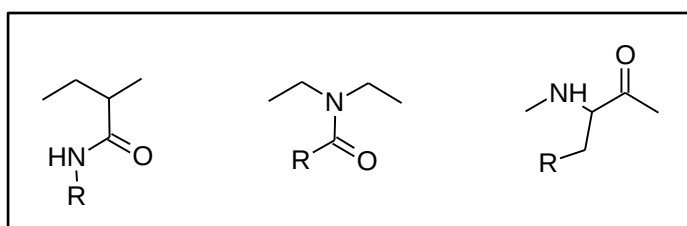


Abbildung 2.9: Isomerstrukturen der Wiederholungseinheiten von Polyoxazolin: *N*-alkyl-acrylamid, 2-Oxazolin und Aminosäure

Pseudopolypeptide bezeichnet. Im Gegensatz zu Polypeptiden besitzen sie kein chirales Zentrum und können somit keine Sekundärstruktur ausbilden^[45].

Die lebende kationische ringöffnende Polymerisation (LCROP) (Abbildung 2.10) von Polyoxazolin wurde 1966 unabhängig von 4 Forschungsgruppen entdeckt^{[46] [47] [48] [49]}. Durch diese Polymerisationsmethode ist die Synthese von Blockcopolymeren sowie die Funktionalisierung durch Initiator- und Abbruchreagenz möglich.

Durchgeführt wird die Polymerisation unter inerten Bedingungen in wasserfreien aprotischen Lösungsmitteln^[21]. Die Initiierung erfolgt durch Lewisäuren, starke Protensäuren und ihre Ester, Alkylhalogenide oder Oxoniumsalze. Die Initiation der Polymerisation soll quantitativ und schnell sein, damit es nicht zu Nebenreaktionen kommt.

Abgebrochen werden kann die Polymerisation durch Nucleophile wie beispielsweise Wasser, Alkohole oder Amine^[45].

Der Vorteil der LCROP von Oxazolin ist die sehr gute Kontrolle über die Polymerisation. So kann durch geeignete Wahl des Ansatzes die Kettenlänge, Molmassenverteilung sowie die Monomierzusammensetzung variiert werden^[2].

Durch die Wahl des Restes können 2-Oxazoline hydrophile, hydrophobe oder auch fluorophile Eigenschaften besitzen. Poly(2-oxazoline) mit kurzen Alkylketten (C1-C3) sind beispielsweise wasserlöslich.

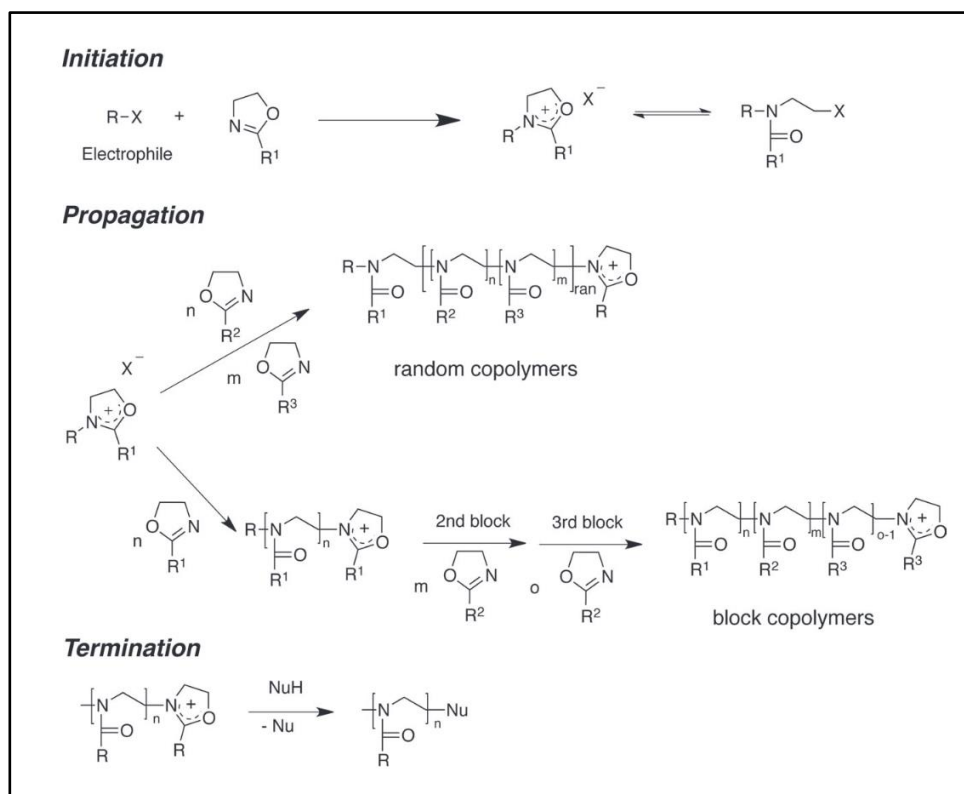


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der Initiierung, des Wachstums und der Terminierung der lebenden kationischen Polymerisation von 2-Oxazolin^[21]

Weiterhin besitzen einige Poly(2-oxazoline) eine lower critical solution temperature

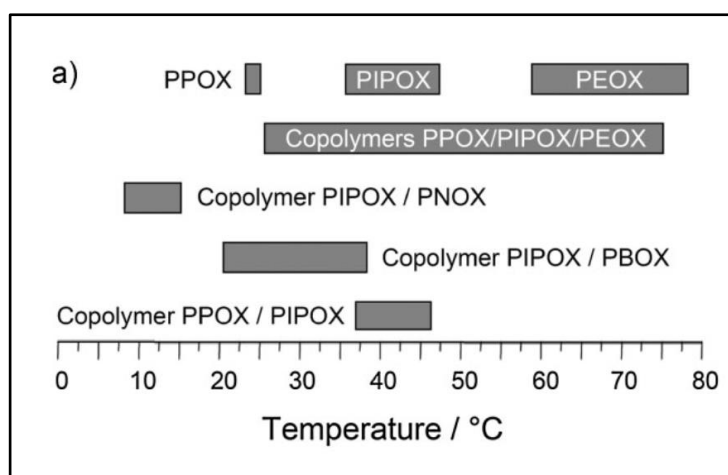


Abbildung 2.11: Übersicht über die Übergangstemperaturen von verschiedenen Poly(2-oxazolin)^[45]

(LCST), welche eine inverse, temperaturabhängige Löslichkeit ist. Ein wasserlösliches Polymer ist zum einen durch enthalpische Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen und zum anderen durch den Entropiegewinn des Systems

durch die Solvation des Polymers im Wässrigen lös-

lich. Durch eine Erhöhung der Temperatur gewinnt das System an Entropie und der

Anteil des Entropiegewinns durch die Solvation des Polymers wird vernachlässigbar und das Polymer dadurch unlöslich^[50]. In Abbildung 2.11 sind die Phasenübergangstemperaturen unterschiedlicher Poly(alkyl-oxazoline) zusammengestellt.

Poly(2-oxazoline) sind zudem biokompatibel und auch in hohen Konzentrationen nicht zytotoxisch. Die Bioverträglichkeit von Poly(2-methyl-2-oxazolin) wurde 1989 an Mäusen nachgewiesen. Des Weiteren ist es blutverträglich und zeigt einen Stealth-Effekt^[9]. Poly(2-ethyl-2-oxazolin) ist darüber hinaus von der FDA als indirect food contact agent zugelassen^[45].

Mit Proteinkinase, einem nicht humanen Enzym, wurden die Abbauprodukte von Polyoxazolin untersucht. Diese Untersuchungen zeigten eine partielle Degradation zu Polyethylenimin, welches als Polykation zytotoxische Eigenschaften aufweist. Jedoch ist nicht gesichert, dass diese Reaktion auch im menschlichen Körper abläuft.^[10]

Anzumerken ist jedoch auch, dass sich gezeigt hat, je kleiner die Molmasse und der Verzweigungsgrad des entstehenden Polyethylenimins ist, desto höher ist die Bioverträglichkeit^[10].

Im Folgenden werden die Vor- und Nachteile von Poly(ethylenglycol) PEG, Poly(vinylpyrrolidon) (PVP), Poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamid) (PHPMA) sowie Poly(2-oxazolin) (POX) als Polymere für Polymertherapeutika verglichen^[2].

PEG wird mittels anionischer ringöffnender Polymerisation hergestellt. Das Monomer jedoch ist hochtoxisch, explosiv und bei Raumtemperatur gasförmig. Deshalb müssen besondere Sicherheitsvorkehrung beim Umgang mit Ethylenoxid getroffen werden^[51]. Die Funktionalisierung des Polymers ist nur an den Endgruppen durch Variationen des Initiators und des Terminierungsreagenz möglich. Die Herstellung von Copolymeren ist vom Monomer abhängig^[52]. PEG ist oxidativ instabil und kann bei Lagerung explosive Peroxide bilden^[53].

PVP und PHPMA werden beide durch radikalische Polymerisation synthetisiert. Zur Endgruppenfunktionalisierung und Verbesserung des PDIs kann die RAFT-Polymerisation verwendet werden. Dies erlaubt die Kontrolle über die Endgruppen jedoch ist die Ausbeute auf Grund anderer Terminierungsreaktionen geringer als bei der anionischen ringöffnenden und lebenden kationischen Polymerisation von Ethylenoxid und 2-Oxazolin. Durch verschiedene Reaktionen der RAFT-Gruppe bei-

spielsweise der Thiol-en-Reaktion ist die Modifikation nach der Polymerisation möglich^[54]. Die Seitenkettenmodifikation von PVP ist nur durch Copolymerisation möglich, wobei eine Vielzahl von ungeschützten funktionellen Polymeren verwendet werden kann. Im Gegensatz dazu trägt PHPMA in jeder Wiederholungseinheit eine Hydroxylgruppe, die nach der Polymerisation modifiziert werden kann^[55].

Zusammenfassend ist die Polymerisation von 2-Oxazolinen im Vergleich zu PVP und PHPMA schwieriger durchzuführen jedoch leichter als die Polymerisation von Ethylenoxid. Die Kontrolle über die Polymerisation von 2-Oxazolinen ist vergleichbar mit der Polymerisation von Ethylenoxid jedoch besser als bei PVP und PHPMA, welche per kontrollierter radikalischer Polymerisation hergestellt werden^[2].

Der Hauptvorteil von Polyoxazolin im Gegensatz zu PEG ist die einfache Variation der Monomerzusammensetzung und die leichte Einführung von Seitenkettenfunktionalitäten. Jedoch müssen der Stealth-Effekt und die Abbauprozesse im Körper noch genauer untersucht werden^[9].

2.5 RAFT-Polymerisation

Die radikalische Polymerisation ist der technisch am meisten genutzte Prozess für die Herstellung einfacher kommerzieller Polymere mit hoher Molmassen^[56]. Im Gegensatz zur freien Radikalik erlaubt die kontrollierte radikalische Polymerisation eine bessere Kontrolle über den Polymerisationsprozess. In dieser Arbeit wird die reversible Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragungs-Polymerisation abgekürzt als RAFT-Polymerisation verwendet.

Das erste RAFT-Agens wurde bereits 1986 in der Literatur erwähnt^[57]. Aber erst 1995 sind sie zur Synthese von engverteilten Polymeren angewendet worden^[58]. Die Verwendung von Thiocarbonylthio-RAFT-Agentien unter der Bezeichnung als RAFT-Agens wurde erstmals 1998 publiziert^[59].

Der Mechanismus der Polymerisation ist in Abbildung 2.12 dargestellt.

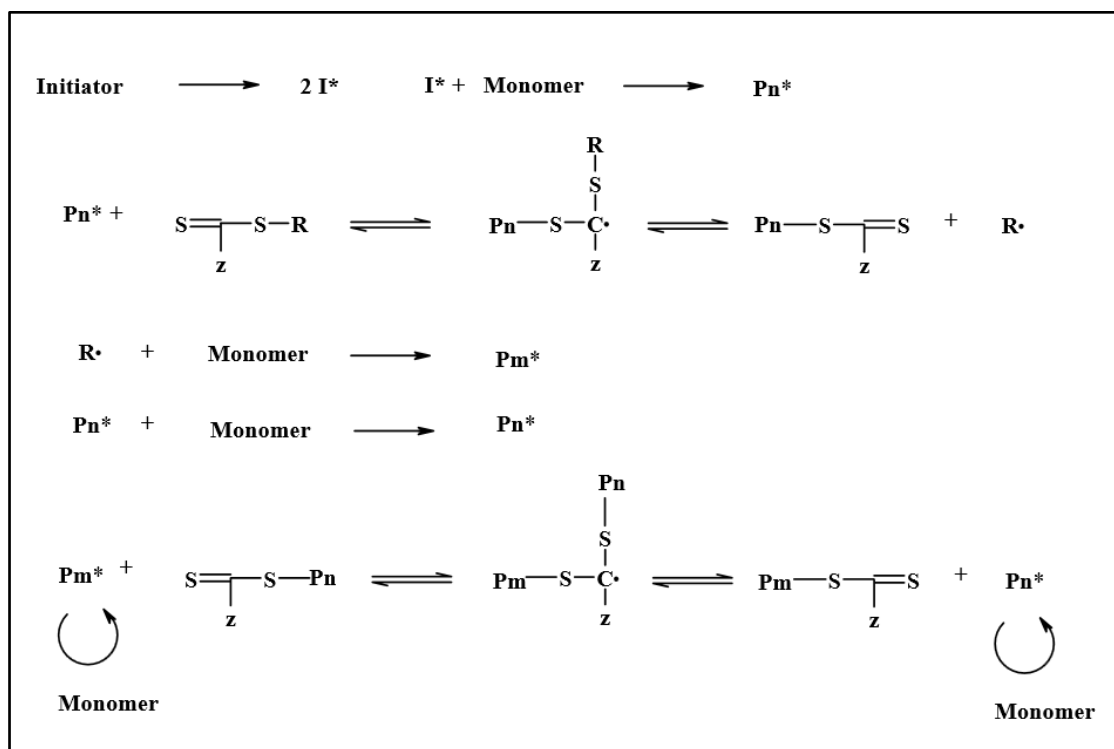


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung des Mechanismus der RAFT-Polymerisation^[57]

Als Kettentransferagentien werden Thiocarbonylthio-RAFT-Agentien verwendet, welche einen Zwei-Schritt-Additions-Fragmentierungs-Mechanismus zeigen.

Der RAFT-Mechanismus startet mit einem Fragment eines Radikalinitiators wie beispielsweise AIBN, welches an das freie carbonyl analoge Schwefelatom des Dithioesters angreift. Die Z-Gruppe hat die Aufgabe das resultierende Übergangsradikal zu stabilisieren. Die R-Gruppe ist so gewählt, dass diese das R-basierende Radikal stabilisiert und zudem die Polymerisation reinitiiert. Das terminale Radikal der wachsenden Kette kann dann mit einem anderen Dithioestermolekül reagieren. Während der Polymerisation liegt ein Gleichgewicht zwischen schlafender und aktiver Spezies vor^[60].

Nach Beendigung der Polymerisation liegen die meisten Ketten als schlafende Spezies vor. Diese besitzen damit eine Thiocarbonylendgruppe und können als stabile Verbindung isoliert werden.

Mit Hilfe der RAFT-Polymerisation ist es somit möglich Polymere mit definierten Endgruppen herzustellen.

Es können eine Vielzahl von Monomeren wie beispielsweise (Meth)acrylate, (Meth)acrylamide, Acrylonitrile, Styrole und deren Derivate, Butadien, Vinylacetat, und n-Vinylpyrrolidon verwendet werden. Zudem ist die RAFT-Polymerisation tolerant gegenüber der Funktionalität von Monomer, Lösungsmittel und Initiator.

Bei der Polymerisation können die gleichen Bedingungen wie bei der freien Radikalik verwendet werden, es ist nur zusätzlich die Zugabe eines CTAs nötig. Im Unterschied zur freien Radikalik ist die Radikalkonzentration sehr niedrig^[61].

Die RAFT-Polymerisation hat die gleichen Vorteile wie andere lebende Polymerisationsmethoden wie beispielsweise die anionische Polymerisation. Alle Ketten beginnen zeitgleich mit dem Kettenwachstum und setzen das Wachstum fort bis das Monomer vollständig aufgebraucht ist. Dadurch kann eine enge Molekulargewichtsverteilung erreicht werden. Zudem sind verschiedene Architekturen und Blockpolymere möglich^[62].

Es wurden viele verschiedene RAFT-Agentien publiziert. Diese enthalten Trithiocarbonate, Xanthate und Dithiocarbamate^[63].

Nicht symmetrische Trithiocarbonate haben beispielsweise eine gute homolytische Abgangsgruppe und eine schlechte Abgangsgruppe wie primäre Alkyle oder Aryle.

Die wichtigen Voraussetzungen für den Mechanismus der RAFT-Polymerisation sind im Folgenden nochmals zusammengefasst^[64]:

- das RAFT-Agens besitzt eine reaktive C=S Doppelbindung
- das intermediäre Radikal fragmentiert schnell und Seitenreaktionen sind somit nicht möglich
- das Intermediat zerfällt in die gewünschten Produkte
- das Radikal R reinitiiert effizient die Polymerisation

2.6 Literaturverzeichnis Kapitel 2

- [1] B. Guillermin, S. Monge, V. Lapinte, J.-J. Robin, *Macromol Rapid Comm* **2012**, 33, 1600-1612.
- [2] O. Sedlacek, B. D. Monnery, S. K. Filippov, R. Hoogenboom, M. Hruby, *Macromol Rapid Comm* **2012**, 33, 1648-1662.
- [3] D. F. Williams, *Biomaterials* **2009**, 30, 5897-5909.
- [4] H. Ringsdorf, *Journal of Polymer Science Part C-Polymer Symposium* **1975**, 135-153.
- [5] R. Luxenhofer, A. Schulz, C. Roques, S. Li, T. K. Bronich, E. V. Batrakova, R. Jordan, A. V. Kabanov, *Biomaterials* **2010**, 31, 4972-4979.
- [6] R. Konradi, B. Pidhatika, A. Muhlebach, M. Textort, *Langmuir* **2008**, 24, 613-616.
- [7] M. Barz, R. Luxenhofer, R. Zentel, M. J. Vicent, *Polym Chem-Uk* **2011**, 2, 1900-1918.
- [8] J. Khandare, T. Minko, *Progress in Polymer Science* **2006**, 31, 359-397.
- [9] R. Hoogenboom, *Angewandte Chemie* **2009**, 121, 8122-8138.
- [10] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert, *Angewandte Chemie-International Edition* **2010**, 49, 6288-6308.
- [11] G. Pasut, F. M. Veronese, *Progress in Polymer Science* **2007**, 32, 933-961.
- [12] R. Hoogenboom, S. Rogers, A. Can, C. R. Becer, C. Guerrero-Sanchez, D. Wouters, S. Hoepfner, U. S. Schubert, *Chem Commun* **2009**, 5582-5584.
- [13] R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, 2, 347-360.
- [14] F. C. Gaertner, R. Luxenhofer, B. Blechert, R. Jordan, M. Essler, *Journal of Controlled Release* **2007**, 119, 291-300.
- [15] N. Adams, U. S. Schubert, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, 59, 1504-1520.
- [16] V. P. Torchilin, *Pharm. Res.* **2007**, 24, 1-16.
- [17] M. E. Fox, F. C. Szoka, J. M. J. Frechet, *Accounts of Chemical Research* **2009**, 42, 1141-1151.
- [18] D. Weller, A. Medina-Oliva, H. Claus, S. Gietzen, K. Mohr, A. Reuter, D. Schaffel, S. Schottler, K. Koyanov, M. Bros, S. Grabbe, K. Fischer, M. Schmidt, *Macromolecules* **2013**, 46, 8519-8527.
- [19] J. Khandare, M. Calderon, N. M. Dagia, R. Haag, *Chem Soc Rev* **2012**, 41, 2824-2848.
- [20] M. J. Vicent, H. Ringsdorf, R. Duncan, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, 61, 1117-1120.
- [21] R. Luxenhofer, Y. Han, A. Schulz, J. Tong, Z. He, A. V. Kabanov, R. Jordan, *Macromol Rapid Comm* **2012**, 33, 1613-1631.
- [22] G. Cavallaro, M. Campisi, M. Licciardi, M. Ogris, G. Giammona, *Journal of Controlled Release* **2006**, 115, 322-334.
- [23] M. Hruby, C. Konak, J. Kucka, M. Vetrik, S. K. Filippov, D. Vetvicka, H. Mackova, G. Karlsson, K. Edwards, B. Rihova, K. Ulbrich, *Macromol Biosci* **2009**, 9, 1016-1027.
- [24] M. A. Venkatachalam, H. G. Rennke, *Circulation Research* **1978**, 43, 337-347.
- [25] D. E. Owens, N. A. Peppas, *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, 307, 93-102.
- [26] www.biomers.de, **2014**.
- [27] R. B. Fong, Z. L. Ding, C. J. Long, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, *Bioconjugate Chemistry* **1999**, 10, 720-725.

- [28] N. Heimann, *Dissertation* **2008**.
- [29] T. Kiefer, *Dissertation* **2010**.
- [30] S. Fluegel, T. Kiefer, N. Heimann, J. Buehler, K. Fischer, J. McDaniel, A. Chilkoti, M. Schmidt, *Abstr Pap Am Chem S* **2012**, 243.
- [31] M. Oishi, T. Hayama, Y. Akiyama, S. Takae, A. Harada, Y. Yarnasaki, F. Nagatsugi, S. Sasaki, Y. Nagasaki, K. Kataoka, *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2449-2454.
- [32] M. Oishi, F. Nagatsugi, S. Sasaki, Y. Nagasaki, K. Kataoka, *Chembiochem* **2005**, 6, 718-725.
- [33] M. Kwak, A. Herrmann, *Angewandte Chemie* **2010**, 122, 8754-8768.
- [34] D. Kedracki, I. Safir, N. Gour, N. Kien Xuan, C. Vebert-Nardin, in *Bio-Synthetic Polymer Conjugates*, Vol. 253 (Ed.: H. Schlaad), **2013**, pp. 115-149.
- [35] F. E. Alemдарoglu, K. Ding, R. Berger, A. Herrmann, *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, 45, 4206-4210.
- [36] F. Teixeira, Jr., P. Rigler, C. Vebert-Nardin, *Chem Commun* **2007**, 1130-1132.
- [37] C. Y. J. Yang, M. Pinto, K. Schanze, W. H. Tan, *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, 44, 2572-2576.
- [38] A. B. Lowe, C. L. McCormick, *Chemical Reviews* **2002**, 102, 4177-4189.
- [39] T. Alfrey, H. Morawetz, E. B. Fitzgerald, R. M. Fuoss, *J Am Chem Soc* **1950**, 72, 1864-1864.
- [40] D. J. Liaw, W. F. Lee, Y. C. Whung, M. C. Lin, *J Appl Polym Sci* **1987**, 34, 999-1011.
- [41] J. Nagaya, H. Uzawa, N. Minoura, *Macromol Rapid Comm* **1999**, 20, 573-576.
- [42] T. Hamaide, L. Germanaud, P. Leperchec, *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics* **1986**, 187, 1097-1107.
- [43] S. Jiang, Z. Cao, *Adv Mater* **2010**, 22, 920-932.
- [44] A. Reisch, J.-C. Voegel, G. Decher, P. Schaaf, P. J. Mesini, *Macromol Rapid Comm* **2007**, 28, 2217-2223.
- [45] H. Schlaad, C. Diehl, A. Gress, M. Meyer, A. L. Demirel, Y. Nur, A. Bertin, *Macromol Rapid Comm* **2010**, 31, 511-525.
- [46] W. Seeliger, Aufderha.E, W. Diepers, R. Feinauer, R. Nehring, W. Thier, H. Hellmann, *Angewandte Chemie-International Edition* **1966**, 5, 875-&.
- [47] D. A. Tomalia, D. P. Sheetz, *Journal of Polymer Science Part a-1-Polymer Chemistry* **1966**, 4, 2253-&.
- [48] T. Kagiya, S. Narisawa, T. Maeda, K. Fukui, *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Letters* **1966**, 4, 441-&.
- [49] T. G. Bassiri, A. Levy, M. Litt, *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Letters* **1967**, 5, 871-&.
- [50] I. Dimitrov, B. Trzebicka, A. H. E. Muller, A. Dworak, C. B. Tsvetanov, *Progress in Polymer Science* **2007**, 32, 1275-1343.
- [51] C. Weber, C. Remzi Becer, W. Guenther, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, *Macromolecules* **2009**, 43, 160-167.
- [52] R. H. Jin, *Adv Mater* **2002**, 14, 889-892.
- [53] D. W. Branch, B. C. Wheeler, G. J. Brewer, D. E. Leckband, *Biomaterials* **2001**, 22, 1035-1047.
- [54] T. X. Viegas, M. D. Bentley, J. M. Harris, Z. Fang, K. Yoon, B. Dizman, R. Weimer, A. Mero, G. Pasut, F. M. Veronese, *Bioconjugate Chemistry* **2011**, 22, 976-986.
- [55] J. Morrison, S. S. Briggs, N. Green, K. Fisher, V. Subr, K. Ulbrich, S. Kehoe, L. W. Seymour, *Molecular Therapy* **2008**, 16, 244-251.

- [56] D. H. S. G. Moad, *The Chemistry of Radical Polymerisation*, Elsevier, Oxford, **2006**.
- [57] P. Cacioli, D. G. Hawthorne, R. L. Laslett, E. Rizzardo, D. H. Solomon, *Journal of Macromolecular Science-Chemistry* **1986**, A23, 839-852.
- [58] J. Krstina, G. Moad, E. Rizzardo, C. L. Winzor, C. T. Berge, M. Fryd, *Macromolecules* **1995**, 28, 5381-5385.
- [59] 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, 5559-5562.
- [60] C. Barner-Kowollik, *Handbook of RAFT Polymerization*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [61] A. J. Convertine, N. Ayres, C. W. Scales, A. B. Lowe, C. L. McCormick, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 1177-1180.
- [62] G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Polymer* **2008**, 49, 1079-1131.
- [63] G. Moad, J. Chiefari, Y. K. Chong, J. Krstina, R. T. A. Mayadunne, A. Postma, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Polymer International* **2000**, 49, 993-1001.
- [64] G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, *Aust J Chem* **2005**, 58, 379-410.

3 Charakterisierungsmethoden

3.1 MALDI-TOF-Massenspektrometrie^[1]

MALDI-TOF-MS ist die Abkürzung für Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectroscopy. Es ist eine Absolutmethode, mit der man das Zahlen- und Gewichtsmittel von Polymeren bestimmen kann.

Für die Probenpräparation wird der 1000-fache Überschuss an organischer Matrix mit dem Polymer und Lösungsmittel gemischt. Danach wird die Probe auf einen Probenträger aufgetragen und das Lösungsmittel verdunstet. Dadurch kristallisiert die Matrix und die Polymere werden dispergiert.

Der Aufbau eines MALDI-TOF-Massenspektrometers ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Das Spektrometer besteht meistens aus einem Stickstofflaser mit der Wellenlänge $\lambda=337\text{ nm}$ und einer Vakuumkammer. In der Vakuumkammer wird die Probe auf dem

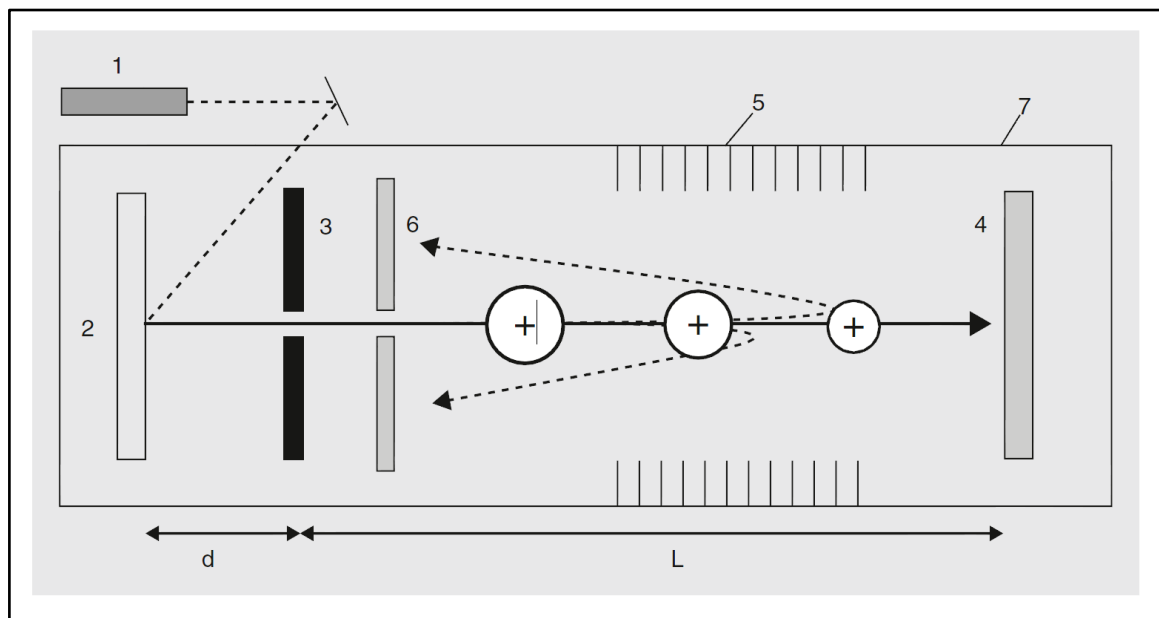


Abbildung 3.1: Aufbau eines MALDI-TOF-Massenspektrometers mit 1. Laser, 2. Probenträger, 3. Beschleunigungselektrode, 4. Linear-Detektor, 5. Reflektor, 6. Reflektordetektor, 7. Vakuumkammer, d=Beschleunigungsstrecke, L=feldfreie Flugstrecke^[1]

Probenträger über eine Beschleunigungselektrode auf einen Lineardetektor beschleunigt.

Durch die Verwendung eines Ionenspiegels wird am Ende des Flugfeldes ein elektrisches Feld mittels ringförmiger Elektroden angelegt, welches entgegengesetzt zum Beschleunigungsfeld wirkt. Die Ionen werden dadurch abgebremst und in die entgegengesetzte Richtung beschleunigt. Wird ein Gradient des E-Feldes angelegt, so wird die Energieverteilung der Ionen, die durch den Laserimpuls entstanden ist, verringert und die Auflösung des Spektrums verbessert. Diese beschriebene Anordnung nennt man Reflektron.

Die Matrix zeigt im Wellenlängenbereich des Lasers eine hohe Absorption. Im Hochvakuum wird durch einen kurzen Laserimpuls von 3-5 Nanosekunden auf die auf dem Probenträger befindliche Probe Energie übertragen. Dies führt zu einem explosionsartigen Übergang von der Fest- in die Gasphase.

Die Matrix ist nicht nur für die Energieübertragung sondern auch für die Ionisierung der Probe wichtig. Die Probe wird durch Protonenübertrag oder Zugabe eines Kationisierungssalzes wie Silber-, Kalium- oder Natriumsalz ionisiert.

Die Ionen werden durch ein elektrostatisches Feld beschleunigt und ihre Flugzeit gemessen. Daraus erhält man ein Verhältnis von Ladung zu Masse. Die Flugzeiten

liegen im Bereich von Millisekunden.

Ein charakteristisches MALDI-TOF-Spektrum ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

Bei der MALDI-TOF-MS-Messung kann eine Diskriminierung höherer Molmassen und damit eine Verfälschung der Ergebnisse auftreten.

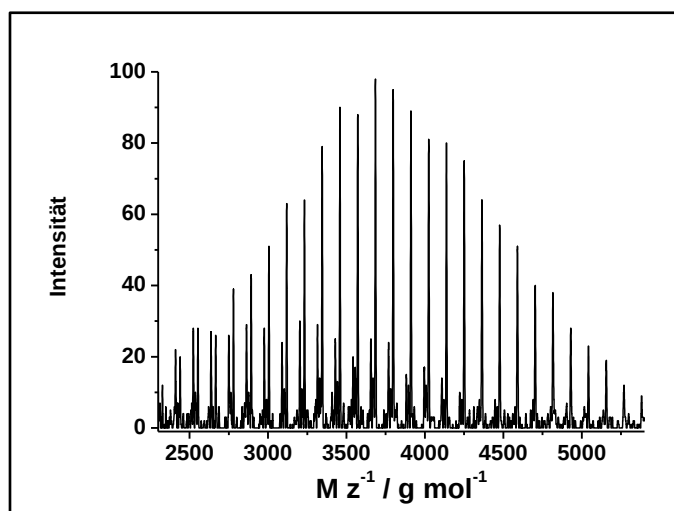


Abbildung 3.2: MALDI-TOF-Spektrum

3.2 Gelpermeationschromatografie^[1]

Die Gelpermeationschromatografie ist eine relative Methode zur Bestimmung der Molmasse und der Polydispersität und beruht auf dem Prinzip des Größenausschlusses.

Sie wird nach der englischen Bezeichnung mit SEC nach Size Exclusion Chromatography abgekürzt.

Der Aufbau besteht aus einem Injektor, einer Pumpe, Trennsäulen und Detektoren. Als Detektoren werden Brechungsindex- und UV-Vis-Detektoren verwendet, möglich sind aber auch IR-, Viskositäts-, Lichtstreu-, Fluoreszenz- und Leitfähigkeitsdetektoren.

Die Auftrennung erfolgt wie in Abbildung 3.3 dargestellt auf Grund der unterschiedlichen Molekülgröße bzw. unterschiedlichen hydrodynamischen Radien. In den Trennsäulen befindet sich eine stationäre Phase aus porösem Polymergel mit unterschiedlichen Porengrößen. Je nach Größe des Polymers dringt dieses unterschiedlich tief in die Poren ein. Ein kleines Molekül kann in mehr Poren eindringen als ein großes Molekül, legt damit eine größere Wegstrecke zurück und eluiert später.

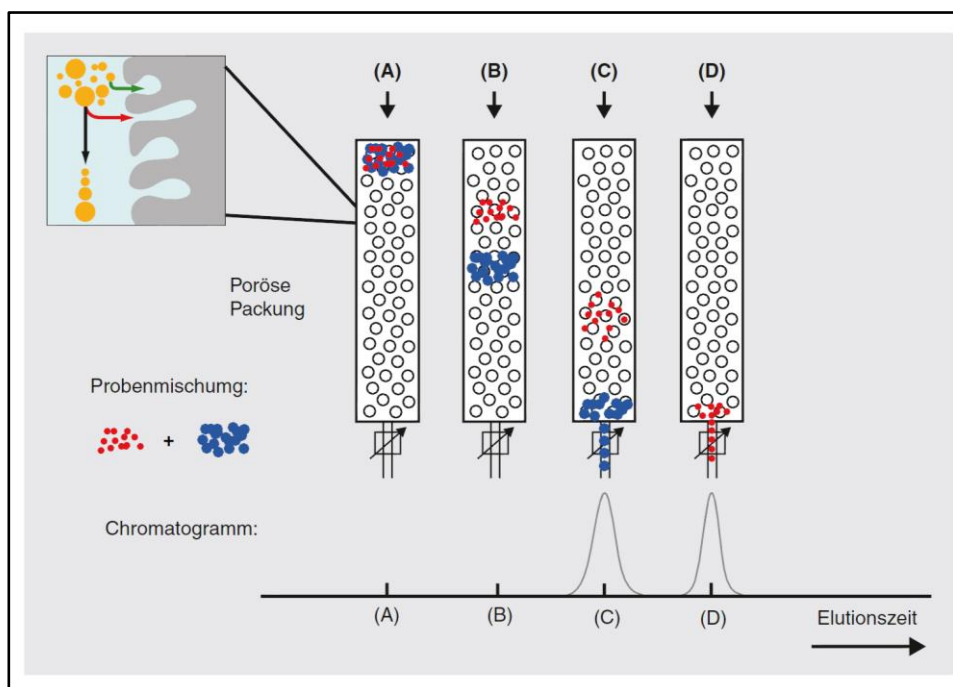


Abbildung 3.3: schematische Darstellung der Probenauftrennung mittels Gelpermeationschromatografie^[1]

Das Elutionsvolumen V_E wird durch $V_E = V_l + V_i \cdot f(M_2)$ beschrieben.

V_l beschreibt das Volumen zwischen den Gelpartikeln und V_i das innere Volumen innerhalb der Poren. Die Funktion $f(M_2)$ gibt den Anteil der Poren an, die dem Polymer mit der Molmasse M_2 zu Verfügung stehen und hat einen Wert zwischen 0 und

1. Dadurch ergibt sich eine obere und untere Ausschlussgrenze. Diese hängen von dem verwendeten Säulensatz, Lösungsmittel, Temperatur und Polymer ab.

Die Kalibrierung der SEC erfolgt durch die Messung von engverteilten Standards. Meist werden Polystyrole mit unterschiedlicher Molmasse verwendet.

Eine charakteristische Kalibrationskurve sowie das entsprechende Elugramm sind in Abbildung 3.4 dargestellt.

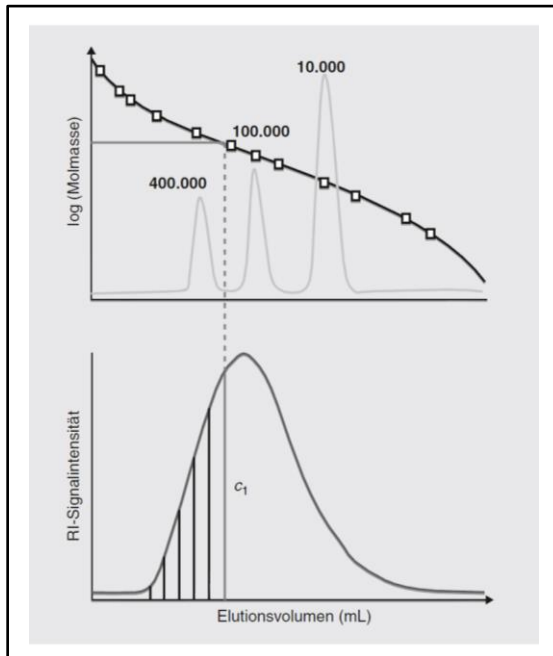


Abbildung 3.4: Kalibrierungskurve mit engverteilten Standards (oben) und eine charakteristische Elutionskurve (unten)^[1]

3.3 NMR-Spektroskopie^[4]

NMR-Spektroskopie ist die Abkürzung für kernmagnetische Resonanzspektroskopie. Ein magnetisches Moment besitzen Atome mit ungerader Zahl an Neutronen oder Protonen. Das Resonanzspektrum zeigt die Absorption elektromagnetischer Strahlung durch magnetische Atomkerne.

Bei der NMR-Spektroskopie wird ein statisches äußeres Magnetfeld angelegt.

Die magnetische Kernspinquantenzahl gibt die Orientierungsmöglichkeiten eines magnetischen Kernels, welcher sich in einem äußeren Magnetfeld befindet, an. Eine Umorientierung der Kernmomentachsen kann erzwungen werden, indem ein elektromagnetisches Wechselfeld angelegt wird. Der magnetische Vektor des Wechselfeldes muss dabei orthogonal auf dem statischen Magnetfeld stehen. Dabei wird Energie aus dem Hochfrequenzfeld aufgenommen. Die benötigte Energie ΔE und die Frequenz der absorbierten Strahlung hängen von den magnetischen Eigenschaften des Atomkerns (μ_1 = magnetisches Kernmoment; I =Kernspin) ab. ΔE ist proportional zur Stärke des äußeren Magnetfeldes H_0

$$\Delta E = h\nu = \frac{\mu_1 H_0}{I}$$

(3.1)

Besonders günstig für die NMR-Messung sind Kerne mit dem Kernspin $I = \frac{1}{2}$. Dies sind beispielsweise ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F ^{31}P . Während der Messung befindet sich die Probe im statischen Magnetfeld H_0 . Mit einer Induktionsspule wird ein hochfrequentes Wechselfeld erzeugt und die Feldstärke wird variiert bis der Resonanzfall eintritt. Dabei nimmt die Probe Energie aus dem Wechselfeld auf und es folgt eine Veränderung des Stroms, der zur Erzeugung des Wechselfeldes benötigt wird. Die Stromänderung ist das Resonanzsignal und ein kernmagnetisches Resonanzspektrum wird aufgenommen.

Bei Atomkernen mit Elektronenhülle, wird der Kern von der Hülle abgeschirmt und damit das äußere Magnetfeld in dessen Umgebung abgeschwächt. Dadurch ergibt sich für das effektive äußere Magnetfeld $H_{\text{eff}} = H_0 - \sigma H_0$ wobei σ die magnetische Abschirmung ist.

Das Resonanzsignal erscheint im Vergleich zu dem nicht abgeschirmten Kern bei einer höheren äußeren Feldstärke. Dieser Effekt wird chemische Verschiebung genannt, da dieser von der elektronischen und damit chemischen Umgebung des Kerns abhängt.

Um ein von der Feldstärke unabhängiges Signal zu erhalten, wird die Feldstärke (Differenz aus Feldstärke der Standardsubstanz H_s und der untersuchten Substanz H_i) durch H_0 geteilt

$$\delta_i = \frac{H_s - H_i}{H_0}$$

(3.2)

δ_i ist die dimensionslose Maßzahl für die chemische Verschiebung und wird in ppm angegeben, da sie in der Größenordnung von 10^{-5} - 10^{-7} liegt.

3.4 IR-Spektroskopie^[4]

Im Infrarotbereich erfolgt die Anregung von Molekülschwingungen, wobei der Übergang vom Schwingungszustand $v=0$ in den ersten angeregten Schwingungszustand $v=1$ auftritt. Diese Schwingungen werden als Grundschrwingungen oder Eigenschwingungen bezeichnet und haben eine Wellenzahl im Bereich von $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, wobei der Bereich von $1400 - 700 \text{ cm}^{-1}$ als finger print Bereich bezeichnet wird. Die Zahl der Schwingungsfreiheitsgrade ergibt sich aus der Differenz der $3n$ Bewegungsfreiheitsgrade (n = Anzahl der Atome) und der benötigten Freiheitsgrade für Translation und Rotation. Dadurch ergeben sich für lineare Moleküle $3n-5$ und für alle anderen Moleküle $3n-6$ Schwingungsfreiheitsgrade.

Der Übergang erfolgt durch die Änderung des elektrischen Dipolmoments bei der Aufnahme von IR-Strahlung. Für starke polare Gruppen erhält man intensive Banden. Die im IR verbotenen Übergänge werden durch die Raman-Spektroskopie erfasst.

Bei den Grundschrwingungen gibt es zwei Arten von Schwingungen. Zum einen sind Valenz- und Streckschwingungen möglich. Bei diesen Schwingungen ändert sich der Abstand der Atome in Bindungsrichtung. Zum anderen sind Deformationsschwingungen möglich, bei den sich der Bindungswinkel ändert.

Die Schwingung eines zweiatomigen Moleküls kann näherungsweise mit dem Hook'schen Gesetz beschrieben werden. Als Modell dient die harmonische Schwingung zweier Kugeln, die mit einer Feder verbunden sind. Dadurch ergibt sich für die Wellenzahl $\tilde{\nu}$

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{K}{\mu}} \quad (3.3)$$

mit der reduzierten Masse $\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$ und der Kraftkonstante K als Maß für die Bindungsstärke. Die Frequenz steigt nach Formel (3.3) mit höherer Bindungsstärke und kleinerer Atommasse. Dadurch sind Einfachbindungen im Vergleich zu Doppel- und Dreifachbindungen zu kleineren Wellenzahlen verschoben. Bei gleicher Atommasse ist die Anregungsenergie für Deformationsschwingungen geringer als für Valenz-

oder Streckschwingungen. Dadurch sind die Valenzschwingungen zu höheren Frequenzen verschoben.

Über die IR-Spektroskopie kann ein Zusammenhang von Struktur und Absorptionsfrequenz erhalten werden. Dadurch lässt sich auf den Aufbau der chemischen Verbindung schließen.

3.5 Elektrophorese^{[5] [6]}

Die Elektrophorese beschreibt die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Sie wird zur Charakterisierung und Trennung von Gemischen verwendet. Dabei erfolgt die Trennung auf Grund der unterschiedlichen Ladung und Größe der Moleküle.

Die erste Elektrophorese wurde 1937 von Arne Tiselius^[7] entwickelt.

Durch das Anlegen des elektrischen Feldes E wandern die Ionen mit einer konstanten Wanderungsgeschwindigkeit u

$$u = \mu \cdot E = \frac{L}{t} \quad (3.4)$$

wobei μ die elektrophoretische Mobilität, L die Wegstrecke und t die Migrationszeit der Probe ist.

Auf die Ionen wirkt dabei im E -Feld das Kräftegleichgewicht aus Beschleunigungskraft K_B mit der Elementarladung e und der Ladungszahl z

$$K_B = z \cdot e \cdot E \quad (3.5)$$

und der Reibungskraft K_R

$$K_R = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_h \cdot u \quad (3.6)$$

mit der dynamischen Viskosität η und dem hydrodynamischen Radius R_h .

Durch Gleichsetzen der Kräfte ergibt sich für die Wanderungsgeschwindigkeit u

$$u = \frac{z \cdot e \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_h} \quad (3.7)$$

Für die elektrophoretische Mobilität folgt daraus

$$\mu = \frac{z \cdot e}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_h}$$

(3.8)

Die elektrophoretische Beweglichkeit der Moleküle ist zum einen abhängig von der Gesamtladung des Moleküls sowie der Größe und Gestalt. Weiter haben pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke des Puffers einen Einfluss.

Bei unendlicher Verdünnung haben zudem noch die Relaxations- und die Retardationskraft einen Einfluss. Diese Kräfte werden durch die ionische Umgebung des Teilchens erzeugt. Jedes Teilchen ist nach der Debey-Hückel-Theorie von einer Hülle entgegengesetzt geladener Ionen umgeben. Die Kraft, die durch das Anlegen des E-Feldes auf diese Hülle wirkt, wird auf die Lösungsmittelmoleküle übertragen. Dadurch bewegt sich das Teilchen nicht durch eine stationäre Phase sondern durch eine Flüssigkeit, die in die entgegengesetzte Richtung fließt. Durch diesen Retardationseffekt wird die Wanderungsgeschwindigkeit des Teilchens verkleinert. Durch diesen Effekt wird die ionische Hülle des Teilchens bei der Wanderung auf Grund des E-Feldes in die entgegengesetzte Richtung gezogen und verkleinert somit nochmals die Wanderungsgeschwindigkeit. Diese Kraft wird als Relaxationskraft bezeichnet. Dadurch nimmt mit steigender Ionenstärke des Teilchens die Mobilität ab.

Die Gleichung (3.8) kann jedoch nur für kugelförmige Teilchen in unendlich verdünnter Lösung angewendet werden. Um die elektrophoretische Mobilität von flexiblen Polyelektrolyten abzuleiten hat Muthukumar einen Ansatz entwickelt, wo die Kettenexpansion der Polyelektrolyte und die reziproke Debye-Länge κ bzw. die zugesetzte Salzkonzentration berücksichtigt wird

$$\mu = \frac{z \cdot e}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_g} \cdot M(\kappa R_g)$$

(3.9)

mit $\kappa = \sqrt{\frac{2F^2 I}{\epsilon \epsilon_0 R T}}$ wobei F die Faraday-Konstante, I die Ionenstärke der Lösung, ϵ die Permittivität des Lösungsmittels bzw. vom Vakuum, R die universelle Gaskonstante und T die Temperatur ist^[8].

Der Korrekturfaktor $M(\kappa R_g)$ beschreibt den Einfluss der Salzkonzentration auf die Form und Größe des Polyelektrolyten mittels des Strukturfaktors $S(kR_g)$

$$M(\kappa R_g) = \frac{2R_g}{\pi N} \int_0^\infty \frac{k^2}{k^2 + \chi^2} S(kR_g) dk \quad (3.10)$$

Der Strukturfaktor, den Muthukumar einführt, ist eine Näherung, die den Exponenten v der Abhängigkeit von Molmasse und Trägheitsradius ($R_g \sim M^v$) berücksichtigt^[9]

$$S(kR_g) \sim \frac{N}{\left(1 + \frac{2v}{3} k^2 R_g^2\right)^{\frac{1}{2v}}} \quad (3.11)$$

3.5.1 Kapillarelektrophorese^[6]

In der Kapillarelektrophorese wird hauptsächlich zwischen den zwei Trenntechniken Kapillarzonenelektrophorese und Kapillargelelektrophorese unterschieden.

In der Kapillarzonenelektrophorese ist die Kapillare mit dem Elektrolyten gefüllt und die Trennung erfolgt auf Grund der Mobilitätsdifferenz. Im Gegensatz dazu ist bei der Kapillargelelektrophorese die Kapillare mit einer Gel- oder Polymerlösung gefüllt. Durch die Behinderung der Probe durch die Gelmatrix ist der Transport der Moleküle von der Ladung und dem Trennungsverhalten der Gelmatrix abhängig. Im weiteren Verlauf wird nur auf die erste Methode eingegangen.

Als Kapillare wird eine dünne Quarzkapillare mit einem Durchmesser von 50-100 μm verwendet, welche aus amorphem Siliciumoxid gezogen wird. Zur besseren Handhabung ist sie mit einer Polyimidschicht überzogen.

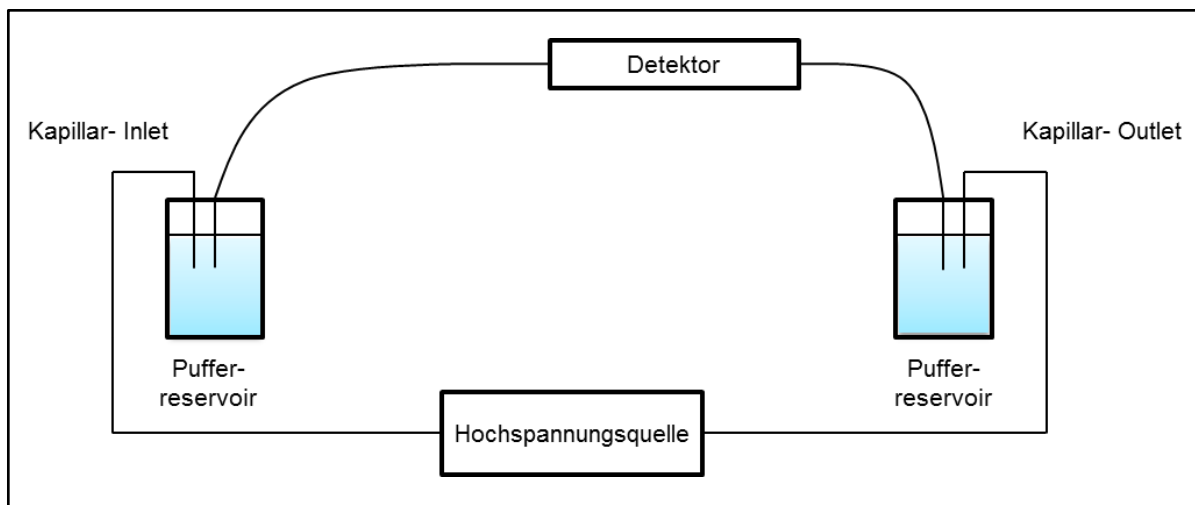


Abbildung 3.5: schematische Darstellung des Aufbaus der Kapillarelektrophorese

Die Kapillare wird bei der Messung in zwei Probengefäße getaucht, zwischen denen mit Hilfe einer Hochspannungsquelle eine Spannung zwischen 10-30 kV angelegt wird (Abbildung 3.5).

Die Detektion wird mit Hilfe eines UV-Detektors durchgeführt.

Die Probeninjektion erfolgt entweder durch Druck bzw. Vakuum oder per elektrokinetischer Injektion. Die erstgenannte Injektion ist von Vorteil, da hier kein Diskriminierungseffekt der Ionen auftritt.

Durch das Anlegen des elektrischen Feldes E wandern die Ionen mit einer konstanten Wanderungsgeschwindigkeit u

$$u = \mu \cdot E = \frac{L_{eff}}{t} \quad (3.12)$$

wobei μ die elektrophoretische Mobilität, L_{eff} die Länge der Kapillare bis zum Detektor und t die Migrationszeit der Probe ist.

Die Trennung der Ionen erfolgt auf Grund der verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten im Trennpuffer und kann mittels der elektrophoretischen Mobilität angegeben werden

$$\mu = \frac{L_{eff}}{t \cdot E} = \frac{L_{eff} \cdot L_{ges}}{t \cdot U} \quad (3.13)$$

Dabei ist zu beachten, dass das elektrische Feld auf der gesamten Länge L_{ges} der Kapillare wirkt und für die Detektion nur die Kapillarlänge bis zum Detektor L_{eff} relevant ist.

Für die Trennung der Ionen muss sich die elektrophoretische Mobilität und dafür nach Gleichung (3.7) das Verhältnis von Ladung zu hydrodynamischen Radius unterscheiden.

Bei der Messung mit einem Puffer mit einem pH-Wert deutlich über 2 liegen die Silanolgruppen der Kapillarwand partiell dissoziiert vor. Durch Anlagerung der Kationen des Puffers bilden sich eine starre Sternschicht und eine bewegliche Schicht bestehend aus Kationen aus. Dies ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Durch die Ladungsverteilung kommt es zum Potentialaufbau (ξ -Potential). In der starren Sternschicht ist die Potentialabnahme linear. In der diffusen Grenzschicht dagegen erfolgt eine exponen-

tielle Abnahme. Den durch die Wanderung der diffusen Grenzschicht entstehenden Fluss nennt man elektroosmotischen Fluss.

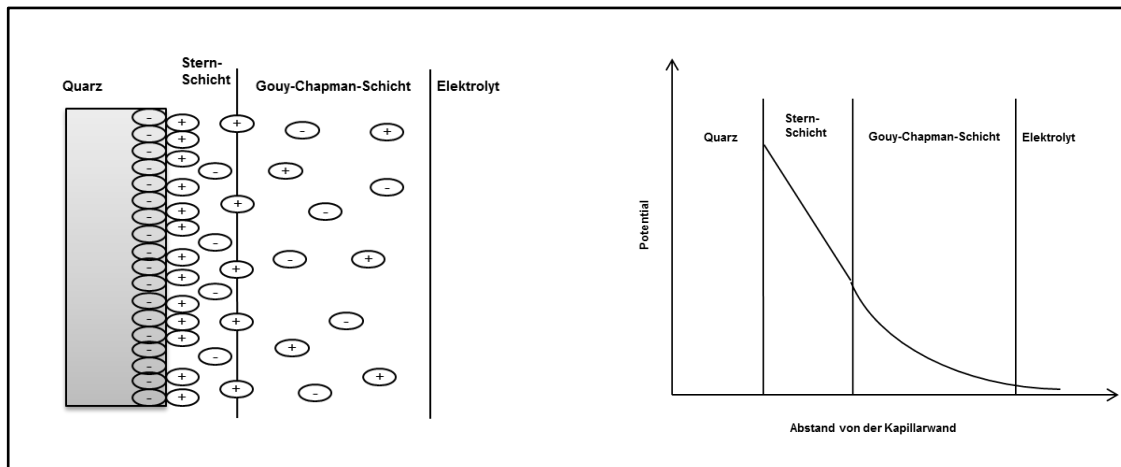


Abbildung 3.6: Ladungsverteilung in der Oberfläche des Quarzes und Ausbildung des ξ -Potentials mit starrer Grenzschicht und Stern-Grenzschicht (links) sowie der Verlauf des ξ -Potentials an der Grenzfläche Puffer/Quarz (rechts)

Durch den elektroosmotischen Fluss (EOF) bewegt sich die gesamte Flüssigkeit in der Kapillare in Richtung der Kathode und es bildet sich durch das ξ -Potential ein stempelförmiges Profil aus.

Bei Messungen in Anwesenheit des elektroosmotischen Flusses werden zuerst kationische Moleküle detektiert. Bei gleicher Gesamtladung eluieren erst kleinere und dann größere Moleküle (Abbildung 3.7).

Als nächste Gruppe eluieren neutrale Moleküle, die nicht nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

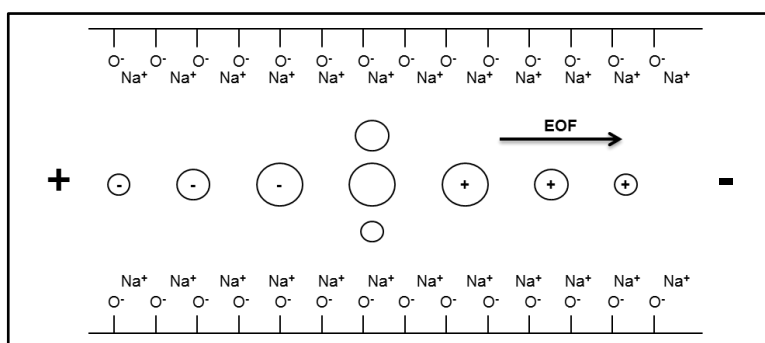


Abbildung 3.7: Wanderungsgeschwindigkeiten der Moleküle beeinflusst durch den elektroosmotischen Fluss

Diese werden durch den EOF mitgenommen und eluieren gleichzeitig mit der Pufferlösung.

Anionische Moleküle dagegen können nur detektiert werden, wenn die Migrationsgeschwindigkeit

geringer als der EOF ist. Es werden bei gleicher Gesamtladung zuerst anionische Moleküle mit größerem hydrodynamischem Radius detektiert.

3.5.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese^[5]

Für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird durch radikalische Polymerisation von Acrylamid mit Ammoniumperoxodisulfat (APS) als Radikalstarter und Tetramethylen-diamin (TEMED) als Polymerisationskatalysator ein dreidimensionales Netzwerk hergestellt. Durch die Konzentration von Acrylamid kann die Porengröße variiert werden. Normalerweise werden Acrylamidkonzentrationen zwischen 2% und 30% (w/v) verwendet. Dabei gilt je höher die Acrylamidkonzentration, desto kleiner werden die Poren. Bei einem 20% Gel erhält man beispielsweise Poren mit einer Größe von 3,3 nm.

Die Auftrennung der Probe erfolgt durch den Siebeffekt des Gels.

Durch den verwendeten Ladepuffer besitzt die negative Gesamtladung jeder Probe ein einheitliches Verhältnis von Ladung zu Masse. Dadurch erfolgt die Auftrennung nur auf Grund des hydrodynamischen Radius der Probe und nicht auf Grund der Ladung.

Zudem können native und denaturierte Gele verwendet werden. Bei nativen Gelen werden im Gegensatz zu denaturierten Gelen die Proteine nicht denaturiert und die Überstrukturen bleiben erhalten.

Die Anfärbung der aufgetrennten Produkte im Gel erfolgt durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen wie beispielsweise GelRed[®].

3.6 Lichtstreuung^[10]

In der Lichtstreuung wird das Streulicht zur Charakterisierung von Partikeln verwendet.

Licht ist eine elektromagnetische Welle, welche mit der Wellengleichung

$$E(x, t) = E_0 \cdot \cos\left(\frac{2\pi x}{\lambda} - \frac{2\pi t}{\lambda/c}\right)$$

(3.14)

beschrieben wird. Durch das Auftreffen der elektromagnetischen Welle auf ein Partikel wird ein Hertz'scher Dipol induziert (Abbildung 3.8). Der Dipol oszilliert dadurch selbst und sendet eine elektromagnetische Welle mit der gleichen Wellenlänge wie die absorbierte Welle aus. Dies wird als elastische Streuung bezeichnet.

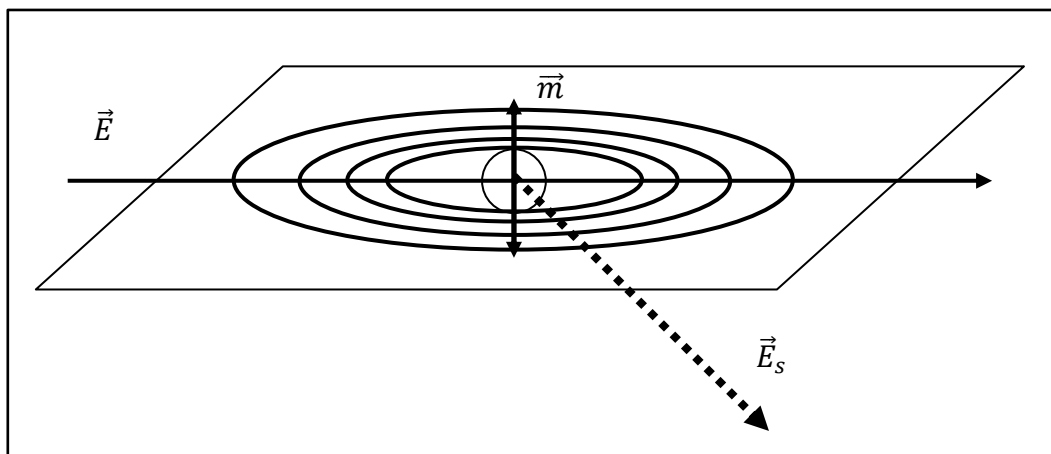


Abbildung 3.8: Ausbildung des Hertz'schen Dipols^[2]

3.6.1 Statische Lichtstreuung

Die statische Lichtstreuung ist winkelabhängig und es wird ein Mittelwert über die Zeit gebildet. Durch die Messung kann man die Molmasse und Partikelform des Polymers erhalten.

Der Streuvektor q beschreibt die Differenz von Wellenvektor der austretenden Welle k und der eintretenden Welle k_0 .

Der Winkel zwischen den beiden Wellenvektoren wird als Streuwinkel Θ bezeichnet. Mit der Wellenlänge im Vakuum λ_0 und dem Refraktionsindex n ergibt sich für den Streuvektor

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\Theta}{2}\right) \quad (3.15)$$

Die Änderung der Polarisierbarkeit kann durch die Änderung des Brechungsindex mit der Konzentration ausgedrückt werden (dn/dc). Dies ist ein charakteristischer Wert für das Polymer-/ Lösungsmittelpaar.

Partikel kleiner als $\lambda/20$ werden als Punktstreuer bezeichnet, da keine intrapartikulären Interferenzen auftreten. Dadurch ist die Lichtstreuintensität winkelunabhängig und kann durch

$$I \sim KkT \frac{c}{\left(\frac{\partial \pi}{\partial c}\right)_{T,N}} \quad (3.16)$$

mit Kontrastfaktor K , Boltzmannkonstante k und der osmotischen Kompressibilität $\left(\frac{\partial \pi}{\partial c}\right)$ beschrieben werden. Für die osmotische Kompressibilität gilt für ideale Lösungen nach van't Hoff

$$\frac{\partial \pi}{\partial c} = \frac{kT}{M} \quad (3.17)$$

Für reale Lösungen müssen die enthalpischen Wechselwirkungen von Lösung und Lösungsmittel beschrieben werden.

$$\frac{\partial \pi}{\partial c} = kT \left(\frac{1}{M} + 2A_2c + \dots \right) \quad (3.18)$$

Durch die Einführung des Rayleigh Ratio und erhält man

$$\frac{K_2 c_2}{R(\theta)} = \frac{1}{M_2} + 2A_2 c_2 + 3A_3 c_2^2 + \dots$$

(3.19)

Bei Partikeln, die größer als $\lambda/20$ sind, gibt es mehrere Streuzentren pro Partikel und damit intramolekulare Wechselwirkungen. Dadurch entsteht konstruktive und destruktive Interferenz des Streulichtes und somit eine Winkelabhängigkeit des Streulichts. Für Partikel mit der Größe $\lambda > d > \lambda/20$ wird der Formfaktor $P(q)$ eingeführt. Dieser beschreibt die Streuintensität, die auf den intramolekularen Wechselwirkungen beruht und ist mathematisch die Summe über alle Amplituden des gestreuten elektrischen Feldes. Der Formfaktor ist charakteristisch für Größe und Form der gestreuten Partikel. Für Partikel kleiner $\lambda/20$ ist $P(q)=1$.

Daraus ergibt sich die Zimm-Gleichung

$$\frac{K_2 c_2}{R(\theta)} = \frac{1}{M_2} + \left(1 + \frac{1}{3} q^2 \langle R_g^2 \rangle\right) + 2A_2 c_2 + 3A_3 c_2^2 + \dots$$

(3.20)

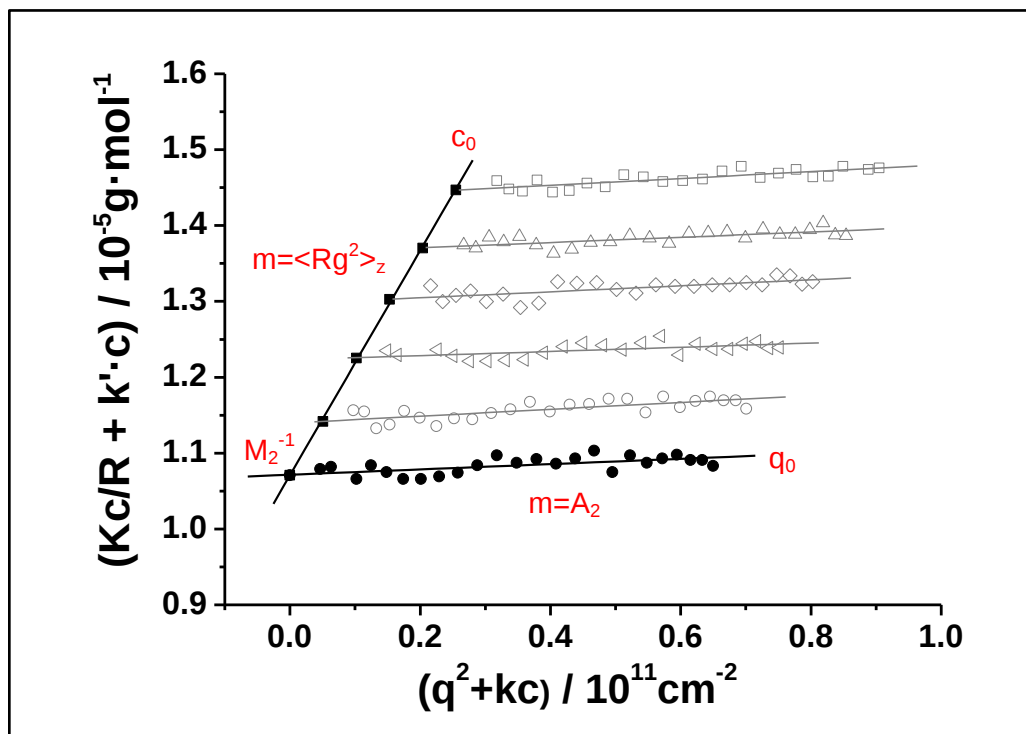


Abbildung 3.9: charakteristischer Zimmplot

Durch Extrapolation von $Kc/R(\Theta)$ gegen $c_2=0$ und $q=0$, erhält man als y-Achsenabschnitt M_2^{-1} und aus der Steigung der Konzentrationsabhängigkeit den zweiten Virialkoeffizient A_2 .

Der Trägheitsradius R_g lässt sich aus der Steigung der q -Abhängigkeit bestimmen. Die Auftragung der Extrapolation wird als Zimm-Plot bezeichnet und ist in Abbildung 3.9 dargestellt.

Durch die statische Lichtstreuung wird das Gewichtsmittel der Molmasse

$$M_w = \frac{\sum_{k=1}^K N_k M_k M_k}{\sum_{k=1}^K N_k M_k} \quad (3.21)$$

erhalten.

3.6.2 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung liefert eine zeitabhängige Intensität bei einem Winkel. Die unterschiedlichen Intensitätsfluktuationen im Streuvolumen beruhen auf Dichte- und Konzentrationsfluktuationen.

Größere Partikel besitzen eine langsamere Brown'sche Bewegung als kleinere Partikel, was sich in der zeitabhängigen Streuintensität zeigt.

Für eine quantitative Messung der zeitabhängigen Fluktuation wird die Zeitkorrelationsfunktion $G_s(r, \tau)$ welche auch als van-Hove-Ort-Zeit-Korrelation bezeichnet wird, verwendet.

$$G_s(r, \tau) = \langle \rho(r, \tau) \rho(r, t + \tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T \rho(r, t) \rho(r, t + \tau) dt \quad (3.22)$$

Dabei beschreibt τ die Korrelationszeit. Diese Funktion beschreibt die Wahrscheinlichkeit ein Partikel im Abstand r zur Zeit τ zu finden. Durch eine Fouriertrans-

formation $F_s(q, \tau)$ kann die van-Hove-Ort-Zeit-Korrelation vom realen Raum in den q -Raum transformiert werden.

$$F_s(q, \tau) = \int_0^\infty e^{-i\vec{q}\vec{r}} G_s(r, \tau) d\vec{r} \quad (3.23)$$

Aus der experimentell ermittelten Lichtstreuintensität

$$\langle I(q, 0)I(q, \tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T I(q, t)I(q, t + \tau) dt \quad (3.24)$$

ergibt sich die Autokorrelationsfunktion der Amplituden des elektrischen Feldes $g_1(q, t)$.

$$g_1(q, \tau) = \frac{\langle E_s(q, 0)E_s(q, \tau) \rangle}{\langle E_s(q) \rangle^2} \quad (3.25)$$

Die Autokorrelationsfunktion beschreibt die Korrelation der Amplitude des gestreuten elektrischen Feldes eines Partikels am Ort r zur Zeit $\tau=0$ und des selben Partikels am Ort r' zur Zeit τ . Die Intensität und Autokorrelationsfunktion des elektrischen Feldes sind verbunden durch die Siegert-Relation

$$g_1(q, \tau) = B\sqrt{g^2(q, \tau) - 1} \quad (3.26)$$

Daraus ergibt sich, wenn die Amplitude des elektrischen Feldes direkt verbunden mit der Dichtefluktuation ist,

$$g_1(q, \tau) = e^{-q^2 D \tau} \quad (3.27)$$

Der Diffusionskoeffizient D kann durch die Stokes-Einstein-Gleichung in den hydrodynamischen Radius R_h überführt werden

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$$

(3.28)

3.6.3 Aufbau der Lichtstreuanlage

Die Lichtstreuanlage besitzt als Lichtquelle einen Laser. Über verschiedene Linsen und ein Pinhole zur Fokussierung wird das Laserlicht durch eine zylindrische Quarzküvette, die sich in einem Toluolbad befindet, geleitet. Das Toluolbad wird mit Hilfe eines Thermostaten temperiert. Als Detektor wird ein Photomultiplier verwendet, der an einem bewegbaren Goniometer befestigt ist.

Die Analyse erfolgt durch Korrelator, Digital-Analog-Konverter und einen Computer (Abbildung 3.10).

Bei der Vielwinkelanlage sind mehrere Detektoren im festen Abstand zueinander am Goniometer befestigt. Dadurch sind simultane Messungen bei unterschiedlichen Winkeln möglich.

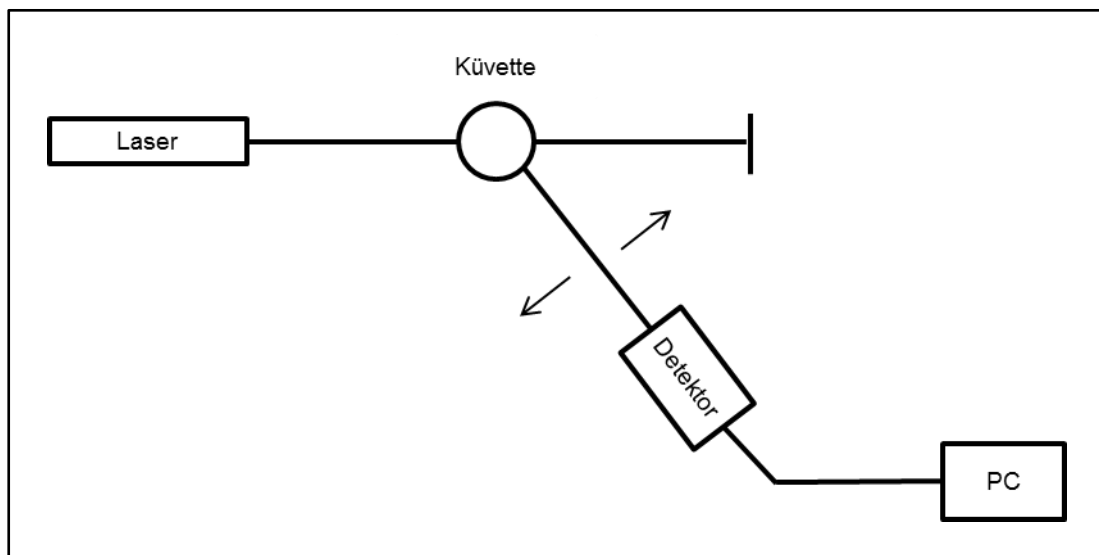


Abbildung 3.10: Aufbau der Lichtstreuanlage

3.7 Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie^[3, 5]

Die Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie (FCS) verknüpft die Laserspektroskopie mit der konfokalen Mikroskopie zu einer sehr sensitiven Analysetechnik. Bestimmt werden können dadurch dynamische Eigenschaften von Partikeln wie beispielsweise der Diffusionskoeffizient und dadurch der hydrodynamische Radius von fluoreszenzmarkierten Partikeln. Die Messmethode beruht auf der Detektion von fluoreszenzmarkierten Einzelmolekülen. Dafür wird ein sehr kleines Volumen ($1 \mu\text{m}^3 = 1 \text{ fL}$) mit sehr geringer Konzentration der fluoreszierenden Partikel benötigt.

Der Aufbau eines FCS-Geräts beruht auf dem System eines inversen konfokalen Mikroskops und ist in Abbildung 3.11 dargestellt.

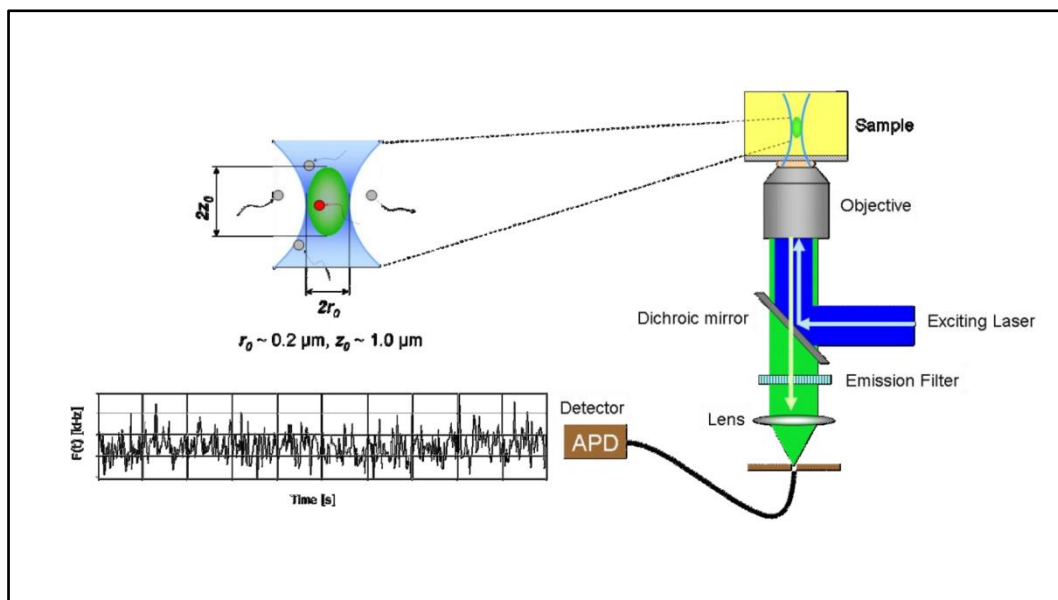


Abbildung 3.11: Aufbau eines Fluoreszenzkorrelations-Spektrometers (rechts), eine Vergrößerung des FCS-Messvolumens (links oben) und die Zeitspur einer exemplarischen Messung (links unten)^[3]

Der Laserstrahl wird über einen dichroitischen Spiegel in ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur gelenkt. Der Laserstrahl wird auf die Probe fokussiert und die emittierte Fluoreszenz durch das gleiche Objektiv und den gleichen dichroitischen Spiegel über ein konfokales Pinhole vom Detektor aufgenommen.

Durch diesen Aufbau kann ein extrem schmales, ellipsoides Probenvolumen erhalten werden.

Die Anzahl der Moleküle im Probenvolumen zu einer bestimmten Zeit ist durch die Poissonverteilung gegeben. Dadurch ergibt sich für das Signal-Rausch-Verhältnis

$$\frac{\sqrt{\langle(\delta N)^2\rangle}}{\langle N\rangle} = \frac{\sqrt{\langle(N - \langle N\rangle)^2\rangle}}{\langle N\rangle}$$

(3.29)

Da die relative Fluktuation der Partikel bei höherer Konzentration sinkt, ist es wichtig bei niedrigen Probekonzentrationen zu messen.

Hängen alle Fluktuationen nur von der Änderung der lokalen Konzentration ab, lässt sich die Änderung der Fluoreszenzintensität durch

$$\delta F(t) = \kappa \int I_{ex}(\underline{r}) \cdot S(\underline{r}) \cdot \delta(\sigma \cdot q \cdot C(\underline{r}, t)) \cdot dV$$

(3.30)

beschreiben. Der Parameter κ bezeichnet die vollständige Detektionseffektivität, die nicht vom Abstand r oder der Zeit t abhängt. I_{ex} beschreibt die räumliche Verteilung der Anregungsenergie, $S(\underline{r})$ den optischen Transfer der Objektiv-Pinhole Kombination und $\delta(\sigma \cdot q \cdot C(\underline{r}, t))$ die Fluktuation des fluorophoren Stoffes.

Die temporäre Fluktuation der detektierten Fluktuationsintensität $\delta I_F(t)$ lässt sich durch die Autokorrelationsfunktion

$$G(t) = \frac{\langle \delta I_F(t) \cdot \delta I_F(t + \tau) \rangle}{\langle I_F(t) \rangle^2} = G'(t) - 1 = \frac{\langle I_F(t) \cdot I_F(t + \tau) \rangle}{\langle I_F(t) \rangle^2} - 1$$

(3.31)

beschreiben. Der Term $\delta I_F(t) = I_F(t) - \langle I_F(t) \rangle$ beschreibt die Fluktuation der Fluoreszenzintensität vom Mittelwert der Fluoreszenzintensität $\langle I_F(t) \rangle$.

Die Eintrittswahrscheinlichkeit der Partikel in das konfokale Volumen lässt sich durch eine Poisson-Verteilung beschreiben. Dadurch ist es möglich aus der Intensitätskorrelationsfunktion Diffusionszeiten τ_D zu bestimmen

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

(3.32)

mit der Korrelationszeit τ , der mittleren Teilchenzahl N im Detektionsvolumen und dem Achsenverhältnis S des ellipsoiden Detektionsvolumen.

Der Diffusionskoeffizient D des fluoreszierenden Partikels lässt sich aus τ_D berechnen, wobei der Diffusionskoeffizient D_{ref} und die Korrelationszeit τ_{Ref} benötigt werden

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D}$$

(3.33)

mit $r_0 = 2\sqrt{D_{\text{Ref}}\tau_{\text{Ref}}}$.

Der hydrodynamische Radius lässt sich über die Stokes-Einstein-Gleichung analog zur dynamischen Lichtstreuung berechnen

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta_0 D}$$

(3.34)

3.8 Literaturverzeichnis Kapitel 3

- [1] M. Koltzenburg, Nuyken, *Polymere: Synthese, Eigenschaften und Anwendungen*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2014**.
- [2] W. Schärtl, *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*, Springer, **2007**.
- [3] A. Vagias, **2013**.
- [4] Becker, *Organikum Organisch-chemisches Grundpraktikum*, Vol. 22, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [5] Lottspeich, *Bioanalytik*, Elsevier GmbH, München, **2006**.
- [6] Engelhardt, *Kapillarelektrophorese Methoden und Möglichkeiten*, Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig/Wiesbaden, **1994**.
- [7] A. Tiselius, *The Biochemical journal* **1937**, 31, 1464-1477.
- [8] M. Muthukumar, *Electrophoresis* **1996**, 17, 1167-1172.
- [9] M. Muthukumar, *Journal of Chemical Physics* **1997**, 107, 2619-2635.
- [10] F. Gröhn, *Characterization of Polymers, Colloids and Nanostructures*, Mainz, **2009**.

4 Diskussion und Ergebnisse

4.1 Polymer-ODN-Konjugat-Bürste

Als erstes Trägersystem für die biomedizinische Anwendung soll eine Polymer-Oligonucleotid-Konjugat-Bürste (Abbildung 4.1) hergestellt werden.

Das Rückgrat dieser Bürste bildet eine Methylmethacrylatwiederholungseinheit, während die Seitenketten aus einem Polymer und einem Einzelstrang-Oligonucleotid bestehen.

Das Oligonucleotid befindet sich als äußerer Block in der Seitenkette und kann mit dem jeweiligen komplementären Einzelstrang hybridisiert werden. Durch die Hybridisierung mit einem funktionalisierten Einzelstrang können verschiedene Modifikationen eingeführt werden. Eine Azidfunktionalisierung des komplementären Einzel-

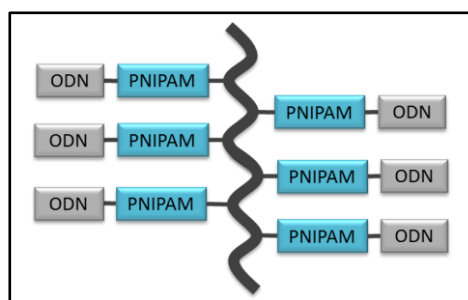


Abbildung 4.1: ODN-Polymerbürste bestehend aus einem Methylmethacrylatrückgrat und Polymer-ODN-Seitenketten

strangs ermöglicht per kupferfreier Click-Chemie Dibenzocyclooctin(DBCO)-funktionalisierte biomedizinisch relevante Stoffe zu binden. Beispielsweise ist so die Konjugation von Farbstoff, Antikörper und Antigen möglich.

Des Weiteren kann die beliebige ODN-Sequenz durch eine CpG-Sequenz ersetzt werden, welche selbst biologisch aktiv ist und die Immunantwort steigert.

Als Trägersystem wird eine Bürstenstruktur gewählt, da diese in der biomedizinischen Anwendung sehr viele Vorteile zeigt. Die hohe Molmasse der Bürste, liegt über der renalen Ausschlussgrenze und damit sollte sich die Retentionszeit im Körper verlängern. Des Weiteren konnte auch bei büstenartigen Strukturen der bereits in Abschnitt 2.1 beschriebene EPR-Effekt beobachtet werden^[4]. Durch die große Anzahl an Endgruppen der Seitenketten ist es zudem möglich mehrere funktionelle und zudem unterschiedliche Modifikationen in ein Polymer einzuführen.

Für die Seitenketten der Polymer-ODN-Konjugat-Bürste wird ein Polymer benötigt, welches sowohl in Wasser als auch im organischen Milieu löslich ist. Des Weiteren ist eine α -, ω -Aminofunktionalisierung des Polymers mit orthogonalen Schutzgruppen für die weitere Synthese des Polymer-ODN-Konjugats nötig. Als Polymerisationsmethode wird die RAFT-Polymerisation verwendet, da sich mit dieser die Endgruppenfunktionalisierung gut durchführen und kontrollieren lässt.

Als Monomer bietet sich *N*-Isopropylacrylamid an, da Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAM) alle im vorherigen Absatz geforderten Eigenschaften aufweist. Zudem besitzt PNIPAM ein LCST-Verhalten, mit einer Übergangstemperatur von 32 °C^[2].

Von Maeda wurde bereits ein Copolymer aus NIPAM und ODN-Makromonomer synthetisiert^[3], jedoch keine Bürste deren Seitenketten aus einem ODN-PNIPAM-Konjugat bestehen.

Wichtig für die Synthese ist ein Oligonucleotid, dessen Sequenz keine Wechselwirkungen mit sich selbst oder einem anderen Einzelstrang eingeht. Die Sequenz darf zudem keine Poly-Guanin-Sequenzen besitzen, da sich dadurch Guanin-Pyramide^[4] bilden können. Ebenso sind Poly-Pyrimidin- oder Poly-Purin-Abfolgen nicht von Vorteil. Diese können die sogenannte Triplex-DNA^[5] ausbilden.

Die Basenfolge muss zudem so gewählt sein, dass der Strang durch Hybridisierung mit sich selbst keine Haarnadeln bilden kann. Die Schmelztemperatur gibt die Temperatur an, bei der die Hälfte der Stränge als Einzelstrang vorliegt, und soll über 50 °C liegen. Dadurch ist gewährleistet, dass die ODN-Sequenz bei Raumtemperatur als Doppelstrang vorliegt.

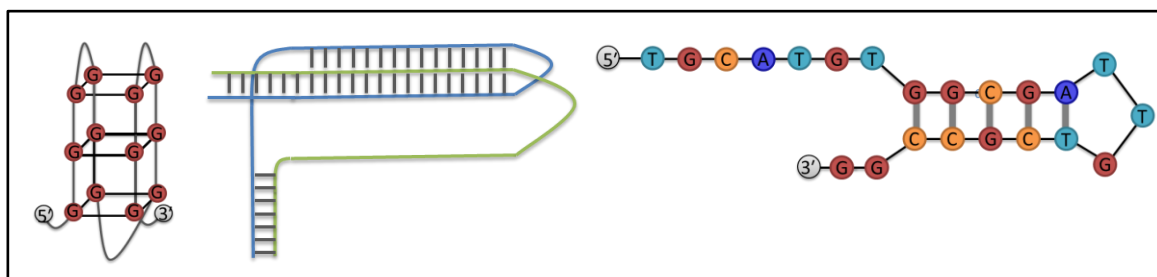


Abbildung 4.2: Wechselwirkung von Einzelstrang DNA mit sich selbst oder einem anderen Einzelstrang. links: G-Pyramide, Mitte: Triplex-DNA, rechts: Haarnadel

Poly-G-Pyramide, Triplex-DNA und Haarnadel sind schematisch in Abbildung 4.2 dargestellt.

Für die einfachere Synthese und bessere Aufreinigung wird als Syntheseansatz eine ODN-Sequenz gewählt, die an einen Träger (controlled pore glass) gebunden ist. Als ODN wird eine 23 Basensequenz mit *N*-Hydroxysuccinimid(NHS)-Funktionalisierung am 5'-Ende mit folgender Basenpaarung 5'-gtc ctc gcc tgt ttc att ga-3' verwendet, die von der Firma Biomers synthetisiert und von dieser bezogen worden ist. Mit dem 3'-Ende ist das Oligonucleotid an den Träger gebunden.

In Abbildung 4.3 ist schematisch die Synthese des Polymer-ODN-Konjugats dargestellt. Die NHS-funktionalisierte ODN-Sequenz reagiert mit der freien Aminogruppe des Polymers und es entsteht ein Polymer-ODN-Konjugat, welches am Träger gebunden ist. Durch Behandlung mit konzentrierter wässriger Ammoniaklösung wird das Konjugat vom Träger abgespalten.

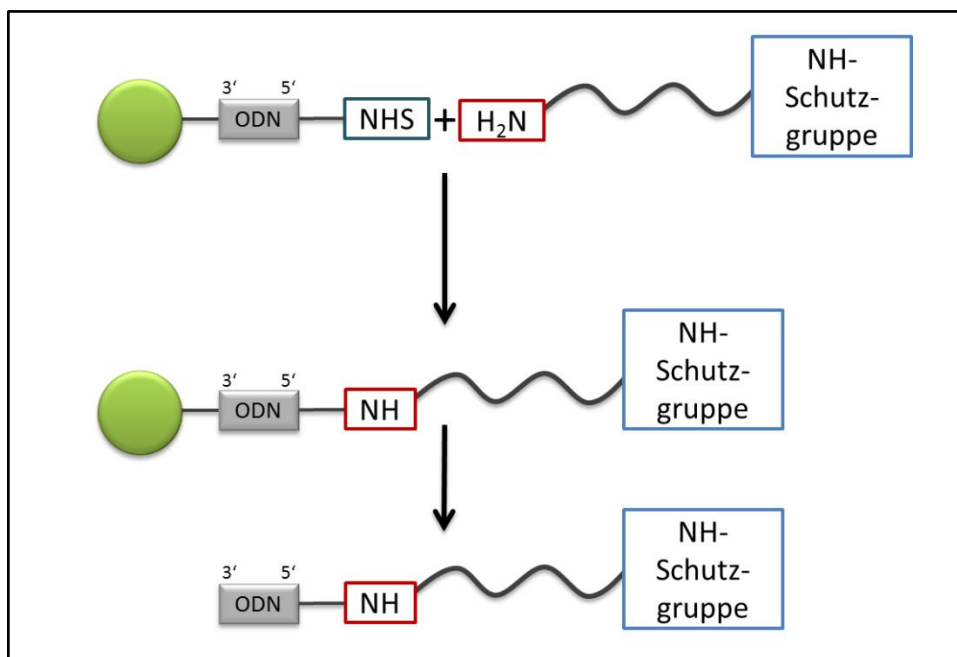


Abbildung 4.3: Reaktionsschema der Synthese des Polymer-ODN-Konjugats aus trägergebundenem NHS-funktionalisiertem ODN und α -, ω -aminofunktionalisierten PNIPAM

In den nächsten Abschnitten werden die Synthese des Polymers, die Konjugation von ODN und Polymer sowie die Herstellung des Makromonomers beschrieben.

4.1.1 Synthese des α -, ω -aminofunktionalisierten Polymers

Die Synthese von Poly(*N*-isopropylacrylamid) wird mittels RAFT-Polymerisation durchgeführt (Abbildung 4.4). Verwendet wird ein Dithio-RAFT-Agens, welches mit einer boc-geschützten Aminogruppe funktionalisiert ist. Dieses RAFT-Agens ist von [6] hergestellt worden^[6].

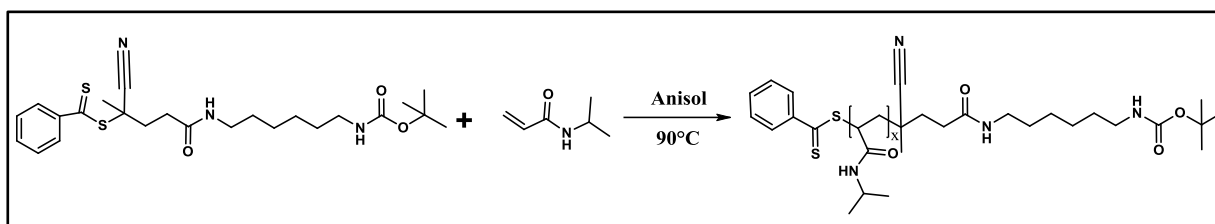


Abbildung 4.4: RAFT-Polymerisation von *N*-(Isopropylacrylamid) mit 4-Cyano-4-thiobenzylvaleriansäure-N-boc-hexylamid als DithioRAFTagens in Anisol bei 90 °C

Die Polymerisation wird in Anisol bei 90 °C durchgeführt und das erhaltene Polymer per MALDI-TOF-Messung (Abbildung 4.5) charakterisiert. Die Molmasse der Wiederholungseinheit von PNIPAM beträgt 113,2 D, der RAFT-Endgruppe 153,2 D und der boc-Aminoendgruppe 324,4 D. Der Peak bei 3684,6 D kann damit einem Polymer mit diesen beiden Endgruppen und einem Polymerisationsgrad von 28 sowie Kalium als Kation zugeordnet werden. Die Differenz zu dem Nachbarpeak mit 3797,8 D beträgt 113,2 D, was genau der Molmasse der Wiederholungseinheit entspricht. Dem Peak

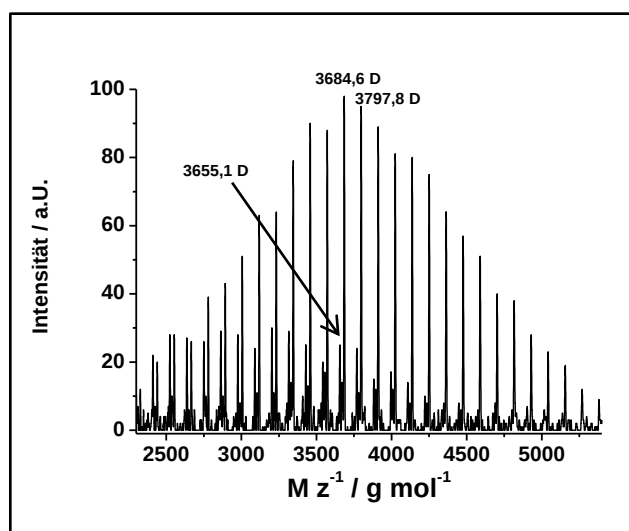


Abbildung 4.5: MALDI-TOF-Spektrum von RAFT-PNIPAM-NHboc gemessen mit HABA + K. Die Molmasse wurde auf $M_w = 3374 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ mit einem PDI von 1,05 bestimmt.

bei 3655,1 D kann ein Polymer mit RAFT-Endgruppe und Aminoendgruppe ohne boc-Schutzgruppe (224,3 D) sowie Silber als Kation zugeordnet werden. Möglicherweise ist die Schutzgruppe während der Ionisierung der Probe abgespalten worden.

Erhalten wird ein Polymer $M_w = 3374 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ und einem PDI von 1,05.

Durch die Wahl des RAFT-Agens wird am α -Ende des Polymers die benötigte Aminogruppe, welche eine boc-Schutzgruppe trägt, erhalten. Die zweite Aminogruppe am ω -Ende wird durch die Substitution der RAFT-Gruppe eingeführt. Dafür wird eine Azoverbindung mit Aminoendgruppe, welche eine orthogonale Schutzgruppe zur boc-Schutzgruppe trägt, benötigt. Als Schutzgruppe wird die Trifluoracetatgruppe gewählt, da diese leicht einzuführen und im Basischen abspaltbar ist.

Zur Synthese der Azoverbindung mit trifluoracetatgeschützter Aminogruppe wird das mono-trifluoracetatgeschützte Hexyldiamin benötigt (Abbildung 4.6).

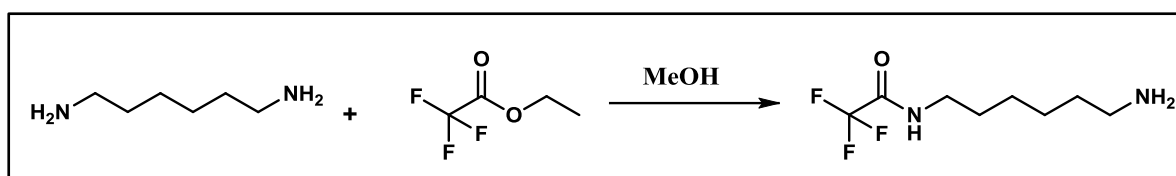


Abbildung 4.6: Synthese von mono-trifluoracetatgeschütztem Hexyldiamin aus Hexamethyldiamin und Ethyltrifluoracetat

Dieses wird nach der Vorschrift von Fixon-Owoo^[7] aus Hexamethyldiamin und Ethyltrifluoracetat in Methanol hergestellt und durch Destillation aufgereinigt.

Das ^1H -NMR dieser Verbindung ist in Abbildung 4.6 dargestellt.

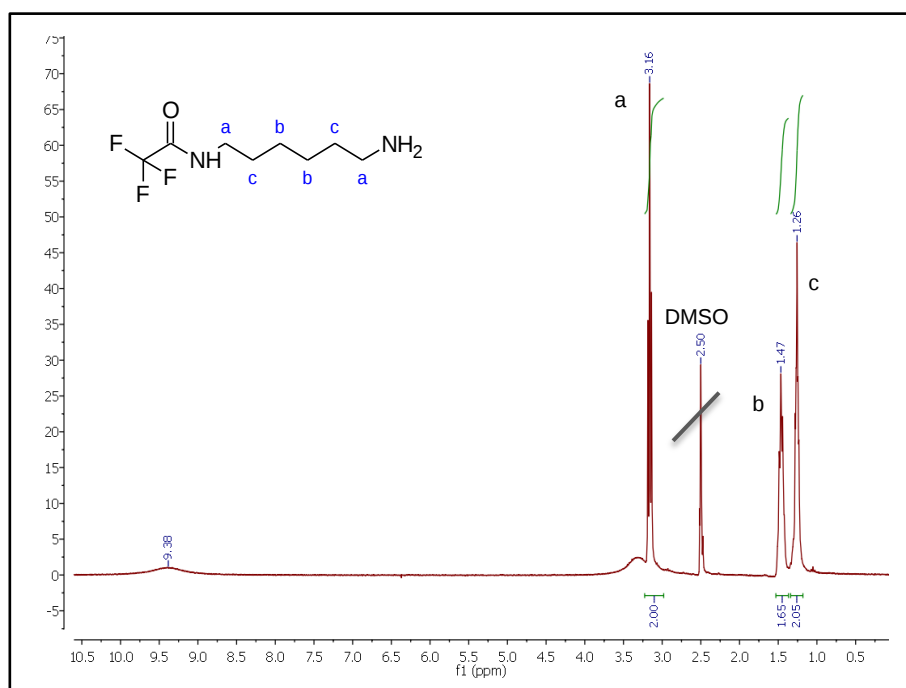


Abbildung 4.6: ^1H -NMR-Spektrum von mono-trifluoracetatgeschütztem Hexyldiamin in DMSO-d_6

Zur Herstellung der Azoverbindung wird 4,4'-Azobis(4-cyanovaleriansäure) mit 1,1-Carbonyldiimidazol in THF umgesetzt um das intermediäre Imidazol herzustellen. Im

zweiten Schritt wird mono-trifluoracetatgeschütztes Hexamethyldiamin zugegeben (Abbildung 4.7).

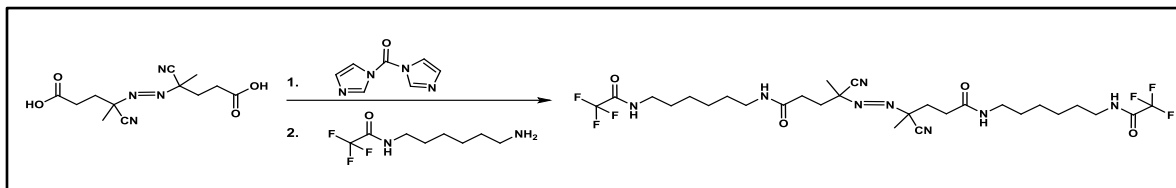


Abbildung 4.7: Synthese der trifluoracetatgeschützten aminofunktionalisierten Azoverbindung mit 4,4'-Azobis(4-cyanovaleriansäure), 1,1'-Carbonyldiimidazol und mono-trifluoracetatgeschütztem Hexyldiamin

Die Aufreinigung des Produkts erfolgt durch Flash-Chromatografie und das ^1H -NMR des Produkts ist in Abbildung 4.8 dargestellt.

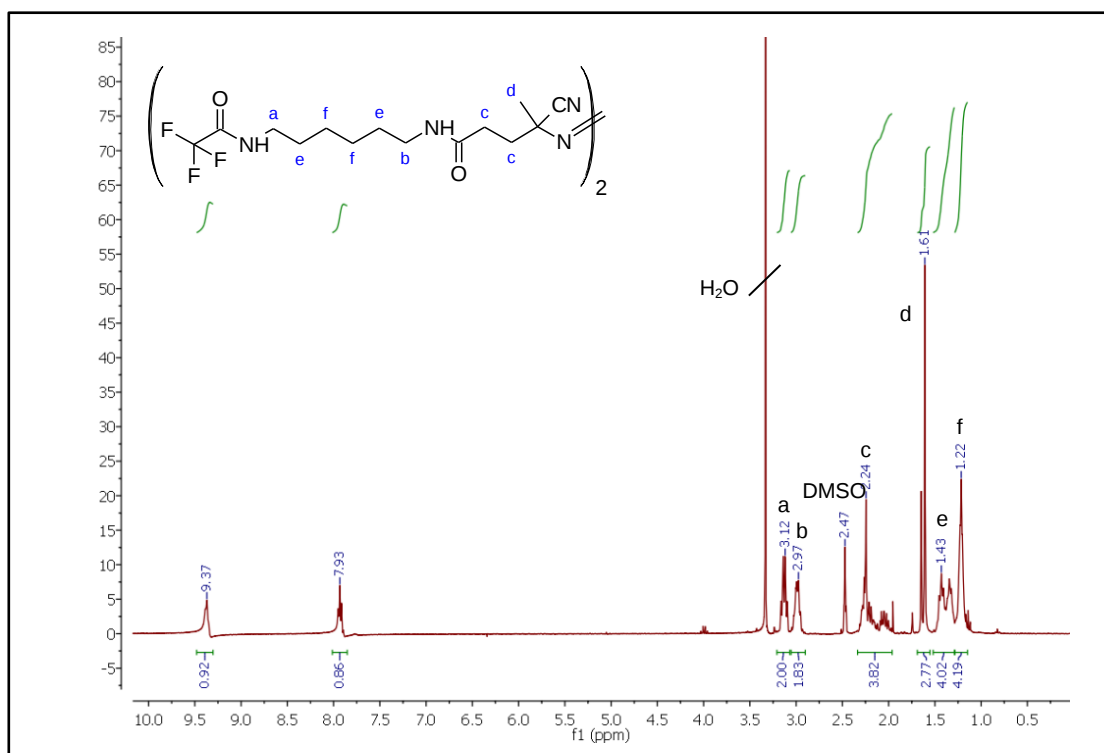


Abbildung 4.8: ^1H -NMR der trifluoracetatgeschützten aminofunktionalisierten Azoverbindung in DMSO-d_6

Als nächster Schritt erfolgt die Substitution der RAFT-Gruppe des Polymers durch die zuvor synthetisierte Azoverbindung um ein α -, ω -aminofunktionalisiertes Polymer mit orthogonal geschützten Aminogruppen zu erhalten (Abbildung 4.9).

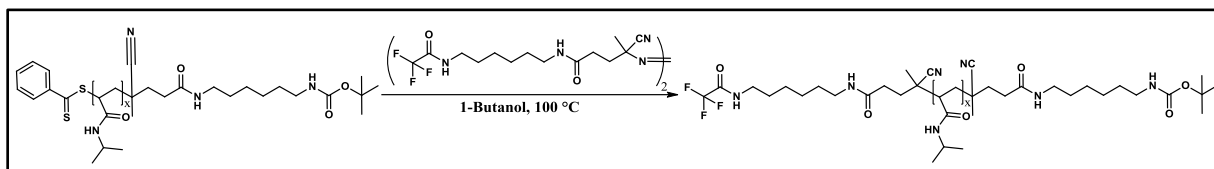


Abbildung 4.9: Substitutionsreaktion des Polymers RAFT-PNIPAM-NHBoc mit der trifluoracetatgeschützten aminofunktionalisierten Azoverbindung zur Synthese des α -, ω -aminofunktionalisierten PNIPAMs mit orthogonalen Schutzgruppen

Die Substitution wird in 1-Butanol unter Ausschluss von Sauerstoff und Wasser bei 100 °C im Schlenkrohr für 16 Stunden durchgeführt. Das erhaltene Produkt wird durch Dialyse gegen Methanol aufgereinigt und per eine MALDI-TOF-Messung analysiert. Als Matrix wurde Dithranol und als Kation Silber verwendet.

In Abbildung 4.10 sind die MALDI-TOF-Spektren vor (schwarz) und nach (rot) der Substitution der RAFT-Endgruppe dargestellt. Exemplarisch wird der Peak vor der Substitution bei 3684,6 D analysiert. Die Wiederholungseinheit des PNIPAM-Polymers hat eine Molmasse von 113,16 D. Die Molmasse der RAFT-Endgruppe beträgt 153,24 D und die der NHBoc-Gruppe 324,24 D. Anhand dieser Molmassen

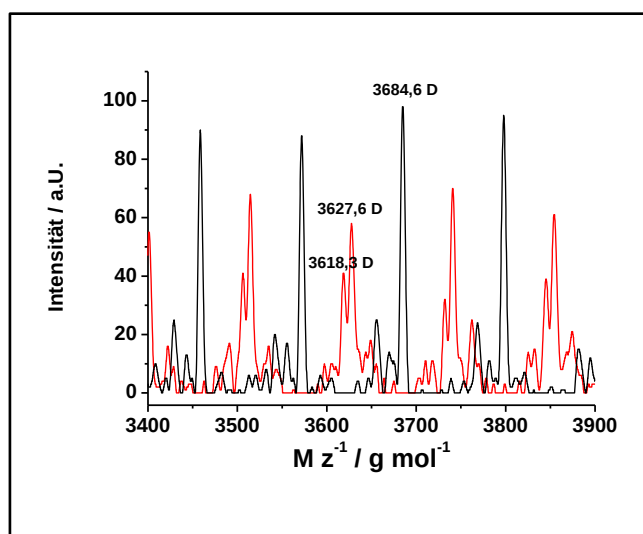


Abbildung 4.10: Ausschnitt des MALDI-TOF-Spektrums des α -, ω -aminofunktionalisierten PNIPAMs (rot) gemessen in Dithranol + Ag und RAFT-PNIPAM-NHBoc (schwarz) gemessen in HABA + K

lässt sich ermitteln, dass der Peak bei 3684,6 D dem RAFT-PNIPAM-NHBoc-Polymer mit 28 Wiederholungseinheiten sowie Kalium (39,10 D) als Kation entspricht.

Durch die Substitution wird die RAFT-Endgruppe wie beschrieben durch eine trifluoracetatgeschützte Aminogruppe ersetzt. Diese besitzt eine Molmasse von 224,24 D ohne Schutzgruppe, da diese durch die Ionisierung der Probe abgespalten wird.

Der Peak bei 3627,6 D kann damit dem α -, ω -aminofunktionalisierten Polymer mit 27 Wiederholungseinheiten und Natrium (22,99 D) als Kation zugeordnet werden. Der Peak bei 3618,3 D entspricht dem gleichen Polymertyp jedoch mit einem Proton statt Natrium als Kation und 28 Wiederholungseinheiten. Die Abweichung der gemessenen Molmasse zur theoretisch ermittelten Molmasse beträgt jeweils 0,6 D.

Zur weiteren Synthese der Polymer-ODN-Konjugate sind zwei unterschiedliche Synthesewege möglich:

- Konjugation der ODN-Sequenz an das α -Ende des Polymers
- Konjugation der ODN-Sequenz an das ω -Ende des Polymers

Im weiteren Verlauf werden beide Möglichkeiten durchgeführt.

Zur Konjugation der ODN-Sequenz an das α -Ende wird die boc-Schutzgruppe mit 20% Trifluoressigsäure in Dichlormethan entfernt (Abbildung 4.11).

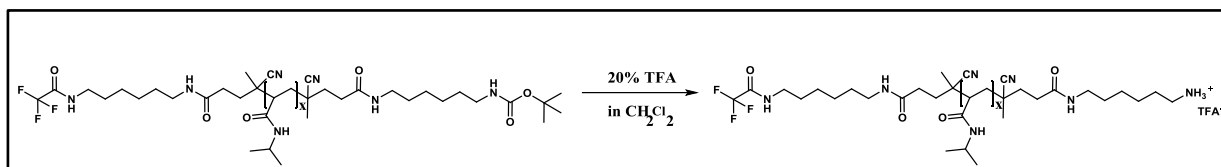


Abbildung 4.11: Entschützung der bocgeschützten Aminoendgruppe des α -, ω -aminofunktionalisierten PNIPAMs mit 20% TFA-Lösung

Die Abspaltung der boc-Schutzgruppe wird durch die Messung eines ^1H -NMR-Spektrums überprüft. Wie in Abbildung 4.12 zu erkennen ist, ist nach der Entschützung der für die boc-Schutzgruppe charakteristische Peak bei 1,41 ppm nicht mehr erkennbar und die Entschützung damit erfolgreich.

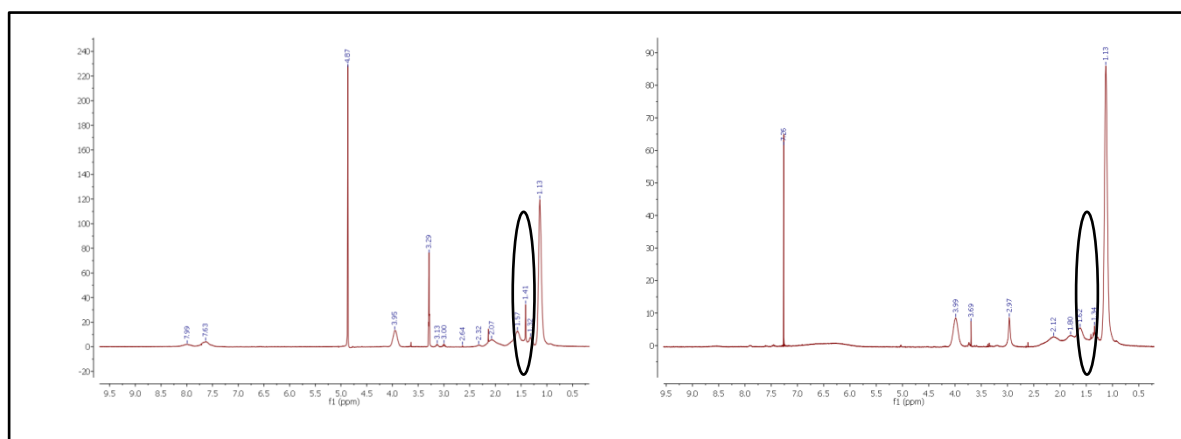


Abbildung 4.12: ^1H -NMR in CDCl_3 von α -, ω -aminofunktionalisierten PNIPAMs vor (links) und nach (rechts) der Entschützung

Für die Konjugation der ODN-Sequenz an das ω -Ende des Polymers wird die Trifluoracetatschutzgruppe mit Hilfe von ammoniakalischer Methanollösung durch Rühren bei Raumtemperatur über Nacht entfernt (Abbildung 4.13).

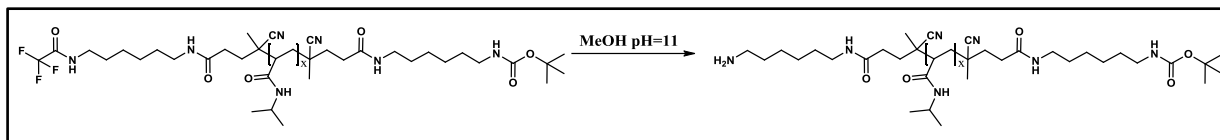


Abbildung 4.13: Entschützung der trifluoracetatgeschützten Aminogruppe α -, ω -aminofunktionalisierten PNIPAMs

Da im ^{19}F -NMR nach der Entschützung und Aufreinigung (rot) kein Peak der Trifluoracetatgruppe mehr sichtbar ist, war die Entschützung erfolgreich (Abbildung 4.14).

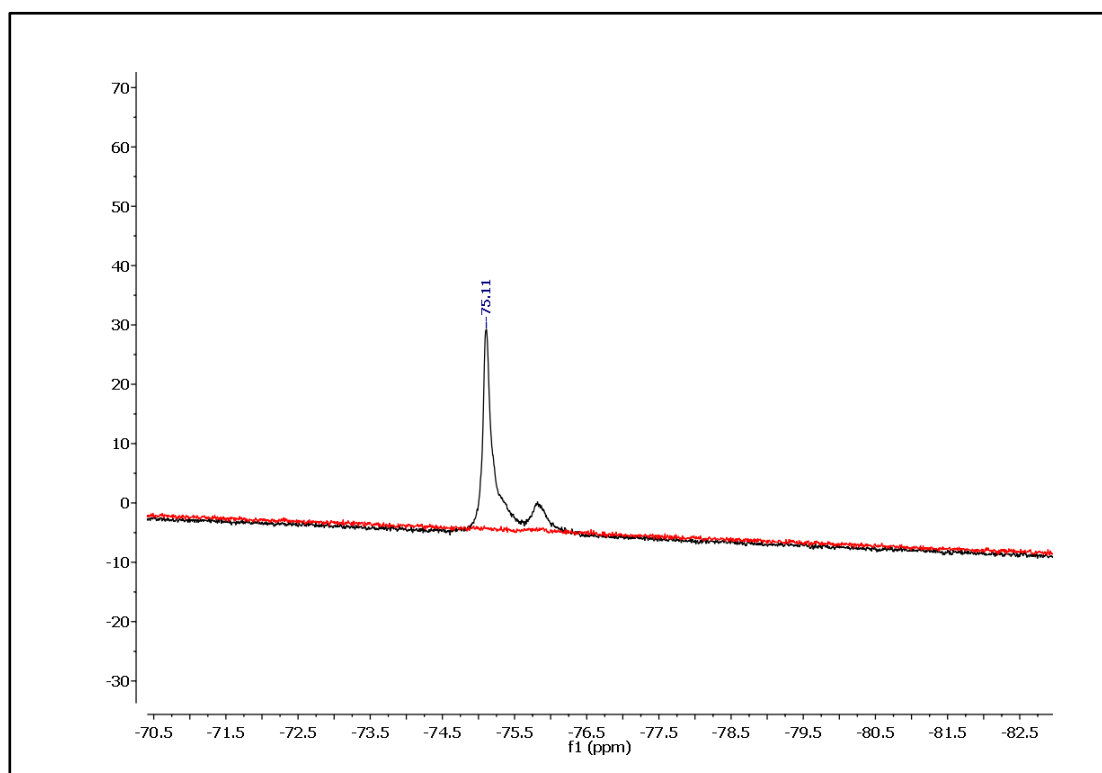


Abbildung 4.14: ^{19}F -NMR des α -, ω -aminofunktionalisierten PNIPAMs vor (schwarz) und nach (rot) der Entschützung in CDCl_3

Durch die RAFT-Polymerisation von *N*-Isopropylacrylamid und die nachfolgende Substitution der RAFT-Gruppe mit Azo-bis-cyanovaleriansäure-*N*-trifluoracetathexylamid konnte ein α,ω -aminofunktionalisiertes Polymer hergestellt werden. Dies ermöglicht im Folgenden zwei unterschiedliche Synthesewege des ODN-Polymer-Konjugats.

4.1.2 Synthese des Polymer-ODN-Konjugats

Wie bereits in Abschnitt 2.1 angesprochen, wird für die Synthese des Polymer-ODN-Konjugats eine Oligonucleotidsequenz verwendet, die mit dem 3'-Ende an einem Träger gebunden ist. Am 5'-Ende trägt diese zudem eine N-Hydroxysuccinimid-Funktionalisierung (NHS-Funktionalisierung).

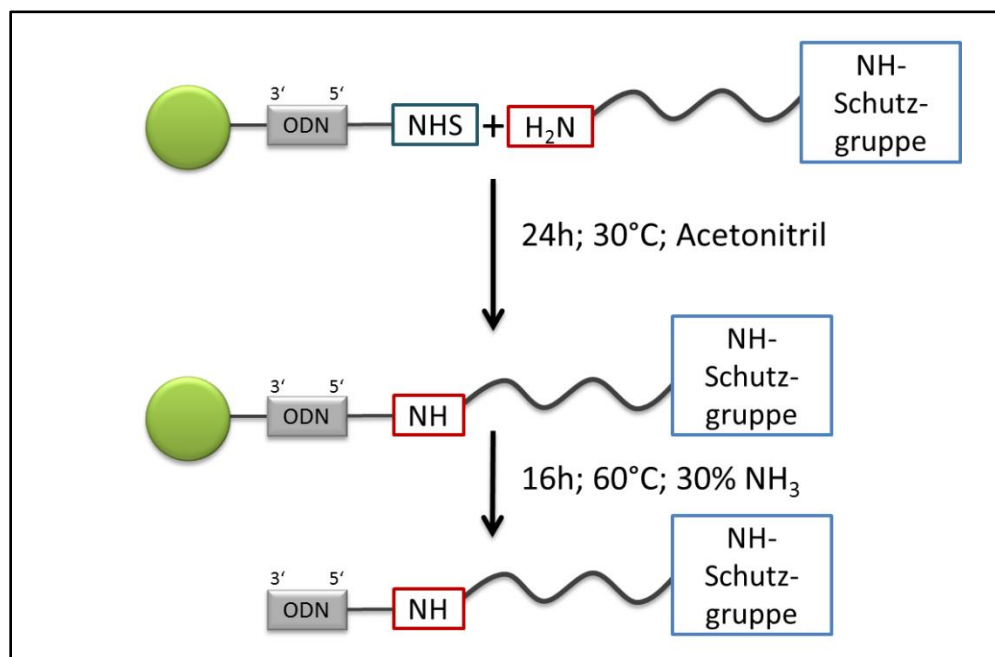


Abbildung 4.15: Reaktionsschema der Synthese des Polymer-ODN-Konjugats aus trägergebundenem ODN und α -, ω -aminofunktionalisiertem PNIPAM

Zur Kopplung des Polymers wird die trägergebundene Sequenz und das Polymer mit freier Aminogruppe, welches im vorherigen Abschnitt synthetisiert wurde, in Acetonitril zusammengegeben und bei 30 °C für 24 h geschüttelt. Danach wird das am Träger gebundene Konjugat durch Waschen mit Acetonitril, Methanol, Wasser, Methanol und Diethylether gereinigt. Die Abspaltung vom Träger erfolgt schließlich durch Behandlung mit konzentrierter wässriger Ammoniaklösung bei 60 °C für 16 h (Abbildung 4.15).

Die produkthaltige Ammoniaklösung wird abgenommen, die Trägersubstanz zweimal mit Wasser gewaschen und alle Proben vereinigt. Diese werden im Konzentrator mit Hilfe von Unterdruck einkonzentriert, wobei sich auch der Ammoniak verflüchtigt. Bei der Abspaltung vom Träger werden auch die Schutzgruppen der Basen der ODN-Sequenz abgespalten.

Außerdem werden die Fehlsequenzen, welche bei der Synthese entstanden sind (vergleiche Kapitel 2.2.1), vom Träger abgespalten. Diese finden sich mit dem Polymer-ODN-Konjugat im Rohprodukt.

Die Konjugation ist sowohl mit dem noch trifluoracetatgeschützten als auch mit dem noch bocgeschützten Poly(*N*-Isopropylacrylamid) durchgeführt worden. Um den Einfluss der Polymerkonzentration zu testen, wird je Polymer ein 5- und 10-facher Überschuss gewählt.

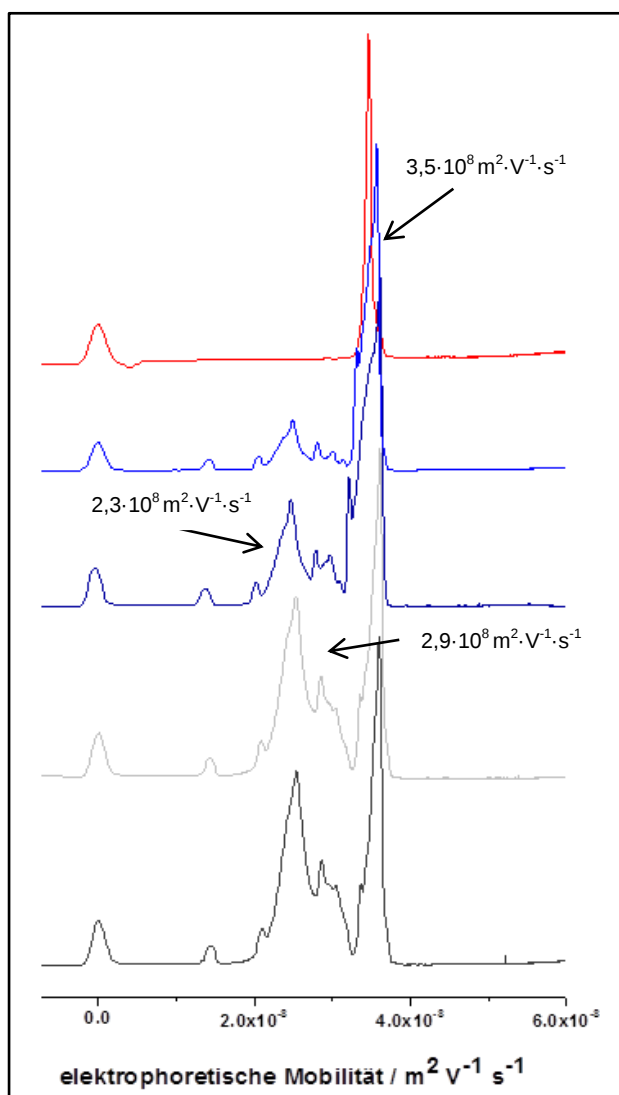


Abbildung 4.16: Kapillarelektrophorese-Messung der Polymer-ODN-Konjugate und einer 46-Basenpaar ODN (rot), welche vorhanden war und zur gleichen Zeit wie eine 23 Basenpaar-ODN eluiert, in Natriumboratpuffer pH = 9,2 mit 45 cm Kapillarlänge bei 20°C für 15 min. In Blau sind die Konjugate mit boc-Polymer (dunkelblau 10-facher Überschuss, blau 5-fach) und in grau die Konjugate mit trifluoracetat-Polymer (dunkelgrau 10-facher Überschuss, grau 5-fach) dargestellt

fluss der Polymerkonzentration zu testen, wird je Polymer ein 5- und 10-facher Überschuss gewählt.

Die Charakterisierung der Konjugate erfolgt durch Kapillarelektrophorese und Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Die Kapillarelektrophorese-Messung wird in Natriumboratpuffer mit pH = 9,2 durchgeführt. Bei diesem pH-Wert ist – wie in Abschnitt 3.5.1 erklärt – ein elektroosmotischer Fluss vorhanden. Durch diesen werden die anionischen Moleküle zur Kathode beschleunigt und können detektiert werden. Um die Messungen vergleichen zu können, werden sie so übereinander gelegt, dass der EOF-Peak aller Proben aufeinander liegt.

Da das Ladungs/Masse-Verhältnis in Bezug auf die negative Ladung der ODN-Sequenz größer ist als das des ODN-Polymer-Konjugats, eluiert das Konjugat vor der ODN-Sequenz. In Abbildung 4.16 ist die Kapillarelektrophoresemessung der Polymer-

ODN-Konjugate gezeigt. In blau sind die Konjugate dargestellt, bei deren Her-

stellung das noch boc-geschützte PNIPAM verwendet worden ist. In grau sind die Konjugate gezeigt, welche trifluoracetat-geschützt waren.

In Rot ist zum Vergleich die Kurve der reinen ODN-Sequenz abgebildet. Dadurch kann der Peak der Polymer-ODN-Konjugate bei $3,5 \cdot 10^8 \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ der freien ODN-Sequenz zugeordnet werden.

Der Peak bei $2,3 \cdot 10^8 \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ fehlt bei der freien ODN-Sequenz, was darauf schließen lässt, dass dieser dem Konjugat zuzuordnen ist.

Der Peak bei $2,9 \cdot 10^8 \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ lässt sich je nach verwendetem Polymer verschiedenen Nebenprodukten zuordnen, die bei der Synthese entstehen können.

Bei der Verwendung des bocgeschützten Polymers zur Synthese des Konjugats war möglicherweise Polymer mit einer freien α - und ω -Aminogruppe vorhanden. Der NHS-Ester der ODN-Sequenz kann so an beide Enden des Polymers binden und Dreiblocke können gebildet werden. Da das freie Polymer keine Ladungen trägt, eluiert es mit dem elektroosmotischen Fluss und kann daher nicht weiter untersucht werden. Weiter liegen die abgespaltenen Schutzgruppen der ODN-Basensequenzen in der Lösung vor und können Artefakte bilden.

Bei der Verwendung des trifluoracetat-geschützten Polymers wird bei der Abspaltung des Konjugats vom Träger mit konzentriertem Ammoniak auch die Trifluoracetatschutzgruppe abgespalten. Dadurch sind nun elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der freien Aminogruppe und der ODN-Sequenz möglich, was zu dem weiteren Peak führen kann.

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Ausbeute der ODN-Polymer-Konjugation ermittelt durch Kapillarelektrophorese-Messung

	Überschuss	Ausbeute ODN / %	Ausbeute ODN-Polymer- Konjugat / %	Ausbeute Nebenpro- dukte / %
Boc- PNIPAM	5-fach	76.30	16.54	7.72
Boc- PNIPAM	10-fach	65.54	23.00	12.94
Trifluorace- tat-PNIPAM	5-fach	39.68	42.04	22.37
Trifluorace- tat-PNIPAM	10-fach	37.17	41.58	27.00

Die Intensität der entsprechenden Peaks der Kapillarelektrophoresemessung sind durch Integration der Peakflächen ermittelt worden und sind in Tabelle 4.1 zusam-

mengefasst. Ein Vergleich zeigt, dass das trifluoracetat-Polymer einen höheren Umsatz bei der Kopplung als das boc-Polymer aufweist.

Der Umsatz bei der Verwendung des trifluoracetat-Polymers ist bei 5- und 10-fachem Überschuss des Polymers vergleichbar, während bei der Verwendung des boc-Polymers der Umsatz bei 10-fachem Überschuss steigt.

Des Weiteren werden die Polymer-ODN-Konjugate mittels PAGE charakterisiert (Abbildung 4.17). Verwendet worden ist ein 20% denaturiertes Polyacrylamid-Gel. Von links gesehen ist zuerst der Marker, gefolgt von dem Konjugat aus boc-Polymer mit 5- und 10-fachem Überschuss sowie dem Konjugat aus trifluoracetat-Polymer mit 5- und 10-fachem Überschuss aufgetragen.

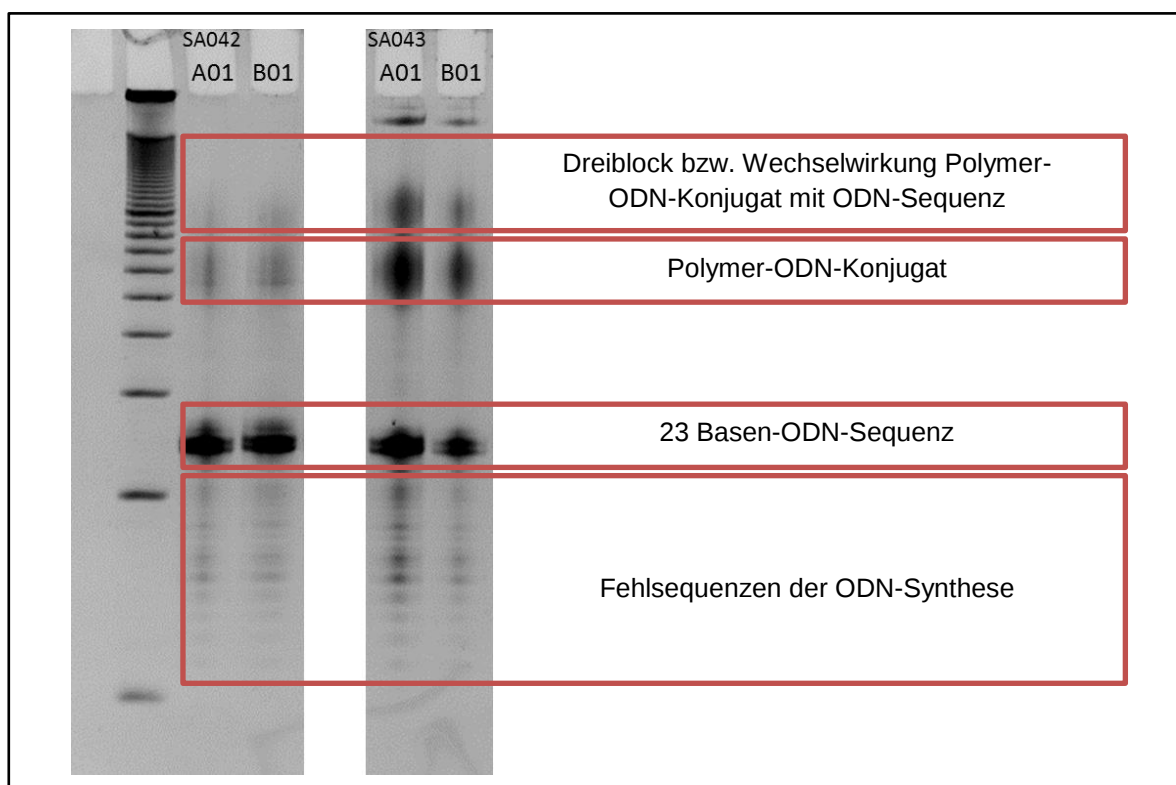


Abbildung 4.17: 20% denaturierte Polyacrylamidgele der Polymer-ODN-Konjugate. Von links nach rechts: Marker, Polymer-ODN-Konjugat mit boc-PNIPAM 5-facher Überschuss und 10-facher Überschuss; Polymer-ODN-Konjugat mit trifluoracetat-PNIPAM 5-facher Überschuss und 10-facher Überschuss

Da die Kapillarelektrophorese nach dem Verhältnis von Ladung zu hydrodynamischem Radius und die PAGE durch die Zugabe des Ladepuffers nur nach hydrodynamischem Radius trennt, ist zu erwarten, dass mögliche Dreiblöcke bzw. ODN/Polymer-ODN-Konjugate bei der PAGE vor dem Produkt eluieren.

Zwischen den Markerbanden 20 und 30 Basen ist deutlich die freie ODN-Sequenz zu sehen wie auch unterhalb die Fehlsequenzen.

Im Bereich zwischen 50-70 Basen ist die Bande des ODN-Polymer-Konjugats zu erkennen. Darüber liegt eine weitere Bande, die dem 2. Peak des Doppelpeaks in der Kapillarelektrophoresemessung entspricht.

Da das trifluoracetatgeschützte Polymer als Trifluoracetatsalz eingesetzt wurde, ist es wahrscheinlich, dass die oberste Bande dem freien Polymer und den Abspaltungsprodukten der Schutzgruppen entspricht.

Die PAGE bestätigt das Ergebnis der Kapillarelektrophorese. Auch hier zeigt das trifluoracetat-Polymer eine höhere Ausbeute an Konjugat als das boc-Polymer und die Bande des ODN-Polymer-Konjugats ist jeweils stärker als die Bande der Nebenprodukte.

Im nächsten Abschnitt folgt die Umsetzung zum entsprechenden Makromonomer.

4.1.3 Synthese des Polymer-ODN-Makromonomers

Bei der Synthese des PNIPAM-ODN-Makromonomers sind wiederum zwei Synthesewege möglich. Als erstes wird auf den Syntheseweg unter der Verwendung des boc-Polymers eingegangen. Die Syntheseroute ist in Abbildung 4.18 dargestellt.

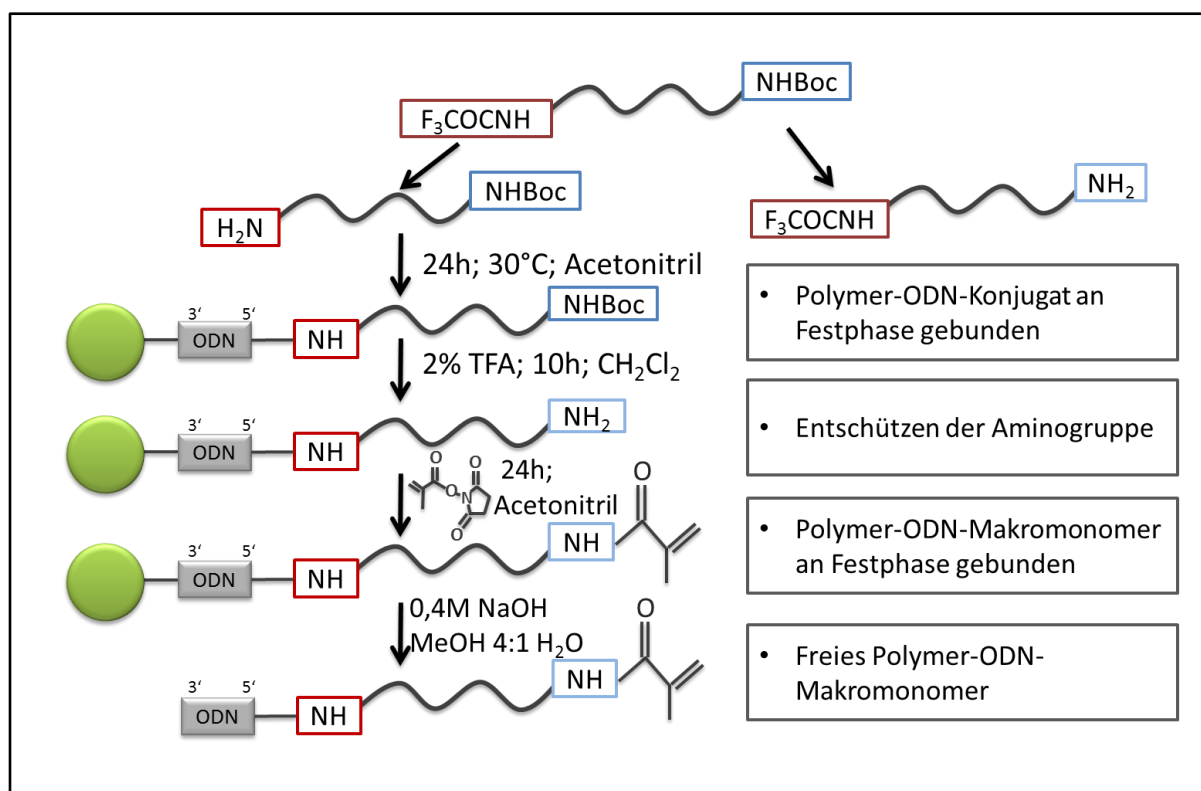


Abbildung 4.18: Reaktionsschema der Synthese des Polymer-ODN-Makromonomers unter Verwendung des bocgeschützten PNIPAMs

Wie im Abschnitt 4.1.2 beschrieben wird das am Träger gebundene Polymer-ODN-Konjugat hergestellt und aufgereinigt, aber auf dem Träger belassen und nicht mit konzentriertem Ammoniak abgespalten.

Im zweiten Schritt wird die boc-Schutzgruppe der Aminogruppe mit 2% Trifluoressigsäure in Dichlormethan durch Inkubation bei Raumtemperatur für 10 h entfernt. Das entstandene Konjugat mit freier Aminoendgruppe wird durch Waschen mit Acetonitril aufgereinigt. Im nächsten Schritt wird NHS-Methacrylat, welches nach der Vorschrift von Batz^[8] hergestellt worden ist, zugegeben und bei Raumtemperatur für 24 h geschüttelt. Zum Entfernen des überschüssigen NHS-Methacrylats und des freigesetzten *N*-Hydroxysuccinimids wird die Probe mit Acetonitril gewaschen.

Im letzten Schritt wird das Polymer-ODN-Makromonomer mit 0,4 M Natronlauge vom Träger abgespalten.

Verwendet man das trifluoracetat-Polymer anstelle des boc-Polymers, so erhält man das trägergebundene ODN-Polymer-Konjugat wie in Abbildung 4.19 gezeigt. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass bei der Entschützung der Aminogruppe mit konzentrierter wässriger Ammoniaklösung sowohl das Polymer-ODN-Konjugat vom Träger als auch die Schutzgruppen der Basen der ODN-Sequenz abgespalten werden. Das freie Konjugat wird nun durch Dialyse gegen Wasser aufgereinigt und aus Wasser gefriergetrocknet. Zur Synthese des Makromonomers wird das Konjugat in 50 mM Natriumphosphatpuffer mit pH = 8,2 gelöst, mit *N*-Hydroxysuccinimidmethacrylsäureester – gelöst in DMF – versetzt und bei Raumtemperatur für 24 h inkubiert. Zur Aufreinigung wird das entstandene Polymer-ODN-Makromonomer wiederum gegen Wasser dialysiert und im Anschluss gefriergetrocknet.

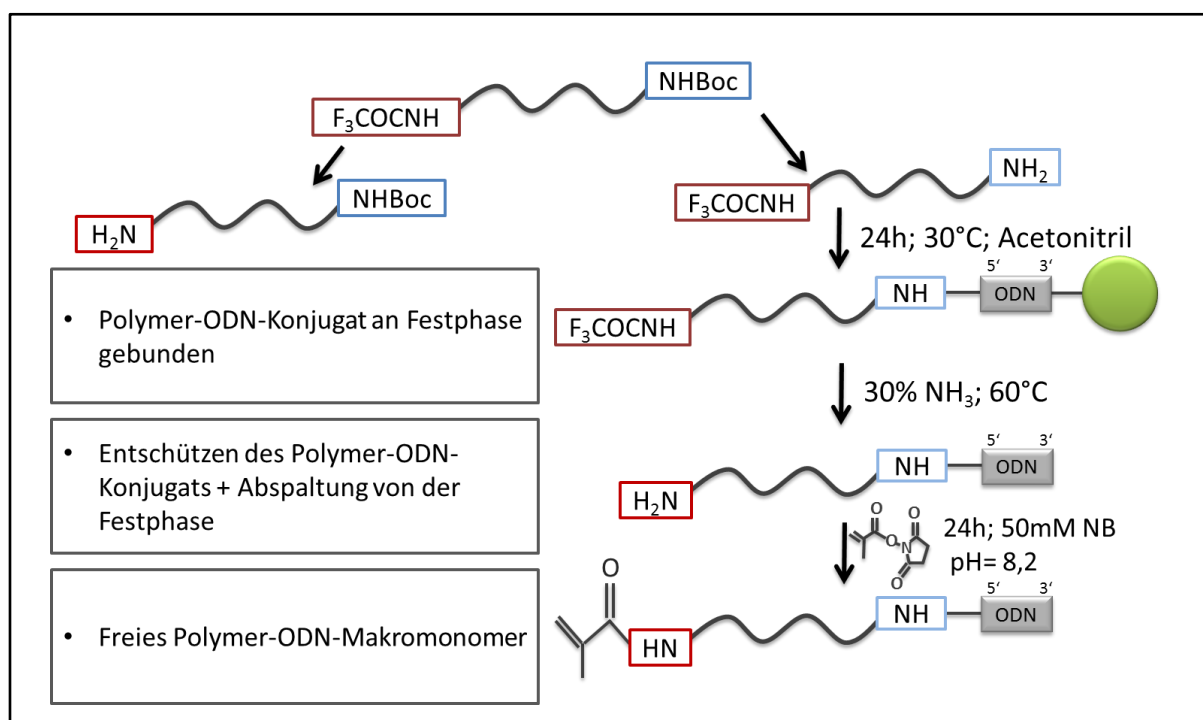


Abbildung 4.19: Reaktionsschema der Synthese des Polymer-ODN-Makromonomers unter Verwendung des trifluoracetatgeschützten PNIPAMs

Analysiert werden die beiden synthetisierten Polymer-ODN-Makromonomere mittels Kapillarelektrophorese und PAGE.

In Abbildung 4.20 sind die Kapillarelektrophorese-Messungen der Konjugate und Makromonomere unter Verwendung des boc-PNIPAMS (links) und des trifluoracetat-PNIPAMS (rechts) dargestellt.

Die Polymer-ODN-Makromonomere (violette und braune Kurve) zeigen im Vergleich zu den im Abschnitt 4.1.2 synthetisierten ODN-Polymer-Konjugaten (blaue und graue Kurve) keinen signifikanten Unterschied. Dies war auf Grund der geringen Molmassenänderung von $69 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ zu erwarten.

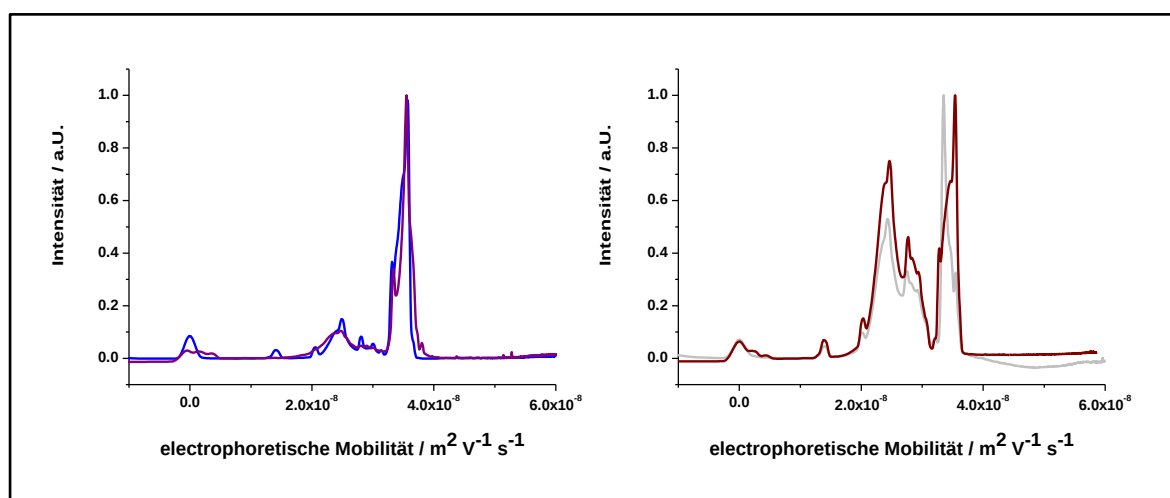


Abbildung 4.20: Kapillarelektrophorese-Messung in 25 mM Natriumboratpuffer mit pH = 9,2, Kapillarlänge 45 cm, 28 kV und 20 °C. Links: Polymer-ODN-Konjugat (blau) und Polymer-ODN-Makromonomer (violett) des bocgeschützten PNIPAMS. Rechts: Polymer-ODN-Konjugat (grau) und Polymer-ODN-Makromonomer (braun) des trifluoracetatgeschützten PNIPAMS.

In Abbildung 4.21 sind die Gelbilder der Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Makromonomere dargestellt.

Im ersten Gelbild ist links der Marker, gefolgt vom Polymer-ODN-Konjugat und Polymer-ODN-Makromonomer des trifluoracetatgeschützten Polymers aufgetragen. Im zweiten Gelbild ist das Makromonomer (links) des bocgeschützten Polymers und im Vergleich das Polymer-ODN-Konjugat (rechts) des trifluoracetatgeschützten Polymers aufgetragen. Beide Polyacrylamidgele sind während der Elektrophorese auf 50 °C temperiert worden. Im Gegensatz dazu zeigt das rechte Gelbild das Makromonomer des bocgeschützten Polymers, welches während der Elektrophorese auf 15 °C temperiert worden ist.

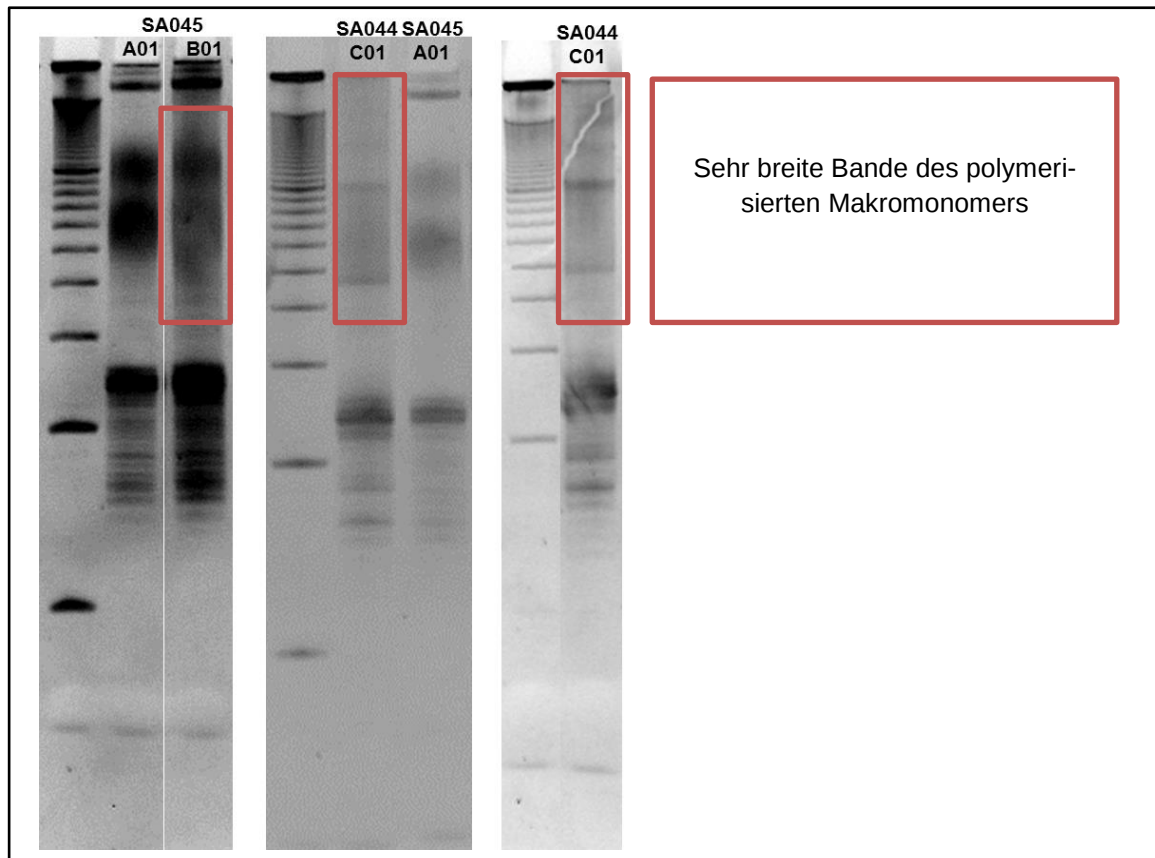


Abbildung 4.21: 20% denaturierte Polyacrylamidgele der Polymer-ODN-Konjugate und Makromonomere. links: Marker, Konjugat und Makromonomer des trifluoracetat-PNIPAMs bei 50 °C Elektrophoresetemperatur; Mitte: Marker, Makromonomer des boc-PNIPAMs und Konjugat des trifluoracetat-PNIPAM bei 50 °C Elektrophoresetemperatur; rechts: Marker und Makromonomer des bocgeschützten Polymers bei 15 °C Elektrophoresetemperatur.

Bei beiden Makromonomeren ist eine sehr breite Bande zu erkennen. Möglich ist eine Polymerisation des Makromonomers während der Elektrophorese. Zur Herstellung des Polyacrylamidgels wird Ammoniumperoxodisulfat (APS) als Radikalstarter und Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Polymerisationskatalysator verwendet. Sind nach der Polymerisation des Acrylamids noch geringe Mengen von APS und TEMED vorhanden, können diese auch die Polymerisation des Makromonomers starten.

Auch ein Gelbild, welches während der Elektrophorese auf 15 °C temperiert worden ist, zeigt im Vergleich zu der Elektrophorese bei 50 °C keine Änderung der Banden. Somit ist keine Aufreinigung des Makromonomers durch präparative Gelelektrophorese möglich, da auch dort das Makromonomer in der Elektrophoresekammer polymerisieren kann.

Aufreinigungsversuche des Makromonomers mit silanisierten heißen Glasperlen mittels des LCST-Verhaltens des PNIPAM-Blocks sind nicht erfolgreich gewesen. Auf Grund der geringen Ausbeute ist die Übergangstemperatur der Makromonomere nicht bestimmt worden, jedoch muss das Makromonomer auf Grund des PNIPAM-Blocks ein LCST-Verhalten besitzen.

Bei der Synthese einer 23 Basensequenz wird im Mittel eine Ausbeute von 67% – bei 98,0% Kopplungseffizienz pro Base – und 90% – bei 99,5% Kopplungseffizienz pro Base – erhalten. Zur Berechnung der maximalen Ausbeute an Polymer-ODN-Konjugat wird im Folgenden von einer mittleren Ausbeute von 80% ausgegangen.

Der Träger hat eine Beladungsdichte von $37 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$. Dadurch ergibt sich bei einem Ansatz von 70 mg ODN und bei 80% Syntheseausbeute der funktionalisierten ODN-Sequenz am Träger eine Ausbeute von $2,1 \mu\text{mol}$ ODN.

Bei einer maximalen Kopplungsausbeute des trifluoracetat-Polymers an die trägergebundene ODN-Sequenz von 40% erhält man $0,83 \mu\text{mol}$ Polymer-ODN-Konjugat, welches noch nicht aufgereinigt ist.

Des Weiteren ist wie vorher gezeigt eine Kopplungseffizienz von 40% nur bei dem Trifluoracetat-Polymer möglich. Mit diesem Polymer ist die Umsetzung zum Makromonomer wie gezeigt wiederum nur in Lösung möglich und damit ergeben sich weitere Verluste, da bei der Dialyse ein Teil des Produkts an der Membran hängen bleibt. Dies zeigt, dass die Synthese nur unter großen Ausbeuteverlusten möglich ist.

Nach zwei Jahren im Gefrierschrank hat sich in allen Proben ein unlöslicher Feststoff von der überstehenden wässrigen Phase abgetrennt. Von einer Probe wird der Feststoff abzentrifugiert und der Überstand aus Wasser gefriergetrocknet. Nach dem Gefriertrocknen ist der verbleibende Rückstand ebenfalls unlöslich.

Vor dem Gefriertrocknen des Überstands wird mittels dynamischer Lichtstreuung ein hydrodynamischer Radius von $R_h = 60 \text{ nm}$ für das gelöste Polymer-ODN-Konjugat gemessen.

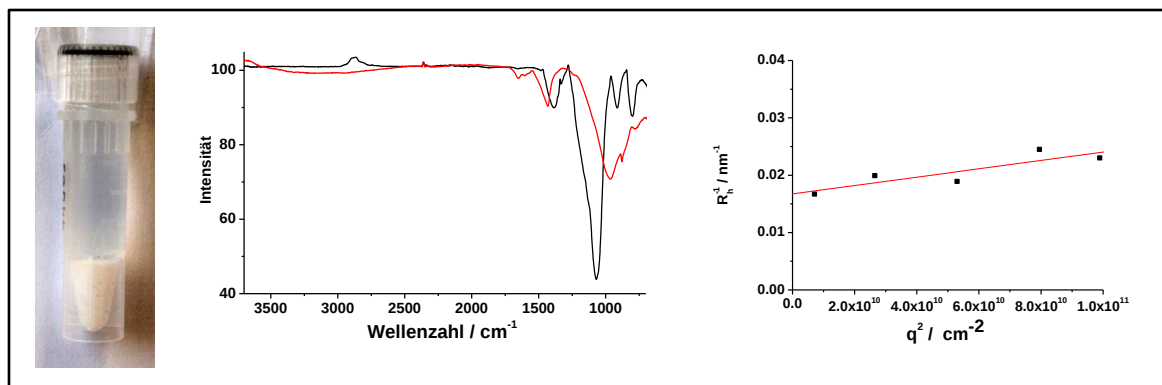


Abbildung 4.22: Links: Foto des Feststoffes, der nach zwei Jahren im Gefrierschrank in der Probe des Polymer-ODN-Makromonomers ausgefallen ist; Mitte: IR-Spektrum von Polymer-ODN-Makromonomer nach zwei Jahren im Gefrierschrank. Schwarz: unlöslicher Feststoff, rot: Überstand nach Gefriertrocknen; rechts: Bestimmung des hydrodynamischen Radius des Überstandes des Polymer-ODN-Makromonomers mit $R_h=60\text{nm}$

Von beiden Proben wird ein IR-Spektrum gemessen (Abbildung 4.22). Im Spektrum des im Überstand gelösten Polymers ist bei der Wellenzahl 1654 cm^{-1} ein geringer Teil organisches Produkt zu erkennen.

Wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben erfolgt die Synthese der Polymer-ODN-Konjugate an einem Träger, der aus controlled pore glass besteht. Durch die Behandlung mit 0,4 M NaOH oder konzentrierter Ammoniaklösung entsteht Natrium-Metasilikat (Na_2SiO_3). Der Peak bei 1070 cm^{-1} im IR-Spektrum des unlöslichen Feststoffes sowie die Peaks im finger-print-Bereich könnten Na_2SiO_3 zugeordnet werden^[9]. Das würde bedeuten, dass das Trägermaterial in der Probe vorliegt und nach der Synthese nicht entfernt werden kann. Damit stellt sich die Frage, ob der Träger aus controlled pore glass die richtige Wahl unter den gewählten Synthesebedingungen darstellt.

Deshalb wäre zudem noch die Optimierung des verwendeten Trägers bzw. der Synthesebedingungen nötig.

4.1.4 Zusammenfassung von Kapitel Polymer-ODN-Konjugat-Bürste

Durch die RAFT-Polymerisation von *N*-Isopropylacrylamid mit einer bocgeschützten Aminofunktionalisierung und anschließender Substitution der RAFT-Gruppe durch eine trifluoracetatgeschützte aminofunktionalisierte Azoverbindung konnte ein α -, ω -aminofunktionalisiertes PNIPAM mit einer Molmasse von $3370 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und einem PDI von 1,05 hergestellt werden.

Durch die orthogonalen Schutzgruppen des α -, ω -aminofunktionalisierten PNIPAMs waren zwei unterschiedliche Synthesewege zur Herstellung eines Polymer-ODN-Konjugats möglich. Diese Konjugat wurde am Träger synthetisiert und weiter auch das jeweilige Makromonomer hergestellt.

Eine Aufreinigung des Polymer-ODN-Makromonomers war nicht möglich, da das Makromonomer während der PAGE polymerisiert ist. Dadurch ist eine präparative PAGE zur Abtrennung der Fehlsequenzen nicht möglich.

Nach zwei Jahren im Gefrierschrank ist ein farbloser unlöslicher Feststoff ausgefallen. Das IR-Spektrum dieses Feststoffes könnte darauf hinweisen, dass in der Probe Natrium-Metasilikat enthalten ist, welches durch die Behandlung des Trägermaterials mit 0,4 M Natronlauge bzw. konzentrierter Ammoniaklösung entstanden ist. Dieser Feststoff konnte während der Synthese nicht abgetrennt werden und dadurch ist eine Optimierung der Reaktionsbedingungen oder die Wahl eines anderen Trägermaterials notwendig.

Zudem ist auf Grund der geringen Ausbeute eine Weiterführung des Projekts nicht sinnvoll, da der Erwerb der ODN-Sequenz den finanziellen Rahmen übersteigt und auch zeitlich sich die Herstellung der Polymer-ODN-Konjugat-Bürste nicht lohnt.

4.2 Polyion-Komplex-Mizellen (PIC) mit zwitterionischer Schale und kationischem Kern

Durch das selbstorganisierende Verhalten von amphiphilen Blockcopolymeren in Wasser bilden sich Nanostrukturen aus. Dies können beispielsweise sphärische, wurmartige, zylindrische oder lamellare Strukturen sein^[10]. Dieses Verhalten wird durch nichtkovalente Wechselwirkungen wie elektrostatische, hydrophobe und van der Waals-Wechselwirkungen induziert und ist weitreichend untersucht worden^[11].

Bei der stöchiometrischen Mischung von gegensätzlich geladenen Polymeren in Wasser bilden diese spontan Polyion-Komplexe (PIC). Durch ihre Elektroneutralität verlieren sie ihre kolloidale Stabilität, fallen aus und sind in gängigen Lösungsmitteln unlöslich^[12].

Diese Fällung kann durch einen hydrophilen Block – wie beispielsweise PEG bzw. hier einem zwitterionischen Polymer – verhindert werden. Es entstehen Polyion-Komplex-Mizellen mit definierter Kern-Schale-Struktur, wobei der Polyion-Komplex den Kern bildet und durch eine hydrophile Schale stabilisiert wird (Abbildung 4.23).

Die chemische Struktur der Schale der PIC-Mizelle beeinflusst die Stabilität, Löslichkeit und Reaktivität der Mizelle.

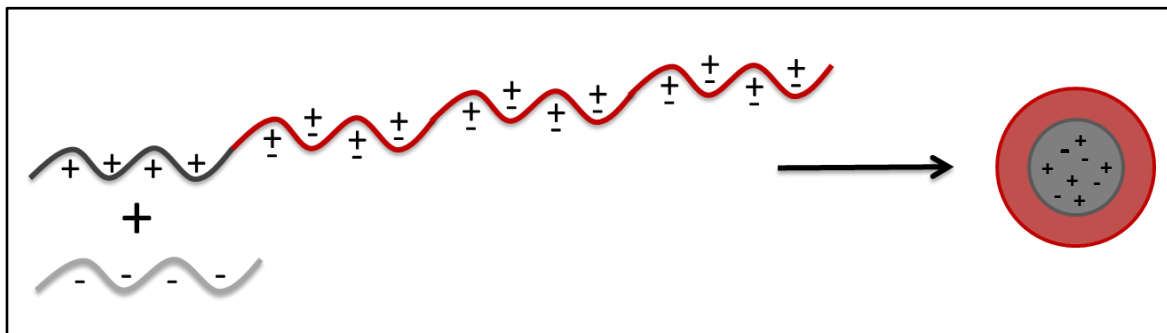


Abbildung 4.23: Schematische Darstellung der Bildung von Polyion-Komplex-Mizellen. In schwarz ist der kationische Block des Blockcopolymers und in Rot der zwitterionische Block dargestellt. Durch Zugabe eines anionischen Polymers (in grau dargestellt) bilden sich Polyion-Komplex-Mizellen mit definierter Kern-Schale-Struktur.

Wichtig für die biomedizinische Anwendung ist die Möglichkeit des Einschlusses von geladenen Makromolekülen bei der Bildung der PIC-Mizelle. Beispielsweise ist somit der Transport von Proteinen und DNA-Sequenzen in die Zelle möglich.

Weiter können die Eigenschaften der Mizellen durch Reaktionen auf externe chemische und physikalische Stimulierung wie Änderung des pH-Werts, Magnetismus, Licht und Hitze verbessert werden^[13].

Von Kataoka wurden bereits PIC-Mizellen aus PEG-*L*-Lysin-Blockcopolymer als Polymer mit kationischem Block und PEG-Asparaginsäure-Blockcopolymer als Polymer mit anionischem Block hergestellt. Diese können in der Humangentherapie als Carrier für die ODN- oder Plasmid-DNA verwendet werden^[14].

Im folgenden Abschnitt wird durch Vorversuche das Aggregationsverhalten von zwitterionischem Polymer unter Zugabe von Poly-*L*-Lysin (PLL) und Polyacrylsäure (PAA) bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht.

4.2.5 Vorversuche zur Bildung von Polyion-Komplexen durch Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) und Poly-L-Lysin bei der Zugabe von Polyacrylsäure

Im Vorfeld wird mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung getestet, ob eine zwitterionische Bürste (Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin), hergestellt von [REDACTED]^[15] mit Poly-L-Lysin (PLL) und Polyacrylsäure (PAA) ein Aggregationsverhalten in 100 mM NaClO₄-Lösung zeigt. Die verwendeten Polymere sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst und haben alle eine Konzentration von 1 g·l⁻¹.

Tabelle 4.2: Vom Hersteller angegebene Molmasse und per DLS ermittelter hydrodynamischer Radius der verwendeten Polymere

	$M_w / \text{g mol}^{-1}$	$\langle R_h^{-1} \rangle_z^{-1} / \text{nm}$
Poly-(ϵ-N-Methacryloyl-L-Lysin)		30
PLL	150.000-300.000	9
PAA	245.200	16

Ausgewertet werden die DLS-Messungen durch eine spezielle Methode, die von Dr. [REDACTED] entwickelt wurde^[16].

In Abbildung 4.24 links sind die Autokorrelationsfunktion und der entsprechende Multikomponentenfit für eine Mischung aus zwitterionischer Bürste (Poly-(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin)) und Poly-L-Lysin bei pH=5,5 gezeigt. Die Funktion kann perfekt durch die Kombination der Fitfunktionen der Einzelkomponenten beschrieben werden. Damit zeigt die Mischung aus zwitterionischer Bürste und PLL bei pH = 5,5 keine Aggregatbildung.

In der zweiten Messung (Abbildung 4.24 Mitte) wurde Polyacrylsäure zu der Lösung der vorherigen Messung – bestehend aus zwitterionischem Polymer und PLL – gegeben. Diese Funktion kann nicht durch den Fit, bestehend aus der Kombination der Einzelkomponenten beschrieben werden. Es wird zusätzlich ein Term benötigt, der die Aggregatbildung beschreibt. Die Aggregate liegen im 100 nm-Bereich.

Durch Zugabe von 0,01 M Natronlauge wird der pH-Wert der Lösung auf pH = 8,4 erhöht. In Abbildung 4.24 rechts sieht man, dass sich die Aggregate fast vollständig aufgelöst haben und die Funktion nahezu wieder durch die Kombination der Fitfunktionen der Einzelkomponenten beschrieben werden kann.

Durch die Zugabe von 0,01 M Salzsäure wird die Reaktionslösung wieder auf pH = 5,5 eingestellt und es bilden sich erneut Aggregate. Die Aggregatbildung ist also mittels pH-Variation reversibel.

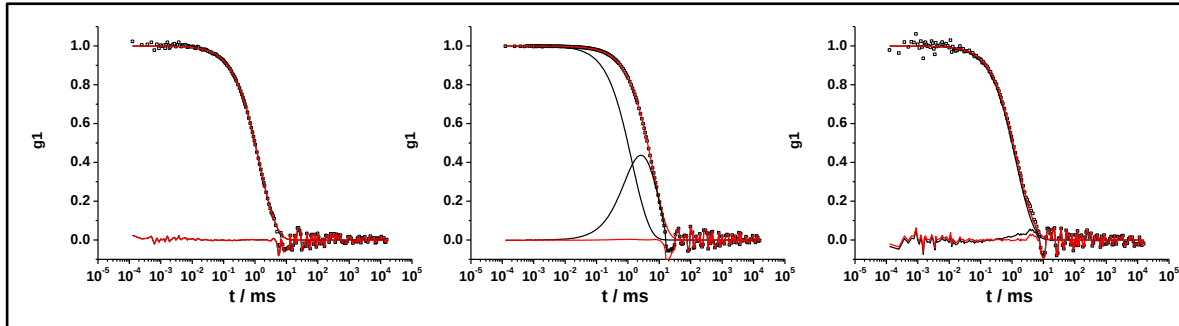


Abbildung 4.24: Autokorrelationsfunktion und Multikomponentenfit mit entsprechenden Residuen für Titrationsmessung von Poly(ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin) und PLL bei PAA-Zugabe und unterschiedlichen pH-Werten. Die Proben wurden in 100 mM NaClO₄-Puffer mit $c = 1$ g/L gelöst. Streuwinkel 30°. rechts: Zwitterionisches Polymer+PLL bei pH = 5,5; Mitte: Zwitterionisches Polymer+PLL+PAA bei pH=5,5 zeigt Aggregatbildung von $R_h = 100$ nm; rechts: Zwitterionisches Polymer+PLL+PAA bei PH = 8,4

Dieser Vorversuch zeigt, dass die Mizellenbildung von zwitterionischem Polymer mit PLL als kationischem und PAA als anionischem Polymer möglich ist.

In späteren Versuchen soll Polyacrylsäure durch eine ODN-Sequenz mit CpG-Motiv ersetzt werden und somit ein Polymer-CpG-Trägersystem für die biomedizinische Anwendung hergestellt werden.

4.2.6 Synthese der benötigten Monomere

Für die Synthese des Blockcopolymers bestehend aus sowohl zwitterionischem als auch kationischem Block werden zwitterionische und kationische Monomere benötigt. Als kationisches Monomer wird Mono-*N*-*boc*-1,3-diaminopropanmethacrylat verwendet.

Als zwitterionisches Monomer wird entweder α - oder ϵ -*N*-Methacryloyl-*L*-Lysin verwendet, wobei die Säure- und die freie Aminogruppe jeweils geschützt sind.

Alle drei Monomere werden durch die Umsetzung des entsprechenden Lysins bzw. Mono-*N*-*boc*-diaminopropans mit Methacryloylchlorid in Anwesenheit von Triethylamin hergestellt. Exemplarisch ist die Darstellung der Lysin-Monomere in Abbildung 4.25 gezeigt.

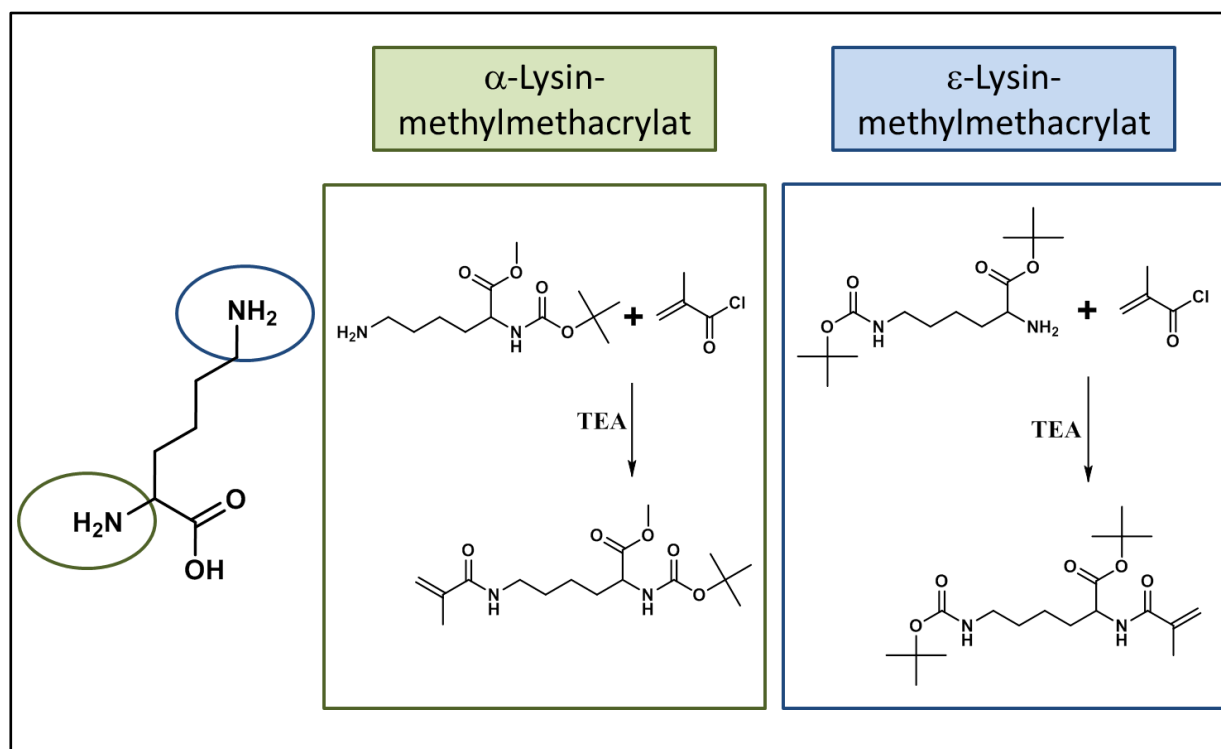


Abbildung 4.25: Darstellung von α - bzw. ϵ -*N*-Methacryloyl-*L*-Lysin aus dem jeweiligen geschützten *L*-Lysin mit Methacryloylchlorid und Triethylamin

Die Charakterisierung der durch Flash-Chromatografie aufgereinigten Monomere erfolgt durch ^1H -NMR. Exemplarisch ist das ^1H -NMR von α -*N*-Methacryloyl-*N*- ϵ -*t*-Butyloxycarbonyl-*L*-Lysin-*t*-butylester in Abbildung 4.26 gezeigt.

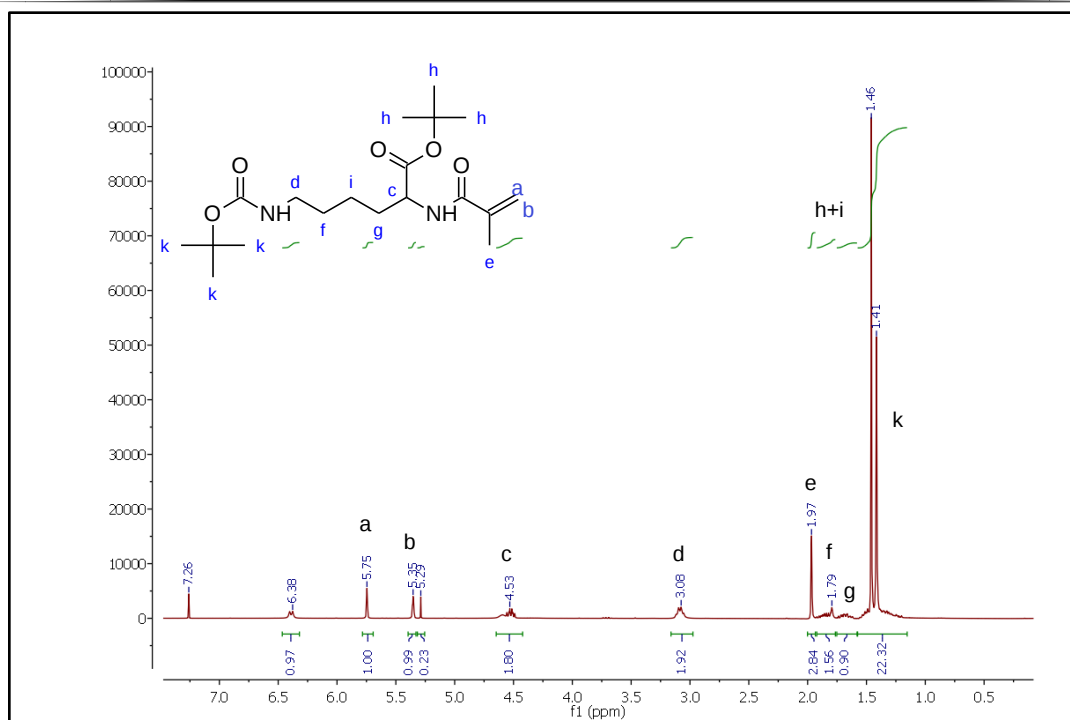


Abbildung 4.26: ^1H -NMR in CDCl_3 von α -N-Methacryloyl- α -t-Butyloxycarbonyl-L-Lysin-t-butylester

Die Reinheit der Lysin-Monomere kann zudem durch HPLC-Messung mit der Säule Si-60 in Ethylacetat überprüft werden. Für das α -N-Methacryloyl- α -t-butyloxycarbonyl-L-lysine-t-butylester wird eine Reinheit von 99% (im Anhang Abbildung 7.3) und beim α -N-Methacryloyl-N- ϵ -t-butyloxycarbonyl-L-lysine-t-butylester eine Reinheit von 97% (im Anhang Abbildung 7.2) gemessen.

4.2.7 Synthese der benötigten Polymere

Zur definierten Herstellung der Polymere wird die RAFT-Polymerisation angewendet. Als RAFT-Agens dient Benzyl-2-hydroxyethylcarbonotrithioat, welches nach der Vorschrift von Skey^[17] aus Mercaptoethanol, Schwefelkohlenstoff und Benzylbromid synthetisiert wird (Abbildung 4.27).

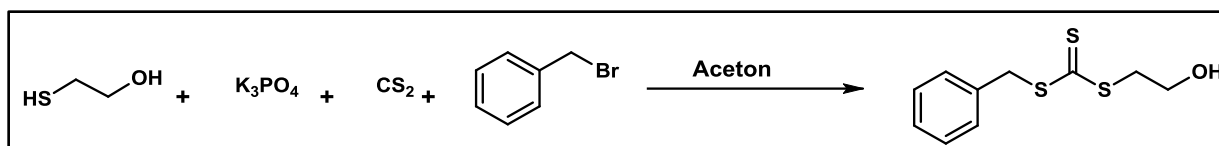


Abbildung 4.27: Darstellung des RAFT-Agens Benzyl-2-hydroxyethyl-carbonotrithioat synthetisiert aus Mercaptoethanol, Schwefelkohlenstoff und Benzylbromid

4.2.7.1 Poly(Amin- α -Lysin)

Zur Herstellung eines Blockcopolymers aus Mono-*N*-*boc*-1,3-diaminopropanmethacrylat und α -*N*-Methacryloyl- α -*t*-Butyloxycarbonyl-*L*-Lysin-*t*-butylester wird zunächst das kationische Monomer mit dem RAFT-Agens Benzyl-2-hydroxyethylcarbonotrithioat und dem Initiator Azoisobutyronitril (AIBN) in Anisol polymerisiert. Aufgereinigt wird das Polymer durch Fällen in Diethylether.

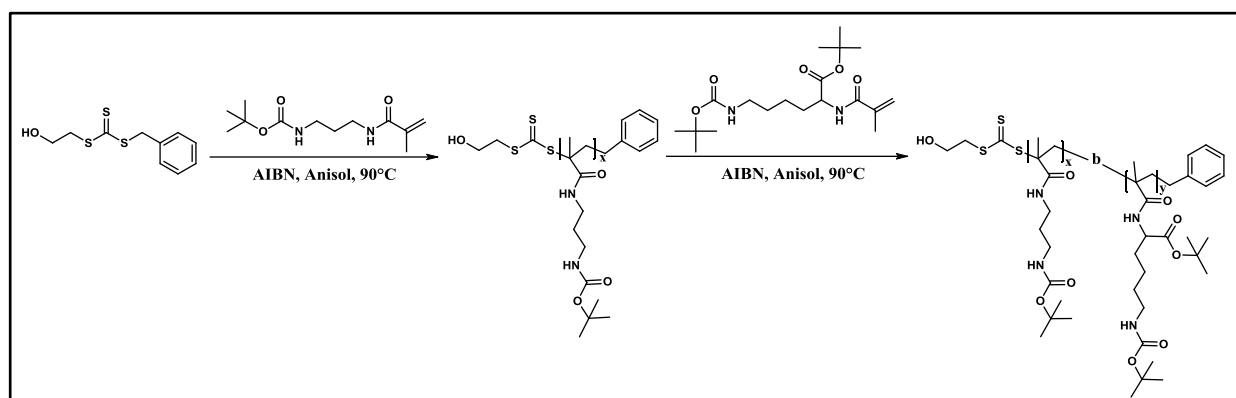


Abbildung 4.28: RAFT-Polymerisation zur Synthese des Blockcopolymers mit Benzyl-2-hydroxyethylcarbonotrithioat als RAFT-Agens, Mono-*N*-*boc*-1,3-diaminopropanmethacrylat als Monomer für den ersten Block und α -*N*-Methacryloyl- α -*t*-Butyloxycarbonyl-*L*-Lysin-*t*-butylester als Monomer für den zweiten Block in Anisol bei 90 °C

Im zweiten Schritt wird das so synthetisierte Polymer als Makroinitiator verwendet und α -N-Methacryloyl- α -t-Butyloxycarbonyl-L-Lysin-t-butylester als geschütztes zwit-terionisches Monomer in Anisol polymerisiert (Abbildung 4.28). Im weiteren Verlauf wird dieses Blockcopolymer als Poly(Amin- α -Lysin) bezeichnet.

Das Blockcopolymer und das Homopolymer werden mittels statischer und dynami-scher Lichtstreuung in Methanol mit 2 mM LiBr sowie GPC-Messung in DMAc cha-rakterisiert (Abbildung 4.29). Bei dem Blockcopolymer wird pro gemessenen Winkel der Mittelwert aus allen Konzentrationen gebildet und daraus mittels linearer Regres-sion die Molmasse sowie der Trägheitsradius bestimmt. Für A_2 wird dabei der Wert 0 angenommen.

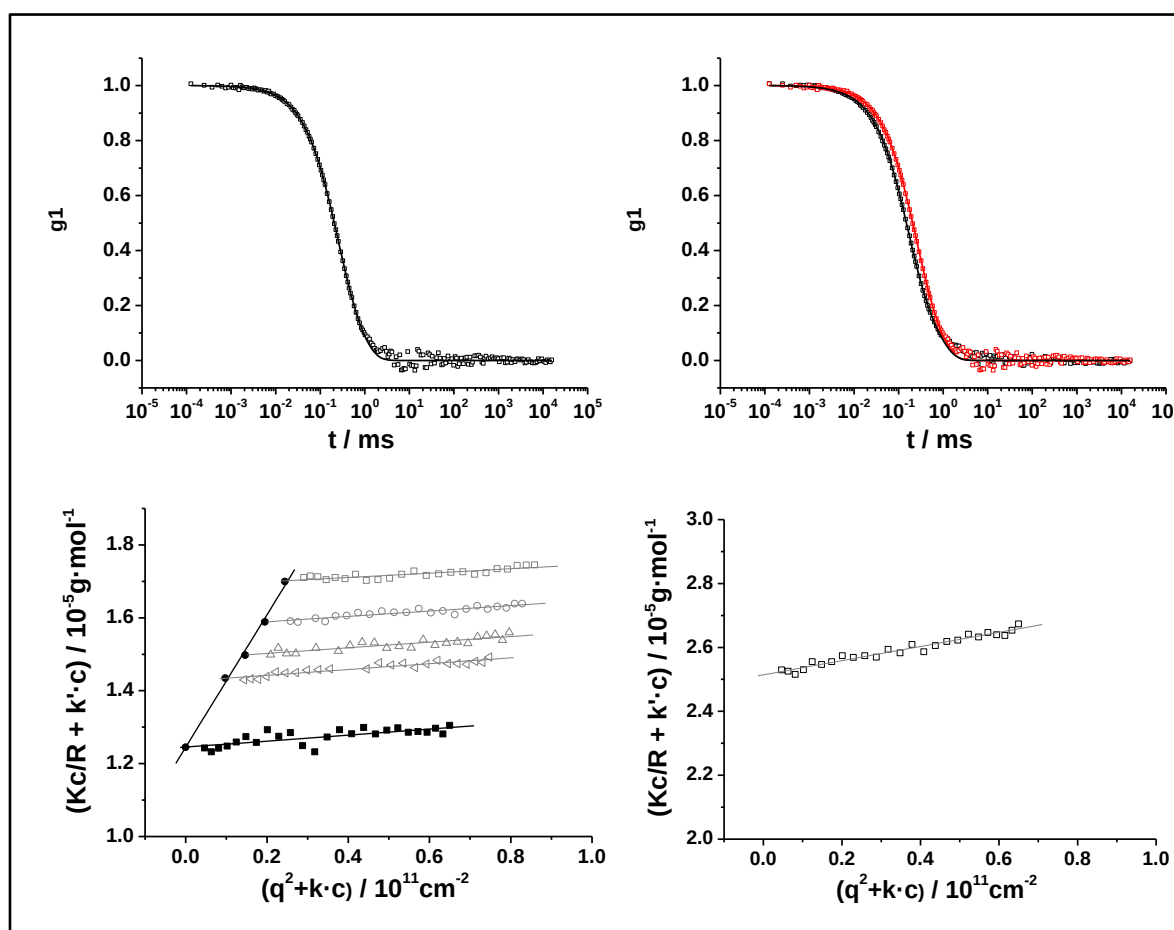


Abbildung 4.29: Charakterisierung des Blockcopolymers Poly(Amin- α -Lysin) (rot) im Vergleich zum Monoblock Poly(Amin) (schwarz) mit dynamischer und statischer Lichtstreuung in Methanol mit 2mM LiBr. oben: dynamische Lichtstreuung bei Streuwinkel von 30° und 20 °C; unten: statische Lichtstreuung im Bereich von 30-150° (5°-Schritte) bei 20 °C mit $dn/dc = 0,180 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (Monoblock) und $dn/dc = 0,165 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (Blockcopolymer)

Die ermittelten Werte sind Tabelle 4.3 zusammengefasst:

Tabelle 4.3: ermittelten Werte aus dynamischer (30°-Messung) und statischer Lichtstreuung in Methanol mit 2 mM LiBr sowie DMAc-GPC für Homo- und Blockcopolymer Poly(Amin- α -Lysin)

	M_w (GPC) / $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	PDI (GPC)	M_w (LS) / $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	A_2 / $\text{mol cm}^3 \cdot \text{g}^{-2}$	R_g / nm	R_h / nm
Homoblock Polyamin	40.450	1,5	80.120	$2,996 \cdot 10^{-7}$	14,1	7,0
Poly(Amin- α-Lysin)	16.270	1,8	39.777	0	16,3	4,9
Mischung aus Homo- und Blockcopolymer	31.810	1,8				

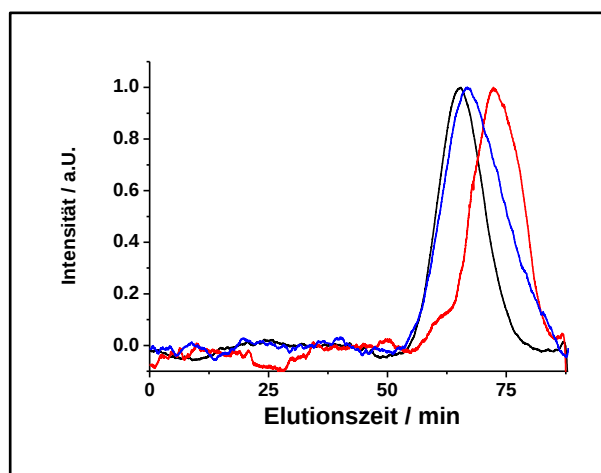


Abbildung 4.30: Charakterisierung des Blockcopolymer Poly(Amin- α -Lysin) durch GPC-Messung in DMAc von Monoblock Poly(Amin) (schwarz), Zweiblock Poly(Amin- α -Lysin) (rot) und einer Mischung mit dem Verhältnis 1:1 von Mono- und Zweiblock (blau)

In Abbildung 4.30 sind die Elutionskurven von Homopolymer (schwarz), Blockcopolymer (rot), sowie eine Mischung aus beiden Polymeren (blau) dargestellt.

Auffällig ist, dass das Homopolymer bei der GPC-Messung eine größere Molmasse als das Blockcopolymer besitzt. Die gleiche Beobachtung zeigt sich bei der Bestimmung der Molmasse mittels statischer Lichtstreuung. Dies wäre durch die Bildung zweier Homopolymere zu erklären.

Vergleicht man den dn/dc -Wert des Blockcopolymer ($0,165 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) mit den dn/dc Werten der Homopolymere von RAFT-Amin ($0,180 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) und RAFT- ϵ -Lysin ($0,1665 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$), stimmen innerhalb des Fehlers von 2% die Werte von RAFT- ϵ -Lysin und dem Blockcopolymer überein. Dies belegt, dass sich zwei Homopolymere gebildet haben und durch die Aufreinigung durch Fällen aus Cyclohexan ein Großteil des RAFT-Amins entfernt worden ist. Da der dn/dc -Wert des vermeintlichen Blockcopolymer sogar kleiner als der Wert der Komponente mit dem kleineren dn/dc -Wert ist, kann auch nicht über

$$(dn/dc)_{Block} = w_1(dn/dc)_1 + w_2(dn/dc)_2$$

der Anteil der beiden Blöcke abgeschätzt werden. Der Anteil des Homoblocks des Amins muss deshalb im Bereich des experimentellen Fehlers von circa 2% liegen.

In der GPC-Messung der Mischung beider Proben ist jedoch nur ein Peak – also kein Copolymer – zu erkennen. Durch die relative hohe Polydispersität der Polymere ist eine Interpretation der Ergebnisse schwierig.

Um zu bestimmen, ob ein Blockcopolymer, Homopolymere bzw. eine Mischung aus beiden Spezies vorliegt, werden die Polymere in 4M HCl in 1,4-Dioxan entschützt um Kapillarelektrophorese messen zu können.

Die erfolgreiche Entschützung wird durch ^1H -NMR-Messung überprüft (Abbildung 4.31). In den rechten Spektren ist deutlich zu erkennen, dass der charakteristische Peak für die Boc-Schutzgruppe bei 1,41 ppm verschwunden ist.

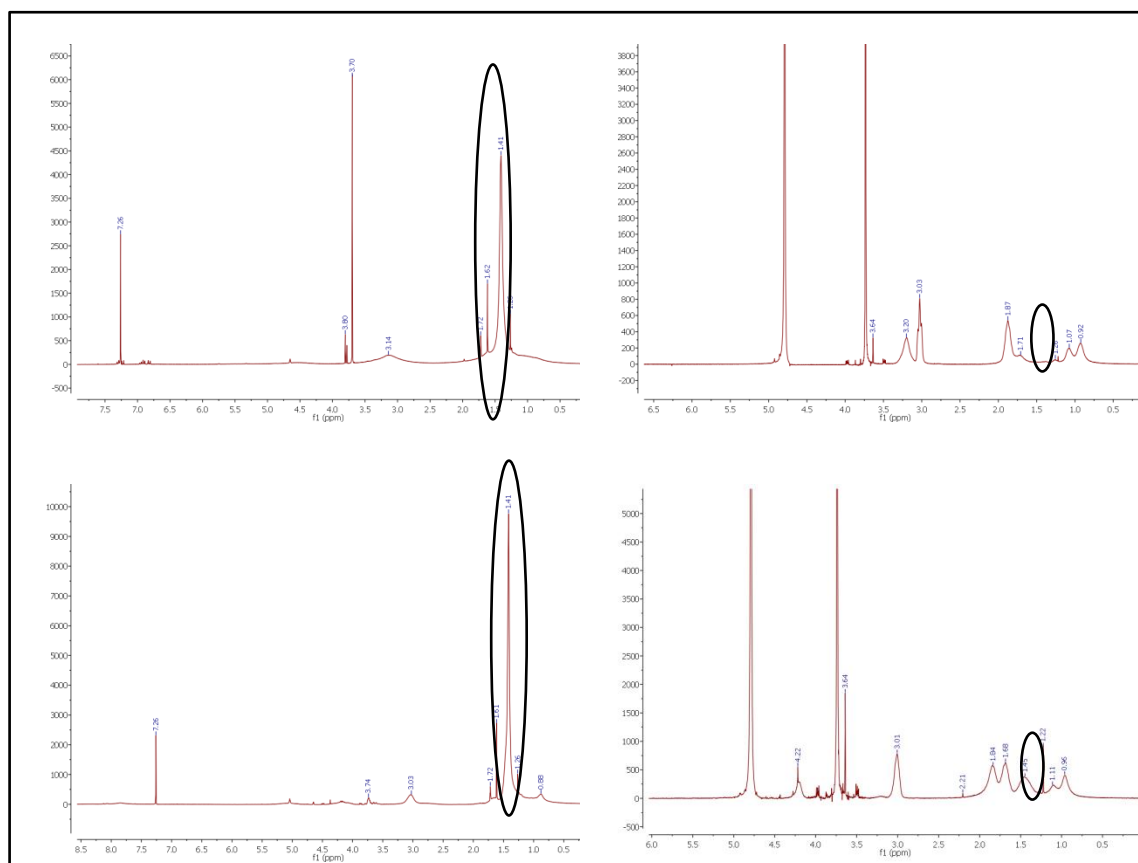


Abbildung 4.31: Kontrolle der Entschützung von Monoblock Poly(Amin) (oben) und Zweiblock Poly(Amin- α -Lysin) (unten) durch ^1H -NMR vor der Entschützung (links in CDCl_3) und nach der Entschützung (rechts in D_2O)

Die Kapillarelektrophorese der Proben wird in Natriumphosphatpuffer bei $\text{pH} = 2$ gemessen. Bei diesem pH -Wert bildet sich kein elektroosmotischer Fluss aus und damit ist es nicht möglich den EOF-Peak aller Messungen übereinander zulegen und

dadurch eine „Normierung“ in Richtung der x-Achse durchzuführen. Unterschiedliche Elutionszeiten der Proben sind damit möglich, da der EOF-Peak von Probe zu Probe stark variieren kann.

Die Kapillarelektrophorese-Messung ist Abbildung 4.32 aufgetragen. Das Homopolymer des kationischen Monomers (grau) eluiert als erstes.

Das Blockcopolymer (schwarz) zeigt zwei Elutionspeaks. Eine Mischung aus Homopolymer des kationischen Polymers sowie des Blockcopolymers entspricht dem Elutionsverhalten des reinen Blockcopolymers. Daraus folgt, dass sowohl Homopolymer

des kationischen Polymers sowie ein anderes Polymer vorliegt.

Weiter wird eine Mischung aus Blockcopolymer und Homopolymer des α -Lysinmonomers (blau) gemessen. Hier ist deutlich eine Überlagerung des Peaks bei 3,6 min des Blockcopolymers mit der Mischung aus Blockcopolymer und Homopolymer des α -Lysinmonomers zu erkennen. Daraus folgt, dass der zweite Peak des Blockcopolymers eindeutig dem Homopolymer des α -Lysinmonomers zugeordnet werden kann.

Hätte sich ein Blockcopolymer gebildet, so sollte die blaue Kurve einen dritten Peak zeigen, der sich nicht durch die beiden Homoblocke beschreiben lässt.

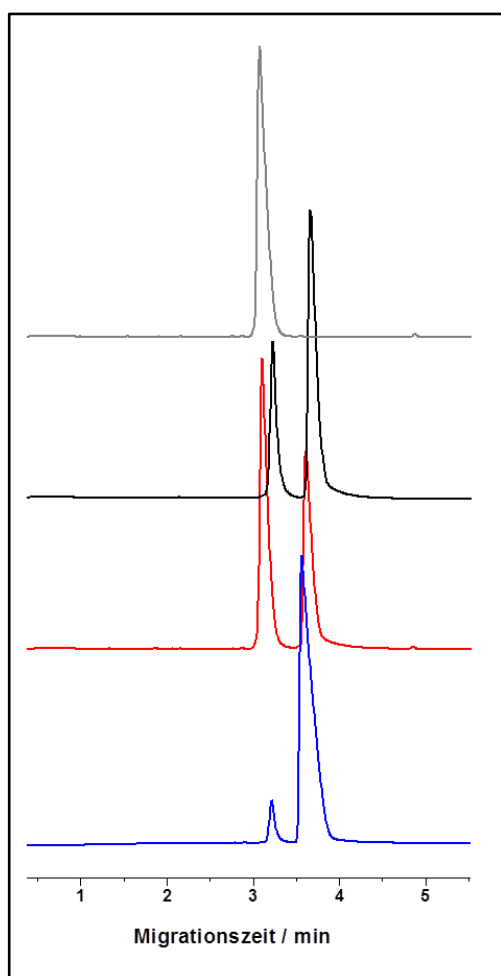


Abbildung 4.32: Kapillarelektrophorese-Messung des entschützten Monoblocks Poly(Amin) (grau), Blockcopolymers Poly(Amin- α -Lysin) (schwarz), Mischung aus Monoblock und Blockcopolymer (rot) und einer Mischung aus Blockcopolymer und einem Homoblock aus α -N-Methacryloyl- α -t-Butyloxycarbonyl-L-Lysin-t-butylester als Monomer (blau) in Natriumphosphatpuffer mit pH = 2, 40 cm Kapillarlänge, 20 °C und 17 kV

4.2.7.2 Poly(α -Lysin-Amin)

Im zweiten Versuch ein Blockcopolymer herzustellen werden die gleichen Monomere wie in Abschnitt 4.2.7.1 verwendet. Diesmal wird jedoch zuerst das α -Lysin-Monomer in Anisol mit dem Trithio-RAFT-Agens polymerisiert. Nach der Aufreinigung durch Fällern in Cyclohexan wird dieses Polymer als Makroinitiator verwendet. Der zweite Block wird mit Mono-N-boc-1,3-diaminopropanmethylmethacrylat als Monomer in 1,4-Dioxan polymerisiert (Abbildung 4.33). Im weiteren Verlauf wird dieses Polymer als Poly(α -Lysin-Amin) bezeichnet.

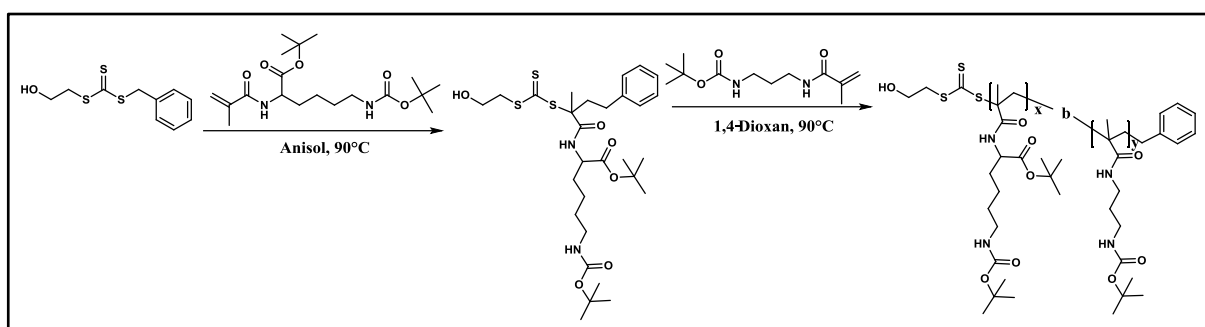


Abbildung 4.33: RAFT-Polymerisation des Blockcopolymers mit Benzyl-2-hydroxyethyl-carbono-trithioat als RAFT-Agens, α -N-Methacryloyl- α -*t*-Butyloxycarbonyl-L-Lysin-*t*-butylester als Monomer für den ersten Block und Mono-N-boc-1,3-diaminopropanmethylmethacrylat als Monomer für den zweiten Block in Anisol bzw. 1,4-Dioxan bei 90 °C

Das Blockcopolymer wird mittels dynamischer Lichtstreuung in Methanol mit 2mM LiBr und DMAc-GPC charakterisiert (Abbildung 4.34).

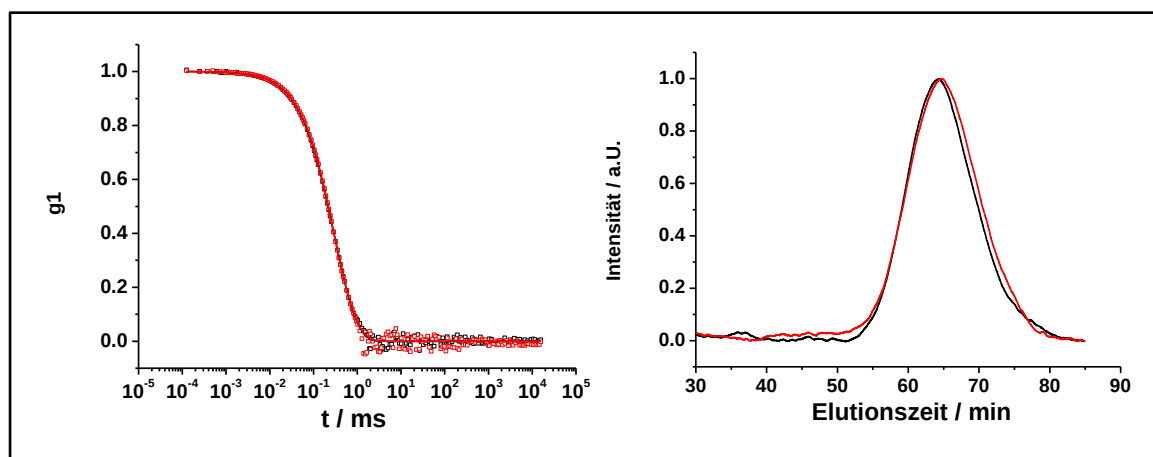


Abbildung 4.34: Charakterisierung des Monoblocks Poly(α -Lysin) (schwarz) und des Blockcopolymers Poly(α -Lysin-Amin) (rot) mittels dynamischer Lichtstreuung in Methanol mit Streuwinkel 30 ° bei 20 °C (links) und GPC-Messung in DMAc (rechts)

Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Tabelle 4.4: Übersicht über die gemessenen Werte mit DMac-GPC und dynamischer Lichtstreuung (30 °-Messung) in Methanol mit 2 mM LiBr von Homo- und Blockcopolymer Poly(α -Lysin-Amin)

	Mw (GPC) / g·mol ⁻¹	PDI (GPC)	R _h / nm
Homoblock α-Lysin	47.660	1,6	7,4
Blockcopolymer	43.410	1,5	7,6

Sowohl in der GPC-Messung als auch in der dynamischen Lichtstreuung ist keine Änderung der Molmasse bzw. des hydrodynamischen Radius messbar.

Somit ist es wahrscheinlich, dass die Polymerisation des zweiten Blocks nicht funktioniert hat.

Um die Proben mit der Kapillarelektrophorese untersuchen zu können, werden die

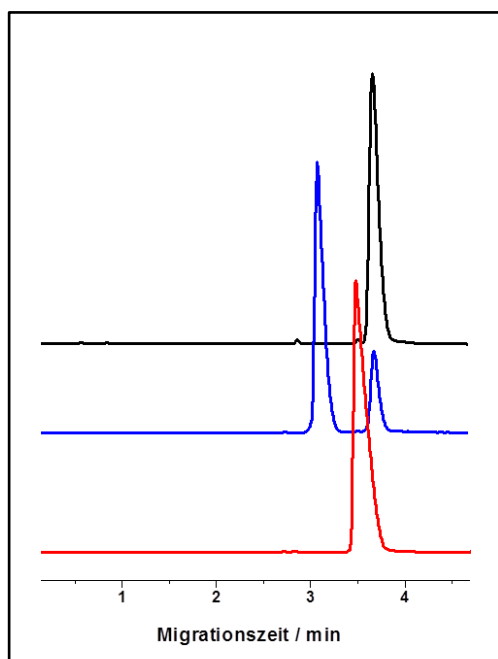


Abbildung 4.35: Kapillarelektrophorese-Messung von entschütztem Blockcopolymer Poly(α -Lysin-Amin) (schwarz), einer Mischung aus Blockcopolymer und Homoblock des Amins (blau) und Mischung aus Blockcopolymer und Homoblock des α -Lysins (rot) in Natriumphosphatpuffer pH 2

bocgeschützten Aminogruppen des Polymers durch Behandlung mit 4M HCl in 1,4-Dioxan entschützt.

Die Kapillarelektrophorese wurde wiederum in Natriumphosphatpuffer mit pH = 2 gemessen und dadurch sind unterschiedliche Elutionszeiten der gleichen Proben möglich, da eine „Normierung“ mit Hilfe des elektroosmotischen Fluss nicht möglich ist.

In Abbildung 4.35 ist die Kapillarelektrophorese-Messung gezeigt. Das Blockcopolymer ist in schwarz dargestellt und zeigt einen Peak. Daraus folgt, dass nur ein Polymer vorliegt.

In blau wird eine Mischung aus Blockcopolymer und Homopolymer des kationischen Monomers aufgetragen. Es sind zwei Peaks er-

kennbar, wobei der zweite Peak dem Peak des Blockcopolymers entspricht. Daraus lässt sich folgern, dass kein Homopolymer des kationischen Polymers entstanden ist.

Des Weiteren wird in Rot eine Mischung aus Blockcopolymer und Homopolymer des α -Lysin-Monomers aufgetragen. Hier ist wiederum nur ein Peak erkennbar. Diese Messung zeigt, dass bei dem Versuch ein Blockcopolymer herzustellen, nur Homopolymer des α -Lysin-Monomers entstanden ist. Wenn ein Blockcopolymer entstanden wäre, müsste man in der roten Kurve zwei Peaks erkennen können. Die Verschiebung des zweiten Peaks der roten Kurve im Vergleich zum Peak der schwarzen Kurve beruht auf der Verschiebung der Migrationszeit während der Messung. Dies kann durch Fehlen des elektroosmotischen Flusses nicht „normiert“ werden.

Um die RAFT-Polymerisation von Mono-N-boc-1,3-diaminopropanmethacrylat und α -Lysin-methylmethacrylat weiter untersuchen zu können, wird die Polymerisation mit Dithio- und Trithio-RAFT-Agentien in unterschiedlicher Polymerisationsreihenfolge in Anisol und 1,4-Dioxan durchgeführt. Variiert werden außerdem das Verhältnis von Lösungsmittel und Monomer sowie der Polymerisationsgrad.

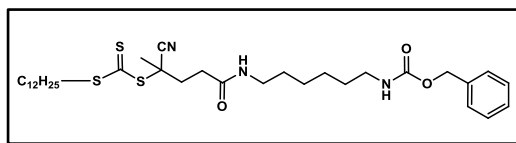


Abbildung 4.36: RAFT-Agens mit Z-geschützter Aminofunktionalisierung

Beispielsweise ist ein Trithio-RAFT-Agens mit Z-geschützter Aminofunktionalisierung (Abbildung 4.36) hergestellt worden.

Als Monomer wird α -Lysin-methylmethacrylat gewählt und der Polymerisationsgrad auf 53 eingestellt. Erhalten wird ein Polymer

mit einem PDI von 1,4.

Wird daraus per RAFT-Polymerisation des zweiten Monomers ein Blockcopolymer hergestellt, ist die Analyse, ob sich ein Blockcopolymer oder zwei Homoblöcke gebildet haben ohne nachfolgende Entschützung schwierig. Wird ein Polymer erhalten, welches sich in der DLS-Messung monomodal anfalten lässt, kann über diese Methode ermittelt werden, ob Blockcopolymere oder Homoblöcke vorliegen.

Außerdem wird ein Polymer mit Polymerisationsgrad 20 hergestellt, welches einen PDI von 1,17 besitzt. Dies liegt im Bereich, der in der DLS-Messung monomodal angefügt werden kann, jedoch ist die Molmasse für die weitere Anwendung zu gering.

4.2.7.3 Poly(ϵ -Lysin-Amin)

Analog zum vorherigen Abschnitt soll ein Blockcopolymer mit ϵ -Lysin-Monomer statt α -Lysin-Monomer als zwitterionischer Block hergestellt werden (Abbildung 4.37). Im weiteren Verlauf wird das Polymer als Poly(ϵ -Lysin-Amin) bezeichnet.

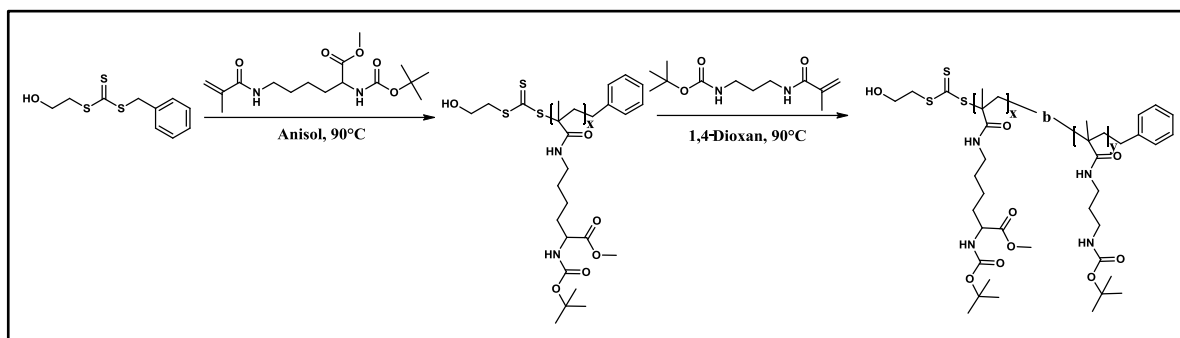


Abbildung 4.37: RAFT-Polymerisation des Blockcopolymers mit Benzyl-2-hydroxyethyl-carbonotrithioat als RAFT-Agens, ϵ -N-Methacryloyl-N- α -butyloxycarbonyl-L-lysinmethylester als Monomer für den ersten Block und Mono-N-boc-1,3-diaminopropanemethylmethacrylat als Monomer für den zweiten Block in Anisole bzw. 1,4-Dioxan bei 90 °C

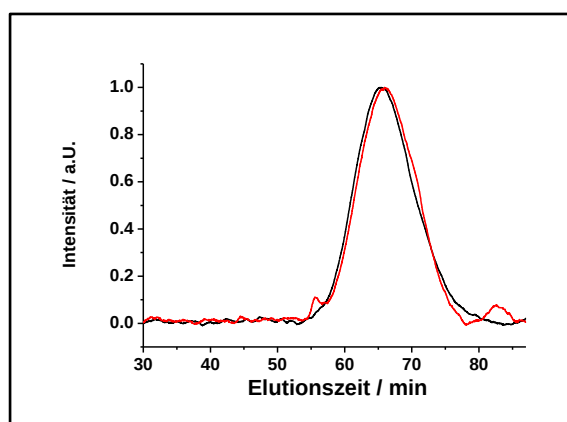


Abbildung 4.38: Charakterisierung des Blockcopolymers Poly(ϵ -Lysin-Amin) durch GPC-Messung von Monoblock Poly(ϵ -Lysin) (schwarz) und Blockcopolymer Poly(ϵ -Lysin-Amin) (rot) in DMAc

Das Polymer wird mittels statischer und dynamischer Lichtstreuung in Methanol mit 2 mM LiBr (Abbildung 4.39) sowie mit der DMAc-GPC untersucht (Abbildung 4.38).

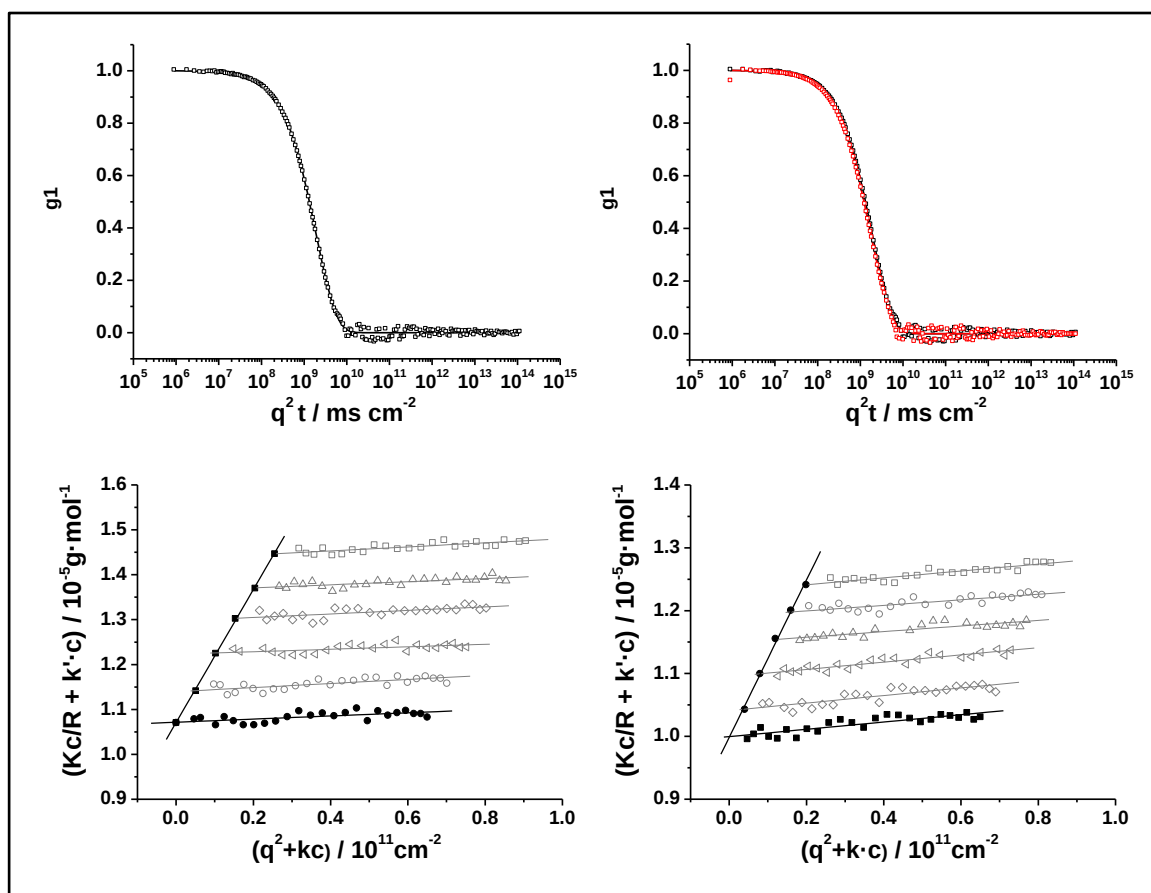


Abbildung 4.39: Charakterisierung des Blockcopolymers Poly(ε-Lysin-Amin) (rot) im Vergleich zum Monoblock Poly(ε-Lysin) (schwarz) mit dynamischer und statischer Lichtstreuung in Methanol mit 2 mM LiBr. oben: dynamische Lichtstreuung bei Streuwinkel von 30 ° und 20 °C; unten: statische Lichtstreuung im Bereich von 30-150 ° (5 °-Schritte) bei 20 °C mit $dn/dc = 0,1665 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (Monoblock) und $dn/dc = 0,163 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (Blockcopolymer)

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.5 zusammengestellt.

Tabelle 4.5: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dynamischer und statischer Lichtstreuung in Methanol mit 2 mM LiBr und DMAC-GPC des Homo- und Blockcopolymers Poly(ε-Lysin-Amin)

	M_w (GPC) / $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	PDI (GPC)	M_w (Statik) / $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	A_2 (Statik) / $\text{mol} \cdot \text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-2}$	R_g (Statik) / nm	R_h (DLS) / nm
Homoblock ε-Lysin	37.130	1,5	$9,34 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^{-7}$	10,6	6,6
Blockco- polymer	35.470	1,4	$1,00 \cdot 10^5$	$1,62 \cdot 10^{-7}$	13,1	6,4

In der DMAC-GPC ist so gut wie keine Änderung der Molmasse zu erkennen. In der statischen Lichtstreuung ist eine Änderung von circa $7\,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ messbar und eine Vergrößerung des Trägheitsradius um 2,5 nm, jedoch ändert sich der per DLS bestimmte hydrodynamische Radius nicht.

Anhand der Ergebnisse der GPC-Messung und der dynamischen Lichtstreuung ist die Bildung eines Blockcopolymers fraglich. Es soll deshalb wie im vorherigen Abschnitt zunächst entschützt werden um dann Kapillarelektrophoresemessungen durchführen zu können.

Zum Entfernen der Boc-Schutzgruppe wird 4M HCl in 1,4-Dioxan verwendet. Zum Entfernen der Methylesterschutzgruppe der Carbonsäure wird das Polymer mit Lithiumhydroxid in einer Methanol-Wasser-Mischung behandelt.

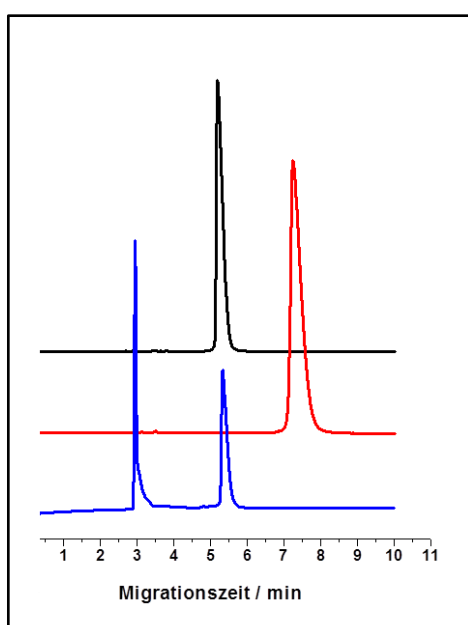


Abbildung 4.40: Kapillarelektrophorese-Messung von entschütztem Blockcopolymer Poly(ϵ -Lysin-Amin) (schwarz), einer Mischung aus Blockcopolymer Poly(ϵ -Lysin-Amin) und Homoblock des ϵ -Lysins (rot) und Mischung aus Blockcopolymer Poly(ϵ -Lysin-Amin) und Homoblock des Amins (blau) in Natriumphosphatpuffer pH=4,0, 40 cm Kapillarlänge, 20°C und 17 kV

Die Kapillarelektrophorese-Messung wird in Natriumphosphatpuffer bei pH = 4,0 durchgeführt. In Abbildung 4.40 sind die Messkurven zum Vergleich übereinander gelegt. In schwarz ist das Blockcopolymer dargestellt. Die Elutionskurve zeigt einen Peak. Daraus folgt, dass nur eine Art Polymer entstanden ist.

Die Mischung aus Blockcopolymer und Homopolymer des kationischen Monomers (blau) zeigt zwei Peaks, wobei der zweite Peak dem Peak des Blockcopolymers entspricht. Daraus ergibt sich, dass kein Homopolymer des kationischen Monomers entstanden ist.

Eine Mischung aus Blockcopolymer und Homopolymer des ϵ -Lysin-Monomers (rot) zeigt einen Peak. Daraus lässt sich folgern, dass das Blockcopolymer nur aus einem Homoblock des ϵ -Lysin-Monomers besteht, da ansonsten die

Messung zwei Peaks zeigen müsste – für Blockcopolymer und ϵ -Lysin-Polymer.

Weiter ist das Homopolymer des Amin-Monomers und des ϵ -Lysin-Monomers zusammengegeben worden. Wie erwartet werden zwei Peaks erhalten und damit kann eine Komplexbildung der beiden Polymere ausgeschlossen werden.

Die Verschiebung der roten relativ zur schwarzen Kurve ist wiederum durch Fehlen des elektroosmotischen Flusses und der somit fehlenden „Normierung“ zu erklären.

Die Polymerisation von Mono-N-boc-1,3-diaminopropanmethylemethacrylat als kationisches Polymer und α - oder ϵ -N-Methacryloyl-L-Lysin als zwitterionisches Monomer ist mit verschiedenen RAFT-Agentien in unterschiedlicher Polymerisationsreihenfolge und Lösungsmitteln durchgeführt worden.

Die einzelnen Monoblocke haben sich jeweils per RAFT-Polymerisation synthetisieren lassen besitzen jedoch immer einen PDI zwischen 1,4-1,5.

Dies legt die Vermutung nahe, dass die Polymere nicht geraftet worden sind, sondern durch freie Radikalik polymerisiert sind. Aufgrund der relativ hohen Molmasse ist die RAFT-Endgruppe im NMR nicht sichtbar und MALDI-TOF-Messung zur Endgruppenanalyse nicht möglich.

Die Funktionalität des RAFT-Agens ist mittels Polymerisation von NIPAM überprüft worden und es wurde ein Polymer mit PDI = 1,12 erhalten.

Eine andere Möglichkeit wäre beide Blöcke getrennt zu polymerisieren und danach per Kopplungsreaktion der Endgruppen das Blockcopolymer herzustellen. Jedoch ist hier wiederum die Kopplungseffizienz begrenzt sowie die Aufreinigung am Ende schwierig.

Während der Versuche Polyion-Komplex-Mizellen mit einer zwitterionischen Hülle herzustellen, hat [18] gezeigt, dass auch Polyoxazoline nicht in Blutserum aggregieren.

Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse soll im nächsten Abschnitt die Synthese von Polyion-Komplex-Mizellen mit Polyoxazolinhülle diskutiert werden.

4.2.8 Zusammenfassung von Kapitel Polyion-Komplex-Mizellen (PIC) mit zwitterionischer Schale und kationischem Kern

Für die Synthese von zwitterionischen Polymeren wurden zwei unterschiedliche Lysin-Monomere hergestellt. Bei dem ersten ist die Methacrylamidgruppe an die α -Aminogruppe gebunden und bei dem zweiten Monomer an die ϵ -Aminogruppe.

Als kationisches Monomer wurde Mono-N-boc-1,3-diaminopropanmethylemethacrylat verwendet.

Diese Monomere konnten jeweils einzeln polymerisiert werden, wobei fraglich ist, ob dies per kontrollierter RAFT-Polymerisation geschah.

Es wurden drei verschiedene Systeme versucht zu polymerisieren:

- Mono-N-boc-1,3-diaminopropanmethylemethacrylat + α -Lysin-Methylemethacrylat
- α -Lysin-Methylemethacrylat + Mono-N-boc-1,3-diaminopropanmethylemethacrylat
- ϵ -Lysin-Methylemethacrylat + Mono-N-boc-1,3-diaminopropanmethylemethacrylat

Charakterisiert wurden die Systeme mit dynamischer und statischer Lichtstreuung sowie DMAc-GPC.

Durch die Kapillarelektrophorese konnte jeweils abschließend gezeigt werden, dass jeweils nur Homoblocke entstanden sind und keine Blockcopolymere.

4.3 Polyion-Komplex-Mizellen (PIC) mit Poly-(oxazolin)-Schale

Die Vorzüge der Mizellenbildung wurden bereits in Abschnitt 4.2 diskutiert. Dr. [REDACTED]^[19] konnte zeigen, dass nicht nur zwitterionische Polymere sondern auch Polyoxazoline in Blutserum nicht aggregieren.

Dies ermöglicht die Anwendung von Polyoxazolinen als Schale bei der Polyion-Komplex-Mizellenbildung.

Kataoka hat gezeigt, dass Poly(2-propyl-2-oxazolin)-block-poly-L-lysin und Poly(2-propyl-2-oxazolin)-block-poly-L-aspartat in Wasser Polyion-Komplex-Mizellen bilden. Diese zeigen ein LCST-Verhalten und kollabieren bei 32 °C (Abbildung 4.41)^[14].

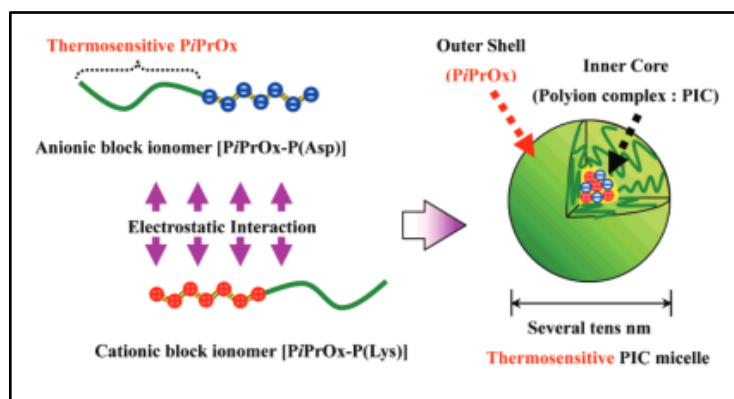


Abbildung 4.41: Bildung von thermoresponsiven Mizellen in Wasser aus Poly(2-propyl-2-oxazolin)-block-poly-L-lysin und Poly(2-propyl-2-oxazolin)-block-poly-L-aspartat^[13]

Jedoch wird statt Poly(2-propyl-2-oxazolin)-block-poly-L-aspartat eine ODN-Sequenz bzw. siRNA zur Komplexierung genommen. Als Oxazolin wird 2-Ethyl-2-oxazolin bzw. 2-Propyl-2-oxazolin verwendet.

Auch in diesem Fall soll der kationische Block des Blockcopolymers aus Poly-L-lysin hergestellt werden. Dafür wird das von [REDACTED] synthetisierte trifluoracetatgeschützte Lysin-N-Carboxyanhydrid (TFA-Lysin-NCA) verwendet.

4.3.9 Synthese des benötigten Blockcopolymers

4.3.9.1 Polymerisation von 2-Ethyl-2-oxazolin und 2-Isopropyl-2-oxazolin

Das verwendete Poly(2-oxazolin) ist von [REDACTED] als statistisches Polymer aus 2-Ethyl-2-oxazolin und 2-Isopropyl-2-oxazolin mit 6-Azido-1-hexyltosylat als Initiator in Acetonitril synthetisiert worden. Das statistische Polymer wurde gewählt, da dieses im Arbeitskreis verfügbar gewesen ist.

Die Polymerisation wird mit 1-Boc-Piperazin abgebrochen und durch Flash-Chromatografie aufgereinigt (Abbildung 4.42).

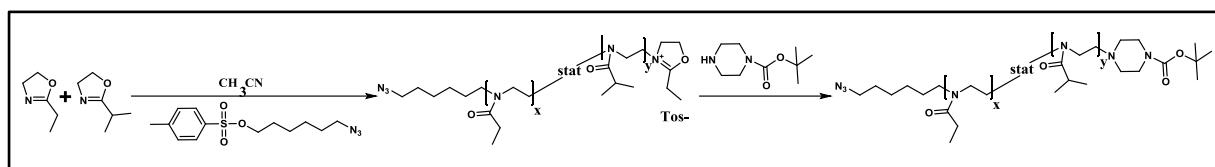


Abbildung 4.42: Polymerisation von Poly(iPrOx+EtOx) aus 2-Ethyl-2-oxazolin und 2-Isopropyl-2-oxazolin mit 6-Azido-1-hexyltosylat als Initiator in Acetonitril

Mit Hilfe des ^1H -NMR (Abbildung 4.43) lässt sich das Einbauverhältnis von 2-Ethyl-2-Oxazolin und 2-Isopropyl-2-Oxazolin bestimmen, wobei vorausgesetzt wird, dass der Abbruch mit 1-Boc-Piperazin quantitativ verläuft. Den Anteil des 2-Isopropyl-2-oxazolins erhält man durch die Addition der Integrale der zwei Singulett-Peaks des Protons an C2 der Isopropylgruppe. Als Referenz ist der charakteristische Peak der boc-Schutzgruppe bei 1,41 ppm genommen worden. Die Methylgruppen des Propyl- und Ethyloxazolins entsprechen dem Peak bei 1,09 ppm. Um den Anteil des 2-Ethyl-2-Oxazolins zu bestimmen, muss deshalb das Integral des Isopropyloxazolins abgezogen werden. Daraus ergibt sich ein Einbauverhältnis von circa 60 zu 40 2-Ethyl-2-oxazolin zu 2-Isopropyl-2-oxazolin, was dem eingesetzten Verhältnis entspricht. Der Polymerisationsgrad beträgt 57.

Das Polymer besitzt eine Übergangstemperatur von 66 °C, die mittels Aufnahme einer Trübungskurve (im Anhang Abbildung 7.4) bestimmt worden ist.

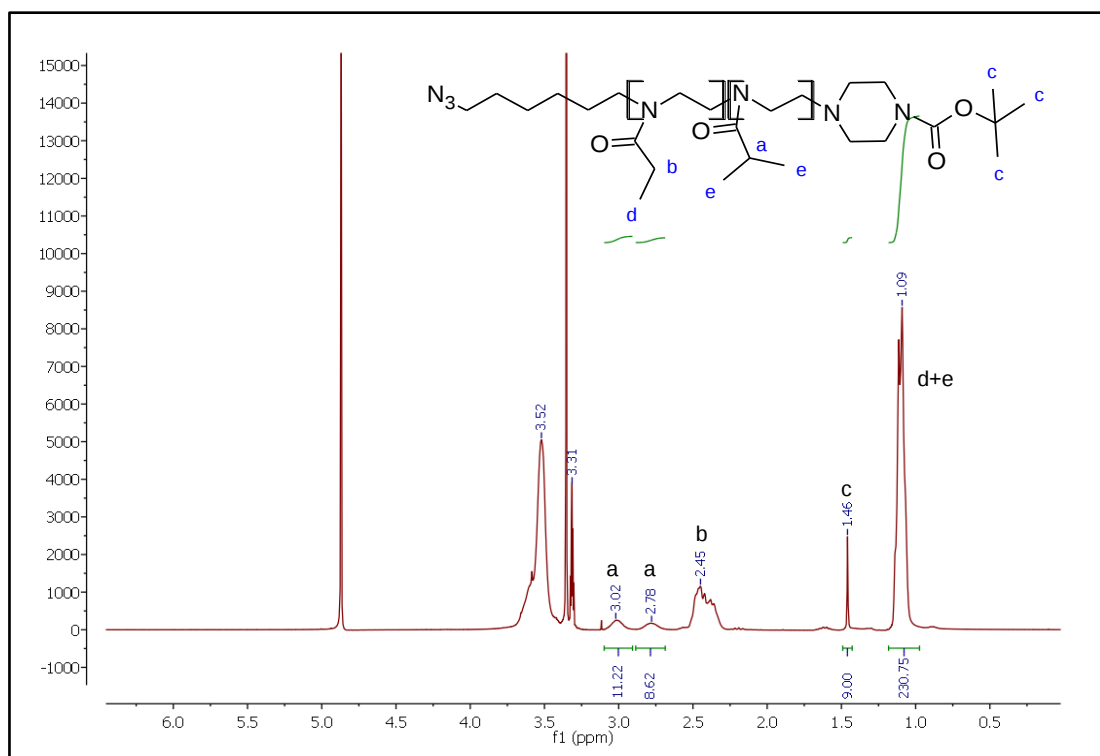


Abbildung 4.43: ^1H -NMR von Poly(iPrOx+EtOx) in MeOH-d_4

4.3.9.2 Blockcopolymer aus Poly(2-Oxazolin) und TFA-Lysin-NCA

Um ein Blockcopolymer bestehend aus 2-Oxazolin und einem kationischen Block zu erhalten, ist der nächste Schritt die Polymerisation des TFA-Lysin-NCA's unter Verwendung des Polyoxazolins als ersten Block. Für die Initiierung der NCA-Polymerisation wird eine freie Aminogruppe benötigt.

Vorversuche haben gezeigt, dass 1-Boc-Piperazin nicht als Initiator für die Polymerisation von TFA-Lysin-NCA verwendet werden kann, da das sekundäre Amin des Piperazins die Polymerisation des NCAs nicht startet.

Deshalb wird die Azidgruppe des Polyoxazolins, welche mittels des Initiators eingeführt worden ist, durch eine Staudinger-Reaktion mit Triphenylphosphin zum primären Amin reduziert (Abbildung 4.44), um damit ein primäres Amin zur Initiierung der NCA-Polymerisation zu erhalten.

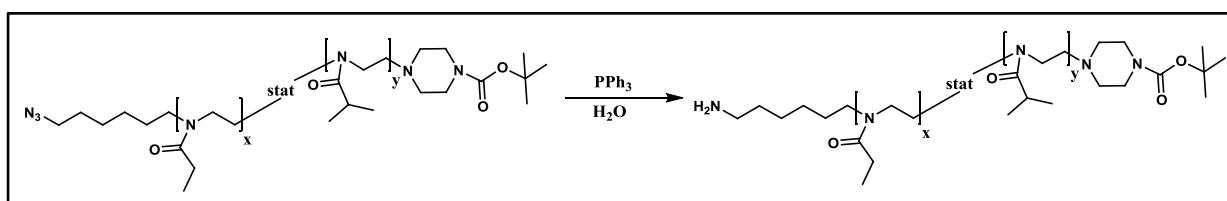


Abbildung 4.44: Reduktion der Azidengruppe des Polyoxazolins mit Triphenylphosphin zu einer primären Aminoendgruppe

Im Vergleich der IR-Spektren des Polyoxazolins vor der Reduktion (schwarz) und nach der Reduktion (rot) in Abbildung 4.45 ist die erfolgreiche Staudinger-Reaktion

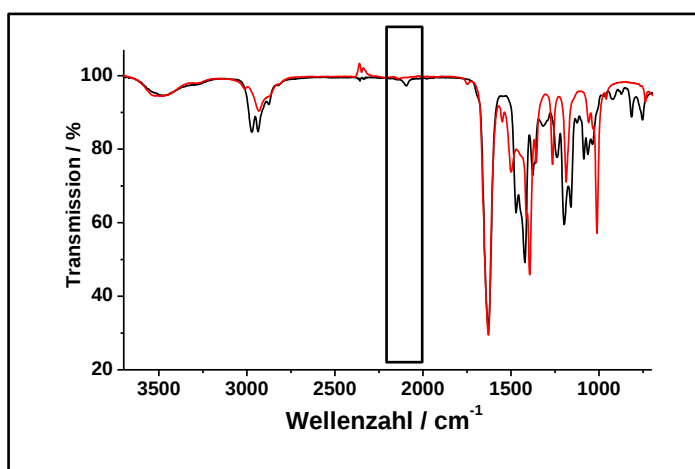


Abbildung 4.45: IR-Spektrum zeigt das Polyoxazolin vor (schwarz) und nach (rot) der Reduktion der Azidbande

anhand der fehlenden Azidgruppe zu erkennen. Alternativ kann statt der Reduktion der Azidgruppe auch die sekundäre Aminoendgruppe über eine Reaktion mit boc-geschützter Aminobuttersäure und 1,1-Carbonyldiimidazol in eine primäre Aminogruppe umgewandelt werden. Dies ermöglicht den Erhalt der Azid-

gruppe zur Biofunktionalisation durch kupferfreie Clickchemie (vergleiche Kapitel 4.4).

Die entstandene freie Aminoendgruppe des Polyoxazolins kann nun als Initiator für die Polymerisation des trifluoracetatgeschützten Lysin-NCA verwendet werden.

In einem ersten Versuch wird die Polymerisation in Acetonitril bei Raumtemperatur durchgeführt. Dabei ist jedoch das Blockcopolymer als farbloser Niederschlag ausgefallen, da dieses in Acetonitril nicht löslich ist. Deshalb wird in einem zweiten Ansatz die Polymerisation in DMAc durchgeführt (Abbildung 4.46).

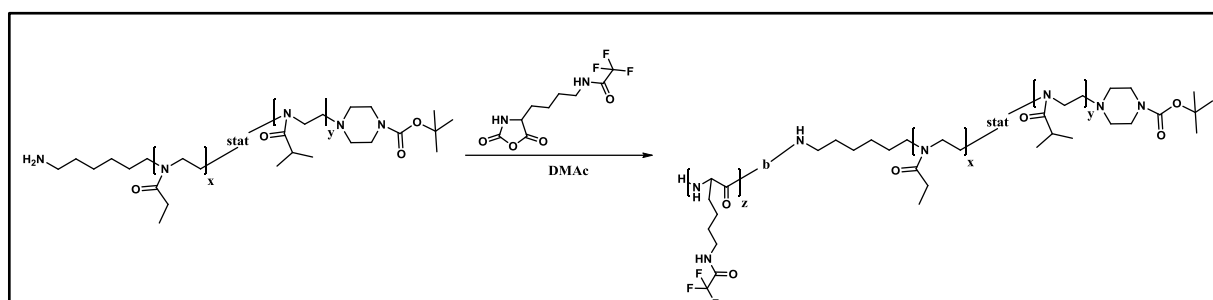


Abbildung 4.46: Polymerisation von TFA-Lys-NCA mit Poly(iPrOx+EtOx) als Makroinitiator in Dimethylacetamid

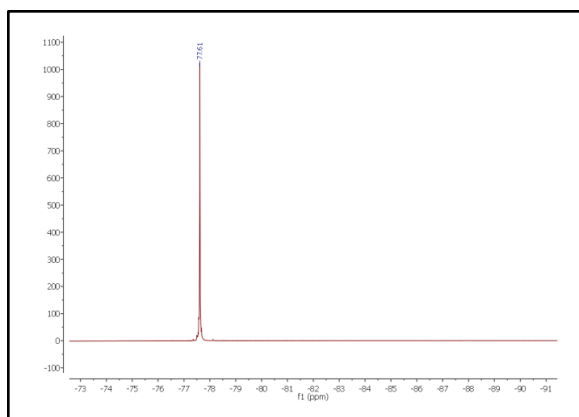


Abbildung 4.47: ^{19}F -NMR von Poly(iPrOx+EtOx)-b-(Lys-TFA) in MeOD

Das Polymer wird durch Fällen in Cyclohexan aufgereinigt und das überschüssige Monomer dabei entfernt. Das ^{19}F -NMR (Abbildung 4.47) zeigt die Trifluoracetatendgruppe des Polymers und damit die erfolgreiche Polymerisation.

Mittels DMAc-GPC-Messungen wird das Polymer charakterisiert (Abbildung 4.48). In grün ist das Polyoxazolin aufgetragen. Das Blockcopolymer aus Polyoxazolin und Lysin-NCA ist in türkis zu sehen. Die Messung zeigt, dass nur ein Teil des Polyoxazolins die NCA-Polymerisation initiiert hat. Man sieht, dass in der Probe Blockcopolymer und reines Polyoxazolin nebeneinander vorliegen. Um das Homopolyoxazolin abzutrennen erfolgt die Aufreinigung durch Amicon-Zentrifugenfilter

30kD gegen Methanol. Die GPC-Messung nach der Aufreinigung ist in grau dargestellt.

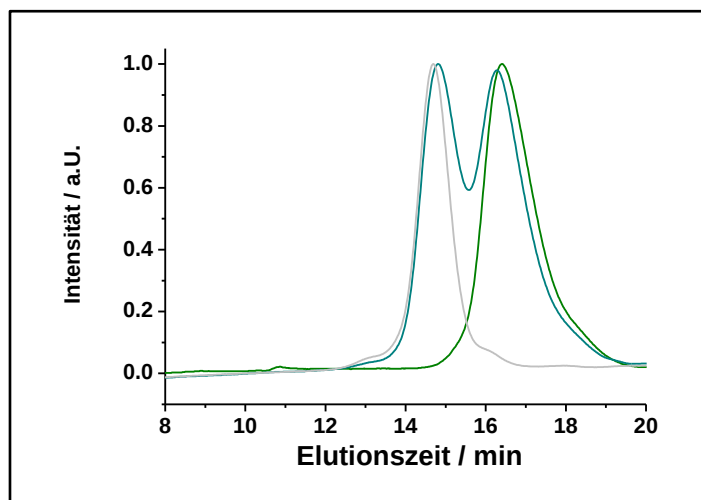


Abbildung 4.48: DMac-GPC von Poly(iPrOx+EtOx) (grün), Poly(iPrOx+EtOx)-b-(Lys-TFA) (türkis) und nach Aufreinigung mit 30kD Amicon (grau)

Die Messung zeigt, dass die Synthese und Aufreinigung des Blockcopolymers Poly-(iPrOx+EtOx)-b-(Lys-TFA) erfolgreich ist, da nur noch der Peak des Blockcopolymers vorhanden ist.

Das Blockverhältnis wird mittels des ^1H -NMR-Spektrums ermittelt (Abbildung 4.49).

Das Signal bei 3,98 ppm entspricht dem Backbone des Poly-

L-Lysinblocks, das Signal bei 2,47 ppm dem Backbone des Poly-Oxazolinblocks.

Über das Verhältnis der Integrale und unter Einbeziehung der Protonen pro

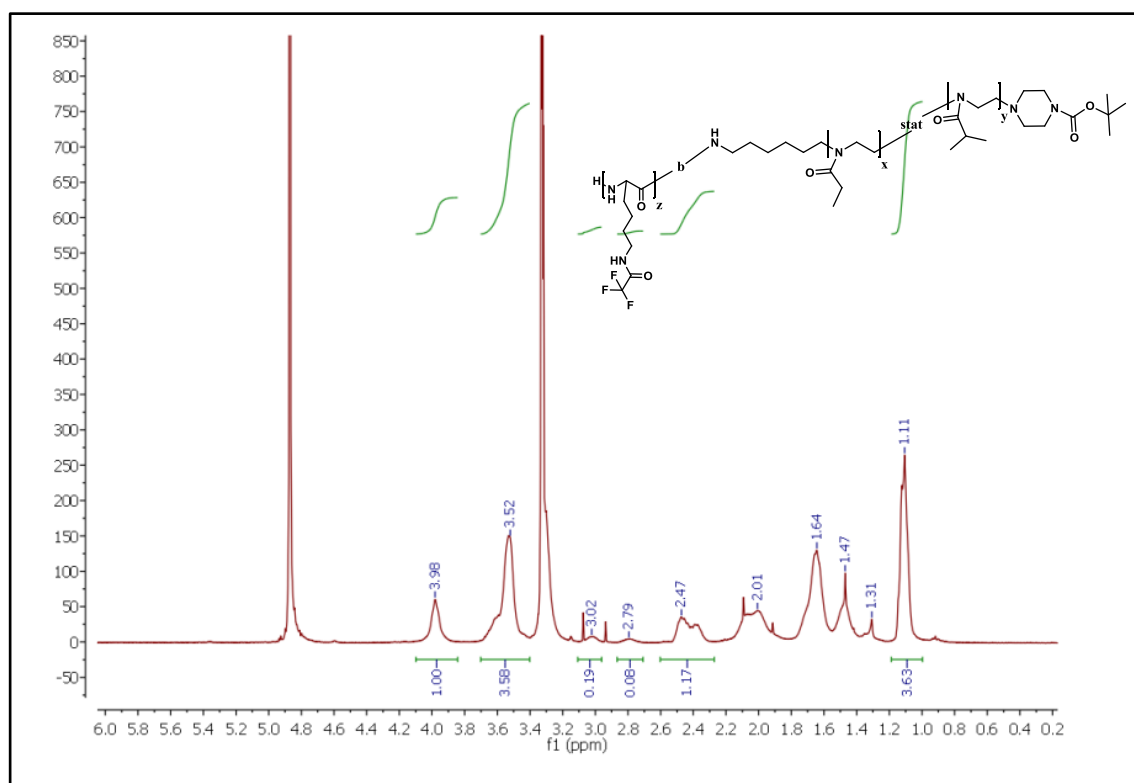


Abbildung 4.49: ^1H -NMR von Poly(iPrOx+EtOx)-b-(Lys-TFA) in Methanol- d_4

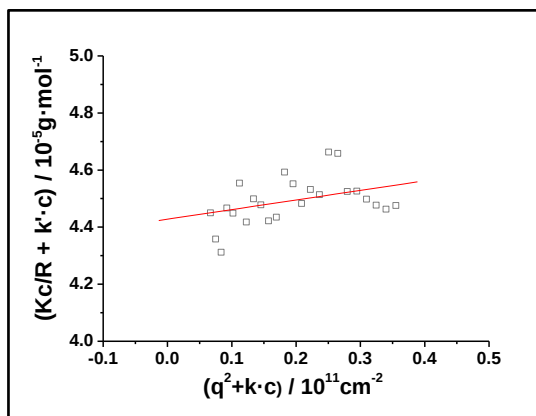


Abbildung 4.50: Statische Lichtstreuung von Poly(iPrOx+EtOx) im Bereich von 30-150° (5°-Schritte) bei 20 °C mit $dn/dc = 0,15 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ (berechnet).

Backbone kann ein Verhältnis von Polylysin zu Polyoxazolin von circa 1:1 ermittelt werden.

Das Gewichtsmittel des Blockcopolymers wird per statischer Lichtstreuung auf circa $25.000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ermittelt.

Um eine Komplexierung des Blockcopolymers mit CpG bzw. siRNA durchführen zu können, ist zuerst die Trifluoracetat-schutzgruppe des Polylysinblocks mit 35% Hydrazinlösung in Methanol entfernt worden (Abbildung 4.51).

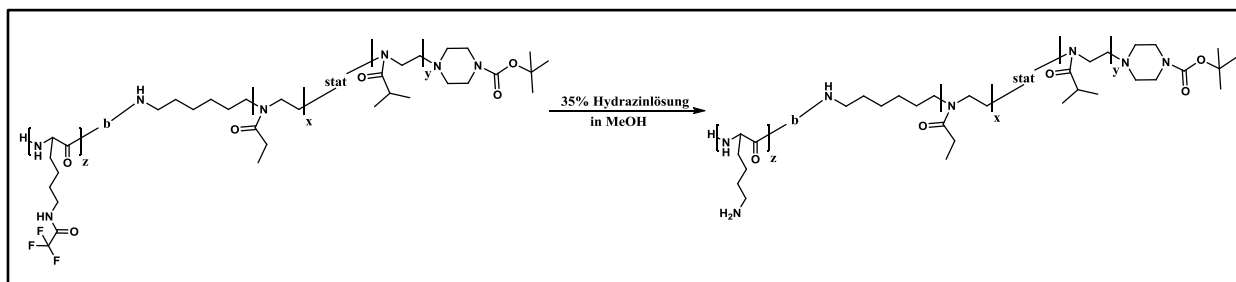


Abbildung 4.51: Entschützung von Poly(iPrOx+EtOx)-b-(Lys-TFA) mit 35% Hydrazinlösung in Methanol

4.3.10 Komplexierung von Poly(iPrOx+EtOx)-b-(Lys) mit siRNA

Für die Komplexierung des Blockcopolymers Poly(iPrOx+EtOx)-b-(Lysin) (Abbildung 4.52) mit siRNA wird das Blockcopolymer mit einer Konzentration von $72 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in 30 mM PBS-Puffer vorgelegt (schwarze Kurve) und siRNA mit einer Konzentration von $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ zugetropft. Nach der Zugabe der siRNA (braune Kurve) wird die Salzkonzentration der Probe auf 150 mM PBS erhöht (grüne Kurve). Die Komplexierung wird mittels dynamischer Lichtstreuung untersucht.

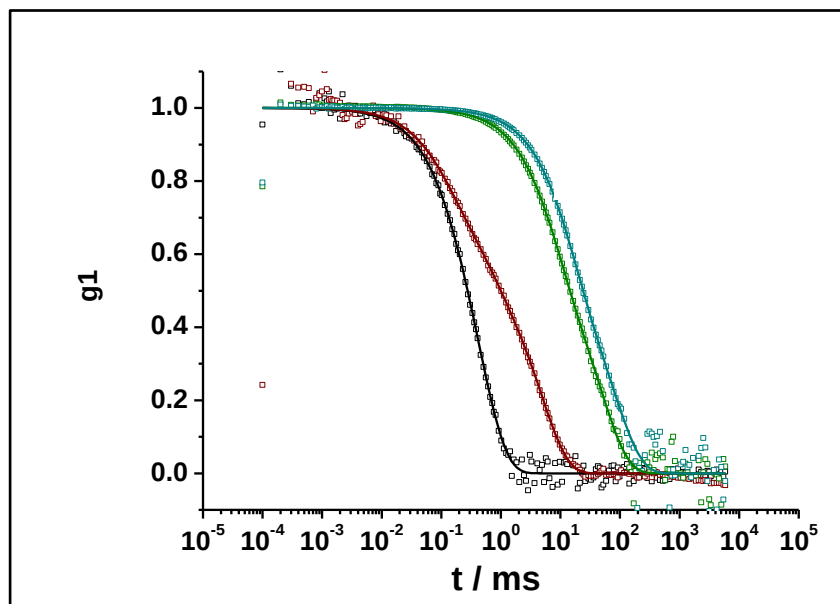


Abbildung 4.52 Komplexierung von Poly(iPrOx+EtOx)-b-(Lysin) mit siRNA in 30 mM PBS bzw. 150 mM PBS. Streuwinkel 30° bei 20°C . In schwarz ist das reine Poly(iPrOx+EtOx)-b-(Lysin), in braun nach Zugabe von siRNA in 30 mM PBS, in grün nach Erhöhung des Pufferstärke auf 150 mM PBS und in türkis die Messung nach 24 h dargestellt.

Die ermittelten hydrodynamischen Radien sind in Tabelle 4.6 zusammengefasst. Das Blockcopolymer hat einen hydrodynamischen Radius von 3,6 nm. Nach der Zugabe der siRNA erhält man eine weitere Fraktion mit einem hydrodynamischen Radius von 50 nm, welches circa 60% der Gesamtintensität ausmacht. Somit liegen intensitätsgewichtet circa 60% Aggregate in der Lösung vor.

Als Größenordnung der Mizellen werden ca. 7 nm erwartet. Die Größe der Aggregate mit circa 50 nm ist jedoch um ein vielfaches größer.

Nach Erhöhung des Salzgehaltes auf 150 mM PBS bilden sich zudem Aggregate mit circa 70 nm (40%) und 500 nm (60%) aus. Nach 24 h sind die Aggregate nochmals gewachsen (türkisfarbene Kurve).

Tabelle 4.6: Zusammenfassung der Messungen von Poly(iPrOx+EtOx)-b-(Lysin) nach Zugabe von siRNA und Erhöhung der Pufferstärke von 30 mM auf 150 mM PBS mit dynamischer Lichtstreuung bei Streuwinkel 30°

	R_{h1} / nm	R_{h1} / %	R_{h2} / nm	R_{h2} / %	R_{h3} / nm	R_{h3} / %	R_h / nm
Poly(iPrOx+EtOx)-b-(Lysin)	1.0	8.6	4.6	91			3.6
Zugabe siRNA	1.1	21.4	5.3	21.2	50	57	4.1
150mM PBS	73	40	510	59			150
über Nacht	138	43	880	56			260

Die stärkere Aggregatbildung bei Erhöhung der Salzmenge beruht auf dem Aussalzungseffekt. Das Polymer wird bei höherer Salzkonzentration unlöslich und bildet Aggregate. Das Polyoxazolin alleine zeigt jedoch auch in 150 mM PBS-Puffer keinen Aussalzungseffekt. Dies bedeutet, dass es auf Grund des Lysinblocks zur Aggregatbildung kommt und damit die Polyoxazolin-Hülle der Polyion-Komplex-Mizelle nicht ausreicht um den Kern aus Polylysin und siRNA abzuschildern.

Auf einen Lösungsansatz wird in den nächsten Abschnitten eingegangen.

4.3.11 Komplexierung von Poly(iPrOx+EtOx)-b-(Lys) mit siRNA bei pH = 11,5

Um den Einfluss des pH-Wertes auf das Komplexierungsverhalten von Poly(iPrOx+EtOx)-b-(Lys) mit siRNA zu testen, wird zuerst das Verhalten des Blockcopolymers in 30 mM PBS-Puffer bei pH = 11,5 untersucht. Wie in Tabelle 4.7 zu sehen, beträgt der hydrodynamische Radius des Blockcopolymers unter diesen Bedingungen 5,9 nm. Im Vergleich zum Blockcopolymer in 30 mM PBS-Puffer bei pH = 7,2 ist jedoch eine Mizellenbildung beobachtbar, da der Polylysinkern im Basischen unlöslich wird und sich damit Mizellen mit einem Polylysinkern und einer Polyoxazolin-hülle bilden.

Tabelle 4.7: Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius des Poly(iPrOx+EtOx)-b-Lys vom pH-Wert

pH	7,2	11,5
R_h / nm	3,4	5,9

Aber zudem ist bei pH = 11,5 wie in Tabelle 4.8 gezeigt bereits ein leichtes Aggregationsverhalten sichtbar. So haben sich bereits Aggregate mit einem hydrodynamischen Radius von 40 nm ausgebildet.

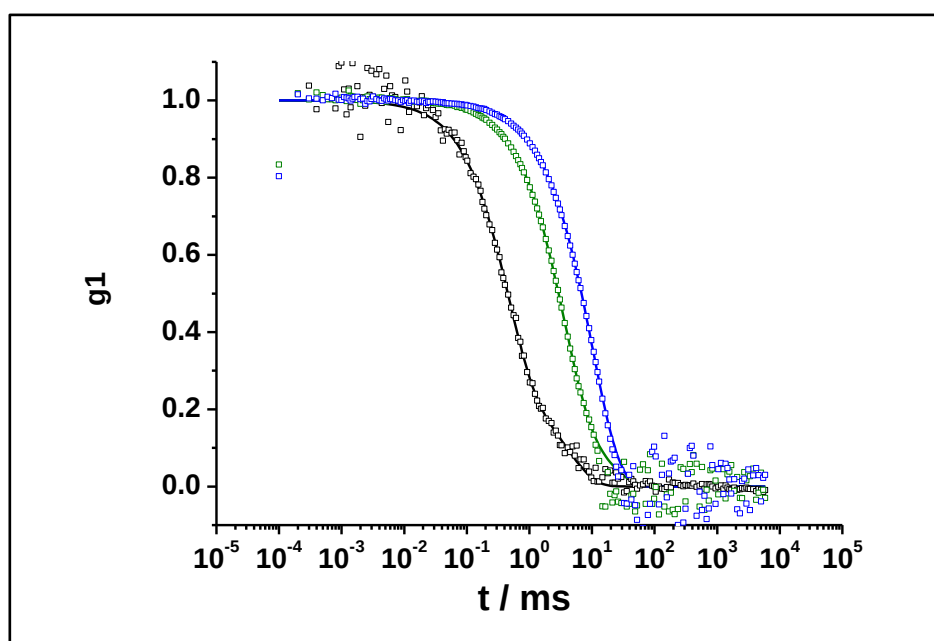


Abbildung 4.53: Komplexierung von Poly(iPrOx+EtOx)-b-(Lysin) und siRNA bei pH = 11,5 in 30 mM (grün) bzw. 150 mM PBS-Puffer (blau). In schwarz ist das Poly(iPrOx+EtOx)-b-(Lysin) vor der Komplexierung abgebildet

Dennoch wird die Komplexierung mit siRNA in 30 mM PBS-Puffer bei pH = 11,5 durchgeführt um den Einfluss der Mizellenbildung auf Grund der pH-Änderung auf die Komplexierung von siRNA zu beobachten (Abbildung 4.53).

In einer Küvette wird das Polymer ($250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) vorgelegt und siRNA ($15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) zugetropft bis sich ein Ladungsverhältnis N^+/P^- 10:1 eingestellt hat. Die hydrodynamischen Radien sind in Tabelle 4.8 zusammengefasst. Nach der Zugabe der siRNA kommt es sofort zur Bildung von Aggregaten. Diese setzen sich aus zwei Fraktionen mit 34 nm und 170 nm hydrodynamischen Radius zusammen, wobei die kleinere Fraktion zu 80% in der Probe vertreten ist. Die hydrodynamischen Radien migrieren bei Erhöhung der Pufferstärke auf 150 mM PBS auf circa 100 nm, wobei eine kleine Fraktion von 10% einen hydrodynamischen Radius von 9 nm besitzt.

Tabelle 4.8: Zusammenfassung der hydrodynamischen Radien bestimmt durch dynamische Lichtstreuung bei einem Streuwinkel von 30° von Poly(iPrOx+EtOx)-b-(Lysin), nach der Zugabe von siRNA und Erhöhung der Pufferstärke von 30 mM auf 150 mM PBS bei pH = 11,5

	R_{h1} / nm	R_{h1} / %	R_{h2} / nm	R_{h2} / %	R_h / nm
Poly(iPrOx+EtOx)-b-(Lysin) pH 11,5	4.5	73.33	41.3	26.67	5.9
Poly(iPrOx+EtOx)-b-(Lysin) pH 11,5 + siRNA	34.0	80.19	168.5	19.81	40.4
Poly(iPrOx+EtOx)-b-(Lysin) + siRNA 150mM	9.2	2.98	104.4	97.02	79.9

Die Ergebnisse zeigen, dass auch bei pH = 11,5 keine Bildung von Polyion-Komplex-Mizellen durch die Komplexierung von siRNA möglich ist, obwohl sich vorher schon Mizellen auf Grund des pH-Wertes gebildet haben.

Ein Einfluss des reinen Homo-Polyoxazolins kann ausgeschlossen werden, da dieses wie beschrieben vorher per Dialyse entfernt worden ist.

Jedoch zeigt sich wie bei der Komplexierung in PBS-Puffer bei pH = 7,2, dass die Abschirmung des Polyoxazolinblocks nicht ausreicht.

Ein Lösungsansatz ist die Änderung des Blocklängenverhältnisses von Polylysin zu Polyoxazolin, da ein größerer Polyoxazolinblock eine bessere Abschirmung bewirken sollte.

Das Blocklängenverhältnis des verwendeten Polymers ist in Abschnitt 4.3.9.2 auf circa 1:1 bestimmt worden. Erhöht man das Verhältnis auf 1:3 Polylysin zu Polyoxazolin ist wahrscheinlich eine bessere Abschirmung möglich.

Synthetisch ergibt sich aber das Problem der Aufreinigung, da der Unterschied der Molmasse zwischen Polyoxazolin und Blockcopolymer zu gering ist, um die beiden Polymere per Dialyse zu trennen.

Die Umkehrung der Polymerisationsreihenfolge ist nicht möglich, da die Aminendgruppe des Polylysins zu 100% in eine Tosylatendgruppe überführt werden müsste, damit diese nicht die Polymerisation des Oxazolins abbricht.

4.3.12 Polyoxazolin mit Spermin-Endfunktionalisierung

Ein weiterer Lösungsansatz zur Änderung des Blockverhältnisses von kationischem Block zu Polyoxazolinblock ist die Verringerung der Anzahl der positiven Ladungen durch Einführen eines anderen kationischen Blocks.

Dafür wird die Polyoxazolinpolymerisation mit tribocgeschütztem Spermin anstelle von Boc-Piperazin abgebrochen (Abbildung 4.54).

Dadurch erhält man eine Endgruppenfunktionalisierung des Polyoxazolins mit vier Aminogruppen bestehend aus drei sekundären und einem primären Amin. Das verwendete tribocgeschützte Spermin ist von Dr. [REDACTED]^[20] synthetisiert worden. Zudem wird als Monomer ausschließlich 2-Ethyl-2-oxazolin verwendet, da dieses hydrophiler ist. Der Polymerisationsgrad wird auf 160 Wiederholungseinheiten statt 50 Wiederholungseinheiten eingestellt, da dadurch eine bessere Abschirmung erfolgen sollte.

Die Polymerisation wird in Acetonitril durchgeführt und das überschüssige tribocgeschützte Spermin durch Dialyse gegen Methanol abgetrennt.

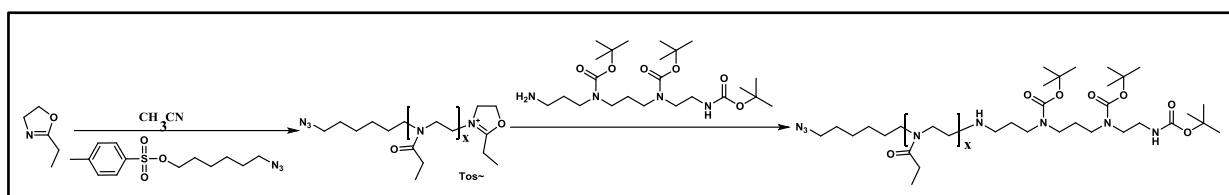


Abbildung 4.54: Polymerisation von 2-Ethyl-2-oxazolin in Acetonitril mit 6-Azidoxytosylat als Initiator und Tribocsperrin als Abbruchreagenz

Anhand des ^1H -NMRs kann die Funktionalisierung des Polyoxazolins mit tribocgeschütztem Spermin analysiert werden (Abbildung 4.56).

Der Peak bei 1,12 ppm kann der Methylgruppe des Ethylrests der Wiederholungseinheit des Polyoxazolins zugeordnet werden. Zudem ist bei 1,41 ppm deutlich der charakteristische Peak der boc-Schutzgruppe des Spermins sichtbar. Über das Intensitätsverhältnis dieser beiden Peaks (boc-Peak zu Methylpeak) erhält man einen Polymerisationsgrad von 360. Die Stöchiometrie der Polymerisation ist aber nur auf 160 Zielwiederholungseinheiten eingestellt worden, man würde also einen um den Faktor 2,25 höheren boc-Peak erwarten. Vergleicht man die GPC-Messung dieser Probe mit Polyoxazolinen, die mit boc-Piperazin abgebrochen worden sind, ist ein Polymerisationsgrad von 160 realistischer. Daraus folgt, dass nur maximal 45% des

Polyoxazolins mit Spermin abgebrochen worden sind. Die restlichen 55% der Polymerprobe sind wahrscheinlich durch Verschmutzungen des Spermins (HPLC im Anhang Abbildung 7.5) abgebrochen worden.

Um das Komplexierungsverhalten des Polymers zu testen, werden die boc-Schutzgruppen mit 30% Trifluoressigsäure in Dichlormethan entfernt (Abbildung 4.55) und die Entschützung mittels ^1H -NMR-Messung kontrolliert.

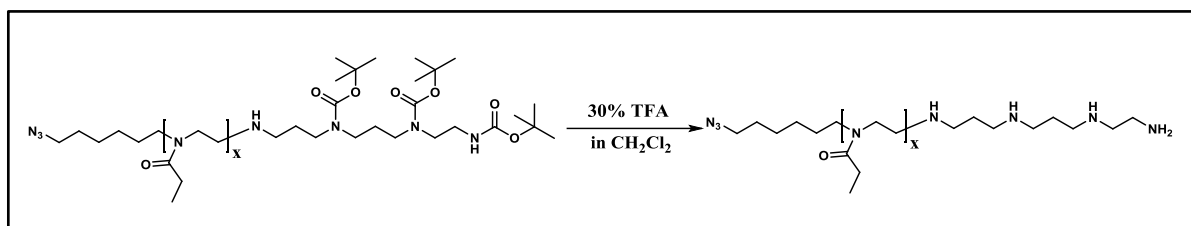


Abbildung 4.55: Entschützung der Amingruppen von Poly(EtOx)-Spermin

Abbildung 4.56 zeigt mit dem ^1H -NMR die vollständige Entschützung des Poly(EtOx)-Spermins.

Zusammenfassend ist ein Polyoxazolin mit 160 Wiederholungseinheiten polymerisiert worden, welches eine Azid- sowie eine Sperminendgruppe trägt.

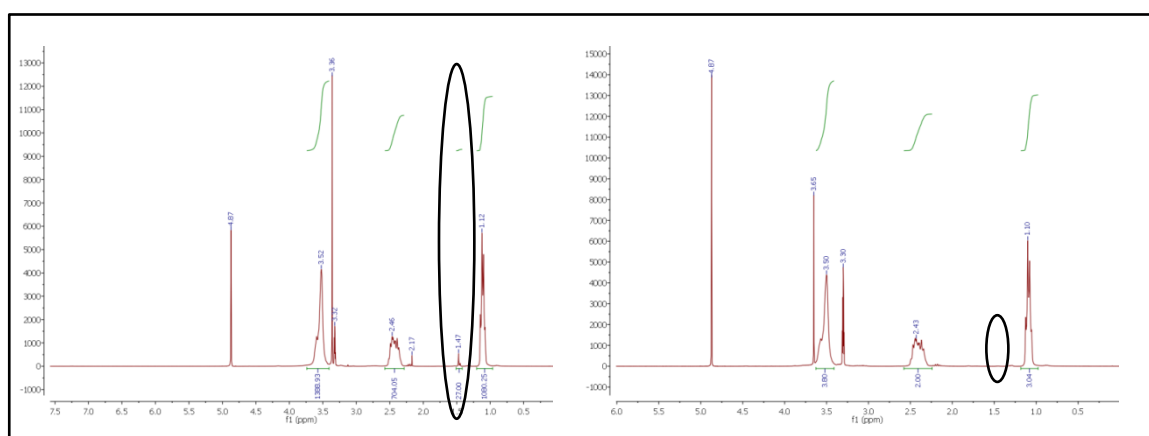


Abbildung 4.56: Kontrolle der Entschützung von Poly(EtOx)-Spermin durch ^1H -NMR in MeOH-d_4 vor der Entschützung (links) und nach der Entschützung (rechts)

4.3.12.1 Komplexierung von Poly(EtOx)-Spermin mit CpG-ODN

Im nächsten Schritt wird das Komplexierungsverhalten des Poly(EtOx)-Spermins mit einem Oligonucleotid mit CpG-Sequenz getestet.

CpG ist die Abkürzung für Cytidin-Guanosin-Dinucleotid, wobei das p für die Phosphatbindung steht. Sie besteht aus einer Folge von mindestens sechs Basen und wird durch die Phosphorodithioat-Modifizierung von Nucleasen langsamer abgebaut als unmodifiziertes ODN. Der Unterschied im Aufbau zwischen bakterieller bzw. viraler DNA und Wirbeltier-DNA liegt im CpG-Motiv. 1992 entdeckte Yamamoto, dass die DNA von Bakterien immunstimulatorische Aktivität zeigt, die DNA von Wirbeltieren jedoch nicht^[21].

Das angeborene Immunsystem erkennt potentielle Krankheitserreger anhand ihres molekularen Musters und initiiert eine antigenspezifische Immunantwort. Durch die Anbindung bzw. Komplexierung von ODN mit CpG-Motiv wird der Partikel als Bestandteil eines intrazellulären Erregers erkannt und somit eine mikrobielle Infektion stimuliert^[22].

Der Vorteil von CpG gegenüber siRNA ist die höhere Stabilität gegenüber Nucleasen. Die Anzahl der Basenpaare ist mit 20 bei CpG und 22 bei der siRNA vergleichbar.

Im ersten Schritt wird die Komplexierung in 150 mM PBS-Puffer bei pH = 7,2 durchgeführt. Unter diesen Bedingungen ist jedoch keine Polyion-Komplex-Mizellbildung detektierbar, da die Komplexbildungskonstante der Polyion-Komplex-Mizellbildung durch die hohe Konzentration des Fremdelektrolyten stark erniedrigt wird.

Deshalb wird die Komplexierung nochmals in 15 mM PBS-Puffer durchgeführt. Dafür wird das Polymer mit einer Konzentration von $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ in der Lichtstreuoküvette vorgelegt und das CpG-ODN ebenfalls mit einer Konzentration von $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ dazu titriert. Das Ladungsverhältnis wird je nach Zugabeschritt auf 6,4 bis 0,8 (positiv zu negativ) eingestellt.

In Abbildung 4.57 sind die Autokorrelationsfunktionen der CpG-Sequenz (schwarz), des Polymers (grün) sowie das Produkt der Komplexierung nach Zugabe von 175 μL CpG (blau) und Erhöhung der Salzkonzentration auf 150 mM PBS (rot) dargestellt.

Da mindestens 50% der Polymerprobe nicht sperminfunktionalisiert ist und somit nicht an der Mizellenbildung teilnehmen kann, wird die Messung der dynamischen Lichtstreuung nach der bereits erwähnten Multikomponentenfit-Methode von Dr. ■■■■■ ausgewertet^[16].

Bei der Fitfunktion wird der Term für das Poly(EtOx)-Spermins festgehalten und zusätzlich ein Term für die Mizellenbildung eingeführt. Somit kann die Mizellenbildung unabhängig vom nicht funktionalisierten Polymer untersucht werden.

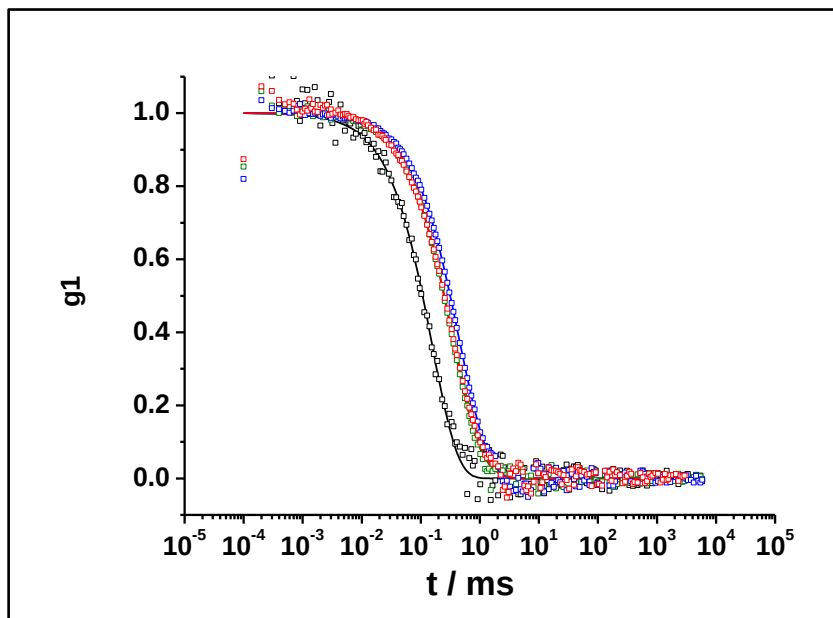


Abbildung 4.57: DLS-Messung der Komplexierung Poly(EtOx)-Spermin + CpG in 15 mM PBS (blau) und 150 mM PBS (rot), sowie CpG (schwarz) und Poly(EtOx)-Spermin vor der Komplexierung (grün) bei 30° Streuwinkel und 20°C.

Die ermittelten Werte für den hydrodynamischen Radius sowie die count rate der jeweiligen Probe sind in Tabelle 4.9 zusammengefasst.

Tabelle 4.9: Zusammenfassung der hydrodynamischen Radien bestimmt durch dynamische Lichtstreuung sowie der count rate von Poly(EtOx)-Spermin bei Zugabe von CpG bei Streuwinkel 30°

	R_{h1} / nm	R_{h1} / %	R_{h2} / nm	R_{h2} / %	count rate / kHz
Poly(EtOx)-Spermin	3.5				23.3
Poly(EtOx)-Spermin + 20µl CpG	3.5	93	7.5	7.1	24.5
Poly(EtOx)-Spermin + 30µl CpG	3.5	92	8.5	7.7	25.0
Poly(EtOx)-Spermin + 50µl CpG	3.5	87	8.3	13.1	26.5
Poly(EtOx)-Spermin + 75µl CpG	3.5	83	8.2	17.1	27.5
Poly(EtOx)-Spermin + 125µl CpG	3.5	66	6.0	34	30.0
Poly(EtOx)-Spermin + 175µl CpG	3.5	65	6.5	35	32.0

Nach der ersten Zugabe von 20 µL CpG ist der Anteil von Polymer im Vergleich zur Mizellenbildung 93%.

Nach der Zugabe von 175 µL CpG jedoch ist der Anteil an Polymer im Vergleich zur Mizellenbildung nur noch 65%. Zudem hat sich die count rate um 43% von 22 auf 32 kHz erhöht.

Die zeigt, dass sich Mizellen gebildet haben. Der hydrodynamische Radius der Mizellen beträgt 7 nm.

Nach Erhöhen der Salzkonzentration auf 150 mM PBS sinkt die count rate jedoch wieder auf 21 kHz und auch die Fitfunktion entspricht wieder der Fitfunktion des reinen Polymers. Das heißt, dass die Mizellen nicht salzstabil sind.

Die Erhöhung der Konzentration von kationischen Ladungen kann beispielsweise durch die Vernetzung der Spermingruppen erhalten werden. Dieser Ansatz wird im folgenden Abschnitt weiter ausgeführt.

Zusammengefasst ist die Bildung von Polyion-Komplex-Mizellen aus Poly(EtOx)-Spermin und CpG in 15 mM PBS möglich, jedoch sind diese nicht salzstabil, was vermutlich auf die zu geringe Anzahl der positiven Ladungen zurückzuführen ist.

4.3.12.2 Crosslinken mit 1,3,5-((Trisbrommethyl))benzol

Um die Anzahl der kationischen Ladungen zu erhöhen wird im nächsten Schritt das Vernetzen der Aminogruppen durchgeführt. Als Vernetzer wird 1,3,5-(Trisbrommethyl)benzol verwendet und die Reaktion in Nitromethan bei 60 °C durchgeführt (Abbildung 4.58).

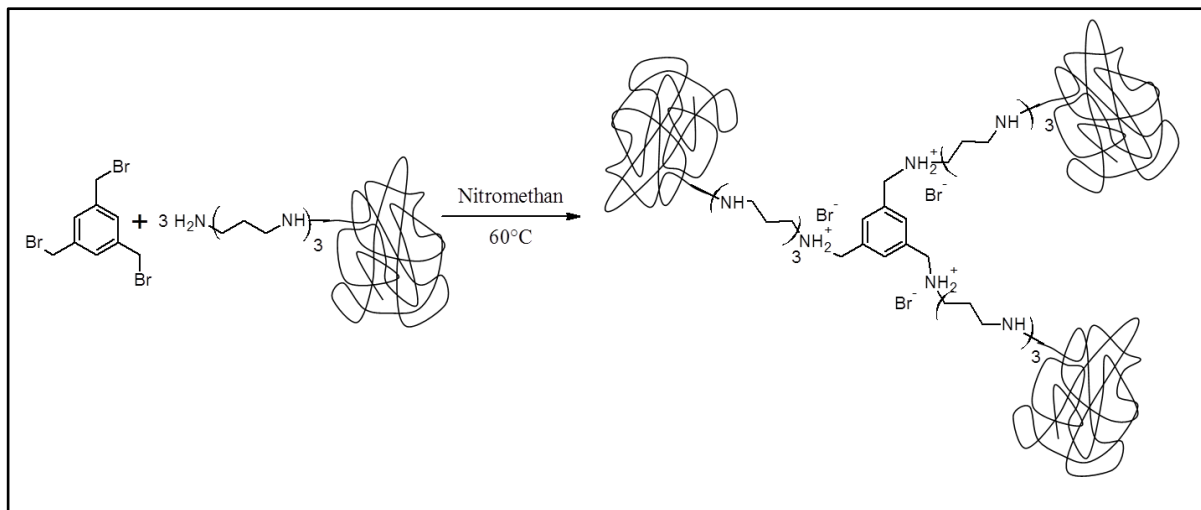


Abbildung 4.58: Umsetzung von Poly(EtOx)-Spermin mit 1,3,5-((Trisbrommethyl))benzol

Die Reaktion wird mit verschiedenen Verhältnissen von Aminogruppen des Poly(EtOx)-Spermin zu Bromgruppen des (Trisbrommethyl)benzol durchgeführt. Zudem wird bei einer Probe Huisgenbase zur Steigerung der Aktivität der Aminogruppen zugegeben.

Bei zwei Ansätzen wird nach der Umsetzung von Poly(EtOx)Spermin mit 1,3,5-(Trisbrommethyl)benzol Dimethylaminoethanol zugegeben um die überschüssigen Bromgruppen zu Aminogruppen umzuwandeln, in dem die Bromgruppen durch Zuga-

be der OH-Gruppen substituiert werden.

Die verschiedenen Ansätze sowie deren durch dynamische Lichtstreuung in PBS-Puffer ermittelten hydrodynamischen Radien sind in Tabelle 4.10 zusammengefasst. Es werden hydrodynamische Radien zwi-

Tabelle 4.10: Zusammenfassung der hydrodynamischen Radien bestimmt mit dynamischer Lichtstreuung mit Streuwinkel 30° von verschiedenen Ansätzen Poly(EtOx)-Spermin + Vernetzer

NH ₂ :	Br	Zusatz	R _h / nm
4	: 1		26.1
4	: 1	Huisgenbase	51.7
4	: 1	Dimethylaminoethanol	32.9
1	: 1		32.6
1	: 1	Dimethylaminoethanol	37.8

schen 26 nm und 52 nm erhalten.

Alle gemessenen Radien sind für die Mizellenbildung zu groß und lassen auf Aggregatbildung schließen. Durch die Zugabe von Huisgenbase werden die größten Radien erhalten.

Die Zugabe von Dimethylaminoethanol hat nur einen geringfügigen Einfluss auf die Größe der Aggregate.

In einem Vorversuch ist Spermin – in derselben Konzentration wie später die Sperminfunktionalisierung des Polymers – mit (Trisbrommethyl)benzol in Nitromethan umgesetzt worden. Bereits bei Raumtemperatur haben sich Sol-Gel-Partikel gebildet. Der hydrodynamische Radius des Solteils ist mittels dynamischer Lichtstreuung auf circa 200 nm bestimmt worden.

Im Vergleich von Vernetzen des freien Spermins und Vernetzen des Poly(EtOx)-Spermin zeigt sich, dass es eine geringe Abschirmung der positiven Ladungen durch das Polyoxazolin gegeben muss, da ansonsten auch hier Aggregate im 200 nm-Bereich und nicht im 30 nm-Bereich entstehen müssten.

Zudem wäre sonst die Bildung von Mizellen bei 15 mM PBS nicht möglich.

Durch die nur teilweise Abschirmung der kationischen Ladungen des Poly(EtOx)-Spermins können die vier Aminogruppen des Spermins mit verschiedenen Vernetzermolekülen reagieren und damit Aggregate bilden. Bei vollständiger Abschirmung sollten jeweils vier Polymere eine Mizelle bilden und untereinander vernetzten. Hier jedoch entstehen Aggregate aus vielen Polymeren, da jede Aminogruppe mit einer Aminogruppe eines neu hinzukommenden Polymers vernetzen kann.

Zur Kontrolle wird trotzdem die Komplexierung von Poly(EtOx)Spermin mit CpG durchgeführt. Das Komplexierungsverhalten wird per Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht. Es werden in Bezug auf die kationischen Ladungen des Polymers 5-20% CpG ohne Berücksichtigung des unvollständigen Sperminfunktionalisierung des Polymers zugegeben und die Proben jeweils auf das Polyacrylamidgel aufgetragen.

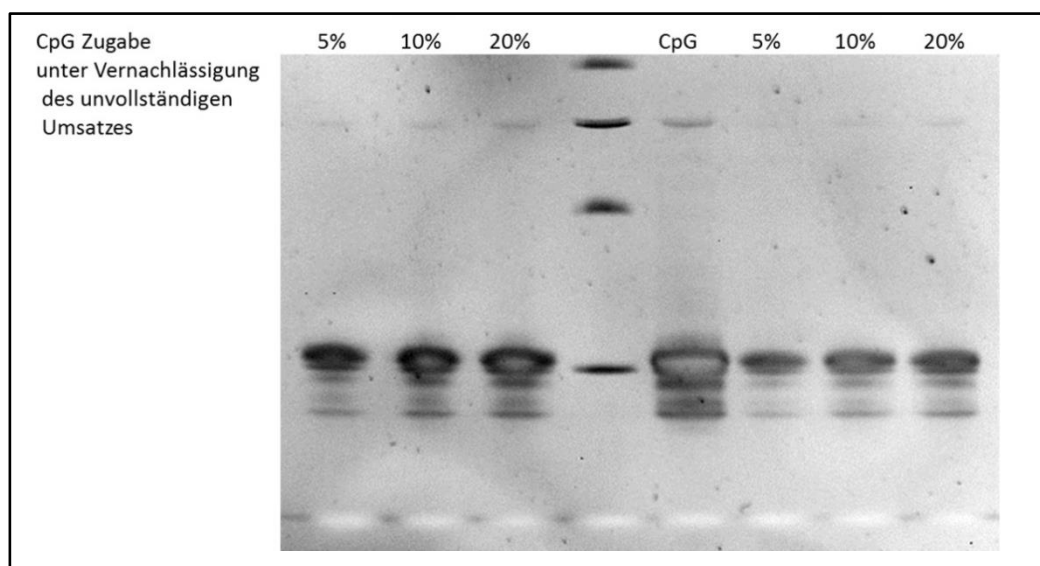


Abbildung 4.59: PAGE von Poly(EtOx)-Spermin mit CpG-Zugabe unter Vernachlässigung des unvollständigen Sperminumsatzes

In Abbildung 4.59 ist exemplarisch das Gelbild der beiden Ansätze mit Dimethylaminoethanol gezeigt.

In den ersten drei Spalten ist das Produkt mit dem Ansatz Aminogruppe zu Bromgruppe von 4:1 aufgetragen. In Spalte vier und fünf folgen der Marker und CpG. In den letzten drei Spalten ist das Produkt mit dem Ansatzverhältnis Aminogruppe zu Bromgruppe von 1:1 aufgetragen.

Da in jeder Spalte das CpG-ODN bestehend aus 20 Basenpaaren zu erkennen ist, hat die Komplexierung von Poly(EtOx)Spermin-Crosslink mit CpG nicht funktioniert. Dies zeigt, dass weitere Versuche mit diesem System nicht sinnvoll sind.

Eine Möglichkeit ein Blockcopolymer bestehend aus einem Polyoxazolinblock und einem kationischen Block im Blocklängenverhältnis 3 zu 1 zu bilden und aufzureinigen zu können, ist die Synthese an der Festphase. Beispielsweise kann ein Resin mit labilen Linker verwendet werden, der eine Aminofunktionalisierung zur Initiierung der TFA-Lys-NCA-Polymerisation trägt.

Die endständige Aminogruppe des entstehenden am Träger gebundenen Polymers könnte dann mit einer Verbindung umgesetzt werden, die an einem Ende säurefunktionalisiert ist und am anderen Ende eine Tosylatgruppe trägt.

Hier ist jedoch wieder das Problem, dass alle freien Aminogruppen zu 100% umgesetzt werden müssten, da diese sonst die Polyoxazolinpolymerisation abbrechen.

Zudem gestaltet sich die Einführung einer Azidgruppe am Ende der Polymerisation schwierig. Diese wird jedoch zur weiteren Biofunktionalisation benötigt.

Da die Synthese von Polyion-Komplex-Mizellen für die biomedizinische Anwendung nicht erfolgreich war, wird im nächsten Abschnitt eine ELP (elastin like peptide) basierte Polymerbürste hergestellt von [REDACTED] verwendet.

4.3.13 Zusammenfassung von Kapitel Polyion-Komplex-Mizellen (PIC) mit Poly(oxazolin)-Schale

Um Polyion-Komplex-Mizellen mit einer Polyoxazolinhülle herzustellen, wurde zuerst ein statistisches Polyoxazolin bestehend aus 40% 2-Isopropyl-2-oxazolin und 60% 2-Ethyl-2-oxazolin verwendet, welches mit einem azidfunktionalisierten Initiator polymerisiert wurde. Per NCA-Polymerisation wurde eine Blockcopolymer bestehend aus diesem Polyoxazolin und einem kationischen Lysinblock hergestellt mit einem Blocklängenverhältnis von circa 1:1.

Die Komplexierung dieses Blockcopolymers mit siRNA wurde in PBS-Puffer bei pH = 7,2 und pH = 11,5 durchgeführt. Jedoch ist die Abschirmung des Lysinblocks durch den Polyoxazolinblock nicht genügend hoch, so dass sich Aggregate gebildet haben.

Im zweiten Ansatz ist das Polyoxazolin nicht mit monobocgeschütztem Piperazin sondern mit einem tribocgeschützten Spermin abgebrochen worden. Die ringöffnenden Polymerisation des 2-Ethyl-2-oxazolins wurde wiederum mit einem azidfunktionalisierten Initiator gestartet. Dadurch wurde ein Polymer erhalten, was zum einen eine Azidendgruppenfunktionalisierung und zum anderen einen kationischen Block mit 4 Aminogruppen besitzt.

In 15 mM PBS-Puffer bei pH = 7,2 konnten Polyion-Komplex-Mizellen mit CpG hergestellt werden. Diese Polyion-Komplex-Mizellen besitzen einen hydrodynamischen Radius von 7 nm, sind aber nicht salzstabil.

Um die lokale Konzentration der kationischen Gruppen zu erhöhen ist eine Vernetzungsreaktion mit 1,3,5-(Trisbrommethyl)benzol in Nitromethan durchgeführt worden. Jedoch ist die Abschirmung der Polyoxazolinblöcke nicht genügend hoch, so dass sich Aggregate gebildet haben. Diese Aggregate konnten keine CpG-Sequenz komplexieren.

4.4 Biofunktionalisierung einer ELP-Bürste

Für die Aufnahme des Trägers in die Zelle ist eine Funktionalisierung mit rezeptor-vermitteltem Antikörper nötig. Zur Kontrolle und Charakterisierung wird eine mit Farbstoff gelabelte Probe benötigt.

Als Trägersystem wird eine ELP basierte Polymerbürste verwendet. Diese elastin-ähnlichen Polypeptide sind biokompatibel und besitzen eine Lower Critical Solution Temperature. Die Seitengruppen der verwendeten Bürste sind zu 90% azidfunktionalisiert und 10% der Endgruppen tragen eine Säureendgruppe. Das Gewichtsmittel der Molmasse beträgt $M_w = 1,8 \cdot 10^6$ g/mol mit einem hydrodynamischen Radius von 23,5 nm in 2 mM Natriumchloridlösung und 33 nm in PBS-Puffer. Der Polymerisationsgrad beträgt $P_n = 208$. Die Bürste ist von  synthetisiert worden^[15].

Die Übergangstemperatur der Bürste in PBS-Puffer bei einer Konzentration von $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ beträgt 27 °C. Diese ist für Zelleexperimente zu niedrig, da die Experimente bei physiologisch relevanten 37 °C durchgeführt werden müssen. Im Folgenden soll deshalb der Einfluss des Antikörpers auf die Übergangstemperatur der Bürste untersucht werden.

4.4.14 Konjugation von Farbstoff

Für Zellaufnahmestudien muss die Bürste mit Farbstoff gelabelt werden. Dafür wird ein Teil der Azidseitenendgruppen der ELP-Bürste mittels kupferfreier Clickchemie mit dem Farbstoff Alexa Fluor 488 umgesetzt, welcher DIBO funktionalisiert ist (Abbildung 4.60). Die Reaktion wurde in PBS-Puffer bei 4 °C durchgeführt.

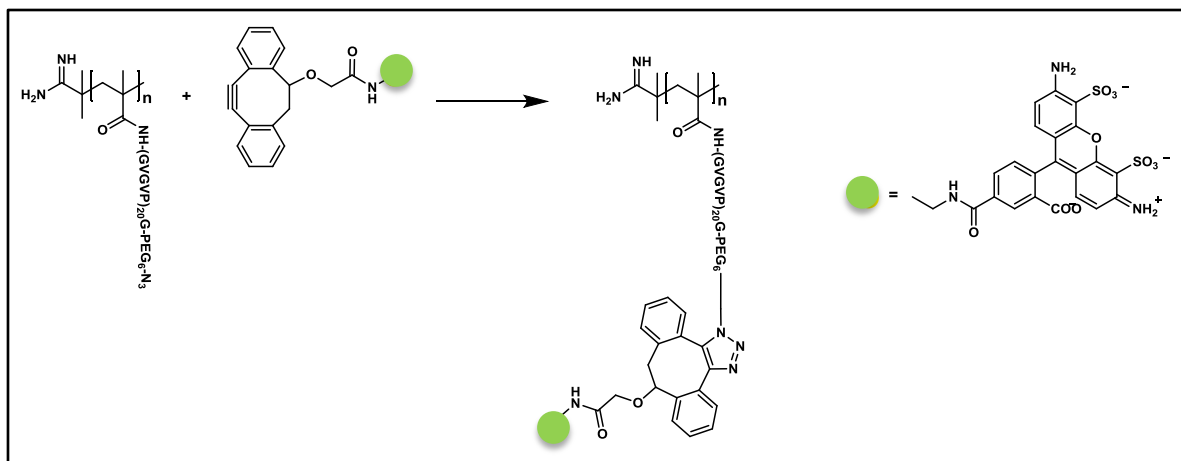


Abbildung 4.60: Farbstofflabeling der ELP basierenden Polymerbürste mit DIBO-Alkyne Alexa Fluor 488 mittels kupferfreier Clickchemie

Der nicht gebundene Farbstoff wird mittels Säulenchromatografie abgetrennt. Durch FCS-Messung (Abbildung 4.61) kann der Labelgrad auf 11 Farbstoffmoleküle pro Bürste bestimmt werden.

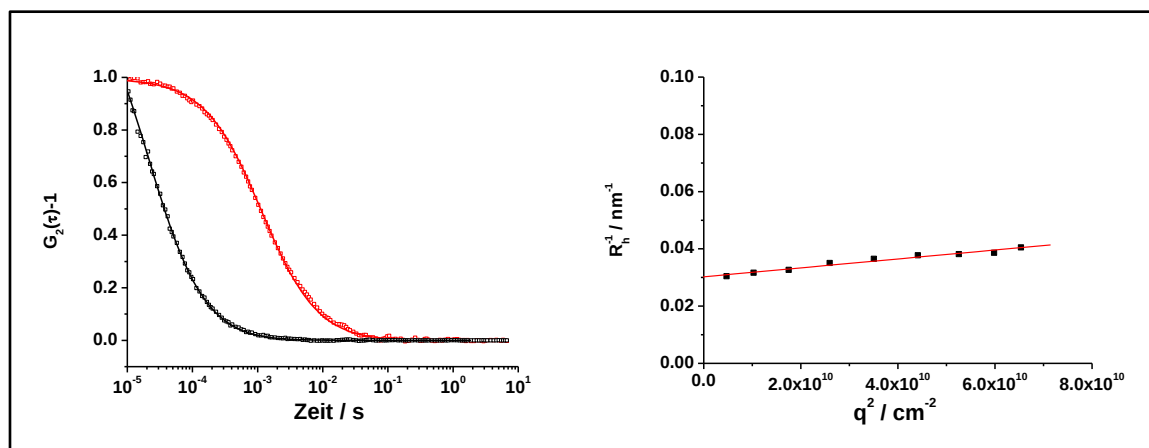


Abbildung 4.61: links: Autokorrelationsfunktion der FCS-Messung der Alexa Fluor 488 markierten ELP-Bürste (rot) und freier Farbstoff Alexa Fluor 488 (schwarz) in PBS-Puffer; rechts: Bestimmung des hydrodynamischen Radius der Alexa Fluor 488 markierten ELP-Bürsten in PBS-Puffer mit $R_h = 33$ nm

Zudem wurde mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung ein hydrodynamischer Radius von 33 nm bestimmt (Abbildung 4.61).

4.4.15 Konjugation von Antikörper

Für die rezeptorvermittelte Endocytose der Probe wird eine Funktionalisierung mit Antikörper benötigt. Im Folgenden wird der monoclonale Antikörper aDEC205 verwendet. Dendritische Zellen exponieren DEC205-Rezeptoren oder CD205-Rezeptoren an ihrer Zelloberfläche. Diese Rezeptoren können mit Antikörper aDEC205 adressiert werden und dadurch die Probe in die Zelle internalisiert werden.

Für die Konjugation des Antikörpers aDEC205 an die ELP-Bürste wird zuerst der Antikörper mit dem Linker DIBO-NHS bei 4 °C in PBS-Puffer umgesetzt und mittels Zeba Columns aufgereinigt. Der Antikörper ist zuvor von [REDACTED] mit Alexa Fluor 647 Farbstoff markiert worden. Die FCS-Messung zeigt, dass der Antikörper aDEC205 im Mittel drei bis vier Farbstoffe trägt.

Für die kupferfreie Clickchemie des DIBO funktionalisierten Antikörpers aDEC205 und der ELP-Bürste wird ein Ansatz von 12 Antikörpern aDEC205 pro Bürste verwendet. Durch UV-Messung wird im Mittel ein Verhältnis von vier Antikörpern aDEC205 pro Bürste ermittelt.

Bei der Anregung des Alexa Fluor 647 Farbstoffes während der FCS-Messung wird Alexa Fluor 488 nicht angeregt. Damit kann die Messung des hydrodynamischen Radius von 21 nm dem Molekül zugeordnet werden, welches mit Alexa Fluor 647 markiert ist.

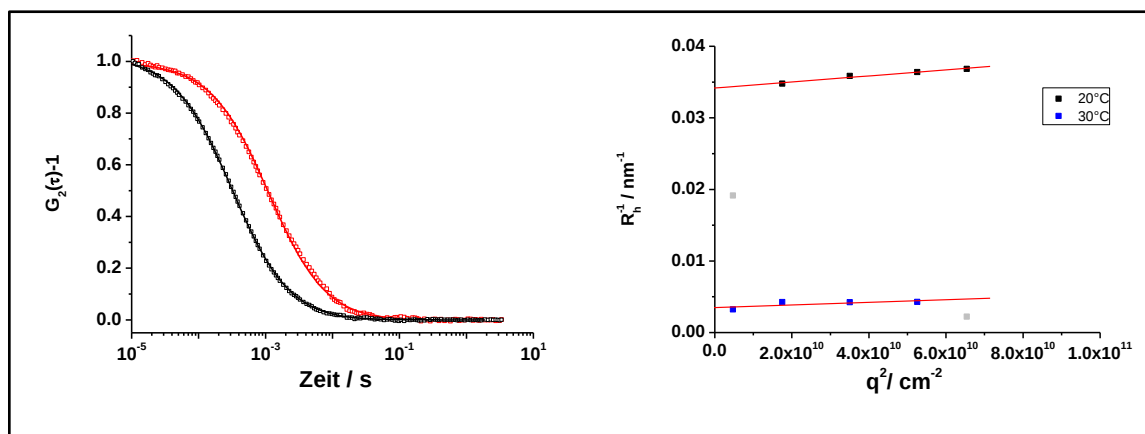


Abbildung 4.62: links: Autokorrelationsfunktion der FCS-Messung der ELP-Bürste mit konjugiertem Antikörper aDEC205 (rot) und freier Antikörper aDEC205 (schwarz) mit Anregung des Alexa Fluor 647 Farbstoffs; rechts: Bestimmung des hydrodynamischen Radius des Konjugats aus Antikörper aDEC205 und ELP-Bürste bei 20°C (schwarz) und 30°C (blau) in PBS durch DLS.

Da gleichzeitig nicht Alexa Fluor 488 angeregt wird, zeigt dies, dass der Antikörper an die Bürste konjugiert ist und nicht frei vorliegt (Abbildung 4.62).

Um den Einfluss des Antikörpers aDEC205 auf die Übergangstemperatur der ELP-Bürste zu ermitteln wird dynamische Lichtstreuung des Konjugats bei 20 °C und 30 °C in PBS-Puffer gemessen. Bei 20 °C wird ein hydrodynamischer Radius von 29 nm erhalten. Bei der Messung bei 30 °C jedoch haben sich Aggregate im Bereich von 290 nm gebildet (Abbildung 4.62). Dies zeigt, dass der Antikörper keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf die Übergangstemperatur des Konjugats aus ELP-Bürste und Antikörper aDEC205 zeigt. Zudem wird durch die DIBO-Gruppe, die für die kupferfreie Clickchemie benötigt wird, eine hydrophobe Gruppe in das System eingeführt.

4.4.16 Konjugation von CpG

Um den Einfluss des CpG-ODNs auf die Übergangstemperatur der ELP-Bürste zu testen, wird die mit Alexa Fluor 488 markierte Bürste mit DBCO funktionalisiertem CpG für 4 Tage bei 20 °C umgesetzt. Zur Bestimmung des gebundenen CpG-Anteils wird der komplementäre CpG-Strang, welcher mit Atto 425 markiert ist, zugegeben und die Probe zur Hybridisierung bei 20 °C für 24 h inkubiert. Auf das vorherige Aufheizen der Probe zur Hybridisierung wird verzichtet, da die Probe, wie bereits ge-

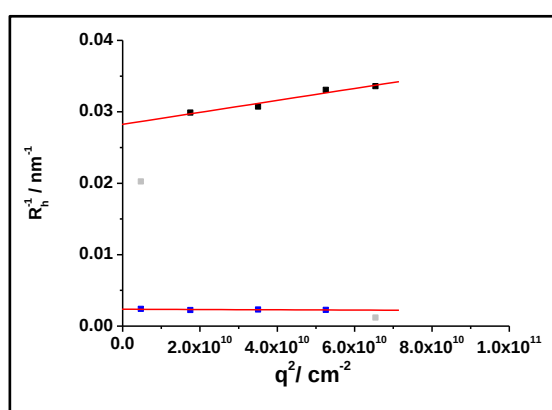


Abbildung 4.63: Bestimmung des hydrodynamischen Radius des Konjugats aus CpG und ELP-Bürste bei 20°C (schwarz) und 30°C (blau) in PBS durch DLS.

zeigt, bei 27 °C Aggregate bildet. Mittels Dialyse mit Amicon 30 kD wird das freie CpG abgetrennt. Durch den Vergleich der Intensitäten im UV-Vis-Spektrum der Farbstoffe Atto 425 (CpG-Sequenz) und Alexa-Fluor 488 (Polymerbürste) wird im Mittel ein Verhältnis von 6 bis 7 CpG-Sequenzen pro ELP-Bürste bestimmt.

Um den Einfluss des CpG-ODNs auf die Übergangstemperatur der ELP-Bürste zu ermitteln, wird analog zum Antikörper-Konjugat dynamische Lichtstreuung des Konjugats bei 20 °C und 30 °C in PBS-Puffer gemessen (Abbildung 4.63). Bei 20 °C wird ein hydrodynamischer Radi-

us von 35 nm erhalten, der circa dem Radius der mit Farbstoff markierten ELP-Bürste entspricht. Bei 30 °C jedoch haben sich Aggregate im 420 nm-Bereich gebildet.

4.4.17 Reduktion der Azidgruppen zu Amingruppen mit TCEP

■■■■■ hat gezeigt, dass sich die Übergangstemperatur durch Einführen der Azidgruppe erniedrigt^[15]. Deshalb werden die Azidgruppen der ELP-Bürste mit Tris(2-carboxyethyl)phospin (TCEP) im 400-fachen Überschuss zu Amingruppen reduziert. Das überschüssige TCEP wird mit Zeba-Säulen entfernt.

Die dynamische Lichtstreuung bei 30 °C zeigt auch für die reduzierte ELP-Bürste Aggregate. Das heißt, dass die Übergangstemperatur einer aminofunktionalisierten ELP-Bürste unter 30 °C liegt.

Eine säurefunktionalisierte ELP-Bürste, die von Dr. ■■■■■ hergestellt worden ist, zeigt im Vergleich eine Übergangstemperatur von 36,5 °C.

In dieser Arbeit ist gezeigt worden, dass die Konjugation von Antikörper aDEC205 oder CpG per Clickchemie keine Erhöhung der Übergangstemperatur bewirkt. Zudem erhöht sich der hydrophobe Charakter des Polymers durch den DIBO-Linker bzw. DBCO-Linker.

Die säurefunktionalisierte ELP-Bürste zeigt, dass maximal eine Übergangstemperatur von 36,5 °C für dieses System erreicht werden kann. Eine Erhöhung der Übergangstemperatur ist nur durch Funktionalisierung mit beispielsweise PEG möglich um die Hydrophilität der Bürste zu erhöhen. Die Einführung von PEG jedoch wirkt den Vorteilen dieses Systems wie beispielsweise die Nicht-Aggregation in humanem Blutserum entgegen und es könnte auch reines PEG als Träger verwendet werden. Zusammenfassend zeigt sich, dass dieses ELP basierende System auf Grund seiner geringen Übergangstemperatur für die biomedizinische Anwendung nicht geeignet scheint.

4.4.18 Zusammenfassung von Kapitel Biofunktionalisierung einer ELP-Bürste

Ziel dieses Kapitel war es eine Bürste mit ELP-Seitenketten, die eine Azidengruppe tragen, mit biomedizinischen Komponenten zu funktionalisieren um die Eigenschaften dieses Systems in Zellstudien untersuchen zu können.

Dafür wurde zuerst die ELP-Bürste mittels kupferfreier Clickchemie mit dem Farbstoff AlexaFluor 488 markiert. Per FCS-Messung konnte bestimmt werden, dass 11 Farbstoffmoleküle pro Bürste gebunden werden konnten.

Zur rezeptorvermittelten Endocytose wird die Funktionalisierung des Trägermoleküls mit Antikörpern benötigt. Die Kupplung des Antikörpers an die Bürste konnte mittels kupferfreier Clickchemie mit dem zuvor hergestellten DIBO-funktionalisierten Antikörper durchgeführt werden. Durch FCS-Messungen konnte ein Verhältnis von 3-4 Antikörpern pro Bürste ermittelt werden.

Um den Einfluss einer CpG-Sequenz zu testen, wurde diese ebenso an die ELP-Bürste gebunden und durch Hybridisierung dieser Sequenz mit einer farbstoffmarkierten komplementären Sequenz konnte ein Verhältnis von 6-7 CpG-Sequenzen pro Bürste bestimmt werden.

Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Übergangstemperatur der Bürste mit 27 °C zu gering ist um Zellexperimente durchführen zu können. Auch die Kopplung der Antikörpermoleküle hatte keinen Einfluss auf die Übergangstemperatur.

Grundsätzlich ist es möglich an dieses System per kupferfreier Clickchemie Farbstoffe, Antikörper und CpG zu binden, jedoch wird für weitere Experimente ein System mit höherer Übergangstemperatur benötigt.

4.5 Literaturverzeichnis Kapitel 4

- [1] M. E. Fox, F. C. Szoka, J. M. J. Frechet, *Accounts of Chemical Research* **2009**, 42, 1141-1151.
- [2] K. Isoda, N. Kanayama, D. Miyamoto, T. Takarada, M. Maeda, *React Funct Polym* **2011**, 71, 367-371.
- [3] W.-Y. Ooi, M. Fujita, P. Pan, H.-Y. Tang, K. Sudesh, K. Ito, N. Kanayama, T. Takarada, M. Maeda, *J Colloid Interf Sci* **2012**, 374, 315-320.
- [4] J. R. Williamson, M. K. Raghuraman, T. R. Cech, *Cell* **1989**, 59, 871-880.
- [5] H. Htun, J. E. Dahlberg, *Science* **1988**, 241, 1791-1796.
- [6] M. Franz, *Diplomarbeit*, Mainz, **2010**.
- [7] S. Fixon-Owoo, F. Levasseur, K. Williams, T. N. Sabado, M. Lowe, M. Klose, A. J. Mercier, P. Fields, J. Atkinson, *Phytochemistry* **2003**, 63, 315-334.
- [8] H.-G. Batz, G. Franzmann, H. Ringsdorf, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1972**, 11, 1103-1104.
- [9] http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi, **2014**.
- [10] H. Cui, Z. Chen, S. Zhong, K. L. Wooley, D. J. Pochan, *Science* **2007**, 317, 647-650.
- [11] P. N. Hurter, T. A. Hatton, *Langmuir* **1992**, 8, 1291-1299.
- [12] A. S. Michaels, R. G. Miekka, *Journal of Physical Chemistry* **1961**, 65, 1765-&.
- [13] K. Nakai, M. Nishiuchi, M. Inoue, K. Ishihara, Y. Sanada, K. Sakurai, S.-i. Yusa, *Langmuir* **2013**, 29, 9651-9661.
- [14] J.-S. Park, Y. Akiyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, *Langmuir* **2007**, 23, 138-146.
- [15] D. Weller, *Dissertation* **2013**.
- [16] K. Rausch, A. Reuter, K. Fischer, M. Schmidt, *Biomacromolecules* **2010**, 11, 2836-2839.
- [17] J. Skey, R. K. O'Reilly, *Chem Commun* **2008**, 4183-4185.
- [18] J. Bühler, *Dissertation* **2013**.
- [19] J. Bühler, S. Gietzen, A. Reuter, C. Kappel, K. Fischer, S. Decker, D. Schäffell, K. Koynov, M. Bros, I. Tubbe, S. Grabbe, M. Schmidt, *Chemistry – A European Journal* **2014**, n/a-n/a.
- [20] W. Chai, *Dissertation* **2012**.
- [21] S. Yamamoto, T. Yamamoto, S. Shimada, E. Kuramoto, O. Yano, T. Kataoka, T. Tokunaga, *Microbiology and Immunology* **1992**, 36, 983-997.
- [22] S. Rothenfußer, *Deutsches Ärzteblatt* **2001**, 98, A981-A985.

5 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, Trägermaterialien für biomedizinische Anwendungen zu synthetisieren und anschließend zu charakterisieren.

Ein Ansatz war die Synthese einer Polymerbürste, deren Seitenketten aus einem biokompatiblen Polymer und einer ODN-Sequenz bestehen. Als geeignetes Polymer wurde Poly(*N*-Isopropylacrylamid) gewählt, welches am α - und ω -Ende aminofunktionalisiert war. Dieses Polymer wurde mittels RAFT-Polymerisation hergestellt und durch anschließende Substitution der RAFT-Endgruppe mit einer entsprechenden Azoverbindung modifiziert.

Um nun ein Polymer-ODN-Konjugat zu erhalten, wurde eine am Träger gebundene und NHS-funktionalisierte ODN-Sequenz mit dem α -, ω -aminofunktionalisierten PNI-PAM umgesetzt. Durch die Reaktion des Polymer-ODN-Konjugats mit NHS-methacrylat konnte das entsprechende Makromonomer synthetisiert werden. Charakterisiert wurden die Konjugate und Makromonomere mittels Kapillarelektrophorese und PAGE. Jedoch war eine Aufreinigung durch präparative PAGE nicht möglich, da das Makromonomer während der Elektrophorese polymerisieren kann. Zudem ist nach zwei Jahren im Gefrierschrank ein unlöslicher farbloser Feststoff ausgefallen, der aus Natrium-Metasilikat bestehen könnte, welches sich durch die Behandlung des Trägers mit konzentrierter Ammoniaklösung gebildet haben könnte.

Überlegenswert wäre es die Bürsten anstatt durch „grafting through“ zu synthetisieren, einen „grafting onto“-Ansatz zu wählen. Der Vorteil dabei wäre, dass das Polymer-ODN-Konjugat ohne Methacrylatgruppe mittels präparativer Gelelektrophorese aufgereinigt werden kann und man damit das Problem der Aufreinigung des Makromonomers umgehen würde. Der Nachteil dieser Synthesemethode ist jedoch, dass eine Bürste mit geringerer Grafting-Dichte erhalten wird. Weiter müssten entweder die Synthesebedingungen des Polymer-ODN-Konjugats optimiert werden oder ein anderes Trägermaterial für die Synthese verwendet werden.

Ein zweiter Ansatz war die Herstellung von Polyion-Komplex-Mizellen. Dafür wird ein Polymer mit kationischem Block benötigt, welcher durch Komplexbildung mit Nucleinsäuren den Kern der Polyion-Komplex-Mizelle bilden kann. Deswegen wurde als kationisches Monomer Mono-N-boc-1,3-diaminopropanmethylethylmethacrylat synthetisiert und verwendet.

Die Schale der Polyion-Komplex-Mizelle sollte von einem zwitterionischen Polymer gebildet werden, da diese beispielsweise kein Aggregationsverhalten in humanem Blutserum zeigen. Deswegen wurden ausgehend von der jeweiligen geschützten L-Lysin-Aminosäure α -Lysin-Methylethylmethacrylat und ϵ -Lysin-Methylethylmethacrylat hergestellt.

Charakterisiert wurden die hergestellten Monomere und Polymere mittels NMR, statischer und dynamischer Lichtstreuung sowie GPC. Mittels Kapillarelektrophorese-messungen konnte gezeigt werden, dass sich keine Blockcopolymere gebildet haben und jeweils nur Homopolymere vorlagen.

Da sich durch neue Ergebnisse von Dr. Jasmin Bühler im Arbeitskreis gezeigt hat, dass auch Poly(2-oxazolin)e im Serum nicht aggregieren, wurde daraufhin die Herstellung von Polyion-Komplex-Mizellen auf Basis von Poly(2-oxazolin)en untersucht.

Durch kationische ringöffnende Polymerisation von 2-Ethyl-2-oxazolin und 2-Isopropyl-2-oxazolin mit einem azidfunktionalisierten Initiator konnte ein Poly(2-oxazolin) hergestellt werden. Durch Reduktion der Azidgruppe zu einem primären Amin konnte dieses als Initiator für die ringöffnende Polymerisation von Lysin-TFA-NCA verwendet werden. Dadurch wurde ein Blockcopolymer aus PLL und Polyoxazolin erhalten, welches ein Blocklängenverhältnis von 1:1 besaß.

Komplexbildungsexperimente mit siRNA zeigten jedoch, dass die Abschirmung des Oxazolinblocks nicht ausreichte und sich Aggregate bildeten.

Durch Erhöhung des Verhältnisses von Lysin zu Oxazolin auf 1:3 ist wahrscheinlich eine bessere Abschirmung möglich, jedoch ist die Abtrennung des Oxazolin-Homoblocks vom Blockcopolymer sehr schwierig, da die Molmassenänderung gering ist.

Deshalb wurde die Polymerisation von 2-Ethyl-2-oxazolin statt mit Boc-Piperazin mit Triboc-Spermin abgebrochen und damit ein Poly(2-ethyl-2-oxazolin) mit einer Endgruppe bestehend aus vier Amingruppen erhalten.

Eine Komplexierung dieses Polymers mit CpG-Sequenzen zur Herstellung von Polyion-Komplex-Mizellen in 15mM PBS-Puffer war möglich. Allerdings war die Anzahl der kationischen Ladungen nicht ausreichend um die Polyion-Komplex-Mizellen unter physiologischen Salz-Bedingungen zu stabilisieren.

Um die Konzentration an kationischen Ladungen zu erhöhen wurde 1,3,5-Tris(brommethyl)benzol als Vernetzer eingesetzt. Jedoch war auch hier die Abschirmung des Polyoxazolinblocks nicht genügend hoch, so dass sich in PBS-Puffer Aggregate ausbildeten.

Im letzten Projekt wurde per kupferfreier Clickchemie eine ELP-Bürste mit azidfunktionalisierten Seitenkettenenden, die von Dr. Désirée Weller synthetisiert wurde, mit biomedizinisch relevanten Verbindungen funktionalisiert.

Zur Verfolgung weiterer Untersuchungen wurde die Bürste mit dem Farbstoff Alexa Fluor 488 markiert, wobei per FCS-Messung ein Verhältnis von 11 Farbstoffmolekülen pro Bürste bestimmt wurde.

Zur rezeptorvermittelten Endocytose wurde ebenfalls per kupferfreier Click-Chemie DIBO-funktionalisierter Antikörper an die Bürste konjugiert, der mit Alexa Fluor 647 markiert ist. Durch FCS-Messung konnte gezeigt werden, dass 4-5 Antikörper an eine ELP-Bürste gebunden sind.

Zur Untersuchung des Einflusses von CpG wurden auf dem gleichen Weg 6-7 CpG-Sequenzen an die Bürste konjugiert und die Anzahl durch Hybridisierung mit einem farbstoffmarkierten komplementären CpG-Strang und anschließender UV-Vis-Messung bestimmt.

Jedoch war das LCST-Verhalten der Bürste mit einer Übergangstemperatur von 27 °C für Zellexperimente zu gering. Auch durch die Kopplung von Antikörpermolekülen konnte diese nicht erhöht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Kopplung von Farbstoff, Antikörper und CpG-Sequenzen per kupferfreier Clickchemie an die Azidfunktionalisierung der ELP-Bürste möglich ist, allerdings wird für Versuche unter physiologischen Bedingungen bei 37 °C ein System mit einer höheren Übergangstemperatur benötigt.

Dies wäre möglicherweise durch die Einführung einer PEG-Gruppe möglich, jedoch beeinträchtigt dies die Vorteile des ELP-Systems wie beispielsweise das Verhalten in humanem Blutserum.

6 Experimentaltteil

In diesem Kapitel werden die verwendeten Chemikalien und Materialien aufgelistet. Sowie die Synthese der hergestellten Produkte und die Geräte zur Charakterisierung beschrieben.

6.1 Informationen zu verwendeten Chemikalien und Materialien

Tabelle 6.1 zeigt die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel, die für die in Abschnitt 6.2 beschriebenen Synthesen benötigt werden.

Tabelle 6.1: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel:

Chemikalie / Material	Firma	Bestellnummer	Weiterführende Aufreinigung	Verwendungszweck
1,1-Carbonyldiimidazol	Sigma-Aldrich	115533		Azo-bis-cyano-valeriansäure-N-triflat-hexylamid
1,3,5 Trisbrommethylbenzol		657336		Polyoxazoline
1,3-Diaminopropan	Sigma-Aldrich	D23602		Mono-N-boc-1,3-diaminopropan
1,4-Dioxan	Sigma-Aldrich	33147		Lösungsmittel
1-Butanol	Sigma-Aldrich	360465		Lösungsmittel
1-Dodecanthiol	Sigma-Aldrich	471364		RAFT-Agens
25% Ammoniak				ODN-Polymer-Konjugat
2-Ethylloxazolin	Sigma-Aldrich	137456	Destillation über CaH_2	Monomer
2-Propanol	Sigma-Aldrich	190764		Lösungsmittel
35% Hydrazinlösung		309400		Entfernung der Triflatgruppe
4-(Dimethylamino)-pyridin	Sigma-Aldrich	39405		ODN-Polymer-Konjugat
4,4'-Azobis(4-cyano-valeriansäure)	Sigma-Aldrich	118168		Azo-bis-cyano-valeriansäure-N-triflat-hexylamid
4-Cyano-4-thiobenzylvaleriansäure-N-boc-hexylamid	Herstellung von Martin Franz			RAFT-Agens
Aceton	Acros	176800025		Lösungsmittel
Acetonitril	Acros	364311000		Lösungsmittel für die kationische ringöffnende Polymerisation
aDEC205	BioXCell	BE00105		Biofunktionalisation
AlexaFluor®647 Carboxylic Acid Succinimidyl Ester	Invitrogen	A20006		Biofunktionalisation
Aliquat 336	Sigma-Aldrich	205613		RAFT-Agens
Amicon Ultra Centrifugal Filter Unit 30kD	Millipore	UCF800324		Aufreinigung

Anisol	Sigma-Aldrich	123226	Destillation unter Argon	Lösungsmittel für Polymerisation
Antikörper aDEC205				Biofunktionalisation
Azoisobutyronitril	Sigma-Aldrich	441090	Umkristallisation aus Ethanol	Initiator
BioGel P30	BioRad	150-4150		Aufreinigung
Chloroform	VWR	22711324		Lösungsmittel
Click-IT®Alexa FLuor®488 DIBO Alkyne	Invitrogen	C-10405		Biofunktionalisation
CpG-ODN 5'- t*c*c*a*t*g*a*c*g*t*t*c*c*t*g*t*t*-3'	Biomers			Biofunktionalisation
DiBo-NHS				Biofunktionalisation
Dichlormethan	Sigma-Aldrich	32222		Lösungsmittel
Diethylether	Sigma-Aldrich	32203	Destillation	Lösungsmittel
Di-tert-butylidicarbonat	Sigma-Aldrich	205249		Mono-N-boc-1,3-diaminopropan
DPBS-Puffer, no Calcium/Magnesium	Invitrogen	14190136		Puffer
Ethylacetat	Sigma-Aldrich	33211		Lösungsmittel
Ethyltrifluoracetat	Sigma-Aldrich	E50000		N-(6-aminohexyl)-2,2,2-trifluoracetamid
Hexamethyldiamin	Sigma-Aldrich	H11696		N-(6-aminohexyl)-2,2,2-trifluoracetamid
Kieselgel 60	Merk	1060020500		Flashchromatographie
Lysin-TFA-NCA	Synthetisiert von Christian Hörtz			Kationischer Block
Methacrylsäurechlorid	Sigma-Aldrich	64120	Destillation	N-Hydroxysuccinimidmethacrylsäureester
Methanol	Sigma-Aldrich	32213		Lösungsmittel
N,N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich	33120		ODN-Polymer-Makromonomer
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich	31437		N-Hydroxysuccinimidmethacrylsäureester
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich	221465		
N-Dimethylacetamid	Acros	375230010		Lösungsmittel für die kationische ringöffnende Polymerisation
n-Hexan	Sigma-Aldrich	34859		Lösungsmittel
N-Hydroxysuccinimid	Sigma-Aldrich	130672		N-Hydroxysuccinimidmethacrylsäureester
N-Isopropylacrylamid	Sigma-Adrich	N-Isopropylacrylamid	Umkristallisation aus Hexan / Toluol 1:1	Monomer
N-α-t-Butyloxycarbonyl-L-Lysinmethylesteracetat	IRIS-Biotech	HAA6830		Zwitterionisches Monomer
N-ε-t-Butyloxycarbonyl-L-Lysin-t-butylesterhydrochlorid	IRIS-Blotech	HAA6840		Zwitterionisches Monomer
CpG-ODN-5'-NHS 5'-gtc ctc gcc tag tgt ttc att ga -3'	Biomers			ODN-Polymer-Konjugat
Schwefelkohlenstoff	Sigma-Aldrich	180173		RAFT-Agens
Tetrahydrofuran	Sigma-Aldrich	87371		Lösungsmittel
Tri-Boc-Spermin	Synthetisiert von WenqiangChai			Polyoxazoline
Triethylamin	Sigma-Aldrich	T0886	Destillation	N-Hydroxysuccinimidmethacrylsäureester
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich	T6508		Entschützung
Triphenylphosphin		93090		Reduktion von Aziden
Zeba Columns 40 kD	Invitrogen	89882		Aufreinigung

6.2 Standardmäßige Mess- und Analysemethoden

6.2.1 GPC-Messungen

Für die GPC-Messungen wird Dimethylacetamid DMAc mit $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ LiBr versetzt. Der Säulensatz (je nach Messung 10^3 Å , 10^4 Å , 10^5 Å , 10^6 Å oder 10^3 Å , 10^4 Å) von MZ-Analysentechnik mit dem Säulenmaterial SDplus $5\mu\text{m}$ wird verwendet. Der Aufbau besteht aus der Pumpe Hitachi L-2130, dem RI-Detektor Waters 2410 RI-Detektor IIEEE23, dem Degasser VWR 7614 und dem Säulenofen Croco Cil bei 40°C .

Zur Eignung werden engverteilte Polystyrolstandards der Firma PSS, Mainz verwendet.

6.2.2 Statische und dynamische Lichtstreuemessungen

Für die statische Lichtstreuung wird ein ALV-SP86 Goniometer und ALV 3000 Korrelator verwendet. Als Lichtquelle wird ein Uniphase HeNe Laser mit 25 mW Leistung und einer Wellenlänge $\lambda=632,8 \text{ nm}$ benutzt. Die Detektion erfolgt durch ein ALV/High QE ADP Avalanche Photodioden Detektionssystem.

Ausgewertet wird die Messung nach Zimm um M_w , R_g und A_2 zu erhalten. Gemessen wird in 5° -Schritten von 30 - 150° .

Für die dynamische Lichtstreuung werden zwei verschiedene Systeme verwendet. Der erste Aufbau besteht aus einem ALV-SP125 Goniometer, ALV-5000 Korrelator und Spectra Physics 2060 Argonionen Laser mit 500 mW Leistung bei $\lambda=514,4 \text{ nm}$. Die Streuintensität wird in 2 Signale (50:50) aufgeteilt und je von einem Photomultiplier detektiert. Die beiden Signale werden kreuzkorreliert.

Das zweite System besteht aus einem HeNe Laser ($\lambda=632,8 \text{ nm}$, 25 mW) und einem ALV-CGS 8 F SLS/DLS 5022F Goniometer. Dieser besitzt acht gleichzeitig messende ALV 7004 Korrelatoren, sowie acht QEAPD Avalanche Photodioden Detektoren.

Die Messung erfolgt in 20° bzw. 30° Schritten oder bei Verwendung des 2. Systems in 17° Schritten.

Als Küvetten werden Quarzglasküvetten der Firma Hellma Mühlheim mit 20 mm Durchmesser und 14 ml Volumen verwendet. Als Maßlösung wird eine Probelösung von $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ angesetzt.

Zum Filtrieren der Probe werden Filter von Millipore LCR $0,45 \mu\text{m}$ oder LG $0,2 \mu\text{m}$ verwendet. Die ELP-Proben werden mit GHP-Filter filtriert. Die Konzentration der Proben wird durch Gewichtsbestimmung erhalten.

Das Brechungsindexinkrement wird mit Hilfe eines selbstgebauten Michelson Interferometer bei der Wellenlänge $\lambda=632,8 \text{ nm}$ bestimmt. Der Fehler der Messung wird auf 0,2% geschätzt^[1].

6.2.3 NMR-Messung

Die ^1H -NMR-Spektren werden mit einer ^1H Bruker 300 Ultra Shield Anlage bei 293K gemessen. Die Messzeit pro Spektrum beträgt jeweils 7 Minuten.

6.2.4 MALDI-TOF-Messung

Die MALDI-TOF-Messungen sind von Eva Wächtersbach mit einem Micromass TOF-Spec E Mass Spektrometer mit positiven Reflektronbetrieb durchgeführt worden. Als Matrix wird Dithranol oder 2-(5-Hydroxyphenylazo)benzoesäure verwendet. Die Probe wird in THF mit $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ gelöst und mit der Matrixlösung ($25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) im Verhältnis 1:1 verdünnt. Von dieser Mischung wird $1 \mu\text{L}$ auf den Tracer aufgetragen.

Vor jeder Messung wird das Gerät mit Polystyrolstandards von PSS Mainz kalibriert.

6.2.5 FCS-Messung

Die FCS-Messungen sind am Max-Planck-Institut für Polymerforschung von David Schäffel durchgeführt worden. Der Aufbau des FCS-Geräts ist ein kommerzieller Aufbau von Zeiss.

Die Fluorophore werden durch einen Argon Laser (CVI Melles Griot) mit einer Laserleistung von 4% (8 mW Gesamtleistung) angeregt. Die Detektion erfolgt mittels einer Avalanche Photodiode. Für die Messung des Alexa Fluor 488 Farbstoffs wird

eine Langpassfilter 505 nm verwendet. Bei der Messung des Alexa Fluor 647 Farbstoffs wird ein Langpassfilter 605 nm verwendet.

Die Kalibration des konkaven Beobachtungsvolumens erfolgt jeweils mit dem verwendeten Farbstoff in Wasser. Die Proben werden mit einer Konzentration von 2 nmol/ml vermessen.

6.2.6 IR-Messung

Für die IR-Messung wird ein Nicolet iS10 FT-IR Spektrometer von Thermo Scientific mit einer ATR-Einheit verwendet. Gemessen wird im Wellenzahlenbereich von 4000-500 cm^{-1} . Die Auswertung erfolgt mit der Software OMNIC.

6.2.7 Trübungskurven

Die Trübungskurven werden mit dem Carry 100Bio UV-Vis-Spektrometer (Varian, Inc) mit einer Heizrate von 1 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ und einer Absorption bei 345 nm gemessen. Die Küvette ist mit 3 mL Probelösung gefüllt. Die Übergangstemperatur wird graphisch durch den Wendepunkt der Kurve ermittelt.

6.2.8 UV-Vis-Messung

Die UV-Vis-Messungen werden mit einem Carry 100Bio UV-Vis Spektrometer (Varian, Inc) im Wellenlängenbereich von 200-700 nm aufgenommen.

6.2.9 Kapillarelektrophorese

Zur Messung der Kapillarelektrophorese wird das Gerät 7100 Capillary von Agilent Technologies verwendet. Die UV-Detektion erfolgt bei 260 nm. Die weiteren Messbedingungen finden sich in der jeweiligen Bildunterschrift.

6.2.10 PAGE

Für die PAGE wird ein PerfectBlue Twin L vertikales Doppelsystem verwendet.

Das 20%ige denaturierte Acrylamid/Bisacrylamid-Gel wird aus 32 mL 20% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung mit 50% Harnstoff, 250 µL APS (10% w/v) und 25 µL TEMED hergestellt.

1 µg der Probe wird mit denaturiertem Ladepuffer versetzt und bei 90°C für 5 min denaturiert. Diese Lösung wird auf das Polymerisierte Gel aufgetragen und in 1x TBE Puffer bei 50°C mit einer Spannung von $U=600V$ für 1,5h gemessen.

Das Gel wird mit einer GelRed-Lösung für 15 min angefärbt und danach mit einem Transilluminator von PeqLab fotografiert. Als Auswerteprogramm wird E-Capt der Firma ImageCraft verwendet.

Die verwendete GelRed-Lösung wird durch Verdünnung von 75 µl GelRed™ (10000x in DMSO) der Firma Biotium mit 250 mL Wasser hergestellt.

Der Ladepuffer besteht aus 90% Formamid, 10mM NaOH, 1mM EDTA und 0,1 w/v Bromphenolblau.

6.3 Synthesevorschriften

6.3.1 Synthesevorschriften Raftagentien

6.3.1.1 Mono-*N*-*boc*-1,3-diaminopropan

Die Reaktion ist nach der Vorschrift von Chadwick^[2] durchgeführt worden.

317 g (4,3 mol) 1,3-Diaminopropan werden in einem 5L-Dreihalskolben mit KPG-Rührer und Tropftrichter in 1,5 L Dioxan gelöst. 115g (0,5 mol) Di-*tert*-butyldicarbonat werden in 1,5 L Dioxan gelöst und über vier Stunden zugetropft. Ein farbloser Niederschlag (doppelt geschütztes Derivat) bildet sich. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Feststoff wird abfiltriert und das Filtrat eingeeengt. Die eingeeengte Lösung wird in 2 L Wasser gegeben und der entstandene Feststoff abfiltriert. Die wässrige Lösung wird fünf Mal mit je 1 L Dichlormethan extrahiert und mit Natriumsulfat getrocknet.

Das Lösungsmittel wird abdestilliert und das Produkt unter Vakuum destilliert.

Ausbeute:	108 g (0,62 mol, 62% der Theorie)
¹H-NMR (CDCl₃): δ/ppm:	4,98 (s, 1H), 3,18 (q, 2H), 2,72 (t, 2H), 1,57(m, 2H), 1,40 (s, 9H)

6.3.1.2 RAFT-Agens mit *boc* geschützter Aminoendgruppe

Das RAFT-Agens mit Säureendgruppe ist nach Vorschrift von Lai^[3] hergestellt worden.

In einem 2L-Dreihalskolben mit Tropftrichter und Thermometer werden 80,7 g (0,4 mol) Dodecanthiol und 192 g (3,3 mol) Aceton zusammengegeben. Nach Kühlen auf 10°C werden 6,5 g (0,016 mol) Aliquat 336 zugegeben und 33,5 g 50% Natronlauge langsam zugetropft. Ein farbloser Niederschlag fällt aus.

Die Reaktionslösung wird weitere 15 Minuten gerührt. 30,4 g (0,4 mol) Schwefelkohlenstoff wird mit 40,3 g Aceton verdünnt und langsam zur

Reaktionslösung zugetropft. Diese färbt sich gelb und der Niederschlag löst sich teilweise auf.

Die Lösung wird 10 Minuten gerührt bevor 71 g (0,6 mol) Chloroform zugegeben werden. Anschließend werden 160g 50% Natronlauge zugetropft und die Reaktionslösung über Nacht bei 10°C gerührt.

600 mL Wasser werden zugegeben und die Reaktionslösung 10 Minuten mit Argon gespült. Der gebildete Feststoff wird abgesaugt und unter Rühren in 1 L 2-Propanol gegeben. Der Feststoff wird abgesaugt und verworfen. Das Lösungsmittel des Filtrats wird am Rotationsverdampfer entfernt und der entstandene Feststoff in Hexan mehrfach umkristallisiert. Es werden gelbe Kristalle erhalten.

Ausbeute: 29,3 g (0,08 mol, 20% der Theorie)
¹H-NMR (CDCl₃): δ/ppm: 3,28 (t, 2H), 1,72 (s, 3H), 1.25 (m, 20H), 0,8 (t, 3H)

Zur Herstellung des RAFT-Agens mit boc geschützter Aminoendgruppe wird ein 1L-Dreihalskolben mit zwei Kernoliven im Vakuum ausgeheizt. Im Argongegenstrom werden 10,1 g (27,4 mmol) RAFT-Agens mit Säureendgruppe, 400 mL THF sowie 6,6 g (41 mmol) 1,1-Carbonyldiimidazol zusammengegeben und drei Stunden gerührt. Mono-N-boc-1,3-diaminopropan wird in 20 mL THF gelöst, zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und ein gelbes Öl erhalten. Dieses wird in 100 mL Ethylacetat gelöst, 50g Kieselgel zugegeben und gut durchmischt. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und das Produkt am Hochvakuum über Nacht getrocknet. Die Aufreinigung erfolgt mittels Flash-Chromatographie.

Säulendurchmesser: 10 cm
Kieselgelmenge: 270 g
Laufmittel: Hexan 4 : 1 Ethylacetat
R_f-Wert: 0,1
Anfärbemittel Kaliumpermanganat, Ninhydrin
Ausbeute: 6,9 g (13 mmol, 48% der Theorie)
¹H-NMR (CDCl₃): δ/ppm: 6,94 (s, 1H), 4,93 (s, 1H), 3,26 (m, 4H), 3,11 (q, 4H), 1,69 (6H), 1,42 (9H), 1,24 (m, 20H), 0,87 (t, 3H)

6.3.1.3 Benzyl-2-hydroxyethylcarbonotrithioat (RAFT-OH)

Das RAFT-Agens ist nach der Vorschrift von Skey^[4] hergestellt worden.

In einem 100 mL Kolben werden 5,46 g (25,7 mmol) gemörsertes Kaliumphosphat und 60 mL Aceton gegeben. Die Dispersion wird zehn Minuten gerührt. 1,8 mL (25,6 mmol) Mercaptoethanol werden zugegeben und die Reaktionslösung 15 Minuten gerührt. Anschließend werden 4,6 mL (76,1 mmol) Schwefelkohlenstoff zugegeben und danach 20 Minuten gerührt. Die Reaktionslösung färbt sich orange. Nach der Zugabe von 3,0 mL (25,3 mmol) Benzylchlorid färbt sich die Reaktionslösung gelb und wird über Nacht gerührt.

Der entstandene Feststoff wird abfiltriert und 2x mit je 40 mL Aceton gewaschen. Die organischen Phasen werden vereinigt und das Lösungsmittel per Rotationsverdampfer entfernt. Der Feststoff wird in 100 mL Chloroform gelöst und 3x mit je 50 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Die Aufreinigung erfolgt durch Flash-Chromatografie.

Säulendurchmesser:	2 cm
Kieselgelmenge:	150 g
Laufmittel:	Ethylacetat 1 : 4 Hexan
Anfärbemittel	KMnO ₄
Ausbeute:	3,9 g (16 mmol, 62% der Theorie)
¹H-NMR (CDCl₃): δ/ppm:	5,73 (m, 5H), 4,63(s, 2H), 3,91 (t, 2H), 3,63 (t, 2H), 1,79 (s, 1H)

6.3.2 Synthesevorschriften für Polymer-DNA-Bürste

6.3.2.1 Polymerisation *N*-Isopropylacrylamid

Als RAFT-Agens wird 4-Cyano-4-thio-benzyl-valeriansäure-N-boc-hexylamid verwendet, welches von Martin Franz synthetisiert worden ist^[5].

In einem ausgeheizten Schlenkrohr werden 1,0 g (2 mmol) 4-Cyano-4-thio-benzyl-valeriansäure-N-boc-hexylamid, 12,2 g (108 mmol) *N*-Isopropylacrylamid und 70,0 mg (0,4 mmol) Azo-bis-(isobutyronitril) in 15 mL Anisol gelöst. Die Lösung wird durch 3 Freeze-Pump-Zyklen von Sauerstoff befreit und bei 90 °C Ölbadtemperatur für 20 h erhitzt. Die Polymerisation wird durch Quenchen in flüssigen Stickstoff beendet. Das Polymer wird dreimal aus Dioxan in Diethylether gefällt und abschließend aus Dioxan gefriergetrocknet.

Ausbeute:	2,9 g (24% der Theorie)
M_w (Maldi-Tof)	3837 g mol ⁻¹
PDI (Maldi-Tof)	1,04

6.3.2.2 *N*-(6-Aminoethyl)-2,2,2-trifluoracetamid

Die Substanz ist nach der Vorschrift von Fixon-Owoo^[6] hergestellt worden.

20 g (172 mmol) Hexamethyldiamin werden in 100 mL Methanol gelöst und auf -40°C gekühlt. 25,0 g (176mmol) Ethyltrifluoracetat werden langsam zugetropft. Ein farbloser Niederschlag fällt aus. Die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Der entstandene Niederschlag löst sich auf. Das Lösungsmittel wird mit Hilfe des Rotationsverdampfers entfernt und ein farbloses Öl erhalten. Dieses wird unter Vakuum destilliert, wobei ein Teil des Produkts am Kühlfinger sublimiert.

Ausbeute:	24,6 g (116 mmol, 67% der Theorie)
¹H-NMR (D-DMSO): δ/ppm:	3,15 (t, 4H), 1,46 (t, 4H), 1,25 (m, 4H)

6.3.2.3 Azo-bis-cyanovaleriansäure-*N*-triflathexylamid

Ein 2L-Dreihalskolben mit zwei Kernoliven wird im Vakuum ausgeheizt. Im Argongegenstrom werden 21,8 g (78 mmol) 4,4'-Azobis(4-cyano-valeriansäure) zugegeben und in 1,2 L THF gelöst. 25,7 g (156 mmol) 1,1-Carbonyldiimidazol werden zugegeben und drei Stunden gerührt. Nach einer Stunde bildet sich ein farbloser Niederschlag. *N*-(6-Aminohexyl)-2,2,2-trifluoracetamid wird in 70 mL THF gelöst, zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Feststoff wird abfiltriert. Das Lösungsmittel des Filtrats wird per Kälteedestillation entfernt und ein Feststoff erhalten. Die Aufreinigung erfolgt mit Flash-Chromatographie.

Ausbeute:	16,7 g (0,02 mol, 32% der Theorie)
Säulendurchmesser:	10 cm
Kieselgelmenge:	270 g
Laufmittel:	Ethylacetat 8 : 2 Dichlormethan
R_f-Wert:	0,4
Anfärbemittel	Ninhydrin
¹H-NMR (CDCl₃): δ/ppm:	3,15 (t, 2H), 3,12 (t, 2H), 2,24 (m, 4H), 1,64 (s, 3H), 1,44 (m, 4H), 1,24 (m, 4H)

6.3.2.4 Substitution der RAFT-Endgruppe

In einem ausgeheiztem Schlenkrohr wird 2,0 g RAFT-PNIPAM-NHBoc, 2,47 g (4 mmol) Azo-bis-cyanovaleriansäure-*N*-triflathexylamid in 15 mL 1-Butanol gelöst und ein Freeze-Pump-Zyklus durchgeführt. Die Lösung wird bei 100 °C Ölbadtemperatur für 16 Stunden gerührt. Die Aufreinigung erfolgt durch Dialyse (MWCO 1000) gegen Methanol.

Ausbeute:	0,77 g (39% der Theorie)
M_w (Maldi-Tof)	3850 g mol ⁻¹
PDI (Maldi-Tof)	1,05

6.3.2.5 Entschützen der triflatgeschützten Aminogruppe

0,3 g α -, ω -aminofunktionalisierten PNIPAM werden in 10 mL basischem Methanol (pH 11) gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufreinigung erfolgt durch Dialyse (MWCO 1000) gegen Methanol. Das Produkt wird aus Dioxan gefriergetrocknet.

Ausbeute: 0,27 g (90% der Theorie)

6.3.2.6 Entschützen der bocgeschützten Aminogruppe

0,3 g α -, ω -aminofunktionalisierten PNIPAM werden in 10 mL Dichlormethan und 2,5 mL Trifluoressigsäure gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Aufreinigung erfolgt durch Dialyse (MWCO 1000) gegen Methanol. Das Produkt wird aus Dioxan gefriergetrocknet.

Ausbeute: 0,12 g (40% der Theorie)

6.3.2.7 Kopplung von Polymer an trägergebundenes ODN

Trägergebundenes NHS-funktionalisiertes ODN, Polymer und 4-(Dimethylamino)-pyridin werden in trockenem Acetonitril gelöst und bei 30 °C 70 Stunden geschüttelt. Nach der Reaktion wird das trägergebundenen Konjugat mit folgenden Schritten gewaschen:

3x	Acetonitril
1x	Methanol
1x	Wasser
1x	Methanol
2x	Diethylether.

Zum Abspalten des Konjugats vom Träger wird 25% Ammoniak zugegeben und bei 60°C über Nacht geschüttelt, gefolgt von einer Stunde bei 10 °C.

Der Träger wird 1x mit Wasser gewaschen und die Probenlösung im Konzentrator aufkonzentriert.

6.3.2.8 Polymer-ODN-Makromonomer (Syntheseweg über boc-Polymer)

Das Polymer-ODN-Konjugat wird wie oben beschrieben hergestellt und gewaschen, jedoch nicht vom Trägermaterial abgespalten. Zur Entschützung der Boc-Schutzgruppe wird 2% Trifluoressigsäure in Dichlormethan zugegeben und bei Raumtemperatur 10 Stunden geschüttelt. Die Probe wird 4x mit Acetonitril gewaschen.

Im nächsten Schritt wird NHS-Methacrylat gelöst in Acetonitril zugegeben und bei Raumtemperatur 24 Stunden geschüttelt. Die Probe wird 4x mit Acetonitril gewaschen und die Lösung vollständig abgenommen.

Zum Abspalten des trägergebundenen Makromonomers wird 0,4 M Natronlauge/Wasser 4:1 zugegeben und bei Raumtemperatur 45 Stunden geschüttelt. Der Träger wird 2x mit Wasser gewaschen. Die Probe wird gegen Wasser mit FloatALyzer 0,5-1 kD dialysiert und aus Wasser gefriergetrocknet.

6.3.2.9 Polymer-ODN-Makromonomer (Syntheseweg über Triflat-Polymer)

Das Polymer-ODN-Konjugat wird wie oben beschrieben hergestellt, gewaschen und vom Trägermaterial abgespalten. Das Polymer-ODN-Konjugat wird gegen Wasser mit FloatALyzer 0,5-1 kD dialysiert und aus Wasser gefriergetrocknet.

Zur Synthese des Makromonomers wird das Konjugat in 50mM Natriumboratpuffer mit pH 8,2 gelöst. Das NHS-Methacrylat wird in Dimethylformamid gelöst und zum Konjugat gegeben. Die Reaktionslösung wird bei Raumtemperatur 24 Stunden geschüttelt, danach gegen Wasser mit FloatALyzer 0,5-1 kD dialysiert und aus Wasser gefriergetrocknet.

6.3.2.10 N-Hydroxysuccinimidmethacrylsäureester

Die Synthese ist nach der Vorschrift von Batz^[7] durchgeführt worden.

In einem Vierhalskolben mit KPG-Rührer, zwei Tropftrichter und Thermometer werden 83,4 g (0,7 mol) N-Hydroxysuccinimid in 280 mL Dichlormethan gelöst und die Lösung auf 0°C gekühlt. 71,5 g (0,7 mol) destilliertes Triethylamin und 75,1 g (0,7 mol) destilliertes Methacrylsäurechlorid werden jeweils mit 220 mL Dichlormethan verdünnt und gleichzeitig zugegeben. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und danach über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Der entstandene weiße Feststoff wird abgesaugt und die organische Phase mit 200 mL Eiswasser, 100 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 400 mL Eiswasser gewaschen. Die organische Phase wird mit Natriumhydrogencarbonat getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt in Dichlormethan umkristallisiert.

Ausbeute:	84,1 g (0,46 mol, 67% der Theorie)
¹H-NMR (CDCl₃): δ/ppm:	6,42 (s, 1H), 5,98 (s, 1H), 2,87 (s, 4H), 2,06 (s, 3H)

6.3.3 Synthesevorschriften für zwitterionische Polyion-Komplex-Mizellen

6.3.3.1 α-N-Methacryloyl-N-ε-*t*-Butyloxycarbonyl-L-Lysin-*t*-butylester

Die Synthese ist nach der Vorschrift von Dutta^[8] ausgeführt worden.

5g (14,7 mmol) N-ε-*t*-Butyloxycarbonyl-L-Lysin-*t*-butylesterhydrochlorid werden unter Argonatmosphäre in einem 500 mL Dreihalskolben in 150 mL Dichlormethan gelöst. 4,1 mL (29,5 mmol) Triethylamin werden zugegeben und die Reaktionslösung mit Hilfe eines Eisbades auf 0°C gekühlt. 1,4 mL (14,7 mmol) Methacryloylchlorid werden in 35 mL Dichlormethan gegeben und langsam zur gekühlten Reaktionslösung mit Hilfe eines Tropftrichters zugegeben. Die Reaktionslösung wird auf Raumtemperatur

erwärmt, über Nacht gerührt und 1x mit 15% Natriumchloridlösung, 2x mit 10% Zitronensäure und 2x mit 4% Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Die Aufreinigung des Produkts erfolgt durch Flash-Chromatografie.

Säulendurchmesser:	10 cm
Kieselgelmenge:	200 g
Laufmittel:	Dichlormethan + 1% Methanol
R_f-Wert:	0,08
Anfärbemittel	KMnO ₄
Ausbeute:	5,1g (13,8 mmol, 93% der Theorie)
¹H-NMR (CDCl₃): δ/ppm:	5,75 (s, 1H), 5,36 (s, 1H), 4,54 (m, 1H), 3,08 (q, 2H), 1,97 (s, 3H), 1,48 (m, 2H), 1,74 (m, 2H), 1,46 (s, 11H), 1,42 (s, 11H)

6.3.3.2 α-N-Methacryloyl-N-ε-*t*-Butyloxycarbonyl-*L*-Lysin-*t*-butylester

Die Synthese wird analog der Synthese von α-Lysin-Methylmethacrylat mit folgendem Ansatz 5,13g (16 mmol) N-α-*t*-Butyloxycarbonyl-*L*-Lysinmethylesteracetat, 4,4 mL (32 mmol) Triethylamin und 1,6 mL (16 mmol) Methacryloylchlorid durchgeführt.

Die Aufreinigung des Produkts erfolgt durch Flash-Chromatografie.

Säulendurchmesser:	5 cm
Kieselgelmenge:	100 g
Laufmittel:	Dichlormethan + 2,5% Methanol
R_f-Wert:	0,2
Anfärbemittel	KMnO ₄
Ausbeute:	1,2 (3,6 mmol, 23% der Theorie)
¹H-NMR (CDCl₃): δ/ppm:	5,66 (s, 1H), 5,30 (s, 1H), 4,26 (m, 1H), 3,08 (s, 3H), 3,31 (q, 2H), 1,95 (s, 3H), 1,78 (m, 6H), 1,46 (s, 9H)

6.3.3.3 Mono-N-boc-1,3-diaminopropanmethylemethacrylat

in einem 1L-Dreihalskolben werden unter Argonatmosphäre 23,4 g (134 mmol) Mono-N-boc-1,3-diaminopropan, 250 mL Dichlormethan und 22,5 mL (162 mmol) Triethylamin geben. Die Reaktionslösung wird mit Hilfe eines Eisbades auf 0°C gekühlt. 15 mL (155 mmol) Methacryloylchlorid werden in 100 mL Dichlormethan langsam zu der Reaktionslösung getropft, ein farbloser Niederschlag bildet sich. Die Reaktionslösung wird über Nacht gerührt und kurz in den Kühlschrank gestellt, weiterer Niederschlag bildet sich. Dieser wird abfiltriert und die Reaktionslösung 2x mit je 100 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel mit Hilfe des Rotationsverdampfers entfernt. Das Produkt wird durch zweifache Flash-Chromatografie aufgereinigt.

Säulendurchmesser:	15 cm
Kieselgelmenge:	500 g + basisches Alox
Laufmittel:	Ethylacetat 6 : 4 Cyclohexan
R_f-Wert:	0,34
Anfärbemittel	KMnO ₄
Ausbeute:	16,7g (69 mmol, 51% der Theorie)
¹H-NMR (CDCl₃): δ/ppm:	5,73 (s, 1H), 5,31 (s, 1H), 3,33 (q, 2H), 3,18 (q, 2H), 1,96 (s, 3H), 1,62 (m, 2H), 1,46 (s, 9H)

6.3.3.4 Allgemeine Vorschrift der Polymerisation

In einem ausgeheiztem Schlenkrohr werden Monomer, RAFT-Agens und Azoisobutyronitril in Anisol bzw. 1,4-Dioxangelöst. Die Lösung wird durch 3 Freeze-Pump-Zyklen von Sauerstoff befreit und bei 90 °C Ölbadtemperatur erhitzt. Die Polymerisation wird durch Quenchen in flüssigen Stickstoff beendet. Das Polymer wird dreimal aus Dioxan in Diethylether bzw. Cyclohexan gefällt und abschließend aus Dioxan gefriergetrocknet.

Poly(Amin- α -Lysin)

Homopolymer

0,968 g (4 mmol) Mono-N-boc-1,3-diaminopropanmethylemethacrylat

0,021 g (0,08 mmol) Benzyl-2-hydroxyethylcarbonotrithioat

2,8 mg (0,016 mmol) Azoisobutyronitril

4 mL Anisol

3,5 h

Fällungsmittel: Diethylether

Blockcopolymer

0,115 g Homopolymer

0,890 g (2,4 mmol) α -N-Methacryloyl-N- ϵ -t-Butyloxycarbonyl-L-Lysin-t-butylester

1,0mg (0,006 mmol) Azoisobutyronitril

3 mL Dioxan

3 h

Fällungsmittel: Cyclohexan

Poly(α -Lysin-Amin)

Homopolymer

1,06 g (2,77 mmol) α -N-Methacryloyl-N- ϵ -t-Butyloxycarbonyl-L-Lysin-t-butylester

4,5 mg (0,085 mmol) Benzyl-2-hydroxyethylcarbonotrithioat

0,6 mg 0,036 mmol) Azoisobutyronitril

6 mL Anisol

20h

Fällungsmittel: Cyclohexan

Blockcopolymer

195 mg Homopolymer

45 mg (0,18 mmol) Mono-N-boc-1,3-diaminopropanmethylemethacrylat

0,6 mg (0,0036 mmol) Azoisobutyronitril

2 mL Anisol

22,5 h

Fällungsmittel: Cyclohexan

Poly(ϵ -Lysin-Amin)

Homopolymer

1,03 g (3,14 mmol) α -N-Methacryloyl-N- ϵ -*t*-Butyloxycarbonyl-*L*-Lysin-*t*-butylester

7,4 mg (0,03 mmol) Benzyl-2-hydroxyethylcarbonotrithioat

1,2 mg (0,007 mmol) Azoisobutyronitril

4 mL Anisol

3,5 h

Fällungsmittel: Cyclohexan

Blockcopolymer

100 mg Homopolymer

23 mg (0,05 mmol) Mono-N-boc-1,3-diaminopropanmethylemethacrylat

0,1 mg (0,0006 mmol) Azoisobutyronitril

1 mL Dioxan

6.3.4 Synthesevorschriften für Polyion-Komplex-Mizellen mit Polyoxazolinhülle

6.3.4.1 Polymerisation von 2-Ethyl-2-oxazolin und 2-Isopropyl-2-oxazolin

Das Polymer ist von Dr. Jasmin Bühler synthetisiert worden.

In einem ausgeheiztem Schlenkrohr werden 5 g (0,044 mol) 2-Isopropyl-2-oxazolin, 6,57 g (0,066 mol) 2-Ethyl-2-oxazolin und 0,66 g (0,0022 mol) 6-Azido-1-hexyl-tosylat als Initiator in 22 mL trockenem Acetonitril gelöst. Die Lösung wird durch 3 Freeze-Pump-Zyklen von Sauerstoff befreit und für 48 Stunden bei 80 °C Ölbadtemperatur erhitzt. Die Polymerisation wird durch die Zugabe von 1,23 g (0,006 mol) Boc-Piperazin bei Raumtemperatur, welches vorher in 2 mL trockenem Acetonitril gelöst worden ist, beendet. Die Lösung wird über Nacht auf 80°C erhitzt. Die Aufreinigung erfolgte durch Flash-Chromatografie in Acetonitril 7:3 Methanol.

6.3.4.2 Reduktion der Azidbande von Poly(iPrOx+EtOx)

In einem 25 mL Zweihalskolben werden unter Argonatmosphäre 1,05 g Poly(iPrOx+EtOx) in 3 mL Methanol gelöst. 0,4 g Triphenylphosphin werden in jeweils 0,75 mL Methanol und THF gelöst und zugegeben. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei Lichtausschluss gerührt. 0,23 mL H₂O werden zugegeben und wiederum über Nacht gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert, das Lösungsmittel des Filtrats entfernt, das Produkt in Methanol gelöst und gegen Methanol mit einer Ausschlussgrenze von MWCO 1000 g/mol dialysiert. Das Produkt wird im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 570 mg (54% der Theorie)

6.3.4.3 Polymerisation von Lys-TFA-NCA mit Polyoxazolin als Makroinitiator in DMAc (SA137B01)

Das Lysin-TFA-NCA ist von Christian Hörtz synthetisiert worden.

In einem ausgeheiztem Schlenkrohr wird 183 mg NCA-Lysin-TFA und 160 mg Poly(iPrOx+EtOx) mit reduzierter Azidgruppe in 1,5 mL trockenem Dimethylacetamid gelöst. Die Lösung wird für 67h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in Cyclohexan gefällt. Die Aufreinigung erfolgt durch Dialyse gegen Methanol mit Amicon 30 kD.

Ausbeute: 38 mg (11% der Theorie)

6.3.4.4 Entschützen der Triflat-Schutzgruppe

7 mg Polymer werden in 1 mL Methanol gelöst und 430 µl 35% Hydrazinlösung zugegeben. Die Lösung wird über Nacht geschüttelt und anschließend das Lösungsmittel entfernt. Das Polymer wird aus Wasser gefriergetrocknet.

6.3.4.5 Polymerisation von EtOx mit Spermin als Abbruchreagenz

In einem ausgeheiztem Schlenkrohr wird unter Argonatmosphäre 1,57 g (15,8 mmol) 2-Ethyl-2-oxazolin und 30 mg (0,1 mmol) 6-Azido-1-hexyltosylat als Initiator in 2 mL trockenem Acetonitril gelöst. Die Lösung wird durch 3 Freeze-Pump-Zyklen von Sauerstoff befreit und für 48 Stunden bei 80 °C Ölbadtemperatur erhitzt. Die Polymerisation wird durch die Zugabe von 100 mg (0,2 mmol) Tri-Boc-Spermin bei Raumtemperatur, welches vorher in 300 µL trockenem Acetonitril gelöst worden ist, beendet. Die Lösung wird über Nacht auf 80°C erhitzt. Die Aufreinigung erfolgt durch Dialyse gegen Methanol mit SpectraPor MWCO 10 kD.

Das Polymer wird mit 35% Trifluoressigsäure in Dichlormethan entschützt, in kaltem Ether gefällt und aus Dioxan gefriergetrocknet.

Tri-Boc-Spermin ist von Wenqiang Chai synthetisiert worden. 6-Azido-1-hexyltosylat ist von Jasmin Bühler synthetisiert worden.

Ausbeute: 660 mg (90% der Theorie)

6.3.4.6 Vernetzen des Poly(EtOx)Spermin mit 1,3,5-Trisbrommethylbenzol

Zur Vernetzung von Poly(EtOx)Spermin mit 1,3,5 Trisbrommethylbenzol werden beide Komponenten in Nitromethan gelöst und in einem ausgeheiztem Schlenkrohr unter Argonatmosphäre zusammen gegeben. Nach 3 Freeze-Pump-Zyklen wird das Schlenkrohr für 80h auf 60°C Ölbadtemperatur erhitzt. Zur Messung der dynamischen Lichtstreuung wird das Nitromethan entfernt und die Probe in PBS-Puffer gelöst.

6.3.5 Synthesevorschriften für Funktionalisierung am Träger

6.3.5.1 Konjugation von Farbstoff

10,25 mg ($5,69 \cdot 10^{-9}$ mol) azidfunktionalisierte ELP-Bürste, synthetisiert von Désirée Weller, wird in 1mL PBS-Puffer gelöst und 60µL ($5,77 \cdot 10^{-8}$ mol) Alexa Fluor 488 DiBo Alkyne, in einer Konzentration von $2,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ in DMSO, zugegeben und über Nacht bei 4°C geschüttelt.

Die Aufreinigung erfolgt mittels der Biosäule P30.

6.3.5.2 Konjugation des Antikörpers

Zur Funktionalisierung des Antikörpers mit DiBO-NHS-Linker werden Antikörper aDEC205, welcher mit Alexa Fluor 647 gelabelt ist, und DiBO-NHS-Linker - im 25-fachen Überschuss - zusammengegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgt durch Zeba-Säulen.

50µl ($2,2 \cdot 10^{-10}$ M) aDEC205-DiBo wird im 8-fachen Überschuss zu 9,1 µl ($4,88 \cdot 10^{-6}$ M) ELP-Bürste, die mit Alexa Fluor 488 gelabelt ist, gegeben und 80h bei 4°C inkubiert und mittels Zeba-Säulen aufgereinigt. Freier Antikörper kann nicht abgetrennt werden.

6.3.5.3 Konjugation der CpG-Sequenz

Zur Funktionalisierung der ELP-Bürste mit CpG werden 4,88 µl (0,1 nmol/µl) DBCO funktionalisiertes CpG im 10-fachen Überschuss mit 10 µl ($4,88 \cdot 10^{-6}$ M) Farbstoff gelabelter ELP-Bürste eingesetzt und für 80h bei 20°C geschüttelt.

Zur Hybridisierung wird im 20-fachen Überschuss 1 µl ($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) des komplementären CpG-Strangs zugegeben, der mit Atto 425 gelabelt ist, bei 20°C für 24h inkubiert. Mittels Amicon 30 kD wird das überschüssige CpG abgetrennt.

6.4 Literaturverzeichnis Kapitel 6

- [1] A. Becker, W. Kohler, B. Muller, *Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics* **1995**, 99, 600-608.
- [2] J. Chadwick, M. Jones, A. E. Mercer, P. A. Stocks, S. A. Ward, B. K. Park, P. M. O'Neill, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, 18, 2586-2597.
- [3] J. T. Lai, D. Filla, R. Shea, *Macromolecules* **2002**, 35, 6754-6756.
- [4] J. Skey, R. K. O'Reilly, *Chem Commun* **2008**, 4183-4185.
- [5] M. Franz, *Diplomarbeit*, Mainz, **2010**.
- [6] S. Fixon-Owoo, F. Levasseur, K. Williams, T. N. Sabado, M. Lowe, M. Klose, A. J. Mercier, P. Fields, J. Atkinson, *Phytochemistry* **2003**, 63, 315-334.
- [7] H.-G. Batz, G. Franzmann, H. Ringsdorf, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1972**, 11, 1103-1104.
- [8] R. Dutta, M. D. Scott, M. K. Haldar, B. Ganguly, D. K. Srivastava, D. L. Friesner, S. Mallik, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 2007-2010.

7 Anhang

7.1 Abbkürzungsverzeichnis

PEG	Poly(ethylen glycol)
ODN	Oligonucleotid
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NCA	N-Carboxyanhydrid
TFA	Trifluoracetat
NMR	kernmagnetische Resonanzspektroskopie
RES	Retikuloendothelial System
DNA	Desoxyribonukleinsäure
siRNA	Small interfering RNA
CpG	2'-Deoxy(cytidine phosphate guanosine)
DMT	Dimethoxytrityl-Schutzgruppe
POx	Polyoxazolin
LCROP	Kationische ringöffnende Polymerisation
LCST	Lower critical solution temperature
FDA	US Food and Drug Administration
PVP	Poly(vinylpyridin)
PHPMA	Poly(N-(2-hydroxylpropyl)methacrylamid)
PDI	Polydispersitätsindex
RAFT	reversible Additions-Fragmentierungs-Kettenübertragungs-Polymerisation
AIBN	Azoisobutyronitril
CTA	Kettentransferagens
MALDI-TOF-MS	Matrix assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectroscopy
SEC	Size Exclusion Chromatografie
GPC	Gelpermeationschromatografie

M	Molmasse
V	Volumen
E	Energie
I	Kernspin
μ_1	Magnetische Kernmoment
H_0	Stärke des äußeren Magnetfeldes
δ_i	Chemische Verschiebung
v	Schwingungszustand
u	Wanderungsgeschwindigkeit
K_B	Beschleunigungskraft
e	Elementarladung
z	Ladungszahl
R_h	hydrodynamischer Radius
μ	elektrophoretische Mobilität
κ	reziproke Debey-Länge
R_g	Trägheitsradius
μm	Mikrometer
UV	Ultraviolett
t	Zeit
L	Länge
U	Spannung
EOF	elektroosmotische Fluss
APS	Ammoniumperoxodisulfat
TEMED	Tetramethyldiamin
λ	Wellenlänge
q	Streuvektor
n	Brechungsindex
c	Konzentration
k	Boltzmannkonstante
T	Temperatur
A	Virialkoeffizient
$R(\Theta)$	Raleigh-Ratio
D	Diffusionskoeffizient
FCS	Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie

N	Teilchenzahl
DBCO	Dibenzocyclooctin
PNIPAM	Poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid
CPG	controlled pore glass
boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
PIC	Polyion-Komplex-Mizelle
PLL	Poly-L-Lysin
PAA	Polyacrylsäure
DMAc	Dimethylacetamid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
ELP	elastine like peptide
DIBO	Dibenzocyclooctin
DEC205	Rezeptor für DEC205 Antikörper
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phospin
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMF	Dimethylformamid
MeOH	Methanol
CDCl ₃	Deuterochloroform
EPR	Enhanced Permeation and Retention"
$g_2(t)$	Autokorrelationsfunktion
k	Tausend
k,k'	Sprenzfaktor
TFA	Trifluoressigsäure
Θ	Streuwinkel

7.2 Zu Kapitel 4.1

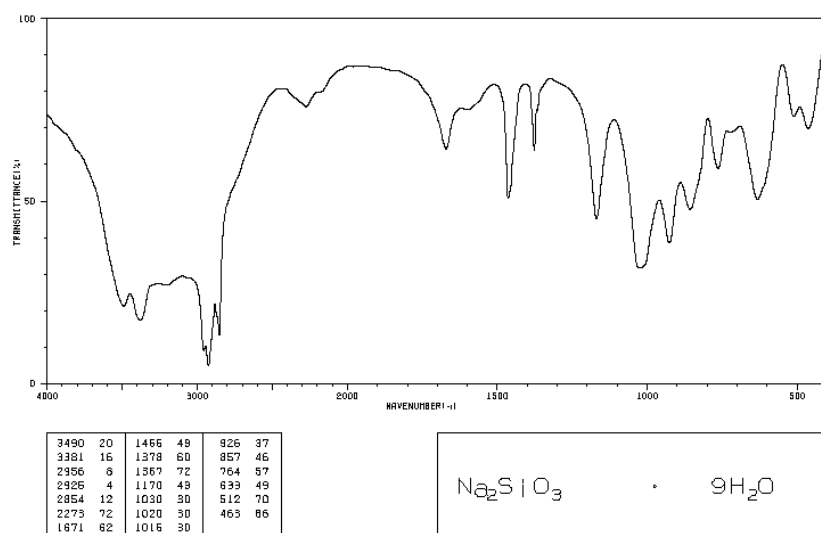


Abbildung 0.1: IR-Spektrum von Natrium Metasilikat Nonahydrat

http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi

7.3 zu Kapitel 4.2

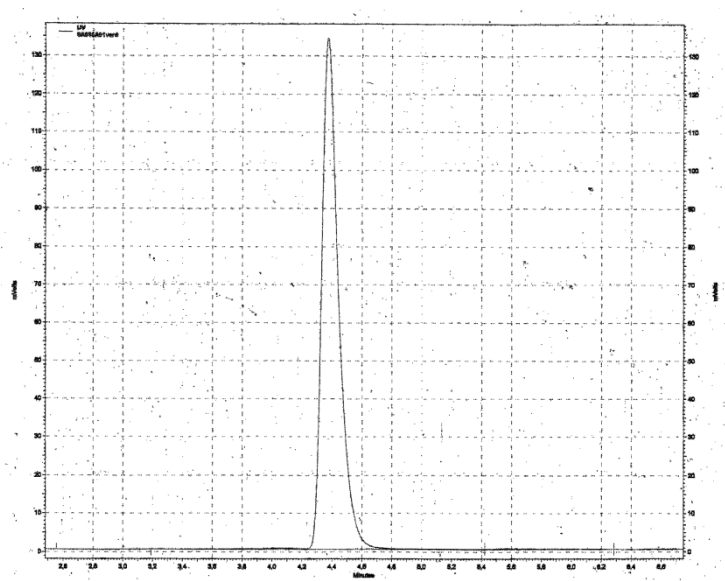


Abbildung 0.2: HPLC-Spektrum von α -Lysin-Monomer (Si60-Säule, 100% Ethylacetat; $0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 25°C)

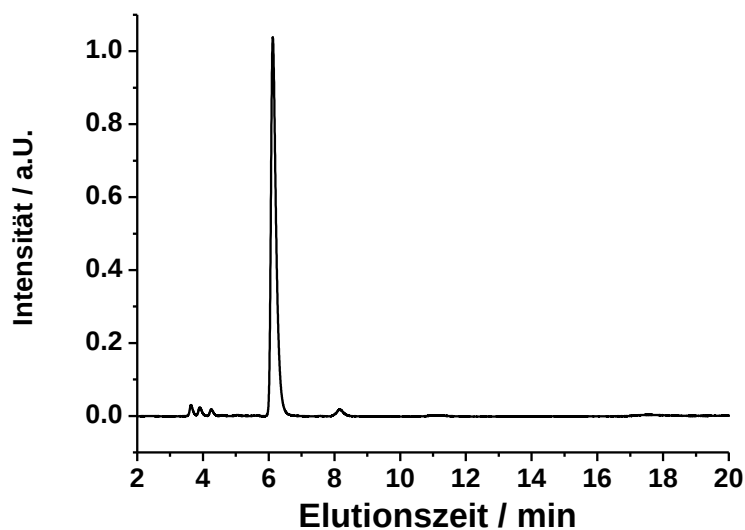


Abbildung 0.3: HPLC-Spektrum von ϵ -Lysin-Monomer (Si60-Säule, 100% Ethylacetat; $0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 25°C)

7.4 zu Kapitel 4.3

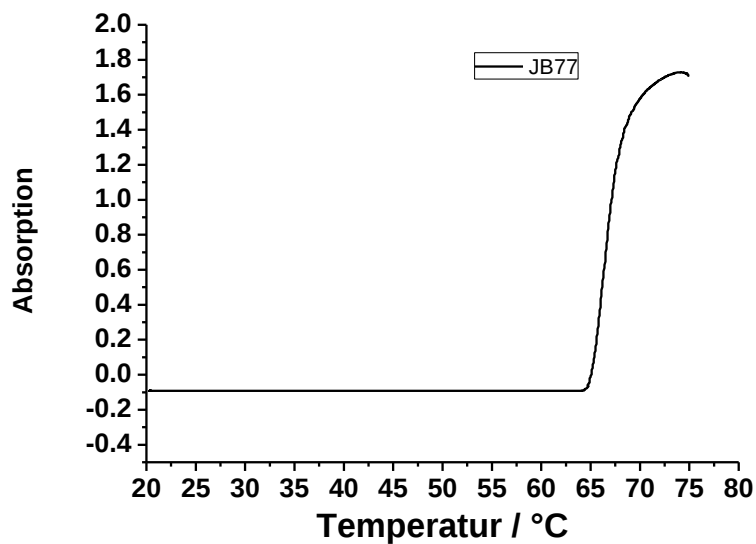


Abbildung 0.4: Trübungskurven-Messung des Poly(iPrOx+EtOx) in Wasser mit $c = 3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; Heizrate $0,5 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$

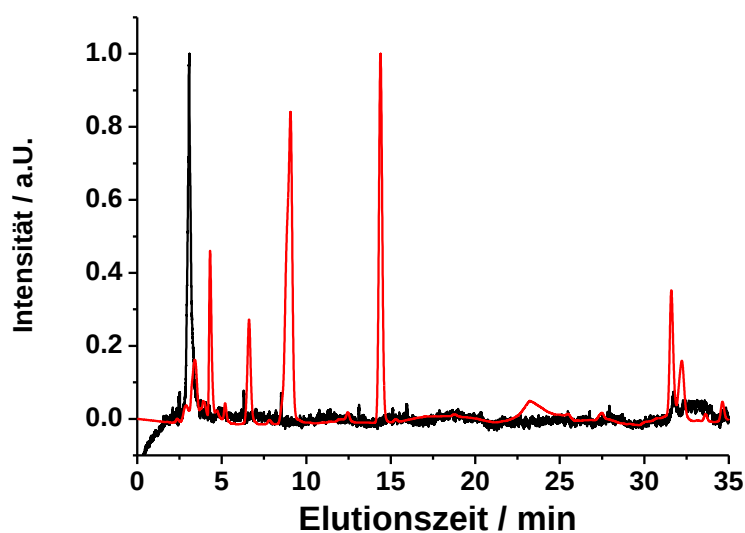


Abbildung 0.5: HPLC-Spektrum von Triboc-Spermin detektiert mit LS-Detektor (schwarz) und UV-Detektor bei $\lambda = 200 \text{ nm}$ (rot) (C8-Säule, Gradient in 40 min von $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN} = 50/50$ auf $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN} = 0/100$; $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$)