JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITÄT MAINZ

JG|U

Synthese, Charakterisierung und biologische Evaluation von Polypept(o)id-basierten mRNA- und DNA-Vakzinen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

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

Liya Heidary Fard
geboren in Teheran

Mainz, August 2021

1.Berichterstatter: [redacted]

2.Berichterstatter: [redacted]

Tag der mündlichen Prüfung: 25.01.2022

„Darin besteht das Wesen der Wissenschaft. Zuerst denkt man an etwas, das wahr sein könnte. Dann sieht man nach, ob es der Fall ist und im allgemeinen ist es nicht der Fall.“

Bertrand Russell

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2016 bis September 2020 unter der Betreuung von [redacted] am Institut für Organische Chemie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz (**D77**) angefertigt.

Für meine Familie

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei den Menschen bedanken, die mich stets während der Promotion begleitet und unterstützt haben. Ohne die Hilfe von Kollegen, Kooperationspartnern, Freunden und Familie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein erster und besonderer Dank gilt Herrn [redacted] für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, für die Betreuung und Unterstützung, sowie für die vielen hilfreichen Diskussionen.

Ein ganz besonderer Dank gilt [redacted] für die tolle Zusammenarbeit, Betreuung, seine stets freundliche Art mit einem offenen Ohr und natürlich auch für die Durchführung der biologischen Experimente in HEK- und DC-Zellen.

Ein weiterer Dank geht an [redacted] für ihre Zeit, die zahlreichen interessanten Diskussionen sowie die Cryo-TEM-Messungen.

Weiterhin möchte ich mich bei [redacted] für die FACS-Messungen, [redacted] für die DLS-Messungen und [redacted] für die Unterstützung bei der chemischen Synthese bedanken.

Und anschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie für den Rückhalt, die moralische Unterstützung und die Geduld in all den Jahren bedanken.

Zusammenfassung

In den letzten zwei Jahrzehnten kam es zu einer beträchtlichen Weiterentwicklung bei der Verwendung polymerbasierter Nanopartikel als Transportsysteme für Nukleinsäuren.

Im Gegensatz zu den natürlichen Transportern (Viren) können synthetische Transporter von einer viel größeren Anzahl an künstlichen Aminosäuren und Bausteinen profitieren. Über die gezielte Einführung verschiedener, funktioneller Gruppen sind diese „künstlichen Viren“ in der Lage auf die Veränderungen der biologischen Umgebung zu reagieren.

Die Eigenschaften der Untereinheiten wie Polymer-Größe, -Gesamtladung, -Anzahl, -Sequenz, und -Topologie (lineare, verzweigte, hyperverzweigte oder dendritische Struktur und Bindungsstellen für zusätzliche funktionelle Gruppen) spielen eine entscheidende Rolle für die Transfektionseffizienz. Die präzise und reproduzierbare Synthese eines solchen Multiblock-copolymers mit definierten Sequenzen lässt sich über die „Ringöffnende Polymerisation“ (ROP) von *N*-Carboxyanhydriden (NCA) realisieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikante Anzahl und Vielfalt an sequenzdefinierten Triblockcopolymeren aus bioabbaubaren Monomeren (Aminosäuren) hergestellt, mit dem Ziel, den Nukleinsäure-Transport und deren Bioaktivität zu verbessern. Um die extrazellulären und intrazellulären pharmakologischen Barrieren für eine bessere systemische Anwendung zu überwinden, wurden Funktionsbausteine wie Abschirmungsdomäne, Targeting-Liganden, hydrophobe Domäne und endosomolytische Eigenschaften in die Polyplexe eingebaut. Die resultierenden Kern-Schale-Strukturen, hervorgerufen durch die Komplexierung der pDNA und/oder mRNA, wurde zur Transfektion von Immunzellen (humane T-Zellen und dendritische Zellen) eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass Aspekte wie der chemische Aufbau der Polymere, die Eigenschaften einzelner Blöcke, die Art (nicht-kovalent, kovalent) und Weise (Redox- oder pH-sensible Gruppen o.ä.), wie „Zellpenetrierende Peptide“ (CPPs) an einem System angebracht werden, der Zell- und Nukleinsäure-Typ, die Internalisierungswege der Polyplexe und in welcher Art von Zellkompartiment sich das Partikel schlussendlich befindet eine große Rolle bei der Transfektionseffizienz der Polyplexe spielen. Darüber hinaus trägt die genaue Durchführung der Transfektion-Assays ebenfalls einen entscheidenden Teil bei.

Abstract

The last two decades have produced a considerable amount of advanced applicability for the usage of polymer based nano particles as transportation systems for nucleic acids.

In contrast to the transporting systems of nature (viruses), artificially constructed transporters may profit from a large number of synthesized amino acids and building blocks in general.

The properties of each sub-unit play a vital role for the overall efficacy of transfection, among which are the polymer's size, total charge, quantity, sequence, and topology (such as linear, branched, hyper-branched or dendritic structure motifs, as well as binding sites for additional functional groups). By means of a "ring-opening polymerization"-reaction (ROP) of *N*-Carboxyanhydrides, multi block co-polymers with defined sequences can be realized in a precise and reproducible fashion.

The work present-at-hand describes the syntheses of a significant number of triblock co-poylmers with a large variety considering the sequences. They were prepared from bio-degradable monomers (amino acids), thus serving the purpose to improve both nucleic acid transportation as well as bioactivity. In order to surpass any extra-cellular and intra-cellular pharmacological barriers to the polyplexes for the sake of gaining advanced systemic applicability, building blocks with inherent functionality were introduced, among which are shielding domains, targeting ligands, hydrophobic domains and domains which allow for endosomolytic properties. By complexing of pDNA and/or mRNA with the polyplex, core-shell-structures are obtained which are further being used in the transfection of immune cells (humane T cells and dendritic cells).

It turned out, that certain aspects regarding polyplexes play a crucial role for their biological activity and transfection efficacy, such as the chemical structure of the polymers, the properties of individual blocks, the way that "cell-penetrating peptides" (CPPs) are attached to the polyplex system (non-covalent vs. covalent bonding; redox-sensitive or pH-sensitive groups, etc.), the cell type and the type of nucleic acid being used, the internalization pathway chosen upon the polyplex, and the type of cell compartment in which the polyplex eventually wanders in. Furthermore, it was shown that the exact procedure which ought to be followed for successful transfection assays plays another vital role.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis XV

1 Einleitung 1

1.1 Nanomaterialien–Therapeutische Formulierungen 1

1.2 Nanopartikel-Transfektion und intrazellulärer Transport 3

1.3 Polypeptide 7

1.4 Polypeptoide 9

1.4.1 Polysarkosin — eine Alternative zu PEG 10

1.5 Polypept(o)ide 12

1.6 NCA-Synthese und Polymerisation 13

1.7 Polyplex-Design und -Entwicklung 16

2 Zielsetzung 19

3 Allgemeiner Teil 23

3.1 Initiator-Synthese 23

3.2 NCA-Synthese 24

3.2.1 Sarkosin-NCA 25

3.2.2 L-Homocystein-NCA 25

3.2.3 L-Lysin(BOC)-NCA 29

3.3 Polymersynthese 30

3.3.1 Polymerisationsmechanismus 30

3.4 Polypept(o)ide 31

3.4.1 Miktoarm-Diblockcopolypept(o)ide 31

3.4.2 Lineare Triblöcke 35

3.4.3 Miktoarm-Triblöcke 42

3.4.4 Lipopolypept(o)ide 44

3.5 Nukleinsäure-Komplexierung zum Polyplex 48

3.5.1 Polyplex-Bildung und Charakterisierung 51

3.5.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz der Polyplexe 66

3.6 Diskussion 84

4 Zusammenfassung und Ausblick 91

5 Experimenteller Teil 93

5.1 Allgemeines und Messgeräte 93

5.1.1 Lösungsmittel und Chemikalien 93

5.1.2 NMR-Spektroskopie 93

5.1.3 Gel-Permeations-Chromatographie 93

5.1.4 Schmelzpunktbereiche 94

5.1.5 IR-Spektroskopie 94

5.1.6 Dialyse 94
5.1.7 Zetasizer 94
5.1.8 Vernetzer-Sequenz 94
5.1.9 Agarose-Gelelektrophorese 95
5.1.10 Nukleinsäuren 95
5.1.11 Luciferase-Assay 95
5.1.12 Durchflusscytometrie (FACS-Messungen) 95
5.2 Synthese der Funktionalisierungseinheiten 97
5.2.1 3-Azido-1-aminopropan 97
5.2.2 Dioctadecyl-NHS-Ester 97
5.2.3 Trimannose-DBCO 98
5.3 NCA-Synthese 98
5.3.1 Sarkosin-*N*-Carboxyanhydrid 98
5.3.2 Natriumethansulfinat 99
5.3.3 L-Homocystein 99
5.3.4 *S*-Ethylsulfonyl-L-Homocystein 100
5.3.5 *S*-Ethylsulfonyl-L-Homocystein-*N*-Carboxyanhydrid 100
5.3.6 $^{\varepsilon}$N-*t*-Butyloxycarbonyl-L-Lysin-*N*-Carboxyanhydrid 101
5.4 Synthese der Polypept(o)ide 101
5.4.1 Miktoarm Diblöcke 102
5.4.2 Lineare Triblöcke 103
5.4.3 Miktoarm Triblöcke 106
5.4.4 Lipopolypept(o)ide 108
5.5 Herstellung der Polyplexe 110
5.5.1 Polyplex Modifikation 111

6 Literaturverzeichnis 113

7 Anhang 119

7.1 NMR-Spektren 119
7.2 GPC-Spektren 135

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
abs.	absolut
ah CD3	anti-Human CD3
AK	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zellen
Äq.	Äquivalente
BA_{18}	C_{18}-Bisalkyl
BOC	*t*-Butyloxycarbonyl
br	breit
CD	Differenzierungscluster
CuAAC	Kupfer(I)katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
Cryo-TEM	Cryo-Transmissionselektronenmikroskopie
CTL	Cytotoxische T-Lymphozyten
CPP	zellpenetrierende Peptide
Cys	*S*-Ethylsulfonyl-L-Cystein
Đ	Polydispersitätsindex (PDI)
d	Dublett
DC	Dendritische Zellen
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (CD 209)
DLS	dynamische Lichtstreuung
δ	Chemische Verschiebung
DIPEA	Diisopropylethylamin, Hünig Base
DMF	*N,N*-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPE	1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine
DOSY	Diffusion-ordered NMR Spectroscopy
et al.	und Mitarbeiter
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
Fluc	Firefly-Luciferase

GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
Hcy	L-Homocystein
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFIP	Hexafluorisopropanol
HPMA	*N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid
IR	Infrarotspektroskopie
IVT	*in vitro*-transkribiert
J	Kopplungskonstante
Lit.	Literatur
Lysin(BOC)	$^{\varepsilon}$N-*t*-Butyloxycarbonyl-Lysin
m	Multiplett
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
n. a.	nicht angegeben
N/P	Verhältnis von Stickstoffatomen des kationischen Polymers zu Phosphoratomen der DNA
NCA	α-Aminosäure-*N*-Carboxyanhydrid
NHS	*N*-Hydroxysuccinimid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance)
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Peripheral Blood Mononuclear Cell)
pCys	Poly(*S*-Ethylsulfonyl-L-Cystein)
PEG	Polyethylenglykol
pHcy	Poly(*S*-Ethylsulfonyl-L-Homocystein)
PEI	Polyethylenimin
pLys	Poly-L-Lysin
PMMA	Polymethylmethacrylat
PRRs	Pattern Recognition Receptors
pSar	Polysarkosin
r.t.	Raumtemperatur
ROP	Ringöffnungspolymerisation

RLU	Relative Light Units
Rluc	Renilla-Luciferase
s	Singulett
SPAAC	Spannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition (Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition)
SPDP	Succinimidyl 3-(2-pyridyldithiol)propionat
t	Triplett
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TLR	toll-like Rezeptor
WW	Wechselwirkung

1 Einleitung

1.1 Nanomaterialien–Therapeutische Formulierungen

Die Behandlung einer Vielzahl von Krankheiten und die Entwicklung verbesserter Impfstoffe profitieren beide von einem effizienteren therapeutischen Transport. Nanomaterialien sind in der Lage den konventionellen Arzneimitteltransport zu transformieren, indem sie mögliche Nebenwirkungen durch gezielten Transport verringern, die Löslichkeit schwer zu verabreichender Arzneimittel verbessern und eine kontrollierte Freisetzung von Therapeutika ermöglichen. Nanomaterialien haben somit das Potenzial empfindliche APIs (aktiver pharmazeutischer Inhaltsstoff), wie Nukleinsäuren und Proteine durch Einkapselung zu schützen.[1]

Nukleinsäuren weisen eine geringe Stabilität gegenüber chemischen und enzymatischen Abbauvorgängen auf. Außerdem trägt die hydrophile Natur des Zucker-Phosphat-Rückgrats und die dort akkumulierte negative Ladung zu einer erheblichen Einschränkung ihres Transports durch die Zellmembran bei.[2] Für eine erfolgreiche Gentherapie ist daher eine schützende Komplexierung der Nukleinsäuren mit einem geeigneten Transportsystem erforderlich.

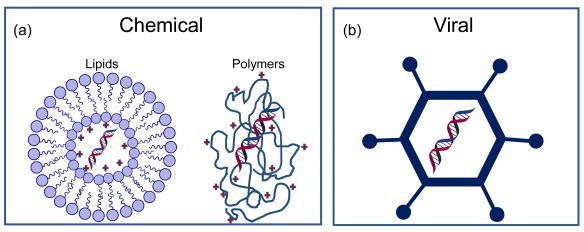


Abbildung 1: Überblick zu den Nukleinsäure-Transportsystemen: chemisch (a), viral (b): Chemische Systeme beinhalten entweder kationische Lipide oder Polymere, welche negativ geladene Nukleinsäuren komplexieren können (a); in biologischen Systemen werden deaktivierte (nicht pathogene) virale Vektoren verwendet (b).

Die Viren sind die besten Gen-Transportsysteme. Sie haben sich im Laufe der Evolution darauf spezialisiert ihr Genom (DNA oder RNA) in die Wirtszelle zu transportieren.[3] Diese Eigenschaft machten sich Forscher zunutze und entwickelten deaktivierte und nicht-replizierfähige virale Vektoren, sogenannte „virus-like particles“ (VLP) als Transportvektoren für die Gentherapie. Sie umfassen mehrere funktionelle Einheiten wie die Nukleinsäurebindungseinheiten, stabilisierende und schützende Einheiten, Abschirmungs-Domänen, Zielliganden, endosomolytische oder membranreaktive Einheiten und Kernlokalisierungssignale.[4] Die Stabilisierungseinheiten umfassen hydrophobe Domänen (z. B. Fettsäuren oder Tyrosin) sowie kovalente Vernetzungen innerhalb des Partikelkerns (z.B. Disulfid-Bindungen).[5]

Adenoviren und Retroviren haben zwar auf Grund ihrer intrinsischen Eigenschaften eine hohe Transfektionseffizienz, besitzen aber Nachteile wie Immunogenität, limitierte Ladungskapazität und scale up-Probleme. Dementsprechend besteht ein großes Interesse an alternativen nicht-viralen Vektoren.[6]

Da Nukleinsäuren (pDNA, mRNA, siRNA usw.) alle vergleichbaren chemischen Komponenten (wie Ribose, Nukleinbasen und Phosphat-Gruppe) besitzen, welche für ihre Hydrophilie und negative Ladung verantwortlich sind, werden für den Gen-Transport meistens Polykationen in der Funktion des nicht-viralen Vektors verwendet. Die synthetische Polykationen sind in der Regel Amin-reiche Strukturen, aufgebaut aus Lipiden oder Polymeren, mit pK_a-Werten, die bei physiologischem pH als Kationen vorliegen. Derartige Polykationen komplexieren die negativ geladene Nukleinsäure zu nanogroßen Polymer-Nukleinsäure-Komplexen, auch bekannt als „Polyplexe“.[7] Das Ausmaß der Nukleinsäure-Komplexierung wird als Mischungsverhältnis angegeben, welches das Verhältnis von N zu P (N/P-Verhältnis) darstellt, wobei N für das Amin im Polykation und P für das Phosphat in der Nukleinsäure stehen.[6, 8]

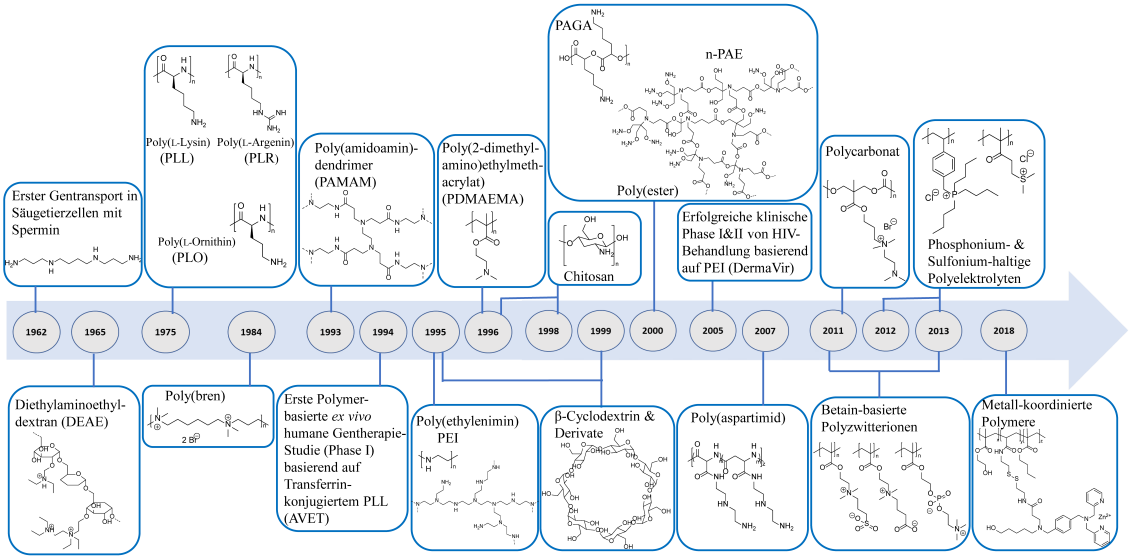


Abbildung 2: Polykationen und Polymere, die in den letzten 50 Jahren für den Gentransport verwendet wurden.

Die modernen Nanopartikel sollen im Wesentlichen multifunktionale Systeme sein, die aus biologisch abbaubaren, nicht-toxischen Komponenten bestehen. Sie sollen einerseits Formulierungen mit hoher Lagerstabilität und andererseits sehr dynamisch im Transportweg sein. Außerdem sollen sie in der Lage sein, wie Viren umgebungsspezifische strukturelle Änderungen, die für eine optimale Transportfunktionen erforderlich sind, durchzumachen.

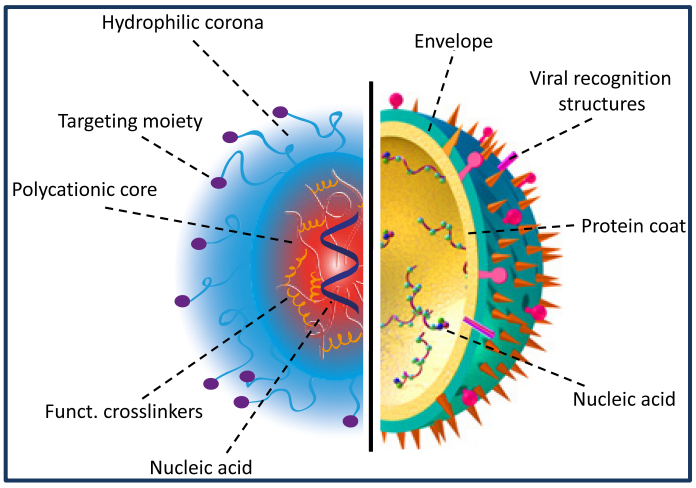


Abbildung 3: Schematischer Aufbau Polyplex *vs.* Virus. Beide besitzen eine Kern-Schale-Struktur mit Peptid-basierter Hülle und mit komplexierter Nukleinsäure im Kern. Auf der äußeren Schale befinden sich Targeting-Einheiten zur gezielten und leichteren Zellaufnahme.

1.2 Nanopartikel-Transfektion und intrazellulärer Transport

Das Einbringen von zellfremden genetischen Materialen, wie DNA oder RNA, in eukaryotischen Zellen wird als Transfektion bezeichnet.[9-10] Grundsätzlich wird die Aufnahme von kationischen Polyplexen durch den Prozess der Endocytose beschrieben.[8]

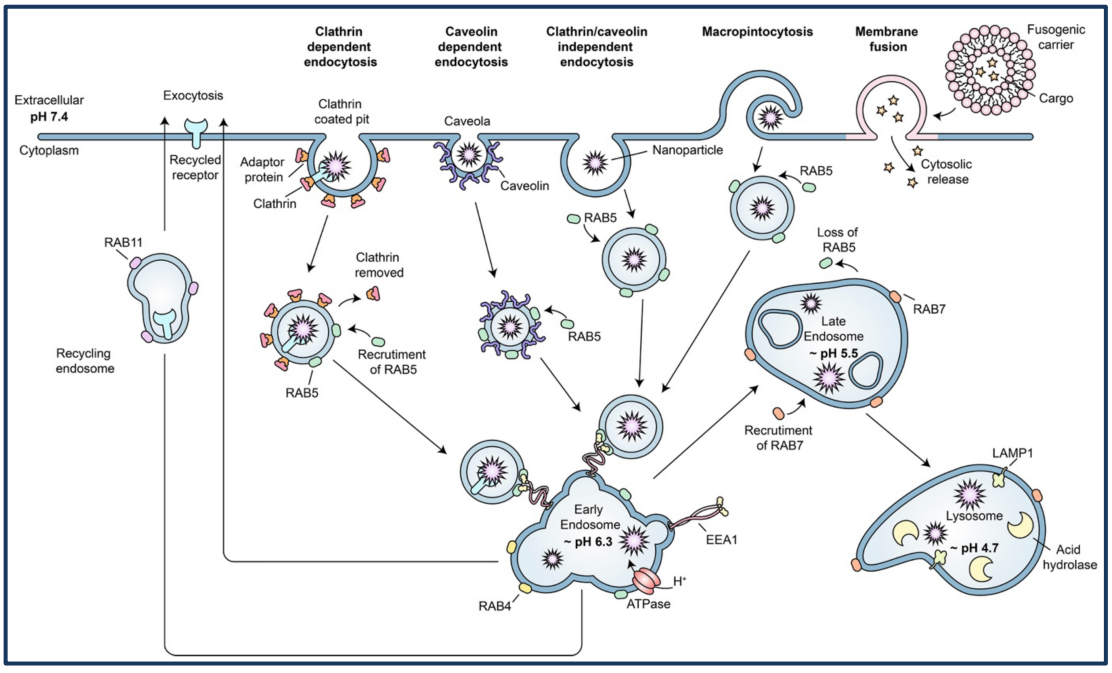


Abbildung 4: Aufnahme-Mechanismen der Polyplexe in die Zelle. Die Partikel werden durch Clathrin-, Caveolin-vermittelte oder Clathrin/Caveolin-unabhängige Endocytose aufgenommen. Endocytose kann durch alternative Aufnahme-Mechanismen wie Membranfusion oder direkte Translokation durch die Zellmembran vermieden werden.[1]

Die Säugetierzellmembran besteht überwiegend aus neutralen Lipiden einschließlich Phosphoglyceriden, Sphingolipiden und Sterolen (meist Cholesterin), die zusammen die typische

Phospholipiddoppelschichtstruktur bilden. Die Affinität kationischer Polyplexe zur Zellmembran wird meist durch Oberflächen-Glykoproteine, d.h. anionische Proteoglykane oder Rezeptoren (falls diese vorhanden sind, wie z.B. Transferrin oder Folsäure etc.) erleichtert.

Nach der Bindung an die Plasmamembran führt die Invagination der Plasmamembran zum Einschluss des Polyplexes in den membrangebundenen Vesikeln. Sowohl Clathrin-abhängige als auch Clathrin-unabhängige Endocytose führen zur Lokalisierung der Polyplexe in den frühen Endosomen. In diesen Kompartimenten fällt der pH-Wert aufgrund der Aktivität der membranständigen vakuolären ATPasen (V-ATPase, Protonenpumpe) schnell von neutralem pH auf niedrigere pH-Werte zwischen 6.5 und 6.0. Von dort wird der Inhalt recycelt und durch Exozytose wieder in das extrazelluläre Milieu zurückgeführt. Andernfalls wird der Inhalt im lysosomalen Abbauweg abgebaut. Im letzteren Fall reifen die Endosomen zu späten Endosomen, bei denen die Wirkung der membranständigen V-ATPasen zu einer weiteren Absenkung des pH-Wertes auf ca. 5.5 bis 5.0 führt. Späte Endosomen können außerdem mit Lysosomen fusionieren, die ein stark saures Milieu von pH 5.0 bis 4.5 aufweisen, welche optimalen Bedingungen für die Aktivität von degradierenden Enzymen darstellt (lysosomalen Hydrolasen).[8]

Das Schicksal der Polyplexe und die damit verbundene Transfektionseffizienz hängt stark von der Transportroute ab,[11-13] welche durch physikochemische Eigenschaften der Polyplexe[14-15] und des Zelltyps[16] beeinflusst werden.[17-19]

GABRIELSON und PACK schlugen vor, dass eine PEI-vermittelte Transfektion nur dann hocheffizient sei, wenn sie über den Caveolae-abhängigen Weg aufgenommen werden würden. Wenn sie aber über den Clathrin-abhängigen Weg aufgenommen werden würden, würden die Partikel schnell zum Abbau zu den Lysosomen transportiert werden.[20] REJMAN *et al.* gelangte zu einem ähnlichen Ergebnis, indem er zeigte, dass Clathrin-abhängige internalisierte Partikel zu Lysosomen transportiert werden. Sie fanden auch heraus, dass die Hemmung des Caveolae-abhängigen Weges, mittels Filipin und Genistein, die Transfektion der PEI-Polyplexe vollständig stoppte, während die Hemmung des Clathrin-abhängigen Weges mit Chlorpromazin keine Wirkung zeigte.[1, 21]

Polyplexe sollen idealerweise an einem frühen Stadium der Endocytose in einem grundlegenden Schritt, der als „*endosomal escape*“ bekannt ist, aus dem Vesikel herauskommen können, bevor es zu einer Exozytose oder einem enzymatischen Abbau des Cargos kommt.[8] Dieses kritische Ereignis wird allgemein als geschwindigkeitsbestimmender Schritt oder „Engpass“ der intrazellulären Auslieferung von Therapeutika unter Verwendung von Nanopartikeln angesehen.[6] Der Mechanismus, durch den der *endosomal escape* erfolgt, ist immer noch sehr umstritten. In der Literatur herrscht gegenwärtig keine Einigkeit zu Transportmechanismen durch die Endosomenmembran. Es gibt eine Reihe von Methoden, die eingesetzt werden können, um den *endosomal escape* zu induzieren.[22] Nachfolgend werden drei prominente Mechanismen vorgestellt. Es ist jedoch denkbar, dass ein Zusammenspiel mehrerer Mechanismen für einen effizienten *endosomal escape* des API erforderlich sein könnte.[1-2, 8]

1) proton sponge

Eine übliche Strategie zur Induktion des *endosomal escape* ist der sog. „*proton sponge*“-Effekt (Protonenschwamm-Effekt), der auf der Pufferwirkung von Polymeren mit einem pK_a im physiologisch relevanten Bereich basiert. Dieser Mechanismus wird häufig polykationischen Materialien wie Polyethylenimin (PEI)[12] und Poly(amidoamin) (PAMAM)-Dendrimeren[23] zugeordnet, jedoch wird dieser noch immer vehement diskutiert.[24-25] Während das Polymer protoniert wird, sollen Protonen kontinuierlich in die Kompartimente (Endosomen/Lysosomen) gepumpt werden, was den Transport von Chlorid-Ionen fördern soll, um somit das Ladungsgleichgewischt aufrechtzuerhalten. Die Erhöhung der Ionenkonzentration verursacht eine osmotische Schwellung und ein anschließendes Aufplatzen des Endosoms.[2]

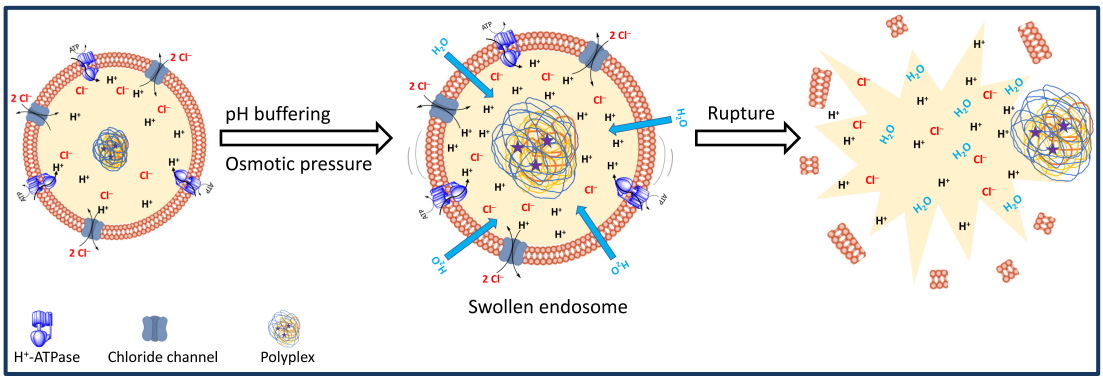


Abbildung 5: Proton sponge-Effekt- Polymere, die zur Pufferung fähig sind, werden durch die Protonen, die von den ATPasen in den Endosomen gepumpt werden, protoniert. Zusätzlich werden Chlorid-Ionen in das Endosom gepumpt. Diesem Konzentrationsgradienten wird durch den Eintritt von Wasser entgegengewirkt (Verdünnung), was zur Schwellung des Endolysosoms und schließlich zum Aufplatzen des Endosoms und zur Freigabe von Träger und Cargo führt.

Dennoch liefert diese Theorie keine allumfassende Erklärung für den *endosomal escape*. Nicht alle Polymere, die im Bereich von pH 5 – 7 puffern, können einen *endosomal escape* durch den *proton spong*-Effekt induzieren.[26] Ein verwandter Mechanismus, der von BATTAGLIA *et al.* vorgeschlagen wurde, beschreibt die Rolle des osmotischen Drucks bei der Zerlegung von Nanopartikeln im Endosom.[27] Bei diesem Mechanismus wird anstelle der Pufferkapazität des Polymers, die den osmotischen Druck und die anschließende Lyse induziert, vorgeschlagen, dass die Zerlegung eines Partikels in viele Polymeruntereinheiten einen osmotischen Schock verursacht, der das Endosom aufbricht.[1]

Es wird vermutet, dass Polyplexe mit sekundären Amin-Gruppen (wie z.B. lineares PEI) durch eine Kombination des *proton sponge*-Effekts und Polyplex-Expansion-Effekts letztlich aus dem Endosom entkommen können.[28] Lineares PEI absorbiert Protonen während des Reifungsprozesses des Endosoms, was mit einem Anstieg des osmotischen Druckes innerhalb des Endosoms einhergeht. Gleichzeitig bewirkt die Ladungsabstoßung zwischen den protonierten Aminen die Expansion von PEI-Polyplexen Die losen PEI-Polyplexe interagieren und destabilisieren die Endosomenembran, womit das Entkommen der Polyplexe aus den Endosomen gefördert wird.[2]

Es ist an dieser Stelle wichtig, die einzelnen Stufen der toxischen Nebenwirkungen von *endosomal scape* zu erwägen. Lysosomen spielen eine wichtige Rolle bei der Apoptose. Die unkontrollierte Freisetzung von Cathepsin sowie Calciumionen kann die Viabilität der Zellen erheblich beeinträchtigen.[29]

2) Membranfusion

In der Natur können umhüllte Viren durch Fusion der Virushülle mit der Endosomenmembran ein *endosomal escape* induzieren, wodurch das virale Kapsid in das Cytoplasma eindringen kann. In ähnlicher Weise wird für Partikel aus Lipiden oder amphiphilen Materialien der Mechanismus des *endosomal escape* vorgeschlagen. Die Phospholipid-Doppelschicht eines Liposoms kann mit der Zellmembran fusionieren, die Struktur des Liposoms invertieren und den therapeutischen Cargo an das Cytoplasma abgeben.[1, 22]

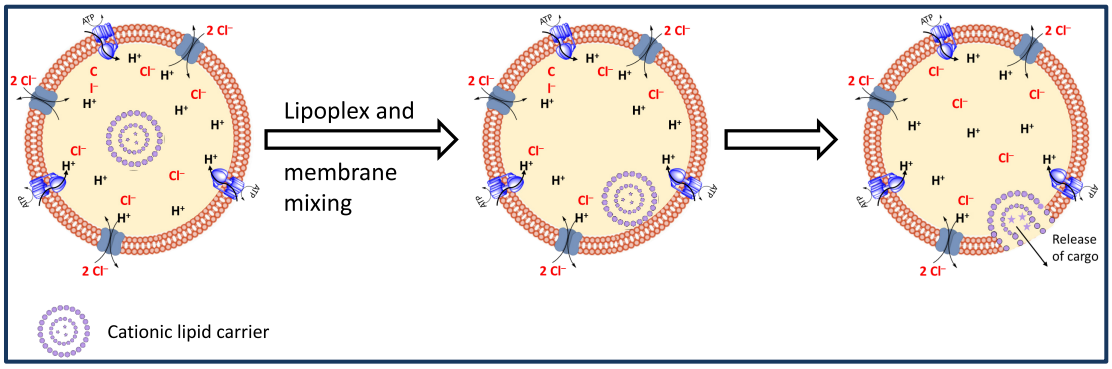


Abbildung 6: Membranfusion – anionische Lipide ordnen sich auf der cytoplasmatischen Seite des Endosoms neu an, um mit kationischen Lipiden des Trägers ein neutrales Ionenpaar zu bilden, dass die Membran destabilisiert. Die Membranen verschmelzen und der Cargo wird es ermöglicht in das Cytosol zu diffundieren.

3) Membranperforation zur Porenbildung

Die Destabilisierung der endosomalen Membran kann es den therapeutischen Cargo ermöglichen, in höherem Umfang durch Löcher bzw. Poren aus dem Endosom selbst herauszudiffundieren. Endosomale Perforationen können durch die direkte Wechselwirkung von Polymeren oder Peptiden mit der endosomalen Membran oder über Peptide, die sich quer durch die Membran selbstorganisieren, um definierte Poren zu erzeugen, auftreten. Diese Transmembranporen sind typischerweise ca. 1 nm groß, was im Allgemeinen ihre Nützlichkeit bei einer effizienten Freisetzung des Cargos einschränkt. Das entwickelte Peptid GALA ist jedoch in der Lage, Moleküle bis zu 5000 Da freizusetzen.[1, 30]

Endosomale Lyse und Membranfusion sind Vorgänge, die das grundlegende Potenzial besitzen, den Cargo unabhängig von dessen Größe in das Cytosol zu liefern, während die Membranperforation und die Porenbildung von Natur aus Vorgängen mit Grenzen in Bezug auf das Molekulargewicht des zu internierenden Cargos darstellen, welche über eine derartig destabilisierte Membran diffundieren können. Darüber hinaus kann die Art und Weise, in welcher der Cargo eingekapselt oder am Transportsystem befestigt ist, einen Einfluss auf das therapeutische Ergebnis haben. Zum Beispiel kann die Konjugation des Cargos an die

Komponente des Partikels, die für die Membranfusion verantwortlich ist, zu adversen und somit zu kontraproduktiven Eigenschaften führen. Es kann im Extremfall sogar zu einer erhöhten Lokalisierung in Endosomen und Lysosomen führen.[1, 28]

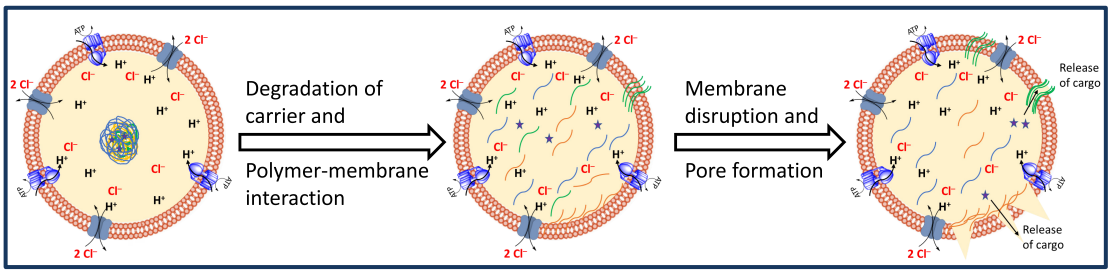


Abbildung 7: Porenbildung – Bestimmte Peptide können sich selbst in der Lipidmembran organisieren und Poren bilden, die es niedermolekularen Therapeutika ermöglichen, aus dem Kompartiment zu entweichen. Diese Membranperforations –Polymere oder Peptide interagieren direkt mit der endosomalen Membran und verursachen eine Störung, wodurch die Ladung entweichen kann.

Fusogene Peptide, die zusätzlich pH-empfindliche Aminosäuren (wie z.B. Glu (E) und His (H)) enthalten, reagieren beim pH-Abfall im Endosom mit einem Konformationswechsel in der Sekundärstruktur, nämlich von der Radom Coil zur α-Helix.[28] Die entstandenen α-helikalen Peptide interagieren und destabilisieren daraufhin die Endosomenmembran und bewirken hierüber den *endosomal escape* von Nukleinsäuren.[2, 30]

Ein repräsentatives Beispiel fusogener Peptide ist HA2, welches vom Hämagglutinin des Influenzavirus abgeleitet ist (Sequenz: GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG). Inspiriert von HA2 wurden bereits mehrere Mutationen wie INF7 (GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYG) und GALA (WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA) entwickelt.[1-2, 28]

1.3 Polypeptide

Polypeptide als eine Art biokompatibler und biologisch abbaubarer Polymere haben die Aufmerksamkeit von Wissenschaftlern als vielversprechende Biomaterialien auf sich gezogen.[31] Eine breite Palette von Polypeptiden, bestehend aus verschiedenen *α*-Aminosäuren als Struktureinheiten, besitzen mehrere potenzielle Vorteile für biomedizinische Anwendungen, wie: **(I)** Vielfalt der chemischen Struktur. Verschiedene Polypeptide können z.B. durch Ringöffnungspolymerisation (ROP) aus verschiedenen *α*-Aminosäure-*N*-Carboxyanhydriden (NCAs) synthetisiert und mit funktionellen Gruppen und bioaktiven Mitteln modifiziert werden, um die praktischen Anforderungen zu erfüllen.[32-35] **(II)** Verschiedene Maßstäbe von Systemen.[36] Durch Einstellung der Zusammensetzung, Sequenz und Polymerisationsgrad von Polypeptiden, können diese durch verschiedene Techniken in nano-, mikro- und makrogroßen Systemen konstruiert werden. **(III)** Hervorragende Biokompatibilität und biologische Abbaubarkeit.[37-38] Polypeptide besitzen als Vorteil die Biokompatibilität durch deren *α*-Aminosäure-Komponenten und den kontrollierten biologischen Abbau *in vivo* in Gegenwart spezifischer Enzyme. Deshalb wurde eine breite Palette von Polypeptiden für biologische, medizinische und pharmazeutische Anwendungen wie beispielweise zur kontrollierten

Arzneimittelfreisetzung, zum gezielten Gentransport, zur Theranostik und sogar zur regenerativen Medizin entworfen.[39]

Polypeptide sind in der Lage durch ihren inhärenten Faltungsvorgang sekundäre Konformationen über Strukturmotive wie z.B. α-Helix, β-Faltblatt oder Gemische davon einzunehmen, um eine dreidimensionale Ordnung herbeizuführen.[33-34, 40]

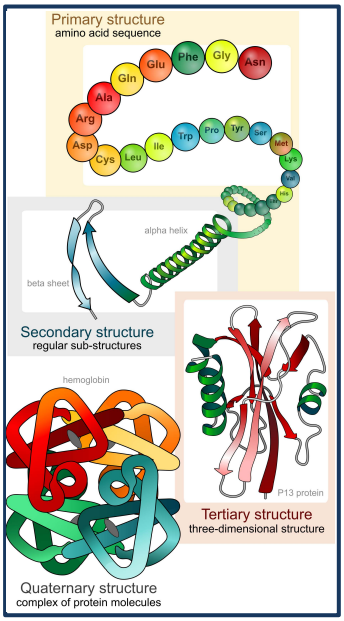


Abbildung 8: Von der Primärstruktur (Art, Anzahl, Abfolge) über die Sekundärstrukturen (α-Helix, β-Faltblatt) zur Tertiärstruktur (räumliche Struktur aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen, kovalenter Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte). Die Quartärstruktur beschreibt die räumliche Anordnung mehrerer Tertiärstrukturen. (z.B.: Hämoglobin ist ein Tetramer dessen Quartärstruktur aus vier Globin-Untereinheiten besteht. [41]

Diese geordneten Sekundärstrukturen entstehen durch die Art der Seitenkette des Polypeptids, den zunehmenden Grad der Polymerisation und Milieu-Einflüsse, mit Stabilisierung der verschiedenen Sekundärstrukturen, die durch intra- und intermolekulare Wasserstoffbrücken-Bindungen sowie hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen erreicht wird. Die Sekundärstrukturen in Polypeptiden ist eine wichtige Determinante für physikalisch-chemische Eigenschaften, da es sich stark auf die Biomaterialmerkmale auswirkt. Die Neigung bestimmter Aminosäurereste, α-helikale oder β-Faltblatt-Konformation anzunehmen, führt zu unterschiedlicher Verhaltensweise in der Packungsdichte, Löslichkeit und Wechselwirkung von Polypeptiden mit biologischen Zielen.[34, 41]

Polypeptide bestehen im Gegensatz zu herkömmlichen Polymeren aus Aminosäuren und bieten daher eine Kombination aus intrinsischen Reaktionen auf externe Reize (wie z.B. Änderungen des pH-Werts, der Salzkonzentration oder des Redoxpotentials) und Multifunktionalität aufgrund unterschiedlicher Seitenketten. Sie können ungiftig, biokompatibel und *in vivo* abbaubar sein, während sie in wässriger Lösung stabil sind. Dies bietet einen großen Vorteil im Vergleich zu anderen biologisch abbaubaren Polymeren wie Polyestern oder Polyphosphaten.[33]

Im Gegensatz zu in der Natur produzierten Makromolekülen können synthetische Polypeptide durch "lebende" Polymerisationstechniken aus einer sehr großen Vielfalt von Monomeren erhalten werden, die nicht nur lineare, sondern auch verzweigte Strukturen besitzen.

Derzeit werden Polypeptide hauptsächlich über drei Methoden synthetisiert:

I. Mikrobielle Synthese

II. Festphasenpeptidsynthese (SPPS)

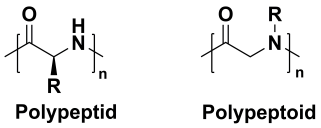
III. Ringöffnungspolymerisation (ROP) von α-Aminosäure-*N*-Carboxyanhydriden (NCAs)

Die mikrobielle Synthese kann nur zur Herstellung von Peptiden aus natürlichen Aminosäuren verwendet werden und außerdem ist die Prozedur für die Gewinnung und Aufreinigung aufwändig und besitzt eine geringe Ausbeute.[39]

Bei der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) werden Polypeptide durch schrittweise Kupplung geschützter Aminosäuren an feste Harze und anschließende Abspaltung der Polypeptide vom Harz hergestellt. SPPS ist jedoch ein kostspieliger Prozess und die erreichbare Länge von Polypeptiden wird durch Harzporosität (sterische Hinderung), unvollständige Kupplungsschritte, Nebenreaktionen und Racemisierung auf kurze Peptide (< 50 Reste) mit geringen Ausbeuten begrenzt.[31, 33-34, 42]

1.4 Polypeptoide

Polypeptoide oder Poly-*N*-substituierte Glycine sind eine Klasse von Peptidomimetika, die die Seitenketten der üblichen α-Aminosäuren an den Stickstoff geknüpft haben. Sie haben im Gegensatz zu Polypeptiden keine Stereozentren am Kohlenstoff-Rückgrat und sind keine Wasserstoff-Donoren. Die *N*-Methylierung macht sie zu einem exklusiven Wasserstoffbrücken-Akzeptor. Außerdem können die Amid-Gruppen der Polypeptoide im Vergleich zu Polypeptiden, deren Amid-Gruppen in den meisten Fällen eine *trans*-Konformation einnehmen, sowohl eine *cis*- als auch *trans*-Konformation einnehmen. Der prozentuale Anteil beider Konformere ist Lösungsmittel-abhängig, während in DMSO ein etwa gleich hoher *cis*/*trans*-Anteil vorliegt, liegt in TFA der Hauptteil in der *trans*-Konformation vor.[33, 43]



Schema 1: Chemische Struktur von Polypeptiden und Polypeptoiden.

Die Polypeptoide können, genauso wie Polypeptide, durch nucleophile ringöffnende Polymerisation (ROP) der entsprechenden *N*-substituierten *N*-Carboxyanhydride (NNCA) hergestellt werden. Da NNCAs am Amidstickstoff kein saures Proton besitzen, das abstrahiert werden kann, tritt der Aktivierte-Monomer-Mechanismus (AMM) bei dieser Verbindungsklasse nicht auf.[33, 43-44]

Da bei den Polypeptoiden mit aliphatischen Seitenketten keine Stellen vorhanden sind, die als Wasserstoffbrückenbindungs-Donoren in der Polymerkette wirken können, ist eine Stabilisierung der Sekundärstruktur nicht möglich. Dies führt zu einer Random Coil-Konformation.[45] Das einfachste Polypeptoid ist Polysarkosin (Poly(*N*-Methylglycin)). Im Vergleich zu Polyglycin, welches aufgrund seiner β-Faltblatt-Konformation praktisch unlöslich ist, zeigt Polysarkosin eine gute Löslichkeit in Wasser und in vielen organische Lösungsmitteln wie z.B. DMSO, Chloroform und *N,N*-Dimethylformamid (DMF). Es konnten bereits Polysarkosine durch kontrollierte lebende Polymerisation mit primären Aminen als Initiatoren in den Kettenlängen 5 – 400 synthetisiert werden.[33, 46]

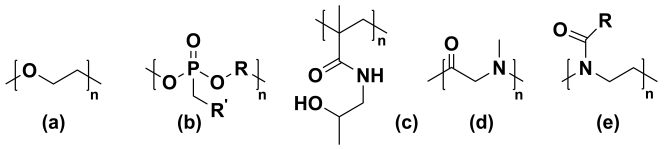
1.4.1 Polysarkosin — eine Alternative zu PEG

Ein breites Spektrum von Nanopartikeln werden jedes Jahr auf ihre Fähigkeiten wie z.B. unterschiedliche Arten von Cargo zu laden, löslich im biologischen Milieu zu bleiben (z. B. Blut, Schleimhaut, etc.), Sekretion und Immunantwort zu umgehen, auf bestimmte Gewebe abzuzielen und ihren Cargo freizugeben, getestet. Die Effizienz der meisten dieser Prozesse hängt davon ab, wie die Nanopartikeloberfläche mit dem biologischen Medium, in dem es eingeführt wird, interagiert. Diese Wechselwirkungen bestimmen die Zusammensetzung der Schicht aus biologischem Material (Proteinkorona), die um das Nanopartikel gebildet wird, wenn es mit einem Organismus in Kontakt kommt. Es ist die Proteinkorona, die entscheidend für die Zirkulationszeit, Zellaufnahme oder Immunogenität ist.[47] So aggregierten Polyplexe mit hohen positiven Nettoladungen beispielsweise unmittelbar nach intravenöser Injektion und interagierten mit Thrombozyten, was zur Bildung größerer Aggregate (> µm) führte. Das Risiko für das Auftreten einer Embolie oder eine unerwünschte Immunreaktion ist dementsprechend hoch. Eine Abschirmung der Polyplex-Oberflächenladung gegenüber den Bestandteilen des Serums ist daher für einen systemischen Gentransport unabdingbar. Die Beschichtung der Nanopartikeloberfläche mit bestimmten Materialien ist eine Strategie, um die Zusammensetzung der Proteinkorona zu kontrollieren. Eine der wichtigsten Strategien ist die Ausnutzung des sogenannten „Stealth"-Effekts, d.h. die Kapazität bestimmter Materialien, insbesondere von nichtionischen, flexiblen, hydrophilen Polymeren, unspezifische Wechselwirkungen mit dem umgebenden biologischen Milieu zu reduzieren. Mit solchen Polymeren beschichtete Nanopartikel weisen nicht nur eine geringere Toxizität auf, sondern besitzen zudem eine kleinere Proteinkorona und werden vom Immunsystem nicht erkannt, was ebenfalls zu einer erhöhten Zirkulationsdauer beiträgt.[48-49]

Polyethylenglykol (PEG) war bis vor einiger Zeit das einzige Polymer, dem so eine Wirkung nachgesagt wurde. Daher ist PEG bis heute das am häufigsten verwendeten Polymer in biomedizinische Anwendungen.

In letzter Zeit zeigten jedoch mehrere Berichte, dass unter bestimmten Bedingungen PEG und PEG-haltige Polymere signifikante Komplementaktivierungen hervorgerufen haben und eine schnelle Clearance nach wiederholten Injektionen von PEGylierten Liposomen stattfand. Es wurden sogar bereits IgM-Antikörpern gegen PEG bei manchen Patienten nachgewiesen. Darüber hinaus ist PEG chemisch betrachtet ein Polyether, der zur Peroxid-Bildung neigt, welche sich auf

verschiedene Art und Weise auf Bioaktivstoffe, Zellen und Gewebe auswirken kann. Seine Bioabbaubarkeit *in vivo* ist sehr limitiert, da unser Körper keine zusätzlichen Mechanismen neben der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) besitzt, um C–C- oder C–O-Bindungen zu spalten.[33, 50] Die Suche nach Alternativen für biomedizinische Anwendungsgebiete führte zur bevorzugten Verwendung hydrophiler Polymere, darunter Polyphosphonate, Poly(N-(2-hydroxypropyl)-methacrylamide (pHPMA), Poly(2-alkyloxazolin) oder Polypeptoide wie Polysarkosin (pSar).



Schema 2: Schematische Darstellung von PEG (a) und alternative Polymeren wie z.B. Polyphosphonate (b), pHPMA (c), pSar (d) und POx (e).

Sarkosin (**2**) ist eine nicht-proteinogene, aber endogene Aminosäure. Es ist ein Intermediat des Glycin-Metabolismuses und kommt in Muskeln und anderen Geweben vor. Sarkosin (Sar) wird durch Glycin-*N*-Transferase synthetisiert und durch Sarkosin-Dehydrogenase zu Glycin und Formaldehyd abgebaut.[51]

In einem Vergleich konnte gezeigt werden, dass PEG und Polysarkosin (pSar) ein sehr ähnliches Interaktionsmuster mit der Proteinoberfläche entwickeln, sowohl hinsichtlich der Affinität zu den verschiedenen Aminosäuren als auch in Bezug auf die Gesamtintensität der Wechselwirkung. Die Dicke der Adsorptionsschicht war für pSar etwas größer ausgeprägt als für PEG, was wiederum dessen sperrige und weniger flexible Struktur widerspiegelt.[47, 52] HÜSMANN *et al*. verglichen amphiphile Blockcopolymere mit pSar und PEG untereinander verglichen und auf ihre chemischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften in Bezug auf den Polymerisationsgrad, die Dispersität und den hydrodynamischen Volumen in verschiedenen Lösungsmitteln sowie den Aggregationsverhalten hinsichtlich ihrer kritischen Aggregationskonzentration und ihrer Aggregatgröße untersucht. Diese Eigenschaften der PEG- und pSar-Systeme unterscheiden sich letztlich nicht signifikant voneinander.[38] Darüber hinaus induzierte pSar keine Komplement-Aktivierung in humanem Serum.[44] Noch wichtiger pSar-basierte Nanopartikel zeigten Stabilität im Blutplasma und Serum und „Stealth like"-Eigenschaften *in vivo*.[53]

pSar bietet also eine vielversprechende Alternative zu PEG, sowohl in den biomedizinischen Anwendungsgebieten als auch in anderen Themengebieten. Es ist zumindest aufgrund der ähnlichen chemischen, physikochemischen und komplementsystem-bezogenen Eigenschaften eine mögliche Konkurrenz dazu.[44, 54] Es wäre nicht überraschend, wenn im Einzelfall der individuellen Anwendung pSar sogar deutlich spezifischer wirken könnte.

1.5 Polypept(o)ide

Polypeptid-Polypeptoid-Polymere werden Polypept(o)ide genannt.[33]

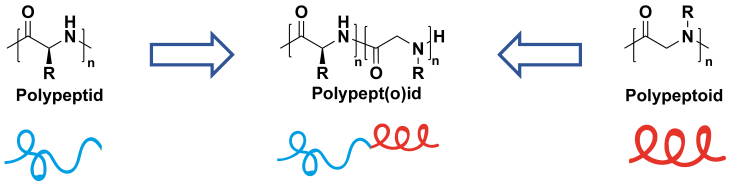


Abbildung 9: Schematische Darstellung der allgemeinen Struktur der Polypept(o)ide.

Polypept(o)ide werden ausschließlich aus endogenen Aminosäuren aufgebaut und kombinieren die Multifunktionalität und die intrinsischen Reizreaktionen von synthetischen Polypeptiden mit der *"Stealth"*-Eigenschaft des Polysarkosins. Diese Klasse von Blockcopolymeren kann entweder durch *a)* sequenzielle ROP von NCAs und Sar-NCA synthetisiert werden, wobei der erste Block als Makroinitiator für den zweiten Block wirkt. So sind durch die Zugabe des zweiten oder dritten Monomers, Di-, Tri- und Multiblockcopolymere direkt zugänglich. Oder durch *b)* chemische Ligation zweier Endgruppen-funktionalisierter Polymere.[33, 52]

Für Polypept(o)ide bis zu einem Polymerisationsgrad (X_n) von mehreren 100 Einheiten im pSar-Block (= Polypeptoid-Block) und bis zu 100 Einheiten im Polypeptid-Block sind nach internem Erfahrungswert die Arbeit unter sauberen Polymerisationsbedingungen (dazu gehören die Verwendung von hochreinen Monomeren, Lösungsmitteln und Initiatoren in Kombination mit einer Schutzgasatmosphäre) und bei niedrigen Temperaturen ausreichend, um enge Molekulargewichtsverteilungen zu erreichen.[33, 55]

Polypept(o)ide basierend auf pSar- und α-Poly(aminosäure)-Blöcken kombinieren ein Random Coil Polypeptoid mit einem Polypeptid in einer bestimmten Sekundärstruktur (α-Helix oder β-Faltblatt). So bilden sich Rod Coil-Blockcopolymere.[33]

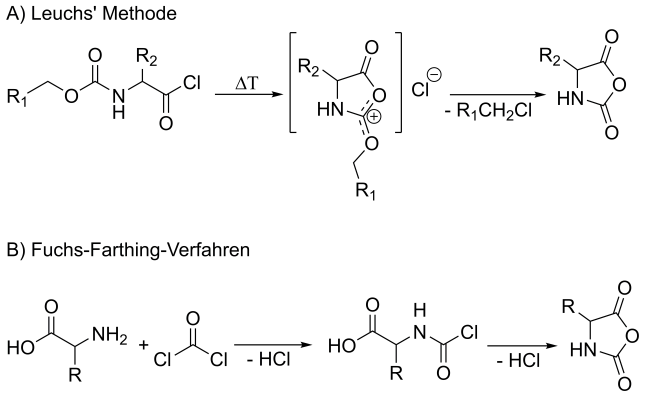
Zusätzlich können über funktionelle Initiatoren oder über nachträgliche Modifikation Seitenketten- und Endgruppenfunktionalisierungen auf einfache Art und Weise eingeführt werden. Kurz gesagt, Polypept(o)ide sind multifunktionale Systeme, die aus biologisch abbaubaren und nicht-toxischen Komponenten aufgebaut sind und daher besitzen sie ein großes Potential für die Anwendung in der Nanomedizin.

Die Polyplexe, die aus Polypept(o)iden bestehen, wurden in unserem Arbeitskreis gemeinhin „PeptoPlex(e)“ genannt.[56]

1.6 NCA-Synthese und Polymerisation

Die ROP von NCAs ist, die am häufigsten angewandte Polymerisationstechnik zur Herstellung synthetischer Polypeptide und Blockcopolymeren und bietet eine beträchtliche chemische Vielfalt mit Konservierung der Stereoinformation über die 21 proteinogenen Aminosäuren im Großmaßstab. Das erste *N*-Carboxyanhydrid (NCA, auch LEUCHS'sche Anhydrid genannt) wurde 1906 von HERMANN LEUCHS ausgehend von *N*-Alkoxycarbonylaminosäurechloriden synthetisiert.[57]

Am häufigsten werden NCAs nach der von FUCHS im Jahre 1922 entwickelten[58] und von FARTHING verbesserten Methode synthetisiert (FUCHS-FARTHING-Verfahren)[59], welches Phosgen oder ein Phosgenäquivalent (z.B. Di- oder Triphosgen) zur Cyclisierung verwendet. Bisher wurden mehr als 200 NCA-Monomere in der Literatur beschrieben.[34, 42, 45]

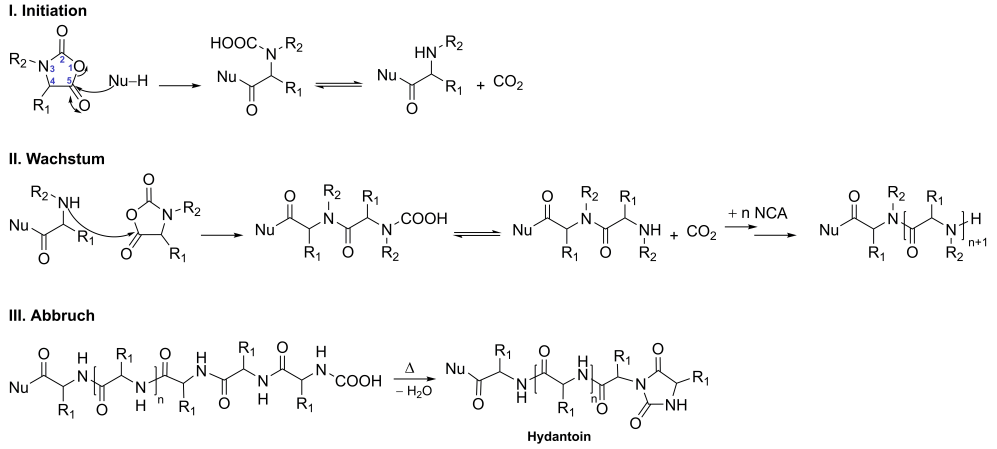


Schema 3: Die bekanntesten Methoden zur Synthese von α-Aminosäure-*N*-Carboxyanhydriden nach LEUCHS'(A) oder FUCHS-FARTHING-Verfahren (B).

Erst 1997 wurde eine kontrollierte Polymerisation von NCA-Monomeren von DEMING entwickelt, bei der metallorganische Initiatoren verwendet werden, um Kettenübertragungs- und Abbruchreaktionen zu unterdrücken. Mit auf Ni- und Co-basierten Initiatoren schaffte er gut definierte Blockcopolypeptide herzustellen. Nach dieser Arbeit wurden mehrere lebende Initiationssysteme entwickelt, darunter ein Ammoniumsalz-Initiationssystem (SCHLAAD, 2003)[60], ein Hochvakuumaufbau (HADJICHRISTIDIS, 2004)[61], eine Niedertemperatur-Technik (GIANI, 2004)[62], Organosilicium-Initiatoren (CHENG, 2007)[63] und eine Stickstoff-Strömungs-Strategie (WOOLEY, 2013)[64].[34, 42] Einer der Parameter mit enormem Einfluss auf das Polymerisationsergebnis ist die Reinheit der verwendeten Lösungsmittel, Initiatoren und insbesondere der NCA-Monomere. Ausschluss von Verunreinigungen wie Lösungsmittelspuren, Wasser, Rückstände von Aminosäuren oder Säurechloriden wurden allgemein als obligatorisch akzeptiert, um die lebende Polymerisation zu verwirklichen. Nucleophile Verunreinigungen besitzen das Potential wachsende elektrophile Kettenenden zu terminieren, Nebenreaktionen zu katalysieren oder als Kettenübertragungsmittel zu wirken, sodass kürzere Ketten erzeugt werden, welche zu einer ungewünschten breiten Molekulargewichtsverteilung des Materials führt.[42, 45]

Die wahrscheinlichsten Mechanismen für die ROP von NCAs sind der normale Amin-Mechanismus (NAM) und der aktivierte Monomer-Mechanismus (AMM). Wenn Initiatoren verwendet werden, die nucleophil sind (z.B. primäre Amine), wird der NA-Mechanismus ablaufen. Bei der Verwendung von Initiatoren, die einen basischen Charakter haben und wenig oder gar nicht nucleophil sind (z.B. Metall-Alkoxide, tertiäre Amine) läuft der AM-Mechanismus ab. Im Falle von durch tertiäre und sekundäre Amine sowie durch Alkalihalogenide initiierten Polymerisationen wird angenommen, dass AMM und NAM nebeneinander existieren.[34, 42]

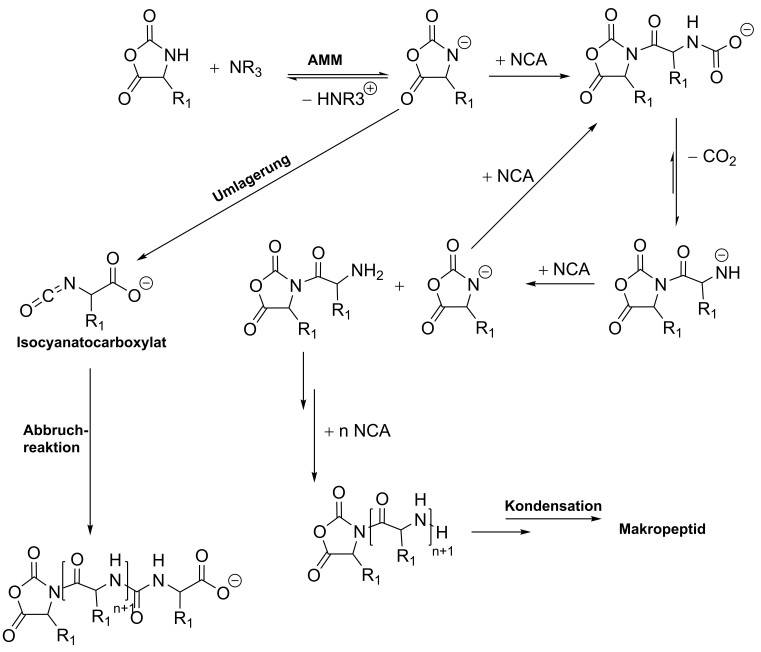
NAM: Dieser Mechanismus wird allgemein für die Polymerisation von NCAs angewendet, die von einem nichtionischen Initiator mit mindestens einem mobilen Wasserstoffatom (Base-H) initiiert wurden, wie z.B. durch primäre und sekundäre Amine, Alkohole und Wasser. Dieser Mechanismus gilt für *N*-unsubstituierte NCAs (R_2=H) sowie für *N*-substituierte NCAs (R_2≠H). Die Initiierung basiert auf dem nukleophilen Angriff der Base auf das Carbonyl-Kohlenstoff (C5) des NCAs. Das Zwischenprodukt, eine instabile Carbaminsäure, decarboxyliert zu einem Intermediat mit freier Amingruppe, die die Polymerisation fortsetzt. Primäre Amininitiatoren liefern die besten Ergebnisse in Bezug auf die Übereinstimmung der Daten zwischen den experimentellen Werten und dem stöchiometrischen Molekulargewicht. Da primäre Amine nukleophiler sind als die ω-Aminogruppen der Wachstumskette, ist die Initiationsrate höher als die der propagierenden Ketten, was zu Polypeptiden mit niedrigen Polydispersitätsindizes (PDI) führt. Das Einbauverhältnis variiert mit der Struktur des Initiators von 100% für primäre Amine bis hinzu nur 10% für sekundäre Amine, wie beispielsweise für Diisopropylamin, welches hauptsächlich dem AM-Mechanismus folgt. Dies liegt an der höheren Basizität und sterischen Hinderung von Diisopropylamin im Vergleich zu *n*-Hexylamin. Zu den Faktoren, die die Abweichungen von der lebenden Natur der ROP verursachen, gehören folgende: Carbaminsäure-CO_2-Gleichgewicht, Lösungsmittel und die Anwesenheit von Wasser und anderen Verunreinigungen.[42]



Schema 4: Normaler-Amin-Mechanismus (NAM) der NCAs und mögliche Nebenreaktionen.

AAM: Dieser Mechanismus wurde erstmals von BALLARD *et al.*[65] zur Klärung der ROP von DL-Phenylalanin-NCA, initiiert durch ein tertiäres Amin, beschrieben. Später schlug SZWARC[66]vor, dass die AMM auch für die basische salzinitiierte Polymerisation von *N*-unsubstituierten NCAs gilt.[42]

- Vorinitiierungsreaktion: Hier, im Gegensatz zum NAM, fungiert der Initiator nicht als Nukleophil, sondern als Base. Diese abstrahiert das Proton des 3-N vom NCA, was zu dem entsprechenden Anion führt. Daher wirkt in diesem Mechanismus der Initiator als „Katalysator“. Dieser Mechanismus kann nur auf *N*-unsubstituierten NCAs mit einem Proton in der N3-Position angewendet werden.
- Initiierung: Der eigentliche Initiator ist das resultierende NCA-Anion, dass das C5-Carbonyl eines anderen NCAs angreift, um ein Dimer zu bilden. Durch die Freisetzung von Kohlenstoffdioxid wird ein neues Anion gebildet.
- Propagation: Das Dimer wird von einem neuen Anion angegriffen, um ein Trimer zu bilden, und so weiter, gefolgt von der Bildung eines NCA-Anions bei jedem Reaktionsschritt.



Schema 5: Aktivierter-Monomer-Mechanismus (AMM) und mögliche Nebenreaktionen.

1.7 Polyplex-Design und -Entwicklung

Wie bereits beschrieben sind Polyplexe nanogroße Komplexe bestehend aus kationischen Polymeren und negativ geladenen Nukleinsäuren. Ihre extrazelluläre Stabilität ist von höchster Bedeutung. Im Blutkreislauf sind diese Partikel nämlich Nukleasen ausgesetzt, die die Ladung abbauen können, und anderen Serumproteinen, die den Komplex durch elektrostatische Wechselwirkung destabilisieren können.[67] Einfache Poly-L-Lysin (pLys)-pDNA-Komplexe werden im Blut innerhalb von 10 min abgebaut![48]

Zu diesem Zweck wurden Blockionomere hergestellt, welche im Prinzip Blockcopolymere sind, die einen kationischen und einen „Stealth-like" Block in einem doppelt hydrophilen Blockcopolymer kombinieren. Sie können die Bildung von Kern-Schale-Polyplexen induzieren, in denen der kationische Block die Nukleinsäure durch elektrostatische Wechselwirkung komplexiert, während der hydrophile Stealth-like Block das Konstrukt vor unerwünschten Wechselwirkungen mit Blutbestandteilen schützt und ihre Stabilität gegenüber Degradation erhöht.[7, 55] Diese Schutzhülle begrenzt jedoch gleichzeitig die Internalisierung von solchen Nanopartikeln in die Zielzellen. Die schlechte Zellaufnahme ist ein entscheidendes Problem für Anwendungen, bei denen die Therapeutika erst intrazellulär aus den Nanopartikeln abgegeben werden müssen. Dieser Effekt wird allgemein als „PEG-Dilemma" bezeichnet, da die meisten Literaturstellen dieses Phänomen mit der PEGylierten Oberfläche der Nanopartikeln assoziieren. Dieser Effekt wird dennoch auch für andere hydrophile schalenbildende Polymere beobachtet. Vorteilhafterweise können Liganden mit einer spezifischen Bindungsaffinität zu einem Rezeptor der Zielzellen auf die Nanopartikel-Oberfläche integriert werden (das sogenannte „aktive" Targeting). Die Effizienz von mit Liganden-modifizierten Polyplexen hängt zunächst von Aspekten wie der Ligandendichte auf der Oberfläche des Polyplexes und der Flexibilität des Linkers, welcher eine verbesserte Zugänglichkeit zum Rezeptor durch Erhöhung der Mobilität zwischen dem Liganden und dem Polyplex bieten soll, ab.[49, 68]

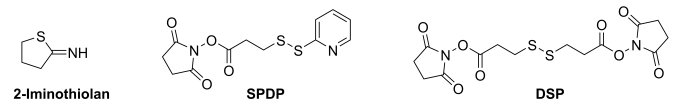
Im Falle von pLys wird angenommen, dass die primären terminalen Amingruppen der Lysin-Seitenkette nicht an einem *proton sponge*-Effekt teilnehmen, was zu einer reduzierten Transfektions-Effizienz führt. Dennoch bedeutet die geringe Cytotoxizität von pLys ein gesteigertes Interesse zur Verbesserung dessen Transfektionsleistung.[6] Solche Bemühungen umfassen hauptsächlich die Verwendung von niedermolekularen Additiven in Verbindung mit pLys, darunter beispielsweise Lösungsmittel wie DMSO, schwache Basen wie Chloroquin und Ammoniumchlorid oder Glycerin, und/oder kovalenter Modifikationen am pLys. Die Transfektion von pLys-basierten Polyplexen wird beispielsweise in Gegenwart von Chloroquin verbessert, dessen Pufferkapazität verhindert nämlich den Abbau der bereits endozytierten pLys/DNA durch Neutralisation der sauren endosomalen Kompartimente. Weitere Strategien umfassen die Konjugation von Liganden oder die Fusion von Peptiden. Die Konjugation von Histidin oder Arginin an pLys förderte beispielsweise das Entweichen aus den Endosomen und verstärkte die Transfektion aufgrund des intrinsischen Puffereffekts.[8, 31, 48]

Zusätzliche Polyplex-Stabilität kann durch eine Kern-Vernetzung erhalten werden. Dies ist für siRNA-Systeme kritischer als für pDNA-Systeme, da diese eine deutlich reduzierte Größe

aufweisen (Plasmid-DNA enthält Tausende von Negativen Ladungen, während siRNA nur 50 enthält).[48] Eine übliche angewendete Methode zur Erhöhung der Komplex-Stabilität, wenn mit pDNA gearbeitet wird, ist die simple Erhöhung der Polykation-Kettenlänge, was wiederum zur Erhöhung der elektrostatischen Anziehungskraft und kooperativen Bindungsfähigkeit an pDNA führt. Die Erhöhung der Polykation-Kettenlänge kann auch zu einer Überstabilisierung der Komplexe sowie zu erhöhter Toxizität führen.[69]

Intrazellulärer Transport der Nukleinsäuren oder Proteinen erfordert dynamische Träger, die zwischen verschiedenen zellulären Standorten unterscheiden. Vernetzung von Polyplexen in reversibler Art und Weise würde den Stabilitätsfaktor außerhalb der Zielzelle uneingeschränkt lassen, darüber hinaus nach Internalisierung, Abbau und Freisetzung der Nukleinsäuren eine Wirkung am gewünschten Aktivitätsort ebenso ermöglichen. Es sind Polyplexe mit hydrolysierbaren Acetal-Gruppen, Ester-Bindungen oder hydrogenolytisch reduzierbaren Disulfid-Bindungen literaturbekannt, die eine gezielte Degradation von Polyplexen in der Zelle ermöglichen.[67]

Disulfid-vernetzte Träger sind besonders attraktiv, da die verschiedenen physiologischen Redox-Umgebungen im Inneren und außerhalb der Zelle zur Optimierung der beteiligten Transportprozesse verwendet werden kann. Die Glutathion-Konzentration (GSH, eine natürliches Disulfid-Reduktionsagens) ist in Zellen etwa 50 – 1000-mal höher ist (1 – 11 mM) als in dem extrazellulären Raum (0.02 mM).[48, 67] Neben Thiol-tragenden Monomeren wie Cystein stehen mehrere Amin-reaktive Thiol-Modifikationsreagenzien zur Verfügung, darunter beispielsweise Iminothiolane (TRAUT's Reagenz), welches die Ladung des Ausgangspolymers aufbewahren soll oder DSP [Dithiobis(Succinimidylpropionat), LOMANT's Reagenz] und SPDP (*N*-Succinimidyl 3-(2-Pyridyldithio)propionat) und, die die Ladung des Ausgangspolymers reduzieren und somit eine weitere Feinabstimmung der Polyplex-Eigenschaften ermöglichten sollen.[48]



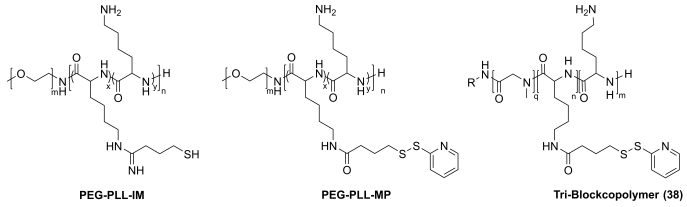
Schema 6: Schematische Darstellung der Amin-reaktiven Thiol-Modifikationen.

Um die Stabilität von PEG-*b*-PLys-Polyplexen durch kovalente Vernetzung zu erhöhen, bauten KATAOKA *et al*. Thiole durch Modifikation der Lysin-Seitenketten mit SPDP (PEG-PLL-MP) oder 2-Iminothiolan (PEG-PLL-IM) in das Polymergerüst ein und reduzierten diese nach der Polyplex-Bildung. Beide Thiol-haltigen PEG-pLys komplexierten pDNA effizient in Disulfid-vernetzten Polyplexen, die stabiler waren als jene unvernetzten. Jedoch, im Gegensatz zu den mit 2-Iminothiolan behandelten Polyplexen zeigten die mit SPDP Thiol-haltigen Polyplexen eine eindeutige Freisetzung der pDNA im reduktiven Milieu. Im Luciferase-Assay konnte in HEK 293T-Zellen eine 50-fach erhöhte Transfektionseffizienz von Thiol-haltigen Polyplexen (Thiol-Gehalt 28%) im Vergleich zu den nicht vernetzten Polyplexen beobachtet werden.

Diese Zusammensetzung balanciert die Anforderungen an Stabilität und effizienter Freisetzung von pDNA im Cytosol.[70]

Anstelle der Verwendung von Diblockcopolymere wie bei KATAOKA *et al*. können Multi-Blockcopolymere als Komplexbildner verwendet werden, welche die Einführung verschiedener Funktionen in einem Makromolekül ermöglichen. Insbesondere Multiblockcopolymere vom Typ A-B-C wurden als fortgeschrittene Polyplex-Bildungsblöcke hergestellt. Ein solches Polymer mit verschiedenen Regionen im Backbone, welches jeweils einem ganz bestimmten Zweck dienen soll, wurde hergestellt. Einige Designs verwenden den grundlegenden Typ A-B-C Blockcopolymere, die ein PEG-Segment für die Biokompatibilität und verlängerte Zirkulationszeiten im Blut an einem Ende, ein Polykation zur Nukleinsäure-Komplexierung am anderen Ende und verschiedene Segmente in der Mitte, die hydrophobe, pH-Pufferung oder Endosomen-perforierende chemische Eigenschaften umfassen können.[48] Als Schutz-Zwischenschicht (oder B-Segment) sind hydrophobe Einheiten besonders attraktive Kandidaten, weil sie die Peripherie des Polyplex-Kerns aus dem äußeren wässrigen Milieu maskieren können, wodurch der Zugang geladener Biomakromoleküle wie Serumproteine und Nukleasen zu dem Polyplex-Kern blockiert wird.[71]

Die Strategie von KATAOKA *et al*. zu vernetzten Polymeren wurde von HELLER *et al*. in der Synthese der Triblockcopolymere pSar-*b*-pLys(PDP)-*b*-pLys **(38)** angewendet.[7] Nach dem Komplexierungsschritt mit pDNA wurde den Polyplexen der Thiol-haltige Vernetzer zugesetzt, die mit den PDP-Gruppen innerhalb der Polymere reagierten. Neben Thiolen enthielten die bifunktionellen Vernetzer auch endosomolytische Gruppen. Vernetzte Polyplexe zeigten neben Stabilität im Serum auch eine erhöhte Transfektionseffizienz in HEK 293T-Zellen.[55]



Schema 7: Polymere hergestellt von KATAOKA *et al*. (PEG-PLL-IM mit Iminothiolan, PEG-PLL-MP mit SPDP) und von HELLER *et al*. (Triblockcopolymer mit SPDP), die zur Herstellung von bioreduktiven Polyplexen verwendet wurden.

2 Zielsetzung

Die Grundbausteine für die Nukleinsäure-Transportsysteme, nämlich ein nicht-ionischer Block mit Stealth-Eigenschaften zur Abschirmung des Kerns und ein kationischer Block zur Komplexierung der Nukleinsäure, sollen in Form biologisch abbaubarer, ausschließlich aus endogenen Aminosäuren bestehenden Diblockcopolypept(o)iden (**19**) zusammengefasst werden. Da bereits von HELLER *et al*. lineare Diblöcke mit verschiedenen Kettenlängen an pLys- und pSar-Einheiten untersucht wurden[56], sollten zum Vergleich Miktoarm-Polymere in Form von $(pSar)_3$–pLys (**19**) hergestellt und deren Transfektionseffizienz untersucht werden.

Die Herstellung stabiler Polyplexe soll durch kovalent vernetzte Polymere gewährleistet werden. MultiBlockcopolymere des Typ A-B-C mit einem hydrophoben Mittelblock, der Thiol-Gruppen enthält, wurden hierfür ausgesucht. Die Verwendung der Amin-reaktiven Thiol-Modifikations-Reagenzie SPDP wurde bereits von HELLER *et al*. beschrieben.[7] In dieser Arbeit soll hingegen ein Thiol-haltige Monomer zum Einsatz kommen.

Homocystein (**5**) und Cystein sind die einzigen natürlich vorkommenden Aminosäuren, die in der Lage sind, Disulfid-Bindungen in Peptiden und Proteinen zu bilden. Die bereits im Arbeitskreis etablierten S-Alkylsulfonyl-Schutzgruppen (**7**) für Thiole bieten Stabilität gegen harte Nucleophile, wie z.B. Amine, die während der NCA-Polymerisation oder Festphasen-Peptidsynthese (SPPS) erforderlich sind, gleichzeitig zeigen sie durch die Bildung von asymmetrischen Disulfiden Reaktivität gegenüber Thiolen und weichen Nukleophilen.[72] Poly(*S*-Ethylsulfonyl-L-Cystein) (pCys) bildet β-Faltblatt-Sekundärstrukturen, die zu einer verringerten Löslichkeit führen und durch die Bildung von Aggregaten den Polymerisationsgrad von pCys auf maximal 50 begrenzen.[73] Im Gegenzug bildet Poly(*S*-Ethylsulfonyl-L-Homocystein) (pHcy) α-Helices als Sekundärstruktur und es sind bereits Kettenlänge von bis zu 165 ohne Aggregatbildung polymerisiert worden.[74]

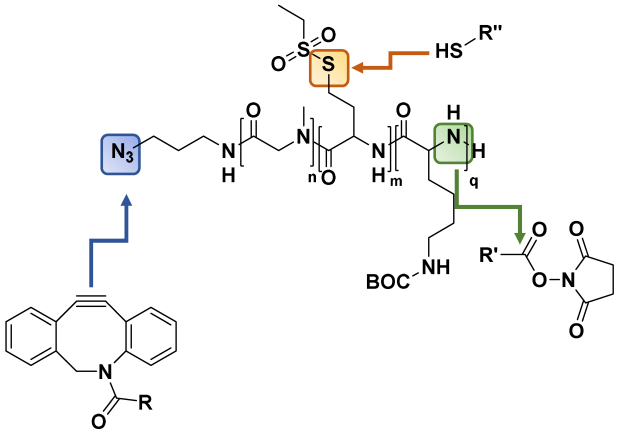
Der Einbau endosomolytischen Gruppen zur effizienten „*endosomal escape*“ soll in Form von reversiblen nachträglichen Polymer-Modifikationen an den Polypept(o)iden erfolgen. Die endosomolytische Eigenschaft soll durch Verwendung bifunktioneller Vernetzer eingeführt werden. Diese sollen durch Bildung asymmetrischer bioreversibler Disulfid-Bindungen mit dem hydrophoben Block, der reaktive Thiole trägt, an das Polyplex geknüpft werden.

Des Weiteren soll der Einfluss unterschiedlicher Topologien bei der Nukleinsäure-Transfektion untersucht werden. So sollen neben Miktoarm-Triblockcopolypept(o)iden (**27**) noch zusätzlich lineare reaktive Triblockcopolypept(o)ide (**24**) synthetisiert werden.

Die Triblockcopolypept(o)ide sollen jeweils in unterschiedlichen Block-Längen synthetisiert werden, um darüber hinaus den Einfluss unterschiedlicher Polymer-Kettenlängen bei der Transfektion zu untersuchen.

Durch die Funktionalisierung von terminalen Amin-Gruppen am pSar der Miktoarm-Triblöcken ($(N_3$-pSar$)_3$-*b*-pHcy-*b*-pLys (**27**)) und durch die Verwendung eines Azid-funktionalisierten Initiators (**1**) bei der Synthese der linearen Triblöcke (pSar-*b*-pHcy-*b*-pLys (**24**)) sollen

heterotelechele Polymere hergestellt werden. Sie würden drei orthogonal adressierbare Gruppen kombinieren, die eine ortsspezifische Umwandlung aller reaktiven Einheiten in einem einzigen Schritt ermöglicht. Die Azid-Gruppe kann anschließend im Sinne einer [2+3]-Cycloaddition mit Alkinen in Anwesenheit von Kupfer (I) (CuAAC) oder mit Cyclooctin (SPAAC) reagieren. Das primäre Amin-Ende kann eine Amid-Bindung mit reaktiven Ester-Derivaten (z.B. *N*-Hydroxysuccinimid(NHS)-Ester) eingehen ohne die Vernetzungsreaktion zwischen Thiolen und *S*-Alkylsulfonyl-Schutzgruppen zu beeinflussen.[75-76]



Schema 8: Heterotelechele Triblockcopolypept(o)ide am Beispiel eines linearen Polypept(o)ids (**24**). Die funktionellen Gruppen sind unabhängig voneinander adressierbar.

Auf diesen heterotelechelen Triblockcopolypept(o)id-basierten Nanopartikeln würden die Azid-Gruppen auf dem äußeren Rand der Korona liegen, während sich die freien Amin-Gruppen der pLys-Blöcke im Kern der Nanopartikel und die aktivierten Thiol-Gruppen im mittleren Bereich der Kern-Schale-Struktur lokalisieren. Diese räumliche Trennung ist sehr attraktiv für die Bildung eines multifunktionalen Kern-Schale-Systems, da diese im Gegensatz zu statischen Copolymeren keinen Einfluss auf die Ladungsdichte des Polyplex-Kerns und somit auf die Komplexierungseffizienz der Nukleinsäure haben. Die Triblockcopolymere zeigten eine höhere pDNA-Expression in HEK-Zellen als statische Copolymere.[77-78]

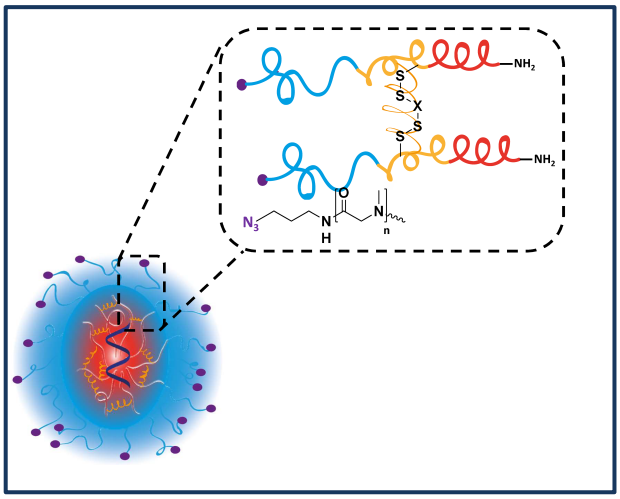


Abbildung 10: Die räumliche Trennung der funktionellen Gruppen in einem auf heterotelechelen Tri-Blockcopolypept(o)id basierten Kern-Schale-Polyplex. Während der Polyplex durch Disulfid-Bindungen bioreversibel vernetzt ist, ermöglichen die reaktiven Gruppen an den Polymer-Enden eine Einführung funktioneller Einheiten im Kern und in der Korona.

Ferner soll der Einfluss verschiedener Funktionalisierungen bei der Transfektion untersucht werden. Die funktionelle Azid-Gruppe soll für das aktive Targeting der Polyplexe und das terminale Amin soll für die Funktionalisierung mit Bisalkyl$_{18}$ verwendet werden.

Nebenbei soll die Rolle der Position der Bisalkyl-Einheit im Polyplex, nämlich ob es am Kern oder an der Korona lokalisiert ist, untersucht werden. Deswegen sollen neben C_{18}-Bisalkyl (BA_{18}) funktionalisierten Polymeren (**36**) noch mit C_{18}-Bisalkylamin (Dioctadecylamin) initiierte Triblockcopolypept(o)ide (**32**) synthetisiert werden.

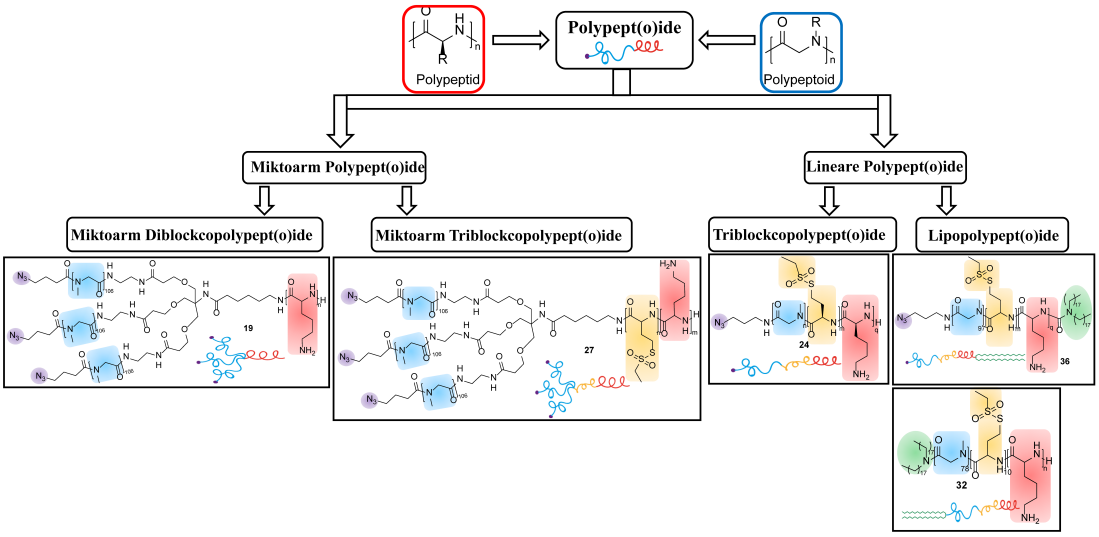


Abbildung 11: Die Unterteilung der synthetisierten Polypept(o)ide in verschiedene Gruppen anhand ihrer unterschiedlichen Topologie und Zusammensetzung.

Zusammengefasst sollen im Rahmen dieser Arbeit neue Blockcopolypept(o)ide mit unterschiedlichen Kettenlängen und unterschiedlicher Topologie hergestellt und deren Einfluss auf Komplexierungsgrad und Transfektionseffizenz von Nukleinsäuren (pDNA und mRNA) untersucht werden. Ziel ist die optimalen Systeme für die pDNA- bzw. mRNA-Transfektion bis hin zur Reprogrammierung von Immunzellpopulationen zu finden.

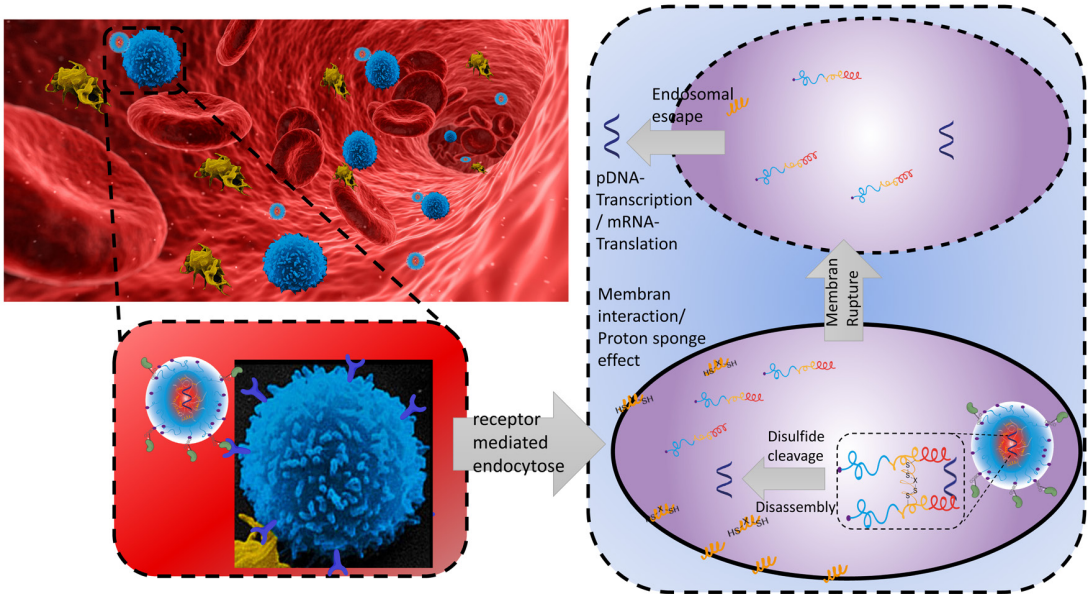


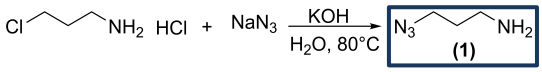
Abbildung 12: Polypept(o)id-basierte Polyplex-Formulierung und deren Funktionalisierung. Diese Polyplexe sollen später gezielt Zellen des Immunsystems adressieren und aktivieren können. Je nach Verwendung der Nukleinsäure, die für ein bestimmtes Peptid kodiert, können Krebs-Zellen, Viren oder Bakterien durch das Immunsystem erkannt und eliminiert werden.[79]

3 Allgemeiner Teil

3.1 Initiator-Synthese

Die bioorthogonale Azid-Alkin-Cycloaddition ist eine der am häufigstenverwendeten Reaktion zur regioselektiven Funktionalisierung von Bio(makro)molekülen, da die funktionellen Gruppen Azid und Alkin nicht in der Natur vorkommen, nicht-toxisch gegenüber Zellen und Organismen sind und sich hoch selektiv miteinander verknüpfen lassen. Kupfer (I)-katalysierte (CuAAC) und Spannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) sind bekannte Beispiele für diesen Reaktionstyp.[80] Trotz der schnelleren Reaktionskinetik der CuAAC wird SPAAC bevorzugt, da die Verwendung von CuAAC *in vivo*- und *in vitro*-Tests aufgrund der Toxizität des Kupfers, eingeschränkt ist. Kupfer kann die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auslösen. Diese sind in hohen Konzentrationen zelltoxisch, da sie DNA-Strang-Brüche erzeugen und Spaltung und Vernetzung von Aminosäuren in Proteinen induzieren können.[81]

Die direkte Verwendung eines Azid-funktionalisierten Initiators (**1**) bietet im Gegensatz zu nachträglichen Polymer-Modifikationen mittels Azid-haltiger Capping-Reagenzien nicht nur die Möglichkeit eine zweite Funktionalisierung am freien Amin-Ende über reaktive Ester-Derivate zu realisieren, sondern zusätzlich ist sichergestellt, dass jede Polymer-Kette eine terminale Azid-Gruppe enthält.



Schema 9: Darstellung von 3-Azido-1-aminopropan.

Nach der Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde als Rohprodukt ein gelbes Öl erhalten, welches durch fraktionierte Destillation gereinigt wurde. Das Produkt (**1**) wurde über Molsieb (4Å) und unter Inertgas-Atmosphäre gelagert. Mittels IR-Spektroskopie erfolgte die Kontrolle anhand der charakteristischen Azid-Bande bei 2088.5 cm^{-1}.[52, 82]

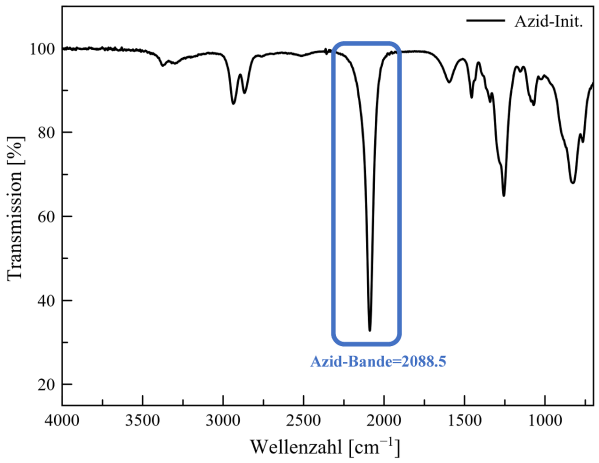
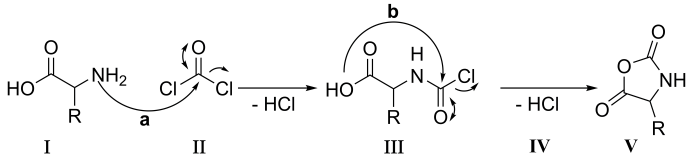


Abbildung 13: IR-Spektroskopie (ATR) des Azid-Initiators.

3.2 NCA-Synthese

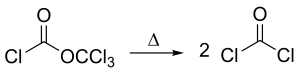
Die in dieser Arbeit verwendeten *N*-Carboxyanhydride, kurz NCAs, wurden allesamt nach einer modifizierten Variante der FUCHS-FARTHING-Methode synthetisiert (vgl. Schema 3).



Schema 10: Allgemeiner Reaktionsmechanismus der modifizierten Fuchs-Farthing-Methode.

Hier greift der Stickstoff der Aminosäure (**I**) nucleophil am Carbonyl-C-Atom des Phosgens (**II**) an (**a**). Nach der Abspaltung eines Moleküls HCl entsteht ein reaktives Carbamoylchlorid (**III**). Der ausschließende intramolekularer nucleophiler Angriff durch Sauerstoff am Carbonyl-C-Atom (**b**) führt unter Abspaltung eines weiteren Moleküls HCl (**IV**) zum fünfgliedrigen Ring (**V**). Hierbei handelt es sich um das *N*-Carboxyanhydrid der entsprechenden Aminosäure.

Bei der in der Arbeitsgruppe Barz etablierten Synthese-Vorschrift wird,[83] anstelle von gasförmigem Phosgen, das bei Raumtemperatur flüssige Diphosgen verwendet. Der Vorteil hierbei liegt in der leichteren Handhabbarkeit im Labormaßstab und in der durch Thermolyse *in situ* freigesetzter zweier Moleküle Phosgen.



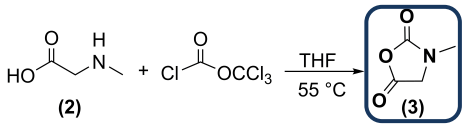
Schema 11: Thermische Disproportionierung von Diphosgen zu Phosgen.

Wie bereits erwähnt sind *N*-Carboxyanhydride gegenüber Nucleophilen, insbesondere Wasser, empfindlich und eine hohe Reinheit der NCAs ist für die weiterführenden Synthesen wohldefinierter Polymere zwingend notwendig. Verunreinigungen führen u.a. zu unerwünschten Nebenprodukten und zu Polymeren unterschiedlicher und ungleichmäßiger Kettenlänge. Deshalb

wurden die NCA-Synthesereaktionen ausschließlich mit Edukten hoher Reinheit unter Inertgas-Atmosphäre in wasserfreien Lösungsmitteln durchgeführt.

3.2.1 Sarkosin-NCA

Sarkosin (*N*-Methylglycin)-NCA (**3**) wurde nach der oben beschriebenen modifizierten Variante der FUCHS-FARTHING-Methode, ausgehend von kommerziell erhältlichem Sarkosin (**2**), hergestellt.



Schema 12: Darstellung von Sarkosin-NCA (**3**).

Nach einer Reaktionszeit von ca. 2 h wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt wurde über Sublimation gereinigt. Sarkosin-NCA (**3**) konnte somit in einer Ausbeute von bis zu 70% (Lit. 50-67%) erhalten werden. Die Reinheit des NCAs konnte anhand des Schmelzpunktbereichs von 102.4 − 103.9 °C, welcher mit den Literaturwerten (102 − 104 °C) übereinstimmte,[84] und ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestätigt werden.

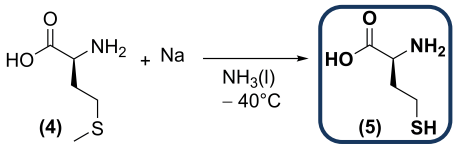
Zum Testszwecken wurde mit einem Teil des Sarkosin-NCA-Rohprodukts eine Umkristallisation durchgeführt. Für die Umkristallisation wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Chloroform und *n*-Hexan (v/v 1/1) verwendet. Die erhaltenen hochreinen Sarkosin-NCAs zeigten einen mit der Literatur übereinstimmenden Schmelzpunktbereich (s.o.) und konnten unter lebenden und kontrollierten Bedingungen polymerisiert werden.

3.2.2 L-Homocystein-NCA

L-Homocystein (**5**) ist eine natürlich vorkommende, aber nicht proteinogene α-Aminosäure. Sie ist ein Zwischenprodukt des Methionin-Stoffwechsels.

- **Homocystein-Synthese**

Hierfür wurde Homocystein (**5**) in einer Birch-Reduktion, ausgehend von kommerziell erhältlichem L-Methionin (**4**) hergestellt. Die Synthese wurde nach dem von KURT HAMACHER im Jahr 1989 beschriebenen Protokolls durchgeführt.[85]



Schema 13: Darstellung des L-Homocysteins.

Diese robuste Reaktion lieferte hohe und reproduzierbare Ausbeuten. Die Einstellung des pH-Werts mittels kalibrierter pH-Elektrode ist der einzige Arbeitsschritt, welcher ein hohes Maß an Präzision erfordert. Die Überschreitung des isoelektrischen Punktes (pH 5.5 für Homocystein)

durch Zugabe von zuviel Säure führt zur Bildung des Thiolactons. Im basischen Milieu wiederum wird die Bildung des Dimers, Homocystins, bevorzugt. Die schnelle Zugabe von 6N HCl oder die Verwendung von konz. HCl zur pH-Einstellung, gerade im näheren Bereich zum isoelektrischen Punkt (pH 5.5), kann leicht dazu führen, dass überschüssig HCl verwendet wird und somit ein niedrigerer pH erreicht, werden kann als benötigt. Dies würde die Bildung des Homocystein-Thiolactons begünstigen. In solch einem Fall kann der anschließende Versuch zur Korrektur des pH unter Verwendung von NaOH zusätzlich zur Bildung des Homocystins, dem Dimer des Homocysteins, führen.

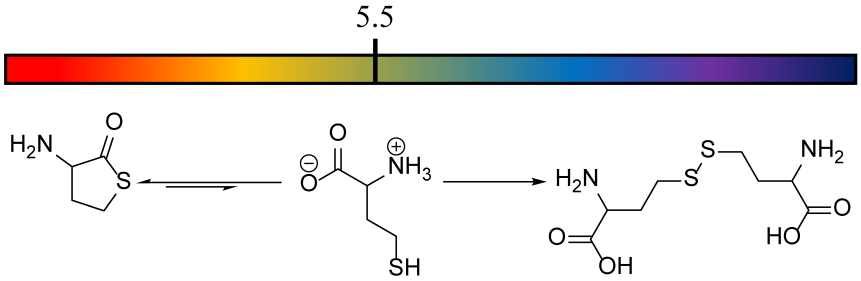


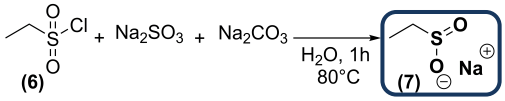
Abbildung 14: pH-abhängige Cyclisierung (Bildung des Homocystein-Thiolactons) und Dimerisierung (Bildung von Homocystin) des Homocysteins.

Im optimalen Fall wird der gewünschte pH langsam und unter Verwendung verdünnter HCl durch Annäherung erreicht, sodass es zur spontanen Kristallisation des Homocysteins (**5**) beim Erreichen des isoelektrischen Punkts kommt.

I. Herstellung der Schutzgruppe

Um Nebenreaktionen bei der Verwendung von Homocystein oder Cystein in der Festphasenpeptidsynthese oder bei der NCA-Polymerisation zu vermeiden, verlangt es nach einer geeigneten Schutzgruppe für Thiole. Diese Schutzgruppe soll die Stabilität während der Peptidsynthese mit der Fähigkeit zur Bildung asymmetrischer Disulfid-Bindungen durch chemoselektive Reaktionen kombinieren.[72, 86]

Als Schutzgruppe wurde die bereits im Arbeitskreis etablierte *S*-Ethylsulfonyl-Gruppe (**7**) verwendet, da die *S*-Alkylsulfonyl-Gruppen die oben beschriebenen Eigenschaften mit der Synthese von Homo- und Blockcopolymeren mit enger Verteilung aus den entsprechenden NCAs kombinieren.



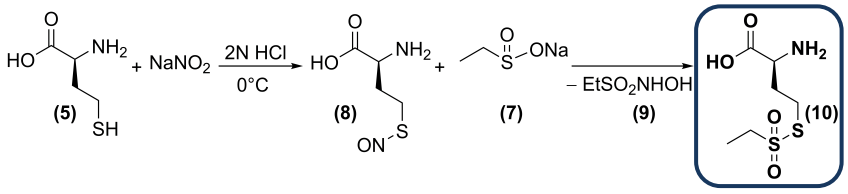
Schema 14: Darstellung von Natriumethansulfinat.

Ethansulfonylchlorid (**6**) und Natriumcarbonat wurden portionsweise zur auf 80 °C erwärmten wässrigen Natriumsulfit-Lösung gegeben. Es musste herbei besonders vorsichtig gearbeitet werden, da die Bildung von CO_2 leicht außer Kontrolle geraten kann, wenn die Zugabe schnell oder in größeren Mengen erfolgt. Das Rohprodukt, welches nach dem Entfernen des Wassers im

Vakuum erhalten wurde, wurde in Methanol suspendiert und abfiltriert. Das Natriumsalz **(7)** wurde nach dem Entfernen des Methanols erhalten.[72]

II. Herstellung von *S*-Ethylsulfonyl-L-Homocystein

Die Synthese des geschützten Homocysteins **(10)** wurde analog zum etablierten Verfahren der Schützung von Cystein durchgeführt.[87]

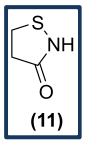


Schema 15: Darstellung von *S*-Ethylsulfonyl-L-Homocystein (**10**). Der *in situ*-hergestellte *S*-Nitrosohomocystein (**8**) reagiert mit dem Natriumethansulfinat (**7**) unter der Bildung von Thiosulfonat (**10**) und das Nebenprodukt *N*-Hydroxyethylsulfonamid (**9**) in einem 1:1-Verhältnis.

Homocystein wurde durch die Umwandlung in *S*-Nitrosohomocystein (**8**) aktiviert, welches mit Natriumethansulfinat (**7**) reagierte.

Aufgrund von vorhandenen Nebenprodukten wie z.B. *N*-Hydroxyethylsulfonamid (**9**), Ethansulfinat und -sulfonat kristallisierte das *S*-Ethylsulfonyl-L-Homocystein (Hcy) (**10**) im Gegensatz zu *S*-Ethylsulfonyl-L-Cystein nicht. Deshalb wurden verschiedene Anpassungen und Modifikationen ausprobiert, um das Produkt in Reinform zu isolieren. Es folgen die wichtigsten Beispiele:

i. Reaktion von Homocystein (**5**) mit Ethansulfonsäurechlorid (**6**) anstelle des Natriumsalzes (**7**). Hier zeigte sich das Problem der unterschiedlichen Löslichkeitsverhaltens beider Edukte. Es wurden verschiedene Lösungsmittel/-gemische (wie z.B. THF, H_2O/MeOH, Et_2O, EtOH/MeOH mit Iod, THF/H_2O, Pyridin) oder auch Lösungsmittelfrei bei verschiedenen Temperaturen (0 °C, r.t., 50 °C) ausprobiert.
ii. Reaktion von Homocystein (**5**) mit Natriumethansulfinat (**7**) in verschiedenen Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen (EtOH/MeOH (*v/v* 1/1) mit Iod; DMSO; DCM; DMSO/THF).
iii. Geänderte Reaktionsbedingungen und Reaktionspartner in der oben beschriebenen Reaktion von *S*-Nitrosohomocystein (**8**) mit Natriumethansulfinat (**7**) (Schema 15) (z.B. die Verwendung von konz. H_2SO_4 und 2N H_2SO_4 anstelle von 2N HCl und anschließender Erwärmung auf 70 °C; Zugabe von verschiedenen Mengen an 2N HCl).
iv. Durch die zusätzliche CH_2-Gruppe in der Seitenkette des Homocysteins, können möglicherweise durch intramolekulare Angriffe thermodynamisch bevorzugte 5-Ringe gebildet werden. Z. B. kann es durch den intramolekularen Angriff der α-Amingruppe zur Bildung des Isothiazolidin-Derivats (**11**) kommen. Aus diesem Grund wurde die α-Amingruppe durch die BOC-Schutzgruppe blockiert. Die Reaktion zwischen BOC-geschütztem Hcy und Ethansulfonsäurechlorid (**6**) oder Natriumethansulfinat (**7**) wurde in verschiedenen Lösungsmitteln (THF, DMF, DMSO, Et_2O) bei verschiedenen Temperaturen (0 °C, r.t., 50 °C) durchgeführt.



Schema 16: Isothioazolidin-3-on (**11**) als mögliches Nebenprodukt.

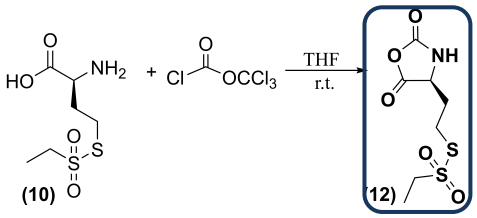
v. Zu dem Natriumsalz des Homocysteins in flüssigem Ammoniak, welches bei der Birch-Reduktion entsteht, wurde direkt Ethansulfonsäurechlorid (**6**) dazu gegeben. Des Weiteren wurde die Reaktion des isolierten Natriumsalzes mit Ethansulfonsäurechlorid in THF bei Raumtemperatur und bei 66 °C durchgeführt.
Außerdem wurde ein Versuch mit in Wasser gelöstem Natriumsalz unternommen. Nach der Zugabe von Essigsäure bei 0 °C wurde eine Ethansulfonsäurechlorid-Ether-Lösung dazugegeben.

vi. Des Weiteren wurden Methoden wie Umkristallisation (MeOH, H_2O, Aceton) und Reversed-Phase-Chromatographie (Acetonitril+0.1% TFA) zur Reinigung des Rohprodukts getestet.

Da all diese Methoden zu keinem Produkt oder keinem ausreichend sauberen Produkt führten, wurde das Rohprodukt mittels präparativer HPLC gereinigt.[74] Diese Methode lieferte ein ausreichend sauberes Produkt aber mit geringer Ausbeute (10%), welcher für die NCA-Synthese verwendet werden konnte. Nichtsdestoweniger bedarf die Reaktion zur Herstellung von *S*-Ethylsulfonyl-L-Homocystein (**10**) bedarf weiterer Optimierung.

III. Herstellung von *S*-Ethylsulfonyl-L-Homocystein-NCA (Hcy-NCA)

Hcy-NCA (**12**) wurde nach der oben beschriebenen modifizierten Variante der FUCHS-FARTHING-Methode hergestellt.



Schema 17: Darstellung von *S*-Ethylsulfonyl-l-Homocystein-NCA (**12**).

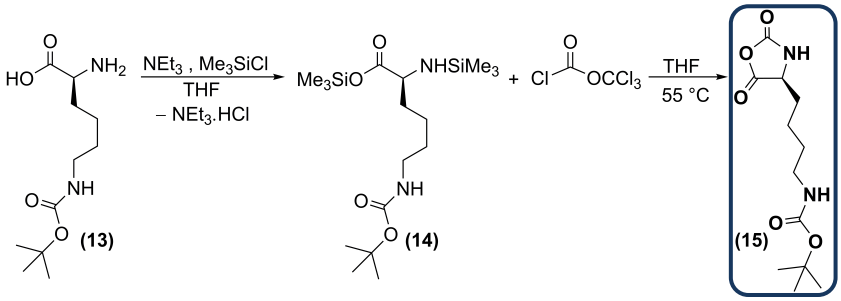
Hier wurde die Reaktion bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dem Entfernen von THF im Vakuum wurde das Rohprodukt mittels Fällung in Diethylether/*n*-Hexan gereinigt.

Hcy-NCA (**12**) konnte somit in einer Ausbeute von 41% (Lit. 44%) erhalten werden. Die Reinheit des NCAs konnte anhand des Schmelzpunktbereichs von 93.6–94.3 °C, welcher mit den Literaturwerten (95 °C) übereinstimmte, und ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestätigt werden.[74]

Einfachheitshalber wurde in dieser Arbeit *S*-Ethylsulfonyl-L-Homocystein mit Hcy abgekürzt.

3.2.3 L-Lysin(BOC)-NCA

$^{\varepsilon}$*N*-Butyloxycarbonyl-L-Lysin (Lysin(BOC))-NCA (**15**) wurde nach der oben beschriebenen modifizierten Variante der FUCHS-FARTHING-Methode, ausgehend von kommerziell erhältlichem Lysin(BOC) (**13**), hergestellt.



Schema 18: Darstellung von Lys(BOC)-NCA (**15**).

Im Gegensatz zur Sarkosin (**2**) wurde Lysin(BOC) (**13**) erst mit Trimethylsilylchlorid in Anwesenheit von Triethylamin als Base zum zweifach trimethylsilylierten Derivat (**14**) umgesetzt. Diese Spezies ist reaktiver gegenüber nucleophilen Angriffen. Anderseits wurde Triethylamin als Säure-Fänger verwendet, da die BOC-Schutzgruppe säurelabil ist und so eine an dieser Stelle ungewollte Abspaltung der Schutzgruppe vermieden wird. Das als farbloser Feststoff ausgefallene Triethylamin-Hydrochlorid wurde vor der Zugabe von Diphosgen *via* Filtration entfernt.

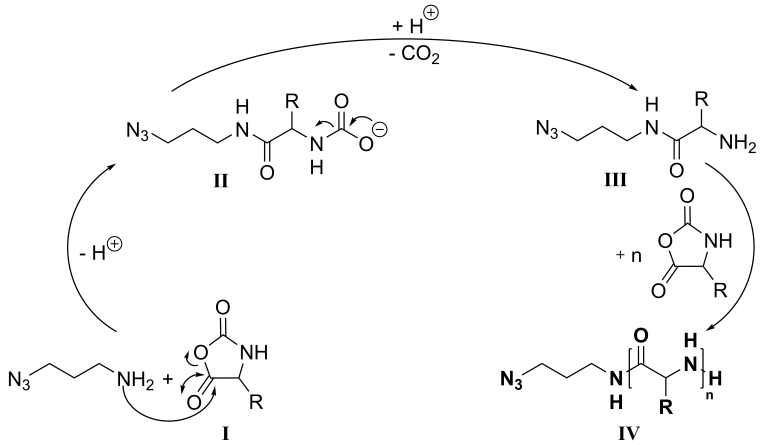
Das Vermeiden einer kationischen ROP des Lösungsmittels THF sowie eine an dieser Stelle ungewollten Initiation der NCA-Polymerisation durch schwach nucleophile Chlorid-Ionen sind weitere Vorteile dieser im Arbeitskreis gängigen Praxis.

Da bereits während der Diplomarbeit festgestellt wurde, dass die Fällungsmethode, die im Arbeitskreis verwendet wird, für diesen NCA (**15**) zu keiner ausreichend hohen Reinheit führt, wurde alternativ eine Umkristallisationsprozedur entwickelt, die zu NCAs sehr hoher Reinheit führt, jedoch mit einer niedrigeren Ausbeute 32%. Diese Prozedur wurde während der Doktorarbeit weiter optimiert, was nicht nur zu NCAs sehr hoher Reinheit, sondern auch zu hohen Ausbeuten führte. Hierfür wurde der Feststoff, der nach dem Entfernen des Lösungsmittels erhalten wurde, aus einem *n*-Hexan/THF-Gemisch (*v/v* 0.7/1) umkristallisiert. Somit konnte Lysin(BOC)-NCA (**15**) in einer Ausbeute von 86% (Lit. 68%) erhalten werden. Die Reinheit des NCAs konnte anhand des Schmelzpunktbereichs von 134.8 – 136.4 °C, welcher mit den Literaturwerten (134 − 137 °C) übereinstimmte, und ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestätigt werden.[7] Das erhaltene Produkt konnte erfolgreich für nachfolgende Polymerisationen eingesetzt werden.

3.3 Polymersynthese

3.3.1 Polymerisationsmechanismus

Die zuvor beschriebenen N-Carboxyanhydride wurden zunächst in einer nucleophilen ringöffnenden Polymerisation (ROP) umgesetzt. Mechanistisch beginnt die ROP mit einem nucleophilen Angriff des Initiator-Stickstoffs an das elektrophilere der beiden Carbonyl-C-Atome (C5) des NCAs (**I**), welcher nach Auflösung des zwitterionischen tetraedrischen Übergangszustandes zu einer Ringöffnung führt. Infolgedessen entsteht unter spontaner Abspaltung von CO_2 das Aminosäureamid (**II**). Der so erhaltene primäre (im Falle von Sarkosin (**2**) sekundäre) Stickstoff (**III**) dient nun erneut als Nucleophil und der Angriff auf ein weiteres NCA-Molekül setzt das Kettenwachstum fort, sodass letztendlich das Polymer (**IV**) daraus hervorgeht.



Schema 19: Mechanismus der Ringöffnende Polymerisation (ROP).

Der Reaktionsfortschritt wird standardmäßig mittels IR-Spektroskopie untersucht. Die Abnahme der Intensität der beiden charakteristischen NCA-Carbonylbanden bei ca.1850 cm^{-1} (C5-Carbonyl) und 1780 cm^{-1} (C2-Carbonyl) ist proportional zur Monomer-Umsetzung.

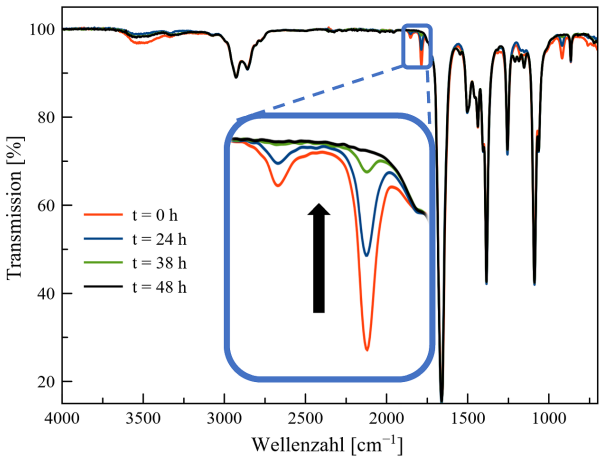
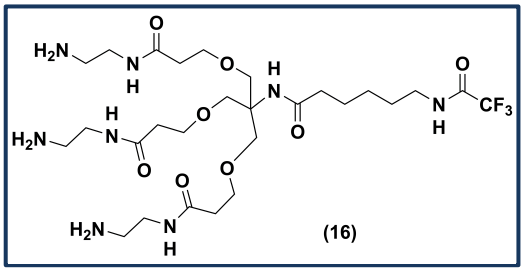


Abbildung 15: Kontrolle des Reaktionsverlaufs *via* IR-Spektroskopie (ATR). Das Verschwinden der Carbonyl-Banden deutet auf einen vollständigen Umsatz des Monomers hin.

3.4 Polypept(o)ide

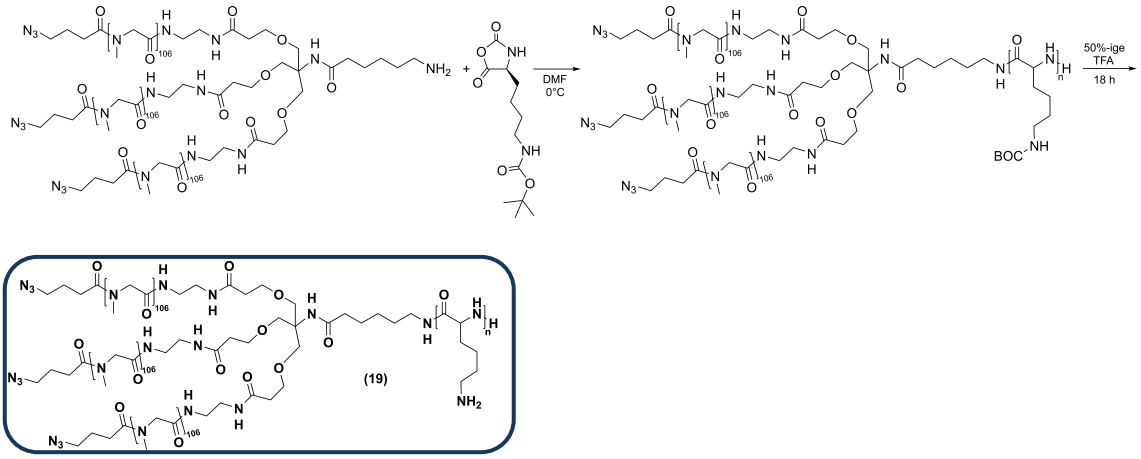
3.4.1 Miktoarm-Diblockcopolypept(o)ide

Es wurde bereits an einem multivalenten Initiator (TFA-Ahx-Tris{[2-(ethylendiamincarbonyl)ethoxy]methyl}methylamid) (**16**) Sarkosin polymerisiert und die Endgruppen mit Azid-Einheiten funktionalisiert.



Schema 20: Struktur des tetra-funktionale Initiators TFA-Ahx-Tris (**16**).

Dieses Miktoarmpolymer (**17**) wurde als Makroinitiator für die Herstellung von Diblockcopolypept(o)iden (**19**) mit pLys verwendet.



Schema 21: Reaktionsschema der Miktoarm-Diblockcopolypept(o)ide (**19**) mit $(N_3\text{-pSar})_3$ (**17**) als Makroinitiator.

Da das $(N_3\text{-pSar}_{106})_3$-Polymer (**17**) bereits im Vorfeld eine niedermolekulare Schulter im GPC-Elugramm aufwies (Abbildung 16), zeigten die daraus hergestellten Diblöcke ebenfalls diese niedermolekulare Schulter.

Die Polymere (**18a-b**) wurden mit 50%iger TFA entschützt und drei Tage gegen eine 2%ige Essigsäure-Lösung dialysiert. Nach der Entschützung zeigen die Polymere keine zusätzlich auftretenden Kurven im GPC-Elugramm, was eine Fragmentierung des Polymers, während der Entschützungsreaktion ausschließen ließ.

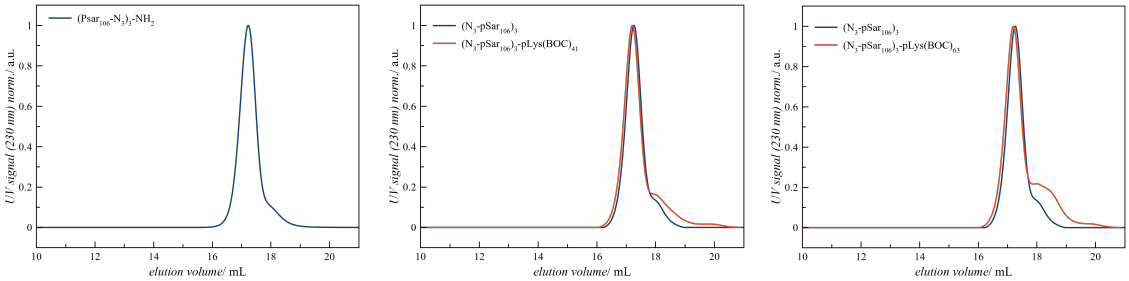


Abbildung 16: GPC-Elugramme des $(N_3\text{-pSar}_{106})_3$-Polymers (**17**) und der Miktoarm-Diblockcopolymere (**18a-b**).

Die Entschützungsreaktion wurde mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie kontrolliert. Dies ist anhand des distinkten ^{e}N*H*-Signals zu beobachten, welches nach einem vollständigen Umsatz komplett verschwindet.

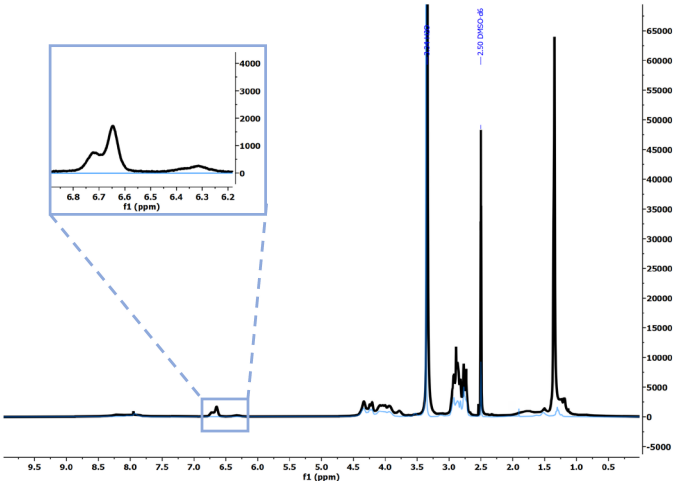


Abbildung 17: ^{1}H-NMR der Miktoarm Di-Block vor (schwarz) (**18a**) und nach (blau) (**19a**) dem Entschützen.

Die Konnektivität zwischen den Blöcken wurde anhand derselben Diffusionskoeffizienten im DOSY-Spektrum von $(N_3\text{-pSar}_{106})_3$-*b*-$pLys_{43}$ (**19a**) (Abbildung 18) bewiesen.

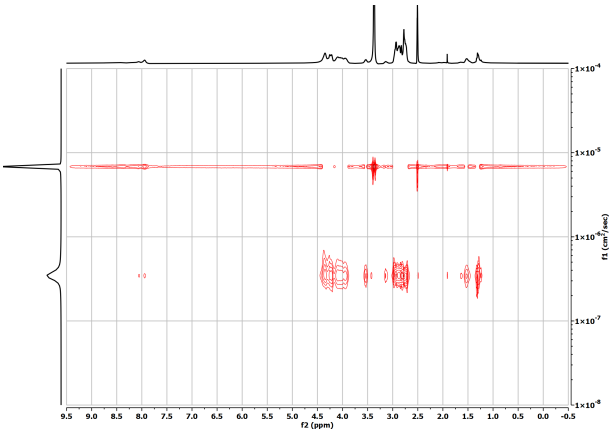
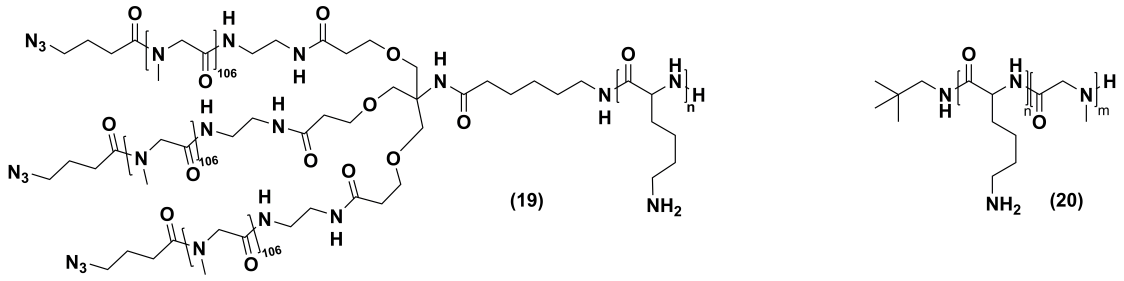


Abbildung 18: DOSY von Miktoarm-Diblock ($(N_3\text{-pSar}_{106})_3$-*b*-$pLys_{43}$ (**19a**)).

Um den Einfluss unterschiedlicher Topologien bei der pDNA-Transfektion zu untersuchen, wurden Miktoarm (**19**)-Diblockcopolypept(o)iden mit linearen Diblockcopolypept(o)iden (**20**) von HELLER *et al*. verglichen.[56] Der pLys-Block der Miktoarm-Blockcopolymeren (**19**) wurde in Bezug auf die Kettenlänge am pLys-Block der linearen Diblöcke (**20**) angepasst, und zwar basierend auf den Polyplexen mit der höchsten (P3) und niedrigsten (P4) Transfektionseffizienz.



Schema 22: Polymerstrukturen von linearen (**20**) und Miktoarm-Diblockcopolypept(o)iden (**19**).

Die hergestellten Polyplexe mit den Miktoarm-Diblöcke (**19a-b**) wurden über den Zetasizer und über die Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Die Polyplexe (**P19a, P19b**) zeigten in der Agarose-Gelelektrophorese eine vollständige Komplexierung der pDNA bei einem N/P-Verhältnis von 2.

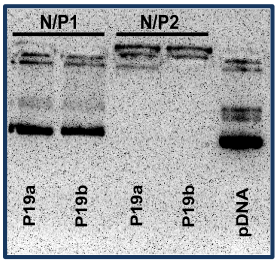


Abbildung 19: Agarose-Gelelektrophorese der Polyplexe basierend auf Miktoarm-Diblockcopolypept(o)ide $(N_3\text{-pSar}_{106})_3$-*b*-$\text{pLys}_{43}$ (**P19a**) und $(N_3\text{-pSar}_{106})_3$-*b*-$\text{pLys}_{63}$ (**P19b**).

Die charakteristischen Daten zu den jeweiligen Polymeren und den daraus resultierenden Polyplexe können Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 1: Charakterisierung der Polyplexe aus pSar-*b*-pLys-Copolymere (**19, 20**).

Polymer	**pSar:pLys-Länge**	**Đ**	**Lys-Anteil (M_{pLys}:M_{Total})**	**Z-Ave [d.nm]**	**ζ-Potential [mV]**
Linear (**P3**)	171:32	1.14	25%	80	n.a.
Linear (**P4**)	255:32	1.18	18%	81.4	n.a.
Miktoarm (**P19a**)	318:43	1.41	18%	96.3	7.4
Miktoarm (**P19b**)	318:63	1.40	25%	94.1	8.6

Die Polyplexe der Miktoarm-Diblöcke besaßen im Vergleich zu den Polyplexen der linearen Diblöcke einen größeren Durchmesser. Dies kann auf die größere Anzahl an Sarkosin-Einheiten

und die höhere Flexibilität der pSar-Ketten aufgrund ihrer Verzweigung zurückzuführen sein. Es konnte kein Vergleich bezüglich des ζ-Potentials bezogen werden, da diese Daten über die linearen Diblöcke nicht vorlagen.

Die Transfektionseffizienz der Polyplexe in HEK 293T-Zellen wurde mittels Luciferase-Assay untersucht.

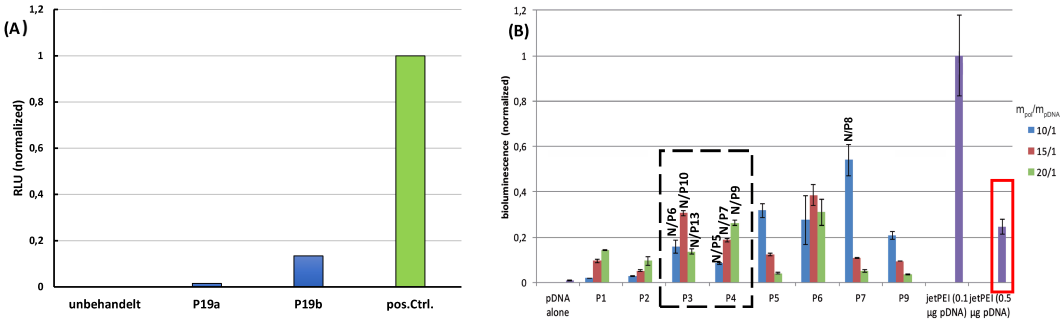


Abbildung 20: Normalisierte RLU-Werte nach 18 h Inkubation der HEK 293T-Zellen mit $(N_3\text{-pSar}_{106})_3$-*b*-pLys-Polyplexen (N/P6; 1 µg pDNA; DOTAP als pos. Kontrolle) (A). Normalisierte Biolumineszenz nach 18 h Inkubation der HEK 293T-Zellen mit pSar-*b*-pLys-Polyplexe (0.5 µg pDNA) (B).

Das für den linearen pSar-*b*-pLys-basierten Polyplexe verwendete $m_{Polymer}/m_{pDNA}$-Verhältnis berücksichtigt im Gegensatz zum N/P-Verhältnis den Lysinsgehalt nicht. Dies ist gerade bei der Variation des Lysinsgehalts zwischen verschiedenen Polypeptiden zum Vergleich deren Transfektionsraten von Bedeutung. Nicht nur die unterschiedlichen N/P-Verhältnisse, sondern die zusätzlich fehlgeschlagene dazugehörige Positivkontrolle (mit 0.5 µg pDNA) erschwerte deren Vergleich insgesamt mit den Miktoarm-Polyplexe. Bei Außerachtlassung dieses Aspektes würden P3 und P19b im direkten Vergleich bei N/P6 ähnliche Expressionsraten aufweisen, wohingegen P19a im Vergleich zu P4 kaum eine Expression der pDNA zeigen würde.

Die fehlgeschlagene Positivkontrolle bei 0.5 µg pDNA wird von HELLER *et al*. mit der Toxizität von PEI begründet. Jedoch, die von ihm durchgeführten Cytotoxizitätstest *via* Annexin V-Assay mit 5 µg pDNA zeigten keinerlei Toxizität bei jetPEI an. Es zeigten sich bei JetPEI 9%, P3 6% und pDNA 7% (neg. Kontrolle) Annexin-positive HEK-Zellen.[56]

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse des Luciferase-Assays, dass die Polyplexe aus linearen- sowie Miktoarm-Polymeren keine nennenswerte Genexpression aufweisen. Eine Expression in DC2.4-Zellen blieb bei den beiden Systemen aus.[55]

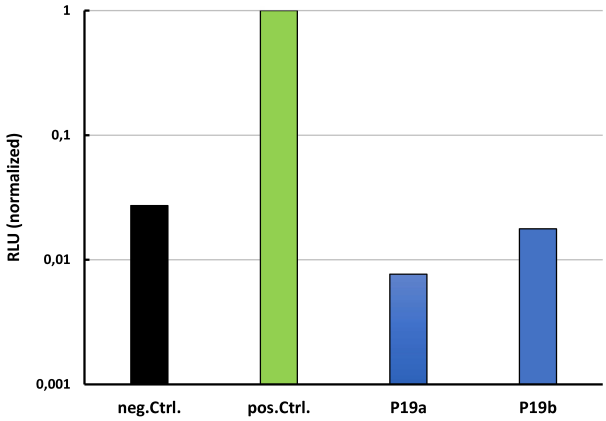


Abbildung 21: Normalisierte RLU-Werte bei N/P6 nach 18 h Inkubation der DC2.4 mit Miktoarm-Polyplexen; n=2.

Der Grund für die negativen Ergebnisse liegen an fehlenden endosomolytischen Eigenschaften der Diblöcke. Polylysins vollständige Bioabbaubarkeit und moderate Cytotoxizität macht es zwar vor allem für die *in vivo*-Anwendungen attraktiv, aber dem Polylysin fehlt es im Gegensatz zu PEI an Aminogruppen mit pK_a-Werten zwischen 5 und 7.[88] Dadurch ist letztlich der *endosomal escape* dieser Polyplexe limitiert und es wird die Zugabe eines endosomolytischen Agens wie beispielsweise Chloroquin benötigt. Die Chloroquin-Zugabe bei den Transfektionstests der pLys-haltigen Polymere wurde bereits von WAGNER *et al*., KATAOKA *et al*. und vielen anderen Arbeitsgruppen beschrieben.[67, 89-90] KATAOKA *et al*. verwendeten Chloroquin z.B. bei den bereits erwähnten Thiol-haltigen PEG-*b*-PLys-Polyplexen (PEG-PLL-IM/-MP; s. 1.7.Polyplex-Design und -Entwicklung S.15).[70] Des Weiteren beschrieben sie für die PEG-pLys-Diblöcke, dass ohne den Zusatz von Chloroquin keinerlei Genexpression detektierbar sei.[91]

Die Synthese der Triblockcopolymere sollte durch die Einführung eines zusätzlichen, mittleren Poly-L-Homocystein(SO_2Et)-Blocks als Lösungsansatz dienen, indem fusogene oder endosomolytische Peptide durch nachträglichen Polymer-Modifikationen über Disulfid-Bindungen eingeführt werden.

3.4.2 Lineare Triblöcke

- **Homopolymer-Synthese (N_3-pSar$_n$)**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde 3-Azido-1-aminopropan (**1**) als Standard-Initiator verwendet. Es wurden zwei Sarkosin-Homopolymere (**21**) mit Kettenlängen zu jeweils 100 (**21b**) und 200 (**21a**) Einheiten hergestellt. Die Kettenlänge des Polymers wird über das molare Verhältnis des Initiators zum NCA kontrolliert.

In den meisten Fällen wird die Quantifizierung der Kettenlänge eines Polymers über ^{1}H-NMR anhand der Protonen-Anzahl der Monomer-Einheit relativ zu den Protonen des Initiators berechnet.

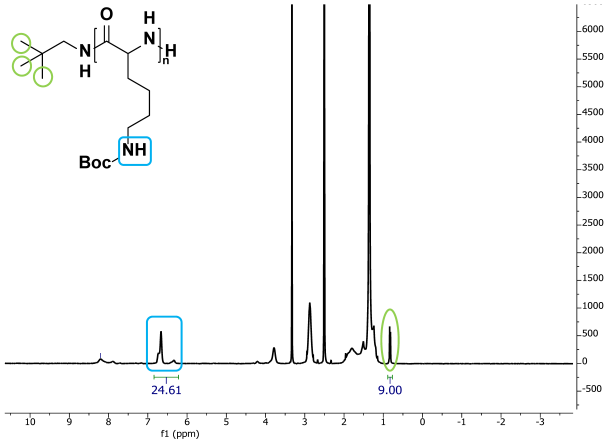


Abbildung 22: Die Bestimmung der Länge des Polymers *via* ^{1}H-NMR durch Relativierung zu Initiator-Protonen.

Manchmal werden die Initiator-Signale aber von anderen Signalen überlagert oder das Signal-Rausch-Verhältnis der Initiator-Protonen ist zu klein, sodass eine zuverlässige Bestimmung der Kettenlänge *via* ^{1}H-NMR nicht mehr möglich ist. Hierbei kann die Bestimmung anhand von GPC-Messungen erfolgen.

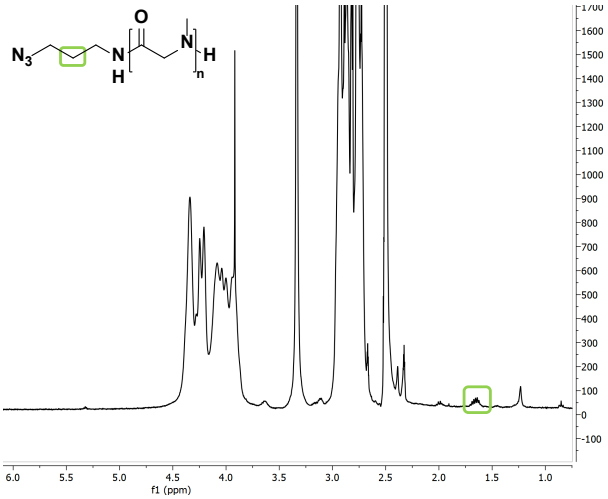
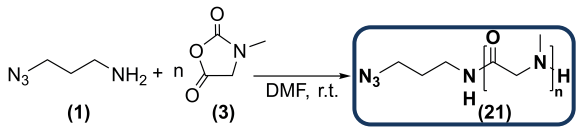


Abbildung 23: Aufgrund des zu kleinen Signal-Rausch-Verhältnisses von Initiator-Protonen ist die Bestimmung der Blocklänge erschwert.

WEBER *et al*. zeigten, dass bei der HFIP-GPC die Verwendung einer universellen Kalibrierung aus PMMA-(Polymethylmethacrylat)-Standards gerade bei den pSar-Homopolymeren nicht sinnvoll sei, da der R_h-Wert des PMMA in HFIP im Vergleich zu anderen Lösungsmitteln (z.B. Aceton) hoch ist, welches zur Unterschätzung der Molekulargewichte der Polypeptide führen würde.[44] Deshalb wurden hierbei die Sarkosin-Kettenlängen durch die Verwendung einer auf pSar-basierenden Universalkalibrierung bestimmt.

Sarkosin-Homopolymer (**21**) wurde wie zuvor beschrieben über eine nucleophile ROP mit 3-Azido-1-aminopropan (**1**) als Initiator in abs. DMF bei Raumtemperatur hergestellt.



Schema 23: Reaktionsschema des Sarkosin-Homopolymers (**21**) initiiert durch einen Azid-funktionalisierten Initiator (**1**).

Das GPC-Elugramm beider Sarkosin-Homopolymere (**21**) zeigten eine einzige diffundierende Polymerspezies, welches als Beweis für die Nicht-Anwesenheit von Nebenprodukten, die z.B. durch ungewollte Initiierungen (z.B. durch Wasser) entstanden sein könnten, gilt. Die Verschiebung der einzelnen Elugramme hin zu kleineren Elutionsvolumina in Abhängigkeit zur Zunahme des hydrodynamischen Radius war gut zu erkennen.

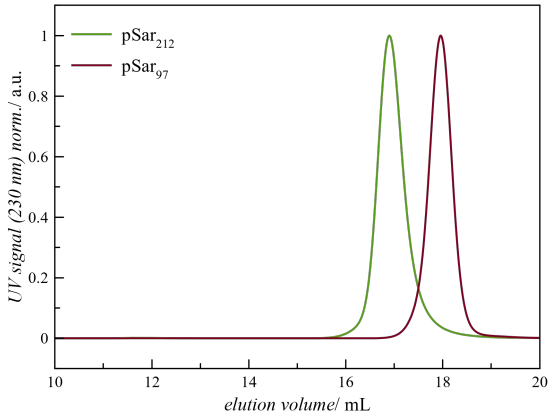
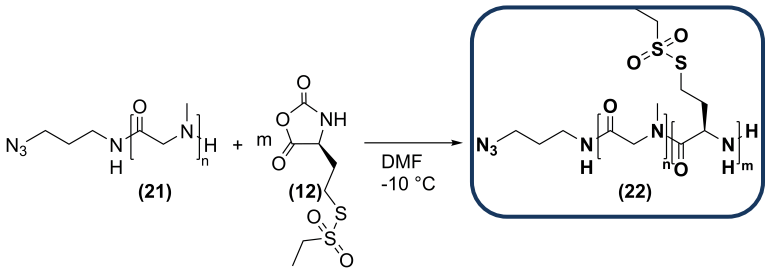


Abbildung 24: GPC-Elugramme der Sarkosin-Homopolymere (**21a, 21b**).

- **Diblock-Synthese (pSar$_n$-*b*-pHcy$_m$)**

pSar$_n$-*b*-pHcy$_m$ (**22**) wurde durch nucleophile ROP mit Sarkosin-Homopolymer (**21**) als Makroinitiator in abs. DMF bei −10 °C hergestellt. Dabei wurde das Hcy-NCA (**12**) als Stamm-Lösung angesetzt.



Schema 24: Reaktionsschema für pSar$_n$-*b*-pHcy$_m$ (**22**) mit pSar (**21**) als Makroinitiator.

Die hergestellten Diblöcke (**22**) und Triblöcke (**23**) wurden in einer One-Pot-Synthese hergestellt. Der Vorteil hierbei liegt in der Vermeidung einer Isolation und Fällung jeder einzelnen Stufe, was zu einer effektiven Minimierung und Umgehung möglicher Verunreinigungen wie z.B. Wasser (da Sarkosin hygroskopisch ist) führt.

Die oben beschriebenen Sar-Homopolymerlösungen (**21**) wurden zunächst gedrittelt. Durch das Initiator-Monomer-Verhältnis wurde die benötigte Menge an Hcy-NCA (**12**) berechnet. Diese wurde aus der angesetzten Stammlösung dazu gegeben.

Die DOSY-Messungen zeigten keine zusätzlichen diffundierenden Spezies, welche die Konnektivität der Blöcke zu einer Polymerspezies und die Abwesenheit von Homopolymeren bewies.

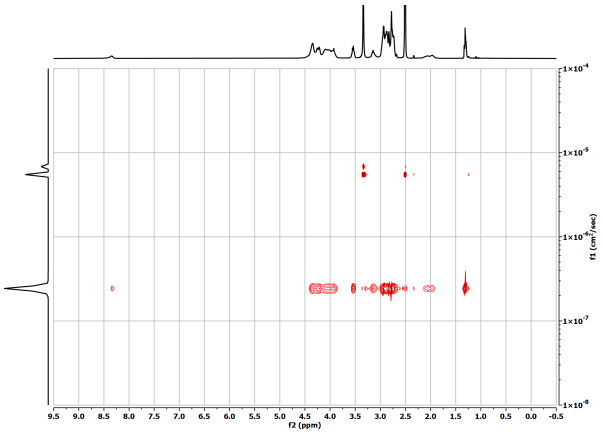


Abbildung 25: DOSY von $pSar_{212}$-*b*-$pHcy_{19}$ (**22b**).

Die PDI-Werten (Đ) der linearen Diblöcke (**22a-f**) mit drei unterschiedlichen pHcy-Kettenlängen kann Tabelle 2 entnommen werden.

Tabelle 2: GPC-Daten der $pSar_n$-*b*-$pHcy_m$-Blockcopolypept(o)ide (**22a-f**).

Polymer	**Đ**	**Polymer**	**Đ**
N_3-$pSar_{212}$-*b*-$pHcy_{11}$ (**22a**)	1.12	N_3-$pSar_{97}$-*b*-$pHcy_8$ (**22d**)	1.13
N_3-$pSar_{212}$-*b*-$pHcy_{19}$ (**22b**)	1.14	N_3-$pSar_{97}$-*b*-$pHcy_{17}$ (**22e**)	1.13
N_3-$pSar_{212}$-*b*-$pHcy_{27}$ (**22c**)	1.19	N_3-$pSar_{97}$-*b*-$pHcy_{27}$ (**22f**)	1.14

Zur Veranschaulichung sind die GPC-Elugramme zweier Diblöcke, einmal mit $pSar_{212}$ (**22a**) und einmal mit $pSar_{97}$ (**22d**) gegeneinander aufgetragen (s. Abbildung 26). Wie zu erwarten eluierte das größere Polymer bei einem niedrigeren Elutionsvolumen als das kleinere Polymer. Der monomodale Kurvenverlauf der GPC-Elugramme bestätigte, dass ausschließlich Diblöcke (**22**) und keine Nebenprodukte vorhanden waren.

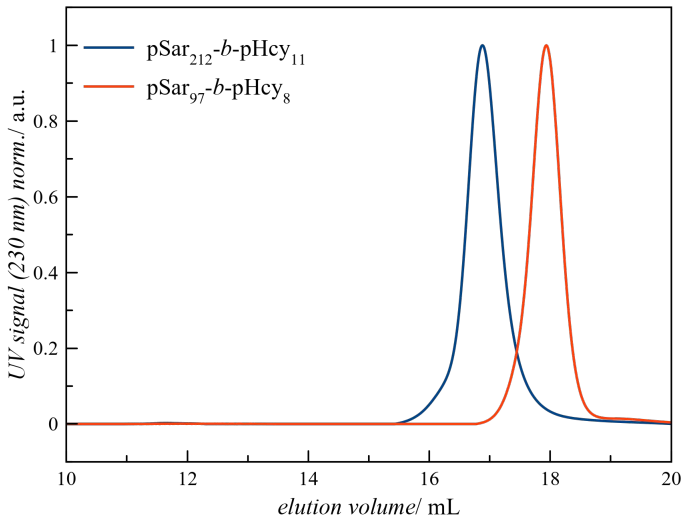
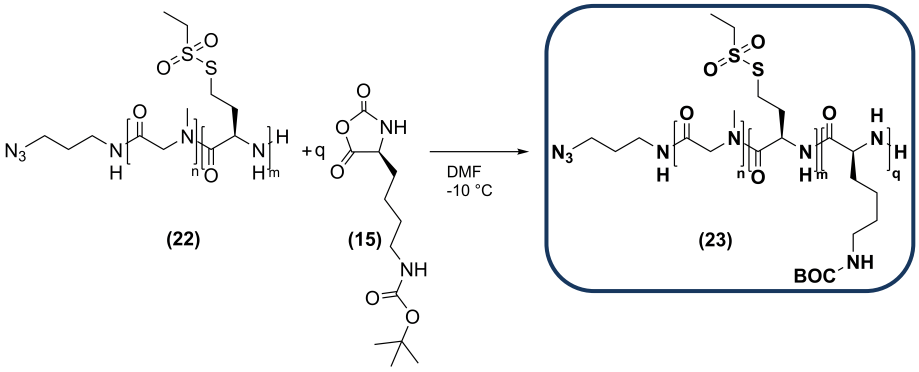


Abbildung 26: $pSar_{212}$-*b*-$pHcy_{11}$ (**22a**) *vs.* $pSar_{97}$-*b*-$pHcy_{8}$ (**22d**).

- **Triblock-Synthese ($pSar_n$-*b*-$pHcy_m$-*b*-$pLys(BOC)_q$)**

$pSar_n$-*b*-$pHcy_m$-*b*-$pLys(BOC)_q$ (**23**) wurden durch nucleophile ROP mit den Diblöcken ($pSar_n$-*b*-$pHcy_m$) (**22**) als Makroinitiator in abs. DMF bei −10 °C hergestellt. Diese Diblöcke (**22**) wurden vorher jeweils in zwei Teile aufgeteilt. Dabei wurde das Lys(BOC)-NCA (**15**) als Stamm-Lösung angesetzt und die benötigte Menge zur Diblock-Lösung hinzugegeben. Es ergaben sich insgesamt 12 verschiedene Polymere.



Schema 25: Reaktionsschema der $pSar_n$-*b*-$pHcy_m$-*b*-$pLys(BOC)_q$ (**23**).

Eine Übersicht der linearen Triblockcopolypept(o)ide (**23a-l**) und die dazugehörigen PDI-Werten kann der Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3: GPC-Daten der linearen Triblockcopolypept(o)ide (**23a-l**).

Polymer	Đ	Polymer	Đ
N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{11}$-*b*-pLys(BOC)$_{21}$ (**23a**)	1.18	N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{8}$-*b*-pLys(BOC)$_{21}$ (**23g**)	1.17
N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{19}$-*b*-pLys(BOC)$_{21}$ (**23b**)	1.20	N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{17}$-*b*-pLys(BOC)$_{22}$ (**23h**)	1.18
N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{27}$-*b*-pLys(BOC)$_{23}$ (**23c**)	1.20	N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{27}$-*b*-pLys(BOC)$_{20}$ (**23i**)	1.20
N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{11}$-*b*-pLys(BOC)$_{7}$ (**23d**)	1.18	N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{8}$-*b*-pLys(BOC)$_{8}$ (**23j**)	1.20
N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{19}$-*b*-pLys(BOC)$_{7}$ (**23e**)	1.19	N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{17}$-*b*-pLys(BOC)$_{9}$ (**23k**)	1.23
N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{27}$-*b*-pLys(BOC)$_{9}$ (**23f**)	1.22	N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{27}$-*b*-pLys(BOC)$_{9}$ (**23l**)	1.20

In der Abbildung 27 sind die GPC-Elugramme zweier Polymere einmal mit pSar$_{212}$ (**23c, 23f**) und einmal mit pSar$_{97}$ (**23i, 23l**), mit zwei unterschiedlich langen pLys-Ketten vergleichsweise dargestellt. Die Elugramme der pSar$_{97}$ (**23i, 23l**)-Polymere sind im Vergleich zu den pSar$_{212}$ (**23c, 23f**)-Polymeren zu höheren Elutionsvolumina (nach rechts) verschoben. Der ausschlaggebende Grund für diese Verschiebung ist die Länge der pSar-Einheit, da der pSar-Block im Vergleich zum pHcy- oder pLys-Block einen wesentlich größeren Beitrag zum hydrodynamischen Volumen des Polymers besitzt.

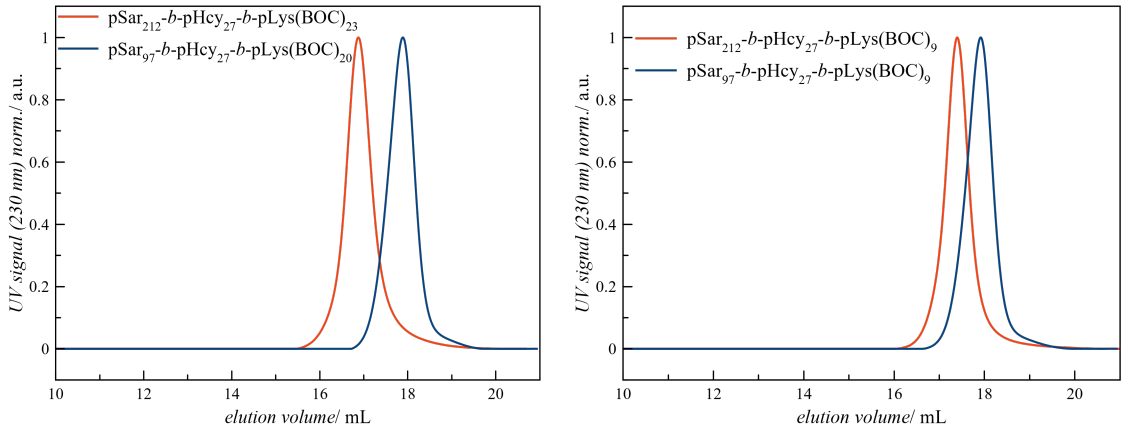
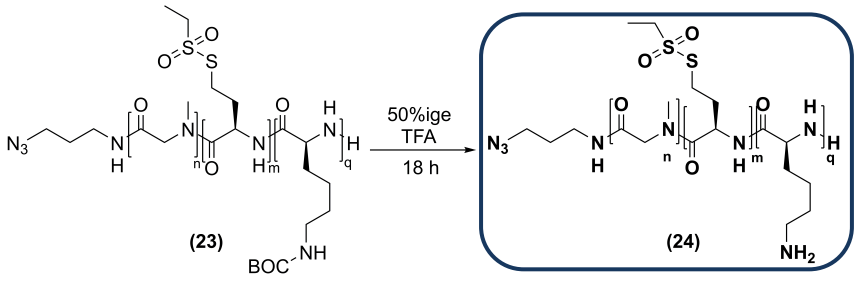


Abbildung 27: GPC-Elugramme der linearen Triblockcopolypept(o)ide (**23c**) *vs.* (**23i**) (links) und (**23f**) *vs*. (**23l**) (rechts).

- **Reaktive Triblockcopolypept(o)ide**

Durch die saure Spaltung der BOC-Schutzgruppe im Lysine-Block wurden reaktive Triblöcke (**24**) hergestellt, die für die Komplexierung der Nukleinsäuren zu Polyplexen (**P24**) verwendet werden. Die Entschützung der Lys-Ketten erfolgte unter Verwendung einer 50%igen wässrigen TFA-Lösung.



Schema 26: Reaktionsschema der sauren Spaltung der BOC-Schutzgruppe.

Der Reaktionsfortschritt wurde anhand des $^{\varepsilon}$NH-Signals im ^{1}H-NMR-Spektrum kontrolliert, welcher nach vollständigem Umsatz zum freien Amin verschwindet.

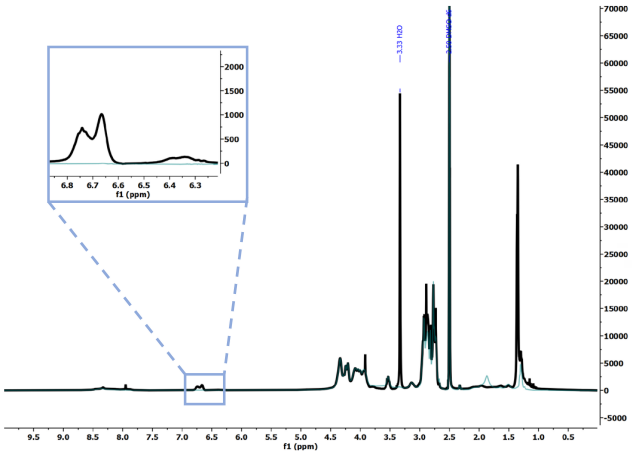


Abbildung 28: ^{1}H-NMR von N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{11}$-*b*-pLys(BOC)$_{21}$ (**23a**) (schwarz) und N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{11}$-*b*-pLys$_{21}$ (**24a**) (blau).

Die Charakterisierung der BOC-entschützten reaktiven Triblöcke (**24a-l**) mittels GPC kann Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4: GPC-Daten der reaktiven Triblockcopolypept(o)ide (**24a-f**).

Polymer	Đ	Polymer	Đ
N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{11}$-*b*-pLys$_{21}$ (**24a**)	1.19	N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{8}$-*b*-pLys$_{21}$ (**24g**)	1.20
N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{19}$-*b*-pLys$_{21}$ (**24b**)	1.20	N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{17}$-*b*-pLys$_{22}$ (**24h**)	1.24
N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{27}$-*b*-pLys$_{23}$ (**24c**)	1.20	N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{27}$-*b*-pLys$_{20}$ (**24i**)	1.30
N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{11}$-*b*-pLys$_{7}$ (**24d**)	1.22	N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{8}$-*b*-pLys$_{8}$ (**24j**)	1.17
N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{19}$-*b*-pLys$_{7}$ (**24e**)	1.23	N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{17}$-*b*-pLys$_{9}$ (**24k**)	1.32
N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{27}$-*b*-pLys$_{9}$ (**24f**)	1.25	N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{27}$-*b*-pLys$_{9}$ (**24l**)	1.30

Die GPC-Elugramme der BOC-entschützten Polymere (**24**) wiesen einen monomodalen Charakter auf, somit kann eine Fragmentierung des Polymers im Laufe der Entschützungsreaktion ausgeschlossen werden.

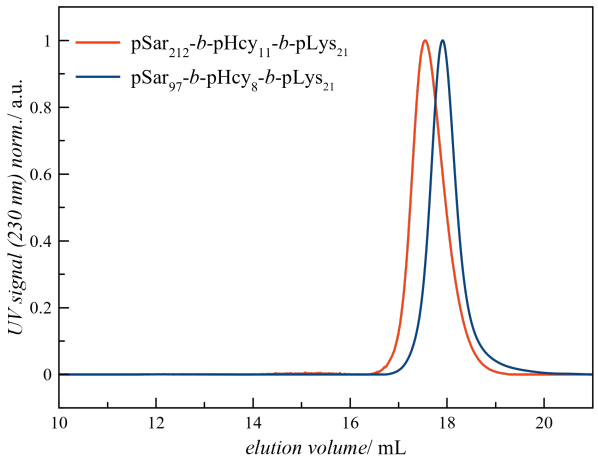
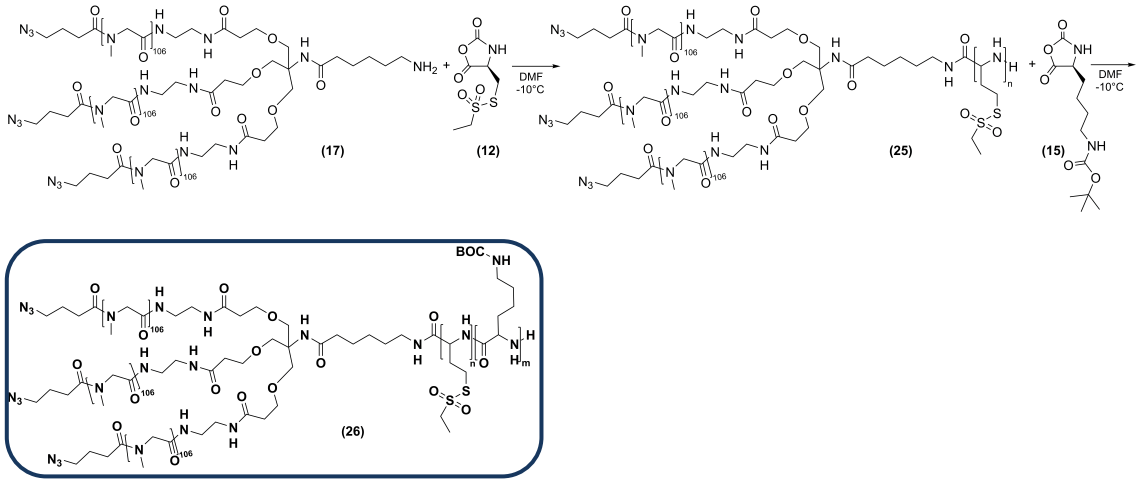


Abbildung 29: GPC-Elugramm $pSar_{212}$-*b*-$pHcy_{11}$-*b*-$pLys_{21}$ (**24a**) vs. $pSar_{97}$-*b*-$pHcy_{8}$-*b*-$pLys_{21}$ (**24g**).

3.4.3 Miktoarm-Triblöcke

Dasselbe Miktoarm-Polysarkosin (**17**), das für die Synthese der Miktoarm-Diblöcke (**19**) verwendet wurde, wurde für die Herstellung von Triblöcken (**26**) verwendet. Diese wurden analog zu den linearen Triblöcken synthetisiert und analysiert.



Schema 27: Synthese der Miktoarm-Triblockcopolypept(o)ide (**26**).

In Tabelle 5 sind die GPC-Daten der resultierenden Diblöcke (**25a-b**) aufgeführt.

Tabelle 5: GPC-Daten der $(N_3$-$pSar_{106})_3$-*b*-$pHcy_n$-Blockcopolypept(o)iden (**25a-b**).

Polymer	Đ
$(N_3$-$pSar_{106})_3$-NH_2 (**17**)	1.30
$(N_3$-$pSar_{106})_3$-*b*-$pHcy_{28}$ (**25a**)	1.27
$(N_3$-$pSar_{106})_3$-*b*-$pHcy_{15}$ (**25b**)	1.23

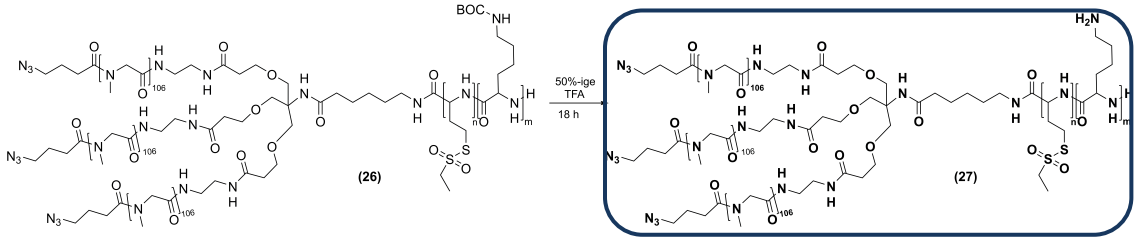
Es ergaben sich insgesamt vier unterschiedliche Miktoarm-Triblockcopolypept(o)ide (**26a-d**).

Tabelle 6: GPC-Daten der Miktoarm-Triblöcke (**26a-d**).

Polymer	Đ
$(N_3\text{-pSar}_{106})_3\text{-}b\text{-pHcy}_{28}\text{-}b\text{-pLys(BOC)}_9$ (**26a**)	1.35
$(N_3\text{-pSar}_{106})_3\text{-}b\text{-pHcy}_{28}\text{-}b\text{-pLys(BOC)}_{18}$ (**26b**)	1.29
$(N_3\text{-pSar}_{106})_3\text{-}b\text{-pHcy}_{15}\text{-}b\text{-pLys(BOC)}_8$ (**26c**)	1.26
$(N_3\text{-pSar}_{106})_3\text{-}b\text{-pHcy}_{15}\text{-}b\text{-pLys(BOC)}_{18}$ (**26d**)	1.26

- **Reaktive Miktoarm-Triblöcke**

Um die hergestellten Triblöcke (**26**) zur Komplexierung der Nukleinsäuren zu Polyplexen (**P27**) verwenden zu können, wurden durch saure Abspaltung der BOC-Schutzgruppe der Lysin-Gruppen, reaktive Triblöcke (**27**) hergestellt.



Schema 28: Reaktionsschema der reaktiven Miktoarm-Triblöcke (**27**).

Auch hier wurde der Reaktionsfortschritt anhand des Verschwindens des $^{\varepsilon}$N*H*-Peak im ^{1}H-NMR-Spektrum beobachtet. Die GPC-Elugramme zeigten keine zusätzliche Aggregat-Bildung oder Defragmentierung des Polymers.

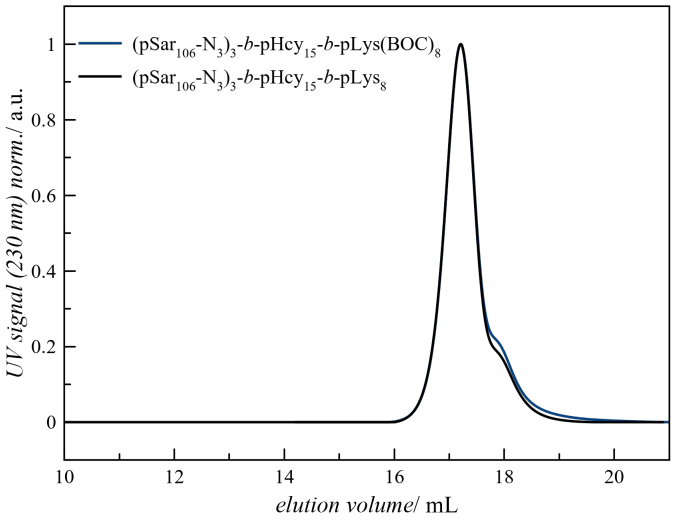


Abbildung 30: GPC-Elugramm des Miktoarm-Polymers (**26a**).

Die GPC-Daten der entschützten Triblöcke (**27a-d**) sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: GPC-Daten der entschützten Miktoarm-Triblöcke (**27a-d**).

Polymer	Đ
$(N_3\text{-pSar}_{106})_3$-*b*-pHcy$_{28}$-*b*-pLys$_9$ (**27a**)	1.38
$(N_3\text{-pSar}_{106})_3$-*b*-pHcy$_{28}$-*b*-pLys$_{18}$ (**27b**)	1.37
$(N_3\text{-pSar}_{106})_3$-*b*-pHcy$_{15}$-*b*-pLys$_8$ (**27c**)	1.28
$(N_3\text{-pSar}_{106})_3$-*b*-pHcy$_{15}$-*b*-pLys$_{18}$ (**27d**)	1.27

3.4.4 Lipopolypept(o)ide

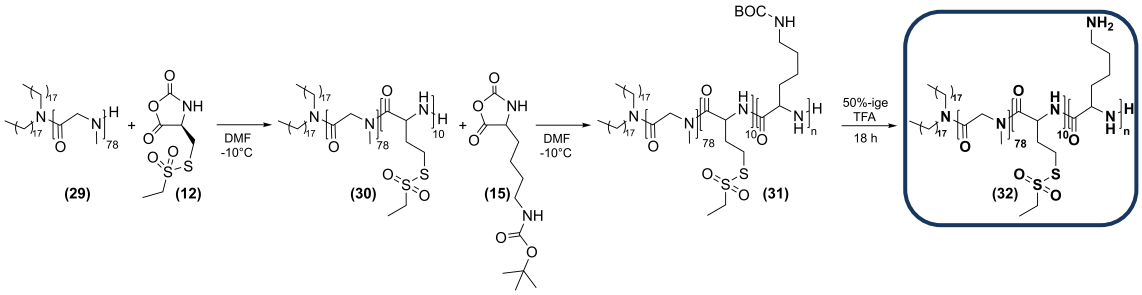
Die bisalkylierten Lipopolymere zeigten im Vergleich zu Cholesterin-basierten Lipopolymeren eine stabilere Integration in Lipiddoppelschichten, indem sie durch ihre flexiblen Kohlenwasserstoffketten stärkere Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit den hydrophoben Einheiten der Lipidmembran aufbauen und sich somit verstärkt in diese verfangen können.[53] Diese Eigenschaft könnte zu erhöhten Zellaufnahmeraten von Lipid-Partikeln führen.[92]

Bisalkylierte Lipopolymere sind im Arbeitskreis Barz bereits bekannt. Es wurden Lipopolymere durch ROP aus Sar-NCA (**3**) mit Initiatoren wie z.B. Didodecylamin (C_{12}-Bisalkylamin) und Dioctadecylamin (C_{18}-Bisalkylamin) (**28**) hergestellt.[53]

3.4.4.1 Bisalkyl-Initiierung

Der verwendete pSar-Markroinitiator (**29**) für die Herstellung der BA_{18}-pSar$_{78}$-*b*-pHcy$_{10}$-*b*-pLys$_n$ (**32**) wurde über eine ROP der Sarkosin-NCA (**3**) unter Verwendung von C_{18}-Bisalkylamin (BA_{18}) (**28**) als Initiator hergestellt.

Die Synthese der Triblockcopolymere (**31**) wurde genau wie die zuvor beschriebene Synthese der Triblöcke (**24, 27**) durch eine sequenzielle Polymerisation durchgeführt.



Schema 29: Reaktionsschema der reaktiven Bisalkyl-Triblöcke (**32**).

Hier wurde ein Diblock (**30**) mit einer pHcy-Blocklänge von zehn hergestellt. Daraus wurden zwei Triblöcke (**31a-b**) mit zwei unterschiedlichen pLys-Kettenlängen synthetisiert.

Tabelle 8: GPC-Daten der Bisalkyl-Di (**30**)- und Triblöcke (**31a-b**).

Polymer	Đ
BA_{18}-pSar_{78}-*b*-pHcy_{10} (**30**)	1.17
BA_{18}-pSar_{78}-*b*-pHcy_{10}-*b*-pLys(BOC)$_{19}$ (**31a**)	1.17
BA_{18}-pSar_{78}-*b*-pHcy_{10}-*b*-pLys(BOC)$_{10}$ (**31b**)	1.18

Die GPC-Elugramme des Diblocks (**30**) und Triblocks (**31b**) sind in Abbildung 31 dargestellt. Da der lange pSar-Block wesentlich zum hydrodynamischen Volumen des Polymers beiträgt und somit dessen Dispersität im hydrodynamischen Volumen bestimmt, ist kaum eine Verschiebung im GPC-Elugramme zu beobachten.

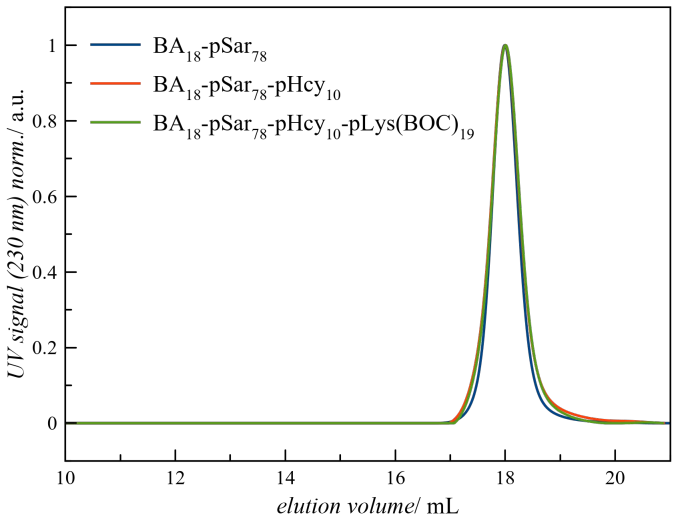


Abbildung 31: GPC-Elugramme der Bisalkyl-Polymere (**30, 31a**).

Die GPC-Daten der reaktiven Triblöcke (**32**), hergestellt über die saure Abspaltung der BOC-Schutzgruppe, sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: GPC-Daten der entschützten Bisalkyl-Triblöcke (**32a-b**).

Polymer	Đ
BA_{18}-pSar_{78}-*b*-pHcy_{10}-*b*-pLys_{19} (**32a**)	1.34
BA_{18}-pSar_{78}-*b*-pHcy_{10}-*b*-pLys_{10} (**32b**)	1.40

Nach der Entschützung zeigten die GPC-Elugramme weiterhin einen monomodalen Verlauf, dass als Beweis für die Integrität des Polymers gilt.

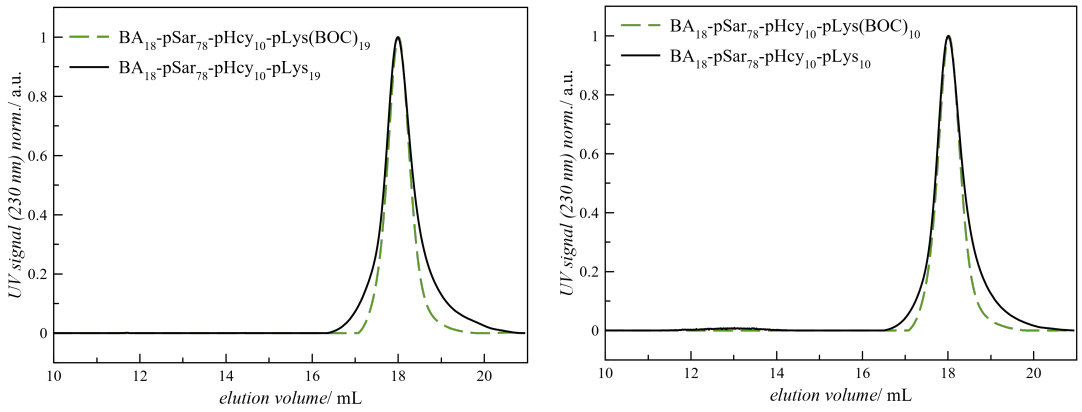
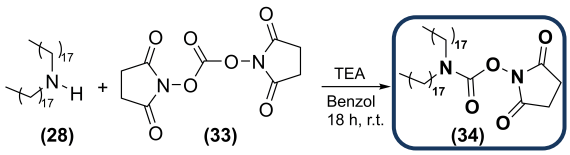


Abbildung 32: GPC-Elugramme der Bisalkyl-Polymere vor (**31a, 31b**) und nach dem Entschützen (**32a, 32b**).

3.4.4.2 Bisalkyl-Funktionalisierung

Zum Vergleich der Lipopolymere mit BA_{18} als Initiator wurde in einer zweiten Versuchsreihe die terminale freie Amin des pLys(BOC) der linearen Triblockcopolymere (**23g, 23j**) mit Bisalkyl-Einheiten funktionalisiert.

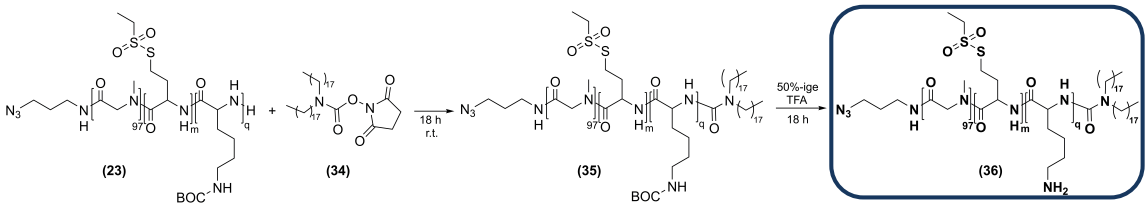
In der Arbeitsgruppe Barz wurden bereits terminales Amin mit einem Farbstoffkonjugiertem NHS(*N*-Hydroxysuccinimid)-Ester funktionalisiert.[76] Diese Methode wurde zur Funktionalisierung der Polymere mit BA_{18} zu Grunde gelegt. Dafür war aber zunächst die Darstellung des NHS-Esters des entsprechenden Dioctadecylamins (**28**) notwendig.



Schema 30: Reaktionsschema der Dioctadecyl-NHS-Ester (**34**).

Durch mehrfache Zugabe von Benzol gefolgt von dessen Entfernung im Vakuum wurde das überschussigen TEA azeotrop entfernt. Da die Herstellung des BA-NHS-Esters (**34**) bislang in der Literatur unbekannt war, musste eine Reinigungsprozedur gefunden werden, die das überschussige *N*,*N*′-Disuccinimidylcarbonat (**33**) und das Nebenprodukt entfernen könnte. Mit dem Wissen, dass das BA_{18} (**28**) in Chloroform löslich sei, wurde zunächst angenommen, dass der NHS-Ester (**34**) eine ähnliche Löslichkeit in Chloroform aufweisen könnte. Da sich das Edukt (**33**) aber kaum bis gar nicht in Chloroform löste, wurde der erhaltene Feststoff in kaltem Chloroform suspendiert und abgesaugt. Nach der destillativen Trennung des Chloroforms wurde das Produkt (**34**) als farbloser Feststoff erhalten.

Es wurden zwei Polymere aus den zuvor beschriebenen linearen Triblöcke (**23g, 23j**) ausgesucht, die eine ähnliche pSar- und pHcy-Blocklänge wie die Lipopolypept(o)iden (**32**) besaßen. Diese wurden dann mit dem hergestellten BA-NHS-Ester (**34**) funktionalisiert und schließlich mit 50%ige TFA-Lösung am pLys-Block entschützt.



Schema 31: Reaktionsschema der BA_{18}-funktionalisierte Lipopolypept(o)ide (**36**).

Die GPC-Daten und -Elugramme der BA_{18}-funktionalisierte Triblockcopolypept(o)ide (**35a-b**) sind in Tabelle 10 und Abbildung 33 dargestellt.

Tabelle 10: GPC-Daten der BA_{18}-funktionalisierte Polypept(o)ide (**35a-b**).

Polymer	**Đ**
N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_8$-*b*-pLys(BOC)$_{21}$-BA_{18} (**35a**)	1.18
N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_8$-*b*-pLys(BOC)$_8$-BA_{18} (**35b**)	1.16

Die Funktionalisierung mit BA_{18} führte zu keiner Fragmentierung der Polymere, welche anhand der monomodalen Verläufe der GPC-Elugramme zu sehen war.

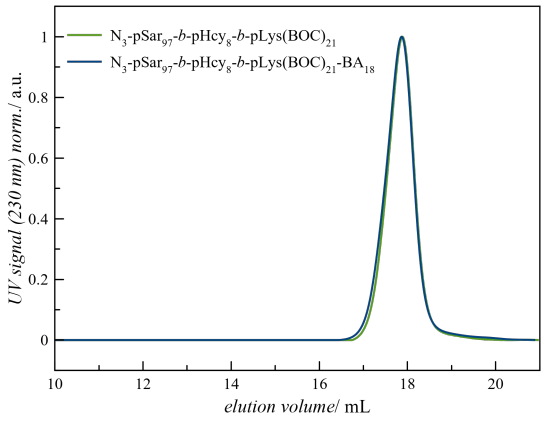


Abbildung 33: GPC-Elugramme der Triblockcopolypept(o)ide vor (**23g**, grün) und nach der BA_{18}-Funktionalisierung (**35a**, blau).

Nach der Entschützung der BOC-Schutzgruppe haben die Polymere (**36a, 36b**) ihre monomodale enge Verteilung beibehalten, welche eine Fragmentierung des Polymers, während der Entschützungsreaktion ausschließt.

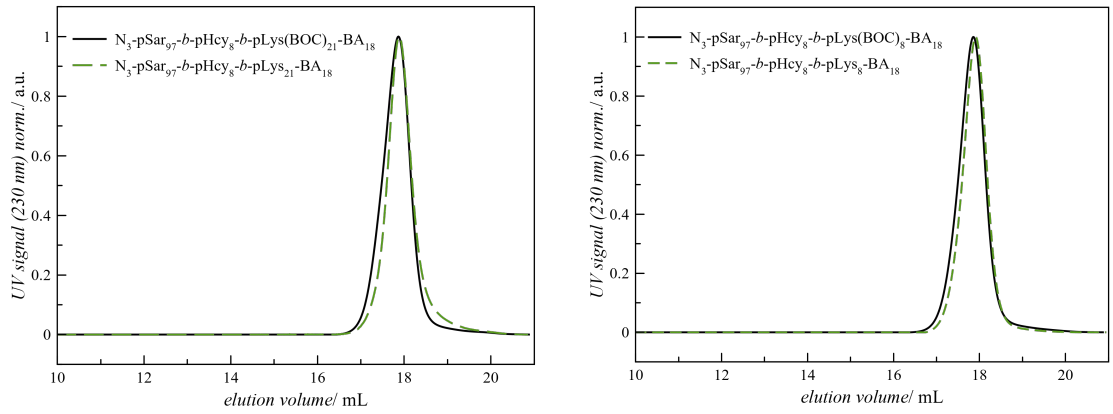


Abbildung 34: GPC-Elugramme der mit BA_{18}-funktionalisierten Polymere vor und nach dem Entschützen des pLys-Blocks.

Die PDI-Werte der entschützten Triblöcke (**36a, 36b**) sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: GPC-Daten der entschützten BA-funktionalisierten Triblöcke (**36a-b**).

Polymer	**Đ**
N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_8$-*b*-pLys$_{21}$-BA$_{18}$ (**36a**)	1.21
N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_8$-*b*-pLys$_8$-BA$_{18}$ (**36b**)	1.22

3.5 Nukleinsäure-Komplexierung zum Polyplex

Wie bereits erwähnt, werden durch elektrostatische Wechselwirkung zwischen Polykationen und negativ geladenen Nukleinsäuren nanogroße Polymer-Nukleinsäure-Komplexe, die sogenannten „Polyplexe“, gebildet.

Während der pLys-Block der synthetisierten Triblockcopolymere die Komplexierung der pDNA und mRNA übernimmt, kann der Polyplex durch den mittleren hydrophoben Block (pHcy/pCys) mit endosomolytischen Verbindungen über Disulfid-Bindungen kovalent quervernetzt werden. Aufgrund seiner abschirmenden Eigenschaft dient der hydrophilen pSar-Block als schützende Schicht des Polyplex-Kerns nach außen.

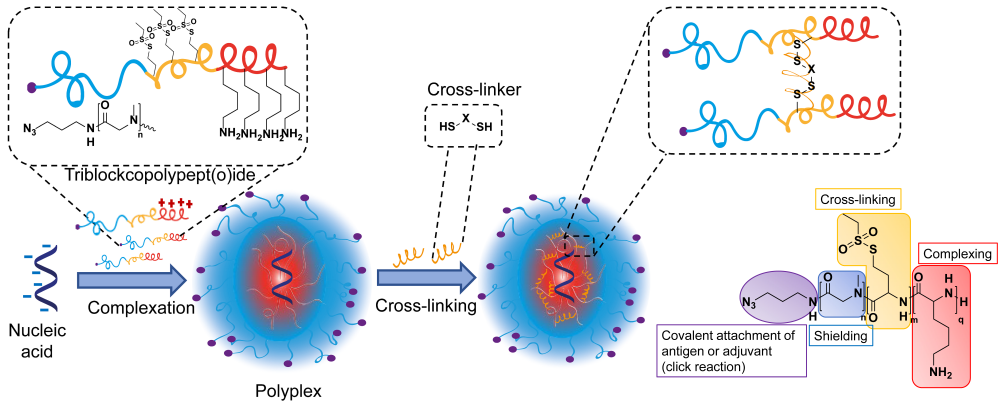
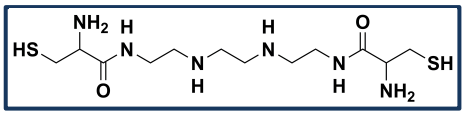


Abbildung 35: Die Zusammensetzung der synthetisierten Polymere und die Rolle einzelner Abschnitte bei der Polyplex-Herstellung.

Nach der Charakterisierung der Polyplexe wurden diese anschließend auf ihre Transfektionseffizienz in verschiedenen Zelllinien untersucht. Die Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten dargestellt. Eine Diskussion folgt erst am Ende des Kapitels.

Der verwendete Vernetzer und deren Funktionsweise beim *endosomal escape sind:*

1. TETA* (T): Das von WAGNER *et al.* entwickelte Dithioltriethylenetetramin-α,ω-di(Cystein)diamid besitzt 1,2-Diaminoethan als Grundbaustein. Das Diaminoethan-Motiv verleiht Transfektionspolymeren eine ausgezeichnete Nukleinsäure-Bindung und endosomale Pufferkapazität (proton sponge).[67]



Schema 32: Schematische Darstellung des verwendete Vernetzers TETA*.

2. LAH* (L): Um LAH4-L1 als Quervernetzer verwenden zu können, ersetzte HELLER *et al.* die Alanine am N- und C-Terminus durch Cystein.[55]

KK**A**LLAHALHLLALLALHLAHALKK**A** ⇨ KK**C**LLAHALHLLALLALHLAHALKK**C**

Schema 33: Schematische Darstellung des verwendete Vernetzers LAH*.

KICHLER und BECHINGER *et al.* entwickelten 1996 das 26 Aminosäuren langes, amphiphiles, kationisches Peptid LAH4-L1. Im neutralen und leicht basischen pH nimmt das Peptid eine amphiphile Helix-Struktur an, mit angeordneten Histidin-Reste auf einer Seite und einem idealisierten helikalen Winkel von 80°. In saurem pH, genauer gesagt bei pH 5.10 ± 0.15 findet eine Konformationsänderung zu Radom Coil statt.[93-94]

Zusätzlich zu den physikalisch-chemischen Veränderungen durch die Protonierung der Histidin-Reste, während der Ansäuerung der Endosomen orientiert sich das Peptid, welche bei neutralen pH aufgrund seiner helikalen Struktur Transmembran orientiert war, parallel zur Membranoberfläche und interagiert mit negativ geladenen Lipiden.[95] Bei einer ausreichend hohen Peptidkonzentration wird die Membran destabilisiert und APIs werden in das Cytosol freigesetzt.[10, 96-97]

3. GALA* (G): wie bei LAH* wurde GALA ebenso von HELLER *et al.* modifiziert. Hier wurden die C- und N-terminalen Aminosäuren, Tryptophan (W) und Alanin (A) durch Cystein ersetzt.

WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALA**A**

⇩

CEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALA**C**

Schema 34: Schematische Darstellung des verwendete Vernetzers GALA*.

SUBBARAO *et al.* entwickelten 1990 das synthetische Peptid mit 30 Aminosäuren und Glutaminsäure-Alanin-Leucin-Alanin (GALA)-Wiederholungseinheiten, die der

Fusionspeptiddomäne des Influenzavirus Hämagglutinin2 (HA2) ähnelt und eine pH-abhängige Membranfusions-Fähigkeit besitzt.[98]

Bei einem neutralen pH-Wert verhindert die Abstoßung zwischen den negativen Ladungen der Glu-Resten die Bildung einer helikalen Struktur im Peptid. Somit weist GALA eine Random Coil-Konformation vor. Wenn der pH-Wert verringert wird, werden die Abstoßungskräfte aufgrund der Protonierung dieser Glu-Reste geschwächt und induzieren letztlich eine Helix-Struktur. In Gegenwart von Lipidmembranen interagiert das Peptid leicht mit der Membran, um anschließend damit zu fusionieren.[99-100]

Um später den Einfluss der Sekundärstruktur des mittleren Blocks zu beobachten, wurden zusätzlich zwei weitere Polymere mit Poly-L-Cystein(SO_2Et) (pCys) anstelle von Poly-L-Homocystein(SO_2Et) (pHcy) untersucht. Wie bereits erwähnt bildet pCys β-Faltblätter als Sekundärstruktur aus, während pHcy α-Helices bildet.

Zur Veranschaulichung wurden die verwendeten reaktiven Triblockcopolypept(o)ide zur Polyplex-Herstellung in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Liste der verwendeten Triblockcopolypept(o)ide für die Polyplex-Herstellung.

Polymer -Nr.	**Struktur**	**Polymer -Nr.**	**Struktur**
24a	N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{11}$-*b*-pLys$_{21}$	24l	N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{27}$-*b*-pLys$_9$
24b	N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{19}$-*b*-pLys$_{21}$	27a	(N_3-pSar$_{106}$)$_3$-*b*-pHcy$_{28}$-*b*-pLys$_9$
24c	N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{27}$-*b*-pLys$_{23}$	27b	(N_3-pSar$_{106}$)$_3$-*b*-pHcy$_{28}$-*b*-pLys$_{18}$
24d	N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{11}$-*b*-pLys$_7$	27c	(N_3-pSar$_{106}$)$_3$-*b*-pHcy$_{15}$-*b*-pLys$_8$
24e	N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{19}$-*b*-pLys$_7$	27d	(N_3-pSar$_{106}$)$_3$-*b*-pHcy$_{15}$-*b*-pLys$_{18}$
24f	N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{27}$-*b*-pLys$_9$	32a	BA$_{18}$-pSar$_{78}$-*b*-pHcy$_{10}$-*b*-pLys$_{19}$
24g	N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_8$-*b*-pLys$_{21}$	32b	BA$_{18}$-pSar$_{78}$-*b*-pHcy$_{10}$-*b*-pLys$_{10}$
24h	N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{17}$-*b*-pLys$_{22}$	36a	N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_8$-*b*-pLys$_{21}$-BA$_{18}$
24i	N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{27}$-*b*-pLys$_{20}$	36b	N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_8$-*b*-pLys$_8$-BA$_{18}$
24j	N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_8$-*b*-pLys$_8$	Cys-a	N_3-pSar$_{182}$-*b*-pCys$_9$-*b*-pLys$_{18}$
24k	N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{17}$-*b*-pLys$_9$	Cys-b	N_3-pSar$_{182}$-*b*-pCys$_8$-*b*-pLys$_{10}$

Für die Benennung der Polyplexe wurde folgendes System verwendet:

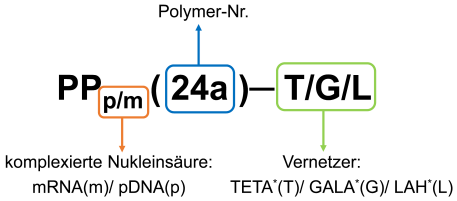


Abbildung 36: Benennungssystem für die hergestellten Polyplexe.

3.5.1 Polyplex-Bildung und Charakterisierung

- **Gen-Komplexierung**

Der Komplexierungsgrad der mRNA und DNA durch die Polymere in Abhängigkeit vom N/P-Verhältnis wurde *via* Gelelektrophorese untersucht.

Hierbei wurde nach dem N/P-Verhältnis (Abbildung 37; blau umrandet) gesucht, bei welchem die negative Ladung der mRNA/pDNA bei vernetzten Polyplexen (PP_m(x)-T/L) im Gegensatz zu nicht-vernetzten Polyplexen (PP_m(x)) kompensiert ist. Bei diesem N/P-Verhältnis wandert die Nukleinsäure nicht mehr im Gel und wird in der Gel-Tasche zurückgehalten.

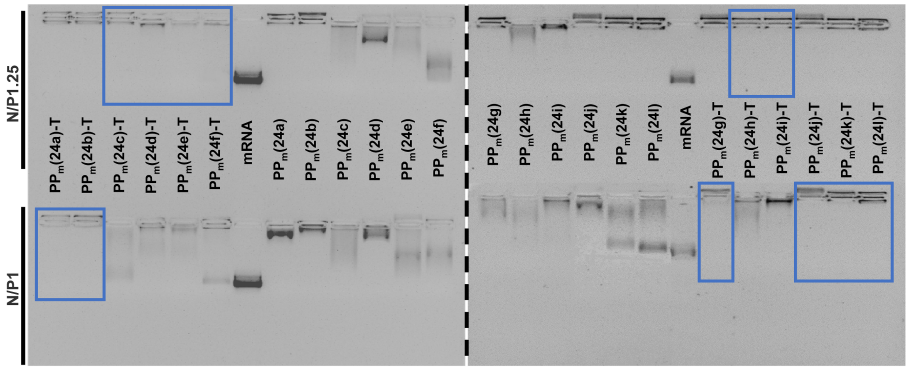


Abbildung 37: Agarose-Gelelektrophorese der PPm(24a)–PPm(24l) bei N/P1 und N/P1.25 mit und ohne TETA*.

Im Vergleich zu mRNA erreichte pDNA, aufgrund höherer negativer Ladung, erst bei N/P2 eine komplette Neutralisation der Ladung durch den Polyplex.

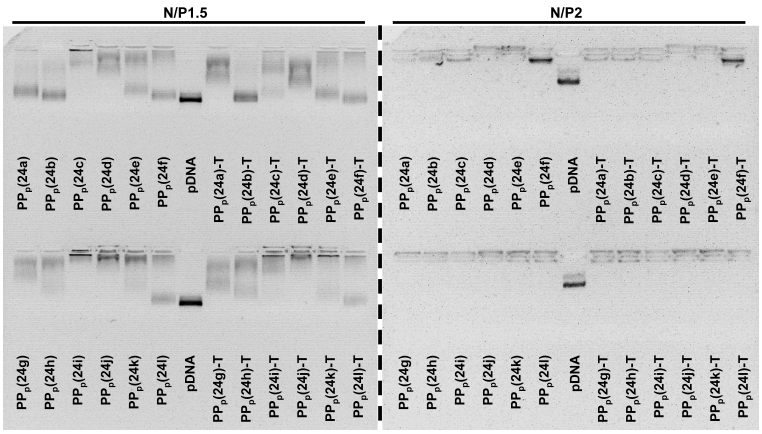


Abbildung 38: Agarose-Gelelektrophorese der PP_p(24a)–PP_p(24l) bei N/P1.5 und N/P2 mit und ohne den Vernetzer TETA*.

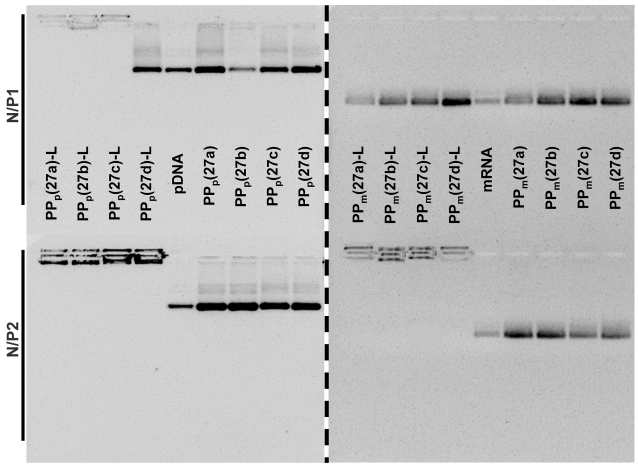


Abbildung 39: Agarose-Gelelektrophorese der $PP_p(27a)$–$PP_p(27d)$ und $PP_m(27a)$–$PP_m(27d)$ bei N/P1 und N/P2 mit und ohne den Vernetzer LAH*.

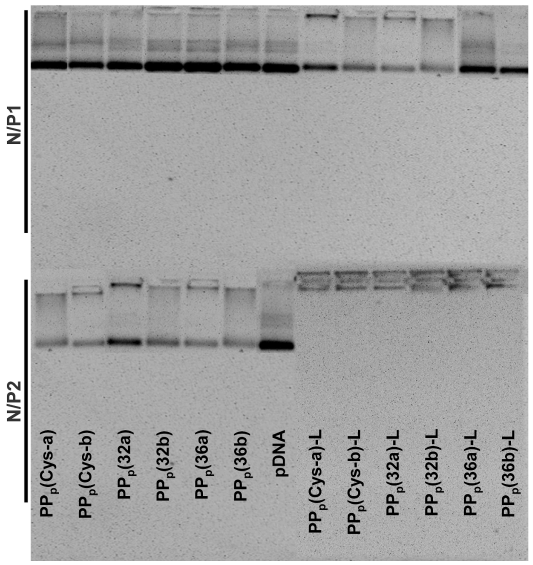


Abbildung 40: Agarose-Gelelektrophorese der pDNA-Polyplexe aus BA_{18}-Polymeren (32, 36) und pCys-Polymeren (Cys-a, Cys-b) bei N/P1 und N/P2 mit und ohne den Vernetzer LAH*.

- **Size und ζ-Potenzial der Polyplexe**

Bei konstanter mRNA-Konzentration (0.1 µg/µL) wurden die Polyplexe mit zunehmendem N/P-Verhältnis kleiner und sie erreichten einen Plateauwert von etwa 78 nm für $PP_m(24a)$, 87 nm für $PP_m(24b)$ und 111 nm für $PP_m(24c)$. Die Verkleinerung der Polyplexe ist auf die Bildung kompakter kondensierter Komplexe aufgrund des Polymer-Überschusses und der hohen elektrostatischen Wechselwirkung zurückzuführen, da während die positive Ladung zunimmt die negative Ladung konstant bleibt. Die Bildung eines Plateaus liegt vermutlich am Erreichen des Sättigungspunkts der Polyplexe.[101-102]

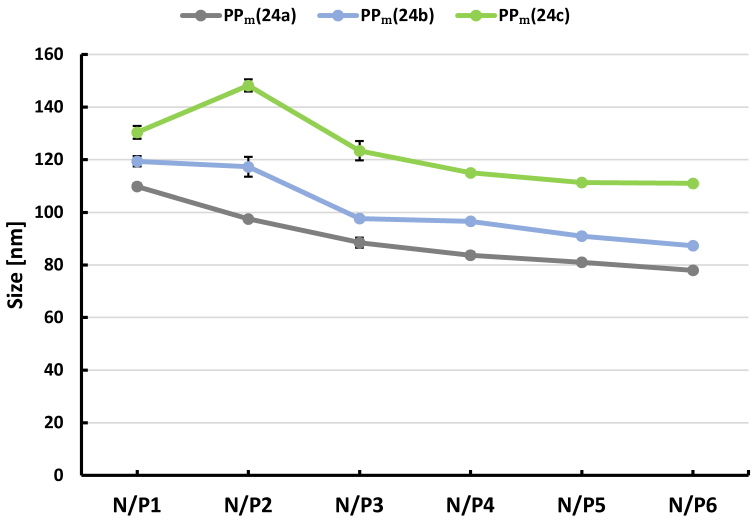


Abbildung 41: Größe der Polyplexe in Abhängigkeit des N/P-Verhältnisses.

Würde hierbei der Sättigungspunkt der Polyplexe überschritten werden, würden die überschüssigen Polymere ab diesem Zeitpunkt nicht mehr in den Polyplex eingebaut werden und verblieben als freies Polymer in der Lösung. Diese freien Polymere können in DLS detektiert werden. Hierbei wurde der Sättigungspunkt jedoch noch nicht überschritten, da keine freien Polymere in DLS-Messungen detektiert werden konnten.

Die Erhöhung des N/P-Verhältnisses bei konstanter mRNA-Konzentration (0.1 µg/µL) führte zu einer Zunahme des ζ-Potentials von LAH*-vernetzten Polyplexen. Der Kurvenverlauf deutet auf das Erreichen eines Plateaus bei N/P > 6 hin.[71, 101]

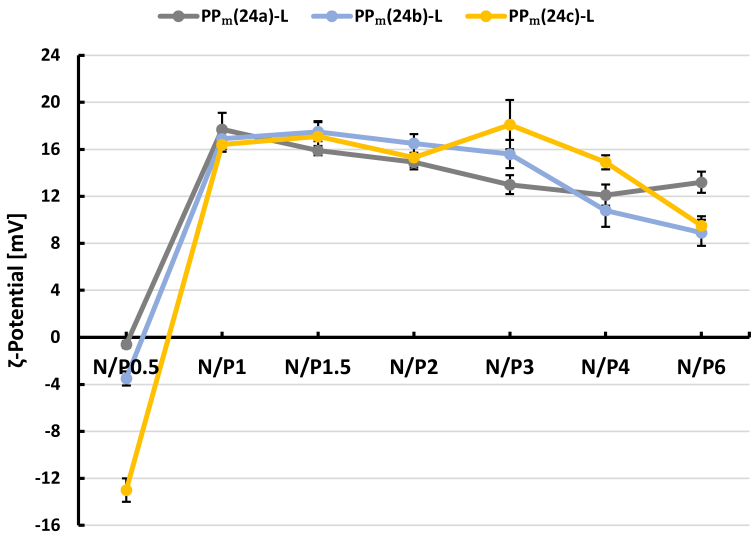


Abbildung 42: ζ-Potential der mRNA-Polyplexe vernetzt mit LAH* in Abhängigkeit des N/P-Verhältnisses.

Durch die Quervernetzung der Polymere konnten kompaktere, kleinere Polyplexe hergestellt werden.

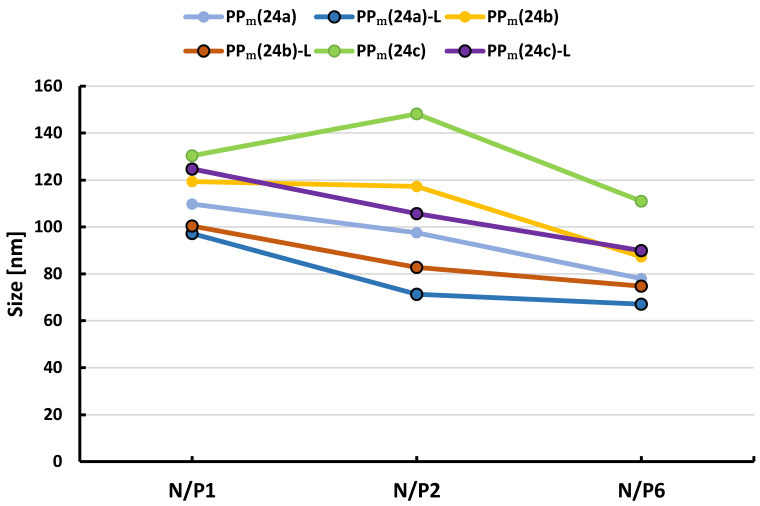


Abbildung 43: Durchmesser der LAH*-vernetzten *vs.* nicht-vernetzten Polyplexe in Abhängigkeit des N/P-Verhältnisses.

Die Zunahme der mRNA-Konzentration bei konstantem N/P-Verhältnis (N/P4) zeigte einen proportionalen Verlauf beim Durchmesser der nicht-vernetzten Polyplexe (s. Abbildung 44). Die Erhöhung der mRNA- und somit auch Polymer-Menge in den gleichen Volumina bei den locker-gebauten Polyplexen führt vermutlich durch die Abstoßung zwischen den Polymeren zur Zunahme des Polyplex-Durchmessers.[88, 102]

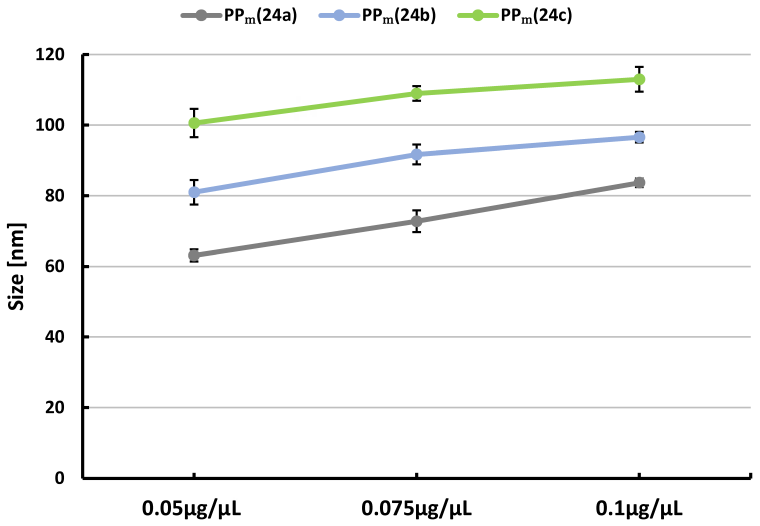


Abbildung 44: Größe der Polyplexe in Abhängigkeit der mRNA-Konzentration.

Der Durchmesser und das ζ-Potential der hergestellten mRNA- und pDNA-Polyplexe, vernetzt mit TETA*, LAH* und GALA* wurde *via* DLS untersucht. Bei der Aufteilung der Polyplexe aus linearen Polymeren in vier Gruppen, nämlich nach der pSar- und pLys-Blocklänge, zeigte sich ein proportionales Verhältnis zwischen der Größe der Polyplexe und der Länge des hydrophoben Blocks (pHcy).

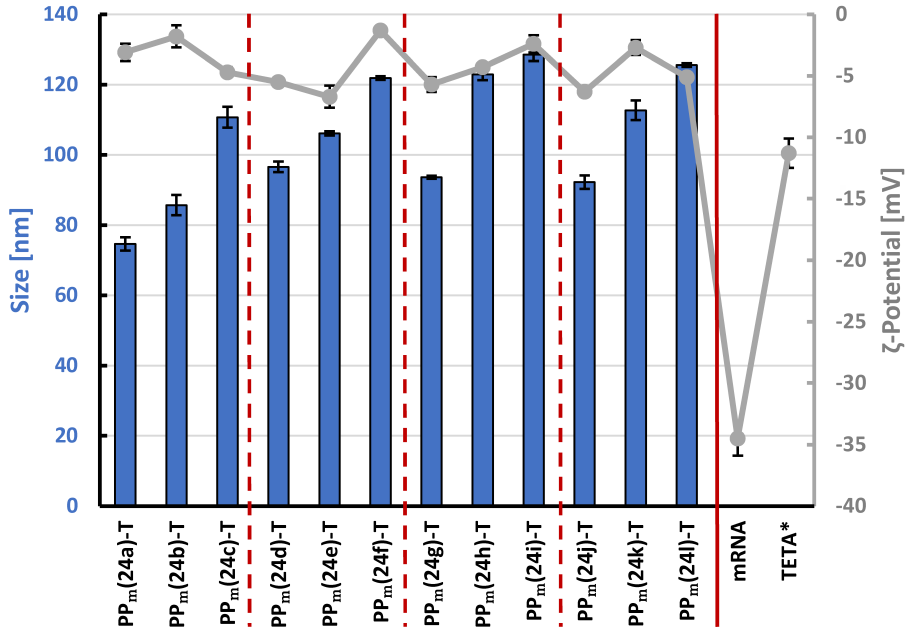


Abbildung 45: Größe und ζ-Potential der TETA*-vernetzten mRNA-Polyplexe bei N/P1, N/P1.25 und 0.1 µg/µL mRNA (s. Abbildung 37).

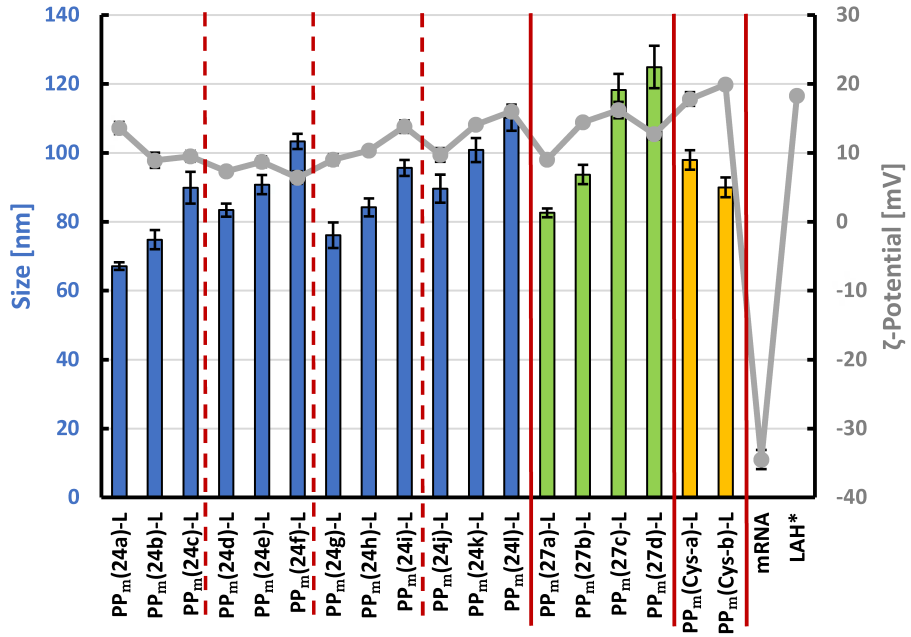


Abbildung 46: Größe und ζ-Potential der LAH*-vernetzten mRNA-Polyplexe bei N/P6 und 0.1 µg/µL mRNA.

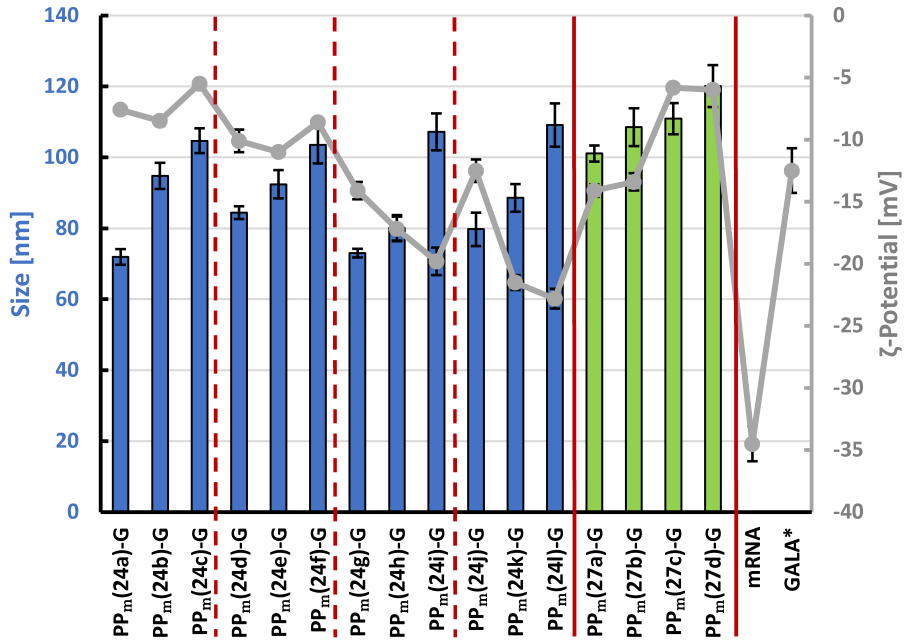


Abbildung 47: Größe und ζ-Potential der GALA*-vernetzten mRNA-Polyplexe bei N/P6 und 0.1 µg/µL mRNA.

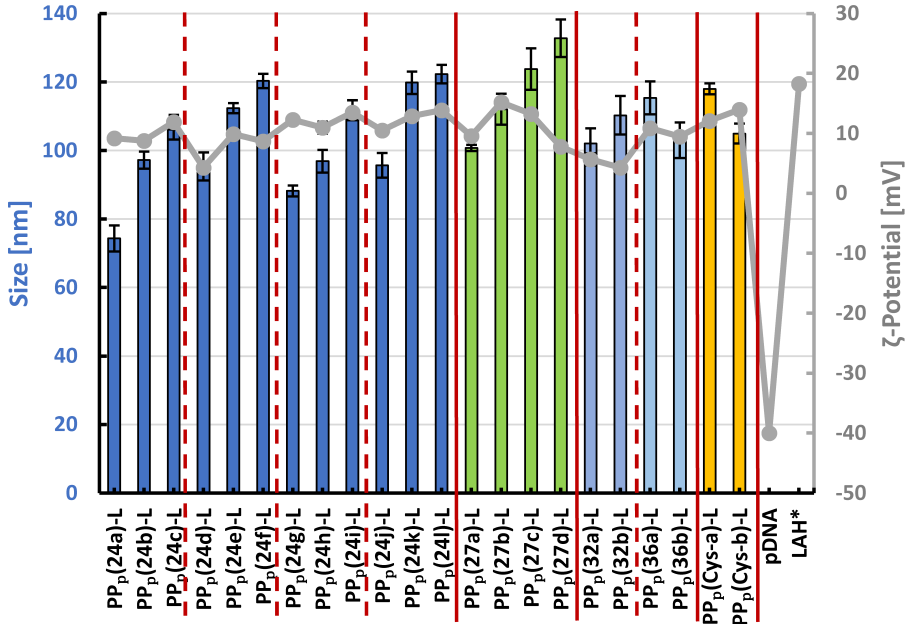


Abbildung 48: Größe und ζ-Potential der LAH*-vernetzten pDNA-Polyplexe bei N/P6 und 1 µg pDNA.

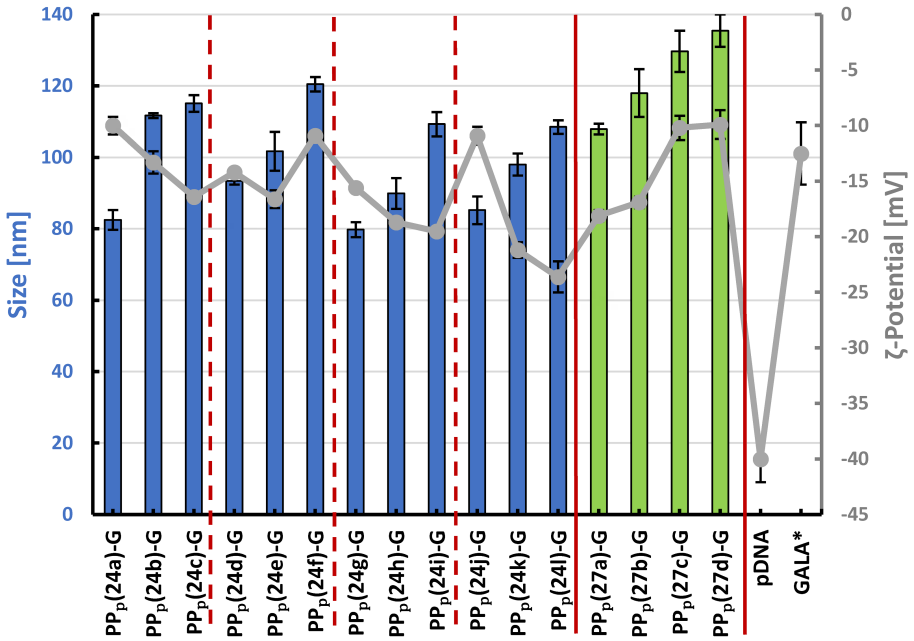


Abbildung 49: Größe und ζ-Potential der GALA*-vernetzten pDNA-Polyplexe bei N/P6 und 1 µg pDNA.

Während die ζ-Potenzialwerte der LAH*-Polyplexe mit mRNA und pDNA 4 – 15 mV bzw. 6 – 20 mV erreichten, zeigten die GALA*-Polyplexe Werte von -23 bis -9 mV mit pDNA und von -22 bis -5 mV mit mRNA an. Die negativen Werte können durch die Ladung von GALA* (ζ-Pot. GALA* = -12 mV; Lit.-Wert für GALA = -8)[99] bei neutralen pH-Werten erklärt werden.

Durch die Auflistung der Werte nach Größe und ζ-Potential lässt sich der proportionale Zusammenhang zwischen dem Sarkosin-Anteil und dem ζ-Potential leichter sichtbar machen.

Polyplex	ζ-Pot. [mV]	Size [nm]	pSar-Blocklänge	pHcy-Blocklänge	pLys-Blocklänge	Hcy-Anteil *w/w* [%]	Lys-Anteil *w/w* [%]	Sar-Anteil *w/w* [%]
PP_p(24d)-L	4,30	95,40	212,00	11,00	7,00	13%	5%	82%
PP_p(24f)-L	8,70	120,30	212,00	27,00	9,00	26%	5%	69%
PP_p(24b)-L	8,80	97,20	212,00	19,00	21,00	18%	12%	69%
PP_p(24a)-L	9,20	74,40	212,00	11,00	21,00	11%	13%	75%
PP_p(24e)-L	9,90	112,40	212,00	19,00	7,00	20%	4%	75%
PP_p(24j)-L	10,50	95,70	97,00	8,00	8,00	17%	11%	71%
PP_p(24h)-L	11,00	96,90	97,00	17,00	22,00	27%	21%	52%
PP_p(24c)-L	11,90	106,10	212,00	27,00	23,00	24%	12%	63%
PP_p(24g)-L	12,30	88,20	97,00	8,00	21,00	15%	24%	61%
PP_p(24k)-L	12,90	119,80	97,00	17,00	9,00	30%	10%	59%
PP_p(24i)-L	13,50	111,80	97,00	27,00	20,00	37%	17%	45%
PP_p(24l)-L	13,90	122,30	97,00	27,00	9,00	41%	8%	50%

min
max

Abbildung 50: Nach Größe der ζ-Potentialwerte (aufsteigend) sortierte Werte der linearen PPs.

Bei der Größe des Polyplexes spielen mehrere Faktoren wie der Lys- und Hcy-Anteil eine Rolle. Die Werte zeigten eine allgemeine Zunahme des Durchmessers bei simultaner Zunahme des Hcy-Anteils und Abnahme des Lys-Anteils.

Polyplex	ζ-Pot. [mV]	Size [nm]	pSar-Blocklänge	pHcy-Blocklänge	pLys-Blocklänge	Hcy-Anteil *w/w* [%]	Lys-Anteil *w/w* [%]	Sar-Anteil *w/w* [%]
PP_p(24a)-L	9,20	74,40	212,00	11,00	21,00	11%	5%	82%
PP_p(24g)-L	12,30	88,20	97,00	8,00	21,00	15%	5%	69%
PP_p(24d)-L	4,30	95,40	212,00	11,00	7,00	13%	12%	69%
PP_p(24j)-L	10,50	95,70	97,00	8,00	8,00	17%	13%	75%
PP_p(24h)-L	11,00	96,90	97,00	17,00	22,00	27%	4%	75%
PP_p(24b)-L	8,80	97,20	212,00	19,00	21,00	18%	11%	71%
PP_p(24c)-L	11,90	106,10	212,00	27,00	23,00	24%	21%	52%
PP_p(24i)-L	13,50	111,80	97,00	27,00	20,00	37%	12%	63%
PP_p(24e)-L	9,90	112,40	212,00	19,00	7,00	20%	24%	61%
PP_p(24k)-L	12,90	119,80	97,00	17,00	9,00	30%	10%	59%
PP_p(24f)-L	8,70	120,30	212,00	27,00	9,00	26%	17%	45%
PP_p(24l)-L	13,90	122,30	97,00	27,00	9,00	41%	8%	50%

min
max

Abbildung 51: Nach Größe des Durchmessers (aufsteigend) sortierte Werte der linearen PPs.

Ein allgemeiner Zusammenhang zwischen allen hergestellten Polyplexen konnte nicht zweifelsfrei festgestellt werden.

Polyplex	ζ-Pot. [mV]	Size [nm]	Molmasse [g/mol]	pSar-Blocklänge	pHcy-Blocklänge	pLys-Blocklänge	Hcy-Anteil *w/w* [%]	Lys-Anteil *w/w* [%]	Sar-Anteil *w/w* [%]
PP_p(24d)-L	4,30	95,40	18367,42	212,00	11,00	7,00	13%	5%	82%
PP_p(32b)-L	4,30	110,30	9300,54	78,00	10,00	10,00	23%	14%	60%
PP_p(32a)-L	5,70	102,10	10454,16	78,00	10,00	19,00	20%	23%	53%
PP_p(27d)-L	7,80	132,80	28958,92	318,00	15,00	18,00	11%	8%	78%
PP_p(24f)-L	8,70	120,30	21972,26	212,00	27,00	9,00	26%	5%	69%
PP_p(24b)-L	8,80	97,20	21836,18	212,00	19,00	21,00	18%	12%	69%
PP_p(24a)-L	9,20	74,40	20161,94	212,00	11,00	21,00	11%	13%	75%
PP_p(36b)-L	9,50	103,00	10215,56	97,00	8,00	8,00	16%	10%	67%
PP_p(27a)-L	9,60	100,80	30525,94	318,00	28,00	9,00	19%	4%	74%
PP_p(24e)-L	9,90	112,40	20041,66	212,00	19,00	7,00	20%	4%	75%
PP_p(24j)-L	10,50	95,70	9693,56	97,00	8,00	8,00	17%	11%	71%
PP_p(36a)-L	10,90	115,40	11881,90	97,00	8,00	21,00	14%	23%	58%
PP_p(24h)-L	11,00	96,90	13371,60	97,00	17,00	22,00	27%	21%	52%
PP_p(24c)-L	11,90	106,10	23766,78	212,00	27,00	23,00	24%	12%	63%
PP_p(Cys-a)-L	12,10	118,00	16904,92	182,00	9,00	10,00	9%	14%	77%
PP_p(24g)-L	12,30	88,20	11359,90	97,00	8,00	21,00	15%	24%	61%
PP_p(24k)-L	12,90	119,80	11705,26	97,00	17,00	9,00	30%	10%	59%
PP_p(27c)-L	13,30	123,80	27677,12	318,00	15,00	8,00	11%	4%	82%
PP_p(24i)-L	13,50	111,80	15208,04	97,00	27,00	20,00	37%	17%	45%
PP_p(24l)-L	13,90	122,30	13798,06	97,00	27,00	9,00	41%	8%	50%
PP_p(Cys-b)-L	14,00	105,00	16074,73	182,00	8,00	18,00	11%	8%	80%
PP_p(27b)-L	15,20	112,10	31935,92	318,00	28,00	20,00	18%	8%	71%

min
max

Abbildung 52: Nach Größe der ζ-Potentialwerte (aufsteigend) sortierte Werte aller PPs.

Polyplex	ζ-Pot. [mV]	Size [nm]	Molmasse [g/mol]	pSar-Blocklänge	pHcy-Blocklänge	pLys-Blocklänge	Hcy-Anteil w/w [%]	Lys-Anteil w/w [%]	Sar-Anteil w/w [%]
PP_p(24a)-L	9,20	74,40	20161,94	212,00	11,0	21,00	11%	13%	75%
PP_p(24g)-L	12,30	88,20	11359,90	97,00	8,0	21,00	15%	24%	61%
PP_p(24d)-L	4,30	95,40	18367,42	212,00	11,0	7,00	13%	5%	82%
PP_p(24j)-L	10,50	95,70	9693,56	97,00	8,0	8,00	17%	11%	71%
PP_p(24h)-L	11,00	96,90	13371,60	97,00	17,0	22,00	27%	21%	52%
PP_p(24b)-L	8,80	97,20	21836,18	212,00	19,0	21,00	18%	12%	69%
PP_p(27a)-L	9,60	100,80	30525,94	318,00	28,0	9,00	19%	4%	74%
PP_p(32a)-L	5,70	102,10	10454,16	78,00	10,0	19,00	20%	23%	53%
PP_p(36b)-L	9,50	103,00	10215,56	97,00	8,0	8,00	16%	10%	67%
PP_p(Cys-b)-L	14,00	105,00	16074,73	182,00	8,0	18,00	11%	8%	80%
PP_p(24c)-L	11,90	106,10	23766,78	212,00	27,0	23,00	24%	12%	63%
PP_p(32b)-L	4,30	110,30	9300,54	78,00	10,0	10,00	23%	14%	60%
PP_p(24i)-L	13,50	111,80	15208,04	97,00	27,0	20,00	37%	17%	45%
PP_p(27b)-L	15,20	112,10	31935,92	318,00	28,0	20,00	18%	8%	71%
PP_p(24e)-L	9,90	112,40	20041,66	212,00	19,0	7,00	20%	4%	75%
PP_p(36a)-L	10,90	115,40	11881,90	97,00	8,0	21,00	14%	23%	58%
PP_p(Cys-a)-L	12,10	118,00	16904,92	182,00	9,0	10,00	9%	14%	77%
PP_p(24k)-L	12,90	119,80	11705,26	97,00	17,0	9,00	30%	10%	59%
PP_p(24f)-L	8,70	120,30	21972,26	212,00	27,0	9,00	26%	5%	69%
PP_p(24l)-L	13,90	122,30	13798,06	97,00	27,0	9,00	41%	8%	50%
PP_p(27c)-L	13,30	123,80	27677,12	318,00	15,0	8,00	11%	4%	82%
PP_p(27d)-L	7,80	132,80	28958,92	318,00	15,0	18,00	11%	8%	78%

Abbildung 53: Nach Größe des Durchmessers (aufsteigend) sortierte Werte aller PPs.

Die Partikelgrößenverteilung der Polyplexe aus DLS-Messungen zeigten alle einen monomodalen und engen Verlauf, welcher auf die Bildung uniformer Polyplexe ohne jegliche Aggregate hindeutet. (s. Abbildung 54–Abbildung 61).

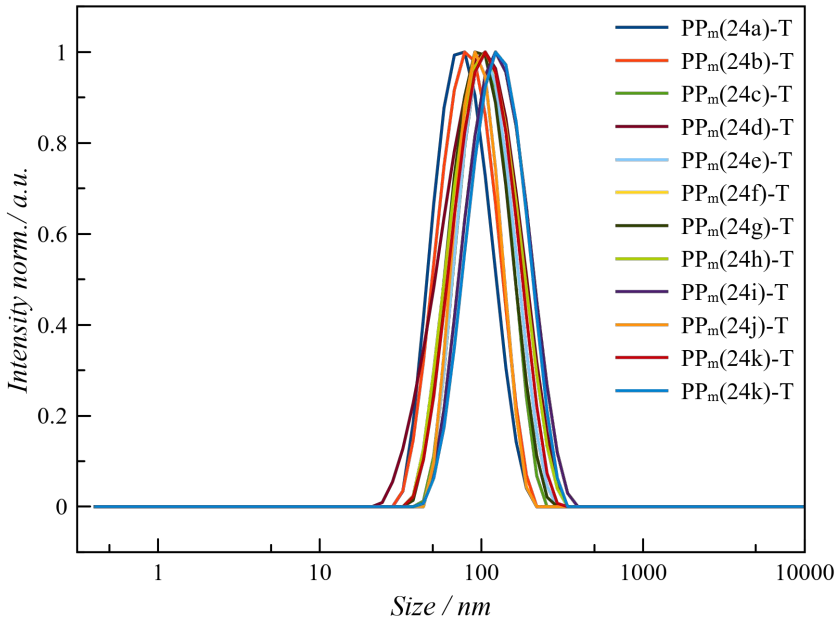


Abbildung 54: Logarithmische Darstellung der durchschnittlichen Partikelgröße (Z-Average) aus DLS-Daten der PP_m(24a)-T–PP_m(24l)-T.

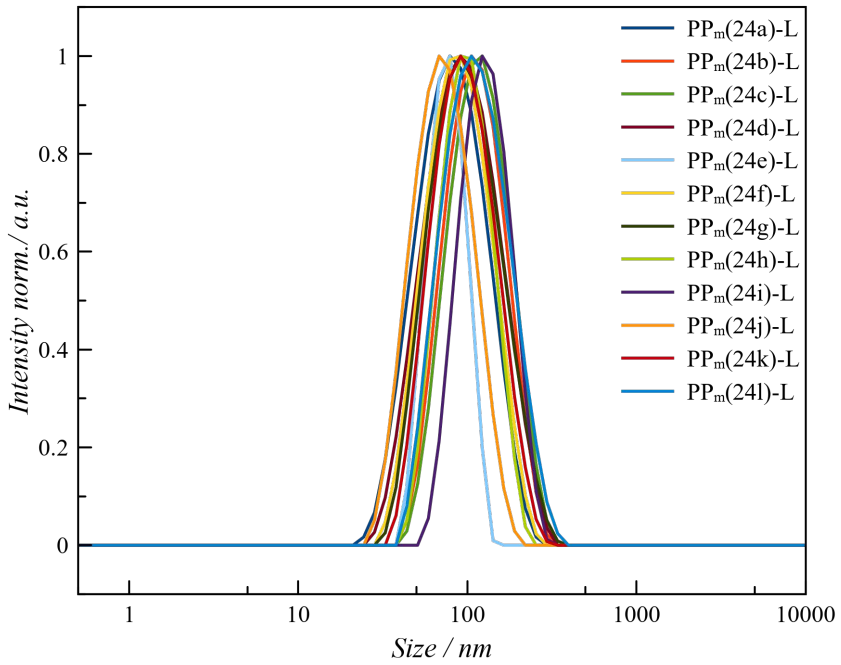


Abbildung 55: Logarithmische Darstellung der Z-Average Diagramme der PP_m(24a)-L–PP_m(24l)-L bei N/P6.

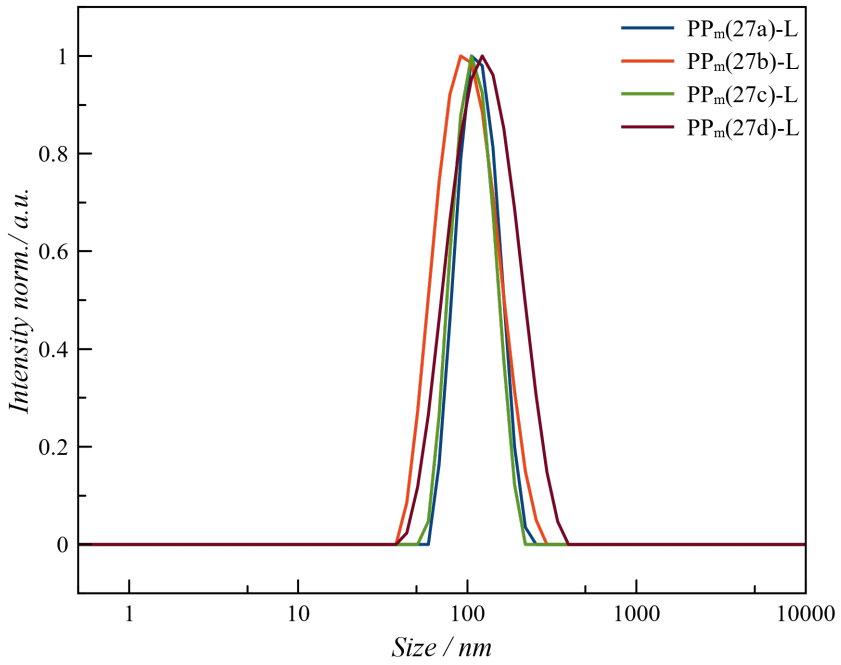


Abbildung 56: Logarithmische Darstellung der Z-Average Diagramme der PP_m(27a)-L–PP_m(27d)-L bei N/P6.

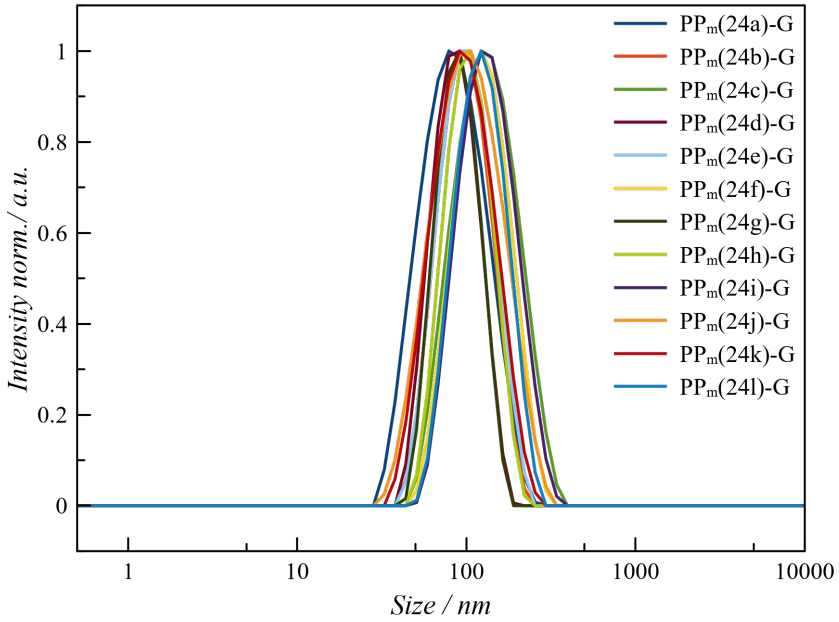


Abbildung 57: Logarithmische Darstellung der Z-Average Diagramme der PP_m(24a)-G–PP_m(24l)-G bei N/P6.

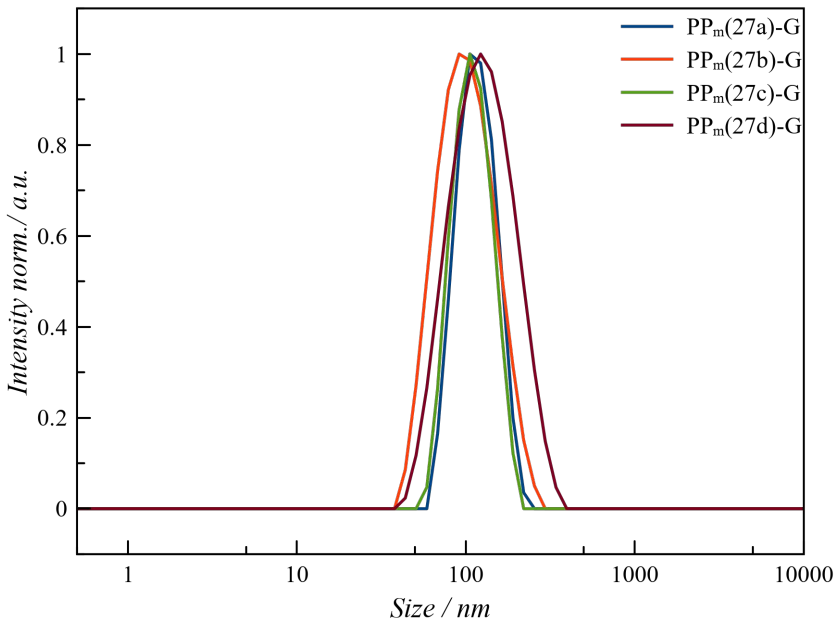


Abbildung 58: Logarithmische Darstellung der Z-Average Diagramme der PP_m(27a)-G–PP_m(27d)-G bei N/P6.

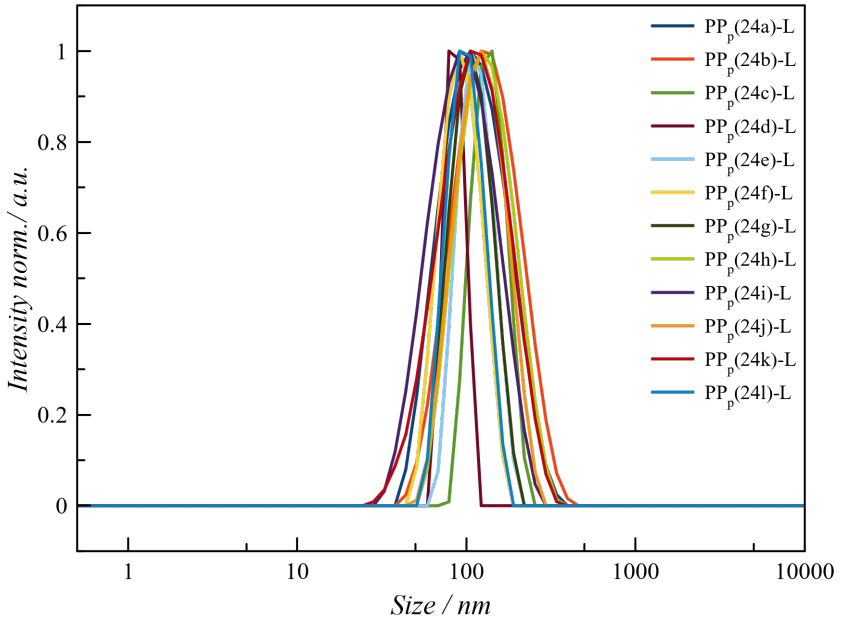


Abbildung 59: Logarithmische Darstellung der Z-Average Diagramme der PP$_p$(24a)-L–PP$_p$(24l)-L bei N/P6.

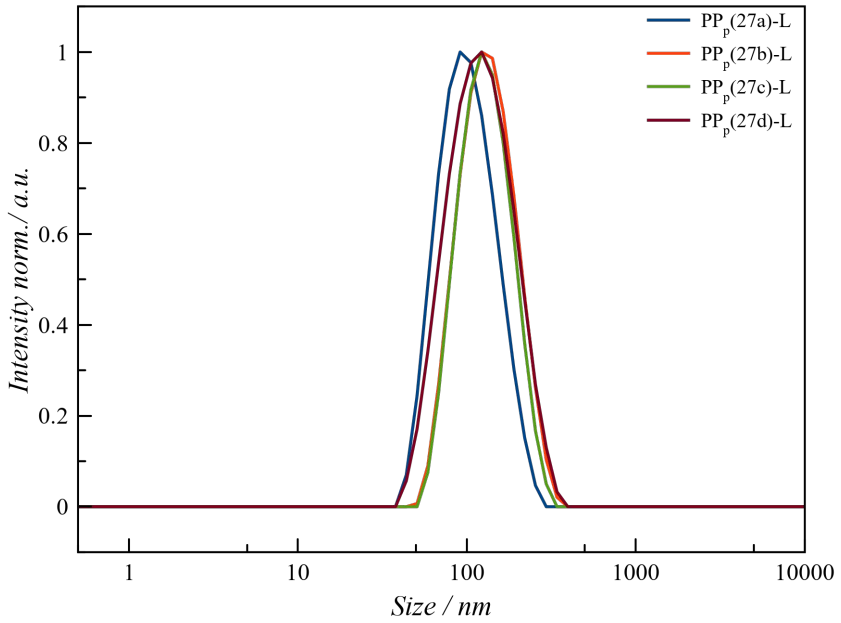


Abbildung 60: Logarithmische Darstellung der Z-Average Diagramme der PP$_p$(27a)-L–PP$_p$(27d)-L bei N/P6.

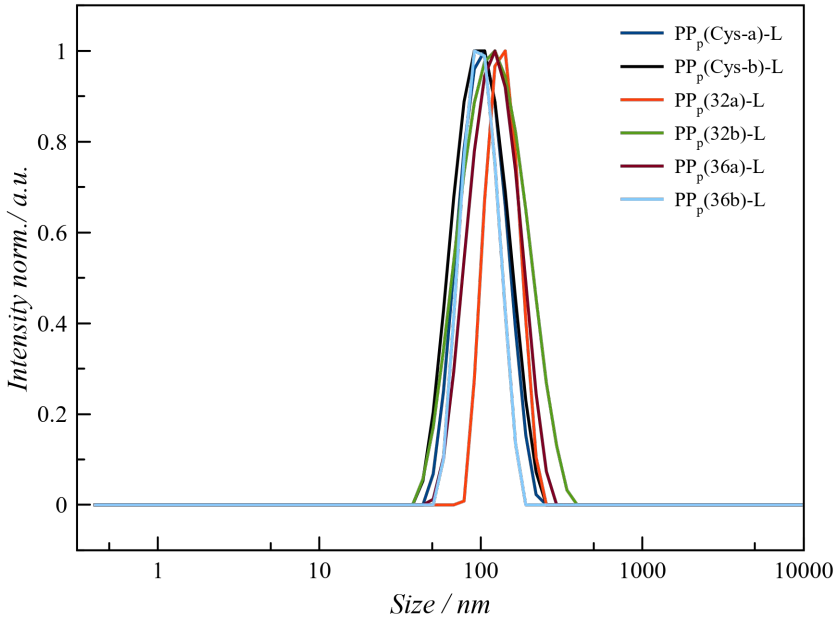


Abbildung 61: Logarithmische Darstellung der Z-Average Diagramme der Polyplexe aus BA_{18}-Polymeren (32, 36) und pCys-Polymeren (Cys-a, Cys-b) bei N/P6.

Die Cryo-TEM-Aufnahmen der PP_m(27a)-L zeigten wie bereits die DLS-Messung die Bildung von uniformen Polyplexe an.

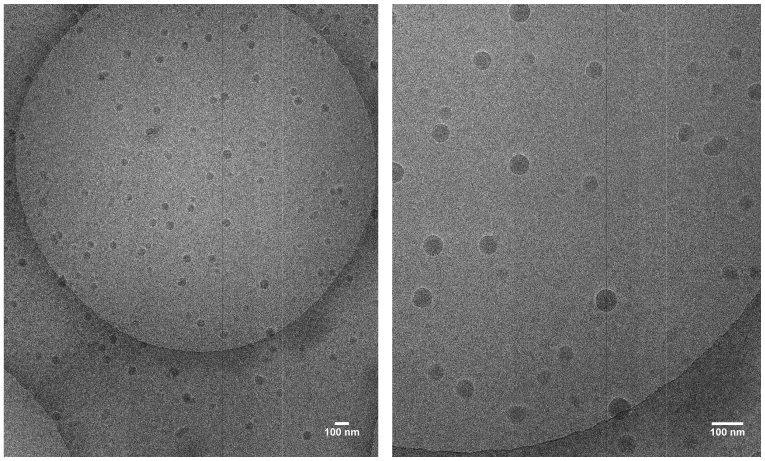


Abbildung 62: Cryo-TEM-Messung der PP_m(27a)-L.

Die Cryo-TEM-Messung (d≈66 nm) zeigte einen kleineren Durchmesser als die DLS-Messung (d=108 nm). Dieses bereit bekannte Phänomen wird der Kern-Schale-Struktur der Polyplexe zugeschrieben. Sie bestehen aus einem dichtbepackten Kern umgeben von einer solvatisierten und expandierten Schale. Da die Schale von Uranylacetat nicht angefärbt wird, ist in der Cryo-TEM nur der Kern visualisierbar. Somit ergibt sich für die pSar-Schale ein Durchmesser von ca. 42 nm.[91, 102]

- **Disulfid-Reduktion**

Um die Gen-Expression zu ermöglichen, müssen Nanopartikel vor der Fusion mit dem Lysosom aus den Endosomen entkommen.

Es wurde bereits im Vorfeld angenommen, dass die Disulfid-Bindungen zwischen dem Polymer und dem Vernetzer (LAH*/GALA*) durch das intrazelluläre Glutathion (GSH) abgespaltet werden würden. Die somit entkoppelten Vernetzer würden das *endosomal escape* induzieren und die mRNA/pDNA in das Cytoplasma freisetzen.[7, 55] Zur Kontrolle dieses Ereignisses wurden Polyplexe mit 10 mM Glutathion (GSH-Konzentration in der Zelle 2–10 mM) für 2 h bei 37°C inkubiert und durch die Gelelektrophorese analysiert. Die mRNA/pDNA wurde bei allen Polyplexen im Gel freigesetzt.

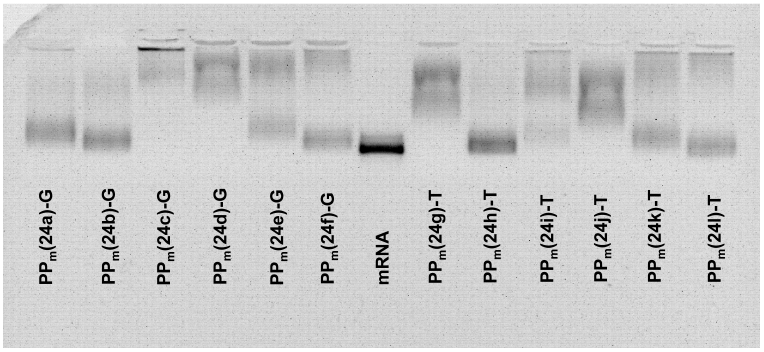


Abbildung 63: Freisetzung der mRNA nach zweistündiger Inkubation der Polyplexe mit 10 mM GSH-Lösung bei 37°C.

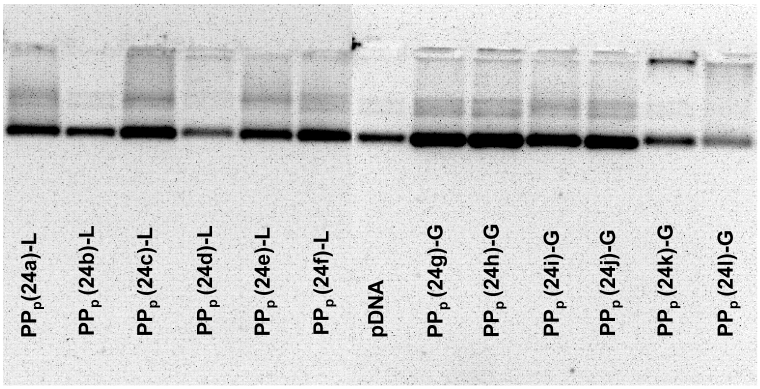


Abbildung 64: Freisetzung der pDNA nach zweistündiger Inkubation der Polyplexe mit 10 mM GSH-Lösung bei 37°C.

- **Plasma-Stabilität**

Die Plasma-Stabilität der Polyplexe wurde beispielhaft anhand von drei Polyplexen, zwei aus linearen Polymeren mit unterschiedlichen pSar-Blocklängen und einem Miktoarm-Polymer, *via* Gelelektrophorese untersucht. Diese wurden zwei Stunden bei 37 °C mit 50%igem humanem Plasma inkubiert und aufs Gel aufgetragen. Die mRNA/pDNA wurde nur eine Stunde mit dem Plasma inkubiert, trotzdem reichte diese Zeit zum kompletten Abbau der mRNA aus, welche nicht mehr im Gel zu sehen war. Die inkubierte pDNA im Plasma bildete Schlieren im Gel, da sie in

mehreren kleinen Fragmenten abgebaut wurde. Die Polyplexe zeigten allesamt komplexierte mRNA/pDNA, welche noch in den Gel-Taschen vorlagen.

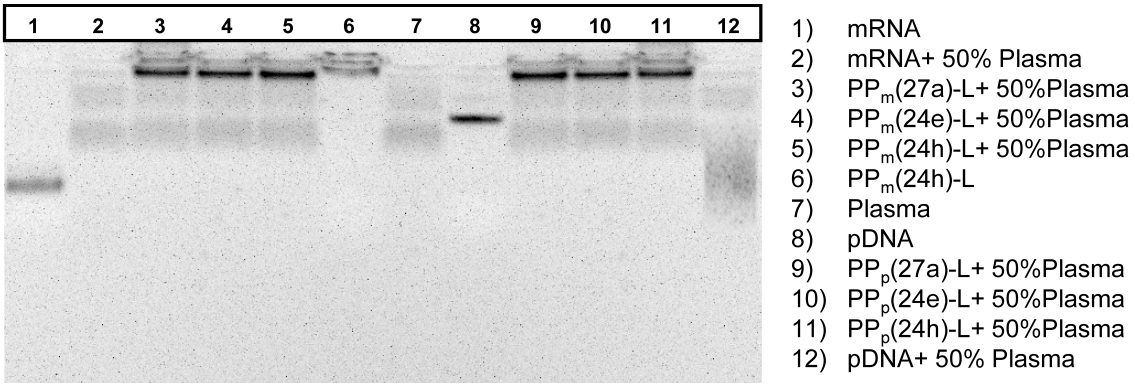


Abbildung 65: Plasma-Stabilitätsnachweis der mRNA- und pDNA-Polyplexe durch Agarose-Gelelektrophorese nach zwei-stündiger Inkubation der Polyplexe in humanem Plasma (nackte mRNA und -pDNA wurden eine Stunde inkubiert).

Zusätzlich wurde für die Untersuchung der Serum-Stabilität der vernetzten gegenüber nicht-vernetzten Polyplexe die Mehrwinkel-Lichtstreuung im Serum verwendet.

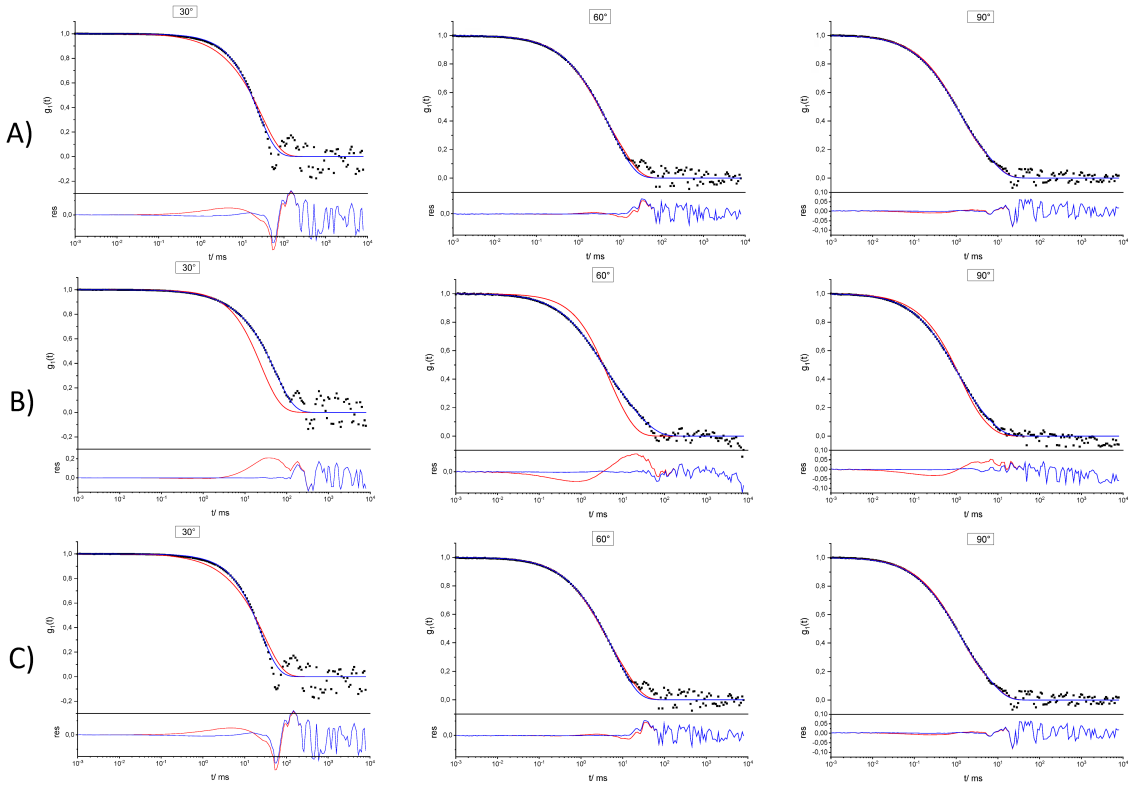


Abbildung 66: Mehrwinkel-Lichtstreuung der PP_p(24f)-L (A) und PP_m(24f)-L (C) im Vergleich zu PP_p(24f) (B) im Serum.

Während der LAH*-vernetzte Polyplex eine leichte Winkelabhängigen Aggregatsbildung im Serum zeigte, bildete der nicht-vernetzte Polyplex Aggregate im Serum.

3.5.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz der Polyplexe

Die Transfektionseffizienz der hergestellten Polyplexe wurde in verschiedenen Zellpopulationen untersucht:

1. PBMC: Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) sind periphere Blutzellen mit einem runden Kern, die aus T-Zellen (70–85%), B-Zellen (5–10%), NK-Zellen (5–20%), Monozyten (10–20%) und dendritischen Zellen (1–2%) bestehen. Der Fokus in dieser Arbeit lag auf den T-Zellen. Die peripheren T-Zellen ($CD3^+$) sind aus T-Helferzellen ($CD4^+$) und cytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$) in einem Verhältnis von 2:1 zusammengesetzt.[103] Während cytotoxische T-Zellen Apoptose, in vor allem viral-infizierten Zellen und Tumorzellen, auslösen, spielen T-Helferzellen eine wichtige Rolle bei den humoralen Immunantworten und bei der Stimulation der B-Lymphozyten. Diese Eigenschaften machen T-Zellen zu interessantem Ziel in den Krebsimmuntherapie und Vakzin-Herstellung.[104]

2. HEK 293T-Zellen: sind immortalisierte humane embryonale Nierenzellen. Sie sind einfach zu kultivieren und zu transfizieren. Deshalb wurden sie in den Transfektion-Experimenten und Impfstoff-Produktionen großflächig eingesetzt.[105]

3. DC2.4-Zellen: DC2.4 sind immortalisierte murine dendritische Zellen. DC2.4 hat die für dendritische Zellen charakteristischen Merkmale, u.a. Zellmorphologie und Expression von für dendritische Zellen spezifischen Markern sowie die Fähigkeit zur Phagozytose und Präsentation exogener Antigene an den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Klassen I- und MHC-Klassen II-Moleküle.[106]

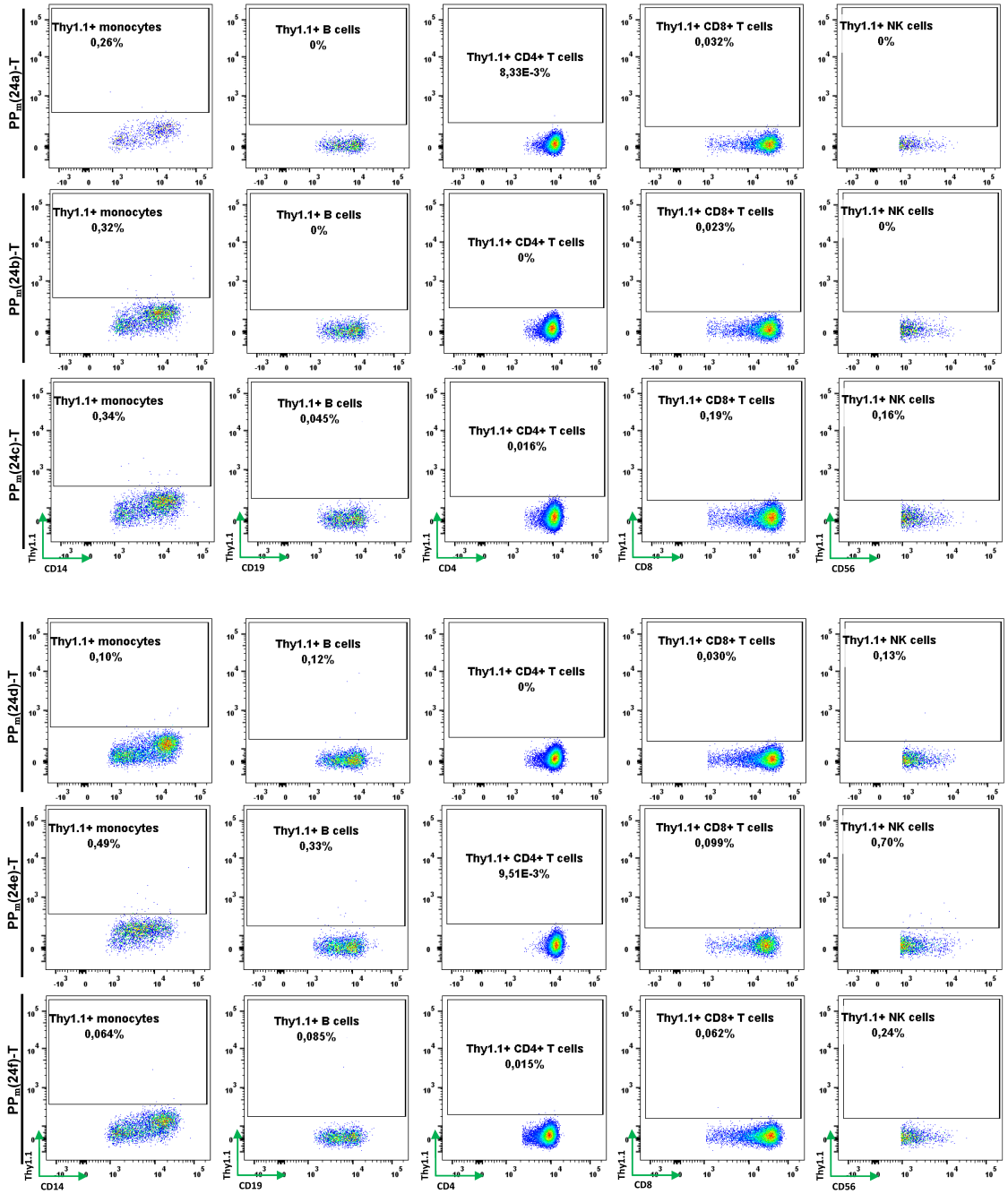
Dendritische Zellen (DCs) sind eine Untergruppe von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) und sind in den meisten Gewebearten vorhanden (z.B. Haut und Schleimhäute von Nase, Lunge, Magen und Darm). Eine der Hauptfunktionen von DCs sind die Phagozytose fremder Pathogene und die Präsentation der verarbeiteten Antigene an naive T-Zellen zur Regulierung adaptiver Immunantworten. DCs exprimieren auch Toll-like-Rezeptoren und unterstützen die Regulierung der angeborenen Immunantworten.[107-109] Da bereits eine geringe Anzahl dieser Zellen eine potente Immunantwort hervorrufen können, werden sie für die Tumorimmuntherapie verwendet.[110-111]

3.5.2.1 mRNA-Transfektion

Die Polyplexe wurden nach einem im Arbeitskreis etablierten Protokoll hergestellt.[7] Diese Polyplexe sollten zur Transfektion von Thy1.1-Rezeptor (CD90.1)-kodierenden mRNA in T-Zellen der humanen PBMCs verwendet werden. Thy1.1 (CD90.1) ist ein kleines Glycophosphatidylinositol (GPI)-verankertes Protein, welches bei humanen PBMCs nicht vorkommt.[112] Dies macht eine spätere Markierung der $Thy1.1^+$-Zellen und deren Erkennung spezifisch. Diese Zellen können 100%ig als solche Zellen, die durch Polyplexe transfiziert wurden, identifiziert werden.

Durchflusscytometrie-Tests zeigten keine mRNA-Expression in keinen der Subpopulationen der Leukozyten der PBMCs an, wodurch eine unspezifischen Zellaufnahme der Polyplexe

ausgeschlossen werden konnte. Die verwendete Gating-Strategie können aus dem Experimental-Teil entnommen werden.



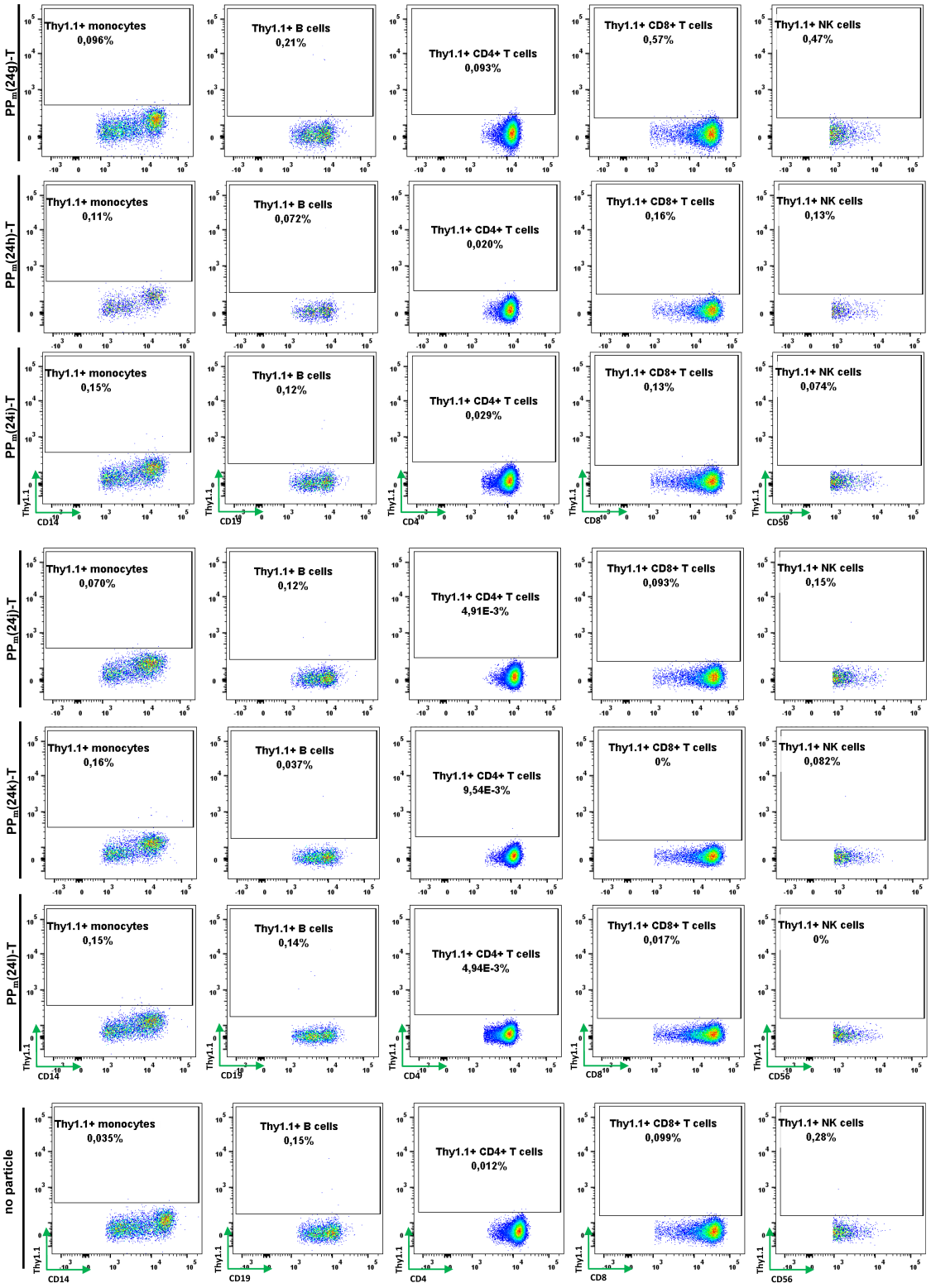


Abbildung 67: Transfektionstests der $PP_m(24a)$-T–$PP_m(24l)$-T in PBMC mit 0.1µg/µL Thy1.1-mRNA.

Beim Zellviabilitätstest der Polyplexe $PP_m(24a)$-T–$PP_m(24l)$-T zeigten keine Toxizität auf. Die prozentuale Anzahl an lebenden Zellen veränderte sich bei den mit Polyplexen behandelten im Vergleich zu unbehandelten Zellen kaum bis gar nicht.

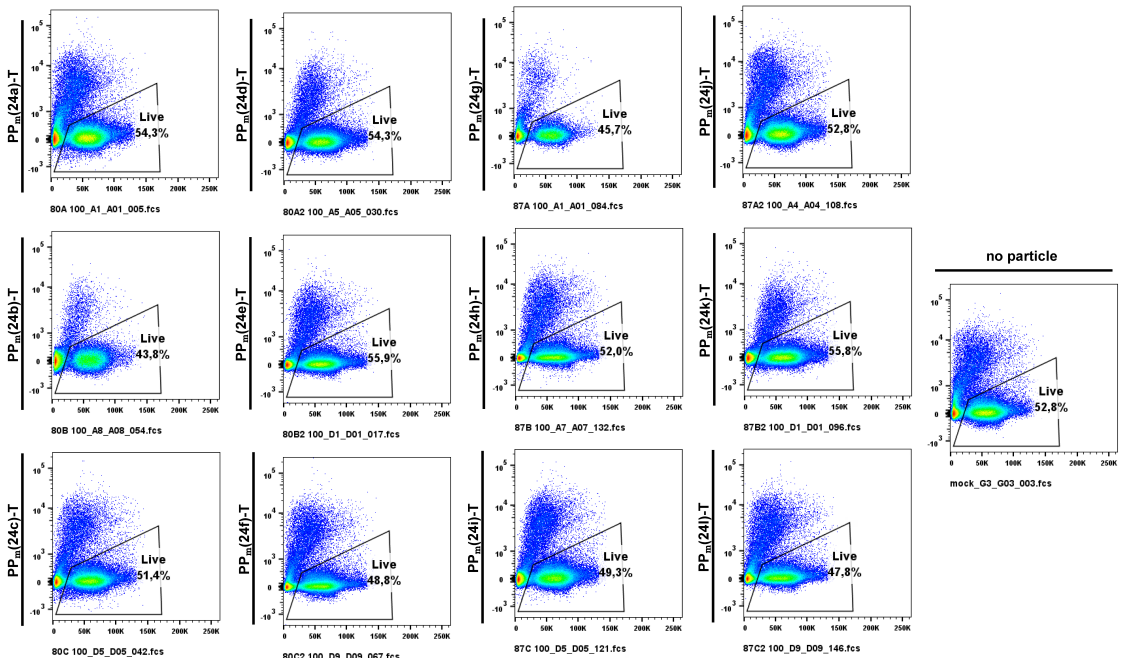


Abbildung 68: Zellviabilitätstest der PP_m(24a)-T–PP_m(24l)-T in PBMC mit 0.1 µg/µL Thy1.1-mRNA.

Eine gezielte Adressierung der T-Zellen sollte durch die Konjugation des monoklonalen Antikörpers (mAb) CD3ε-F(ab')$_2$-Fragments (CD3ε-F(ab')$_2$) am Polyplex erzielt werden. Dies erfolgte durch die SPAAC-Reaktion zwischen den Azid-Gruppen der Polymere und der Alkin-Gruppe des DBCO-modifizierten F(ab')$_2$-Fragments. Der verwendete CD3-Antikörperfragment bindet speziell an die humane CD3ε-Kette, eine 20 kDa schweren Untereinheit des CD3-T-Zell-Antigenrezeptor-Komplexes (CD3-TCR-Komplex). Studien zeigten, dass Anti-CD3 mitogen wirkt, indem es zur Vernetzung vom Fc-Fragment des Antikörpers (AK) mit den Fc-Rezeptoren auf den Monozyten und Makrophagen kommt. Deshalb werden in Immunaktivierungsstudien meistens Antikörper-Fragmenten ohne Fc-Domäne verwendet, die die unspezifische Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems reduziert.[113-114]

Das F(ab')$_2$-Fragment wird durch die enzymatische Spaltung via das Enzym Pepsin erhalten. Pepsin schneidet den Antikörper knapp unterhalb der Hinge-Region an und produziert ein pFc- und ein F(ab')$_2$-Fragment. Das F(ab')$_2$-Fragment besteht also aus zwei Fab-Fragmenten, die durch zwei Disulfid-Brücken zusammengehalten werden und hat eine Molmasse von ca. 110 kDa. F(ab')$_2$-Fragmente sind zweiwertig, wodurch sie im Vergleich zu F(ab)-Fragmente erhöhte Avidität besitzen.[114]

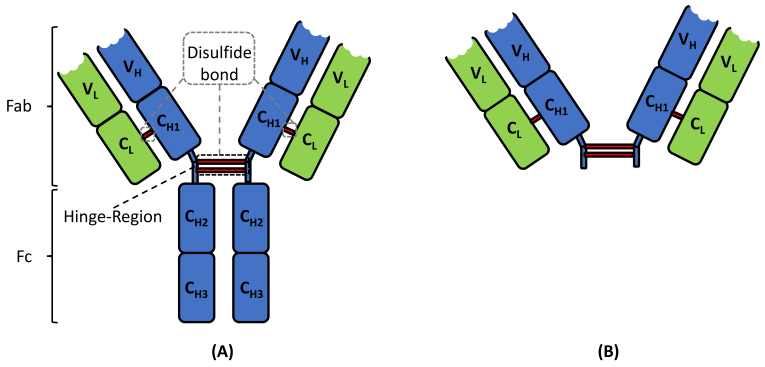


Abbildung 69: Schematische Struktur von einem Antikörper: zwei schwere Ketten (blau) und zwei leichte Ketten (grün). Die leichten Ketten bestehen aus einer variablen Domäne V_L und einer konstante Domäne C_L, während die schweren Ketten aus einer variablen Domäne und drei konstanten Domänen C_H1, C_H2 und C_H3 bestehen. (A) F(ab')$_2$-Fragment (B).

Der Vorteil bei der Verwendung der CD3-AK für die Adressierung des TCR ist, dass (i) reife T-Zellen 10^4–$4{\cdot}10^4$ CD3-TCR-Komplex-Moleküle pro Zelle exprimieren; (ii) da die Bindung von immobilisiertem CD3-AK ein mitogenes Signal für T-Zellen ist, werden lösliche Antikörper zusammen mit dem CD3-TCR-Komplex schnell endozytiert; (iii) bis zu $15{\cdot}10^4$ AK-Moleküle an einer Zelle binden können. Da der internalisierte CD3-TCR-Komplex teilweise recycelt wird, wurden Internalisierungsraten von ungefähr $42{\cdot}10^4$ Molekülen/Zellen pro 24 Stunden in der immortalisierten humanen T-Zelllinie *Jurkat* beobachtet.[104]

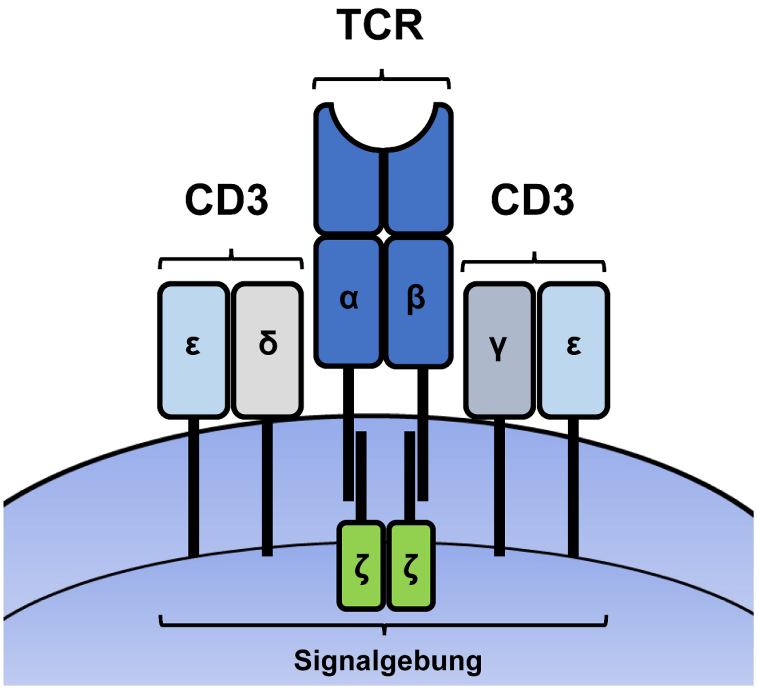
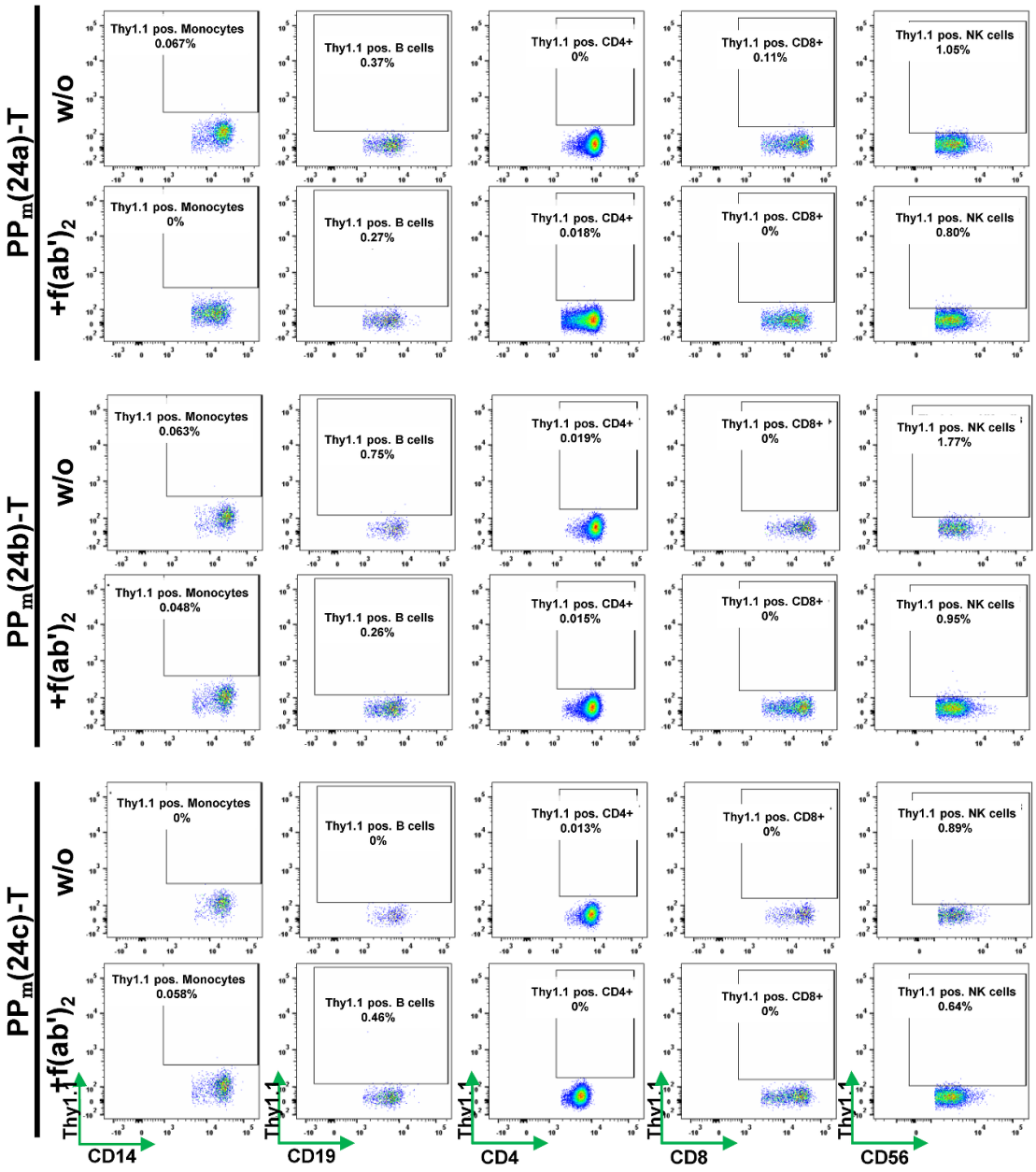
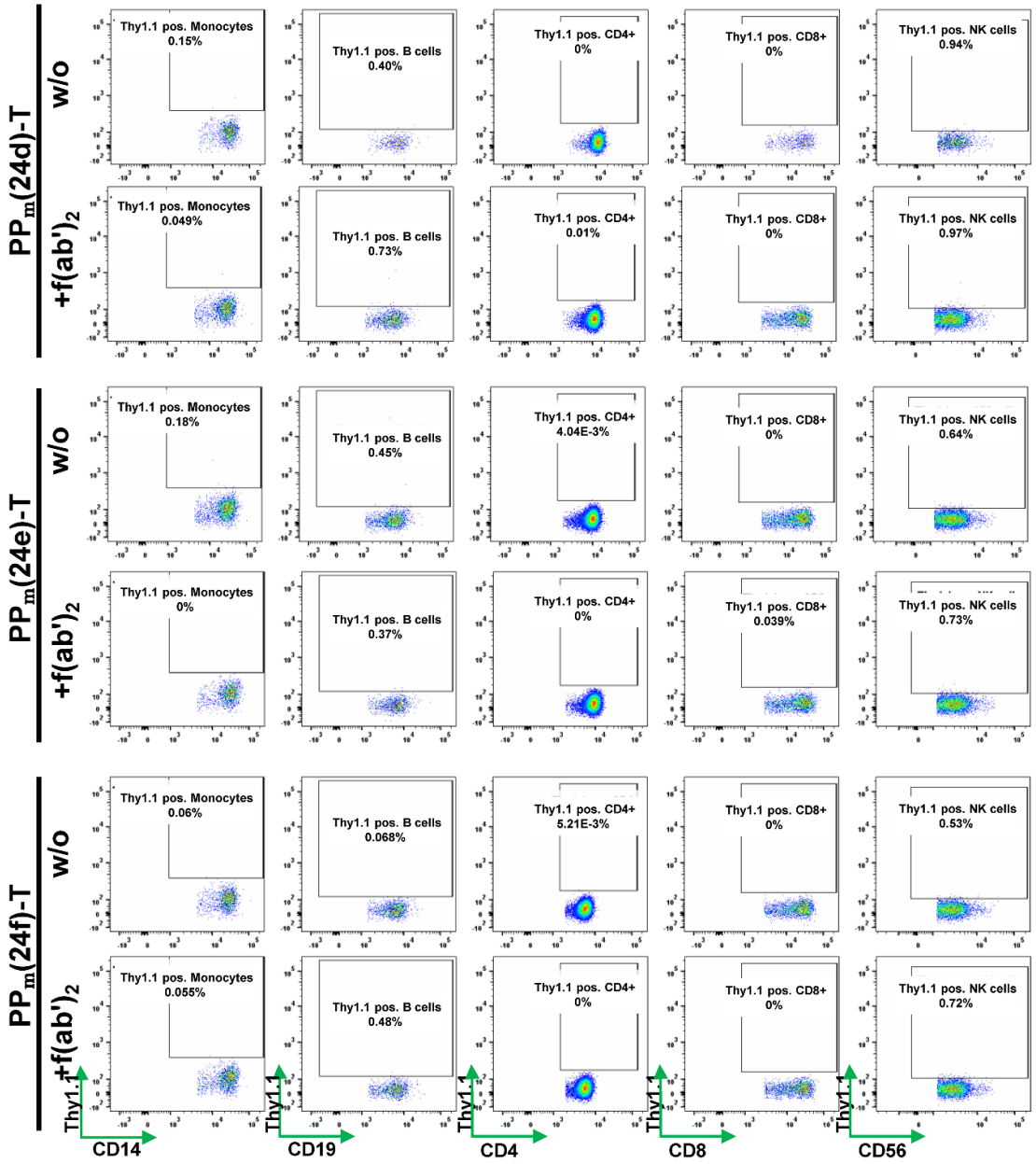
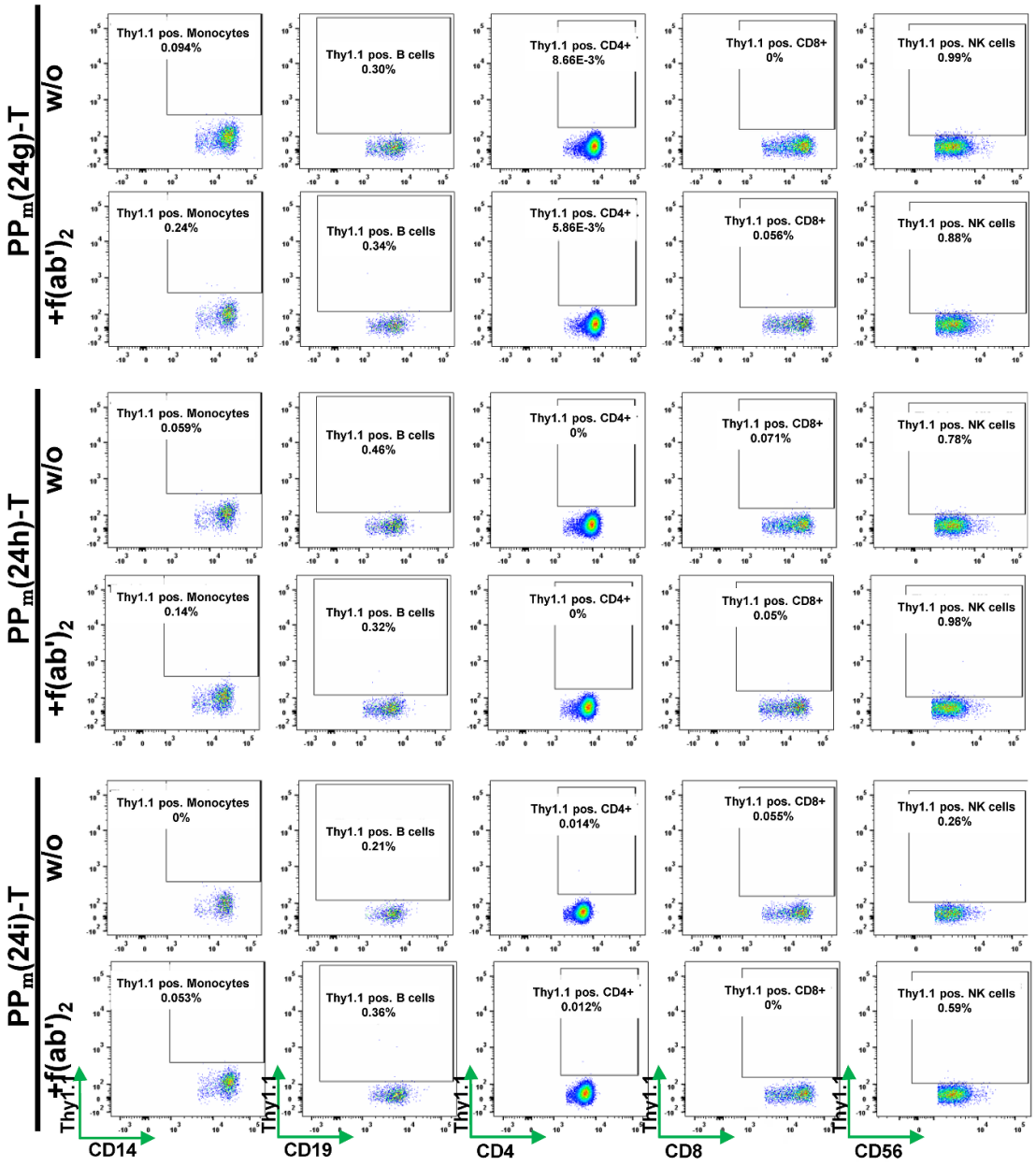


Abbildung 70: Schematische Darstellung des CD3-TCR-Komplexes.

Die durchgeführten Transfektion-Assays mit F(ab')$_2$-Polyplexe zeigten ebenfalls keine mRNA-Expression an.


PPm(24a)-T
w/o
+f(ab')2
Thy1.1 pos. Monocytes 0.067%
Thy1.1 pos. B cells 0.37%
Thy1.1 pos. CD4+ 0%
Thy1.1 pos. CD8+ 0.11%
Thy1.1 pos. NK cells 1.05%
Thy1.1 pos. Monocytes 0%
Thy1.1 pos. B cells 0.27%
Thy1.1 pos. CD4+ 0.018%
Thy1.1 pos. CD8+ 0%
Thy1.1 pos. NK cells 0.80%
PPm(24b)-T
w/o
+f(ab')2
Thy1.1 pos. Monocytes 0.063%
Thy1.1 pos. B cells 0.75%
Thy1.1 pos. CD4+ 0.019%
Thy1.1 pos. CD8+ 0%
Thy1.1 pos. NK cells 1.77%
Thy1.1 pos. Monocytes 0.048%
Thy1.1 pos. B cells 0.26%
Thy1.1 pos. CD4+ 0.015%
Thy1.1 pos. CD8+ 0%
Thy1.1 pos. NK cells 0.95%
PPm(24c)-T
w/o
+f(ab')2
Thy1.1 pos. Monocytes 0%
Thy1.1 pos. B cells 0%
Thy1.1 pos. CD4+ 0.013%
Thy1.1 pos. CD8+ 0%
Thy1.1 pos. NK cells 0.89%
Thy1.1 pos. Monocytes 0.058%
Thy1.1 pos. B cells 0.46%
Thy1.1 pos. CD4+ 0%
Thy1.1 pos. CD8+ 0%
Thy1.1 pos. NK cells 0.64%
Thy1.1
CD14
Thy1.1
CD19
Thy1.1
CD4
Thy1.1
CD8
Thy1.1
CD56


PPm(24d)-T
w/o
+f(ab')2
Thy1.1 pos. Monocytes 0.15%
Thy1.1 pos. B cells 0.40%
Thy1.1 pos. CD4+ 0%
Thy1.1 pos. CD8+ 0%
Thy1.1 pos. NK cells 0.94%
Thy1.1 pos. Monocytes 0.049%
Thy1.1 pos. B cells 0.73%
Thy1.1 pos. CD4+ 0.01%
Thy1.1 pos. CD8+ 0%
Thy1.1 pos. NK cells 0.97%
PPm(24e)-T
w/o
+f(ab')2
Thy1.1 pos. Monocytes 0.18%
Thy1.1 pos. B cells 0.45%
Thy1.1 pos. CD4+ 4.04E-3%
Thy1.1 pos. CD8+ 0%
Thy1.1 pos. NK cells 0.64%
Thy1.1 pos. Monocytes 0%
Thy1.1 pos. B cells 0.37%
Thy1.1 pos. CD4+ 0%
Thy1.1 pos. CD8+ 0.039%
Thy1.1 pos. NK cells 0.73%
PPm(24f)-T
w/o
+f(ab')2
Thy1.1 pos. Monocytes 0.06%
Thy1.1 pos. B cells 0.068%
Thy1.1 pos. CD4+ 5.21E-3%
Thy1.1 pos. CD8+ 0%
Thy1.1 pos. NK cells 0.53%
Thy1.1 pos. Monocytes 0.055%
Thy1.1 pos. B cells 0.48%
Thy1.1 pos. CD4+ 0%
Thy1.1 pos. CD8+ 0%
Thy1.1 pos. NK cells 0.72%
Thy1.1
CD14
Thy1.1
CD19
Thy1.1
CD4
Thy1.1
CD8
Thy1.1
CD56


PPm(24g)-T
w/o
+f(ab')2
Thy1.1 pos. Monocytes 0.094%
Thy1.1 pos. B cells 0.30%
Thy1.1 pos. CD4+ 8.66E-3%
Thy1.1 pos. CD8+ 0%
Thy1.1 pos. NK cells 0.99%
Thy1.1 pos. Monocytes 0.24%
Thy1.1 pos. B cells 0.34%
Thy1.1 pos. CD4+ 5.86E-3%
Thy1.1 pos. CD8+ 0.056%
Thy1.1 pos. NK cells 0.88%
PPm(24h)-T
w/o
+f(ab')2
Thy1.1 pos. Monocytes 0.059%
Thy1.1 pos. B cells 0.46%
Thy1.1 pos. CD4+ 0%
Thy1.1 pos. CD8+ 0.071%
Thy1.1 pos. NK cells 0.78%
Thy1.1 pos. Monocytes 0.14%
Thy1.1 pos. B cells 0.32%
Thy1.1 pos. CD4+ 0%
Thy1.1 pos. CD8+ 0.05%
Thy1.1 pos. NK cells 0.98%
PPm(24i)-T
w/o
+f(ab')2
Thy1.1 pos. Monocytes 0%
Thy1.1 pos. B cells 0.21%
Thy1.1 pos. CD4+ 0.014%
Thy1.1 pos. CD8+ 0.055%
Thy1.1 pos. NK cells 0.26%
Thy1.1 pos. Monocytes 0.053%
Thy1.1 pos. B cells 0.36%
Thy1.1 pos. CD4+ 0.012%
Thy1.1 pos. CD8+ 0%
Thy1.1 pos. NK cells 0.59%
Thy1.1
CD14
Thy1.1
CD19
Thy1.1
CD4
Thy1.1
CD8
Thy1.1
CD56

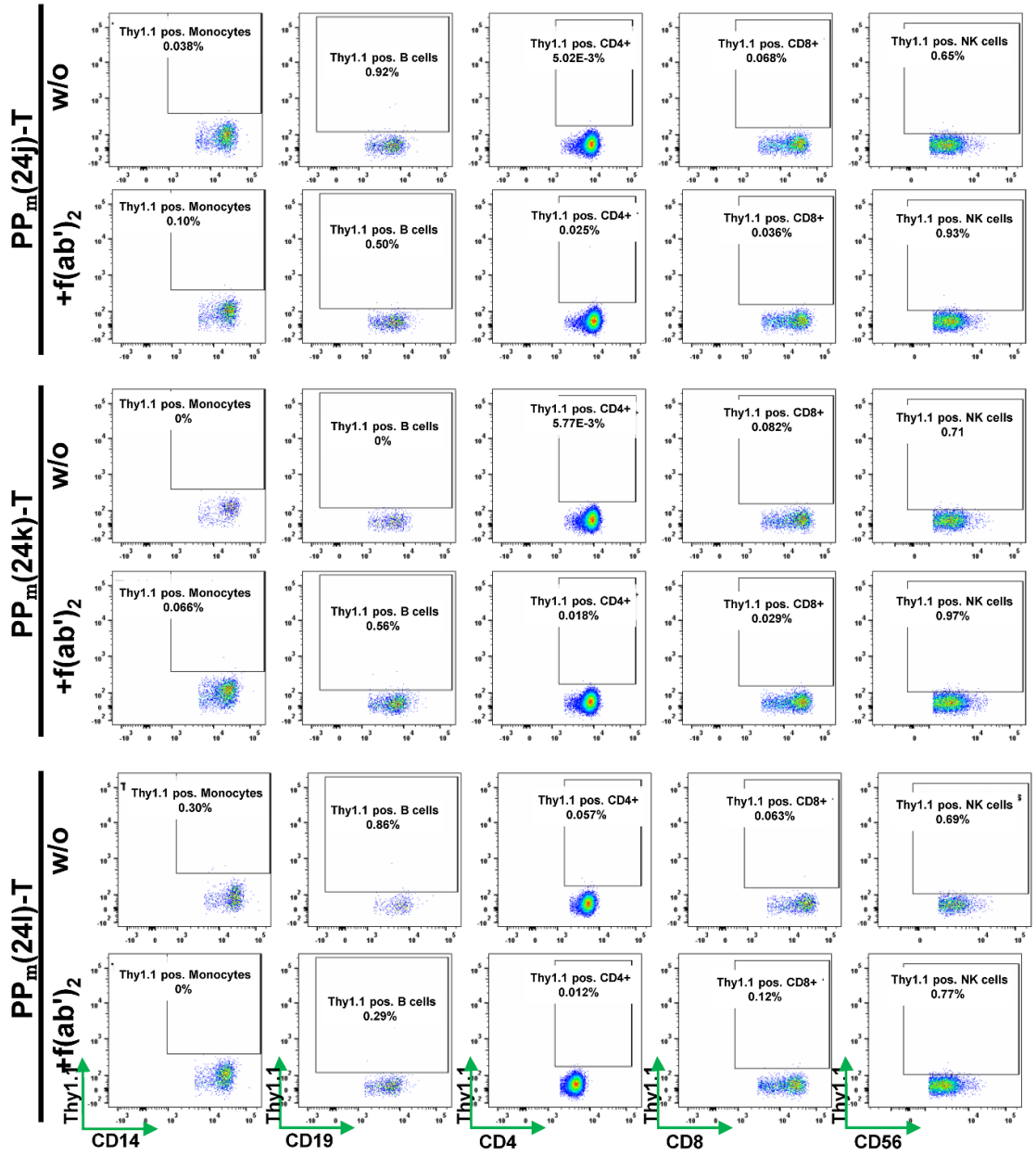


Abbildung 71: Transfektionstests der PP_m(24a)-T–PP_m(24l)-T mit und ohne $F(ab')_2$ in PBMCs mit 0.1µg/µL mRNA bei N/P1, 1.25.

Die Verwendung der HELLER *et al.*-Polymere (s. Schema 7) vernetzt mit LAH* und GALA* führte ebenso zu keiner Expression (s. Abbildung 72).

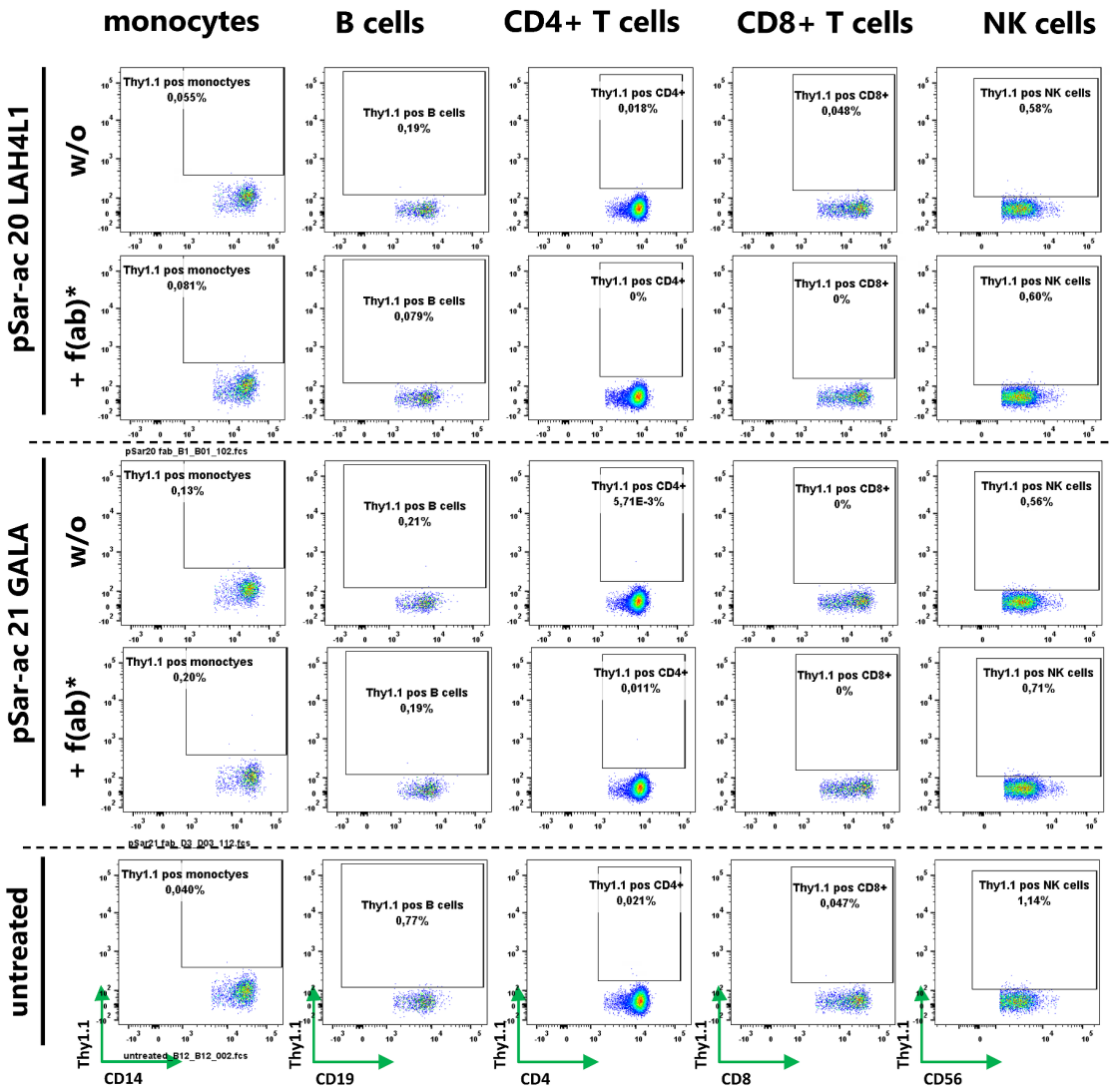


Abbildung 72: Transfektionstests der Polymeren basierend auf HELLER *et al.*-Systemen mit und ohne F(ab')$_2$ in PBMCs.

Charakterisierung der F(ab')$_2$-Polyplexe wurde beispielhaft anhand dreier Polyplexe in Abbildung 73 dargestellt.

Die Konjugation der F(ab')$_2$-Fragmente führte zu einer Zunahme des Radius des Polyplexes und zu einer Abnahme des ζ-Potentials, hervorgerufen durch die negative Ladung des AKs.

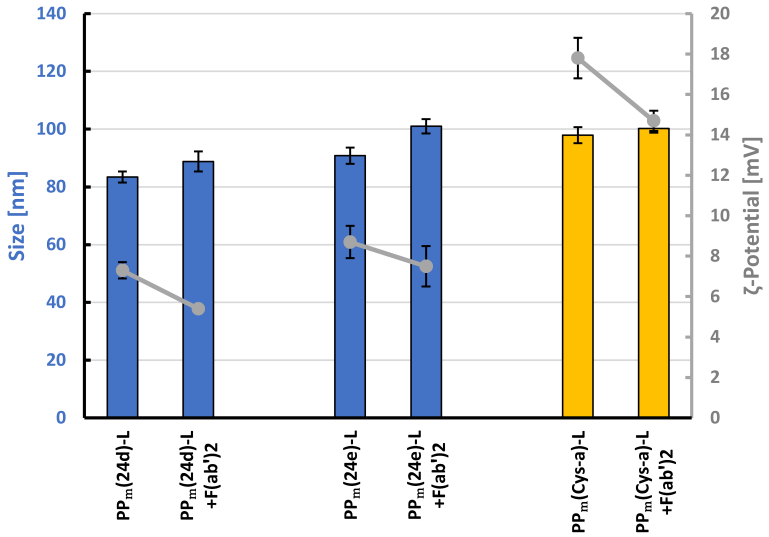


Abbildung 73: Größe und ζ-Potential der F(ab')$_2$-Polyplexe mit mRNA bei N/P6 und 0.1 µg Thy1.1 mRNA.

Die Erhöhung des N/P-Verhältnisses auf 6 führte zu keinem beobachtbaren Unterschied in Hinblick auf die mRNA-Expression der der Polyplexe. Die Verwendung von LAH* als Vernetzer führte ebenso zu keiner Thy1-mRNA-Expression.

Eine Transfektion der HEK 293T-Zellen mit LAH*- und GALA*-vernetzten mRNA-Polyplexen blieb ebenso erfolglos.

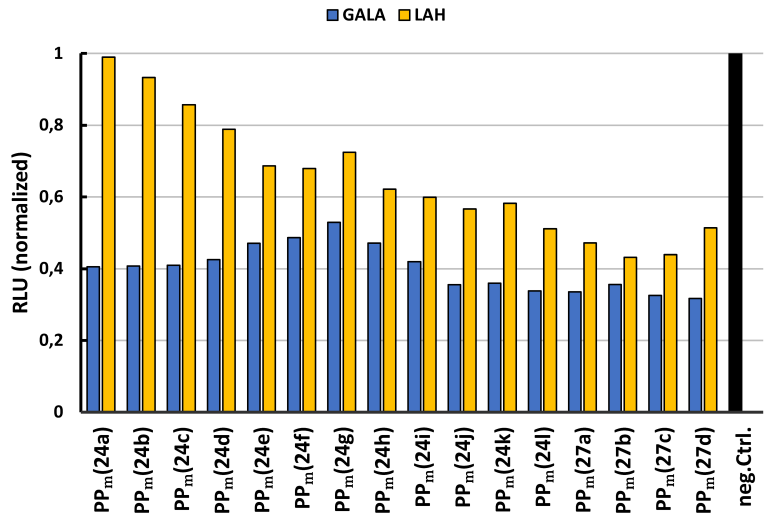


Abbildung 74: Normalisierte RLU-Werte nach 18 h Inkubation der HEK 293T-Zellen mit den LAH*- und GALA*-vernetzten Fluc-mRNA-Polyplexen bei N/P6.

Nach all den negativen Ergebnissen Deshalb wurde die Bindung an das TCR *via* CD3-Färbung der T-Zellen an PP$_m$(24k)-T bei N/P6 ohne (w/o) und mit F(ab')$_2$-Fragment untersucht.

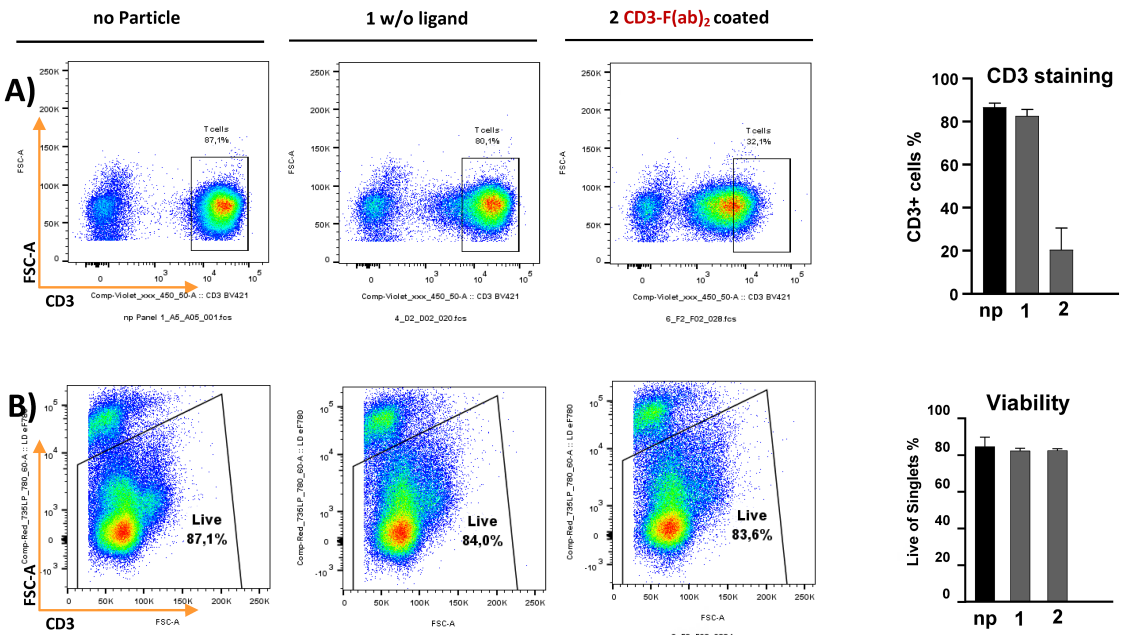


Abbildung 75: DC3-Färbung der inkubierten T-Zellen mit Polyplexen mit und ohne F(ab')$_2$-Fragment (A), Viabilitätstest (B) mit 500 ng Thy1.1 mRNA.

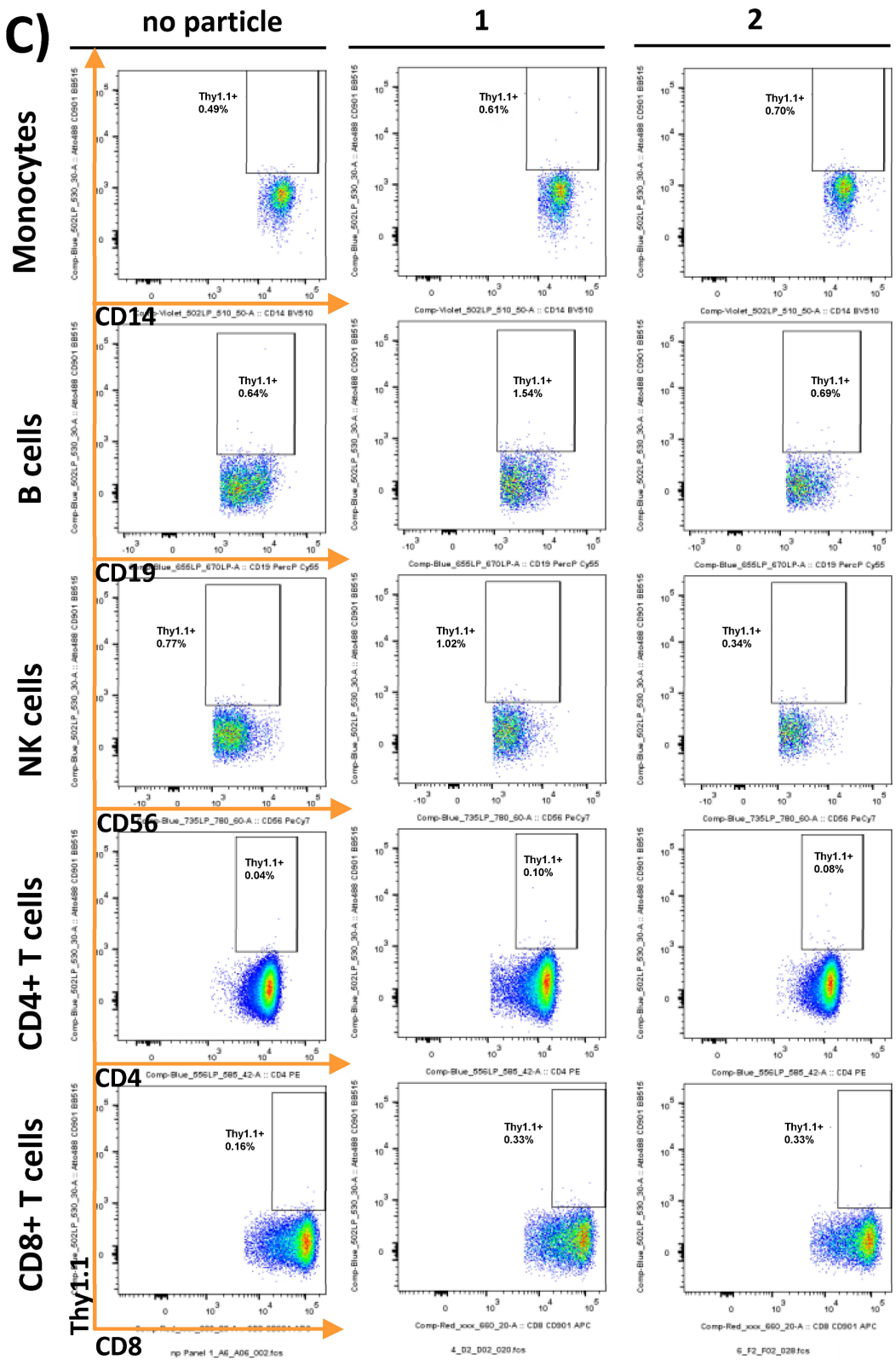


Abbildung 76: Thy1.1-Expression der PBMCs nach 30 min Co-Inkubation mit Polyplexen und weiteren 5.5 h Inkubation mit 500 ng mRNA.

Die CD3-Färbung der behandelten T-Zellen mit den F(ab')$_2$-Polyplexen im Vergleich zu Polyplexen ohne F(ab')$_2$ zeigte einen deutlichen Rückgang der Anzahl an CD3$^+$-Zellen. Dies liegt

daran, dass nach der Bindung des AKs am CD3-TCR-Komplex diese zusammen internalisieren.[115-116] Dadurch konnte die erfolgreiche Bindung der F(ab')$_2$-Polyplexe an den T-Zellen und die Aufnahme über Rezeptor-vermittelte Endocytose nachgewiesen werden. Trotzdem konnte keine mRNA-Expression detektiert werden (s. Abbildung 76).

Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Polyplexe nicht aus dem Endosomen entkommen können und stattdessen samt der mRNA abgebaut werden.

3.5.2.2 pDNA-Transfektion

Die Transfektionseffizienz der pDNA-Polyplexe wurde in HEK 293T-Zellen untersucht.

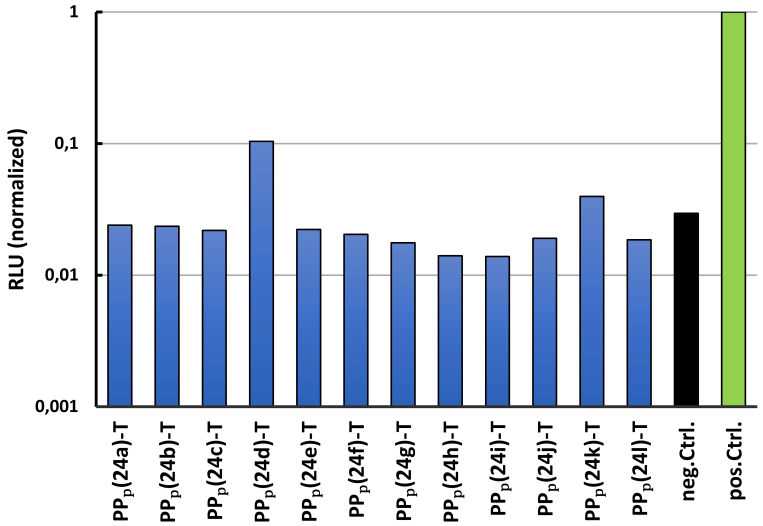


Abbildung 77: Logarithmische Darstellung der normalisierte RLU-Werte nach 18 h Inkubation der HEK 293T-Zellen mit den TETA*-vernetzten pDNA-Polyplexe bei N/P6 (n=2).

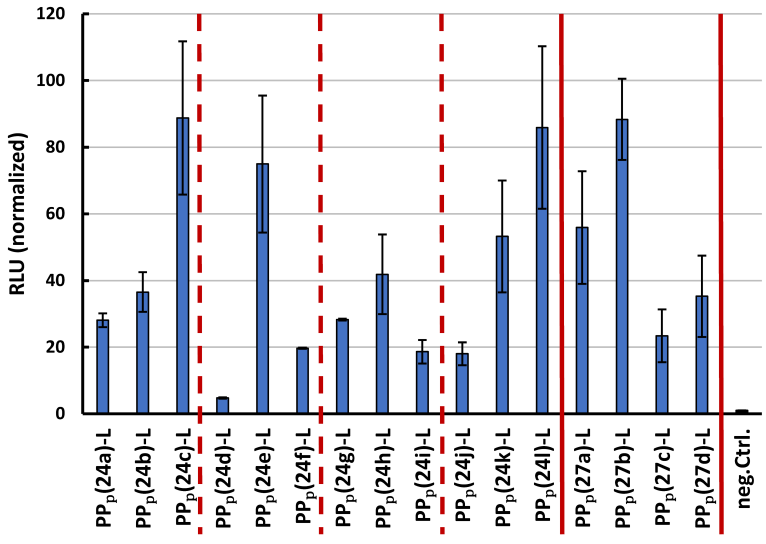


Abbildung 78: Normalisierte RLU-Werte nach 18 h Inkubation der HEK 293T-Zellen mit den LAH*-vernetzten pDNA-Polyplexe bei N/P6 (n=3).

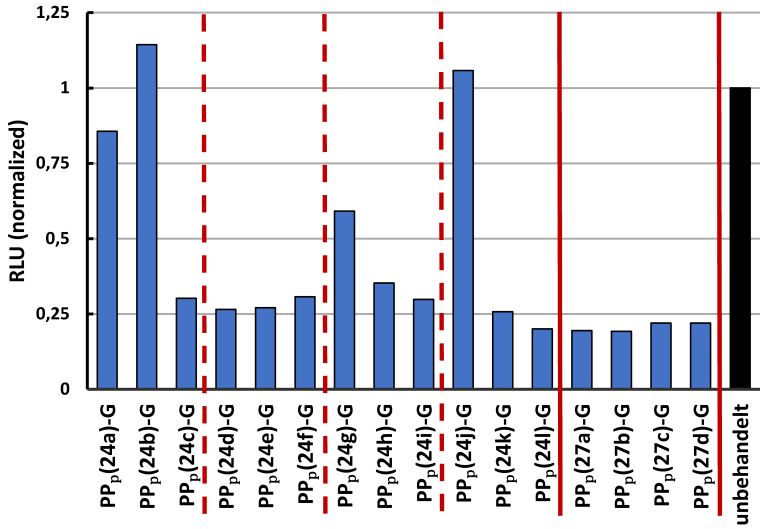


Abbildung 79: Normalisierte RLU-Werte nach 18 h Inkubation der HEK 293T-Zellen mit den GALA*-vernetzten pDNA-Polyplexen bei N/P6.

Auf Grund der besseren Transfektionsraten bei den LAH*-Polyplexe wurden diese für weitere Tests mit DC2.4-Zellen ausgesucht.

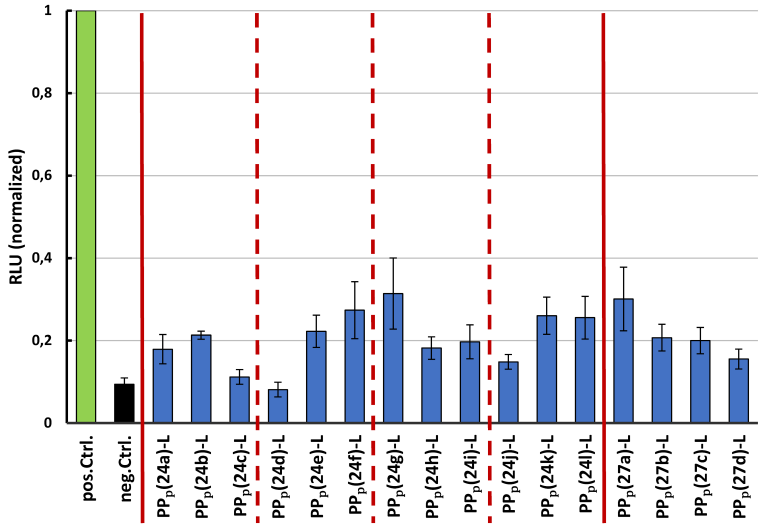


Abbildung 80: Normalisierte RLU-Werte nach 18 h Inkubationszeit der DC2.4-Zellen mit den LAH*-Polyplexen bei N/P6 (n=5).

Bei den Polyplexen mit pLys-Kettenlängen von etwa zehn Einheiten (PP_p(24d)–PP_p(24f) und PP_p(24j)–PP_p(24l)) zeigten jene auf Polymere mit längeren pHcy-Ketten von ca. 20 Einheiten basierende Polyplexe eine höhere Transfektionseffizienz. Bei den Polyplexen aus Miktoarm-Polymeren (PP_p(27a)–PP_p(27d)) konnte derselbe Zusammenhang festgestellt werden. Somit zeigte PP_p(27a)-L mit den pLys- und pHcy-Kettenlängen von 9 und 28 Einheiten die höchste Transfektionseffizienz innerhalb der Gruppe. Eine Ausnahme stellt PP_p(24g)-L mit der Polymer-Struktur N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_8$-*b*-pLys$_{21}$ dar.

- **Funktionalisierte Polyplexe**

a) Polyplexe aus Bisalkyl-Polymeren

Den Einfluss der Bisalkyl-Gruppe (BA-Gruppe) und dessen Topologie in den Polyplexen wurde anhand der Transfektionseffizienz der Polyplexe basierend auf bisalkylierten Polymeren im Vergleich zu den Polyplexen aus den vergleichbaren Polymeren ohne BA-Gruppe in DC2.4-Zellen untersucht.

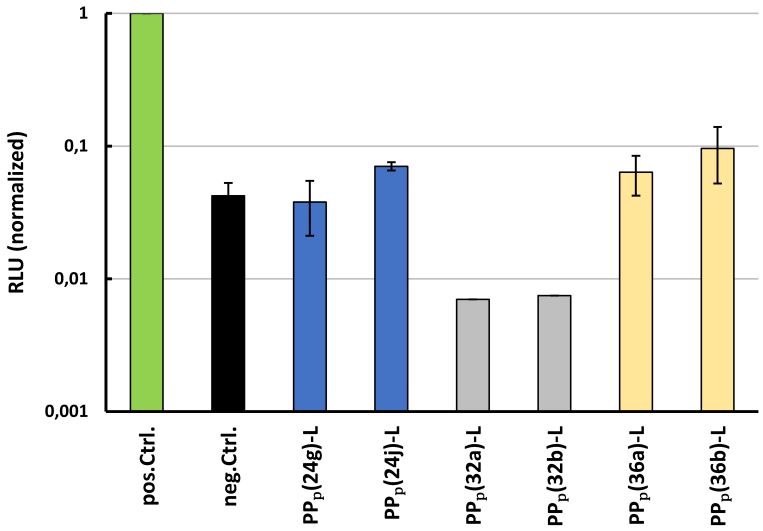


Abbildung 81: Logarithmische Darstellung der Transfektionseffizienz von Polyplexen basierend auf bisalkylierten Polymeren (PP_p(32a–32b), PP_p(36a–36b)) und Polymeren ohne Bisalkyl-Gruppe (PP_p(24g, 24j)) (n=2).

Die Polyplexe aus den Polymeren mit der BA-Kette als Initiator, zeigten keine Transfektion an (PP_p(32a), PP_p(32b)). Dies kann an der deutlich niedrigeren Löslichkeit diese Polymere in wässrigem Milieu liegen. Die hydrophobe BA-Gruppe wird sich vermutlich durch Rückfaltung in den mittleren hydrophoben Bereich des Polyplexes anordnen wollen, da sie aber direkt am pSar-Block liegt, beeinflusst sie dadurch die Hydrophilie des Polyplexes. Ist aber die BA-Gruppe am pLys gebunden, stellt die Rückfaltung kein Problem dar.

PP_p(36a) und PP_p(36b), beide mit einer BA-Kette am Lys-Ende, zeigten eine weniger ausgeprägte Transfektion als die entsprechende Polymere ohne BA-Kette (PP_p(24g), PP_p(24j)). Diese Polymere zeigten keinerlei Löslichkeitsprobleme in wässrigen Lösungen.

b) Trimannose-Konjugation an pDNA-Polyplexen

Die Bindung der Polyplexe am DC-SIGN-Rezeptor wurde als Strategie für die gezielte Adressierung der DC2.4-Zellen ausgesucht. Der DC-SIGN-Rezeptor (CD209) kommt auf der Zelloberfläche von DCs und Makrophagen vor und bindet an hochmannosylierten und hochfucosylierten Glucoproteinen.[117] Deshalb wurden die Polyplexe mit Trimannose (TM) funktionalisiert. Dazu diente mit DBCO-funktionalisierte Trimannose, welche durch SPAAC an die Azid-Gruppe des Initiators geknüpft wurde.

Um den Einfluss der TM-Konzentration auf die Transfektionseffizienz der Polyplexe zu untersuchen, wurden die vorhandenen Azid-Gruppen auf der Korona der Polyplexe einmal zu 0.3 Äq und einmal zu 1 Äq mit TM funktionalisiert.

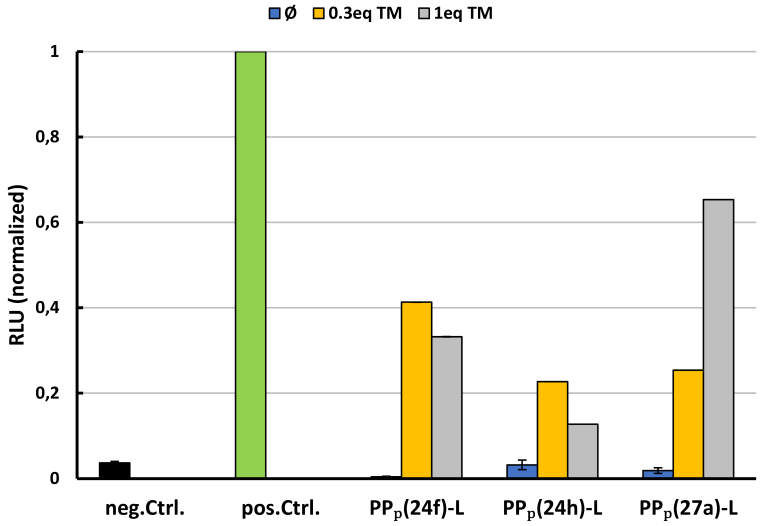


Abbildung 82: RLU-Werte der mit unterschiedlichen Mengen an Trimannose funktionalisierten Polyplexe.

Die TM-funktionalisierten Polyplexe zeigten alle gegenüber den nicht-funktionalisierten Polyplexen eine höhere Transfektionsrate. Interessant hierbei ist, während PP_p(27a)-L (aus Miktoarm-Polymer) bei 1 Äq TM hohe Transfektionsrate zeigte, zeigten PP_p(24f)-L und PP_p(24h)-L (aus linearen Polymeren) höhere Transfektionsrate bei 0.3 Äq TM an. Die geringe Transfektionsrate der mit 1 Äq TM-funktionalisierten Polyplexe kann an einer niedrigeren Aufnahme der Polyplexe, hervorgerufen durch die Bildung größerer Partikel und des niedrigeren ζ-Potentials liegen (s. Abbildung 83).

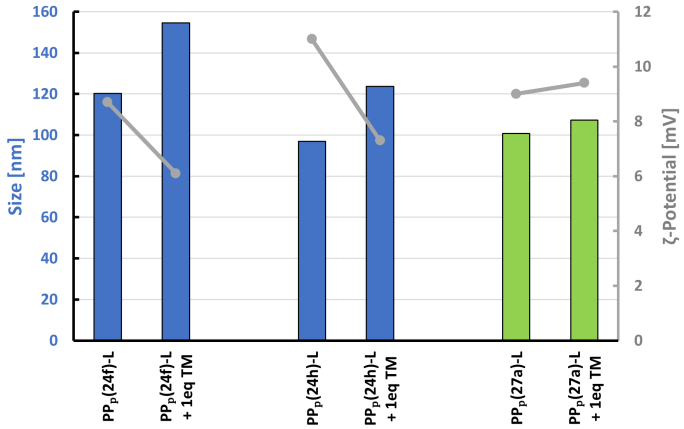


Abbildung 83: Größe und ζ-Potential der TM-funktionalisierten LAH*-Polyplexe mit pDNA bei N/P6 und 1 µg pDNA.

c) Trimannose-Konjugation an mRNA-Polyplexen

Zum Vergleich wurden mRNA-Polyplexe PP_m(27a)-L und PP_m(Cys-a)-L ebenso mit 0.3 Äq und 1 Äq mit TM funktionalisiert.

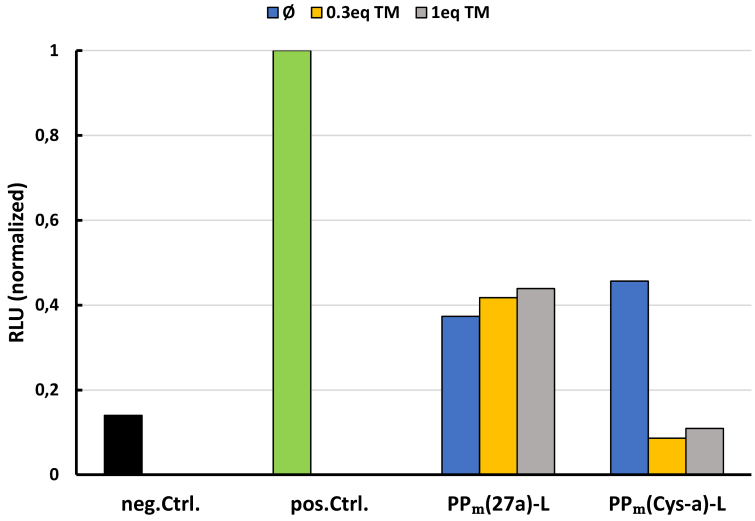


Abbildung 84: RLU-Werte der mit unterschiedlichen Mengen an TM-funktionalisierten PP_m(27a)-L und PP_m(Cys-a)-L.

Während PP_m(27a)-L mit und ohne TM kaum ein Unterschied bei den RLU-Werten zeigte, wies PP_m(Cys-a)-L mit TM eine viel niedrigere Transfektionseffizienz auf.

Dass PP_m(27a)-L im Vergleich zu PP_p(27a)-L eine niedrigere Transfektionseffizienz zeigt, liegt vermutlich an der unterschiedlichen Nukleinsäure-Stabilität während der Endocytose. Da pDNA (doppelsträngig) stabiler ist als mRNA (einzelsträngig), werden mehr pDNA-Moleküle im Cytosol freigesetzt werden können als mRNA-Moleküle.

Bei PP_m(Cys-a)-L zeigten weder die mit 0.3 Äq noch die mit 1 Äq TM-funktionalisierten Polyplexen eine Transfektion. Es kann sein, dass die Rezeptor-vermittelte Endocytose für auf pCys-basierende Polyplexe nicht geeignet ist.

- **Co-Transfektion der mRNA und pDNA**

Die Suche nach Antworten auf Fragen, wie:

- Ob wie gedacht durch die Abspaltung von Disulfid-Bindungen *via* GSH im Laufe des endosomalen Weges, die mRNA oder pDNA und die Vernetzer aus dem Polyplex freigesetzt werden können
- Können die freigesetzten Vernetzer zur *endosomal esape* des Cargos und somit zu dessen Freisetzung im Cytosol führen
- Gibt es dabei Unterschiede zwischen mRNA- und pDNA-Polyplexe,

führte zu der Co-Transfektion der mRNA mit pDNA. Die Transfektionseffizienz dieser mRNA/pDNA Polyplexe (PP_{pm}) wurde anhand von dualem Luciferase-Assay (DLA) untersucht, welcher die Aktivitätsmessung zweier unterschiedlicher Luciferase-Reporter in einer Probe ermöglicht. Als Reporter-Gen kommen Vektoren wie die Firefly- (Fluc) und Renilla-Luciferasen

(Rluc) in Frage, die unterschiedliche Emissionsbereiche besitzen. (Emissionsbereich: Fluc: 560 – 700 nm, Rluc: 450–650 nm).[118-119]

Die Herstellung der Polyplexe erfolgte durch die Co-Komplexierung der Rluc-pDNA als Kontroll-Reporter, bei einem Mengen-Verhältnis von 10:1 (Firefly:Renilla), mit Fluc-pDNA oder Fluc-mRNA als experimenteller Reporter. Zur Kontrolle und Nachweis der Transfektionseffizienz der Rluc-pDNA wurde eine nicht-kodierende DNA (Dummy DNA) mit transfiziert. Die erhaltenen Daten aus DLA wurde in Abbildung 85 anhand von normalisierten Fluc/Rluc-Aktivitäten dargestellt.

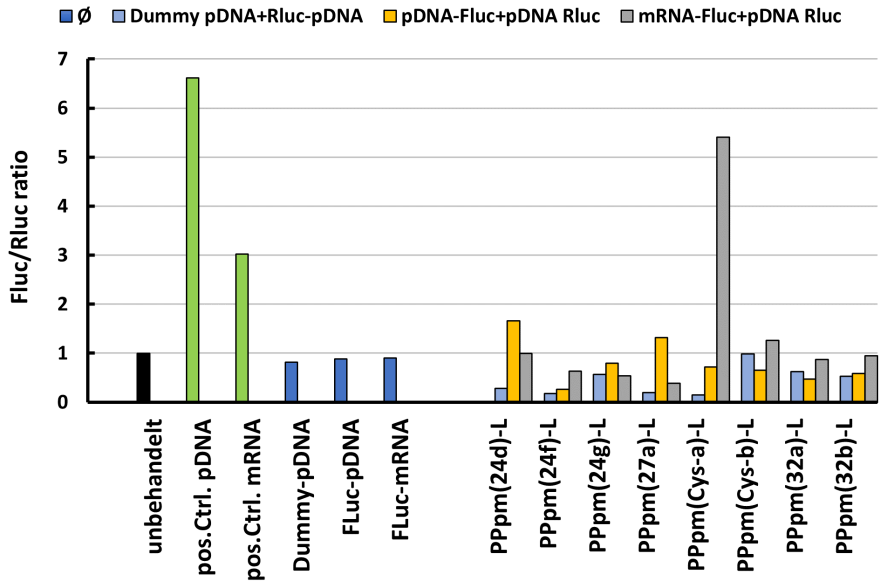


Abbildung 85: Normalisierte Fluc/Rluc-Aktivitäten der Co-transfizierten mRNA/pDNA-Polyplexe (n=3).

Während die pHcy-Polyplexe höhere Transfektionsraten für pDNA in DC2.4-Zellen zeigten, zeigte der pCys-Polyplex ein Maximum für die mRNA-Transfektion an.

3.6 Diskussion

Im Rahmen intensiver Recherchen, mit dem Ziel eine mögliche plausible Ursache für die ineffiziente Transfektion durch die Polyplexe zu finden, ergeben sich mehrere Punkte, die sowohl einzeln als auch in Kombination die Ursache für die erhaltenen Ergebnisse darstellen können.

1. T-Zell-Aktivierung und -Transfektion

Drei Arten von Signalen sind an der Aktivierung naiver T-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen beteiligt: Signal 1 wird vom T-Zell-Rezeptor bereitgestellt, wenn ein spezifisches Peptid-MHC-Komplex erkannt wird. Signal 2 kommt von costimulatorischen Rezeptoren wie CD28, die auf der Oberfläche anderer Immunzellen präsentiert werden, welches deren Nettoeffekt das erhöhte Überleben und Proliferation der T-Zelle, die das Signal 1 empfangen hat, ist. Signal 3 ist an der T-Zell-Differenzierung in die verschiedenen Untergruppen von Effektor-T-Zellen beteiligt.[120-122]

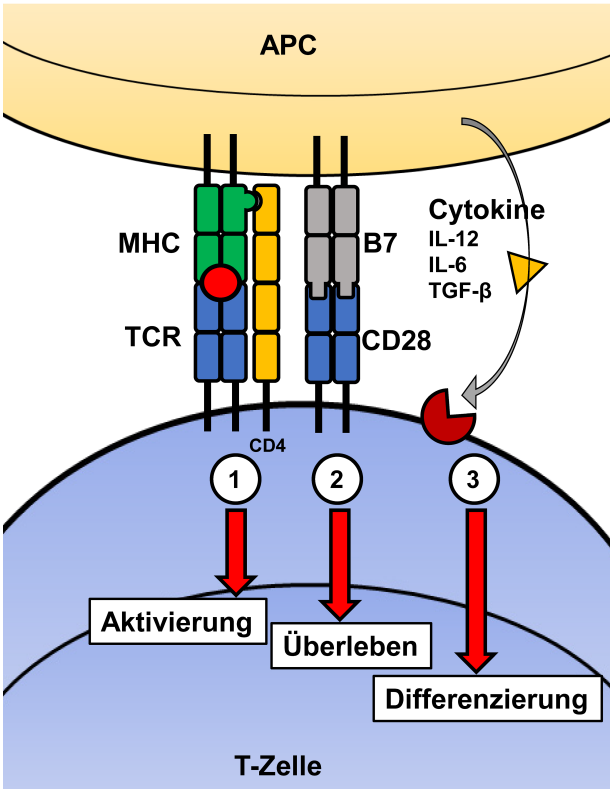


Abbildung 86: Antigen-präsentierende Zellen liefern drei Arten von Signalen für die klonale Expansion und Differenzierung naiver T-Zellen.

Erkennt die T-Zelle ein Antigen in Abwesenheit von Costimulatorischen Signalen wird sie anergisch oder sie stirbt ab. Diese Doppelanforderung, sowohl der Rezeptor-Ligation als auch der Co-stimulation durch dieselbe APC, verhindert eine Reaktion der naiven T-Zellen auf Selbstantigene auf den Gewebezellen, welchen die Co-stimulierende Aktivität fehlen.[120, 123]

Nach 4–5 Tagen durch IL-2 induzierter schneller Proliferation differenzieren aktivierte naive T-Zellen zu Effektor-T-Zellen, die alle Moleküle, die sie für ihre spezialisierten Helfer- oder cytotoxischen Funktionen benötigen, synthetisieren können. Dieser Unterschied zu naiven T-Zellen ist besonders für CD8-zytotoxische T-Zellen nachvollziehbar, da sie in der Lage sein müssen auf jede mit Virus infizierten Zelle zu reagieren, unabhängig davon, ob die infizierte Zelle costimulatorische Moleküle exprimieren können oder nicht. Kurz gesagt, hat sich eine T-Zelle einmal in eine Effektorzelle differenziert, führt die Begegnung mit ihrem spezifischen Antigen zu Immunangriff ohne den Bedarf an eine Co-Stimulation.[120]

BUSCHLE und WAGNER *et al*. stellten 1995 CD3-Polylysin-Konjugate durch Konjugation *via* Disulfidbrücken nach Antikörper-Modifikation und pLys über SPDP her. Jedoch, der Gentransfer zu den T-Zellen *via* Rezeptor-vermittelter Endocytose erforderte eine Voraktivierung der Zellen. Sie beschrieben zwei mögliche Wege für die Zellaktivierung: Eine Möglichkeit sei die Stimulation frisch isolierter Zellen mit IL-2 zusammen mit einem Antigen – eine häufig verwendete Methode zur Expansion von T-Zellen; und eine andere Möglichkeit wäre die Vorinkubation von T-Lymphozyten mit den Antikörpern, die an T-Zell-co-stimulatorische Moleküle binden.[104]

Anti-CD3 und Anti-CD3-F(ab')$_2$ ohne Costimulatoren werden als Immunsuppressiva verwendet.[113, 124-127] Deshalb werden T-Zellen für *in vitro*-Versuche mit Anti-CD3/Anti-CD28, welche als die Gold-Standardmethode gilt, aktiviert. Sie imitieren *in vivo* T-Zell-Aktivierung durch Antigen-präsentierende Zellen.[121]

STEENBLOCK *et al*. entwickelte auf Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA)-basierte Systeme mit costimulatorischen- und Erkennungssignalen (Anti-CD3, Anti-CD28 und MHC-Komplexe) auf der Oberfläche sowie im Partikelkern verkapseltes IL-2.[128]

Mittlerweile werden die T-Aktivator CD3/CD28-Beads (CD3/CD28 Dynabeads®) in fast jedem *in vitro* T-Zell-Assay zur Aktivierung und Expansion von T-Zellen, ohne dass Feeder-Zellen (APCs) oder Antigene erforderlich sind, eingesetzt. Laut Protokoll geschieht das mind. 2–3 Tage vor der eigentlichen Versuchsdurchführung.

OLDEN *et al.* zeigten, dass Transfektionen in ruhenden, nicht aktivierten primären humanen T-Zellen zu vernachlässigbarer Genexpression führten und optimierten die Bedingungen für die Transfektion von humanen T-Zellen, einschließlich der Aktivierungszeit, Zelldichte, DNA-Dosis und Medium. Sie stellten folgenden Bedingungen als optimal für ihre Systeme auf:

Die aufgetauten T-Zellen (zuvor aussortiert aus hu PBMCs) wurden in X-VIVO 15-Medium (spezielles Medium für T-Zell-Wachstum und -Expansion), ergänzt mit IL-21, über 2–16 h kultiviert bevor sie weitere 48 h durch Zugabe von CD3/CD28-DynaBeads aktiviert wurden. Für die Transfektion wurden $500 – 750 \cdot 10^3$ T-Zellen pro Well in OptiMEM-Medium mit 2 µg Nukleinsäure 48 h vor den FACS-Messungen kultiviert. Die Transfektionseffizienz, die für die pDNA- und mRNA-Transfektionen erreicht wurden, betrugen 18% bzw. 25%.[129-130]

KIM *et al.* führten die Transfektion ihrer Anti-CD3ε-F(ab')$_2$-Nanopartikel in 48 Stunden mit CD3/CD28-Dynabeads und IL-2 voraktivierten T-Zellen durch, welche anschließend weitere 48 h mit den Nanopartikeln inkubiert wurden.[131]

STEPHAN *et al.* zeigten, dass bei ihren Anti-CD3ε-F(ab')$_2$-Nanopartikeln, welche zur Transfektion von pDNA in Humane T-Zellen verwendet wurden, erst nach 30 h Inkubation Rezeptoren auf den Oberflächen der behandelten Zellen nachgewiesen werden konnten.[132-133]

TRON/BIONTECH aktiviert für seine Transfektion-Assays T-Zellen 72 h mit CD3/CD28-DynaBeads, welche zuvor in X-VIVO 15-Medium ergänzt mit IL-2 oder mit IL-7 und IL-15 kultiviert worden waren. Die Genexpression wurde nach 72 – 120 h Inkubation mittels Durchflusscytometrie gemessen.[134-138]

Die in dieser Arbeit verwendeten T-Zellen wurden gemäß dem Protokoll des Kooperationspartners (TRON) direkt nach dem Auftauvorgang in einem DC-Medium zur Transfektion durch die Polyplexe eingesetzt. Sie wurden weder voraktiviert noch mit co-stimulatorischen Molekülen versetzt. Die Polyplexe wurden nach nur 30 min Co-Inkubation mit den Zellen durch die Erneuerung des Mediums entfernt bzw. herunter gewaschen. Die Zellen wurden nach anschließenden 5.5 h Inkubation für die FACS-Messung fixiert und gefärbt. (s. 5.1.12 Durchflusscytometrie (FACS-Messungen))

Die Verwendung nicht zuvor aktivierter T-Zellen, die extrem kurze Inkubationszeit zwischen dem Auftauvorgang und dem Transfizieren sowie die ebenfalls kurze Inkubationszeit mit den Polyplexen und unter Umständen gar die Verwendung eines Mediums, das für DC-Zellen und nicht für PBMCs geeignet ist, können allesamt signifikant zu einer mangelhaften mRNA-Transfektion der oben beschriebenen Polyplexe führen.

2. Disulfid-Abspaltung in Endosomen *via* GSH

Die Spaltung der Disulfid-Bindungen zwischen dem Vernetzer und dem Polymer in den hier vorgestellten Polyplexen durch das in Endosomen befindliche GSH ist genau wie bei den von HELLER *et al*. hergestellten Polyplexen die notwendige Grundvoraussetzung für den Ablauf des *endosomal escape* des Cargos. Vor allem bei LAH* und GALA*ist die Freisetzung absolut entscheidend, da durch die pH-abhängigen Konformationsänderungen sowie der anschließenden Anordnung an der Endosomen-Membran es überhaupt erst zu einer Freisetzung der Nukleinsäuren ins Cytosol kommen kann. Der bis dato vermutete Ablauf ist in Abbildung 87 dargestellt.

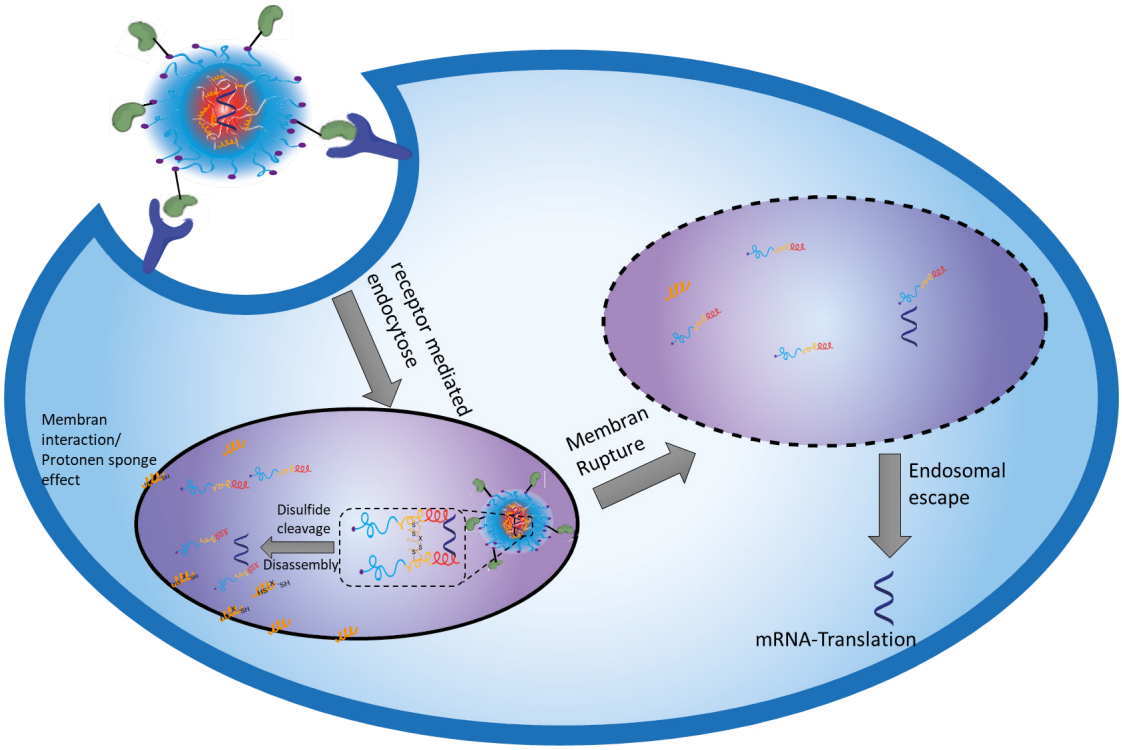


Abbildung 87: Der vermutete Ablauf nach der Rezeptor-vermittelte Endocytose des Polyplexes. Die Disulfid-Bindungen wurden in Endosomen abgebaut und die freigesetzten Vernetzer mit endosomolytischen Eigenschaften können den endosomal escape des Cargos einleiten.

Die Probleme hierbei sind:

1. Die im Vorfeld dieser Arbeit angenommene intrazelluläre GSH-Konzentration von 1 – 11 mM gilt nämlich nur für das Cytosol, und nicht für das innere Milieu des Endosoms. Der Redoxzustand von Glutathion im Cytosol ist auf den reduzierten Zustand durch das Verhältnis von GSH zu GSSG, welches in den meisten Zellen größer als 100 mM ist, voreingestellt. Dieses Verhältnis wird durch die Glutathionreduktase und NADPH katalytisch

nach dem Schema GSSG → GSH aufrechterhalten. Zusammenfassend wird das Redoxpotential des Cytosols und des endoplasmatischen Retikulums (ER) weitestgehend durch den Redoxstatus von Glutathion gesteuert, d.h. dem Redoxpaar GSH/GSSG, wobei Enzyme der Thioredoxin-(Trx)-Familie als katalytischer Effektor dieses Redoxpotentials wirken.[139]

2. Die Endosomen, späten Endosomen und Lysosomen nicht reduzierend, sondern oxidierend wirken.[140]
3. In biologischen Systemen erfolgt die Disulfid-Spaltung meist als Folge eines Thiol-Disulfid-Austausches, der die Anwesenheit eines Thiolat-Anions (S^-) erfordert. Die Deprotonierung von Thiolen ($\text{—SH} \rightarrow \text{—S}^- + H^+$) ist jedoch aus thermodynamischer Sicht in der sauren Umgebung des Endosoms ungünstig (pK_a 8.3).[141]

Aber gerade APCs, die endocytosierte Proteine durch Cathepsine und Proteasen in den zahlreichen Endosomen und Lysosomen verdauen um deren Fragmente (Antigene) auf ihrer Oberfläche zu präsentieren, benötigen solche nukleophilen Thiolat-Anionen (—S^-) für die Disulfid-Austauschreaktionen. Um eine endolysosomale Reduktion mit hoher Spezifität und Effizienz zu erreichen, wird eine enzymatische Unterstützung benötigt.[142] Eines dieser Enzyme ist die 30 kDa große *Gammainterferon-induzierbare lysosomale Thiolreduktase* (GILT). GILT wurde ursprünglich von LUSTER *et al.* beschrieben und IP30 genannt.[143] GILT wird konstitutiv in B-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert und wird als inaktives glykosyliertes Proenzym synthetisiert. Das Glykosylierungsmuster enthält eine terminale phosphorylierte Mannose, die von Mannose-6-Phosphatrezeptoren (M6PR) erkannt und in den Endosomen internalisiert wird, aber erst in den Lysosomen wird es proteolytisch zu einer aktiven, reifen Form verarbeitet. GILT ist entfernt mit den Mitgliedern der Trx-Familie verwandt. Die Unterschiede sind, dass während die Enzyme der Trx-Familie ein -Cys-Gly-His/Pro-Cys-Motiv im aktiven Zentrum aufweisen und ihre optimale Aktivität in einem pH-Bereich von 6 – 7 haben, GILT ein –Cys–X–X–Cys–Motiv im aktiven Zentrum besitzt und ein Reduktase-Optimum bei einem deutlich saureren pH von 4 – 5 hat. Ein weiterer Unterschied ist die Spezifität gegenüber der Co-Reduktanden, da GILT ausschließlich durch Cys und nicht durch GSH aktiviert werden kann.[139, 144-145]

Bei Disulfid-haltigen Therapeutika könnte die Disulfid-Spaltung tatsächlich sehr langsam und unwirksam sein.[67]

Die Daten von AUSTIN *et al.* zeigten, dass keine Disulfid-Reduktion des Trastuzumab-SPP-RR-Linkers (Fluorophor Rhodaminrot (RR)) bei Rezeptor-vermittelter Aufnahme in SKBr3-Zellen (eine humane Brustkrebs-Zelllinie) stattfand und sie legten nahe, dass der Abbau des Antikörpers innerhalb von Lysosomen effizienter als die Reduktion des Partikels sei.[140]

COLLINS *et al.* zeigten, dass die Reduktion von Disulfid-gebundenem Transferrin-[125I]-Tyrosin-Konjugat in T-Zellen mit einer [^{125}I]-Tyrosin-Freisetzungsrate von ~ 6% pro Stunde bestenfalls sehr ineffizient ist.[146]

Und darüber hinaus konnten von FEENER *et al.* keine Abspaltung der Disulfid-Bindungen in endolysosomalen Kompartimenten für [^{125}I]-Iodtyramin gezeigt werden, welche über einen Disulfid-Spacer mit Poly(D-Lysin) verbunden war.[147]

Obwohl die Spaltung von Disulfid-Bindungen in endocytischen Kompartimenten hauptsächlich von den Eigenschaften und dem Design der Nanopartikel abhängen, scheint selbst die Zelllinie einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Ergebnisse zu haben. Nicht nur das Expressionsniveau der Enzyme variiert von Zelle zu Zelle, sondern auch die verschiedenen endocytische Wege, über die der Therapeutika-Transporte in den Zellen verarbeitet wird. Die Zusammensetzung der Redoxumgebungen innerhalb verschiedener Endocytosewege ist nicht unbedingt die Gleiche. Neben der Analyse, ob eine Spaltung auftritt oder nicht, ist es auch wichtig zu beachten, in welcher Art von Zellkompartiment (z.B. frühe/späte Endosomen, Lysosomen), sich das Partikel befindet.[148]

WAGNER *et al.* stellten fest, dass die Entschirmung von PEGylierten pDNA/PEI-Polyplexe, welche durch pH-labiles Hydrazon gebunden waren, weitaus erfolgreicher waren als von über Disulfid-gebundenen PEG-Ketten.[67]

Besonders im Falle eines Gentransport mit zielgerichteten Rezeptorliganden wäre es vorteilhaft, säurelabile- anstelle von Disulfid-Linkern zu verwenden, da durch Rezeptor-vermittelte Endocytose die Partikel meistens sehr schnell in die späten Endosomen/Lysosomen gelangen.[142] Da GILT aber erst in späten Endosomen und Lysosomen aktiv wird, würde das im Falle der hier vorgestellten Polyplexe bedeuten, dass der Abbau des Cargos und des Polymers sowie die Disulfid-Abspaltung parallel ablaufen werden. Das führt dazu, dass durch die destruktiven Reaktionen kaum bis gar keine Nukleinsäuren, und auf alle Fälle nicht auf reproduzierbarer und aussagekräftiger Art und Weise aus den Endosomen entkommen können.

Dieser Punkt ist der ausschlaggebende Faktor für die erhaltenen Ergebnisse.

3. Vernetzer

LAH4*: KICHLER *et al*. stellten durch die Synthese verschiedener LAH4-Derivate fest, dass die Hydrophobizität eine Rolle bei den endosomolytischen Eigenschaften der Peptide spielt. Sie vermuten, dass die Erniedrigung der Hydrophobizität oder des hydrophoben Momentes die Fähigkeit zur Partition der Membran und somit der Freisetzung des Cargos in das Cytosol beeinträchtigen wurde.[149]

Durch das Ersetzen zweier Alanine durch Cysteine nimmt die Hydrophobizität des Peptids insgesamt ab. Ob diese Änderung einen Einfluss auf die endosomolytischen Eigenschaften der LAH4* haben könnte, wurden weder von HELLER et al. noch im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

COOLEN *et al.* präsentierten mRNA-Transfektionssysteme aus Polylactid-Nanopartikeln (PLA-NP) und amphiphilem kationischem Peptid LAH4-L1. Diese Formulierungen ermöglichen eine wirksame *in vitro* Aufnahme von mRNA durch DCs über die Clathrin-vermittelte Endocytose und Phagozytose und liefern eine effiziente mRNA-Expression. LAH4-L1-Polyplexe und LAH4-L1/PLA-Nanokomplexe konnten HEK 293T- und HeLa-Zellen unter den gleichen

Versuchsbedingungen nicht transfizieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Transfektionskapazität LAH4-L1-basierter Transfektionssysteme Zelltyp-abhängig sein muss.[150]

GALA*: Frühere Studien von KAKUDO *et al.* haben gezeigt, damit GALA seine Funktion ausüben könne, es auf der Oberfläche der Partikel vorhanden sein müsse. Als das GALA-Peptid eingekapselt in Liposomen vorlag, wurde keine pH-abhängige Konformationsänderung beobachtet. Das GALA-Peptid blieb in einer eher ungeordneten Konformation in Liposomen, selbst wenn der pH-Wert der Lösung von 7.4 auf 5 herabgesetzt wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die Membrandestabilisierungsaktivität dieses anionischen Peptids nach Konjugation an andere Moleküle sowie in Gegenwart von Serum abnimmt.[151]

GALA besitzt bei neutralem pH eine Random Coil-Konformation. Wenn der pH-Wert in der Umgebung sinkt, formt GALA eine α-helikale Struktur, welche bei pH 5 mit der Lipidmembran interagiert und zu dessen lokalen Zerstörung führt. Eine Studie zeigte, dass in Liposomen eingebaute GALA-Peptide keine pH-abhängige Strukturänderung durchlaufen und diese weiterhin ihre Random Coil-Konformation beibehalten. Diese Liposome zeigten keine Transfektion und kein *endosomal escape* im Vergleich zu Liposomen, welche das GALA-Peptid auf der Oberfläche trugen.[30, 151]

Wie bei LAH4* müsste ebenso bei GALA* der Einfluss der Hydrophobizitäts-Änderung des Peptids untersucht werden.

4. Cys-Polyplexe *vs.* Hcy-Polyplexe

Ein möglicher Grund, weshalb Polymere mit pHcy eine niedrige bis nicht vorhandene mRNA-Transfektion aufweisen, als im Vergleich zum Polymer mit pCys, könnte darin liegen, dass unterschiedliche Sekundärstrukturen zum Tragen kommen. Während pHcy α-Helix-Strukturen bildet, bildet pCys β-Faltblätter. Die Vermutung liegt nahe, dass bei den Triblöcken mit pHcy die α-Helix-Struktur im mittleren Bereich des Polymers zur Bildung eines "perfekten" Knäuels während des Polyplex-Aufbaus führt, was stabiler ist im Vergleich zu den Polyplexen, welche aus den Triblockcopolypept(o)iden mit pCys entstehen, da hier die Knäuel-Bildung immer wieder durch auftretende β-Faltblatt-Strukturen unterbrochen wird. Dies führt dazu, dass die Disulfid-Bindungen unzugänglicher für GILT werden und der Polyplex später abgebaut wird. Somit kann die mRNA nicht rechtzeitig aus dem Lysosom entkommen und wird dort abgebaut.

Es kann sein, dass die pCys- und pHcy-Polyplexe auf unterschiedlichen Wegen in die Zelle gelangen und dementsprechend unterschiedlich prozessiert werden. Diese Hypothese bedarf weiterer Untersuchungen.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine signifikante Anzahl und Vielfalt an sequenzdefinierten Polymeren hergestellt, mit dem Ziel, den Nukleinsäure-Transport und deren Bioaktivität zu verbessern. Um die extrazellulären- und intrazellulären pharmakologischen Barrieren für eine bessere systemische Anwendung zu überwinden, wurden Funktionsbausteine wie Abschirmungsdomäne-, Komplexierungsdomäne, Targeting-Liganden, hydrophobe Domäne und endosomolytische Eigenschaften eingebaut.

Wie erwartet (s. 313.4.1, S.31) waren die hergestellten Polyplexe (**P19a, P19b**) aus den Miktoarm-Diblockcopolypept(o)iden (**19**) aufgrund fehlender endosomolytischer Eigenschaften nicht in der Lage, pDNA effizient in HEK- und DC2.4-Zellen zu transfizieren. Die Zugabe endosomolytischer Agenzien könnte hier die Transfektionseffizienz signifikant verbessern.

Die Idee, stabile Polyplexe durch Quervernetzung im Kern des Polyplexes mit dem Einbringen von Domänen mit endosomolytischen Eigenschaften zu kombinieren, führte nach erfolgreicher Synthese zu Triblockcopolypept(o)iden mit einem über Disulfid-Bindungen vernetzbarem mittlerem Block. L-Homocystein wurde hierfür als natürliche Thiol-Quelle für die Synthese der Redox-sensitiven Triblockcopolymere verwendet. Die Triblockcopolypept(o)ide konnten zuverlässig in einer reproduzierbaren und skalierbaren One-Pot-Synthese durch Verwendung eines Azid-Initiators mittels sequenzieller Ringöffnungs-polymerisation (ROP) der Sar-NCA (**3**), *S*-Ethylsulfonyl-L-Homocystein-NCA (**12**) und Lysin(BOC)-NCA (**15**) zuverlässig und in hohen Ausbeuten sowie kleinen Dispersitäten hergestellt werden. Auf diese Weise wurden heterotelechele Polymere zugänglich, die mit drei orthogonal adressierbaren Gruppen versehen waren, und welche nach Bedarf eine oder mehrere Funktionalisierung(en) mit verschiedenen Molekülen am resultierenden Polyplex ermöglichten. Eine dieser Funktionalisierungen war die bereits erwähnte Einführung endosomolytischer Eigenschaften, indem durch die Verwendung bifunktioneller Vernetzer wie TETA* (mit „proton sponge“-Eigenschaft), sowie fusogener und endosomolytischer Peptide wie LAH4* und GALA* die Polyplexe bioreversibel vernetzt wurden. Des Weiteren wurden über die NHS-Ester-Chemie und über die Click-Reaktion Modifikationen am Polyplex vorgenommen.

Zusammengefasst konnten:

1. *S*-Alkylsulfonyl-Homocystein-NCA (**12**) aus Methionin in einer dreistufigen Reaktion synthetisiert werden.
2. Hcy-NCA als mittlerer Block der Triblockcopolymere polymerisiert werden.
3. Neben Blockcopolymeren mit linearem pSar-Block (**24, 32, 36**) noch zusätzlich Polymere mit verzweigtem pSar Block (Miktoarm-Polymere **19, 27**) synthetisiert werden.
4. Aus den synthetisierten Polymeren mRNA- und pDNA-Polyplexe hergestellt und charakterisiert sowie deren Stabilität geprüft werden.

5. Transfektionseffizienz der Polyplexe *in vitro* zum funktionalen Transfer von mRNA und pDNA in verschiedenen Zellen evaluiert werden.

Zwar zeigten die pHcy-Polyplexe niedrige Expressionsraten an, was sehr wahrscheinlich an nicht-existierenden aber bis dato vermutete GSH-Moleküle in Endosomen liegt, jedoch konnten im Rahmen dieser Arbeit neue Erkenntnisse über die Abhängigkeit der Expressionsraten von verschiedenen Faktoren wie Zelltyp, Polymerstruktur und Topologie gewonnen werden, welche eine Basis für zukünftige Arbeiten über die Synthese bioreversibler Polyplexe oder verwandte Systeme anbietet. Diese Arbeit beinhaltet wertvolle Informationen über die kritischen Punkte, die bei dem chemischen Aufbau des Polymers, den nachträglichen Modifikationen des Polyplexes und außerdem noch bei der Durchführung von Transfektion-Assay beachtet werden sollten achten sollte, um aussagekräftige und vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Eine Optimierung der in dieser Arbeit vorgestellten Systeme kann erreicht werden, indem beispielsweise:

- Die verwendeten Vernetzer über nicht-kovalente Bindungen angebracht werden.
- pH-empfindliche Bindungen zum Vernetzen verwendet werden. Das Zeitfenster zwischen der Internalisierung in dem Initialvesikel und der Fusion mit Lysosomen wurde als optimaler Zeitraum für pH-empfindliche Nanomaterialien festgestellt.[152-153] GILT wird kurz vor der Fusion mit den Lysosomen aktiviert. Dieses Zeitfenster ist zu knapp, um Disulfid-Bindungen zu spalten, eine Konformationsänderung durchzulaufen, sich an den Membran anzuordnen und den *endosomal escape* zu starten.
- Der Einbau von Monomeren mit endosomolytischen Eigenschaften, wie z.B. Histidin, realisiert wird.
- Das Protokoll für den Transfektions-Assay für den eingesetzten Zelltypus optimiert wird.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeines und Messgeräte

5.1.1 Lösungsmittel und Chemikalien

Alle Reaktionen, die unter Luft- und/oder Feuchtigkeitsausschluss stattfanden, wurden in zuvor ausgeheizten Glasgeräten durchgeführt. THF und *n*-Hexan wurden unter Stickstoff-Atmosphäre über Natrium und Benzophenon bis zur Blaufärbung unter Rückfluss erhitzt und anschließend destilliert.

5.1.2 NMR-Spektroskopie

Alle NMR-Spektren wurden an folgenden Geräten in deuteriertem Lösungsmittel gemessen:

- *Bruker* Avance III HD 300 (für 300 MHz ^{1}H-NMR)
- *Bruker* Avance-II 400 (für 400 MHz ^{1}H-NMR)
- *Bruker* Avance III 600 (für 600 MHz ^{1}H-NMR)

Die chemischen Verschiebungen, angegeben in ppm, beziehen sich auf das Signal des verwendeten deuterierten Lösungsmittels relativ zu Tetramethylsilan als Standard: DMSO-d^6 (^{1}H: δ = 2.50 ppm; ^{13}C: δ = 39.52 ppm) und D_2O (^{1}H: δ = 4.79 ppm). Zur Auswertung der Spektren wurde die NMR-Software *MestReNova 14.2.0* der Firma *Mestrelab Research* verwendet.

5.1.3 Gel-Permeations-Chromatographie

GPC wurde an den Geräten der Firma *JASCO* bei 40°C und einer Flussrate von 0.8 mL/min gemessen. Als Eluent wurde Hexafluorisopropanol (HFIP), versetzt mit Kaliumtrifluoracetat (3 g/L), eingesetzt. Als Säulenmaterial wurde modifiziertes Silicagel verwendet (PFG Säulen, Partikelgröße: 7 µm, Porosität: 100 Å + 1000 Å). Das System war zur Detektion der Polymere mit einem RI-Detektor (*JASCO* RI-2031) und einem UV-Detektor (*JASCO* UV-2075 Plus), eingestellt auf einer Wellenlänge von 220 nm, ausgestattet. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurden die GPC-Messungen auf PMMA-Standards (Poly-(methylmethacrylat), Polymer Standards Services GmbH Mainz) und Toluol als interner Standard kalibriert. Die Proben wurden vor der Messung über PTFE-Spritzenfilter (Polytetrafluorethylen) mit einer Porengröße von 0.2 µm filtriert. Zur Auswertung der Elutionsdiagramme wurde die WinGPC Software (Polymer Standards Service GmbH Mainz) verwendet.

5.1.4 Schmelzpunktbereiche

Die Messung von Schmelzpunktbereichen erfolgte an einem Schmelzpunktmessgerät der Firma *Mettler* Model FP62 und einem Schmelzpunktmessgerät der Firma *Krüss* Modell KSP 1N.

5.1.5 IR-Spektroskopie

IR-Spektren wurden an einem FT-IR Spektrometer der Serie 4100 der Firma *JASCO* mit ATR-Einheit (MIRacle™, Pike Technologies) gemessen. Die Spektren wurden mit dem Software Spectra Manager 2.0 (JASCO) analysiert.

5.1.6 Dialyse

Zur Dialyse wurden Schläuche des Typs Spectra/Pro®7 Dialysis Membran (Pre-treated RC Tubing, MWCO: 1 kD) verwendet. Millipore-Wasser wurde mit einem MILLI-Q® Reference A^+ System gereinigt (Leitfähigkeit: 18.2 MΩ/cm, TOC < 5 ppm).

5.1.7 Zetasizer

Die Messungen wurden an einem Gerät der Firma *Malvern* Model Nano ZS bei einem Winkel von 173° und einer Wellenlänge von 633 nm bei 25°C durchgeführt. Als Küvette wurden Einmal-Küvetten (1.5 mL Halbmikro) mit einer Abmessung von 12.5×12.5×45 mm verwendet. Drei Messungen wurden pro Probe durchgeführt. Zur Auswertung der Daten wurde die *Malvern* Zetasizer Software (Ver. 7.11) verwendet. Der durch die Zetasizer-Messung erhaltene Polydispersionsindex (PDI) ist definiert als der Koeffizient des quadratischen Terms „c“ der Kumulantenzerlegung im Fall $2c/b^2$. Die Kumulantenzerlegung entspricht einer polynomialen Fit-Funktion [5.1] des Logarithmus der G1 Korrelationsfunktion:

$$\ln(G1) = a + bt + ct^2 + dt^3 + et^4$$

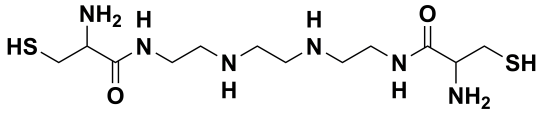
Der Wert der Variablen „b“ entspricht dem Z-durchschnittlichen Diffusionskoeffizienten, welcher unter Verwendung der Dispergens-Viskosität und einiger instrumentellen Konstanten zu einer Größe konvertiert wird.

5.1.8 Vernetzer-Sequenz

Es wurden die letzten beiden Alanine in LAH4-L1 und die letzten beiden Aminosäuren (Tryptophan und Alanin) in GALA innerhalb der ursprünglichen Peptidsequenz durch Cysteine ersetzt.

Als TETA* (Dithioltriethylenetetramin-α,ω-di(Cystein)diamid) wird ein modifiziertes Triethylentetramin verwendet (zur Verfügung gestellt von [redacted], Arbeitskreis [redacted]).

Tabelle 13: Verwendete Vernetzer-Sequenzen.

Vernetzer	Sequenz	Modifikation
LAH*[*]	KKCLLAHALHLLALLALHLAHALKKC	C-terminale Amidierung (wie LAH4-L1)
GALA*	CEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAC	N-terminale Acetylierung
TETA*		

5.1.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde durchgeführt, um die Polyplex-Bildung zu überwachen. Hierfür wurde 100 ng Fluc-pDNA oder 300 ng Thy1.1-mRNA mit der notwendigen Menge an Polymer bei den vorgegebenen N/P-Verhältnissen und dem Vernetzer nach dem allgemeinen Protokoll (angegeben in Kapitel 5.5) zusammengegeben und auf einem 0.75%ige Agarosegel (120 V, 300 mA, 40 min) aufgetragen. Für die Nukleinsäure-Färbung wurde GelRed verwendet.

5.1.10 Nukleinsäuren

Für die Polyplex-Herstellung sowie Transfektionsversuche wurden Fluc-mRNA, Rluc- und Fluc-DNA (zur Verfügung gestellt von [redacted]) sowie IVT_m1Y Thy1.1 mRNA (zur Verfügung gestellt von [redacted]) verwendet.

5.1.11 Luciferase-Assay

Die Tests wurden von [redacted] durchgeführt. Beim Luciferase-Assay wurden pro Well Polyplex-Proben mit jeweils 1 µg Nukleinsäure verwendet. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Zellen und als Positivkontrolle komplexierte Nukleinsäuren mit DOTAP verwendet.

5.1.12 Durchflusscytometrie (FACS-Messungen)

Die FACS-Messungen wurden von [redacted] an einem FACS Canto II, ausgestattet mit FACS Diva 8-Software, gemessen. Die Daten wurden mit den Programmen FlowJo V10 und GraphPad Prism8 bearbeitet und dargestellt.
Die Polyplexe pSar-ac20 und pSar-ac21 (s. Abbildung 72) wurden von [redacted] hergestellt.

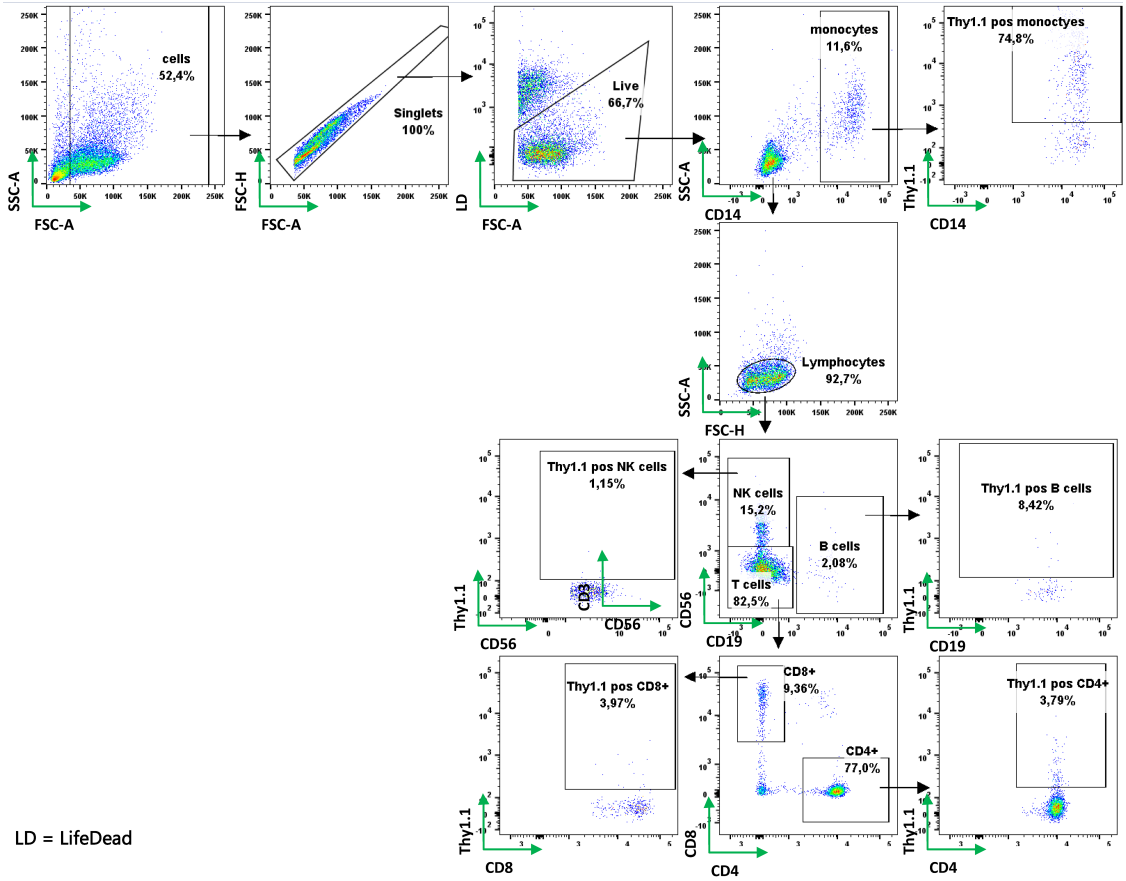


Abbildung 88: Die angewendete Gating-Strategie bei den FACS-Messungen.

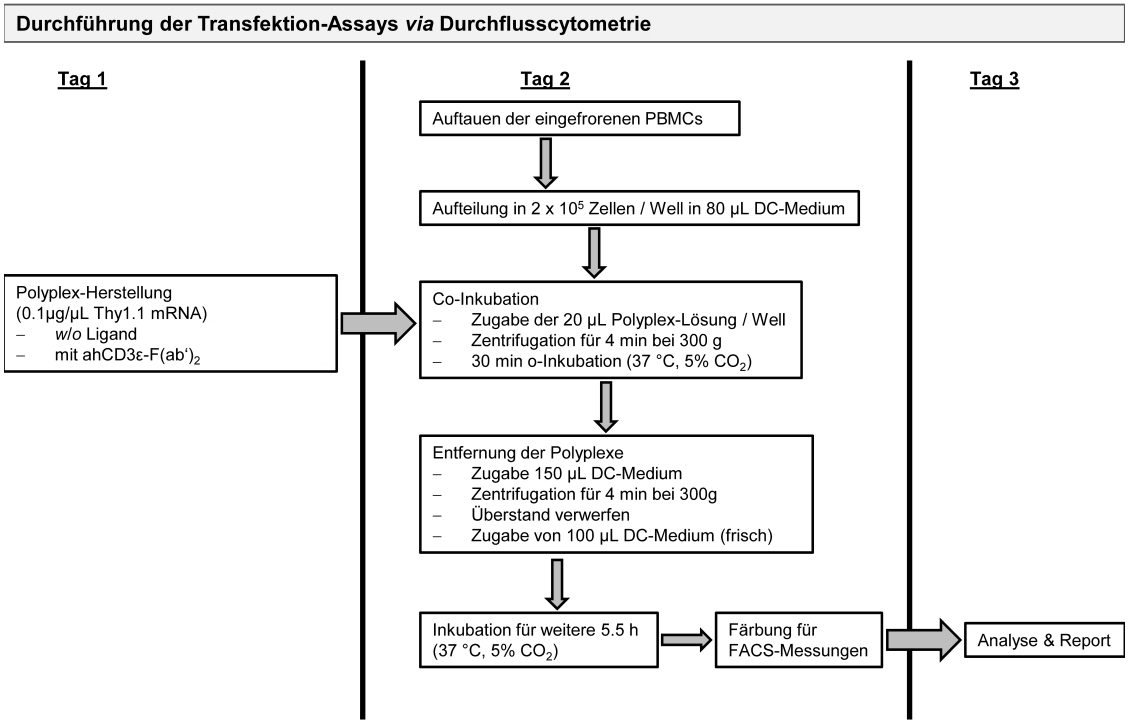
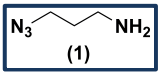


Abbildung 89: Arbeitsablauf der Transfektion-Assay für die PBMCs.

5.2 Synthese der Funktionalisierungseinheiten

5.2.1 3-Azido-1-aminopropan



(1)

3-Chlorpropylamin Hydrochlorid (10.18 g, 0.078 mol) und Natriumazid (15.27 g, 0.235 mol) wurden in 80 mL Wasser gelöst und 18 h auf 80 °C erhitzt.

Nachdem das Reaktionsgemisch im Vakuum eingeengt wurde, wurden 130 mL Diethylether hinzugegeben und die Mischung gekühlt. KOH-Pellets (10 g) wurden langsam dazu gegeben, sodass die Temperatur stets unter 10°C gehalten werden konnte.

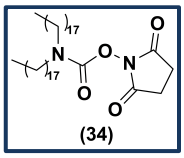
Die organische Phase wurde getrennt und die wässrige Phase wurde zwei Mal mit Diethylether extrahiert. Die zusammengeführten organischen Phasen wurden mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das so erhaltene gelbe Öl wurde fraktioniert destilliert.

Ausbeute: 6.75 g (0.07 mol, 86%), Ausbeute (Lit.)[52]: 41%

^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl3): δ (ppm) = 3.37 (t, J = 6.7 Hz, 2H, H-3), 2.80 (t, J = 6.8 Hz, 2H, H-1), 1.73 (q, J = 6.7 Hz, 2H, H-2), 1.26 (s, 2H, NH_2).

IR 2088.5 cm^{-1} (N_3-Schwingung)

5.2.2 Dioctadecyl-NHS-Ester



(34)

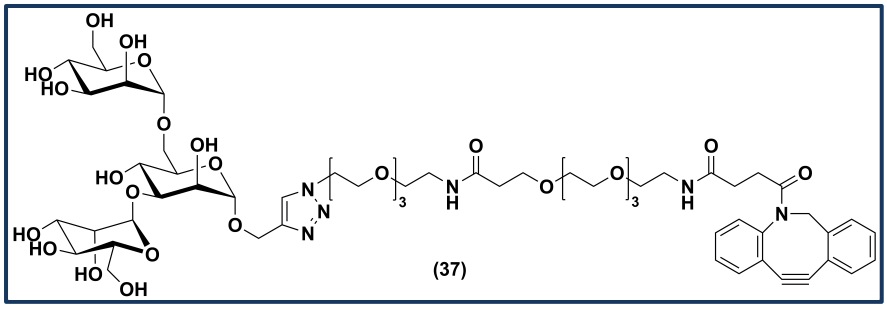
Dioctadecylamin (**28**) (200 mg, 0.38 mmol) wurde in Benzol gelöst und abs. Triethylamin (76.9 mg, 0.76 mmol) wurde in einer Portion dazu gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde zu einer Lösung von *N*,*N*′-Disuccinimidylcarbonat (**33**) (195 mg, 0.76 mmol) in abs. Acetonitril dazu gegeben und 18 h bei Raumtemperatur gerührt.

Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Rückstände an Triethylamin wurden azeotrop mit Benzol entfernt. Der erhaltene Feststoff wurde in kaltem Chloroform suspendiert und abgesaugt. Nach Destillation des Chloroforms wurde das Produkt (**34**) als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 203.6 mg (0.31 mmol, 81%)

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 3.35–3.12 (m, br, 4H, N–(CH_2)), 2.80 (s, 2H, CH_2–CO), 2.74 (s, 2H, CH_2–CO), 1.76–1.02 (m, 64H; CH_3–(CH_2)$_{16}$–CH_2), 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 6H, –CH_3).

5.2.3 Trimannose-DBCO



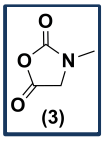
(1-(2-(2‘-(2‘‘-(2‘‘‘-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)-3,6-di-*O*-α-D-mannopyranosyl-α-D-mannopyranose (95 mg, 0.12 mmol, zur Verfügung gestellt von [redacted]) und DBCO-PEG$_4$-NHS-Ester (100 mg, 0.15 mmol) wurden in 30 mL abs. DMF gelöst und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde gegen MP-Wasser über zwei Tage dialysiert. Das Produkt (**37**) wurde anschließend als Lyophilisat erhalten.

Ausbeute: 177.4 mg (0.137 mmol, 89%)

^{1}H-NMR (600 MHz, D_2O): δ (ppm) = 8.07–7.09 (m, br, 9H, Tetrazol-H & Ar-(DBCO)-H), 5.03–4.87 (m, 2H, –C*H*$_2$–N-CO–), 4.07–3.05 & 2.74–2.20 (m, br, 52H & m, 13H; –C*H*$_2$–C*H*$_2$–(40 H)), Mannose-O–*H* (10 H); Mannose-C–*H* (15 H)).

5.3 NCA-Synthese

5.3.1 Sarkosin-*N*-Carboxyanhydrid



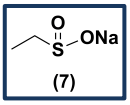
Sarkosin (**2**) (57.60 g, 0.646 mol) wurde 18 h im Vakuum getrocknet und in abs. THF (500 mL) suspendiert. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei 50°C erhitzt. Diphosgen (127.9 g, 0.274 mol) wurde langsam zur Lösung zugetropft und das Reaktionsgemisch wurde weitere 2 h zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde über 18 h N_2 durch die Lösung geleitet. Das Rohprodukt wurde *via* Sublimation gereinigt.

Ausbeute: 52.1 g (0.44 mol, 70%), Ausbeute (Lit.)[7]: 50-67%

Schmelzpunktbereich: 102−104 °C, Schmelzpunktbereich (Lit.): 102–104 °C.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d^6): δ (ppm) = 4.22 (s, 2H, C*H*$_2$), 2.85 (s, 3H, C*H*$_3$).

5.3.2 Natriumethansulfinat

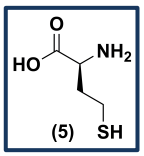


Natriumsulfit (419.2 g, 3.326 mol) wurde in Wasser (1 L) gelöst und auf 80 °C erhitzt. Ethansulfonylchlorid (**6**) (203.6 g, 1.584 mol) und Natriumcarbonat (352.5 g, 3.326 mol) wurden gleichzeitig hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde eine weitere Stunde bei 80 °C gehalten. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt und das erhaltene Rohprodukt wurde in Methanol suspendiert und filtriert. Das Produkt (**7**) wurde nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum als farbloses Feststoff erhalten.

Ausbeute: 148.2 g (1.277 mol, 81%), Ausbeute (Lit.)[73]: 85%

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ (ppm) = 1.85 (q, J = 7.6 Hz, 2H, CH_2), 0.91 (t, J = 7.5 Hz, 3H, CH_3).

5.3.3 L-Homocystein



Eine Gaseinleitungsapparatur wurde aufgebaut und L-Methionin (**4**) (60 g, 400 mmol) wurde in einem Dreihals-Kolben vorgelegt. Der Reaktionskolben wurde mittels Aceton/Trockeneis-Gemisch auf −40 °C gekühlt und es wurde so viel Ammoniak kondensiert, bis alles vollständig gelöst vorlag. Natrium (33 g, 1.4 mol) wurde daraufhin portionsweise hinzugegeben. Bei der Zugabe färbte sich die Lösung unmittelbar dunkelblau. Nach der Zugabe des letzten Stücks Natrium wurde die Lösung weitere 30 Minuten bei −40 °C gerührt. Anschließend wurde portionsweise so viel Ammoniumchlorid hinzugegeben, bis sich die Lösung entfärbte und nicht mehr blau war.

Die Kühlung wurde abgestellt und überschüssige Reste an Ammoniak wurden über 18 h mit einem durch die Lösung geleiteten N_2-Strom ausgetrieben. Der zurück gebliebene Feststoff wurde daraufhin in entgastem Wasser gelöst und der pH wurde mit einer 6 N HCl auf 5.5 eingestellt. Dabei kristallisierte das Produkt (**5**). Die Mutterlauge wurde nach Filtration zur vollständigen Kristallisation bei 4 °C gelagert und erneut filtriert.

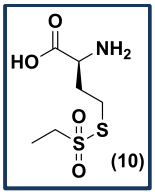
Ausbeute: 47.63 g (0.378 mol, 94%), Ausbeute (Lit.)[74]: 93%

Schmelzpunktbereich: 232–234 °C Schmelzpunktbereich (Lit.): 234–235 °C

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O): δ (ppm) = 3.88 (dd, J = 7.2 Hz, 1H, C_α-H), 2.74–2.56 (m, 2H, CH_2-SH), 2.23–2.0 (m, 2H, CH_2-CH_2-SH).

^{13}C-NMR (100.6 MHz, D_2O): δ (ppm) = 174.20 (C=O), 53.55 (C_α), 34.56 (CH_2–CH_2-SH), 19.75 (−CH$_2$-SH).

5.3.4 *S*-Ethylsulfonyl-L-Homocystein



Eine eiskalte Natriumnitrit-Lösung (1.61 g, 0.02 mol) in entgastem Wasser wurde zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von L-Homocystein (**5**) (3.15 g, 0.02 mol) in 2 N HCl (46.60 mL) langsam zugetropft, sodass die Temperatur zwischen 0 °C–5 °C gehalten werden konnte. Nach der Zugabe wurde das mittlerweile rote Reaktionsgemisch weitere 30 Minuten bei derselben Temperatur gerührt.

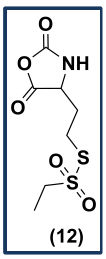
Natriumethansulfinat (**7**) (5.87 g, 0.05 mol) wurde portionsweise hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss war die Lösung farblos geworden. Das Lösungsmittel wurde daraufhin im Vakuum entfernt und der Rückstand in Ethanol aufgenommen und filtriert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das übrig gebliebene gelbe Öl wurde mittels semi-präparativer HPLC (Säule: Phenomenex Luna C18(2); size: 250 × 30 mm; Eluent: H_2O/MeOH mit dem Gradienten: 1 min: 90/10; 16 min: 40/60; 17 min: 0/100; 20.5 min: 0/100; 21 min: 90/10) von Reaktionsnebenprodukten befreit. Das Produkt (**10**) wurde schließlich in Form eines farblosen Lyophilisats aus den vereinigten Produkt-Fraktionen erhalten.

Ausbeute: 450 mg (2.0 mmol, 10%), Ausbeute (Lit.)[74]: 10%

^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O): δ (ppm) = 4.10 (t, J = 6.5 Hz, 1H, C_α-*H*), 3.60 (q, J = 7.3 Hz, 2H, C*H*$_2$-SO_2), 3.40–3.28 (m, 2H, S−C*H*$_2$), 2.48−2.30 (m, 2H, C_αH–C*H*$_2$), 1.44 (t, J = 7.3 Hz, 3H, C*H*$_3$).

^{13}C NMR (100.6 MHz, D_2O): δ (ppm) = 171.70 (*C*=O), 56.41 (CH_2-SO_2), 51.83 (C_α), 31.15 (S−*C*H$_2$), 30.64 (C_αH–*C*H$_2$−), 7.50 (*C*H$_3$).

5.3.5 *S*-Ethylsulfonyl-L-Homocystein-*N*-Carboxyanhydrid



S-Ethylsulfonyl-L-Homocystein (**10**) (3.69 g, 0.016 mol) wurde 18 h bei Raumtemperatur im Vakuum getrocknet und dann in abs. THF (300 mL) suspendiert. Diphosgen (2.21 g, 0.011 mol) wurde langsam hinzugetropft und die Lösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in wenig

Ethylacetat gelöst und filtriert. Das Produkt wurde durch Zugabe eines Diethylether/*n*-Hexan-Gemisches (v/v = 1/1) zur Fällung gebracht.

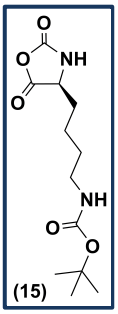
Ausbeute: 1.69 g (6.67 mmol, 41%), Ausbeute (Lit.)[74]: 44%

Schmelzpunktbereich: 93.6–94.3 °C, Schmelzpunktbereich (Lit.)[74]: 95 °C.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ (ppm) = 9.14 (s, 1H, N*H*), 4.53 (ddd, ^3J = 7.9 Hz, ^3J = 5.5 Hz, ^4J = 1.1 Hz, 1H, C*H*), 3.58 (q, J = 7.3 Hz, 2H, CH_3CH_2-SO_2), 3.29–3.15 (m, 2H, –CH_2-CH_2-S-SO_2Et), 2.25–2.08 (m, 2H, –CH_2-CH_2-S-SO_2Et), 1.30 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (100.6 MHz, DMSO-*d6*): δ (ppm) = 171.05 (CH–*C*O–O), 151.88 (NH–*C*O–O), 55.94 (CH_3*C*H_2-SO_2), 55.68 (*C*H), 31.41 (−*C*H_2-CH_2-S-SO_2Et), 31.11 (−CH_2-*C*H_2-S-SO_2Et), 8.32 (*C*H_3CH_2-SO_2).

5.3.6 $^{\varepsilon}$N-*t*-Butyloxycarbonyl-L-Lysin-*N*-Carboxyanhydrid



Lysin(BOC) (**13**) (13.20 g, 0.054 mol) wurde 18 h bei Raumtemperatur im Vakuum getrocknet und in abs. THF (400 mL) vorgelegt, Me_3SiCl (11.64 g, 0.107 mol) und Triethylamin (11.39 g, 0.011 mol) wurden langsam hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde anschließend 2 h bei 50 °C erhitzt. Daraufhin wurden überschüssige Reste an *in situ* erzeugtem Phosgen über 18 h mit einem durch die Lösung geleiteten N_2-Strom ausgetrieben. Der so erhaltene Feststoff wurde mit einem abs. *n*-Hexan/THF-Gemisch (*v/v* = 0.7/1) umkristallisiert.

Ausbeute: 12.56 g (0.046 mol, 86%), Ausbeute (Lit.)[7]: 68%, farbloser Feststoff.

Schmelzpunktbereich: 134–136 °C, Schmelzpunktbereich (Lit.)[7]: 134−137 °C.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d^6): δ (ppm) = 9.07 (s, 1H, $^{\alpha}$N–*H*), 6.93–6.68 (m, 1H, $^{\varepsilon}$N–*H*), 4.49-4.37 (m, 1H, CO–C*H*–CH_2), 2.89 (pseudo-q, J = 6.3 Hz, 2H, (CO)NH–CH_2), 1.78–1.54 (m, 2H, CH–CH_2), 1.43–1.12 (m, 4H, CH–CH_2–(CH_2)$_2$), 1.37 (s, 9H, (CH_3)$_3$).

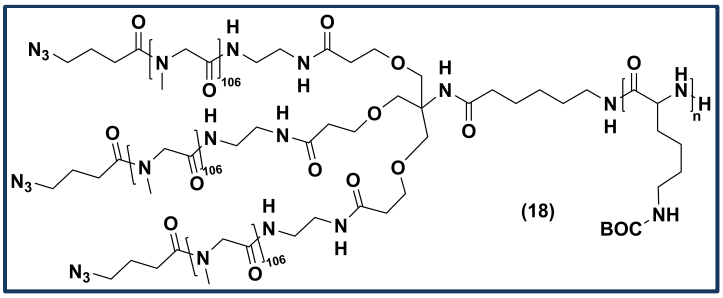
5.4 Synthese der Polypept(o)ide

Der Polymerisationsgrad wird durch die Variation des Monomer/Initiator-Verhältnisses eingestelltt. Als Initiator dient hierbei abs. 3-Azido-1-aminopropan (**1**). Alle Polymerisationen wurden im Schlenkrohr unter Stickstoffatmosphäre und Lichtausschluss durchgeführt.

Für die Analytik wurden jeweils 10 mg Polymer, berechnet am Reaktionsvolumen, aus den Reaktionsgemischen entnommen.

5.4.1 Miktoarm Diblöcke

5.4.1.1 Di-Blöck-Synthese



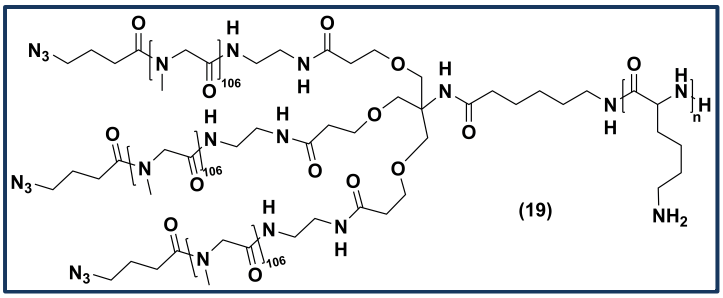
Der Miktoarm pSar-Makroinitiator (**17**) (zur Verfügung gestellt von [redacted] ([redacted]) in zwei Teilen aufgeteilt (z mmol) und in abs. DMF gelöst. Nach dem Kühlen auf 0°C wurde der Lys(BOC)-NCA (**15**) (n.z mmol, als Stammlösung in abs. DMF) hinzugefügt. Nach 2 Tagen war die Reaktion beendet (Kontrolle mittels IR-Spektroskopie). Die Polymere wurden in Diethylether gefällt und zentrifugiert (3 min bei 4500 rpm). Das erhaltene Pellet (**18a-b**) wurde getrocknet.

Tabelle 14: Ansätze der Miktoarm Diblöcke (**18a-b**) mit Lys(BOC)-Einheit.

Polymer	m Init. [mg]	n Init. [mmol]	n Lys-NCA [mmol]	Anzahl n
$(N_3\text{-}pSar_{106})_3\text{-}pLys(BOC)_{41}$ (**18a**)	27	0.001	0.046	40
$(N_3\text{-}pSar_{106})_3\text{-}pLys(BOC)_{63}$ (**18b**)	30	0.001	0.078	60

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ (ppm) = 8.36–7.71 (1n H, br, $^{\alpha}$N*H),* 6.78–6.25 (1n H, br, $^{\varepsilon}$N*H*), 4.60–3.64 (1n+636 H, br, $^{\alpha}C\mathit{H}_x$ (CO–C*H*–NH+ CO–CH_2–N(CH_3)), 3.04–2.59 (br, 954 H (N-CH_3) + 2n H (CH_2–$^{\varepsilon}$NH)), 2.07–1.08 (15n H, br, CH–(CH_2)$_3$–CH_2–NH–CO–O–C(CH_3)$_3$).

5.4.1.2 Abspaltung der BOC-Schutzgruppe

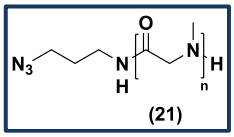


Das oben erhaltene Pellets (**18a-b**) wurde in 50%iger TFA-Lösung (2 mL) gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde 3 Tage gegen eine 2%ige Essigsäure-Lösung dialysiert und anschließend wurde der Schlauchinhalt lyophilisiert.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ (ppm) = 8.76–7.71 (1n H, br, $^{\alpha}$N*H),* 4.60–3.64 (1n+636 H, br, $^{\alpha}$CH_x (CO–C*H*–NH+ CO–CH_2–N(CH_3)), 3.04–2.59 (954+2n H, br, N-CH_3+ CH_2–$^{\epsilon}$NH), 2.07–1.08 (6n H, br, CH–(CH_2)$_3$–CH_2–NH_2).

5.4.2 Lineare Triblöcke

5.4.2.1 Sarkosin-Homopolymer



(21)

Sarkosin-NCA (**3**) (n.z mmol) wurde in 10 mL abs.DMF gelöst und abs. 3-Azido-1-aminopropan (**1**) (z mmol) wurde dazugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständigem Reaktionsumsatz (Kontrolle mittels IR-Spektroskopie) wurde ca. 10 mg Polymer für die Analytik aus dem Reaktionsgemisch entnommen und tropfenweise zu Diethylether zugegeben. Das erhaltene Präzipitat wurde durch Zentrifugation (3 min, 4°C, 4500 rpm) in ein Pellet überführt, welches anschließend in Millipore-Wasser gelöst wurde. Nach anschließender Gefriertrocknung wurde das Polymer (**21**) als Lyophilisat erhalten.

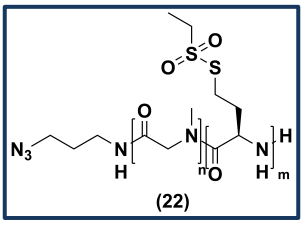
Die Längen der Sarkosin-Ketten wurden anhand der vorhandenen Kalibrationskurve für HFIP-GPC ermittelt.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ (ppm) = 4.63–3.70 (m, br, 2n H, CO–CH_2–N(CH_3)), 3.05–2.56 (m, br, 3n H, N(CH_3)).

Tabelle 15: Ansätze der linearen pSar-Homopolymeren.

Polymer	**n Init. [mmol]**	**n Sar-NCA [mol]**	**Anzahl n**
N_3-pSar_{212} (**21a**)	0.006	0.011	200
N_3-pSar_{97} (**21b**)	0.130	0.013	100

5.4.2.2 Diblöcke



(22)

Die oben beschriebenen Homopolymere (**21**) wurden für die Herstellung der Diblöcke (**22**) direkt weiterverwendet. Dafür wurde die Homopolymer-Lösung (**21**) in drei Teile aufgeteilt und auf −10 °C gekühlt. Dazu wurde *S*-Ethylsulfonyl-L-Homocystein-NCA (**12**) (m.z mmol, als

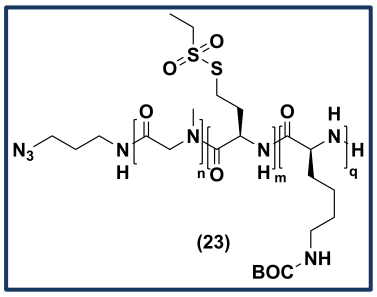
Stammlösung in abs. DMF) hinzugefügt. Nach 3–4 Tagen war die Reaktion beendet. Zwecks Analytik wurde eine geringe Menge des Reaktionsgemisches entnommen.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ (ppm) = 8.67–8.11 (1m H, br, $^{\alpha}$N*H*), 4.71–3.80 (1m+2n H, br, $^{\alpha}$CH_x (CO–C*H*–NH+ CO–CH_2–N(CH_3)), 3.64–3.45 (2m H, br, SO_2–CH_2–CH_3), 3.26–3.04 (2m H, br, S–CH_2–CH_2), 3.03–2.69 (m, br, 3n H, N–CH_3), 2.22–1.81 (2m H, br, S–CH_2–CH_2), 1.36–1.25 (3m H, br, SO_2–CH_2–CH_3).

Tabelle 16: Ansätze der linearen Diblöcke (**22a-f**).

Polymer	n Init. [mmol]	n Hcy-NCA [mmol]	Anzahl m
N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{11}$ (**22a**)	0.002	0.022	10
N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{19}$ (**22b**)	0.002	0.034	20
N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{27}$ (**22c**)	0.002	0.005	30
N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{8}$ (**22d**)	0.052	0.520	10
N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{17}$ (**22e**)	0.039	0.780	20
N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{27}$ (**22f**)	0.039	1.170	30

5.4.2.3 Triblöcke



Die oben beschriebenen Diblöcke (**22**) wurden für die Herstellung der Triblöcke direkt weiterverwendet. Dafür wurden die Diblöcke (**22**) jeweils in zwei Teile aufgeteilt. Dazu wurde Lys(BOC)-NCA (**15**) (q.z mmol, als Stammlösung in abs. DMF) bei derselben Temperatur hinzugefügt. Nach ca. 4 Tagen war die Reaktion beendet.

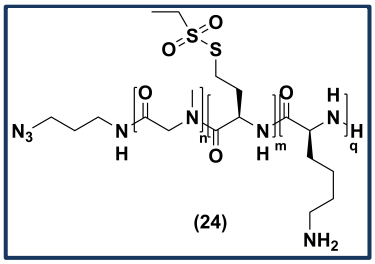
Nach vollständigem Reaktionsumsatz wurde das Reaktionsgemisch tropfenweise zu Diethylether zugegeben. Das erhaltene Präzipitat wurde durch Zentrifugation (3 min,4 °C,4500 rpm) in ein Pellet (**23**) überführt.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ (ppm) = 8.88–7.76 (1m+q H, br, $^{\alpha}$N*H*), 7.12–6.27 (1q H, br, $^{\varepsilon}$N*H*), 5.14–3.68 (1m+2n+1q H, br, $^{\alpha}$CH_x (CO–C*H*–NH+ CO–CH_2–N(CH_3)), 3.63–3.43 (2m H, br, SO_2–CH_2–CH_3), 3.25–3.03 (2m H, br, S–CH_2–CH_2), 3.02–2.58 (3n+2q H, br, N–CH_3+ CH_2–NH–CO–O–C(CH_3)$_3$), 2.28–1.71 (2m H, br, S–CH_2–CH_2), 1.64–0.94 (15q+3m H, br, CH–(CH_2)$_3$–CH_2–NH–CO–O–C(CH_3)$_3$+ SO_2–CH_2–CH_3).

Tabelle 17: Ansätze der linearen Triblöcke (**23a-l**).

Polymer	n Init. [mmol]	n Lys-NCA [mmol]	Anzahl q
N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{11}$-*b*-pLys(BOC)$_{21}$ (**23a**)	0.001	0.022	20
N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{19}$-*b*-pLys(BOC)$_{21}$ (**23b**)	0.001	0.018	20
N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{27}$-*b*-pLys(BOC)$_{23}$ (**23c**)	0.001	0.018	20
N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{11}$-*b*-pLys(BOC)$_{7}$ (**23d**)	0.001	0.011	10
N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{19}$-*b*-pLys(BOC)$_{7}$ (**23e**)	0.001	0.009	10
N_3-pSar$_{212}$-*b*-pHcy$_{27}$-*b*-pLys(BOC)$_{9}$ (**23f**)	0.001	0.009	10
N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{8}$-*b*-pLys(BOC)$_{21}$ (**23g**)	0.026	0.520	20
N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{17}$-*b*-pLys(BOC)$_{22}$ (**23h**)	0.02	0.39	20
N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{27}$-*b*-pLys(BOC)$_{20}$ (**23i**)	0.02	0.39	20
N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{8}$-*b*-pLys(BOC)$_{8}$ (**23j**)	0.026	0.260	10
N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{17}$-*b*-pLys(BOC)$_{9}$ (**23k**)	0.02	0.20	10
N_3-pSar$_{97}$-*b*-pHcy$_{27}$-*b*-pLys(BOC)$_{9}$ (**23l**)	0.02	0.20	10

5.4.2.4 Abspaltung der BOC-Schutzgruppe



Die hergestellten Polymere (**23a-l**) wurden mit einer 50%igen TFA-Lösung (3 mL) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde drei Tage gegen eine 2%ige Essigsäure-Lösung dialysiert und anschließend wurde der Schlauchinhalt lyophilisiert.

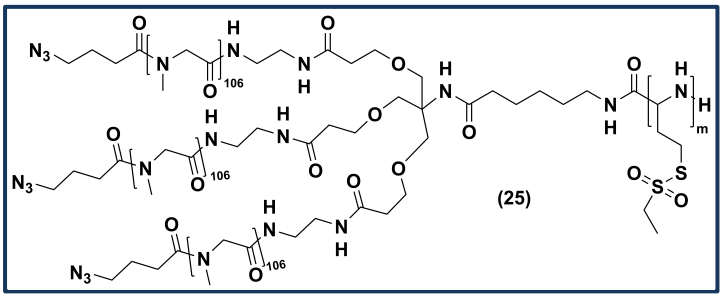
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ (ppm) = 9.69–7.34 (1m+q H, br, $^{\alpha}$N*H*), 4.56–3.83 (1m+2n+1q H, br, $^{\alpha}$CH_x (CO–C*H*–NH+ CO–CH_2–N(CH$_3$)), 3.63–3.43 (2m H, br, SO$_2$–CH_2–CH$_3$), 3.25–3.04 (2m H, br, S–CH_2–CH$_2$), 3.02–2.59 (3n+2q H, br, N–CH_3+ CH_2–NH$_2$), 2.20–1.71 (2m H, br, S–CH$_2$–CH_2), 1.64–0.78 (8q+3m H, br, CH–(CH_2)$_3$–CH$_2$–NH_2+ SO$_2$–CH$_2$–CH_3).

5.4.2.5 Triblockcopolymere mit Polycystein

Die Triblöcke wurden von [redacted] ([redacted]) zur Verfügung gestellt.

5.4.3 Miktoarm Triblöcke

5.4.3.1 Diblöcke



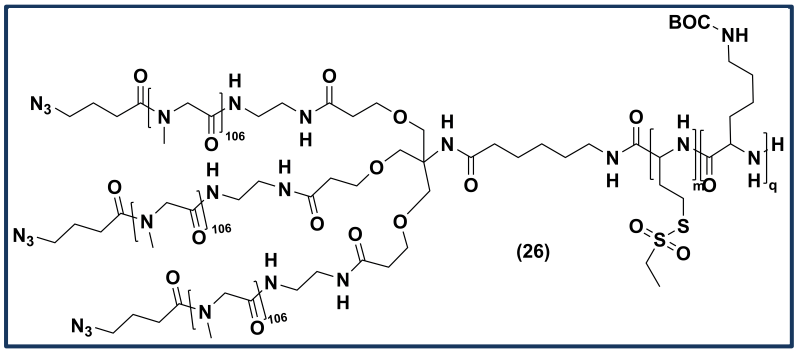
Derselbe Miktoarm-Polysarkosin-Makroinitiator (**17**), der für die Diblöcke (**19a-b**) verwendet wurde, wurde hier ebenfalls verwendet. Der Makroinitiator (**17**) wurde in zwei Teile aufgeteilt und in abs. DMF gelöst. Nach Kühlung auf −10 °C wurde das Hcy-NCA (**12**) (n.z mmol, als Stammlösung in abs. DMF) hinzugefügt. Nach 3–4 Tagen war die Reaktion beendet. Zwecks Analytik wurden 10 mg Polymer aus dem Reaktionsgemisch entnommen.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ (ppm) = 8.67–8.11 (1m H, br, $^{\alpha}$N*H*), 4.60–3.64 (1m+636 H, br, $^{\alpha}$CH_x (CO–C*H*–NH+ CO–CH_2–N(CH_3)), 3.64–3.45 (2m H, br, SO_2–CH_2–CH_3), 3.26–3.04 (2m H, br, S–CH_2–CH_2), 3.04–2.59 (m, br, 954H, N-CH_3), 2.22–1.81 (2m H, br, S–CH_2–CH_2), 0.87 (3m H, br, SO_2–CH_2–CH_3).

Tabelle 18: Ansätze der Miktoarm-Diblöcke mit Hcy (**25a-b**).

Polymer	m Init. [mg]	n Init. [mmol]	n Hcy-NCA [mmol]	Anzahl n
(N_3-pSar_{106})$_3$-pHcy_{28} (**25a**)	75.0	0.003	0.096	30
(N_3-pSar_{106})$_3$-pHcy_{15} (**25b**)	72.2	0.003	0.046	15

5.4.3.2 Triblöcke



Die oben beschriebenen Diblöcke (**25a-b**) wurden für die Herstellung der Triblöcke (**26**) direkt weiterverwendet. Dafür wurden die Diblöcke (**25**) jeweils in zwei Teile aufgeteilt. Lys(BOC)-NCA (**15**) (m.z mmol, als Stammlösung in abs. DMF) wurde bei derselben Temperatur hinzugefügt.

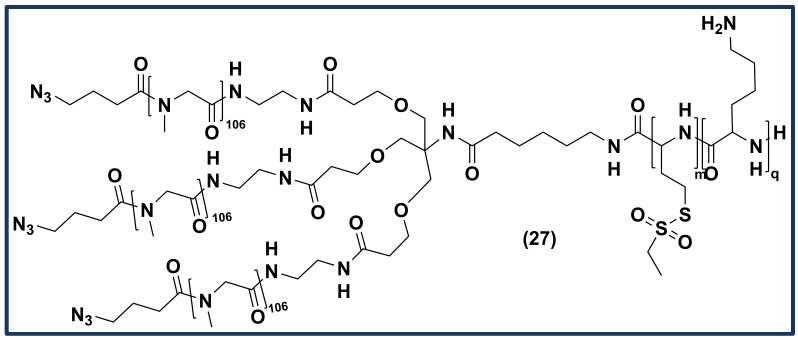
^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ (ppm) = 8.55–8.09 (1m+1q H, br, $^{\alpha}$N*H*), 6.09–6.13 (1q H, br, $^{\varepsilon}$N*H*), 4.50–3.68 (636 H+1m+1q H, br, $^{\alpha}$CH_x (CO–C*H*–NH+ CO–CH_2–N(CH_3)), 3.61–3.48 (2m H, br, SO_2–CH_2–CH_3), 3.22–3.08 (2m H, br, S–CH_2–CH_2), 3.01–2.64 (954H+2q H, br, N–CH_3+ CH_2–NH–CO–O–C(CH_3)$_3$), 2.18–1.81 (2m H, br, S–CH_2–CH_2), 1.60–1.15 (15q H, br, CH–(CH_2)$_3$–CH_2–NH–CO–O–C(CH_3)$_3$), 0.84 (3m H, br, SO_2–CH_2–CH_3).

Tabelle 19: Ansätze der Miktoarm-Triblöcke (**26a-d**).

Polymer	n Init. [mmol]	n Lys-NCA [mmol]	Anzahl m
(N_3-pSar_{106})$_3$-pHcy_{28}-p$Lys(BOC)_9$ (**26a**)	0.001	0.010	10
(N_3-pSar_{106})$_3$-pHcy_{28}-p$Lys(BOC)_{20}$ (**26b**)	0.002	0.030	20
(N_3-pSar_{106})$_3$-pHcy_{15}-p$Lys(BOC)_8$ (**26c**)	0.001	0.014	10
(N_3-pSar_{106})$_3$-pHcy_{15}-p$Lys(BOC)_{18}$ (**26d**)	0.002	0.032	20

Nach vollständigem Reaktionsumsatz wurde das Reaktionsgemisch tropfenweise zu Diethylether zugegeben. Das erhaltene Präzipitat wurde durch Zentrifugation in ein Pellet (**26a-d**) überführt.

5.4.3.3 Abspaltung der BOC-Schutzgruppe



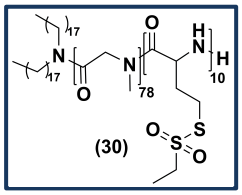
Die hergestellten Polymere (**26a-d**) wurden mit einer 50%igen TFA-Lösung (2 mL) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde drei Tage gegen eine 2%ige Essigsäure-Lösung dialysiert und anschließend wurde der Schlauchinhalt lyophilisiert.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ (ppm) = 9.69–7.34 (1m+q H, br, $^{\alpha}$N*H*), 4.56–3.83 (1m+2n+1q H, br, $^{\alpha}$CH_x (CO–C*H*–NH+ CO–CH_2–N(CH_3)), 3.63–3.43 (2m H, br, SO_2–CH_2–CH_3), 3.25–3.04 (2m H, br, S–CH_2–CH_2), 3.02–2.59 (3n+2q H, br, N–CH_3+ CH_2–NH_2), 2.20–1.71 (2m H, br, S–CH_2–CH_2), 1.64–0.78 (8q+3m H, br, CH–(CH_2)$_3$–CH_2–NH_2+ SO_2–CH_2–CH_3).

5.4.4 Lipopolypept(o)ide

5.4.4.1 Bisalkyl-Initiierung

5.4.4.1.1 Diblöcke



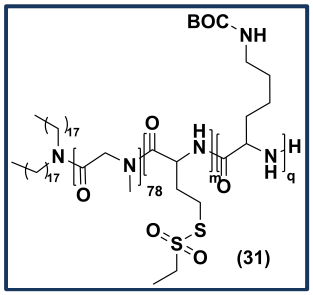
Der Polysarkosin-Makroinitiator (**29**) (z mmol, zur Verfügung gestellt von [redacted] ([redacted])), welcher mit Dioctadecylamin (**28**) initiiert wurde, wurde in abs. DMF gelöst. Nach der Kühlung auf −10 °C wurde das Hcy-NCA (**12**) (n.z mmol, als Stammlösung in abs. DMF) hinzugefügt. Nach zwei Tagen war die Reaktion beendet. Zwecks Analytik wurden 10 mg Polymer aus dem Reaktionsgemisch entnommen.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ (ppm) = 8.32 (10H, br, $^{\alpha}$N*H*), 4.63–3.80 (br, 10H (CO–C*H*–NH)+ 156H (CO–CH_2–N(CH_3)), 3.65–3.45 (20H, br, SO_2–CH_2–CH_3), 3.21–3.03 (20H, br, S–CH_2–CH_2), 3.03–2.59 (m, br, 234H, N-CH_3), 2.19–1.84 (20H, br, S–CH_2–CH_2), 1.57–1.15 (br, 30H (SO_2–CH_2–CH_3)+ 68H (N–((CH_2)$_{17}$–CH_3)$_2$)), 0.86 (t, *J* = 6.7 Hz, 6H, N–((CH_2)$_{17}$–CH_3)$_2$).

Tabelle 20: Ansatz des Di-Blocks mit BA_{18} als Initiator (**30**).

Polymer	m Init. [mg]	n Init. [mmol]	n Hcy-NCA [mmol]	Anzahl n
BA_{18}-pSar_{78}-pHcy_{10} (**30**)	100.0	0.017	0.165	10

5.4.4.1.2 Triblöcke



Der oben beschriebene Di-Block (**30**) wurde für die Herstellung der Triblöcke (**31**) direkt weiterverwendet. Dafür wurde dieser in zwei Teile aufgeteilt. Dazu wurde Lys(BOC)-NCA (**15**) (m.z mmol, als Stammlösung in abs. DMF) bei derselben Temperatur hinzugefügt.

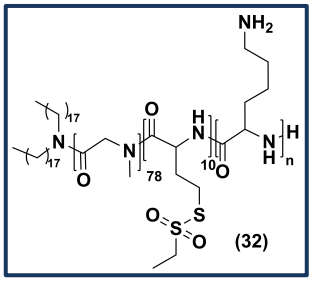
Tabelle 21: Ansätze der Triblöcke mit BA_{18} als Initiator (**31a-b**).

Polymer	n Init. [mmol]	n Lys-NCA [mmol]	Anzahl m
BA_{18}-$pSar_{78}$-$pHcy_{10}$-$pLys(BOC)_{19}$ (**31a**)	0.008	0.152	20
BA_{18}-$pSar_{78}$-$pHcy_{10}$-$pLys(BOC)_{10}$ (**31b**)	0.008	0.076	10

Nach vollständigem Reaktionsumsatz wurde das Reaktionsgemisch tropfenweise zu Diethylether zugegeben. Das erhaltene Präzipitat wurde durch Zentrifugation in ein Pellet (**31a-b**) überführt.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ (ppm) = 8.54–8.03 (10H+q H, br, $^{\alpha}$N*H*), 7.12–6.27 (1q H, br, $^{\varepsilon}$N*H*), 4.63–3.80 (br, 10H (CO–C*H*–NH)+ 156H (CO–CH_2–N(CH_3)), 3.21–3.03 (20H, br, SO_2–CH_2–CH_3),), 3.02–2.58 (954H+2q H, br, N–CH_3+ CH_2–NH–CO–O–C(CH_3)$_3$),–CH_2), 2.28–1.71 (2m H, br, S–CH_2–CH_2), 1.64–0.94 (br, 15q (CH–(CH_2)$_3$–CH_2–NH–CO–O–C(CH_3)$_3$) + 30H (SO_2–CH_2–CH_3)+ 68H (N–((CH_2)$_{17}$–CH_3)$_2$)), 0.86 (t, *J* = 6.7 Hz, 6H, N–((CH_2)$_{17}$–CH_3)$_2$).

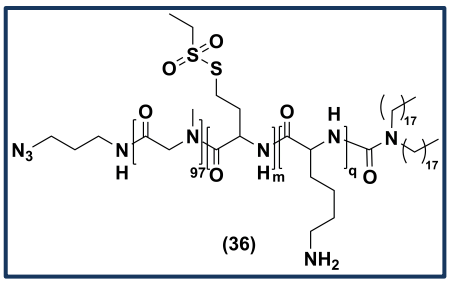
5.4.4.1.3 Abspaltung der BOC-Schutzgruppe



Die hergestellten Polymere (**31a-b**) wurden mit einer 50%igen TFA-Lösung (2 mL) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde drei Tage gegen eine 2%ige Essigsäure-Lösung dialysiert und anschließend wurde der Schlauchinhalt lyophilisiert.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ (ppm) = 8.54–8.03 (10H+q H, br, $^{\alpha}$N*H*), 4.63–3.80 (br, 10H (CO–C*H*–NH)+ 156H (CO–CH_2–N(CH_3)), 3.21–3.03 (20H, br, SO_2–CH_2–CH_3), 3.02–2.58 (954H+2q H, br, N–CH_3+ CH_2–NH–CO–O–C(CH_3)$_3$),–CH_2), 2.28–1.71 (2m H, br, S–CH_2–CH_2), 1.64–0.94 (br, 15q (CH–(CH_2)$_3$–CH_2–NH–CO–O–C(CH_3)$_3$) + 30H (SO_2–CH_2–CH_3)+ 68H (N–((CH_2)$_{17}$–CH_3)$_2$)).0.86 (t, *J* = 6.7 Hz, 6H, N–((CH_2)$_{17}$–CH_3)$_2$).

5.4.4.2 Bisalkyl-Funktionalisierung



Die zwei ausgewählten linearen Triblockcopolypept(o)ide (**23g, 23j**) wurden in abs. DMF vorgelegt. 2 Äq, des als Stammlösung in Chloroform angesetzten BA_{18}-NHS-Esters (**34**), wurde dazugegeben. Die Reaktion wurde 18 h bei Raumtemperatur gerührt.

Das Reaktionsgemisch wurde zweimal in $Et_2O/CHCl_3$ (10:1) und einmal in Diethylether gefällt und zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet (**35**) wurde direkt weiter zur Abspaltung der BOC-Schutzgruppe mittels 50%iger TFA-Lösung umgesetzt. Nach der dreitägigen Dialyse gegen eine 2%ige Essigsäure-Lösung wurde der Schlauchinhalt lyophilisiert.

^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-*d6*): δ (ppm) = 8.54–8.03 (10H+q H, br, $^{\alpha}$N*H*), 4.63–3.80 (br, 10H (CO–C*H*–NH)+ 156H (CO–CH_2–N(CH_3)), 3.21–3.03 (20H, br, SO_2–CH_2–CH_3), 3.02–2.58 (954H+2q H, br, N–CH_3+ CH_2–NH–CO–O–C(CH_3)$_3$),–CH_2), 2.28–1.71 (2m H, br, S–CH_2–CH_2), 1.64–0.94 (br, 15q (CH–(CH_2)$_3$–CH_2–NH–CO–O–C(CH_3)$_3$) + 30H (SO_2–CH_2–CH_3)+ 68H (N–((CH_2)$_{17}$–CH_3)$_2$)).0.86 (t, *J* = 6.7 Hz, 6H, N–((CH_2)$_{17}$–CH_3)$_2$)

5.5 Herstellung der Polyplexe

Die Polymere wurden in sterilem, RNase-freiem Wasser (mit 0.5 vol% Essigsäure) auf eine Endkonzentration von 10 mg/mL gelöst.

Das Polyplex-Formulierungsprotokoll wurde von HELLER *et al*. übernommen.[7, 55] Für die Herstellung von LAH4*-vernetzten Polyplexen wurde LAH4* (in entsprechenden Mengen, die zur Sättigung von 50% der *S*-Ethylsulfonyl-Gruppen im finalen Polyplex führen) zu der Nukleinsäure, Fluc-pDNA, -mRNA (1 µg) und Thy1.1-mRNA (0.1 µg/µL), vorgelegt in 1xHEPES, dazugegeben. Im Falle von TETA*- (100% Sättigung) oder GALA*-vernetzten (50% Sättigung) Polyplexen wurde die Vernetzung erst nach der Komplexierung durchgeführt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das Polypept(o)id zu der Mischung, in dem gewünschten N/P-Verhältnis, gegeben. Die Mischung wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, bevor eine Lösung aus 50%iger Glucose in 10xHEPES dazu gegeben wurde, um eine Endkonzentration von 5% Glucose in 1xHEPES zu erreichen.

Das N/P-Verhältnis wurde berechnet nach:

$$\frac{N}{P} = \frac{m_{pLys}}{m_{Nukleinsäure}} \times \frac{1}{M_{Lys(Monomer)} \cdot n_{Phosphat}}$$

Wobei $n_{Phosphat}$ bei 1 µg mRNA $3.11\times10^{-9}\ \frac{mol}{\mu g}$ und bei 1 µg pDNA $3.07\times10^{-9}\ \frac{mol}{\mu g}$ beträgt.

Die für den dualen Luciferase-Assay verwendeten Polyplexe wurden wie oben beschrieben hergestellt. Der anteilige Gehalt an Rluc-pDNA in der gesamten Menge an Nukleinsäure betrug 10%.

5.5.1 Polyplex Modifikation

Für die Konjugation der Trimannose wurde die benötigte Menge an Trimannose-DBCO und für das $F(ab')_2$-Fragment wurde 3 µg $F(ab')_2$-DBCO / µg mRNA zu den Polyplex-Lösungen gegeben und über Nacht bei 20 °C und 350 rpm auf dem Schüttler gestellt.

6 Literaturverzeichnis

[1] L. I. Selby, C. M. Cortez-Jugo, G. K. Such, A. P. R. Johnston, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2017**, *9*, e1452.

[2] R. Ni, R. Feng, Y. Chau, *Life* **2019**, *9*, 59.

[3] B. G. De Geest, M. A. Willart, H. Hammad, B. N. Lambrecht, C. Pollard, P. Bogaert, M. De Filette, X. Saelens, C. Vervaet, J. P. Remon, *ACS nano* **2012**, *6*, 2136-2149.

[4] N. L. Benner, R. L. McClellan, C. R. Turlington, O. A. W. Haabeth, R. M. Waymouth, P. A. Wender, *Journal of the American Chemical Society* **2019**, *141*, 8416-8421.

[5] Y. Yan, H. Xiong, X. Zhang, Q. Cheng, D. J. Siegwart, *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 4307-4315.

[6] J. W. Salameh, L. Zhou, S. M. Ward, C. F. Santa Chalarca, T. Emrick, M. L. Figueiredo, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2020**, *12*, e1598.

[7] P. Heller, D. Hobernik, U. Lächelt, M. Schinnerer, B. Weber, M. Schmidt, E. Wagner, M. Bros, M. Barz, *Journal of Controlled Release* **2017**, *258*, 146-160.

[8] T. Bus, A. Traeger, U. S. Schubert, *Journal of Materials Chemistry B* **2018**, *6*, 6904-6918.

[9] N. Bono, F. Ponti, D. Mantovani, G. Candiani, *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 183.

[10] A. Kichler, A. J. Mason, B. Bechinger, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2006**, *1758*, 301-307.

[11] P. Midoux, G. Breuzard, J. P. Gomez, C. Pichon, *Current gene therapy* **2008**, *8*, 335-352.

[12] K. Von Gersdorff, N. N. Sanders, R. Vandenbroucke, S. C. De Smedt, E. Wagner, M. Ogris, *Molecular therapy* **2006**, *14*, 745-753.

[13] X. Wang, Y. Qiu, M. Wang, C. Zhang, T. Zhang, H. Zhou, W. Zhao, W. Zhao, G. Xia, R. Shao, *International Journal of Nanomedicine* **2020**, *15*, 9447.

[14] A. Albanese, P. S. Tang, W. C. Chan, *Annual review of biomedical engineering* **2012**, *14*, 1-16.

[15] F. Zhao, Y. Zhao, Y. Liu, X. Chang, C. Chen, Y. Zhao, *small* **2011**, *7*, 1322-1337.

[16] S. Mazumdar, D. Chitkara, A. Mittal, *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2021**.

[17] G. Sahay, D. Y. Alakhova, A. V. Kabanov, *Journal of controlled release* **2010**, *145*, 182-195.

[18] L. Parhamifar, A. K. Larsen, A. C. Hunter, T. L. Andresen, S. M. Moghimi, *Soft Matter* **2010**, *6*, 4001-4009.

[19] S. K. Sohaebuddin, P. T. Thevenot, D. Baker, J. W. Eaton, L. Tang, *Particle and fibre toxicology* **2010**, *7*, 1-17.

[20] N. P. Gabrielson, D. W. Pack, *Journal of Controlled Release* **2009**, *136*, 54-61.

[21] J. Rejman, A. Bragonzi, M. Conese, *Molecular therapy* **2005**, *12*, 468-474.

[22] H. K. Shete, R. H. Prabhu, V. B. Patravale, *Journal of nanoscience and nanotechnology* **2014**, *14*, 460-474.

[23] M. L. Patil, M. Zhang, O. Taratula, O. B. Garbuzenko, H. He, T. Minko, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 258-266.

[24] Y.-Y. Won, R. Sharma, S. F. Konieczny, *Journal of Controlled Release* **2009**, *139*, 88.

[25] R. V. Benjaminsen, M. A. Mattebjerg, J. R. Henriksen, S. M. Moghimi, T. L. Andresen, *Molecular Therapy* **2013**, *21*, 149-157.

[26] A. M. Funhoff, C. F. van Nostrum, G. A. Koning, N. M. Schuurmans-Nieuwenbroek, D. J. Crommelin, W. E. Hennink, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 32-39.

[27] I. Canton, G. Battaglia, *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 2718-2739.

[28] A. K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, H. J. Haisma, *Journal of Controlled Release* **2011**, *151*, 220-228.

[29] K. Roberg, K. Kågedal, K. Öllinger, *The American journal of pathology* **2002**, *161*, 89-96.

[30] W. Li, F. Nicol, F. C. Szoka Jr, *Advanced drug delivery reviews* **2004**, *56*, 967-985.

[31] Z. Song, Z. Han, S. Lv, C. Chen, L. Chen, L. Yin, J. Cheng, *Chemical Society Reviews* **2017**, *46*, 6570-6599.

[32] Z. Song, Z. Tan, J. Cheng, *Macromolecules* **2019**, *52*, 8521-8539.

[33] K. Klinker, M. Barz, *Macromolecular rapid communications* **2015**, *36*, 1943-1957.

[34] A. R. Mazo, S. Allison-Logan, F. Karimi, N. J.-A. Chan, W. Qiu, W. Duan, N. M. O'Brien-Simpson, G. G. Qiao, *Chemical society reviews* **2020**, *49*, 4737-4834.

[35] Y. Liu, L. Yin, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2020**.

[36] C. Deng, J. Wu, R. Cheng, F. Meng, H.-A. Klok, Z. Zhong, *Progress in polymer science* **2014**, *39*, 330-364.

[37] H. Tian, Z. Tang, *Biodegradable Synthetic Polymers: Preparation, Functionalization and Biomedical Application. Prog. Polym. Sci* **2012**, *37*, 237-280.

[38] D. Huesmann, A. Sevenich, B. Weber, M. Barz, *Polymer* **2015**, *67*, 240-248.

[39] Y. Liu, D. Li, J. Ding, X. Chen, *Chinese Chemical Letters* **2020**, *31*, 3001-3014.

[40] D. Huesmann, A. Birke, K. Klinker, S. Türk, H. J. Räder, M. Barz, *Macromolecules* **2014**, *47*, 928-936.

[41] D. K. Meijer, H. J. Geesink, *Open Journal of Biophysics* **2018**, *8*, 117-154.

[42] N. Hadjichristidis, H. Iatrou, M. Pitsikalis, G. Sakellariou, *Chemical reviews* **2009**, *109*, 5528-5578.

[43] R. Luxenhofer, C. Fetsch, A. Grossmann, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2013**, *51*, 2731-2752.

[44] B. Weber, A. Birke, K. Fischer, M. Schmidt, M. Barz, *Macromolecules* **2018**, *51*, 2653-2661.

[45] O. Schäfer, D. Schollmeyer, A. Birke, R. Holm, K. Johann, C. Muhl, C. Seidl, B. Weber, M. Barz, *Tetrahedron Letters* **2019**, *60*, 272-275.

[46] B. Zheng, T. Bai, J. Ling, J. Sun, *Communications Chemistry* **2020**, *3*, 1-9.

[47] G. Settanni, T. Schäfer, C. Muhl, M. Barz, F. Schmid, *Computational and structural biotechnology journal* **2018**, *16*, 543-550.

[48] R. J. Christie, N. Nishiyama, K. Kataoka, *Endocrinology* **2010**, *151*, 466-473.

[49] K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 2562-2574.

[50] M. Barz, R. Luxenhofer, R. Zentel, M. J. Vicent, *Polymer Chemistry* **2011**, *2*, 1900-1918.

[51] A. Birke, J. Ling, M. Barz, *Progress in Polymer Science* **2018**, *81*, 163-208.

[52] K. Klinker, R. Holm, P. Heller, M. Barz, *Polymer Chemistry* **2015**, *6*, 4612-4623.

[53] C. Muhl, M. Conrad, D. Unthan, M. Barz, *European Polymer Journal* **2019**, *120*, 109223.

[54] P. M. Klein, K. Klinker, W. Zhang, S. Kern, E. Kessel, E. Wagner, M. Barz, *Polymers* **2018**, *10*, 689.

[55] P. Heller, *Dissertation* **2017**.

[56] P. Heller, A. Birke, D. Huesmann, B. Weber, K. Fischer, A. Reske-Kunz, M. Bros, M. Barz, *Macromolecular bioscience* **2014**, *14*, 1380-1395.

[57] H. Leuchs, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1906**, *39*, 857-861.

[58] F. Fuchs, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1922**, *55*, 2943-2943.

[59] A. Farthing, *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1950**, 3213-3217.

[60] I. Dimitrov, H. Schlaad, *Chemical communications* **2003**, 2944-2945.

[61] T. Aliferis, H. Iatrou, N. Hadjichristidis, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1653-1656.

[62] W. Vayaboury, O. Giani, H. Cottet, A. Deratani, F. Schué, *Macromolecular rapid communications* **2004**, *25*, 1221-1224.

[63] H. Lu, J. Cheng, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 14114-14115.

[64] J. Zou, J. Fan, X. He, S. Zhang, H. Wang, K. L. Wooley, *Macromolecules* **2013**, *46*, 4223-4226.

[65] L. Bauer, *The Journal of Organic Chemistry* **1956**, *21*, 1182-1183.

[66] M. Van Beylen, S. Bywater, G. Smets, M. Szwarc, D. J. Worsfold, *Polysiloxane Copolymers/Anionic Polymerization* **1988**, 87-143.

[67] P. M. Klein, E. Wagner, *Antioxidants & redox signaling* **2014**, *21*, 804-817.

[68] H. Cabral, K. Miyata, K. Osada, K. Kataoka, *Chemical reviews* **2018**, *118*, 6844-6892.

[69] S. Katayose, K. Kataoka, *Journal of pharmaceutical sciences* **1998**, *87*, 160-163.

[70] K. Miyata, Y. Kakizawa, N. Nishiyama, A. Harada, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 2355-2361.

[71] B. S. Kim, H. J. Kim, S. Osawa, K. Hayashi, K. Toh, M. Naito, H. S. Min, Y. Yi, I. C. Kwon, K. Kataoka, *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2019**, *5*, 5770-5780.

[72] O. Schäfer, D. Huesmann, C. Muhl, M. Barz, *Chemistry–A European Journal* **2016**, *22*, 18085-18091.

[73] O. Schäfer, D. Huesmann, M. Barz, *Macromolecules* **2016**, *49*, 8146-8153.

[74] C. Muhl, O. Schäfer, T. Bauer, H.-J. Räder, M. Barz, *Macromolecules* **2018**, *51*, 8188-8196.

[75] D. Huesmann, K. Klinker, M. Barz, *Polymer Chemistry* **2017**, *8*, 957-971.

[76] O. Schäfer, K. Klinker, L. Braun, D. Huesmann, J. Schultze, K. Koynov, M. Barz, *ACS Macro Letters* **2017**, *6*, 1140-1145.

[77] P. Heller, J. Zhou, B. Weber, D. Hobernik, M. Bros, F. Schmid, M. Barz, *Small* **2017**, *13*, 1603694.

[78] D. Ulkoski, C. Scholz, *Macromolecular bioscience* **2018**, *18*, 1800108.

[79] K.-L. Poggemann.

[80] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 15046-15047.

[81] H. C. Kolb, M. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2004-2021.

[82] W. Agut, R. Agnaou, S. Lecommandoux, D. Taton, *Macromolecular Rapid Communications* **2008**, *29*, 1147-1155.

[83] I. Conejos-Sánchez, A. Duro-Castano, A. Birke, M. Barz, M. J. Vicent, *Polymer Chemistry* **2013**, *4*, 3182-3186.

[84] R. Holm, B. Weber, P. Heller, K. Klinker, D. Westmeier, D. Docter, R. H. Stauber, M. Barz, *Macromolecular bioscience* **2017**, *17*, 1600514.

[85] K. Hamacher, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **1989**, *27*, 343-346.

[86] M. Arslan, R. Sanyal, A. Sanyal, *Polymer Chemistry* **2020**, *11*, 1763-1773.

[87] A. Leonov, B. Voigt, F. Rodriguez-Castañeda, P. Sakhaii, C. Griesinger, *Chemistry–A European Journal* **2005**, *11*, 3342-3348.

[88] J. Intra, A. K. Salem, *Journal of Controlled Release* **2008**, *130*, 129-138.

[89] L. Brülisauer, N. Kathriner, M. Prenrecaj, M. A. Gauthier, J. C. Leroux, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 12454-12458.

[90] M. L. Read, S. Singh, Z. Ahmed, M. Stevenson, S. S. Briggs, D. Oupicky, L. B. Barrett, R. Spice, M. Kendall, M. Berry, *Nucleic acids research* **2005**, *33*, e86-e86.

[91] M. Harada-Shiba, K. Yamauchi, A. Harada, I. Takamisawa, K. Shimokado, K. Kataoka, *Gene therapy* **2002**, *9*, 407-414.

[92] S. Bleher, J. Buck, C. Muhl, S. Sieber, S. Barnert, D. Witzigmann, J. Huwyler, M. Barz, R. Süss, *Small* **2019**, *15*, 1904716.

[93] B. Bechinger, *Journal of molecular biology* **1996**, *263*, 768-775.

[94] A. Kichler, C. Leborgne, O. Danos, B. Bechinger, *Journal of Molecular Medicine* **2007**, *85*, 191-201.

[95] A. J. Mason, A. Martinez, C. Glaubitz, O. Danos, A. Kichler, B. Bechinger, *The FASEB journal* **2006**, *20*, 320-322.

[96] J. Wolf, C. Aisenbrey, N. Harmouche, J. Raya, P. Bertani, N. Voievoda, R. Süss, B. Bechinger, *Biophysical journal* **2017**, *113*, 1290-1300.

[97] N. Liu, B. Bechinger, R. Süss, *Scientific reports* **2017**, *7*, 1-12.

[98] R. A. Parente, L. Nadasdi, N. K. Subbarao, F. C. Szoka Jr, *Biochemistry* **1990**, *29*, 8713-8719.

[99] B. Lou, S. De Koker, C. Y. J. Lau, W. E. Hennink, E. Mastrobattista, *Bioconjugate chemistry* **2018**, *30*, 461-475.

[100] N. K. Subbarao, R. A. Parente, F. C. Szoka Jr, L. Nadasdi, K. Pongracz, *Biochemistry* **1987**, *26*, 2964-2972.

[101] M. Ikonen, L. Murtomäki, K. Kontturi, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* **2008**, *66*, 77-83.

[102] R. Sharma, J.-S. Lee, R. C. Bettencourt, C. Xiao, S. F. Konieczny, Y.-Y. Won, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 3294-3307.

[103] K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, H. Wichers, **2015**.

[104] M. Buschle, M. Cotten, H. Kirlappos, K. Mechtler, G. Schaffner, W. Zauner, M. L. Birnstiel, E. Wagner, *Human gene therapy* **1995**, *6*, 753-761.

[105] Y.-C. Lin, M. Boone, L. Meuris, I. Lemmens, N. Van Roy, A. Soete, J. Reumers, M. Moisse, S. Plaisance, R. Drmanac, J. Chen, F. Speleman, D. Lambrechts, Y. Van de Peer, J. Tavernier, N. Callewaert, *Nature Communications* **2014**, *5*, 4767.

[106] N. Okada, M. Tsujino, Y. Hagiwara, A. Tada, Y. Tamura, K. Mori, T. Saito, S. Nakagawa, T. Mayumi, T. Fujita, *British journal of cancer* **2001**, *84*, 1564-1570.

[107] R. M. Steinman, Z. A. Cohn, *Journal of experimental medicine* **1973**, *137*, 1142-1162.

[108] Z. Shen, G. Reznikoff, G. Dranoff, K. L. Rock, *The Journal of Immunology* **1997**, *158*, 2723-2730.

[109] J. Imai, S. Ohashi, T. Sakai, *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 153.

[110] L. Ke, P. Cai, Y. L. Wu, X. Chen, *Advanced Therapeutics* **2020**, *3*, 1900213.

[111] Y. Willemen, M. Versteven, M. Peeters, Z. N. Berneman, E. L. Smits, *Cancers* **2020**, *12*, 299.

[112] S. M. M. Haeryfar, D. W. Hoskin, *The Journal of Immunology* **2004**, *173*, 3581-3588.

[113] C. Kuhn, H. L. Weiner, *Immunotherapy* **2016**, *8*, 889-906.

[114] A. Bates, C. A. Power, *Antibodies* **2019**, *8*, 28.

[115] H. Liu, M. Rhodes, D. L. Wiest, D. A. Vignali, *Immunity* **2000**, *13*, 665-675.

[116] R. Kedmi, N. Veiga, S. Ramishetti, M. Goldsmith, D. Rosenblum, N. Dammes, I. Hazan-Halevy, L. Nahary, S. Leviatan-Ben-Arye, M. Harlev, *Nature nanotechnology* **2018**, *13*, 214-219.

[117] J. Rojo, A. Sousa-Herves, A. Mascaraque, **2017**.

[118] B. A. Sherf, S. L. Navarro, R. R. Hannah, K. V. Wood, *Promega Notes* **1996**, *57*, 2-8.

[119] L. F. Greer III, A. A. Szalay, *Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence* **2002**, *17*, 43-74.

[120] K. Murphy, C. Weaver, *Janeway's immunobiology*, Garland science, **2016**.

[121] C. Zheng, J. Zhang, H. F. Chan, H. Hu, S. Lv, N. Na, Y. Tao, M. Li, *Small Methods* **2021**, *5*, 2001191.

[122] J. Constantino, C. Gomes, A. Falcão, B. M. Neves, M. T. Cruz, *Immunologic research* **2017**, *65*, 798-810.

[123] S. Hager, F. J. Fittler, E. Wagner, M. Bros, *Cells* **2020**, *9*, 2061.

[124] R. Hirsch, J. A. Bluestone, L. DeNenno, R. E. Gress, *Transplantation* **1990**, *49*, 1117-1123.

[125] L. Chatenoud, *Nature Reviews Immunology* **2003**, *3*, 123-132.

[126] P. A. Carpenter, S. Pavlovic, J. Tso, O. W. Press, T. Gooley, X.-Z. Yu, C. Anasetti, *The Journal of Immunology* **2000**, *165*, 6205-6213.

[127] B. R. Blazar, M. K. Jenkins, P. A. Taylor, J. White, A. Panoskaltsis-Mortari, R. Korngold, D. A. Vallera, *The Journal of Immunology* **1997**, *159*, 5821-5833.

[128] E. R. Steenblock, T. M. Fahmy, *Molecular Therapy* **2008**, *16*, 765-772.

[129] B. R. Olden, Y. Cheng, L. Y. Jonathan, S. H. Pun, *Journal of controlled release* **2018**, *282*, 140-147.

[130] B. R. Olden, E. Cheng, Y. Cheng, S. H. Pun, *Biomaterials science* **2019**, *7*, 789-797.

[131] D. Kim, Y. Wu, Q. Li, Y.-K. Oh, *Nano-micro letters* **2021**, *13*, 1-27.

[132] T. T. Smith, S. B. Stephan, H. F. Moffett, L. E. McKnight, W. Ji, D. Reiman, E. Bonagofski, M. E. Wohlfahrt, S. P. Pillai, M. T. Stephan, *Nature nanotechnology* **2017**, *12*, 813-820.

[133] Q. Sun, M. Barz, B. G. De Geest, M. Diken, W. E. Hennink, F. Kiessling, T. Lammers, Y. Shi, *Chemical Society Reviews* **2019**, *48*, 351-381.

[134] A. M. Frank, A. H. Braun, L. Scheib, S. Agarwal, I. C. Schneider, F. Fusil, S. Perian, U. Sahin, F. B. Thalheimer, E. Verhoeyen, *Blood advances* **2020**, *4*, 5702-5715.

[135] U. Sahin, P. Oehm, E. Derhovanessian, R. A. Jabulowsky, M. Vormehr, M. Gold, D. Maurus, D. Schwarck-Kokarakis, A. N. Kuhn, T. Omokoko, *Nature* **2020**, *585*, 107-112.

[136] K. Reinhard, B. Rengstl, P. Oehm, K. Michel, A. Billmeier, N. Hayduk, O. Klein, K. Kuna, Y. Ouchan, S. Wöll, *Science* **2020**, *367*, 446-453.

[137] N. Salomon, F. Vascotto, A. Selmi, M. Vormehr, J. Quinkhardt, T. Bukur, B. Schrörs, M. Löewer, M. Diken, Ö. Türeci, *Oncoimmunology* **2020**, *9*, 1771925.

[138] M. Vormehr, K. Reinhard, R. Blatnik, K. Josef, J. D. Beck, N. Salomon, M. Suchan, A. Selmi, F. Vascotto, J. Zerweck, *Oncoimmunology* **2019**, *8*, 1553478.

[139] G. Saito, J. A. Swanson, K.-D. Lee, *Advanced drug delivery reviews* **2003**, *55*, 199-215.

[140] C. D. Austin, X. Wen, L. Gazzard, C. Nelson, R. H. Scheller, S. J. Scales, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102*, 17987-17992.

[141] J. Yang, H. Chen, I. R. Vlahov, J.-X. Cheng, P. S. Low, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103*, 13872-13877.

[142] S. Bauhuber, C. Hozsa, M. Breunig, A. Göpferich, *Advanced Materials* **2009**, *21*, 3286-3306.

[143] A. Luster, R. Weinshank, R. Feinman, J. Ravetch, *Journal of Biological Chemistry* **1988**, *263*, 12036-12043.

[144] B. Arunachalam, U. T. Phan, H. J. Geuze, P. Cresswell, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97*, 745-750.

[145] K. T. Hastings, P. Cresswell, *Antioxidants & redox signaling* **2011**, *15*, 657-668.

[146] D. Collins, E. Unanue, C. Harding, *The Journal of Immunology* **1991**, *147*, 4054-4059.

[147] E. Feener, W. Shen, H. Ryser, *Journal of Biological Chemistry* **1990**, *265*, 18780-18785.

[148] L. Brülisauer, ETH Zurich **2014**.

[149] V. Iacobucci, F. Di Giuseppe, T. T. Bui, L. S. Vermeer, J. Patel, D. Scherman, A. Kichler, A. F. Drake, A. J. Mason, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2012**, *1818*, 1332-1341.

[150] A.-L. Coolen, C. Lacroix, P. Mercier-Gouy, E. Delaune, C. Monge, J.-Y. Exposito, B. Verrier, *Biomaterials* **2019**, *195*, 23-37.

[151] T. Kakudo, S. Chaki, S. Futaki, I. Nakase, K. Akaji, T. Kawakami, K. Maruyama, H. Kamiya, H. Harashima, *Biochemistry* **2004**, *43*, 5618-5628.

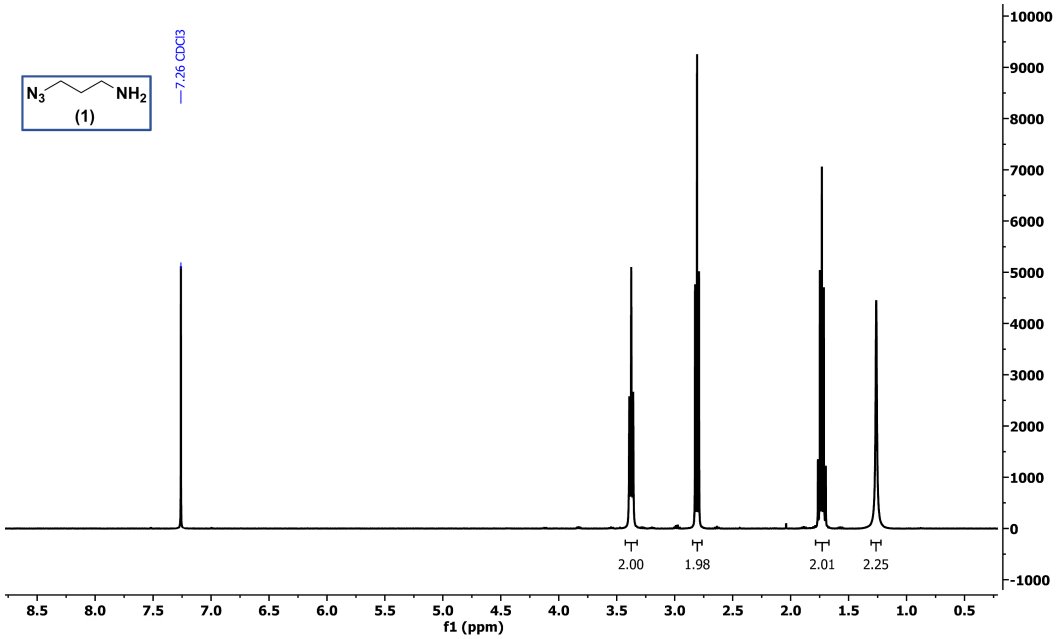
[152] W. Gao, J. M. Chan, O. C. Farokhzad, *Molecular pharmaceutics* **2010**, *7*, 1913-1920.

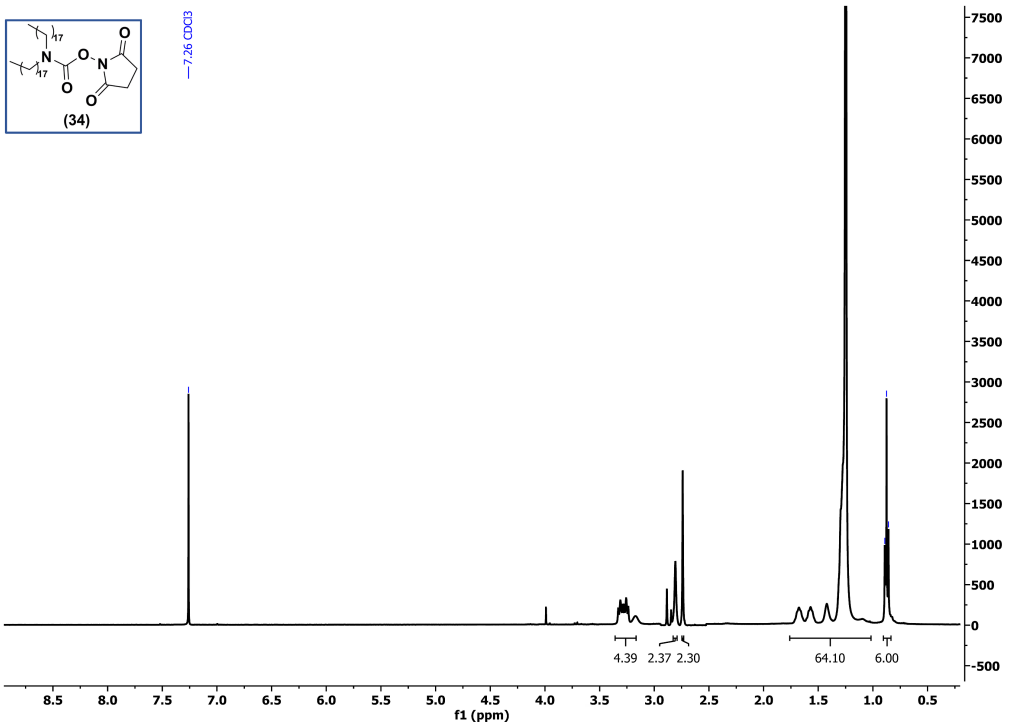
[153] D. Schmaljohann, *Advanced drug delivery reviews* **2006**, *58*, 1655-1670.

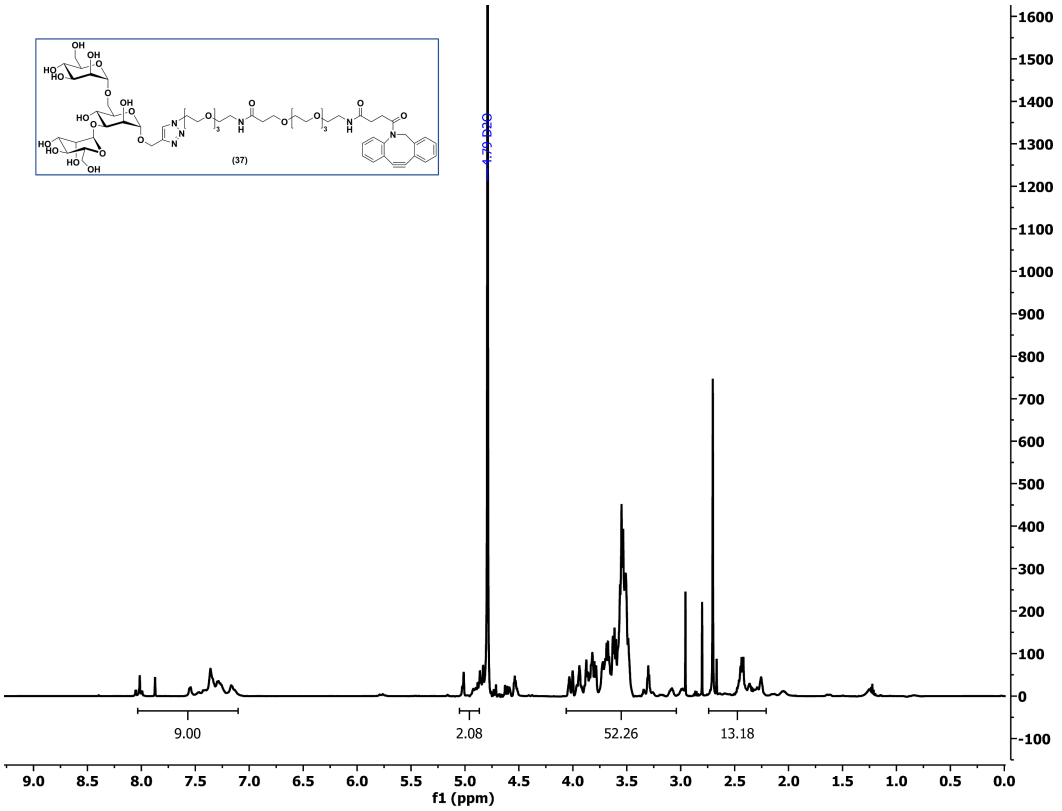
7 Anhang

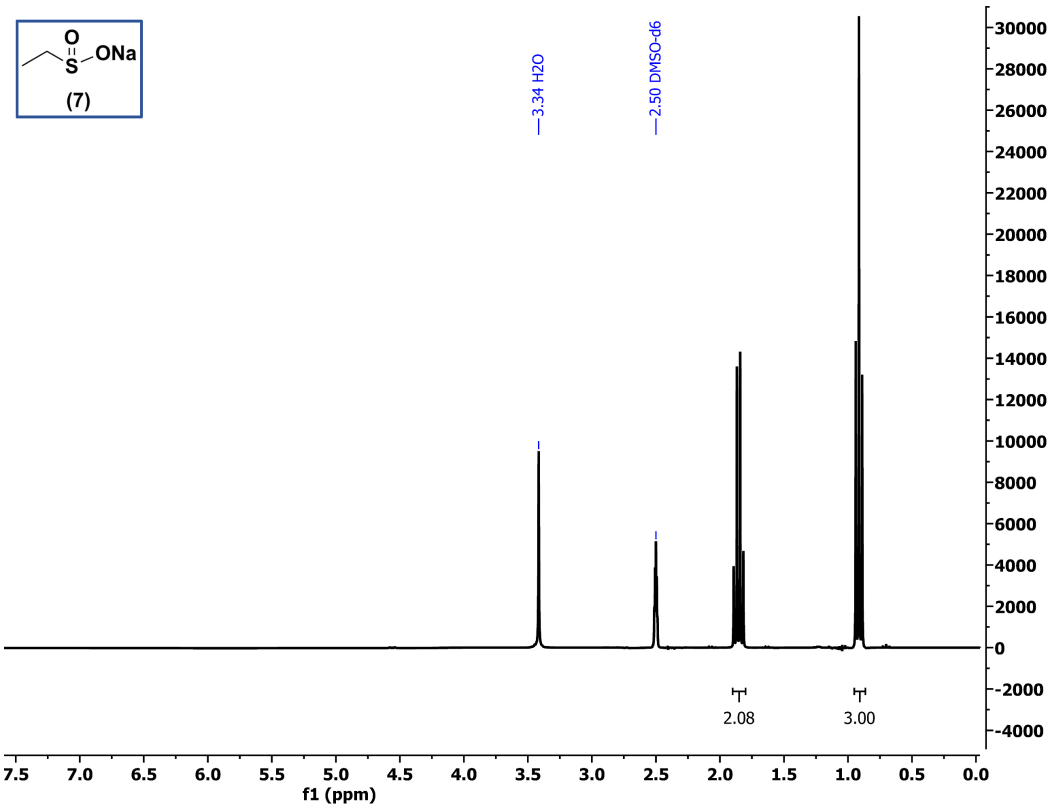
In diesem Abschnitt sind die ausgewählten Spektren der Verbindungen, die im Rahmen dieser Arbeit dargestellt wurden, zusammengefasst.

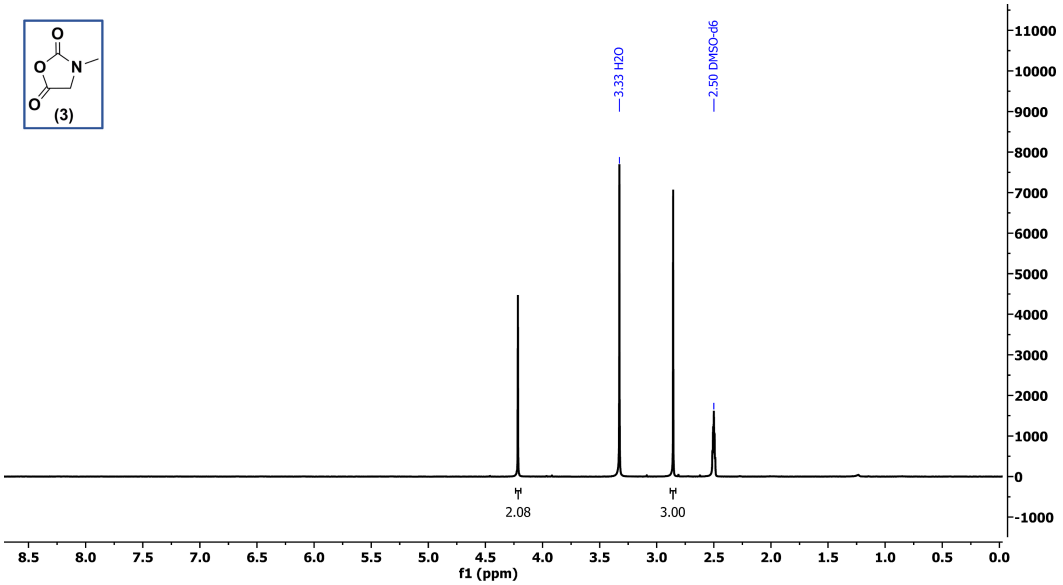
7.1 NMR-Spektren

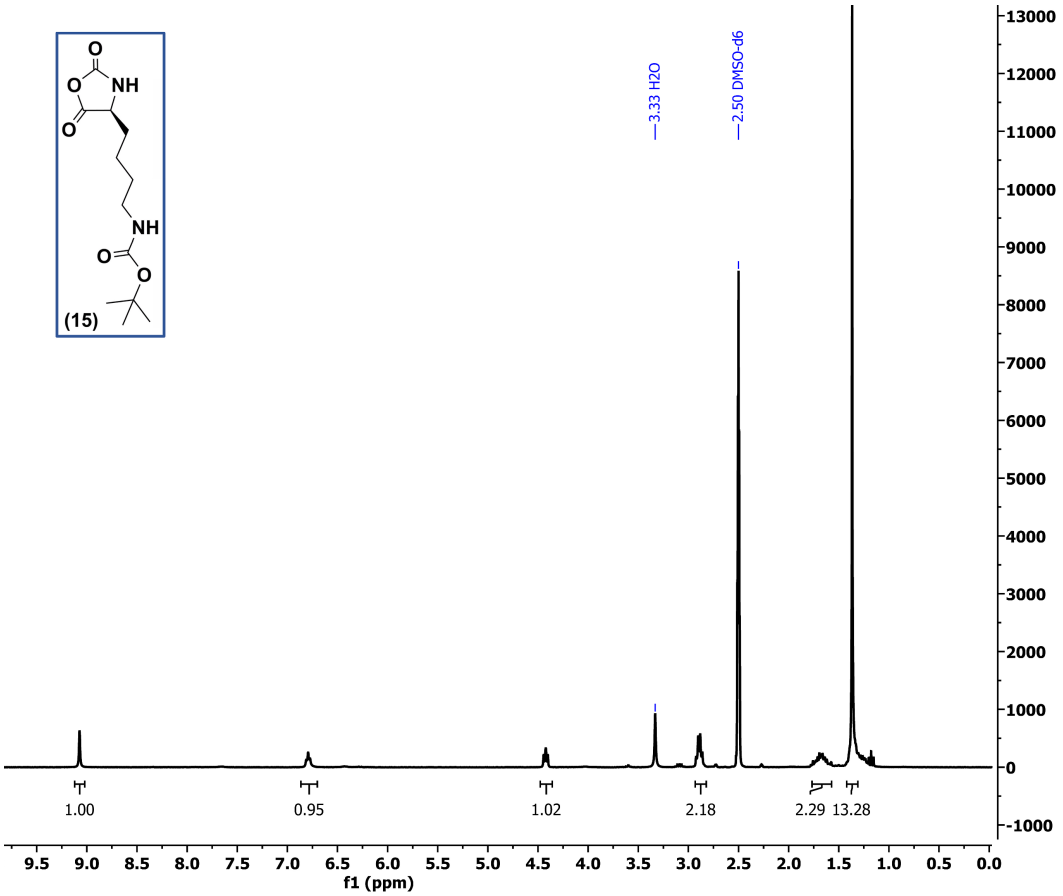


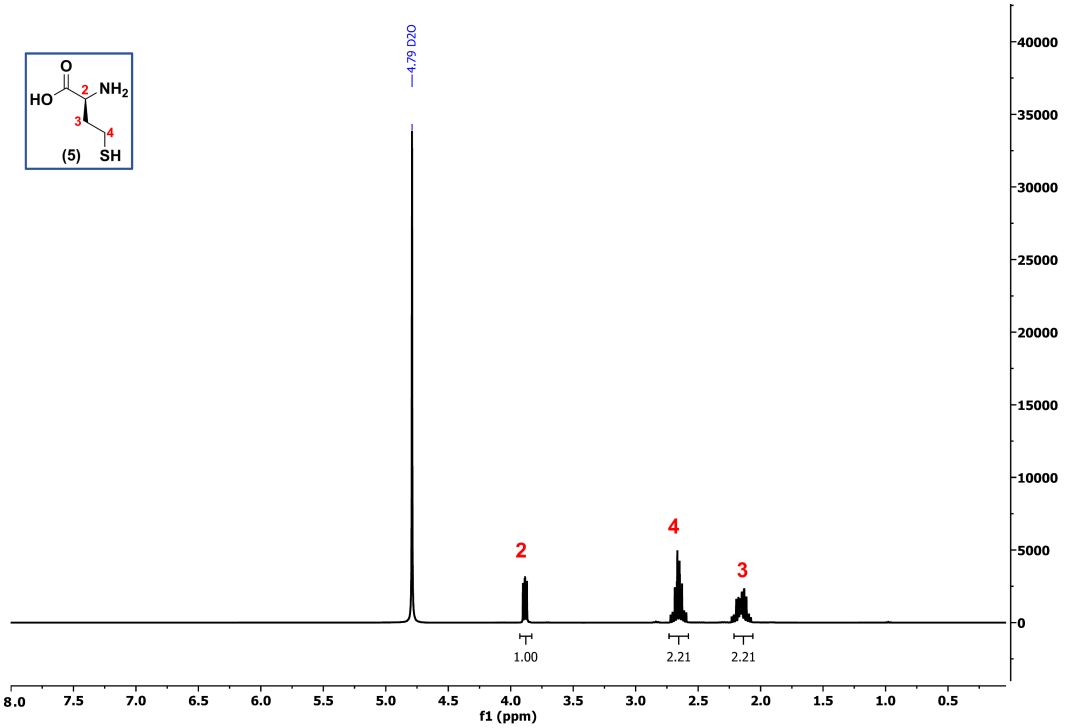


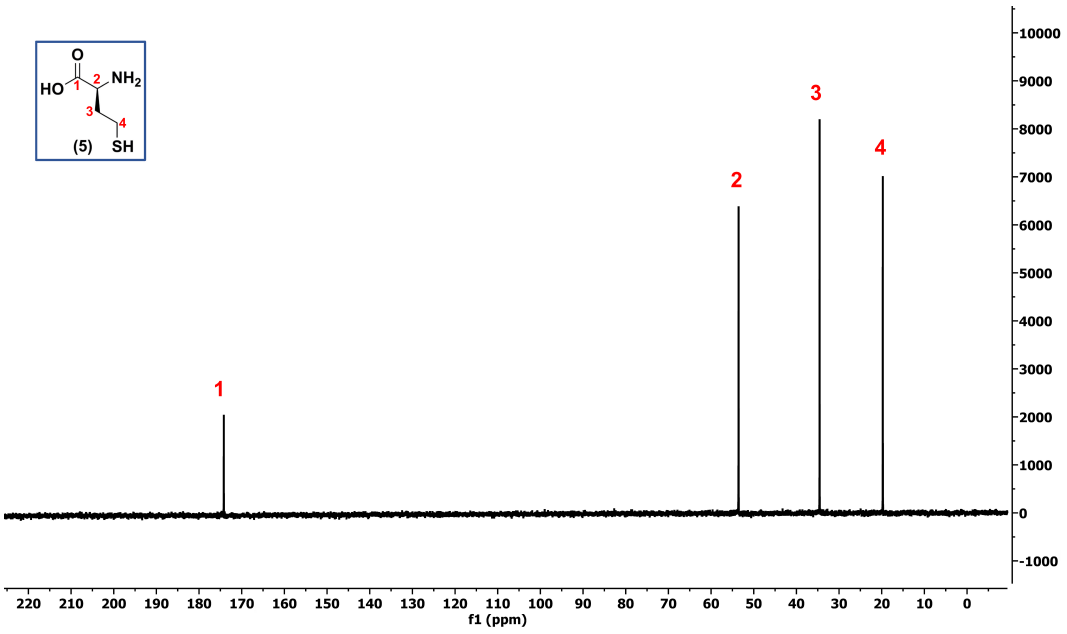

(37)
4.79 H2O
9.00
2.08
52.26
13.18
f1 (ppm)

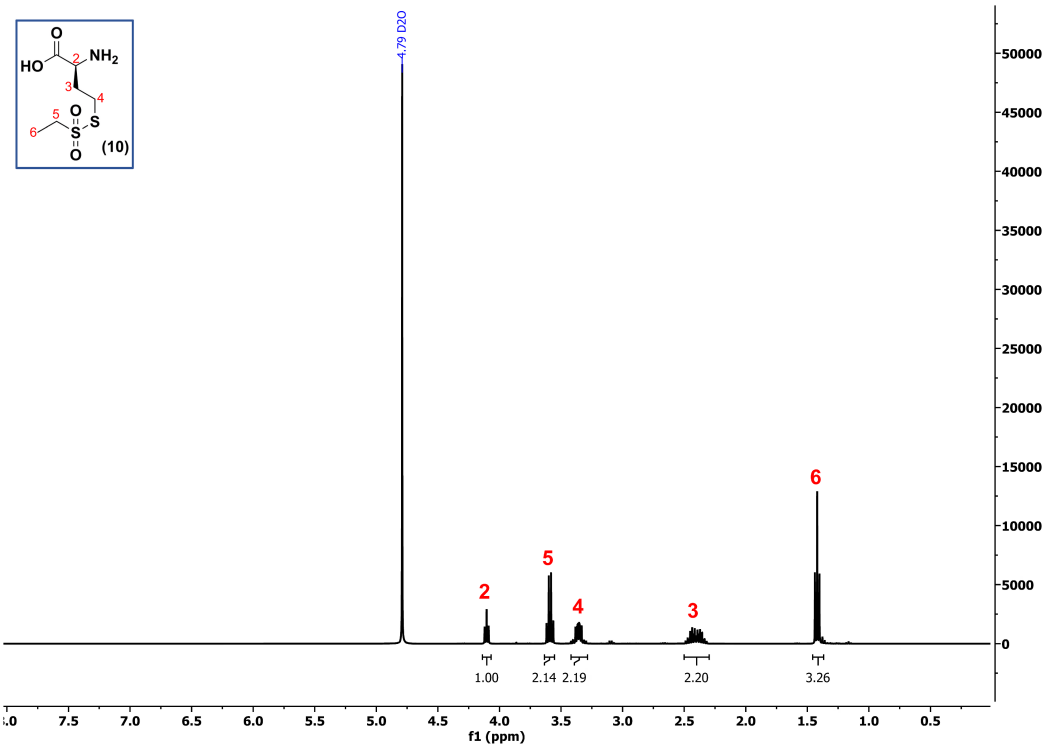

O
S
ONa
(7)
3.34 H2O
2.50 DMSO-d6
2.08
3.00
f1 (ppm)

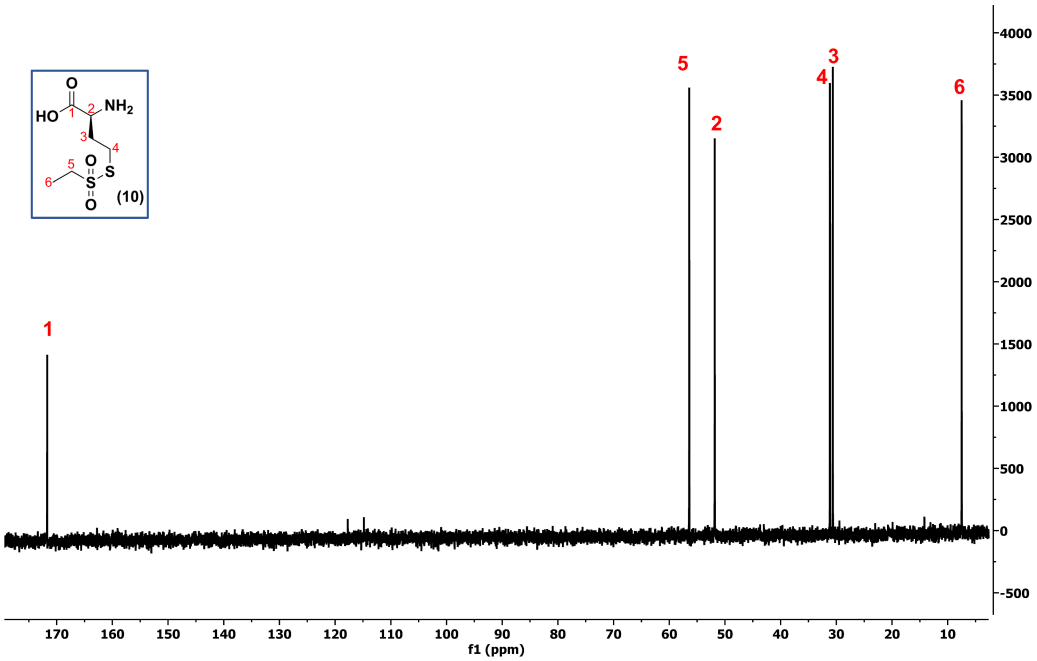

(3)
3.33 H2O
2.50 DMSO-d6
2.08
3.00
f1 (ppm)

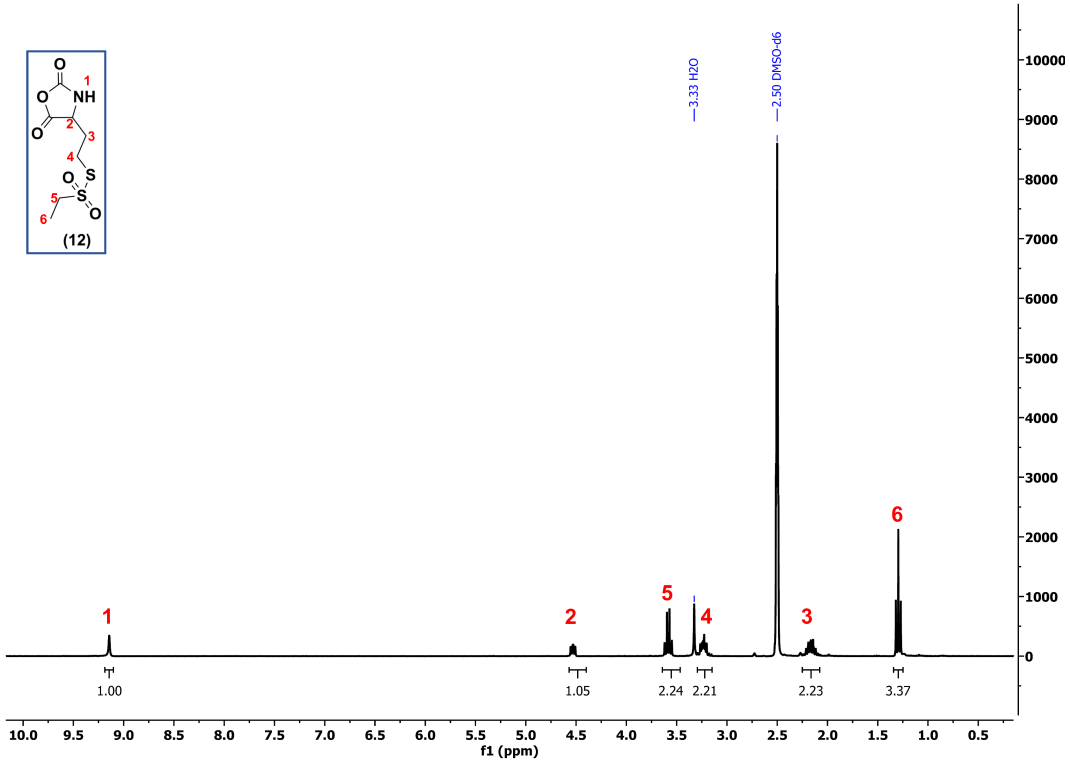

(15)
NH
NH
3.33 H2O
2.50 DMSO-d6
1.00
0.95
1.02
2.18
2.29
13.28
f1 (ppm)

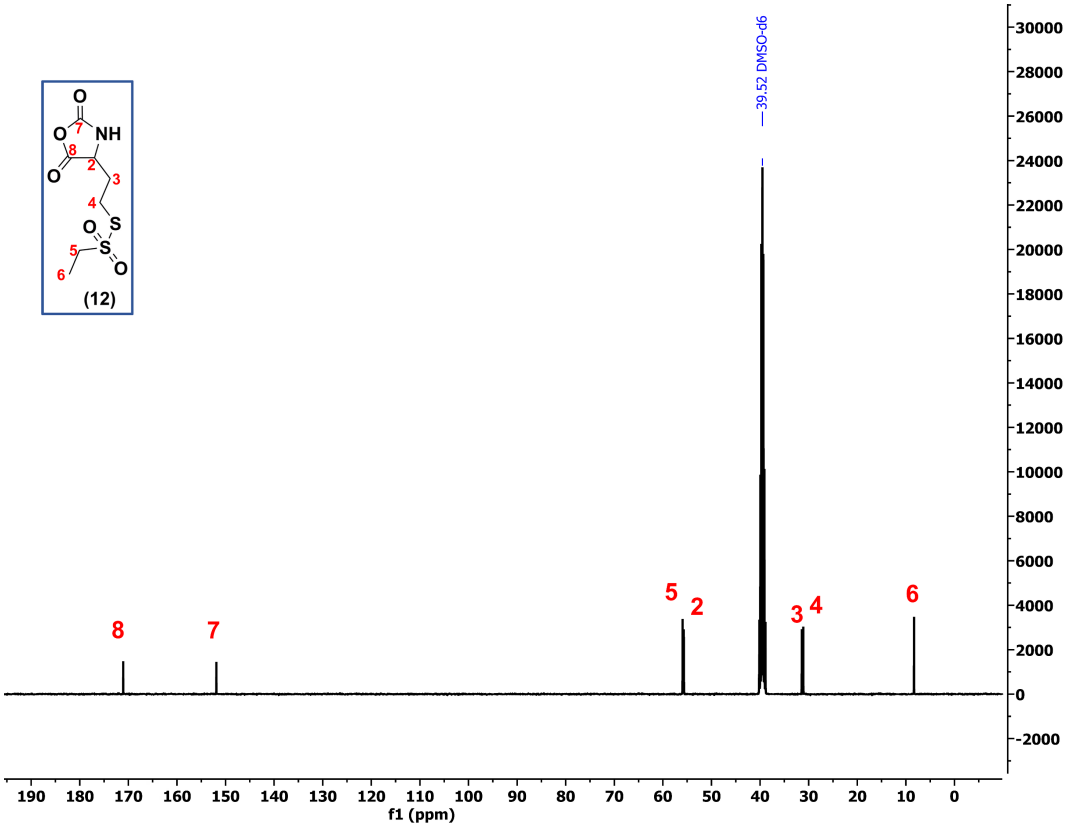

HO
O
NH2
(5) SH
4.79 D2O
2
3
4
1.00
2.21
2.21
f1 (ppm)

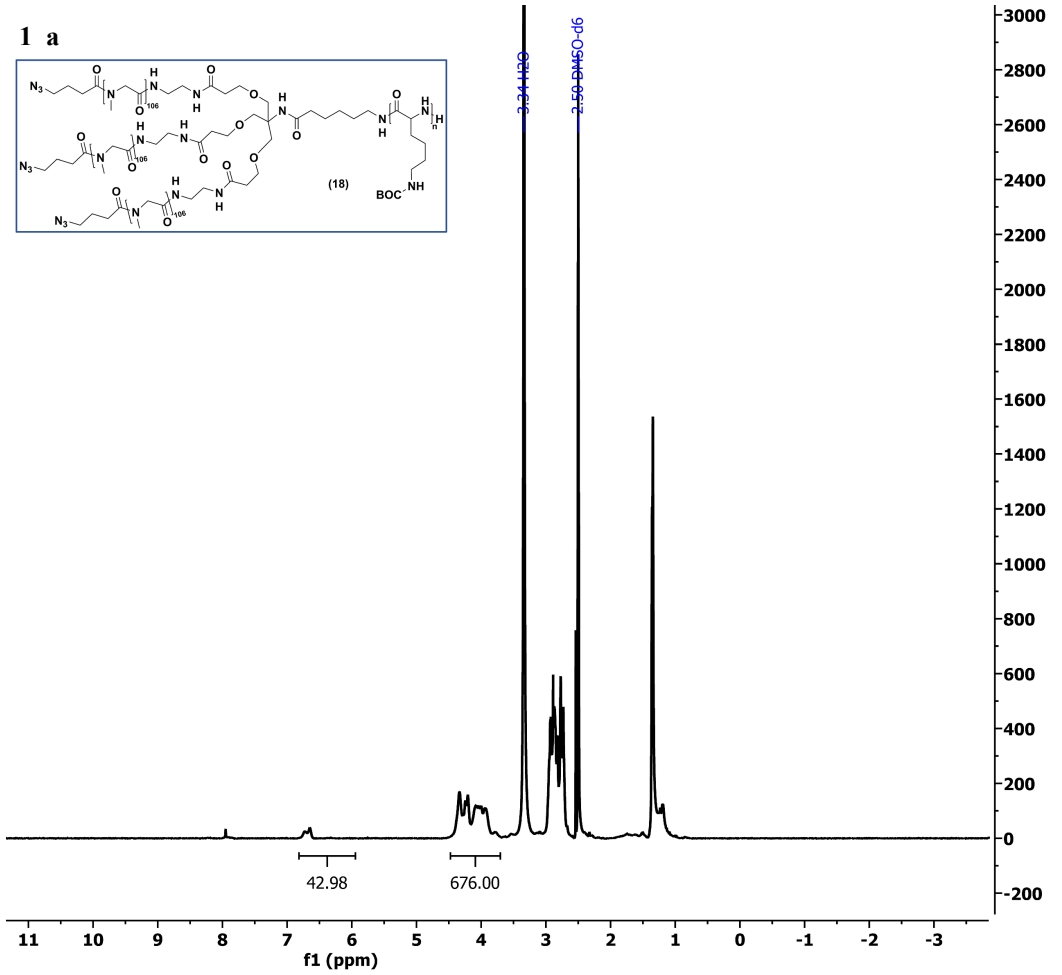

HO
O
NH2
(5) SH
1
2
3
4
f1 (ppm)

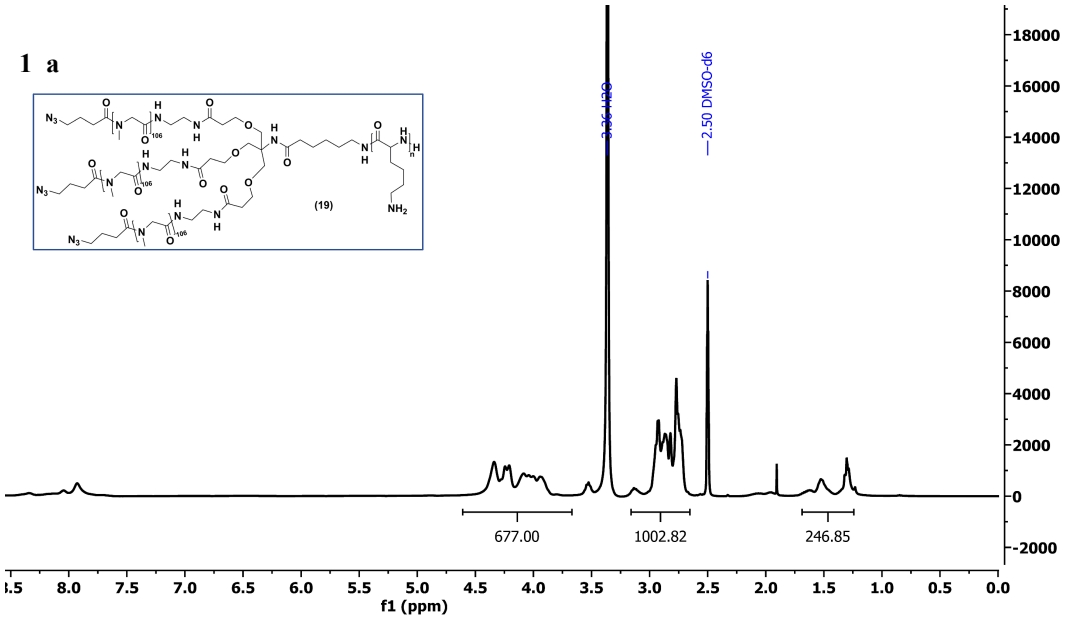

4.79 D2O
2
5
4
3
6
1.00
2.14
2.19
2.20
3.26
f1 (ppm)
(10)

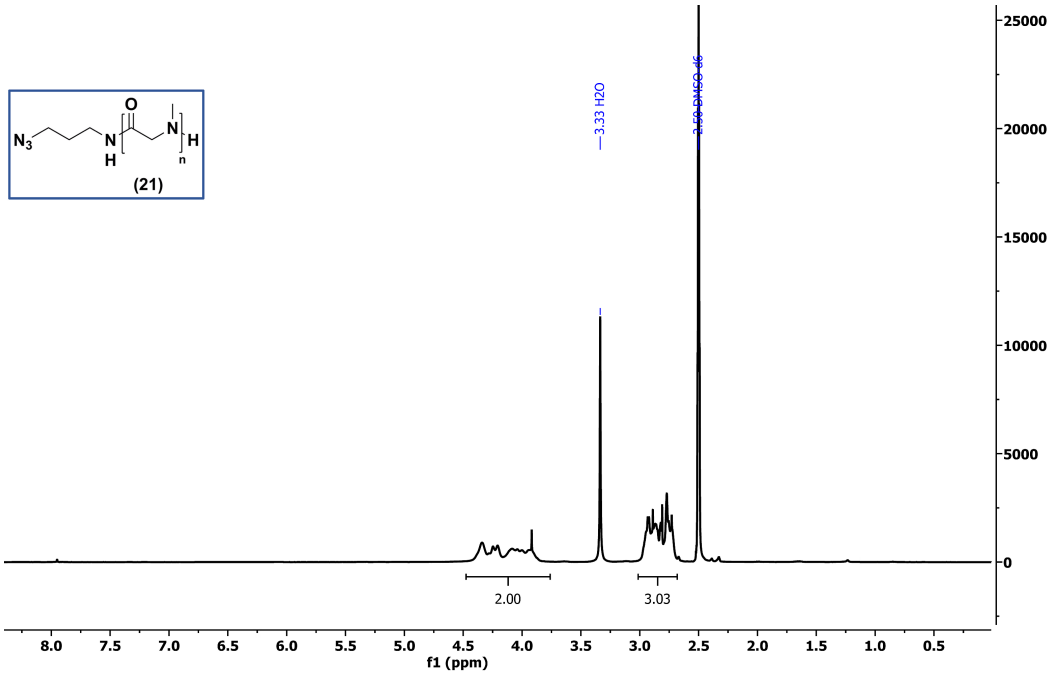

1
5
2
4
3
6
f1 (ppm)
(10)

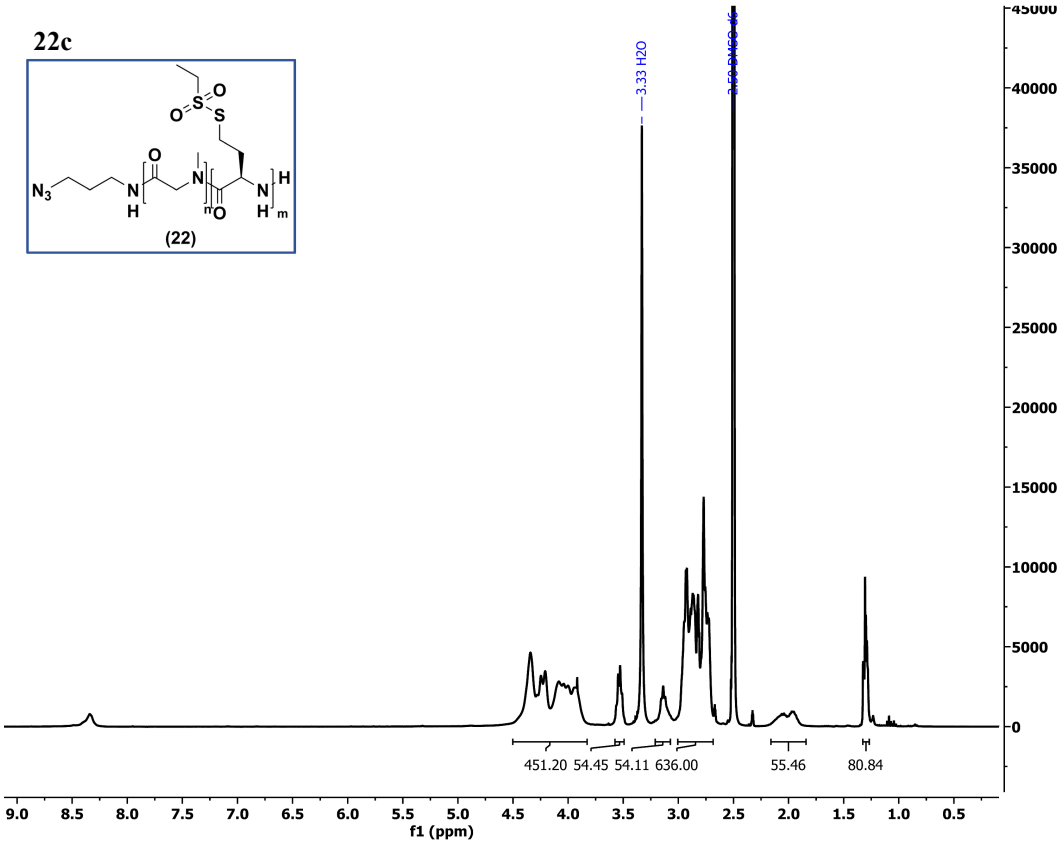

(12)
3.33 H2O
2.50 DMSO-d6
1
2
3
4
5
6
1.00
1.05
2.24
2.21
2.23
3.37
f1 (ppm)


(12)
39.52 DMSO-d6
8
7
5
2
3
4
6
f1 (ppm)

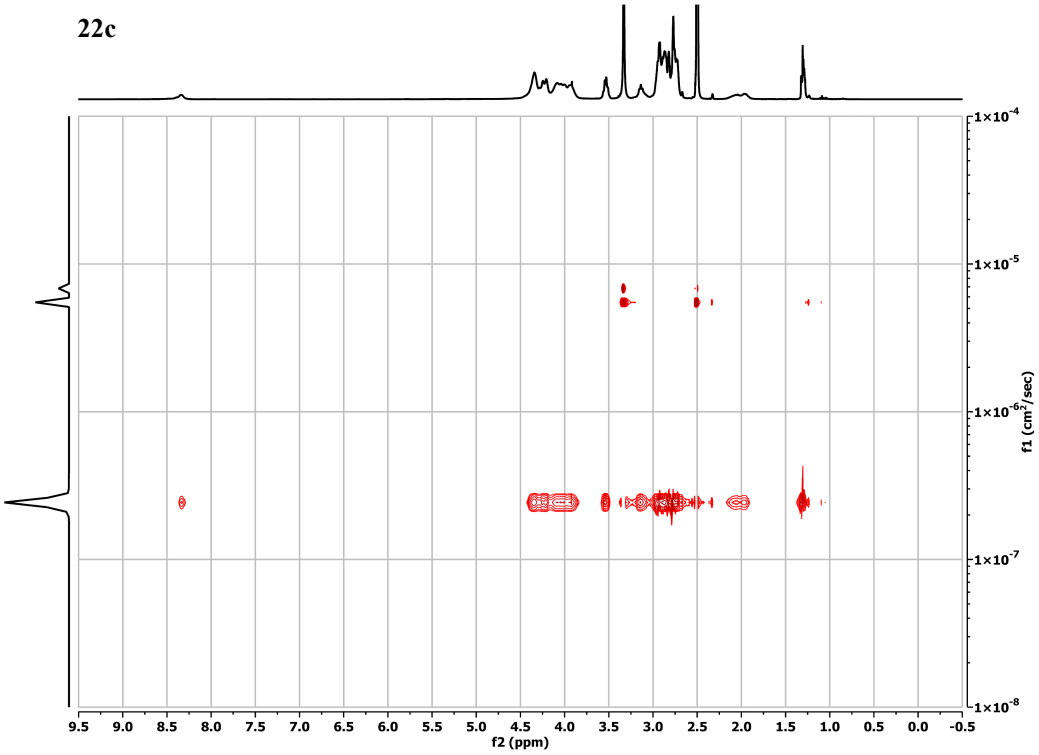

1 a
(18)
BOC
NH
3.34 H2O
2.59 DMSO-d6
42.98
676.00
f1 (ppm)


1 a
(19)
NH2
3.36 H2O
2.50 DMSO-d6
677.00
1002.82
246.85
f1 (ppm)

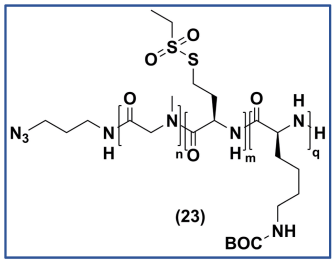

(21)
3.33 H2O
2.00
3.03
f1 (ppm)


22c
(22)
3.33 H2O
451.20 54.45 54.11 636.00 55.46 80.84
f1 (ppm)

22c

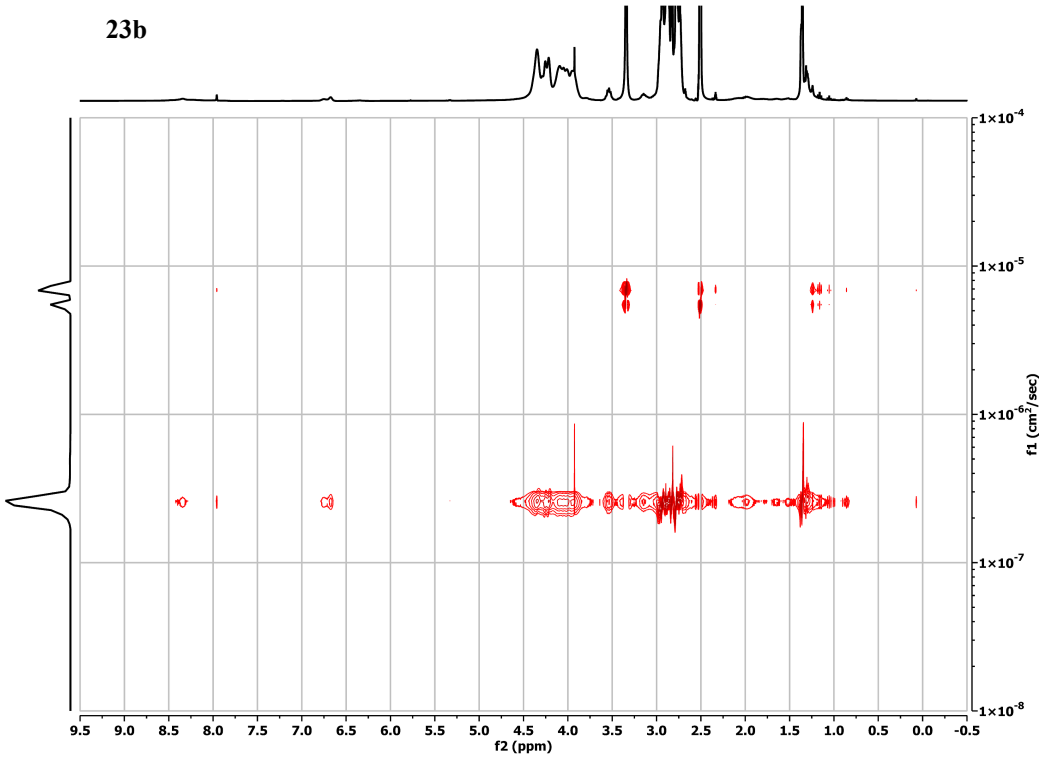

1×10-4
1×10-5
1×10-6
1×10-7
1×10-8
f1 (cm²/sec)
9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 -0.5
f2 (ppm)

23b

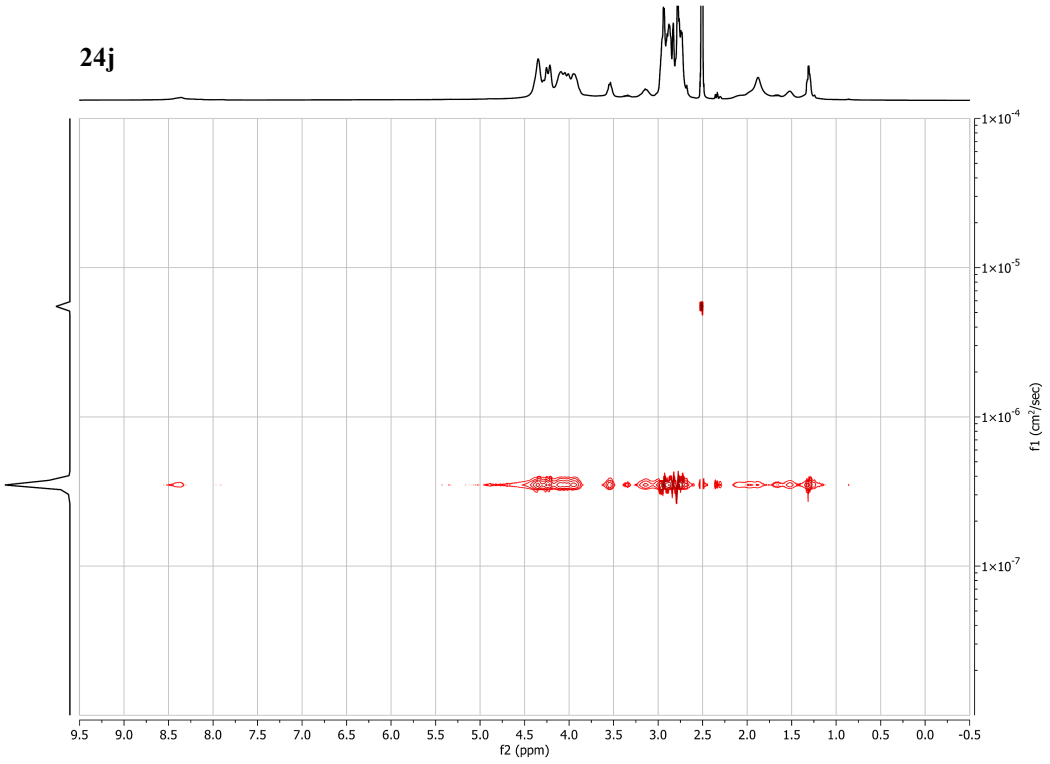

(23)
BOC
NH

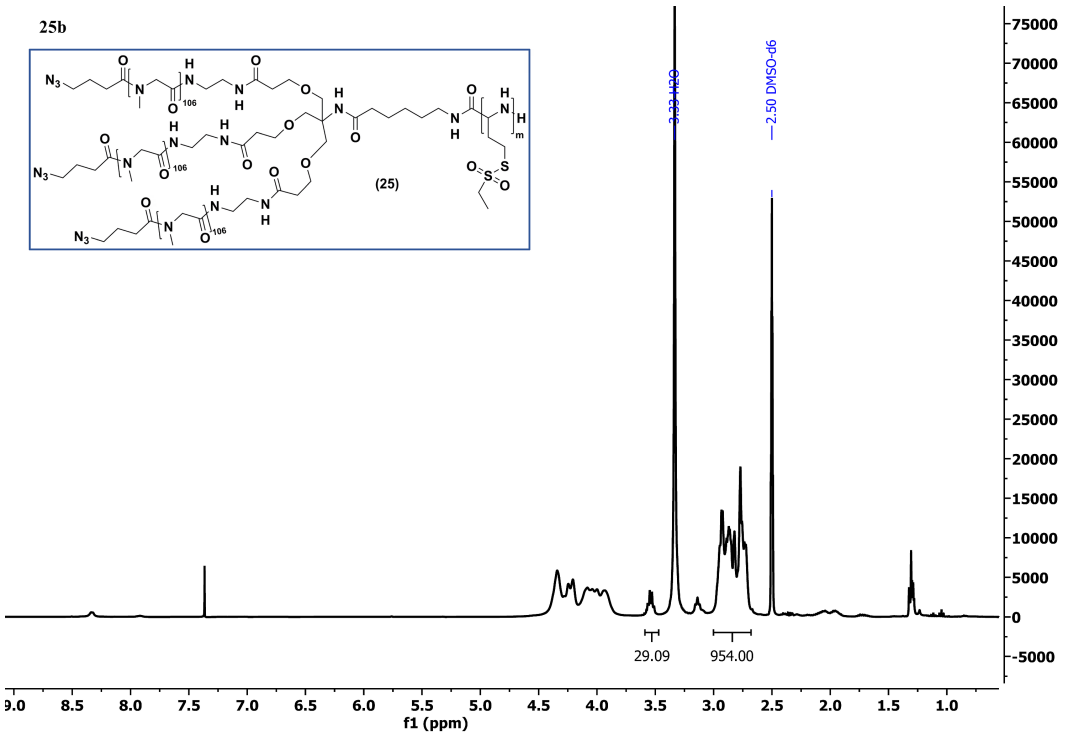
3.34 PPM
3.50 PPM
8000 7500 7000 6500 6000 5500 5000 4500 4000 3500 3000 2500 2000 1500 1000 500 0 -500
21.36
38.00
37.98
9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5
f1 (ppm)

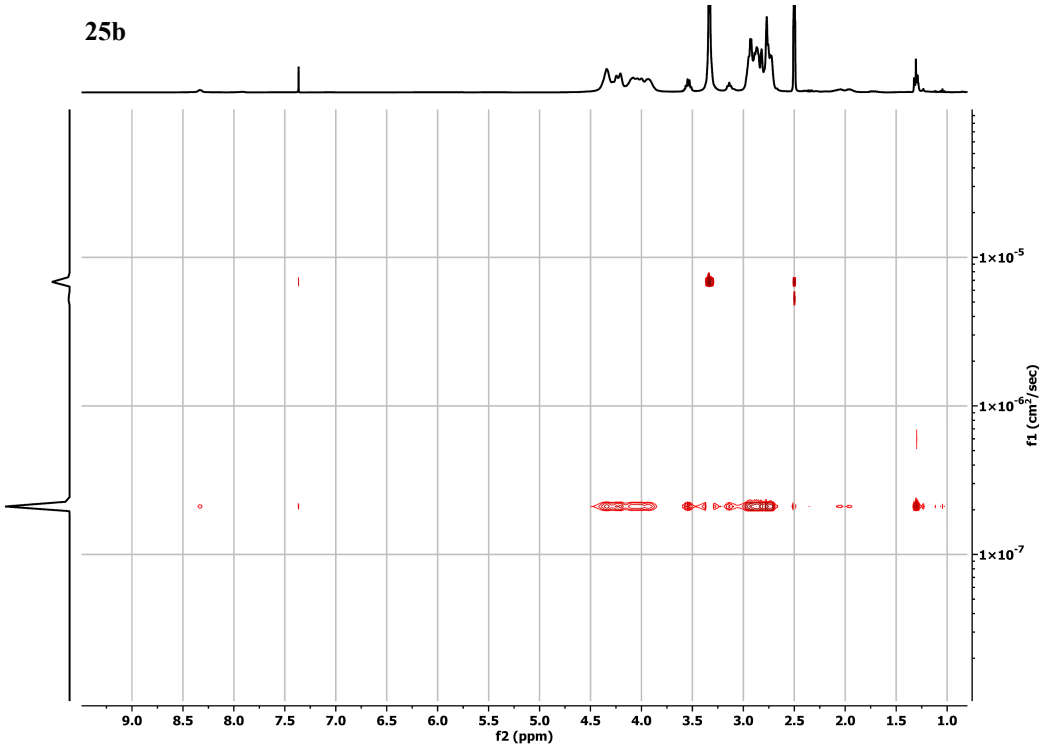
23b

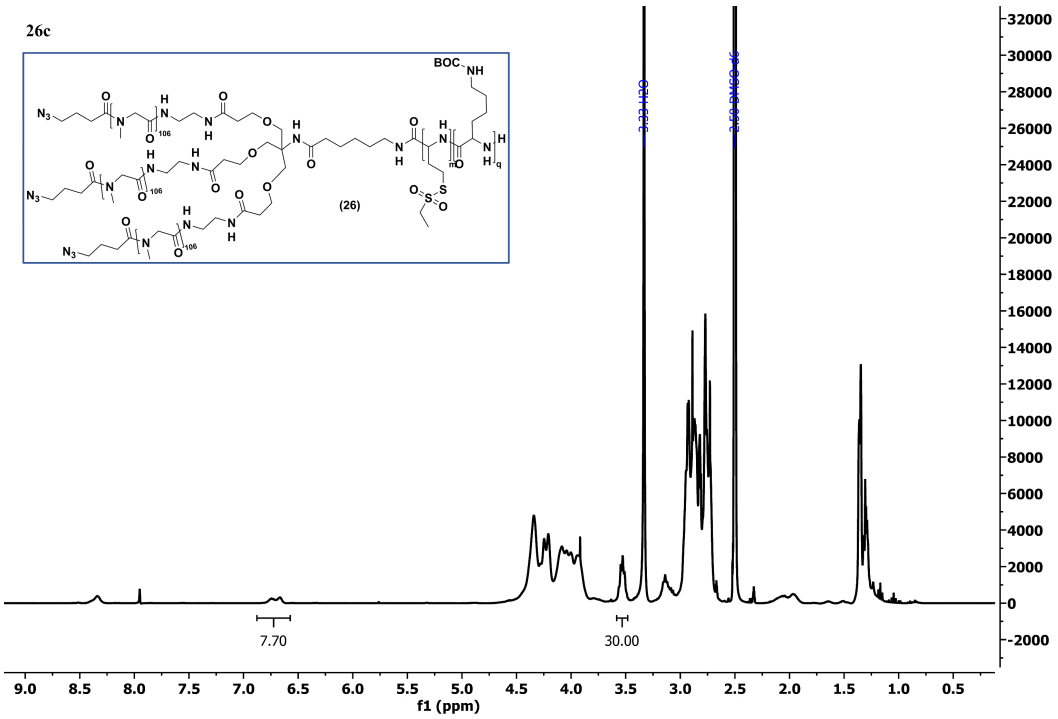

1×10-4
1×10-5
1×10-6
1×10-7
1×10-8
f1 (cm²/sec)
9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 -0.5
f2 (ppm)

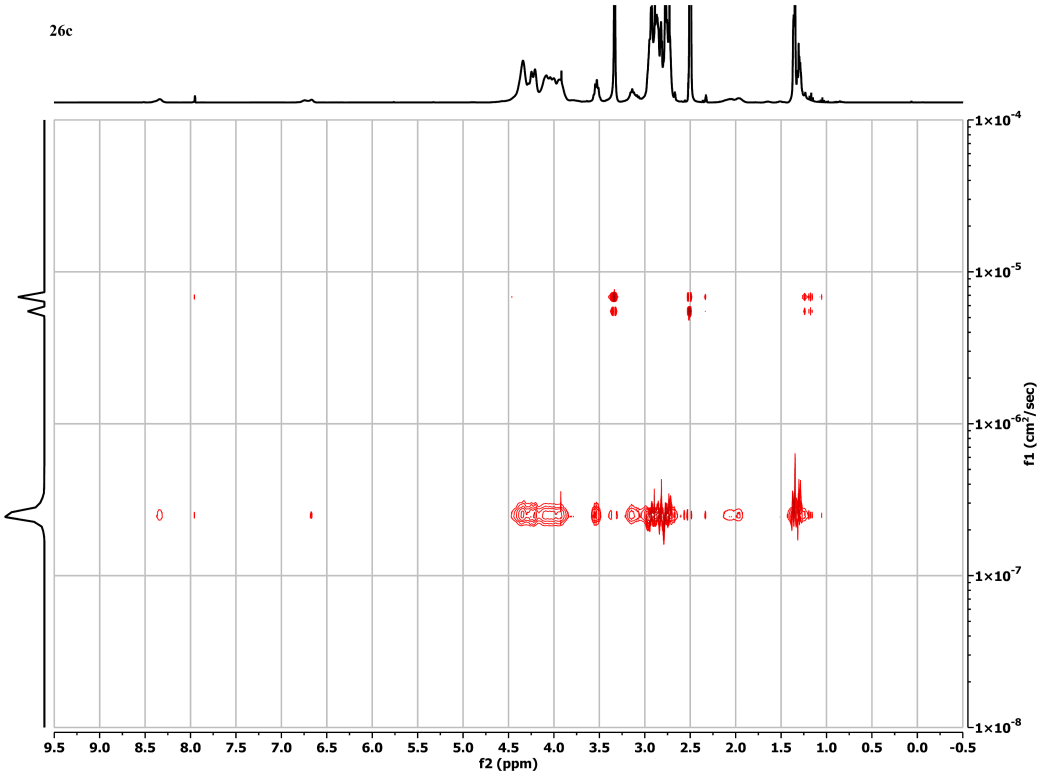
24j

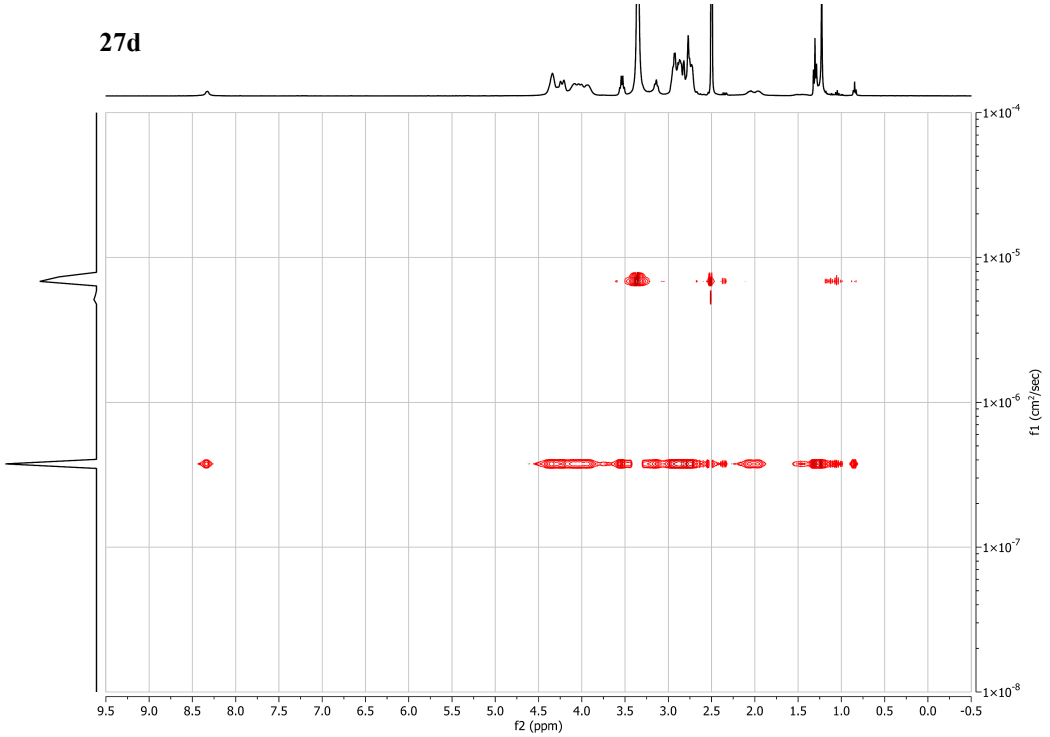

1×10-4
1×10-5
1×10-6
1×10-7
f1 (cm²/sec)
9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 -0.5
f2 (ppm)

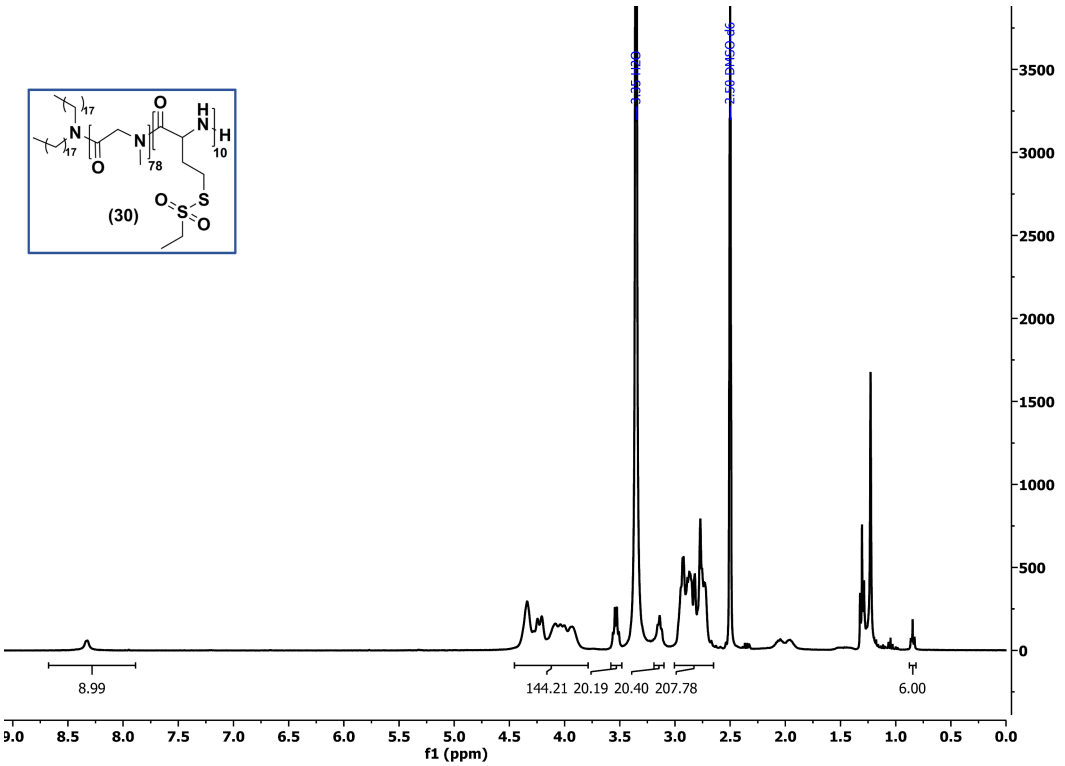

25b
(25)
3.33 H2O
2.50 DMSO-d6
29.09
954.00
f1 (ppm)


25b
f2 (ppm)
f1 (cm²/sec)

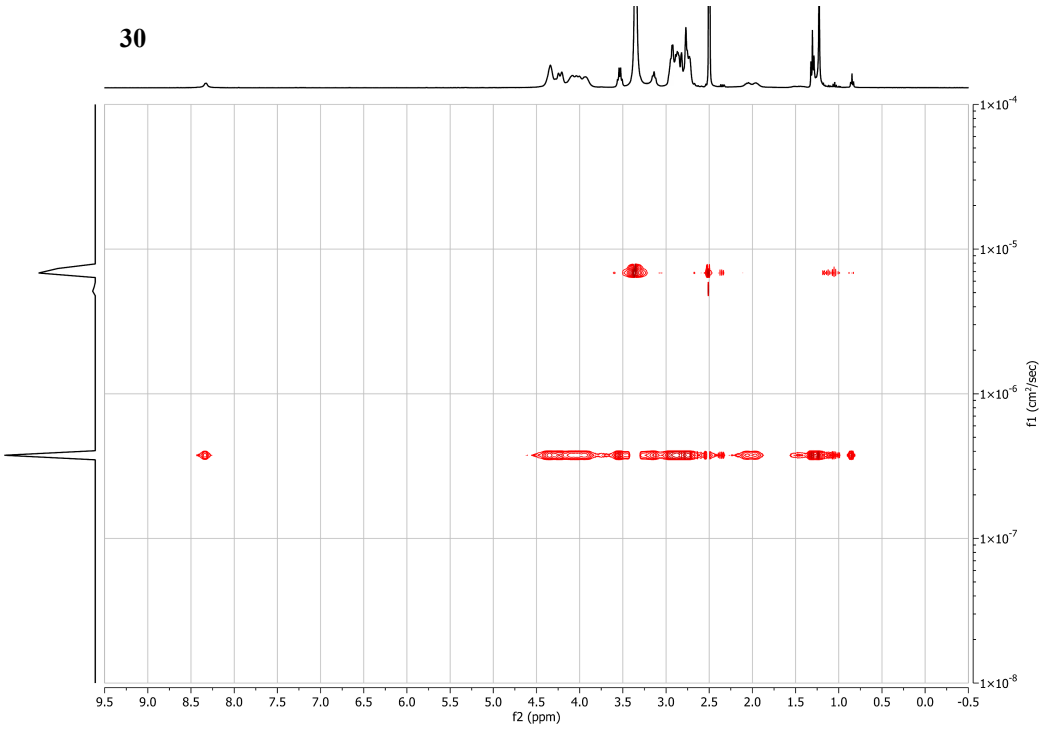

26c
BOC
NH
(26)
7.70
30.00
f1 (ppm)


26c
f1 (cm²/sec)
f2 (ppm)

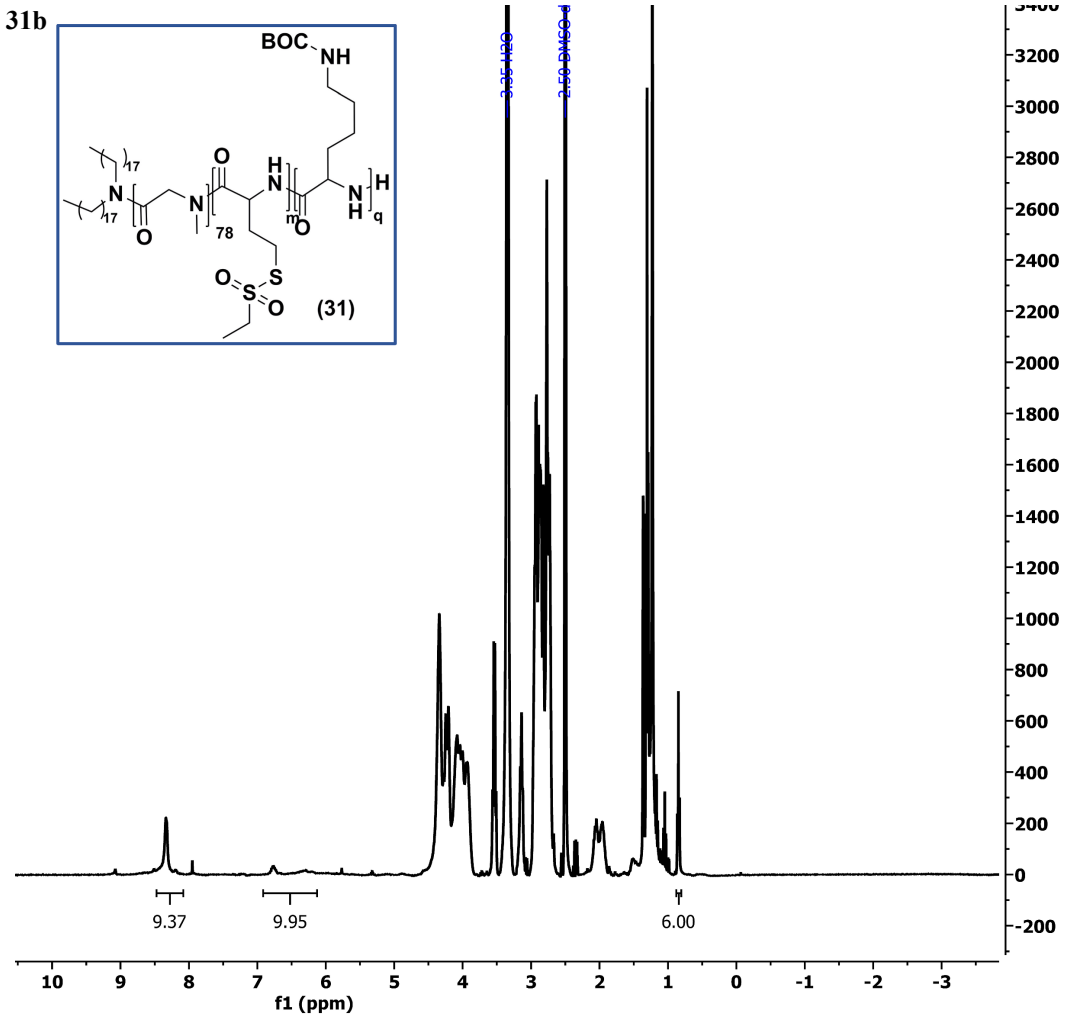

27d
f2 (ppm)
f1 (cm²/sec)


(30)
8.99
144.21
20.19
20.40
207.78
6.00
f1 (ppm)

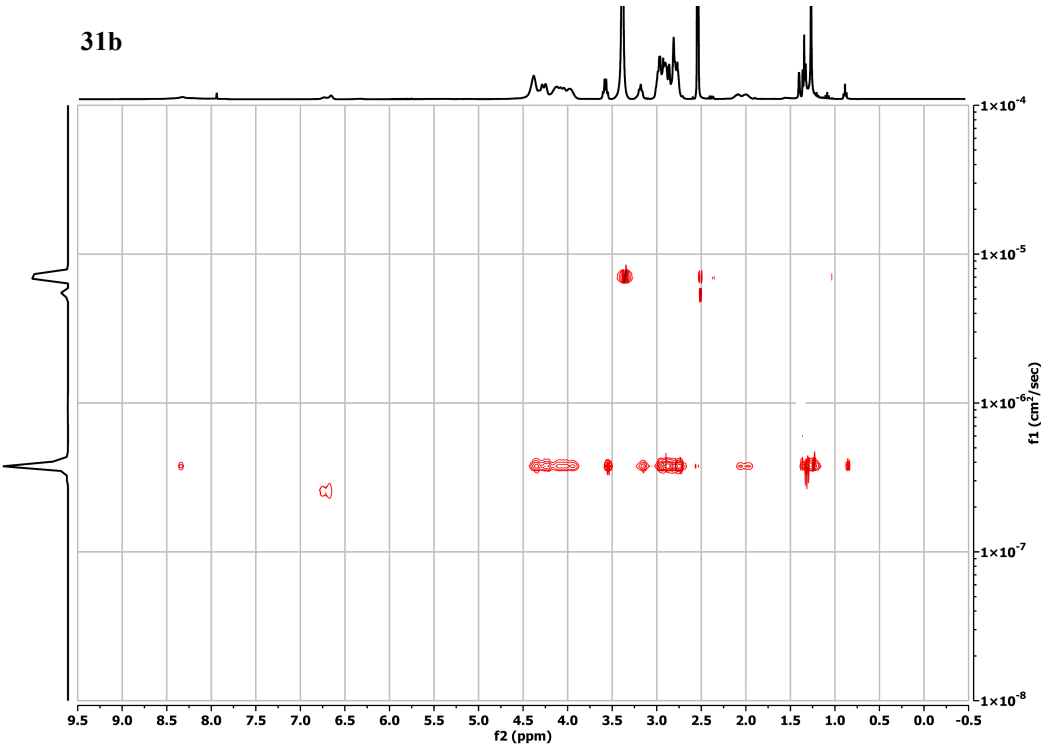
30



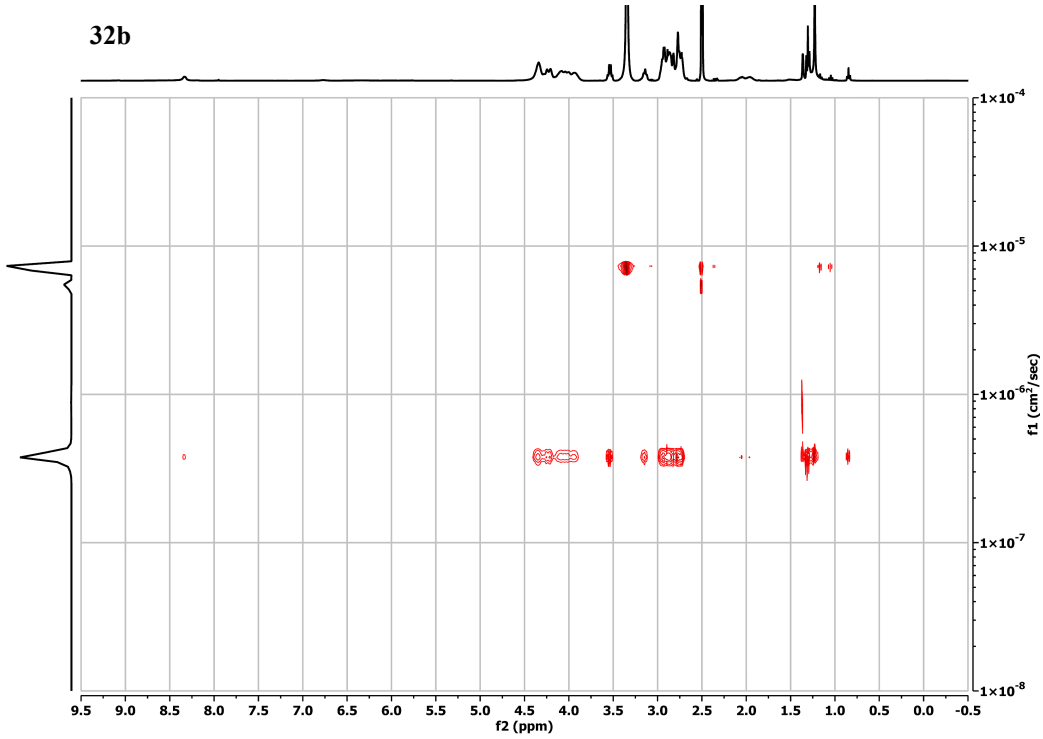
31b



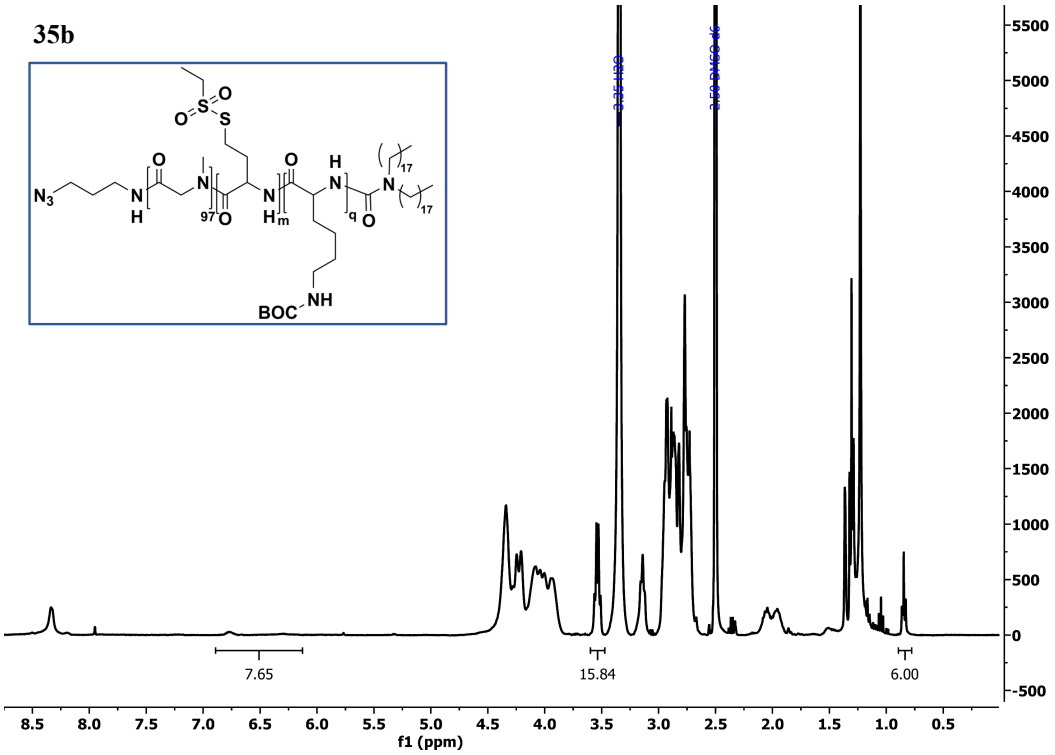
31b


1×10-4
1×10-5
1×10-6
1×10-7
1×10-8
f1 (cm²/sec)
9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 -0.5
f2 (ppm)

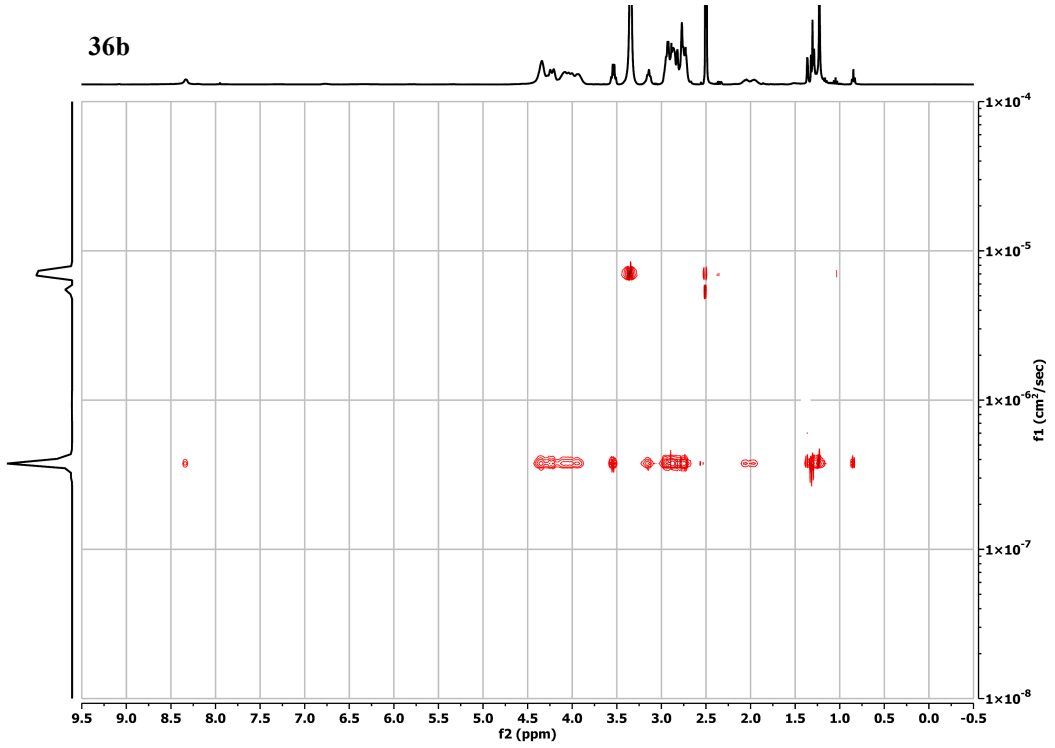
32b


1×10-4
1×10-5
1×10-6
1×10-7
1×10-8
f1 (cm²/sec)
9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 -0.5
f2 (ppm)

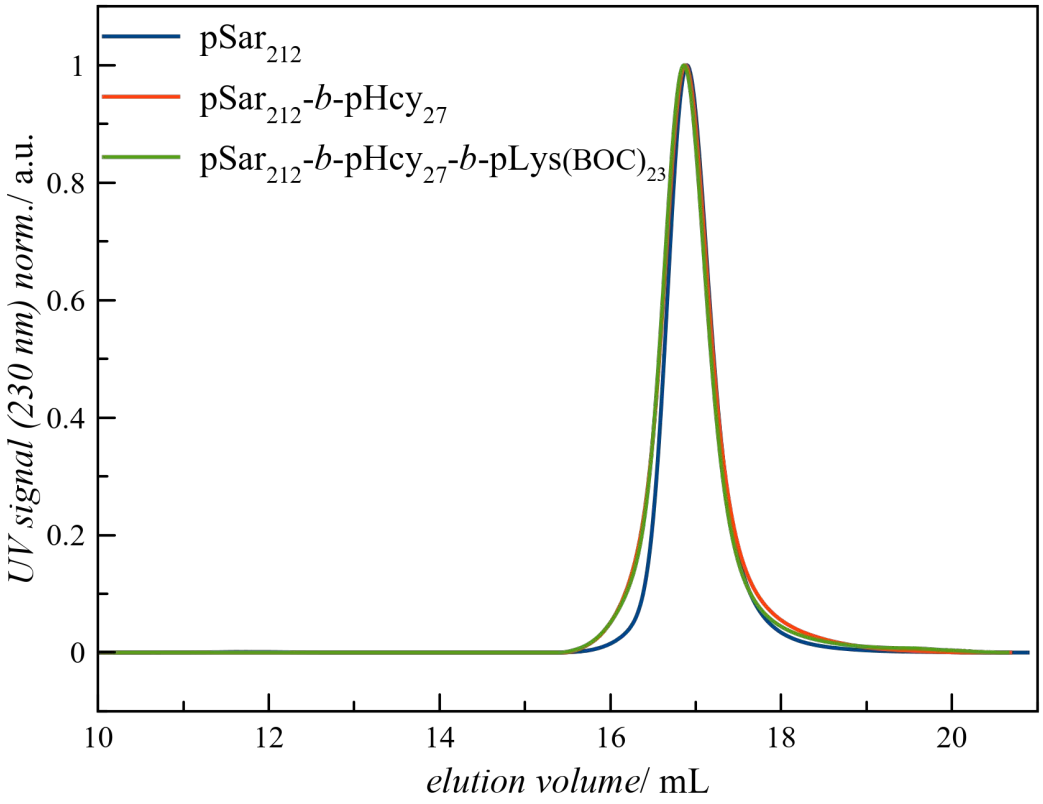
35b

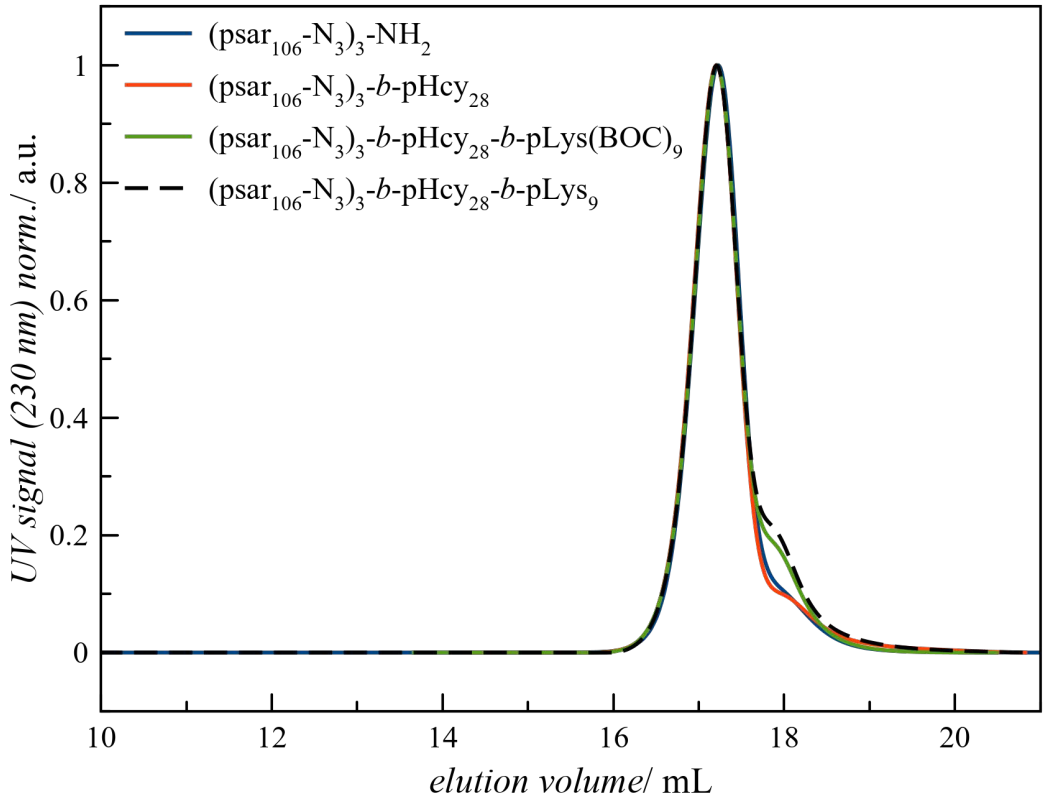


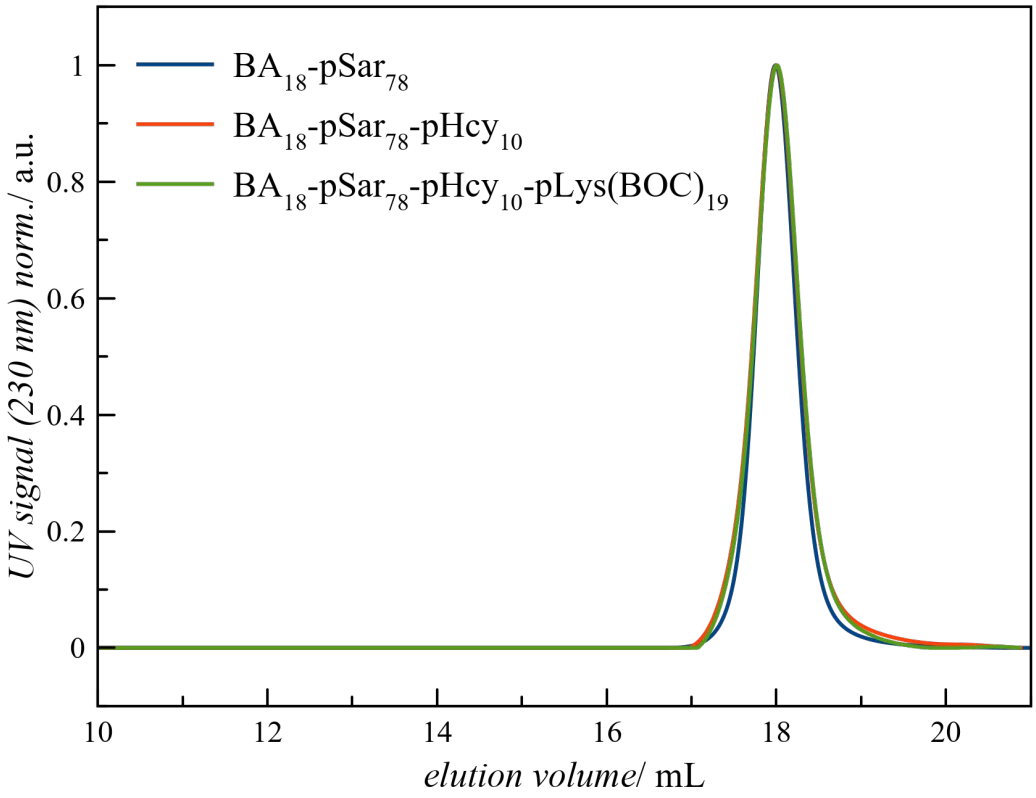
36b



7.2 GPC-Spektren






BA18-pSar78
BA18-pSar78-pHcy10
BA18-pSar78-pHcy10-pLys(BOC)19
UV signal (230 nm) norm./ a.u.
elution volume/ mL
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
10
12
14
16
18
20

Lebenslauf

Liya Heidary Fard

Geburtsdatum	15.09.1986
Geburtsort	Teheran, Iran

Ausbildung

08/2021

Abgabe der Dissertation

12/2016—09/2020

Promotion in der Organischen Chemie/ Makromolekularen Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Titel der Dissertation: „Synthese, Charakterisierung und biologische Evaluation von Polypept(o)id-basierten mRNA- und DNA-Vakzinen“

10/2010—09/2016

Studium der Biomedizinische Chemie an der Universität Mainz

Abschluss: Diplom-Chemikerin (Note: 1.1)

Schwerpunkte: Organische Chemie, Biochemie, Immunologie, Molekulargenetik

Diplomarbeit in der Organischen Chemie zum Thema: „Synthese von Polyplexen aus Triblockcopolypept(o)iden: von

Transfektionsreagenzien zu synthetischen Viren“ (Note: 1.0)

2007—2010

Abitur in Frankfurt an der Bettina-Schule

Bis 12/2003

Bis Oberstufe in Teheran/Iran