

JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ



Polymere Trägersysteme für den Wirkstofftransport

Dissertation

zur Erlangung des Grades

"Doktorin der Naturwissenschaften"

im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Silvia Lucia Rizzelli

geboren in Ludwigshafen

Mainz, 2025

1. Gutachter: [REDACTED]

2. Gutachter: [REDACTED]

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2025

Eigenständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit September 2017 bis April 2022 unter der Betreuung von Herrn [REDACTED] im Department Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen übernommen wurden sind als solche gekennzeichnet.

Mainz, März 2025

Silvia Lucia Rizzelli

Kurzfassung

Ziel dieser Arbeit war es polymerbasierte Trägersysteme herzustellen, die in der Lage sind im Inneren unterschiedliche Substanzen einzuschließen und diese gezielt zu transportieren. Dafür eignen sich besonders Polymersome mit einer dicken hydrophoben Membran und einem wässrigen Kern, sowie kernvernetzte Mizellen mit einem hydrophoben Kern.

Um Polymersome zu bilden wurden Polymere der drei Blockzusammensetzungen P(DHPMA)-*b*-P(LMA), P(DHPMA)-*b*-P(LMA-*stat*-DDEMA) und P(DHPMA)-*b*-P(LMA-*stat*-DDEMA-*stat*-HHMA) hergestellt. Auf Basis von HPMA Polymeren der Zusammensetzung P(HPMA)_x-P(PDSM)_y wurden kernvernetzte Mizellen gebildet. Die Herstellung der Polymere erfolgte mittels RAFT -Polymerisation und einem Reaktivester. Die Aggregation zu Partikeln erfolgte mittels dualer asymmetrischer Zentrifuge. Die vesikulären Partikel wurden hinsichtlich ihres Potentials als Wirkstoffträger hin untersucht, dafür wurden diese mit den Wirkstoffen Doxorubicin und Rapamycin in der dualen asymmetrischen Zentrifuge beladen und die dazugehörigen Beladungseffizienzen ermittelt. Die Aufreinigung erfolgte automatisiert mittels HPLC um saubere Polymersome zu erhalten, die frei von nicht eingeschlossenem Wirkstoff oder nicht assembliertem Polymer sind. Damit bietet die entwickelte Aufreinigungsmethode die Möglichkeit, ein sehr sauberes Partikelsystem zu erhalten welches gleichzeitig automatisierbar, skalierbar und reproduzierbar ist. Somit erfüllt das System wichtige Voraussetzungen hinsichtlich eines späteren Einsatzes als Transportsystem in der Pharmaindustrie. Die mit Doxorubicin beladenen Partikel wurden in Zelltests hinsichtlich Zellaufnahme quantifiziert.

Über die Azid-Endgruppe war es möglich die äußere Hülle der assemblierten Partikel mit Farbstoff oder Biotin zu funktionalisieren. Die Anreicherung solcher farbstoffmarkierten Partikel konnte in Mäusen gezeigt werden.

Es wurde über den Reaktivester Block PFPMA ein Fluoreszenzfarbstoff in das Vorläuferpolymer eingebunden und für die HPMA basierten kernvernetzten Mizellen verwendet. Der PDSM-Block des Polymers ermöglicht eine Kern-Vernetzung der Partikel über Disulfidbrücken. Die Assemblierung der Mizellen erfolgte mittels *solvent switch* Methode (Lösungsmittelaustausch) und über die duale asymmetrische Zentrifuge. Beide Methoden wurden miteinander verglichen.

Abstract

The aim of this thesis was to develop polymer based carrier systems, with the ability to encapsulate various substances on the inside and to deliver them to specific targets.

Polymersomes are particularly suitable for this aim because of their thick hydrophobic membrane and aqueous core. Also suitable are core crosslinked micelles with a hydrophobic core.

In order to assemble polymersomes, polymers of the three different compositions P(PFPMA)-b-P(LMA); P(PFPMA)-b-P(LMA-*stat*-DDEMA) and P(PFPMA)-b-P(LMA-*stat*-DDEMA-*stat*-HHMA) were synthesized. HPMA based polymers of the composition P(HPMA)_x-P(PDSM)_y were used to obtain core crosslinked micelles. The polymers were synthesized via RAFT Polymerization and by using a reactive ester approach. The aggregation into particles was achieved via dual asymmetric centrifuge.

The vesicular particles were examined with regard of being potentially carrier systems. Therefore the particles were loaded with the drugs Doxorubicin and Rapamycin via dual asymmetric centrifugation and the loading efficiency was determined. Purification was made via HPLC to gain clean polymersomes free of unloaded drug and free polymer. Therefore the developed purification method enables gaining a very pure particle system which can be automated, upscaled and achieves a high degree of reproducibility. Thus the developed carrier system fulfils crucial requirements with regard to a later use as a drug delivery system in the pharmaceutical industry. The Doxorubicin loaded particles were examined in cell tests, to quantify the cell uptake of Doxorubicin.

The azido group at the end of the polymer chain allows a functionalization on the outer layer of the assembled particles. The distribution of the fluorescently labeled particles in the body of mice was investigated.

Using the reactive ester block PFPMA, a fluorescence dye could be incorporated into the polymer and used for the core crosslinked micelles.

The synthesized PDSM block can be crosslinked via disulfide bonds. The micelles have been assembled by solvent switch or via dual asymmetric centrifuge, both methods have been compared.

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1. Polymerisationstechniken	1
1.2. RAFT-Polymerisation.....	1
1.3. Polymeranaloge Reaktionen und Reaktivesterpolymere	6
1.4. Bioorthogonale Reaktionen	8
1.5. „Click“-Chemie	8
1.6. Self Assembly	11
1.7. Amphiphile Blockcopolymere.....	11
1.8. Polymermizellen	12
1.9. Vernetzte Polymermizellen	15
1.10. Vesikuläre Partikel: Liposome & Polymersome	17
1.11. Nanomedizin.....	19
1.12. EPR-Effekt (enhanced permeability and retention effect)	20
1.13. HPMA basierte Nanopartikel	23
2. Motivation und Zielsetzung	24
3. Ergebnisse & Diskussion.....	26
3.1. P(DHPMA)-basierte Blockcopolymere.....	28
3.2. Synthese der Monomere und des Kettentransferreagenzes.....	30
3.2.1. Synthese des Pentafluorphenylmethacrylats (PFPMA)	30
3.2.2. Synthese des Ketal Monomers 2-(2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethylmethacrylat (DDEMA)	32
3.2.3. Synthese des Monomers Hydroxyhexylmethacrylat (HHMA)	33
3.2.4. Synthese des Azid-funktionalisierten Kettentransferreagenz 1-Azido-25-cyano-22-oxo-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxa-24-azaheptacosan-28-yl-benzodithioat (Azid-CTA)	34
3.3. RAFT-Polymerisation.....	37
3.3.1. RAFT-Polymerisation von P(PFPMA).....	37
3.3.2. RAFT-Polymerisation der Laurylmethacrylat Diblockcopolymere	43
3.3.3. Statistische RAFT-Polymerisation von LMA und DDEMA Monomeren als zweiten Block.....	46

3.3.4. Statistische RAFT-Polymerisation der LMA, DDEMA und HHMA Monomeren als zweiten Block	50
3.3.5. Entfernung der Dithiobenzoat-Endgruppe des Azid-CTAs.....	54
3.3.6. Polymeranaloge Umsetzung zu $P(DHPMA)_x-b-P(LMA)_y$	55
3.3.7. Polymeranaloge Umsetzung zu $P(DHPMA)_x-b-P(LMA_y-stat-DDEMA_z)$	56
3.3.8. Polymeranaloge Umsetzung zu $P(DHPMA)_x-b-P(LMA_y-stat-DDEMA_z-stat-HHMA_w)$	60
3.4. Assemblierung zu Polymersomen mittels dualer asymmetrischer Zentrifuge....	62
3.5. Aufreinigung der erhaltenen Aggregate mittels HPLC	63
3.6. Charakterisierung der erhaltenen Aggregate.....	71
3.7. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der hergestellten Partikel	73
3.8. Beladung der Polymersome	75
3.9. Beladung mit Doxorubicin.....	75
3.9.1. Einschlusseffizienz von Doxorubicin.....	76
3.9.2. Zellversuche mit Doxorubicin beladenen Polymersomen	79
3.10. Beladung von Polymersomen mit Rapamycin	86
3.11. Beladung von Polymersomen mit siRNA.....	88
3.11.1. Luciferase Assay zur Bestimmung der Transfektion.....	88
3.11.2. MTT-Assay zur Bestimmung der Transfektion.....	90
3.12. Beladung der Polymersome mit TNF-Alpha	91
3.13. Adressierung der Azid Endgruppe zur Funktionalisierung von Aggregaten....	92
3.14. Körperverteilung von Polymersomen mit Cw800 Markierung über das Azid ...	92
3.14.1. Quantifizierung der Menge an siRNA pro Polymersom	95
3.14.2. Funktionalisierung der Polymersome mit Biotin	98
3.15. Herstellung von Polymeren zur Bildung von Mizellen.....	101
3.16. Synthese des Monomers Methacrylsäure-2-(2-pyridyldisulfid)ethylester (PDSM).....	103
3.17. Synthese der Diblockpolymere	105
3.17.1. Synthese Homoblock PFPMA	105
3.17.2. Polymerisation von $P(PFPMA)_x-b-P(PDSM)_y$	106
3.17.3. Entfernen der Dithiobenzoatgruppe.....	111
3.17.4. Polymeranaloge Umsetzung mit 2-Hydroxypropylamin	113
3.17.5. Polymeranaloge Umsetzung mit Farbstoff.....	116

3.18. Aggregation zu Mizellen	117
3.18.1. Assemblierung der P(HPMA) _x -b-P(PDSM) _y Polymere über <i>solvent switch</i>	117
3.18.2. Assemblierung der Mizellen mittels dualer asymmetrischer Zentrifuge	120
3.19. Vernetzung der Mizellen über Disulfidgruppen	123
3.20. Stabilität der vernetzten Mizellen gegenüber Gefriertrocknung	126
3.21. Lagerungsstabilität der vernetzten Mizellen	128
3.22. Einschluss des hydrophoben Farbstoffs Nile Red	130
4. Zusammenfassung & Ausblick	133
4.1. Polymersome	133
4.2. Polymermizellen	139
5. Experimentalteil	141
5.1. Materialien	141
5.2. Analytische Methoden & Geräte	142
5.2.1. Kernresonanzspektroskopie (NMR)	142
5.2.2. Gelpermentationschromatographie (GPC)	142
5.2.3. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) zur Aufreinigung der Partikel	143
5.2.4. Analytische HPLC zur Bestimmung der Wirkstoffkonzentration	143
5.2.5. UV-Vis Messungen	143
5.2.6. Plate Reader	144
5.2.7. Duale asymmetrische Zentrifuge	144
5.2.8. Dynamische Lichtstreuung (Zetasizer)	144
5.2.9. Transmissonselektronenmikroskopie (TEM)	144
5.3. Monomersynthesen	145
5.3.1. Pentafluorphenylmethacrylat	145
5.3.2. Hydroxyethylpyridyldisulfid (HPDS)	146
5.3.3. Pyridyldisulfidethylmethacrylat (PDSM)	147
5.3.4. 2-(2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethylmethacrylat (DDEMA)	148
5.3.5. 6-(Hydroxyhexyl)methacrylat (HHMA)	149
5.4. Synthese des Kettentransferreagenz	150
5.4.1. 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)-sulfanyl)-pentansäure-pentafluorphenylester (PFP-Aktivester-CTA)	150

5.4.2. 1-Azido-25-cyano-22-oxo-3,6,9,12,15,18,21-hepta-oxa-24-azaheptacosan-28-yl-benzodithioat (Azid-CTA).....	151
5.5. RAFT-Polymerisationen.....	152
5.5.1. Poly(Pentafluorophenylmethacrylat) P(PFPMA).....	152
5.5.2. P(PFPMA) _x - <i>b</i> -P(LMA) _y	154
5.5.3. P(DHPMA) _x - <i>b</i> -P(LMA _y - <i>stat</i> -DDEMA _z).....	156
5.5.4. P(DHPMA) _x - <i>b</i> -P(LMA _y - <i>stat</i> -DDEMA _z - <i>stat</i> -HHMA _w)	158
5.5.5. Entfernen der Dithioestergruppe.....	159
5.5.6. Polymeranaloge Umsetzung der Polymere	160
5.5.7. P(PFPMA) _x - <i>b</i> -P(PDSM) _y	161
5.5.8. Entfernen der Dithioestergruppe der P(PFPMA) _x - <i>b</i> -P(PDSM) _y Polymere.....	162
5.5.9. Polymeranaloge Umsetzung der PFPMA-Einheiten zu P(HPMA)	163
6. Anhang	164
6.1. Literaturverzeichnis	164
6.2. Abbildungsverzeichnis.....	179
6.3. Tabellenverzeichnis.....	186
6.4. Abkürzungsverzeichnis.....	188

1. Einleitung

1.1. Polymerisationstechniken

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Polymere mittels *reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization* (radikalischer RAFT-Polymerisation) hergestellt und verwendet. Es wurden sowohl Poly(N-(2-hydroxypropyl)methacrylat) (P(HPMA)) als auch Poly(N-(2,3-dihydroxypropyl)methacrylat) (P(DHPMA)) basierte Polymere synthetisiert. Dabei erfolgte die Polymerisation in einem ersten Schritt über den Reaktivesteransatz unter Verwendung von Pentafluorphenylmethacrylat (PFPMA).

1.2. RAFT-Polymerisation

Die radikalische Polymerisation wird sowohl in der Synthese von Polymeren im Labor als auch im industriellen Maßstab viel eingesetzt. In einem großen Teil der kommerziellen Produktion von Polymeren findet radikalische Polymerisation Verwendung. Einer der großen Vorteile dieser Polymerisationsart ist, dass es keine komplexen Ansprüche an die Reaktionsbedingungen gibt und die Reaktion im wässrigen Medium durchgeführt werden kann. Im Gegensatz zur ionischen Polymerisation oder der koordinativen Insertionspolymerisation beeinflussen sogar Verunreinigungen, wie beispielsweise Stabilisatoren, geringe Spuren von Sauerstoff sowie der Einsatz von nicht getrockneten Lösungsmitteln, die Synthese nicht.¹ Zusammenfassend liegen die Stärken der radikalischen Polymerisation darin, dass eine großen Varianz an Monomeren wie (Meth)acrylaten, (Meth)acrylamiden, Acrylonitrilen, Styrenen, Dienen und Vinylmonomeren verwendet werden können. Zudem toleriert diese Art der Polymerisation den Einsatz von Monomeren und Lösungsmitteln mit ungeschützten Funktionalitäten wie OH, NR₂, COOH, CONR₂ und SO₃H. Die einfache Durchführung und die geringen Kosten begründen die vorherrschende Rolle der radikalischen Polymerisation in der Industrie.

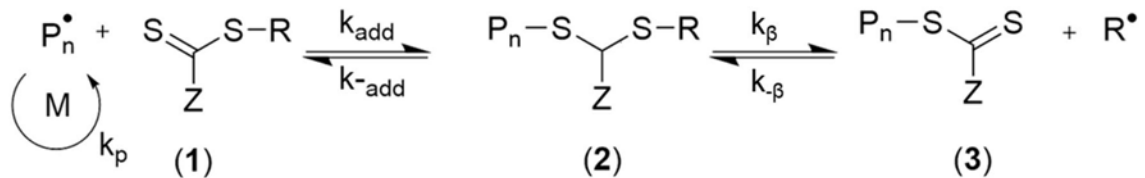
Die einfachste Form der radikalischen Polymerisation, die freie radikalische Reaktion, ist hinsichtlich ihrer Molekulargewichtsverteilung, Copolymer Zusammensetzung und makromolekularer Eigenschaften limitiert.² Mit dem Einsatz von kontrollierter/lebender radikalischer Polymerisation (CLRP), auch unter dem Namen *reversible deactivation radical polymerization* (RDRP) bekannt, können diese Defizite behoben werden.^{3,4} Durch die Verwendung dieser Varianten der radikalischen Polymerisation, ist es möglich, die Kontrolle über Molekulargewicht und Polydispersität ($\bar{M}_w/\bar{M}_n$) zu erlangen und so maßgeschneiderte Makromoleküle herzustellen.⁵ Zu den kontrollierten radikalischen Polymerisationen zählen neben der *nitroxide-mediated polymerization* (NMP-Polymerisation)⁶ und der *atom-transfer polymerization* (ATRP-Polymerisation),⁷ die von Rizzardo et al. entwickelte RAFT-Polymerisation.⁸ Diesen Techniken liegt ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der aktiv wachsenden Kette und einer schlafenden beziehungsweise inaktiven Kette während der Polymerisation zugrunde. Spezifische Vorteile der RAFT-Polymerisation liegen in ihrer Kompatibilität zu einer großen Anzahl an Funktionalitäten von Monomeren wie Säuren, Salze der Säuren, Hydroxylgruppen und tertiären Aminen. Die bei der Polymerisation erhaltenen Makromoleküle weisen ein definiertes Molekulargewicht und eine enge Molekulargewichtsverteilung (Polydispersität ($\bar{M}_w/\bar{M}_n$) <1,2) auf.^{8,9} Der Mechanismus der RAFT-Polymerisation basiert auf einer Abfolge von reversiblen Additions- und Fragmentierungsschritten, die ein dynamisches Gleichgewicht bilden (Abbildung 1).

Die Schritte der Initiierung und der Radikal-Radikal Terminierung erfolgen analog wie bei der konventionellen Radikalischen Polymerisation. Diazoverbindungen wie Azobis(isobutyronitril) (AIBN) fungieren als Initiatoren, der Zerfall in Radikale erfolgt über thermische oder ähnliche homolytisch spaltbare Stoffe.

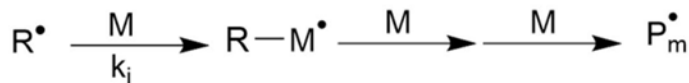
I. Initiierung



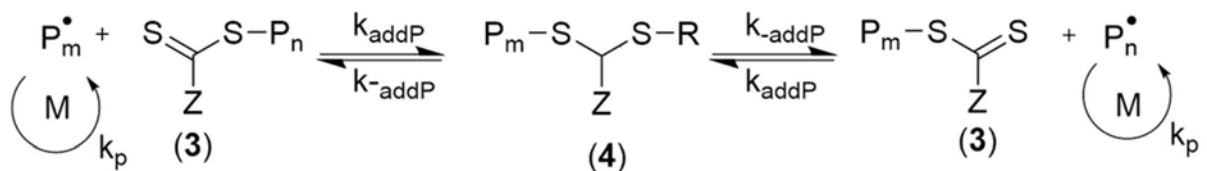
II. Kettenstart (Addition & Fragmentierung)



III. Reinitiierung



IV. Gleichgewicht und Kettenwachstum



V. Terminierung

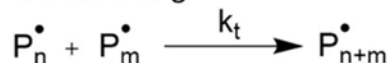


Abbildung 1: Mechanismus der RAFT-Polymerisation nach Rizzardo et al. ⁸

Zu Beginn der Reaktion erfolgt die Addition einer propagierenden Kette mit dem Radikal ($\text{P}_n^\bullet$) an die Thiocarbonylthio-Komponente (1) gefolgt von der Fragmentierung des intermediären Radikals (2) unter Bildung einer wachsenden Polymerkette mit einer Thiocarbonylthio- Gruppe (3) und einem neuen Radikal ($\text{R}^\bullet$). Das so erhaltene Radikal bildet mit weiteren Monomeren eine neue wachsende aktivierte Kette ($\text{P}_m^\bullet$). Dabei herrscht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen einer geringen Konzentration an aktiv wachsenden Polymerketten ($\text{P}_n^\bullet / \text{P}_m^\bullet$) und der in höherer Konzentration vorkommenden reversibel inaktivierten Thiocarbonylthio-Polymerkette („schlafende Spezies“). Wichtig ist dabei die kurze Zeitdauer der Ketteninitiierung im Verhältnis zum Kettenwachstum ($k_i \ll k_p$). Dadurch werden die Ketten annähernd gleichzeitig initiiert und die Wachstumsgeschwindigkeit aller Polymerketten ist nahezu gleich.

So wird eine gleichermaßen große Wahrscheinlichkeit für das Wachstum aller Ketten und somit eine geringe Molekulargewichtsverteilung erreicht. In diesem Fall skaliert das Molekulargewicht linear zum Umsatz der Polymerisation.

Durch eine konstant kleine Radikalkonzentration $[P_n^{\bullet}]$ wird die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Abbruchreaktionen gegenüber der Wachstumsreaktion verringert. Das ist möglich, da die Terminierungsreaktionen quadratisch $[P_n^{\bullet}]^2$ von der Radikalkonzentration abhängen (Kinetik 2. Ordnung). Die Kettenwachstumsreaktionen hingegen hängen direkt proportional von der Radikalkonzentration $[P_n^{\bullet}]$ ab. Am Ende der Polymerisation sind der Großteil der Ketten inaktiv und mit einer Thiocarbonylthio-Endgruppe versehen. Diese verleihen den erhaltenen Polymeren einen quasi lebenden Charakter.

Dadurch ist der Prozess gut dazu geeignet Blockcopolymere herzustellen, da lediglich durch den Zusatz von neuen Monomerverbindungen und einer geringen Menge Initiator das Kettenwachstumsreaktion erneut gestartet werden kann.¹⁰ Ein wesentlicher Faktor der RAFT-Polymerisation ist die Wahl des verwendeten Kettentransferreagenzes (chain transfer agent, CTA). Dafür eignen sich Dithioester, Trithiocarbonate, Xanthane sowie Dithiocarbamate. Das Kettentransferreagenz besteht aus einer Thiocarbonylgruppe und den Resten Z und R, die einen erheblichen Einfluss auf den Ablauf der Polymerisation haben.

Der Rest R muss, um eine Fragmentierung des Radikal-Intermediats (2) zu ermöglichen, die Eigenschaften einer guten Abgangsgruppe aufweisen. Gleichzeitig sollte es in der Lage sein das so entstandene Radikal R zu stabilisieren und eine effektive Reinitiiierung des eingesetzten Monomers zu ermöglichen.

Die Z-Gruppe muss die Doppelbindung der Thiocarbonylgruppe aktivieren und im nächsten Schritt die Stabilität der intermediären Radikale (2) und (4) so beeinflussen, dass es zu einer schnellen Fragmentierung sowie schwachen S-R Bindung kommt. Die Fragmentierung kann entweder zum eingesetzten CTA zurückgehen oder unter Abspaltung des reinitierenden Radikals ($R^{\bullet}$) zur Bildung einer wachsenden Polymerkette mit einer CTA-Endgruppe führen. Dabei ist die homolytische Spaltung der schwachen S-R Bindung die treibende Kraft für die Fragmentierung des Intermediats zur Seite der Produkte (3) ($k_{\beta} \geq k_{\text{add}}$).

Wenn die Spaltung der S-R Bindung langsam ist, hat dies zur Folge, dass es zur Verlangsamung der Polymerisation sowie zur höheren Wahrscheinlichkeit von Nebenreaktionen des Intermediats (Radikal-Radikal Terminierung) kommt.¹¹

Die Wahl des geeigneten CTAs ist abhängig von den eingesetzten Monomeren. Diese können grob in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Zu der Gruppe der reaktiveren Monomere (MAM = more activated monomers) zählen jene, bei denen eine Doppelbindung an ein aromatisches System, einer Carbonylgruppe oder einer Nitrilgruppe konjugiert ist. Zur zweiten Gruppe gehören die weniger aktivierten Monomere (LAM = less activated monomers), hier grenzt die Doppelbindung an einen gesättigten Kohlenstoff oder elektronenziehende Gruppen wie Sauerstoff, Stickstoff oder ein Heteroatom eines Heteroaromatischen Rings. RAFT-Reagenzien wie Dithioester eignen sich besonders zur Polymerisation von reaktiveren Monomeren, hingegen verlangsamen oder gar hemmen sie die Polymerisation von wenig aktiven Monomeren.

Im Falle des aktiveren Methacrylat Monomers Pentafluorphenylmethacrylat (PFPMA) erwies sich der Einsatz eines Dithioesters-CTAs mit Cyanoisopropylgruppe als besonders gut geeignet. Dazu zählen der Säure-CTA 4-Cyano-4((thiobenzoyl)-sulfanyl)-pentansäure und seine Derivate.^{12,13}

Zusammenfassend bietet die RAFT-Polymerisation die Möglichkeit für die Verwendung einer großen Bandbreite an unterschiedlichsten Monomere, abgestimmt auf die jeweiligen Kettentranferreagenzien. Durch das so erhaltene hohe Maß an Kontrolle bei der Polymerisation ist es möglich, Polymere mit definierten Molekulargewichten und geringen Polydispersitäten $\bar{D}$ zu synthetisieren. Durch den Einsatz von RAFT-Polymerisation können definierte Blockcopolymere und endgruppenfunktionalisierte Polymere hergestellt werden. Außerdem ist es möglich, komplexe makomolekulare Architekturen wie Sternpolymere, verzweigte Polymere (Bürsten) oder dendritische Strukturen herzustellen.^{14–16}

Zusätzlich ist es möglich durch den Einsatz der RAFT-Polymerisation reaktive Blockcopolymere herzustellen, die im Anschluss durch polymeranaloge Reaktionen funktionalisiert werden. So können zum Beispiel multifunktionale Poly(acrylamide) erhalten werden oder präzise makroskopischen Eigenschaften beeinflusst werden.¹⁷

1.3. Polymeranaloge Reaktionen und Reaktivesterpolymere

Das Prinzip der polymeranalogen Reaktionen basiert darauf, Monomere zu polymerisieren, welche eine reaktive funktionelle Gruppe besitzen, die unter den eingesetzten Reaktionsbedingungen der Polymerisation inert ist. Diese reaktiven Gruppen können dann nach Abschluss des Polymerisationsprozesses in einem weiteren Syntheseschritt quantitativ mit einer großen Anzahl Reaktanden substituiert werden. Dieser Ansatz ist besonders gewinnbringend, da dieser unter milden Reaktionsbedingungen abläuft, eine hohe Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen aufweist und über eine hohe Selektivität (orthogonale Reaktivität) verfügt.¹⁸ Bereits 1972 schlugen Ringsdorf et al. vor, Polymere aus reaktiven N-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester) herzustellen, da solche Polymere sich gut mit nukleophilen Reagenzien wie beispielsweise Aminen zu Amiden umsetzen lassen.¹⁹ Mittels aktivierten Estern können so Carbonsäuren zu Amiden umgesetzt werden, die im Bereich der Peptidchemie von großer Bedeutung sind. Ein weiterer Vorteil von Modifikationen nach der Polymerisation ist, dass man aus demselben Vorläuferpolymer (Präkursor) unterschiedliche Folgepolymere mit gleicher Blocklänge und unterschiedlichen funktionellen Gruppen erhalten kann. Dadurch können beispielsweise Strukturbeziehungen besser erforscht werden. Oft verwendete Monomere dafür sind N-hydroxysuccinimidacrylat (NHSA) und das Methacrylat Monomer N-hydroxysuccinimidmethacrylat (NHSMA). Hieraus können die Polymere Poly(Nhydroxysuccinimideacrylat) (P(NHSA)) und Poly(N-Hydroxysuccinimidemethacrylat) (P(NHSMA)) erhalten werden. Diese können anschließend, unter milden Bedingungen, durch eine polymeranaloge Reaktion mit Aminen zu funktionalisierten Polyacrylamiden und Polymethacrylamiden umgesetzt werden.

Durch diese Vorgehensweise ist die Herstellung von funktionalen Polymeren zugänglich, die nicht direkt mittels Polymerisation des entsprechenden Acrylamidmonomers erhalten werden können. Oftmals ist es leichter, Amine mit entsprechender funktioneller Gruppe herzustellen, als die korrespondierenden Monomere.^{20,21} Zusätzlich haben NHS-Ester den Vorteil hydrolysestabil zu sein. Diese sind dadurch für Umsetzungen in Wasser, beziehungsweise wässrigem Medium, geeignet. Besonders im Zusammenhang mit biologischen Anwendungen kann dies

von Interesse sein. Nachteilig an NHS-Estern ist ihre begrenzte Löslichkeit, da sie lediglich den Lösungsmitteln Dimethylsulfoxid (DMSO) und Dimethylformamid (DMF) gelöst werden können.¹⁹

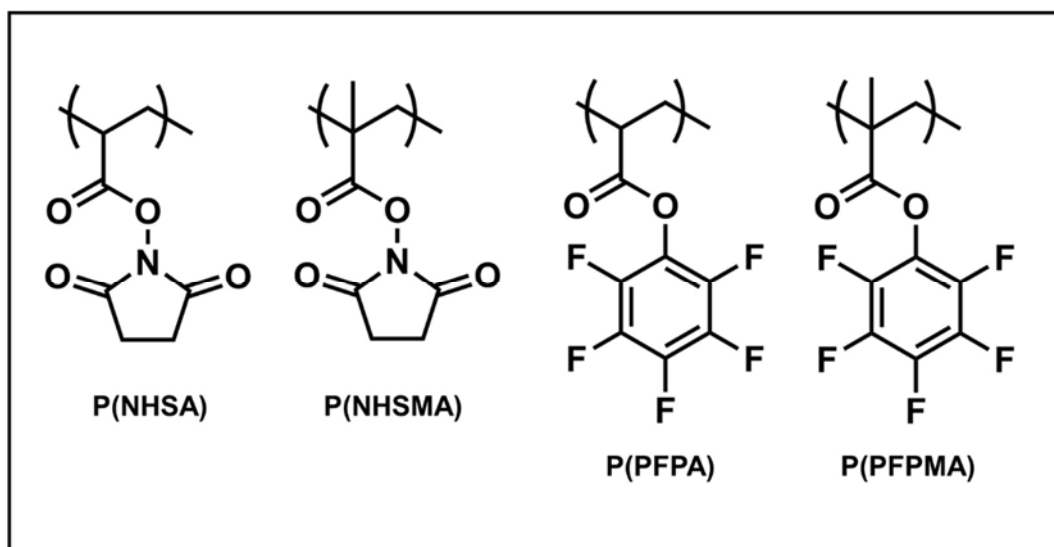


Abbildung 2: Reaktivesterpolymere. Poly(N-hydroxysuccinimideacrylat) P(NHSA); Poly(N-Hydroxysuccinimidemethacrylat) P(NHSMA); Poly(Pentafluorphenylacrylat) P(PFPA); Poly(Pentafluorphenylmethacrylaten) P(PFPMA).

Eine weitere Möglichkeit bieten die auf Pentafluorphenyl basierten Aktivester, welche sich vorteilhaft durch eine verbesserte Löslichkeit der erhaltenen Polymere Poly(Pentafluorphenylmethacrylaten) (P(PFPMA)) auszeichnen. Diese reaktiven Monomere sind in vielen gängigen organischen Lösungsmitteln löslich und lassen sich in Methanol und n-Hexan ausfällen.^{22,23} Damit eignen sich die so erhaltenen P(PFPMA) Polymere für eine große Anzahl unterschiedlicher polymeranaloger Reaktionen. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Umsetzung von PFPMA-Gruppen mittels ¹⁹F-NMR-Spektroskopie nachvollzogen werden kann. Bei der Umsetzung der PFPMA-Gruppen wird Pentafluorphenol freigesetzt. Dabei ist eine Veränderung im ¹⁹F-NMR-Spektrum bei den chemischen Verschiebungen zwischen den freigesetzten Pentafluorphenolgruppen und den gebundenen PFPMA-Gruppen deutlich erkennbar und dadurch der Reaktionsumsatz nachvollziehbar.¹³

Auf der Basis der kontrollierten RAFT-Polymerisation in Kombination mit dem P(PFPMA) Reaktivester werden in dieser Arbeit Polymere definierter Kettenlängen mit schmaler Molekulargewichtsverteilung hergestellt. Die so erhaltenen Polymere dienen

als Vorläuferpolymere für unterschiedliche polymeranaloge Reaktionen, die zu Poly(N-(2-hydroxypropyl)methacrylamid (P(HPMA) und Poly(2,3-Dihydroxypropylmethacrylamid) (P(DHPMA)) Blockcopolymere führen. Auf HPMA und DHPMA basierte Polymere finden aufgrund ihrer biokompatiblen und hydrophilen Eigenschaften Einsatz in medizinischen Anwendungen.^{24–26}

1.4. Bioorthogonale Reaktionen

Molekulare Besonderheiten biologischer Prozesse können am zuverlässigsten untersucht werden, indem man die Biomoleküle von Interesse in ihrer nativen Umgebung, also in Zellen oder noch besser in lebenden Organismen untersucht. Dafür finden in diesem Bereich vor allem sogenannte Bioorthogonale Reaktionen Verwendung. Unter Bioorthogonal, versteht man Reaktionen bei denen die eingesetzten funktionellen Gruppen sehr selektiv, schnell, in wässrigem Medium, bei biokompatiblen pH und Temperatur umgesetzt werden. Zusätzlich dürfen diese, falls in Zell- oder Tierversuchen eingesetzt, nicht toxisch sein.²⁷ Zu den Bioorthogonalen Reaktionen zählen die sogenannten „Click“-Reaktionen. Sie eignen sich hervorragend zur selektiven Markierung von Biomolekülen, da sie zu hohen Umsätzen führen.

1.5. „Click“-Chemie

Sharpless, Finn und Kolb führten 2001 den Begriff der „Click“-Chemie ein, ein neues Konzept in der chemischen Synthese zur Ligation von Molekülen. Die Idee besteht darin, zwei Moleküle nach dem Prinzip zweier Verschlüsse kovalent zu binden. Es kommt bei Annäherung dieser zwei Enden zu einer Bindung. Ziel ist es, auf simple, schnelle und effiziente Weise eine große Substanzbibliothek aufbauen zu können. Für die Einordnung von „Click“-Reaktionen werden folgende Kriterien genannt: Sie sollen modular sein und für viele Anwendungsbereiche geeignet sein. Die Reaktionen sollen in hohen Umsätzen, unter einfachen Reaktionsbedingungen und stereospezifisch ablaufen. Zusätzlich sollen die verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel (vorzugsweise Wasser) leicht zu erhalten, lagerstabil und gut zu entfernen sein. Eventuell anfallende Nebenprodukte sollen mittels Kristallisation oder Destillation

leicht abgetrennt werden können, sodass das Produkt einfach in hoher Reinheit erhalten werden kann.

Das auf diese Weise erhaltene Produkt soll bei physiologischen Bedingungen stabil sein.^{28,29} Um diese Kriterien zu erfüllen, werden Reaktionen benötigt, die hoch selektiv Modifikationen an einem Molekül durchführen können, ohne dabei zu Nebenreaktionen und unspezifischen Bindungen zu führen.³⁰ Die dafür geeigneten Reaktionen zeichnen sich durch schnelle und hohe Umsätze bei Raumtemperatur aus und führen zu einem spezifischen Produkt. Benötigt werden somit Reaktionen mit einer hohen thermodynamischen Triebkraft bei gleichzeitig hoher Selektivität und Spezifität gegenüber einer funktionellen Gruppe.

Aus den oben genannten Gründen findet die Azid-Gruppe für diese Reaktionen oftmals Verwendung. Sie besitzt als weiches Elektrophil oder 1,3-Dipol einerseits eine hohe Reaktivität und ist dabei gleichzeitig sehr selektiv hinsichtlich ihrer Reaktionspartner (Dienophile). Zusätzlich ist die Azid-Gruppe klein, stabil in Wasser und unreaktiv in biologischen Proben. Die Basis der Azid-Alkin basierten Click-Reaktionen bildet die von Huisgen beschriebene 1,3-Dipolare Cycloaddition zur Bildung von fünfgliedrigen Heterocyclen.³¹ Im Jahr 2002 veröffentlichten die Gruppen von M. Medal sowie V.V. Fokin und K.B. Sharpless die ersten Berichte über Kupfer katalysierte Azid-Alkin Cycloadditionen.^{32–34}

Die bisher bekannten thermischen Azid-Alkin Cycloadditionen führten zu Mischungen aus Regioisomeren.³⁶ Im Gegensatz dazu liefern die Kupfer(I) katalysierten Reaktionen regio- und chemoselektiv das 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazolderivat.²⁹ Diese Weiterentwicklung der Azid-Alkin Cycloaddition ist besonders vorteilhaft zur selektiven Kupplung von Molekülen unter physiologischen Bedingungen in komplexen biologischen Systemen.

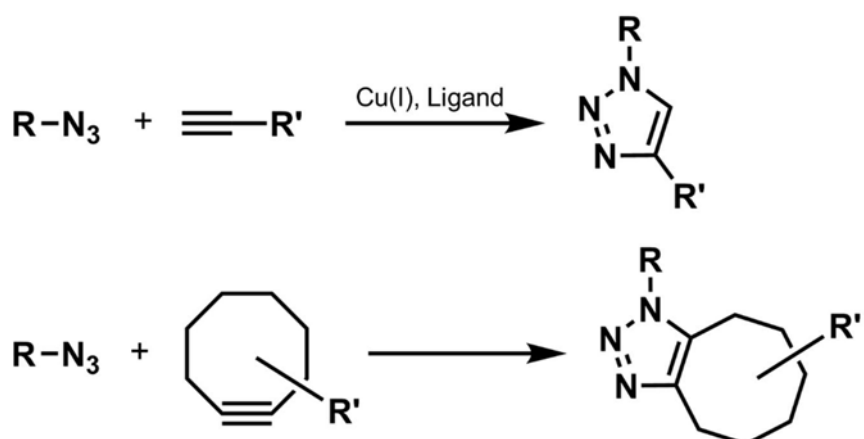


Abbildung 3: Kupfer katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition. "*c promoted [3+2] Azide-Alkyne Cycloaddition*" (SPAAC): Kupferfreie Azid-Alkin Cycloaddition getrieben von der Ringspannung.³⁵

Auf Basis dessen wurden beispielsweise fluoreszierende Reagenzien für biologische Markierungen hergestellt.³⁷ Die Kupfer katalysierte Kupplung eignet sich primär in biologischen Studien für den *in vitro* Einsatz. Allerdings wäre eine Anwendung in *in vivo* Systemen aufgrund des benötigten Kupferkatalysators herausfordernd. Dafür müsste der Katalysator ebenfalls an den Reaktionsort gelangen, zusätzlich ist die potentielle Toxizität von Kupfer als Schwermetall zu bedenken.³⁸ Im Jahr 2004 stellten Bertozzi et al eine kupferfreie Azid-Alkin Reaktion vor, die „*Strain promoted [3+2] Azide-Alkyne Cycloaddition*“ (SPAAC).³⁵ Diese Reaktion basiert auf der hohen Ringspannung von Cyclooctinen, dem kleinsten stabilen, zyklischen Alkin. Bereits 1961 berichteten A. Krebs und G. Wittig von einer explosionsartigen Reaktion zwischen Cyclooctin und Phenylazid zum Triazolderivat.³⁹ Die kupferfreie Azid-Alkin Cycloaddition kann unter physiologischen Bedingungen und ohne Hilfe von weiteren zusätzlichen Reaktionskomponenten durchgeführt werden. Sie ist deshalb für eine sehr große Bandbreite an Anwendungen geeignet. Durch den Einsatz der Click-Chemie können auf die Oberfläche von Nanopartikeln unterschiedliche Moleküle und Funktionalitäten kovalent gebunden werden.^{40–42}

1.6. Self Assembly

In biologischen Systemen bilden unterschiedliche Moleküle die Basis für eine große Anzahl an komplexen makromolekularen Assemblierungen mit unterschiedlichen Funktionen. Dies trifft auf in der Natur vorkommenden Molekülen wie Proteine, Nukleinsäuren, Zucker und Lipide zu. Davon sind Lipide die am einfachsten aufgebauten Moleküle.^{43–45} Zusätzlich weisen Lipide, meist in wässrigen Lösungen, die Eigenschaft zur spontanen und selbstständigen Assemblierung zu höheren Ordnungsstrukturen auf. Aus diesen Gründen sind sie Gegenstand intensiver Forschung.⁴⁶ Zur Klasse der amphiphilen Molekülen werden zum Beispiel Lipide, Tenside und Blockcopolymere gezählt. Die Erforschung der Aggregatbildung von Amphiphilen ist in den Bereichen der Kolloid-, Polymer- und Materialwissenschaften von großer Bedeutung.^{47–49} Auch in Bereichen der Pharmazie-, Nahrungsmittel- und Kosmetikindustrie bedient man sich dieser, um nanostrukturierte Materialien herzustellen.^{50–52}

1.7. Amphiphile Blockcopolymere

Amphiphile Moleküle wie Lipide, Tenside und Blockcopolymere assemblieren selbständig zu Aggregaten in Wasser. Das Konzept der molekularen Selbstorganisation ist Bestandteil des alltäglichen Lebens. Durch Assemblierung von Phospholipiden entstehen Zellmembranen, die fundamentale Bestandteile von Organismen sind. Auch Seifenblasen entstehen durch die Selbstassemblierung kleiner Tenside.

Der Begriff Amphiphil wurde 1936 von Hartley eingeführt, es besteht aus den altgriechischen Worten „*amphi*“ („auf beiden Seiten“) und „*philos*“ („liebend“).⁵³ Es bezeichnet Moleküle die aus zwei oder mehr unterschiedlichen Einheiten bestehen, die sich unterschiedlich verhalten beziehungsweise basierend auf ihrer Polarität unterschiedlich mit der Umgebung (Lösungsmittel) wechselwirken. Amphiphile Moleküle besitzen sowohl einen hydrophoben als auch einen hydrophilen (wasserliebenden) Teil. Dabei ist der hydrophobe (wassermeidende) Teil meist unlöslich bis schlecht löslich in Wasser. Dafür aber gut löslich in organischen Lösungsmitteln und Ölen, weshalb auch der Begriff Lipophil (fettliebend) verwendet

wird. Dabei spricht man von der hydrophilen Einheit als Kopfgruppe und den hydrophoben Anteil als Schwanz.⁵⁴ Flexible Diblock Copolymere können als das makromolekulare Gegenüber zu gewöhnlichen Tensiden angesehen werden. Im einfachsten Fall bestehen die Amphiphile aus AB Diblock Copolymeren.⁵⁵

1.8. Polymermizellen

Der Prozess der Bildung von polymeren Mizellen erfolgt spontan, wenn eine bestimmte Konzentration an amphiphilen Polymeren in Lösung überschritten wird. Diese Konzentration bezeichnet man als kritische Mizellen Konzentration (CMC).⁵⁶ Oberhalb der CMC liegt die Mizelle im dynamischen Gleichgewicht mit den Unimeren (freiem Polymer) und ist thermodynamisch stabil. Unterhalb der CMC liegen die Polymere als Unimere in Lösung vor (Abbildung 4). Eine Mizelle besteht aus einem hydrophoben Kern im Inneren und einer hydrophilen Hülle (Corona), die aus den hydrophoben Kopfgruppen besteht.

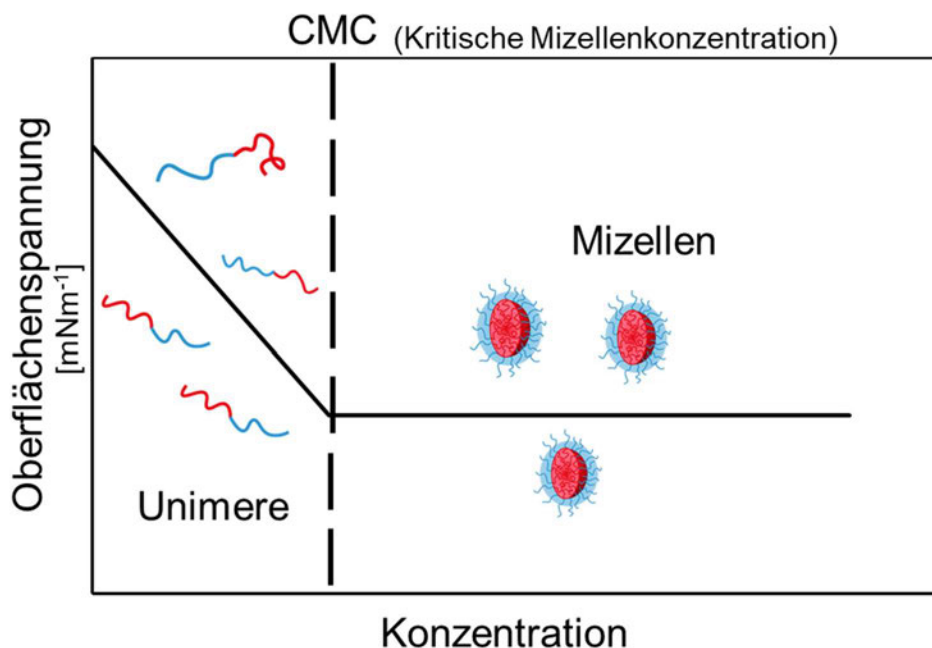


Abbildung 4: Mizellen Bildung überhalb der kritischen Mizellenkonzentration im Gleichgewicht mit den Unimeren.

Diese spontanen Assemblierungen von Amphiphilen können verschiedenste Morphologien annehmen wie unter anderem sphärisch, zylindrisch, lamellar,

vesikulär und noch zahlreiche weitere Formen.^{57,58} Im Falle von Blockcopolymeren bilden sich oftmals sogenannte Compound-Mizellen, die aus keiner definierten Kern-Schale-Struktur bestehen und als Assemblierungen inverser Mizellen von geringem Ordnungsgrad beschrieben werden können. Nach Außen hin sind hydrophile Ketten angeordnet und können durch die inverse Anordnung von Mizellen im Inneren mehrere wässrige Domänen enthalten. Deshalb weisen sie eine breitere Größenverteilung als klassische Mizellen auf.^{59,60}

Auf diese Art gebildeten Aggregate werden zumindest teilweise von hydrophoben Kräften zusammengehalten. Die zugrundeliegende Triebkraft zur Assemblierung geht von den hydrophoben Anteilen aus, diese sind bestrebt direkten Kontakt mit Wasser zu vermeiden.⁶¹ Zusätzlich dazu wirken entropische Effekte auf die Aggregate. In Lösung werden die Bewegungen der Amphiphile von den hydrophoben und hydrophilen Interaktionen bestimmt. Deshalb sind die über der CMC erhaltenen Assemblierungen entropisch günstiger, als die korrespondierenden freien amphiphilen Moleküle.⁶²

Mizellen finden aufgrund ihrer Fähigkeit organische Moleküle zu solvatisieren, in einer Vielzahl von industriellen und biologischen Prozessen Verwendung.⁶³ Dadurch können hydrophobe Substanzen wie Öle, Wirkstoffe oder Farbstoffmoleküle in den hydrophoben Kern der Mizellen eingeschlossen werden.⁶⁴ Diese Eigenschaft hat vor allem für pharmazeutische Formulierungen ein großes Potential, da dort oftmals schlecht wasserlösliche Wirkstoffe unter physiologischen Bedingungen transportiert werden müssen.⁶⁵ Das Einschließen solcher schlecht wasserlöslichen Pharmazeutika in den hydrophoben Kern von nanopartikulärer Strukturen, wie beispielsweise Mizellen, verbessert die Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik der Wirkstoffe im Organismus. Zusätzlich dazu werden die transportierten Substanzen vor dem Abbau und Wechselwirkungen in *in vivo* Systemen bewahrt.⁶⁶ Mizellen finden ebenfalls im Bereich der Reinigungsindustrie Verwendung, um Schmutz oder Ölrückstände zu entfernen, in dem diese Substanzen in Lösung gebracht werden. Im Vergleich zu tensidbasierten Mizellen, weisen polymerbasierte Mizellen aufgrund ihrer mechanischen und physikalischen Eigenschaften eine höhere Stabilität und Haltbarkeit auf. Das hängt auch damit zusammen, dass die Bildung von Mizellen aus Polymeren im Vergleich zu tensidbasierten Mizellen bei niedrigeren CMCs erfolgt.⁴⁷

Die bei der Überschreitung der CMC erhaltenen Morphologien können mit dem Modell des kritischen Packungsparameters „critical packing parameter“ (cpp) als $v/a_0 \cdot l_c$ beschrieben werden. Dabei wird die Krümmung von amphiphilen Molekülen an der Grenzfläche betrachtet. Diese ist abhängig von dem Volumen der hydrophoben Ketten v , von der Länge der hydrophoben Ketten l_c und dem Bereich a_0 , der von der amphiphilen Kopfgruppe an der Grenzfläche von Mizelle und Wasser eingenommen wird. Dieser effektive Bereich des amphiphilen Moleküls ist abhängig von zwei Faktoren, dem hydrophoben Einfluss der der Kopfgruppen und der Triebkraft der hydrophilen Komponenten, maximalen Kontakt zu Wasser aufzunehmen.

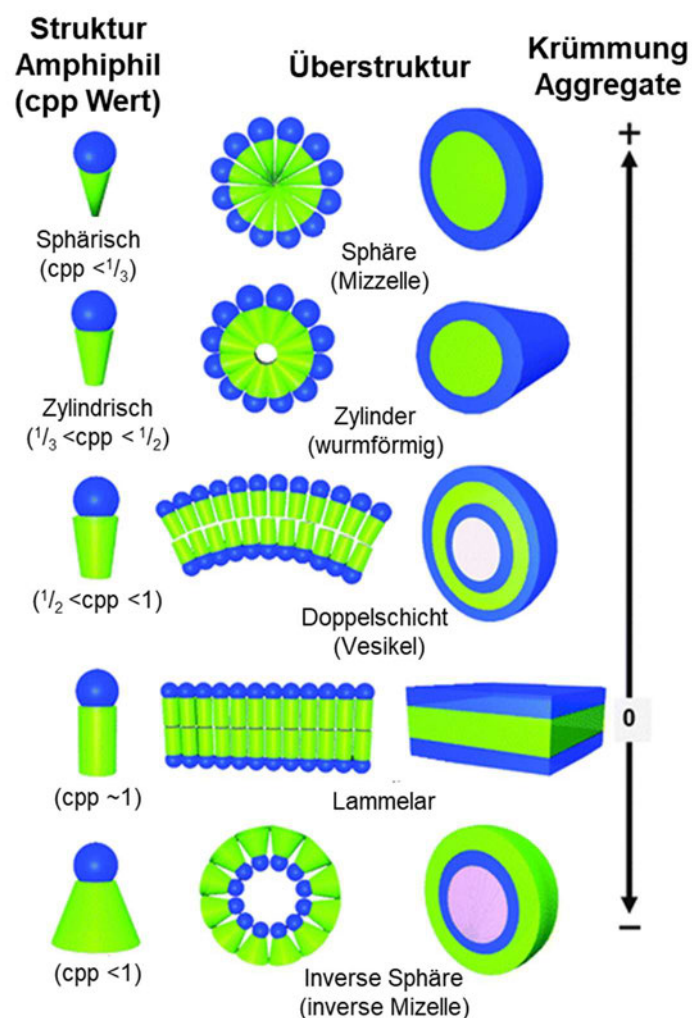


Abbildung 5: Morphologien von Amphiphilen und dazugehörige Krümmung, modifiziert nach⁵⁴.

Daraus ergeben sich für die Morphologien sphärisch, zylindrisch und lammelar die kritischen Packungsparameter (cpp) von $\sim 1/3$, $1/3 < cpp < 1/2$ und $1/2 < cpp < 1$. Diese

Geometrien können durch Variation von Kontrollparametern wie Konzentration, Temperatur, Salzkonzentration und pH in weitere geometrische Formen (z.B.: Scheiben, Stäbchenförmig, etc.) überführt werden.^{47,62}

1.9. Vernetzte Polymermizellen

Polymere Mizellen befinden sich in einem dynamischen Gleichgewicht mit den Unimeren in Lösung (Abbildung 6).

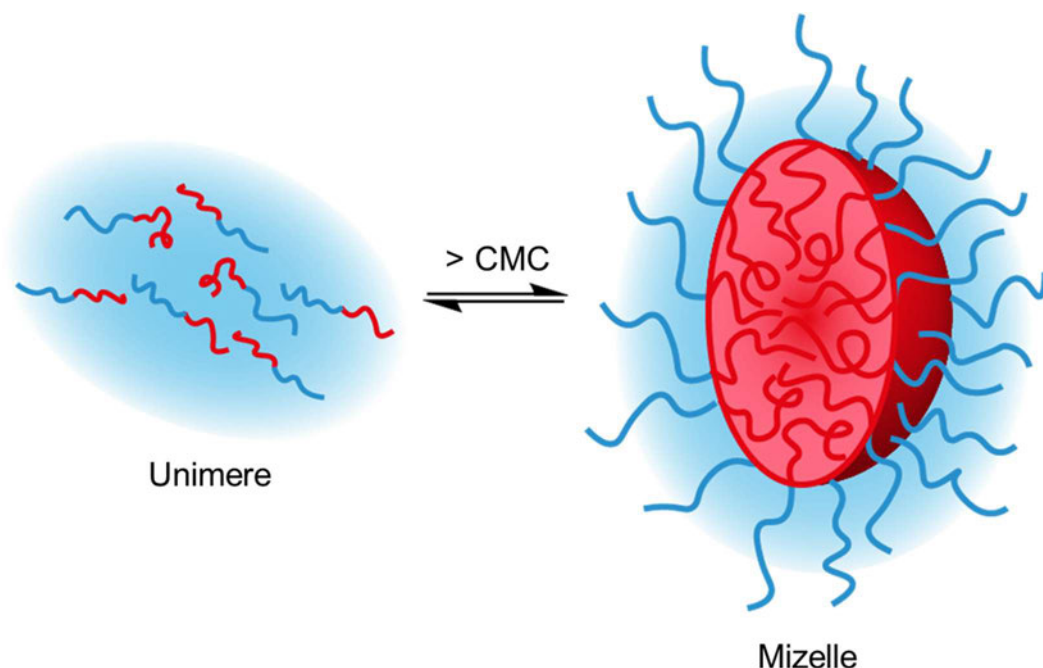


Abbildung 6: Dynamisches Gleichgewicht zwischen Unimeren und Mizellen in Lösung.

Eine der Herausforderungen bei der Verwendung von Polymermizellen in *in vivo* Systemen, ist deren Stabilität im Blutkreislauf. Problematisch dabei ist, dass polymere Mizellen bei Verdünnung unter der CMC zerfallen können. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die hydrophoben Blöcke mit Plasmaproteinen interagieren und so ebenfalls das dynamische Gleichgewicht der Mizellen stören.⁶⁷ Eine Strategie, um eine Auflösung der Mizellen zu verhindern ist eine Vernetzung vom hydrophoben Kern oder der hydrophilen Corona. Durch dieses Vorgehen ist die Assemblierung der Mizellen nicht nur durch hydrophobe Wechselwirkungen begünstigt, sondern auch zusätzlich mittels Vernetzung stabilisiert. Eine solche Vernetzung kann beispielsweise über kovalente Bindungen oder nicht-kovalent über stabilisierende

Wasserstoffbrückenbindungen oder π - π -Wechselwirkungen erfolgen.⁶⁸ Die Vernetzung von Mizellen erwies sich als hilfreich, um die Stabilität der Aggregate im Blutkreislauf signifikant zu verbessern, was von grundlegender Bedeutung ist, um einen eingeschlossenen Wirkstoff nicht vorzeitig freizusetzen.^{69,70} Die kovalente Vernetzung von Mizellen im Kern muss nach ihrer Assemblierung erfolgen. Dafür werden oftmals die Nebenketten oder Endgruppen der Polymere mit entsprechenden Funktionellen Gruppen versehen. Diese Reaktiven Gruppen dürfen nicht den Prozess der Selbstassemblierung der Mizellen stören und sollten deshalb ausreichend hydrophob sein oder nur zu kleinen Anteilen vertreten sein.

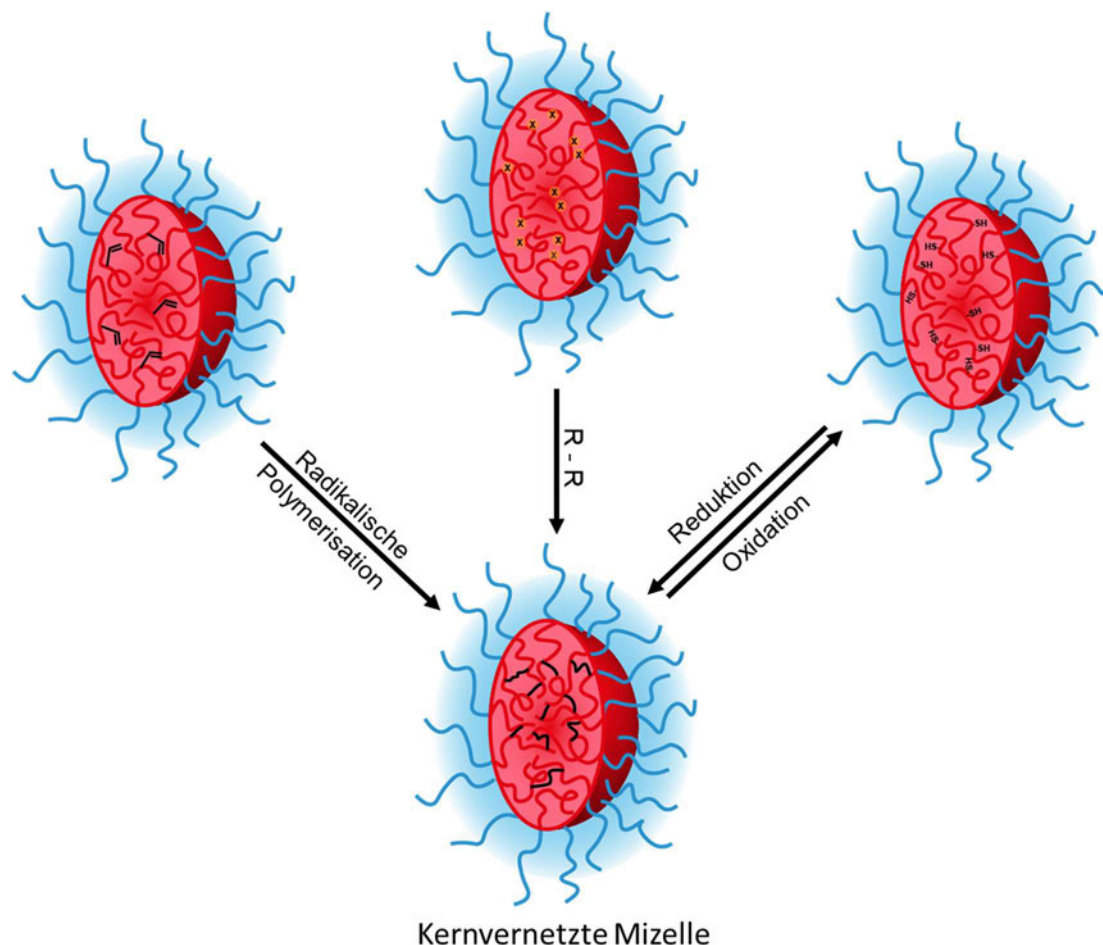


Abbildung 7: Vernetzung von Mizellen mittels Radikalischer Polymerisation, Bifunktionalen Vernetzern und Thiolgruppen.

Am häufigsten verwendete Methoden zur kovalenten Vernetzung sind mittels radikalischer Polymerisation, die Verwendung von bifunktionalen Vernetzern und der Einsatz von Disulfidbrücken mittels Thiolgruppen.⁶⁸ Letztere führen zu einer

reversiblen Vernetzung über Disulfid Bindungen. Solche Vernetzungen mit Disulfiden sind unter physiologischen Bedingungen stabil, können aber in dem reduzierenden Milieu des Cytoplasmas aufgelöst werden. Das basiert auf der Differenz des Redoxpotentials zwischen dem Inneren und Äußeren der Zelle.

Im Cytoplasma ist die Konzentration an Glutathion etwa 50-100 mal höher als im extrazellulären Raum. Über Disulfide vernetzte Polymermizellen können die eingeschlossenen Wirkstoffe, durch reduktive Spaltung der Disulfide, leichter in der Zelle freisetzen.⁷¹ Durch die reduktive Spaltung der Disulfide, die als Vernetzer der Mizellen fungieren, werden die Mizellen destabilisiert, da die Mizellen sich wieder im dynamischen Gleichgewicht mit Unimeren in Lösung befinden.

1.10. Vesikuläre Partikel: Liposome & Polymersome

Basierend auf den amphiphilen Eigenschaften von Lipiden ordnen sich diese in wässrigen Lösungen zu sphärischen Doppellipidschichten mit wässrigem Kern an. Diese Aggregate werden als Liposome bezeichnet.^{72,73} Sie können in ihrem wässrigen Innenraum hydrophile Substanzen einschließen und in ihrer Doppelschicht hydrophobe Substanzen aufnehmen. Liposome sind biokompatibel und schützen die in ihnen eingeschlossenen Substanzen von äußeren Einflüssen. Die Größe, Ladung und Oberflächeneigenschaften von Liposomen können verändert werden indem man die verwendeten Lipidmischungen und gewählte Herstellugsmethode anpasst. Ein Nachteil bei der Verwendung von klassischen Liposomen ist ihre schnelle Ausscheidung aus dem Blutkreislauf über das Retikuloendotheliale System (RES), (früher Retikuloendotheliales System (RES)) primär in die Leber.⁷⁴ Liposomale Formulierungen wurden hinsichtlich ihrer Eignung als Wirkstoffträger untersucht. Aus Basis dieser Forschungen bekam im Jahr 1995 Doxil als erstes Nanomedikament die Zulassung, eine mit Doxorubicin beladene pegylierte Liposomformuillierung.⁷⁵ In den darauf folgenden Jahren erhielten weitere Liposomformulierungen die Zulassung als Medikament.^{76,77}

Erste Vesikel auf Basis von amphiphilen Polymeren wurden 1996 von Eisenberg et al publiziert.⁷⁸ Vesikel aus amphiphilen Block Copolymeren werden als Polymersome bezeichnet, ihre Anordnung ist analog zu den Liposomen. Aufgrund ihres Potentials

große Mengen an wasserlöslichen Substanzen in ihrem Kern einzuschließen sind diese Aggregate in Form von Hohlkugeln von besonderem Interesse. Deshalb werden Liposome und Polymersome auf ihrer Eignung als Wirkstoffträger für therapeutische Zwecke hin untersucht. Lipid Membranen wurden von der Natur aus eher fließend als stabil konzipiert, um ihren Aufgaben in der Kompartimentierung der Zelle und einen Austausch von Material aus dem inneren und äußeren Medium, durch Abschnürung von Teilen der Membran als Vesikel oder der Aufnahme von Außenmedium über Phagozytose, bestens gerecht zu werden.

Typischerweise haben Phospholipide, aus denen die Doppelmembranschichten bestehen, ein Molekulargewicht von weniger als 1kDa. Dagegen bestehen Polymersome aus Polymeren mit signifikant höheren Molekulargewichten (<10 kDa) und weisen somit im Vergleich zu Lipiden ein höheres Molekulargewicht der hydrophoben Komponente auf. Der höhere hydrophobe Molekulargesichtsanteil ist der Grund für die hohe Stabilität der Aggregate. Ein weiterer Faktor für die hohe Stabilität, ist die größere Membrandicke von Polymersomen im Vergleich zu Lipiden.⁷⁹ Dadurch ist die gebildete polymerbasierte Membranschicht weniger permeabel gegenüber wässrigen Lösungen, zusätzlich ist die laterale Diffusion der verwendeten Copolymere gering.^{80,81}

Die gezielte Assemblierung von amphiphilen Polymeren zu Polymersomen ist vom Anteil der hydrophoben Fraktion f und dem Molekulargewicht abhängig.⁸² Dabei zeigte sich ein hydrophober Anteil von den eingesetzten Polymeren im Bereich von $f=(35\pm 10)\%$ als geeignet für die Bildung von Polymersomen.⁸¹ Das ist lediglich ein Bereich in dem es möglich wäre, dass es zur Bildung von Polymersomen kommen kann. Die entstehenden Morphologien und Größen von selbstassemblierten amphiphilen Polymeren sind vielfältig in Abhängigkeit von den Herstellungsmethoden und Bedingungen.^{47,83,84}

Im Gegensatz zu Mizellen bieten Polymersome den Vorteil, sowohl hydrophile als auch hydrophobe Substanzen einschließen zu können. Mizellen und Polymersome können beispielsweise im Bereich der Nanomedizin eingesetzt werden.^{85–87}

1.11. Nanomedizin

Die *European Science Foundation* schlägt 2005 folgende Definition für den Begriff der Nanomedizin vor. „Nanomedizin verwendet Nanometer große Werkzeuge zur Diagnose, Prävention und Behandlung von Krankheiten und um gesteigertes Verständnis von der zugrundeliegenden komplexen Pathophysiologie von Krankheiten zu erlangen. Mit dem höchsten Ziel der Verbesserung von Lebensqualität.“⁸⁸. In den Bereich der Nanomedizin werden Nanopharmazeutika, nanodimensionale bildgebende Diagnostika und Theranostika gezählt.^{89,90} Unter Theranostik versteht man die Kombination aus Diagnostik und Therapie in einem Schritt.⁹¹

Bereits 1975 stellte Ringsdorf das Modell der Zusammensetzung von pharmakologisch aktiven Polymeren als Wirkstoffträger vor. Dabei wird an ein nicht toxisches Polymer ein Wirkstoff reversibel gebunden. Dieses Polymer sollte als weitere Eigenschaften einen wasserlöslichen Anteil besitzen und einen zusätzlichen Liganden, der spezifische Bindungen eingehen kann (Abbildung 8).⁹²

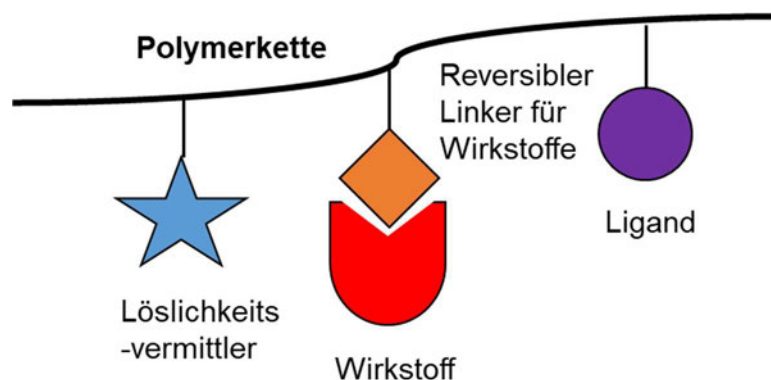


Abbildung 8: Polymere Therapeutika nach dem Ringsdorf Modell.

Sogenannte polymerbasierte Wirkstoffträger „*drug delivery systems*“ (DDS) haben erhebliches Interesse in den Bereichen der Polymerchemie, Pharmazie und Biomaterialwissenschaften erhalten um gezielte biomedizinische Applikationen, mit kontrollierter Freisetzung der eingeschlossenen Ladung zu erhalten. Solche polymerbasierten Wirkstoffträger (DDS) haben das Potential, zahlreiche schwer therapierbare Krankheiten, wie zum Beispiel Krebs, zu behandeln.^{90,93} In den letzten Jahren wurden verschiedene Arten polymerer Wirkstoffträger untersucht. Darunter

zählen Polymer-Protein Konjugate,⁹⁴ Polymer-Wirkstoff Konjugate,⁹⁵ Polymermizellen,⁹⁶ Vesikeln⁹⁷ und Polyplexe.^{98–100}

Mizellen aus selbstassemblierenden amphiphilen Block Copolymere in wässrigen Lösungen waren lange im Fokus als potenzielle Wirkstoffträger, auch unter der Bezeichnung „*drug delivery systems*“ (DDS) bekannt.¹⁰¹ Mizellen sind für den Transport von Wirkstoffen besonders geeignet, vor allem weil hydrophobe Wirkstoffe im hydrophoben Kern der Mizellen eingeschlossen werden können. So können hydrophobe Wirkstoffe in höheren Konzentrationen eingesetzt werden, als ihre ursprüngliche Löslichkeit in Wasser es zulässt.¹⁰² Allgemein ist die schlechte Wasserlöslichkeit vieler Wirkstoffe eine Herausforderung für die Wirkstoffforschung.¹⁰³

Durch den Einsatz von Wirkstoffträgern soll die Verteilung von Wirkstoffen im Körper beeinflusst werden. Die gezielte Verteilung und Anreicherung von Makromolekülen kann durch passives (EPR-Effekt) oder aktives Targeting erreicht werden.¹⁰⁴ Die Verteilung der Nanopartikel im Körper und die damit einhergehende Pharmakokinetik sind von Faktoren wie chemischer Zusammensetzung, Größe und Oberflächenladung abhängig.¹⁰⁵

1.12. EPR-Effekt (enhanced permeability and retention effect)

Makromoleküle, wie Mizellen und Polymersome, zirkulieren länger im Blut als der freie Wirkstoff, da sie die renale Ausscheidung umgehen können.¹⁰⁶ Das führt zu einer erhöhten Anreicherung des in dem Aggregat eingeschlossenen Medikaments in soliden Tumoren. Diese Beobachtung basiert auf den EPR-Effekt (*enhanced permeability and retention*), der von Maeda und seinen Mitarbeitern erstmals beschrieben wurde.^{107,108} Für den Transport von makromolekularen Wirkstoffträgern spielt die Durchlässigkeit der Gefäße von Tumoren eine große Rolle. Die Permeabilität der Blutgefäße solider Tumore unterscheidet sich von den gesunden Blutgefäßen im Körper. Tumorgewebe weist eine erhöhte Angiogenese (Wachstum von Blutgefäßen) auf, was zu einer hohen Dichte an Blutgefäßen führt. Die auf diese Art entstandenen Gefäße weisen eine von Defektstellen geprägte und nicht vollständig geschlossene Epithelschicht auf.¹⁰⁹ Die gesteigerte Durchlässigkeit dieser Blutgefäße wird durch körpereigene Hormone wie beispielsweise Bradykinin verursacht.¹¹⁰ Zusätzlich ist

das Lymphatische System beeinträchtigt, da die Ausscheidung aus dem Interstitium von Tumoren über die Lymphbahnen eingeschränkt ist. Aufgrund dieser Anomalien von Tumor Blutgefäßen ist die Permeabilität gegenüber Makromolekülen und Lipid Partikeln erhöht. Die fehlerhafte Ausscheidung des Lymphatischen Systems führt zu verlängerten Retentionszeiten dieser Makromoleküle im Tumorgewebe.^{107,111}

Allerdings geht mit der erhöhten Angiogenese von Tumor Gewebe auch einher, dass Tumore inhomogen vaskularisiert sind. Dadurch kann keine gleichmäßige Verteilung der Makromoleküle über weitere Bereiche im gesamten Tumor erreicht werden. Das kann dazu führen, dass die inneren Bereiche des Tumors von Makomolekülen nicht erreicht werden können und sich diese lediglich im peripheren Bereich des Tumors anreichern.^{112,113} Diese Anreicherung von Nanopartikeln in Tumoren, kann genutzt werden um in Kombination mit markierten Nanopartikeln eine Bildgebung der Tumore zu erreichen.¹¹⁴

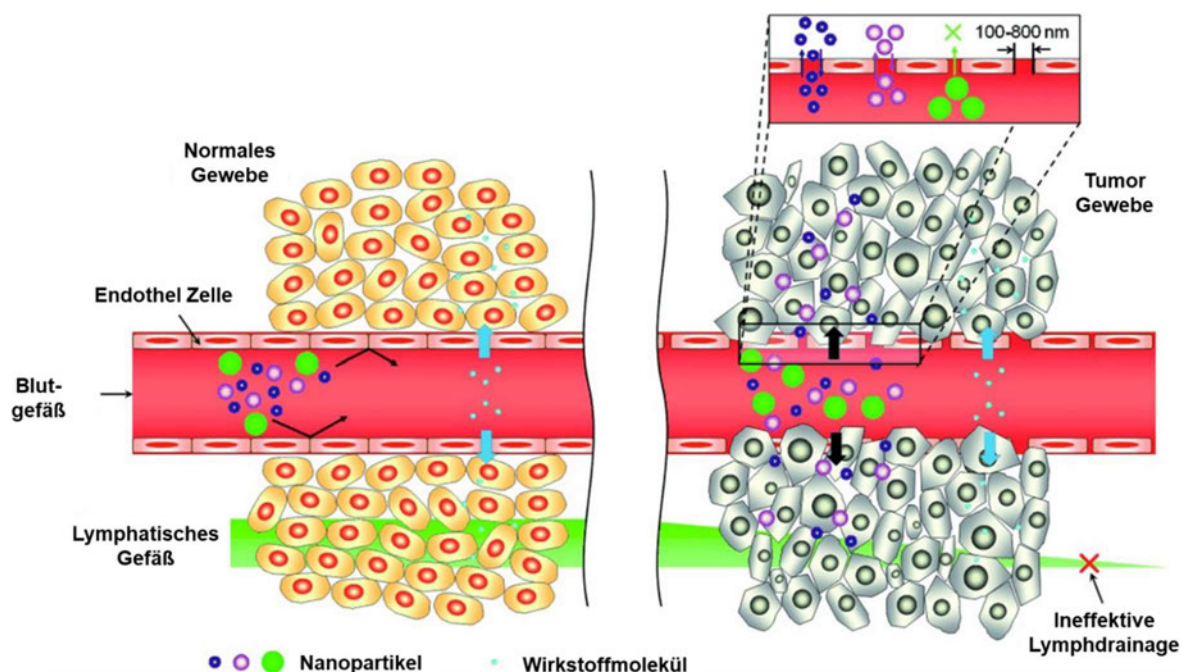


Abbildung 9: Transport von Nanopartikeln in verschiedenen Größen und Wirkstoffmolekülen durch normales Gewebe (links) und Tumor Gewebe (rechts) zur Demonstrierung des EPR Effekts (*enhanced permeability and retention*).¹¹⁵

Mittels passivem Targeting, wie oben beschrieben, können nicht alle Tumore adressiert werden. Deshalb ist ein weiterer Ansatz der des aktiven Targetings.^{116–118} Dabei werden spezifische Liganden auf der Oberfläche von Nanopartikeln angebracht,

die gezielt an spezifische Rezeptoren binden, die von den Zielzellen exprimiert werden. Nachdem es zur Rezeptorspezifischen Bindung gekommen ist, kann der Wirkstoffträger in die Zelle internalisiert werden. Damit es zur Rezeptor-Ligand Bindung kommen kann, muss der Komplex aus Ligand und Trägersystem in die Nähe des Rezeptors gelangen.

Als Liganden eignen sich beispielsweise Antikörper, Proteine, Peptide, Nucleinsäuren, Zucker und andere kleine Moleküle (z.B.: Vitamine).^{119–123} Oftmals werden die Liganden passend zu Rezeptoren gewählt, die spezifisch vom Tumor exprimiert oder gegenüber anderen Zellen überexprimiert sind.¹²⁴ Dabei ist es entscheidend, dass die eingesetzten Liganden keine unspezifischen Bindungen im Körper beispielsweise mit Proteinen oder Blutbestandteilen eingehen.¹²⁵

Allgemein ist es wichtig bei systemischer Verabreichung von polymeren Wirkstoffträgern, dass diese keine Interaktionen mit Blutbestandteilen, wie beispielsweise Plasmaproteinen, eingehen, da dies zur Bildung von großen Aggregaten führen kann. In Abhängigkeit der Größe und Beschaffenheit von Nanopartikeln kann eine Ausscheidung und Akkumulation der Partikel über die Leber oder Niere erfolgen.¹²⁶ Es ist möglich den EPR-Effekt durch pharmakologische und physikalische Einflüsse zu verbessern.¹²⁴ Eine mögliche pharmakologische Strategie ist es Wirkstoffe zu verwenden, die auf die vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren VEGF (*engl. vascular endothelial growth factor*) Signale Einfluss nehmen. da diese Einfluss auf Stoffwechselvorgänge nehmen, welche die vaskuläre Durchlässigkeit kontrollieren.^{127,128} Die Verstärkung des EPR-Effekts kann auch durch Angiotensin Agonisten¹²⁹ und Antagonisten,^{130,131} Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α)¹³² oder durch die Förderung des Wachstums von Blutgefäßen (Angiogenese) erzielt werden.¹³³ Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Einfluss von Hypothermie,^{134,135} Radiotherapie^{136,137} und Ultraschall^{138,139} ebenfalls den EPR-Effekt verstärken können.¹⁴⁰

1.13. HPMA basierte Nanopartikel

Copolymere mit wasserlöslichen Einheiten wie HPMA eignen sich besonders als Wirkstoffträger, da sie die Löslichkeit von hydrophoben Wirkstoffen verbessern und die unspezifische Toxizität reduzieren. Dadurch erfolgt eine Verbesserung der therapeutischen Breite eines Wirkstoffes. HPMA-Polymere wurden bereits umfangreich im Bereich der Nanomedizin untersucht. Im Jahr 1994 startete eine klinische Studie mit dem ersten Polymer–Chemotherapeutikum-Konjugat, bestehend aus HPMA-Polymeren und Doxorubicin.¹⁴¹

2. Motivation und Zielsetzung

Im Jahr 2020 sind laut dem Bericht des Robert Koch-Instituts 231.400 Frauen und 261.800 Männer in Deutschland mit einer Krebserkrankung diagnostiziert worden.¹⁴² Für die Therapie von Krebserkrankungen sind amphiphile Block Copolymere seit Jahren im Fokus der Wissenschaft als potentielle Wirkstoffträger.^{143,144} Die Verwendung von HPMA Copolymeren als Konjugate mit Krebstherapeutika zeigt eine bessere Bioverteilung und verringert damit die systemische Toxizität im Vergleich zum freien Wirkstoff.^{145–147}

Diese Dissertation strebt an, polymere Wirkstoffträger auf Basis von amphiphilen Diblockpolymeren zu entwickeln, die beispielsweise Tumortheraeutika einschließen können. Hierfür sind Eigenschaften wie Biokompatibilität, Stabilität im Organismus und hohe Lagerungsstabilität entscheidend. Dafür sind insbesondere Mizellen und vesikuläre Strukturen, wie Polymersome geeignet. Kernvernetzte Mizellen weisen einen hydrophoben Kern in dem hydrophobe Wirkstoffe eingeschlossen werden können, durch die zusätzliche Vernetzung des Mizellenkerns wird die Stabilität der Nanopartikel erhöht. Polymersome gleichen in ihrer Struktur Liposomen und weisen daher eine dickere hydrophobe Wand auf und haben im Inneren einen hydrophilen Bereich. Damit können sie hydrophile und hydrophobe Substanzen einschließen.

In vorhergehenden Arbeiten wurde gezeigt, dass Diblockpolymere bestehend aus DHPMA dazu geeignet sind als polymere Trägersysteme eingesetzt zu werden, da sie eine bessere Löslichkeit aufweisen. Durch das Einführen eines Diketals und einer langkettigen Alkoholgruppe in den hydrophoben Block, war es möglich pH-abhängige Polymersome zu erhalten.¹⁴⁸

Die HPMA- und DHPMA-Blöcke werden über das hydrophobe Vorläufer Polymer P(PFPMA) in einer polymeranalogen Reaktion erhalten. Diese PFPMA basierte Reaktivester Zwischenstufe ermöglicht die Polymerisation von Blöcken mit geringer Reaktivität und bietet gleichzeitig die Möglichkeit Bausteine nach erfolgter Polymerisation in die Polymerseitenketten einzuführen.

Zur Kernvernetzung der Mizellen werden funktionelle Gruppen im hydrophoben Block des Polymers eingeführt, die reversibel vernetzbar sind und später in der Zelle reduktiv gespalten werden. Dafür eignet sich aufgrund seiner Dithiolgruppen das reduktiv spaltbare Monomer PDSM.

In die Polymersysteme soll eine Azid-Gruppe am Kettenende eingeführt werden, unter Verwendung eines Azid-funktionalisierten CTAs (chain transfer reagent). Dies ermöglicht eine Modifikation der Polymere am Kettenende mittels Click-Chemie. Durch die Azid-Gruppen auf der äußeren Hülle der Partikel ist es möglich, mit aktivem Targeting die Partikel gezielt an den Wirkort zu akkumulieren. Die so erhaltenen Nanopartikel sind vielseitig und individuell modifizierbar und bieten eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten.

Die hierzu benötigten amphiphilen Diblockcopolymere sollen mittels RAFT (*reversible addition-fragmentation chain transfer*) -Polymerisation synthetisiert werden.

Auf Basis der Bestandteile DHPMA, LMA, DDEMA und HHMA werden über eine veränderte Polymerisationsroute Polymere erhalten, die anschließend Polymersome bilden. Diese können eingesetzt werden, um hydrophile und hydrophobe Substanzen einzuschließen und diese in vitro und in vivo zu testen (Kapitel 3.3).

Mit den erhaltenen Polymeren der Zusammensetzung $P(\text{HPMA})_x\text{-}P(\text{PDSM})_y$ werden über Disulfide kernvernetzte Mizellen gebildet, die in der Lage sind hydrophobe Substanzen einzuschließen (Kapitel 3.15).

3. Ergebnisse & Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollten geeignete polymere Trägersysteme für den Transport von Wirkstoffen entwickelt werden. Als Basis dafür dienen amphiphile Polymere, die zu nanodimensionalen Partikeln assembliert werden können und in der Lage sind Wirkstoffe einzuschließen. Mit Hilfe dieser Partikel soll es möglich sein, die Wirkstoffe intakt in die Zelle einzubringen und freizusetzen. Dafür sollen die Partikelsysteme in vivo stabil sein und erst bei Aufnahme in die Zelle zerfallen.

Um eine solche Änderung der Stabilität zu erhalten sollen pH-abbaubare Gruppen im hydrophoben Teil der Polymere eingeführt werden. Die pH-Abbaubarkeit ist für die Freisetzung der Wirkstoffe in der Zelle von Vorteil, da bei Aufnahme eines Partikels in die Zelle in den Lysosomen ein pH-Wert im Bereich von pH 4,5-5 vorliegt, im Blut liegt der pH bei 7,4.¹⁴⁹

Dafür eignen sich Diketal Gruppen, die durch pH-Änderungen im Säuren hydrolysiert werden und damit die Partikel destabilisieren um eine Freisetzung des Wirkstoffs in die Zelle zu erzielen. In vorhergehenden Arbeiten aus der Forschungsgruppe konnte gezeigt werden, dass das Einführen eines Diketals (DDEMA) und eines langkettigen Alkohols (HHMA) in den hydrophoben Block eines Polymers bei pH-Werten unter 5 zur Hydrolyse des Diketals führt. Durch diese Destabilisierung der erhaltenen Polymersome wird die Wirkstofffreisetzung erleichtert (Abbildung 10/Abbildung 11).¹⁴⁸

Polymersome bieten gegenüber Mizellen den Vorteil, sowohl hydrophobe als auch hydrophile Substanzen einschließen zu können. Aus Polymeren der Zusammensetzung P(HPMA)-co-p(LMA) konnten in anderen Arbeiten bereits Mizellen zum Wirkstofftransport hergestellt werden.¹⁵⁰ Versuche der Assemblierung von Polymersomen mit dem Bestandteil HPMA als hydrophoben Block in Kombination mit LMA blieben hingegen erfolglos. Letztendlich zeigte sich die Verwendung des hydrophileren Monomers DHPMA als geeignet zur Bildung von Polymersomen.¹⁵¹

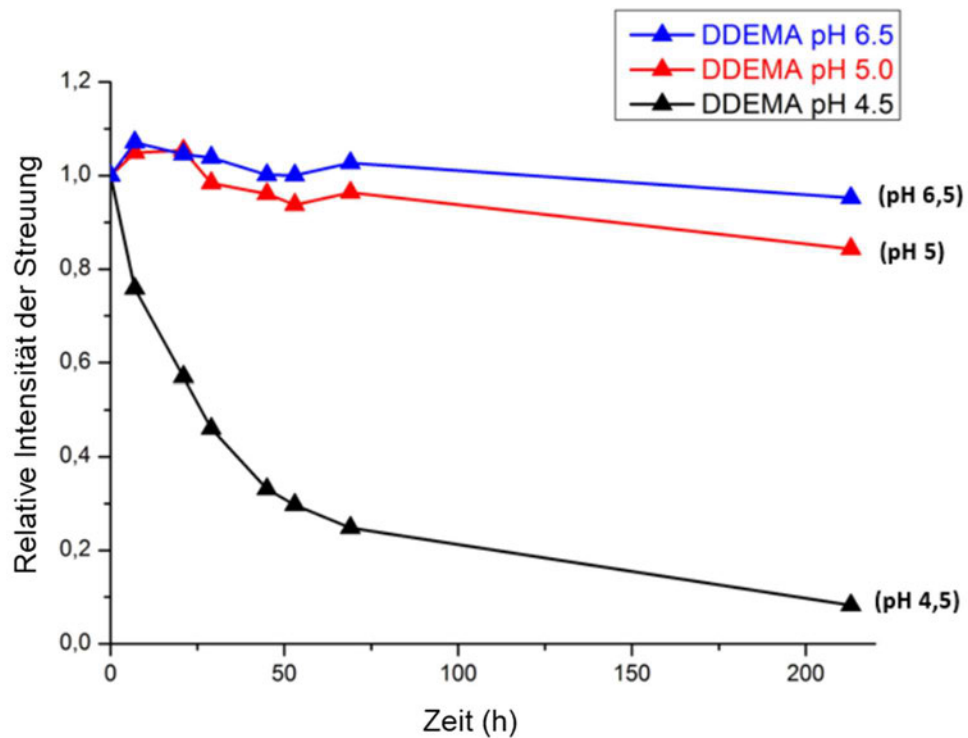


Abbildung 10: pH-Abbau Studie eines Polymers der Zusammensetzung P(DHPMA)-*b*-P(LMA-*stat*-DDEMA).¹⁴⁸

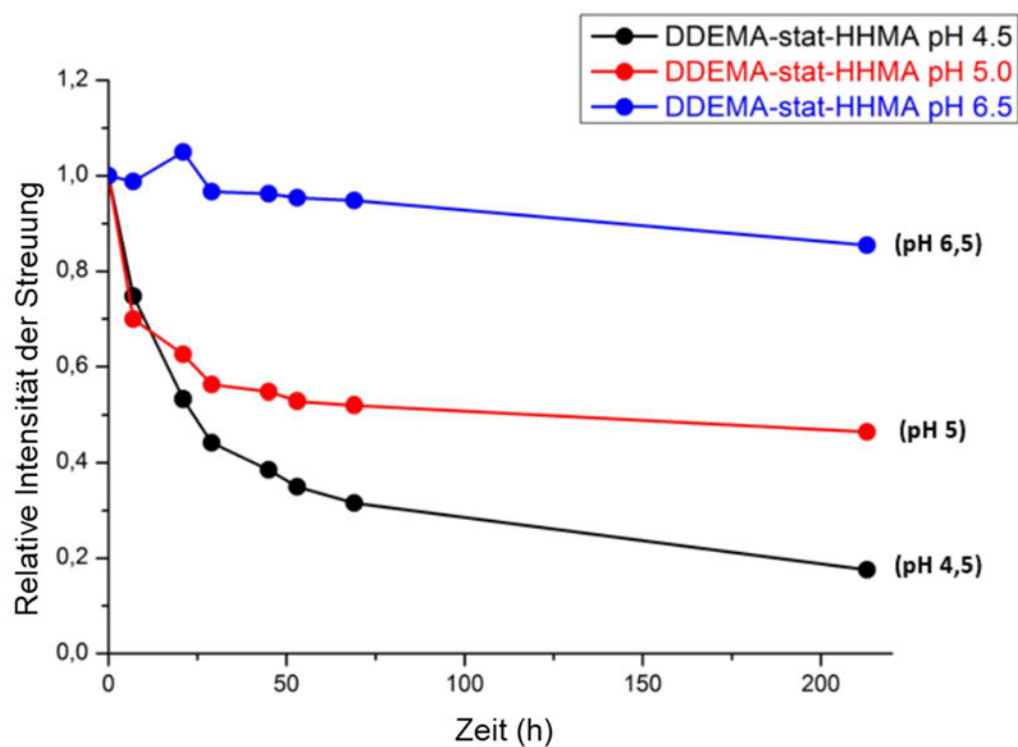


Abbildung 11: pH-Abbau Studie eines Polymers der Zusammensetzung P(DHPMA)-*b*-P(LMA-*stat*-DDEMA-*stat*-HHMA).¹⁴⁸

Auf Basis dessen werden im folgenden Teil der Arbeit amphiphile Polymere mit den hydrophoben Bestandteilen LMA, DDEMA, HHMA und einem hydrophilen DHPMA. Durch die zusätzliche Verwendung eines azid-funktionalisierten Kettentransferreagenz, lassen sich Polymere mit Azid-Endgruppen erhalten. Dadurch ist die Oberfläche der gebildeten Polymersome mit Azid-Gruppen versehen. Dies ermöglicht es durch bioorthogonale, ringgespannte Azid-Alkin Cycloaddition „*strain-promoted alkyne-azide-cycloaddition*“ (SPAAC) die Polymersome mit Dibenzocyclooctin (DBCO) funktionalisierten Bausteine zu versetzen. Die Oberfläche der erhaltenen Polymersome kann durch eine Vielzahl von Molekülen, wie beispielsweise spezielle Targetingstrukturen, wie Peptide oder Zuckermoleküle funktionalisiert werden.

3.1. P(DHPMA)-basierte Blockcopolymere

Zur Bildung von Polymersomen wurden mittels RAFT-Polymerisation DHPMA basierte Diblockpolymere der Zusammensetzungen P(DHPMA)-*b*-P(LMA), P(DHPMA)-*b*-P(LMA-*stat*-DDEMA) und P(DHPMA)-*b*-P(LMA-*stat*-DDEMA-*stat*-HHMA) mit geeigneten Blocklängenverhältnissen hergestellt.

Durch ihre chemischen und strukturellen Eigenschaften eignen diese sich potentiell als polymere Wirkstoffträger. Zum Einschluss in die Polymersome eignen sich besonders kleine Wirkstoffmoleküle wie beispielsweise Doxorubicin und Rapamycin.

Die Bildung der Polymersome erfolgte mit der dualen asymmetrischen Zentrifuge „*dual asymmetric centrifuge*“ (DAC). Die Aufreinigung der gebildeten Polymersome erfolgte mittels HPLC, um die Probe von freiem, gelösten Wirkstoff oder unassembliertem Polymer zu befreien.

Das Reaktionsschema (Abbildung 12) liefert einen Überblick über die Polymerisationsschritte und die darauffolgenden Reaktionen. Der DHPMA-Block wird über das hydrophobe Vorläufer Polymer P(PFPMA) in einer polymeranalogen Reaktion eingeführt. Dieser PFPMA basierte Reaktivester-Zwischenschritt wurde gewählt, da das DHPMA Monomer im Vergleich zum PFPMA Monomer wesentlich unreaktiver und hydrophiler ist.

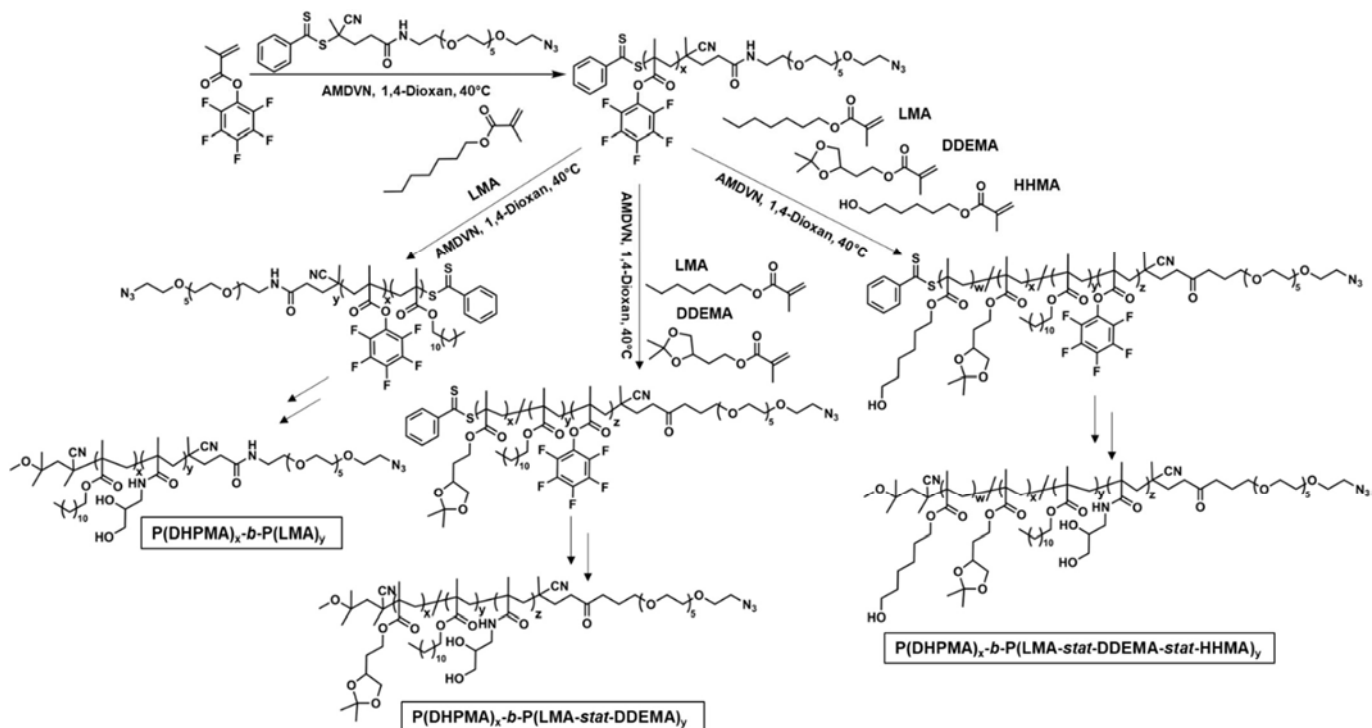


Abbildung 12: Syntheschema der DHPMA basierten Polymere.

Zuerst erfolgte die RAFT-Polymerisation des Azid-funktionalisierten Kettentransferreagenz mit dem Pentafluorphenylmethacrylat (PFPMA) Monomer und 2,2'-Azobis-(4-methoxy-2,4-dimethyl-valeronitril) (AMDVN) als Tieftemperaturinitiator. Die so erhaltenen P(PFPMA) Homopolymere sind die Grundlage für die weiteren Diblockpolymere. In einem zweiten Schritt werden die P(PFPMA) Polymere in einer RAFT-Polymerisation zu den folgenden drei Polymeren umgesetzt: $P(\text{PFPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_y$, $P(\text{PFPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{LMA-}stat\text{-DDEMA})_y$ und $P(\text{PFPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{LMA-}stat\text{-DDEMA-}stat\text{-HHMA})_y$.

Die anschließenden Reaktionsschritte erfolgten analog mit allen drei erhaltenen Polymervarianten. In einer radikalischen Substitutionsreaktion mit einem Überschuss an AMDVN wurde die reaktive Dithioesterendgruppe der Polymere abgespalten. Der letzte Schritt ist eine polymeranaloge Reaktion, bei der die Aktivestereinheiten der PFPMA-Blöcke durch Aminolyse mit Dihydroxypropylamin in den hydrophilen DHPMA-Block überführt werden.

3.2. Synthese der Monomere und des Kettentransferreagenzes

3.2.1. Synthese des Pentafluorphenylmethacrylats (PFPMA)

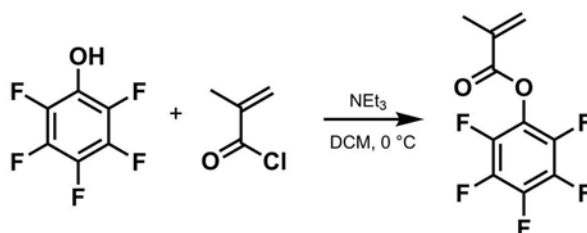


Abbildung 13: Synthese von Pentafluorphenylmethacrylat.

Die Darstellung des Reaktivestermonomers PFPMA erfolgte in einer Schotten-Baumann-Reaktion, nach der Synthesevorschrift von Eberhard¹⁵². Das Methacryloylsäurechlorid wurde in einer basisch katalysierten nukleophilen Substitution mit der Hilfsbase Triethylamin (TEA) und Pentafluorphenol umgesetzt (Abbildung 13). Es folgte erst eine destillative Aufreinigung und im Anschluss eine säulenchromatographische Aufreinigung.

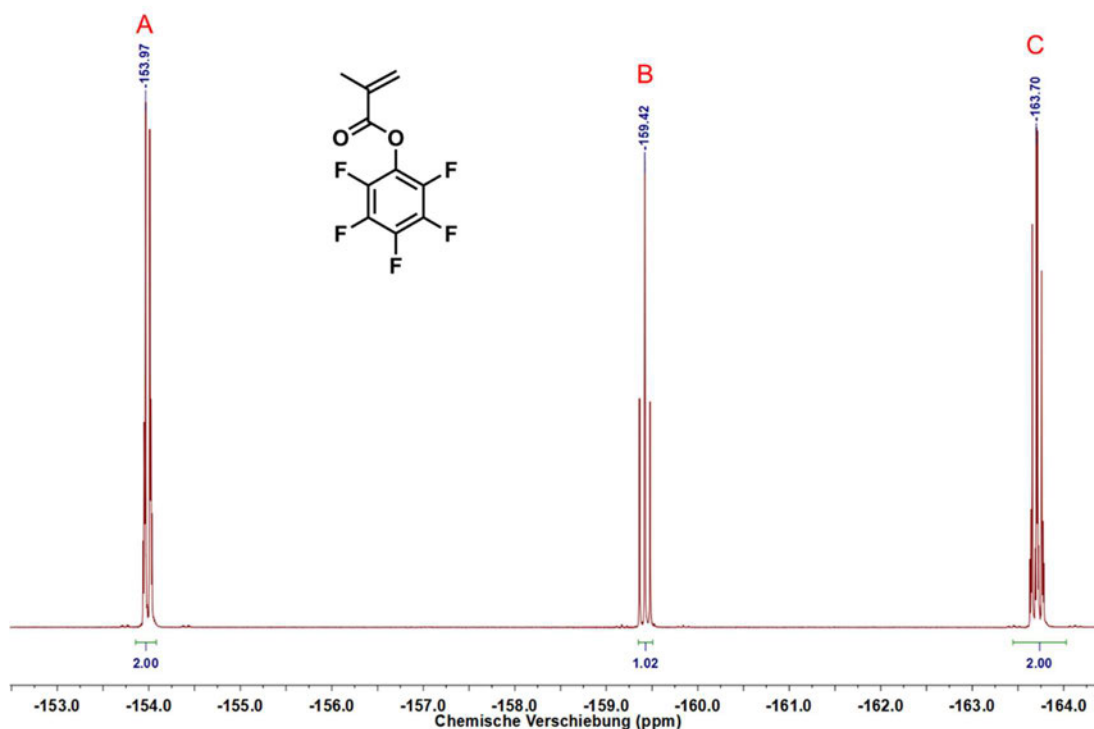


Abbildung 14: ^{19}F -NMR von Pentafluorphenylmethacrylat (CDCl_3 , 400 MHz).

Die Charakterisierung des erhaltenen Monomers PFPMA erfolgte mittels ^1H - und ^{19}F -NMR Spektroskopie (Abbildung 14/Abbildung 15).

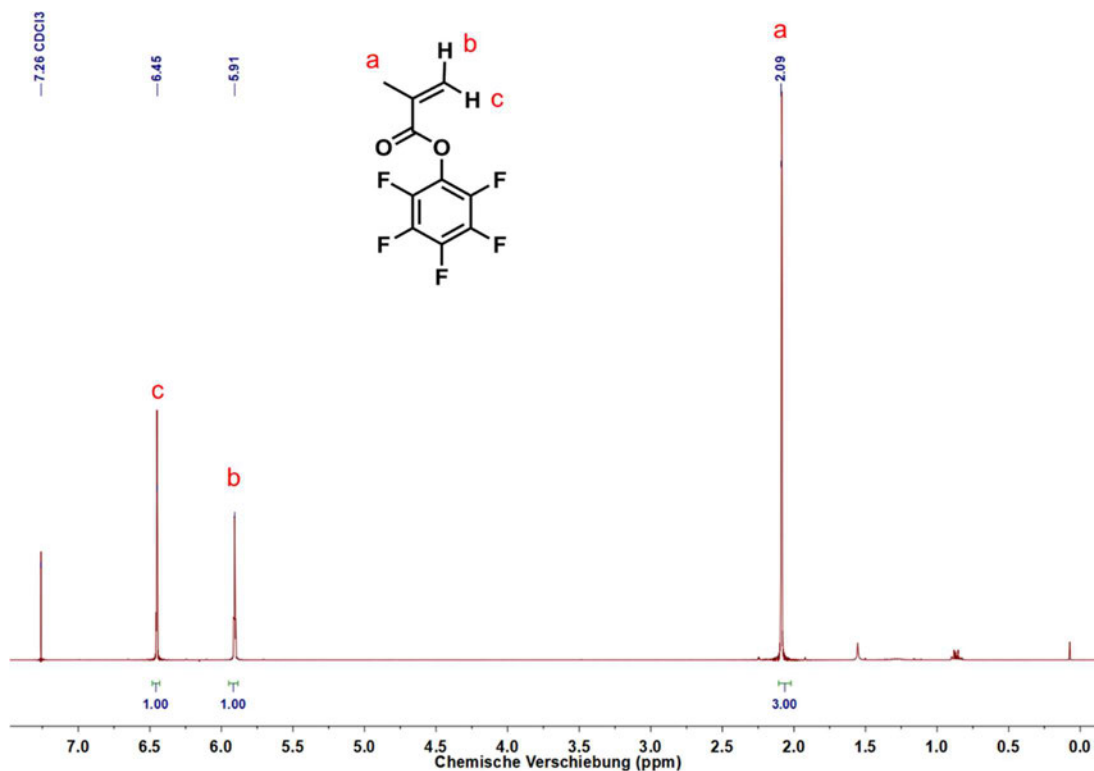


Abbildung 15: ^1H -NMR Pentafluorphenylmethacrylat (CDCl_3 , 400 MHz).

In dem ^{19}F -NMR Spektrum sind die charakteristischen *meta*- (-163.78 bis -163.63 ppm), *para*- (-159.42 ppm) und *ortho*-ständigen (-154.04 ppm bis -153.94 ppm) Fluor-Signale des PFPMA's erkennbar.

3.2.2. Synthese des Ketal Monomers

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

Die Synthese des Ketalmonomers 2-(2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl) ethylmethacrylat (DDEMA) erfolgte nach Literatur,²⁶ durch die Umsetzung von Methacryloylchlorid mit 4-(2-Hydroxyethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan und Triethylamin als Hilfsbase. Die Aufreinigung erfolgte säulenchromatographisch.

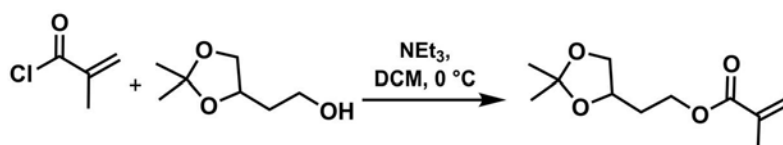


Abbildung 16: Synthese von 2-(2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethylmethacrylat (DDEMA).

Die Charakterisierung des erhaltenen Monomers DDEMA erfolgte mittels ¹H-NMR Spektroskopie.

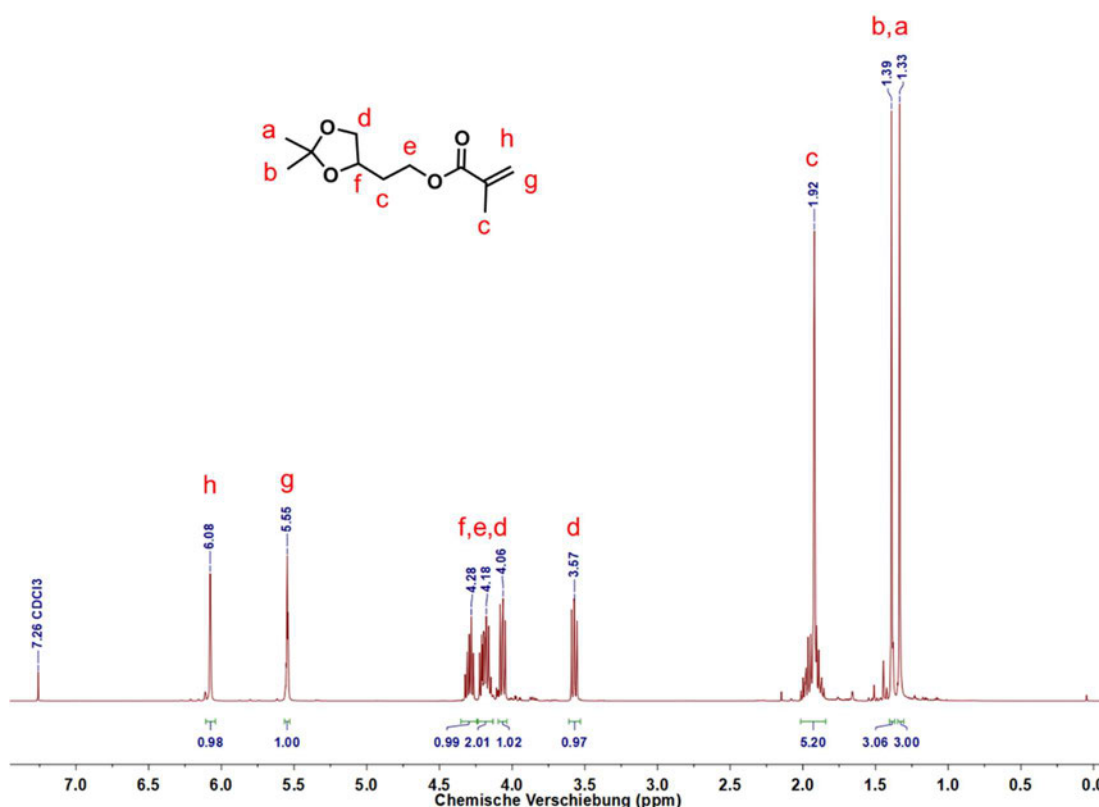


Abbildung 17: ¹H-NMR Spektrum von 2-(2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethylmethacrylat (DDEMA) (CDCl₃, 400 MHz).

3.2.3. Synthese des Monomers Hydroxyhexylmethacrylat (HHMA)

Das Monomer Hydroxymethylmethacrylat (HHMA) wurde nach der Vorschrift aus der Dissertation von [REDACTED].¹⁴⁸ Methacryloylchlorid wurde mit 1,6-Hexandiol im Überschuss in trockenem THF mit Triethylamin als Hilfsbase umgesetzt. Es wurde mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

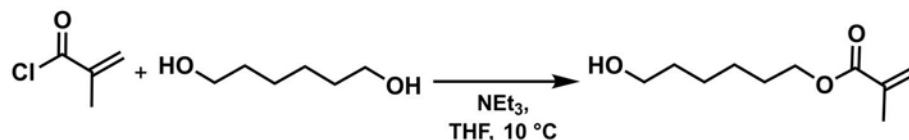


Abbildung 18: Synthese des Hydroxyhexylmethacrylat (HHMA).

Das so erhaltene HHMA Monomer wurde mittels ¹H-NMR Spektroskopie charakterisiert (Abbildung 19).

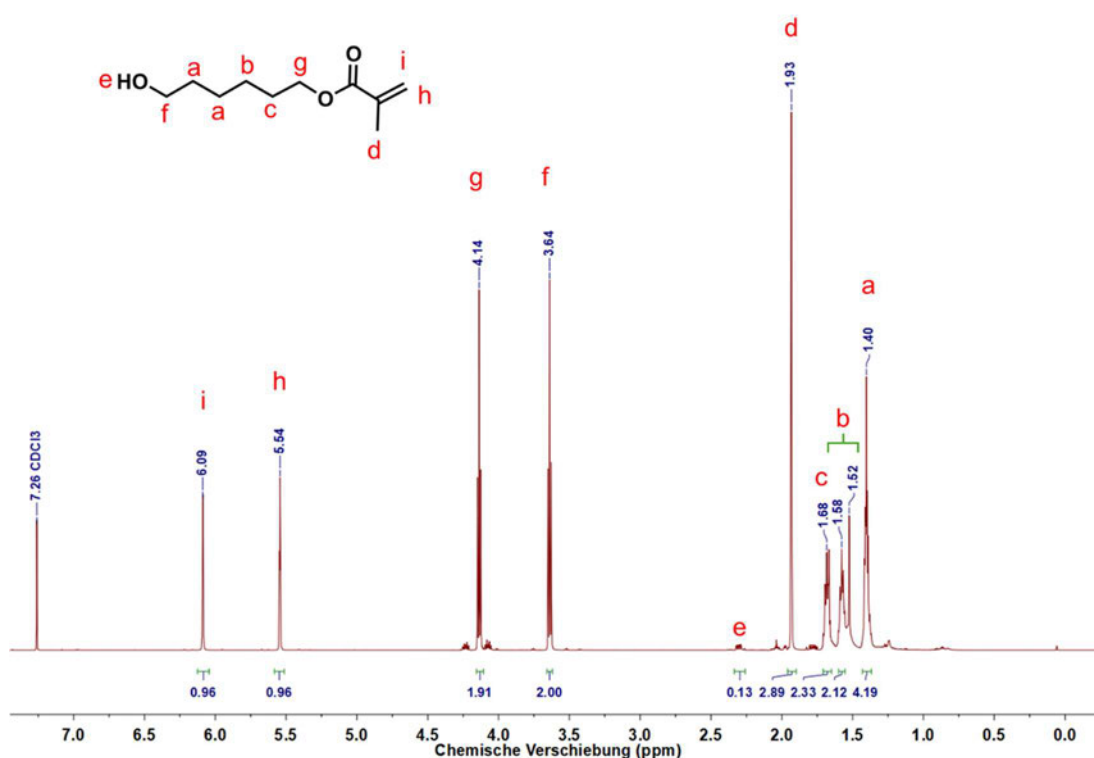


Abbildung 19: ¹H-NMR Spektrum von Hydroxyhexylmethacrylat (HHMA) (CDCl₃, 400 MHz).

3.2.4. Synthese des Azid-funktionalisierten

Kettentransferreagenz 1-Azido-25-cyano-22-oxo-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxa-24-azaheptacosan-28-yl-benzodithioat (Azid-CTA)

Das für die RAFT-Polymerisationen verwendete Kettentransferreagenz wurde in einer zweistufigen Synthese ausgehend von 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)-sulfanyl)pentansäure, im Folgenden als Säure-CTA bezeichnet, erhalten. Die Synthese erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Nuhn et al.¹⁵³ Für alle in dieser Arbeit hergestellten Polymere wurde dieser Azid-CTA als Kettentransferreagenz eingesetzt.

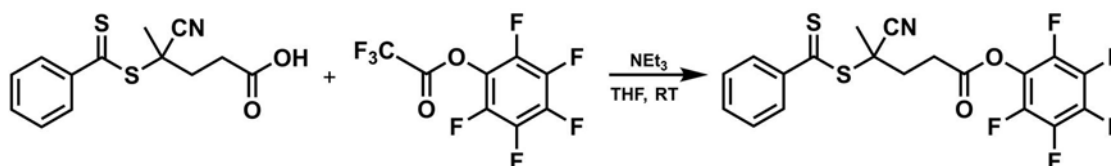


Abbildung 20: Synthese des Pentafluorphenyl-CTA/ PFP-CTA (4-Cyano-4-((thiobenzoyl)-sulfanyl)-pentansäure-pentafluorphenylester).

In dem ersten Schritt wird in einer basisch katalysierten Veresterung der aktivierte Pentafluorphenylester mit dem Säure-CTA zum PFP-CTA (4-Cyano-4-((thiobenzoyl)-sulfanyl)-pentansäure-pentafluorphenylester) umgesetzt. Die so eingeführte endständige Pentafluorphenylestergruppe erhöht die Elektrophilie des Moleküls. Die Carbonylgruppe kann in einem zweiten Reaktionsschritt somit leichter nukleophil angegriffen werden. Nach der säulenchromatographischen Aufreinigung wurde ein dunkelrotes Pulver mit einer Ausbeute von 41% erhalten.

Die Charakterisierung des PFP-CTAs erfolgte durch ¹H- und ¹⁹F-NMR Spektroskopie, die Zuordnungen der Signale können der Abbildung 21 und Abbildung 22 entnommen werden.

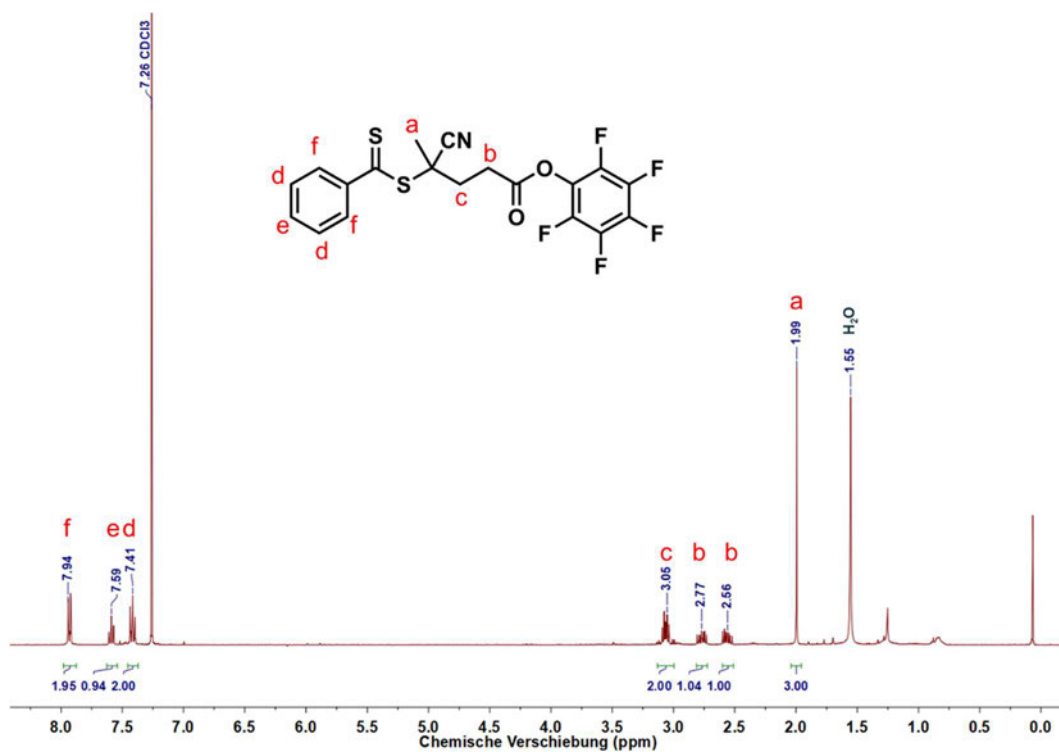


Abbildung 21: ^1H -NMR Spektrum des Pentafluorophenyl-CTAs (4-Cyano-4-((thiobenzoyl)-sulfanyl)-pentansäure-pentafluorphenylester) (CDCl_3 , 400 MHz).

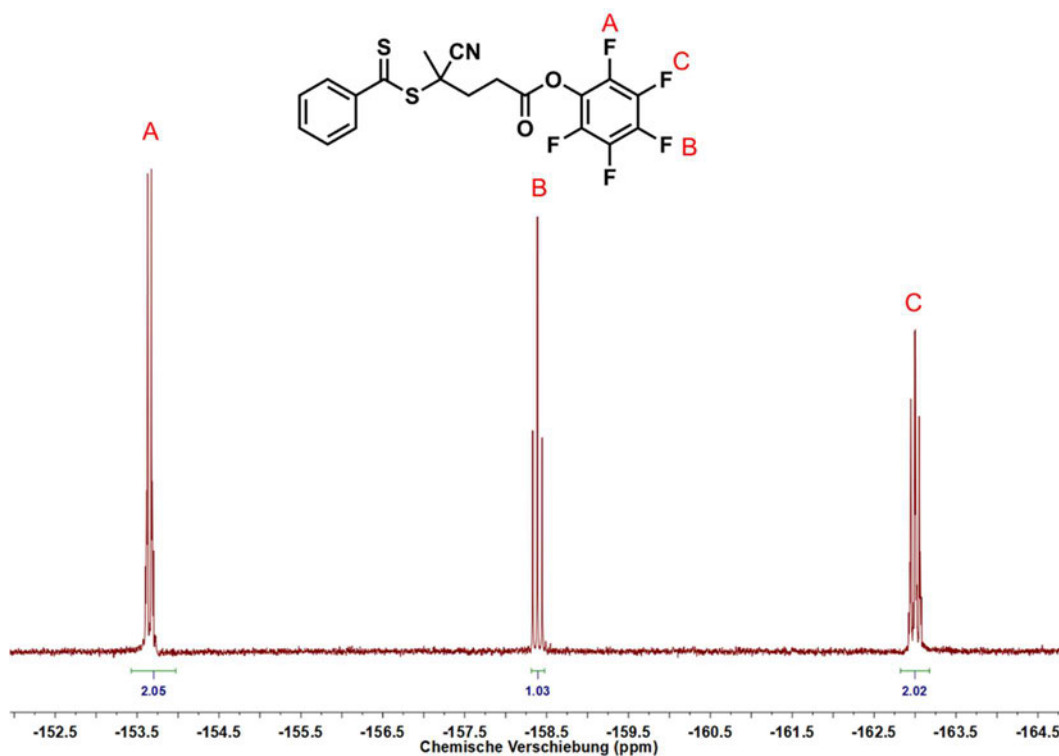


Abbildung 22: ^{19}F -NMR Spektrum des Pentafluorophenyl-CTAs (4-Cyano-4-((thiobenzoyl)-sulfanyl)-pentansäure-pentafluorphenylester) (CDCl_3 , 400 MHz).

Im zweiten Schritt wurde der Azid-CTA durch das Umsetzen des Pentafluorphenylaktivester-CTAs mit einem azidfunktionalisierten PEGylierten Amin und Triethylamin als Hilfsbase erhalten.

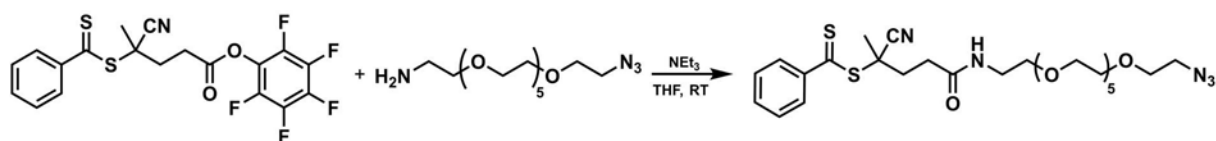


Abbildung 23: Synthese des Azid-CTAs (1-Azido-25-cyano-22-oxo-3,6,9,12,15,18,21-hepta-oxa-24-azaheptacosan-28-yl-benzodithioat).

Anschließend wurde der Azid-CTA säulenchromatographisch aufgearbeitet und in einer Ausbeute von 39% erhalten. Die erfolgreiche Umsetzung wurde anhand von ^1H -NMR Spektroskopie nachgewiesen (Abbildung 24).

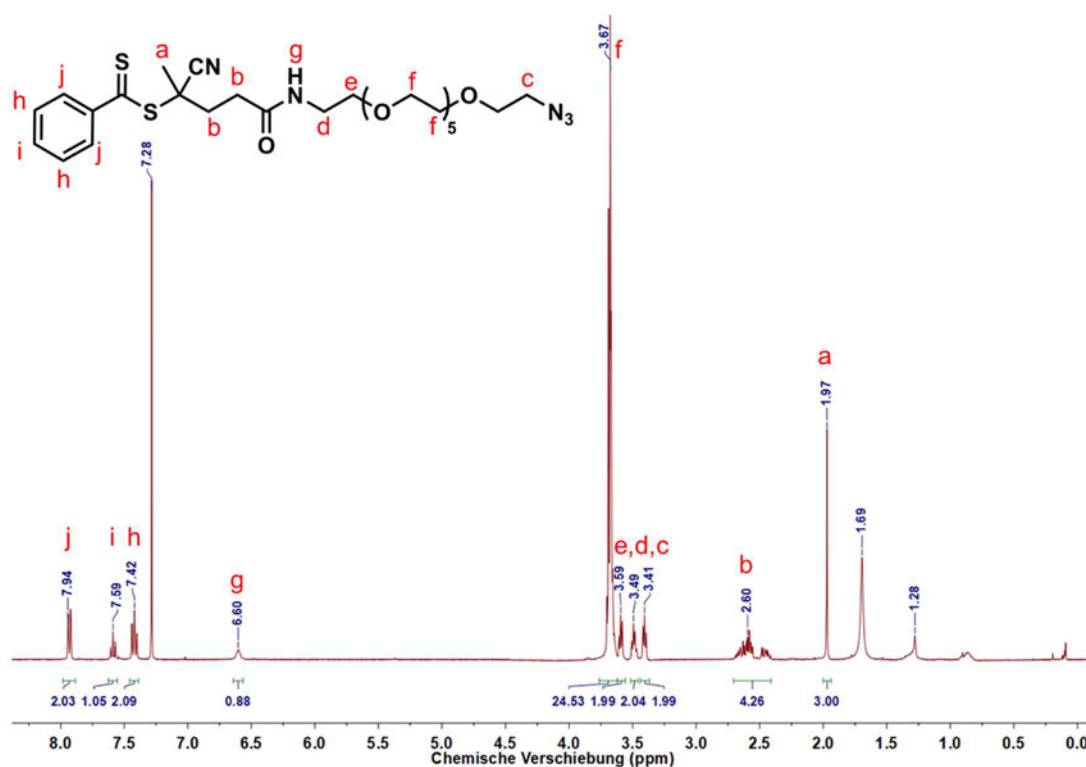


Abbildung 24: ^1H -NMR Spektrum des Azid-CTAs (1-Azido-25-cyano-22-oxo-3,6,9,12,15,18,21-hepta-oxa-24-azaheptacosan-28-yl-benzodithioat (CDCl_3 , 400 MHz).

Die Signale im ^{19}F -NMR konnten auf die gleiche Weise zugeordnet werden, wie bereits in Abbildung 22 des PFP-CTAs.

3.3. RAFT-Polymerisation

Der Polymerisationsgrad X_n ist bei der RAFT-Polymerisation von dem Stoffmengenverhältnis des Monomers $[M_0]$ zu CTA $[CTA_0]$ und vom Umsatz der Polymerisation p abhängig (Gleichung 1). Dadurch lassen sich gezielt Polymere mit den gewünschten Kettenlängen und Molekulargewichten herstellen.

$$X_n = p \cdot \frac{[M_0]}{[CTA_0]}$$

Gleichung 1

Die Berechnung des Molekulargewichts des gewünschten Polymers M_n erfolgt in Abhängigkeit des Polymerisationsgrads X_n , den Molmassen des Monomers ($M_{Monomer}$) und des CTAs (M_{CTA}).

$$M_n = X_n \cdot M_{Monomer} + M_{CTA}$$

Gleichung 2

Um die Monomer- und CTA-Konzentrationen für ein Polymer mit dem gewünschten Molekulargewicht berechnen zu können, werden die Gleichungen 1 und 2 miteinander kombiniert:

$$M_n = p \cdot \frac{[M_0]}{[CTA_0]} \cdot M_{Monomer} + M_{CTA}$$

Gleichung 3

3.3.1. RAFT-Polymerisation von P(PFPMA)

Die finalen DHPMA-Polymere benötigen einen hydrophilen Gewichtsanteil f von $(35 \pm 10\%)^{26}$ um Polymersome bilden zu können, darum muss der initiale PFPMA-Block eine relativ kurze Länge haben. Experimentell erwies sich eine Kettenlänge von ca. 25 Wiederholungseinheiten als besonders gut geeignet. Das liegt daran, dass im zweiten Polymerisationsschritt die Polymerisation der LMA Monomere auf P(PFPMA) Polymere nur kurze LMA-Blöcke liefert. Auch durch einen großen Überschuss an LMA Monomer und verlängerten Reaktionszeiten konnte, bei Verwendung des Azid-CTAs,

kein größerer LMA-Block erhalten werden. Zu kurze LMA-Blocklängen führen dazu, dass das zur Polymersom Bildung benötigte hydrophob zu hydrophil Verhältnis der Polymere nicht erreicht wird.

Im Falle der RAFT-Polymerisation dieser kurzen P(PFPMA) Polymere, zeigte sich die üblicherweise verwendete Ansatzberechnung aus Gleichung 3 als ungeeignet. Das P(PFPMA) Polymer (H7) wurde zum Beispiel so berechnet, dass bei einem 50% Umsatz der Polymerisation eine Kettenlänge von 25 Wiederholungseinheiten erhalten wird. Im Experiment zeigte sich, dass ein solcher Ansatz zu einer Kettenlänge von 43 führt (Tabelle 1). Aus diesem Grund wurden in mehreren Anläufen die Reaktionsbedingungen und die Monomer-Konzentrationen angepasst, bis ein geeigneter Ansatz gefunden wurde.

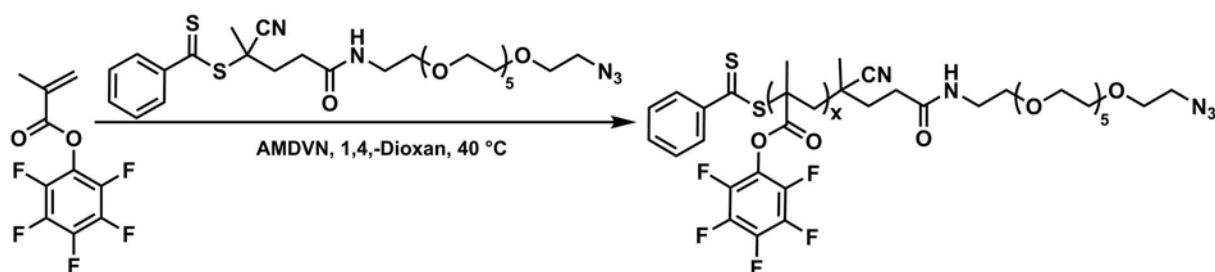


Abbildung 25: RAFT-Polymerisation von P(PFPMA)_x.

Die Polymerisation der PFPMA Monomere mit dem azid-funktionalisierten Kettentransferreagenz erfolgte mittels RAFT. Als Initiator diente das bei tiefen Temperaturen (40°C) spaltbare 2,2'-Azobis-(4-methoxy-2,4-dimethyl-valeronitril) (AMDVN). Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit von PFPMA ist es wichtig, unter Ausschluss von Wasser zu arbeiten.

Aus dem Umsatz der Polymerisation p ergab sich der Polymerisationsgrad der erhaltenen P(PFPMA) Polymere. Diese konnten mittels ^{19}F -NMR Spektroskopie ermittelt werden. (Abbildung 26). Dafür wurden die Integrale der *para*-ständigen Fluor-Signale des Polymers (breiteres Signal) und des Monomers, wie in Gleichung 4 gezeigt, ins Verhältnis gebracht. Der Umsatz zeigt, wie viel Monomer im Verhältnis zur Ausgangsmenge an Monomer polymerisiert ist.

$$p = \frac{\int \text{Polymer}}{\int \text{Polymer} + \int \text{Monomer}}$$

Gleichung 4

Man setzt die Integrale wie folgt ein:

$$p = \frac{1}{1 + 2.57} = 0,28$$

Es ergibt sich daraus ein Umsatz von 28 Prozent nach 3,5 Stunden für die Polymerisation von PFPMA (H5). Bei diesen Reaktionsbedingungen ließen sich P(PFPMA) Polymere mit Kettenlängen um die 25 reproduzierbar darstellen.

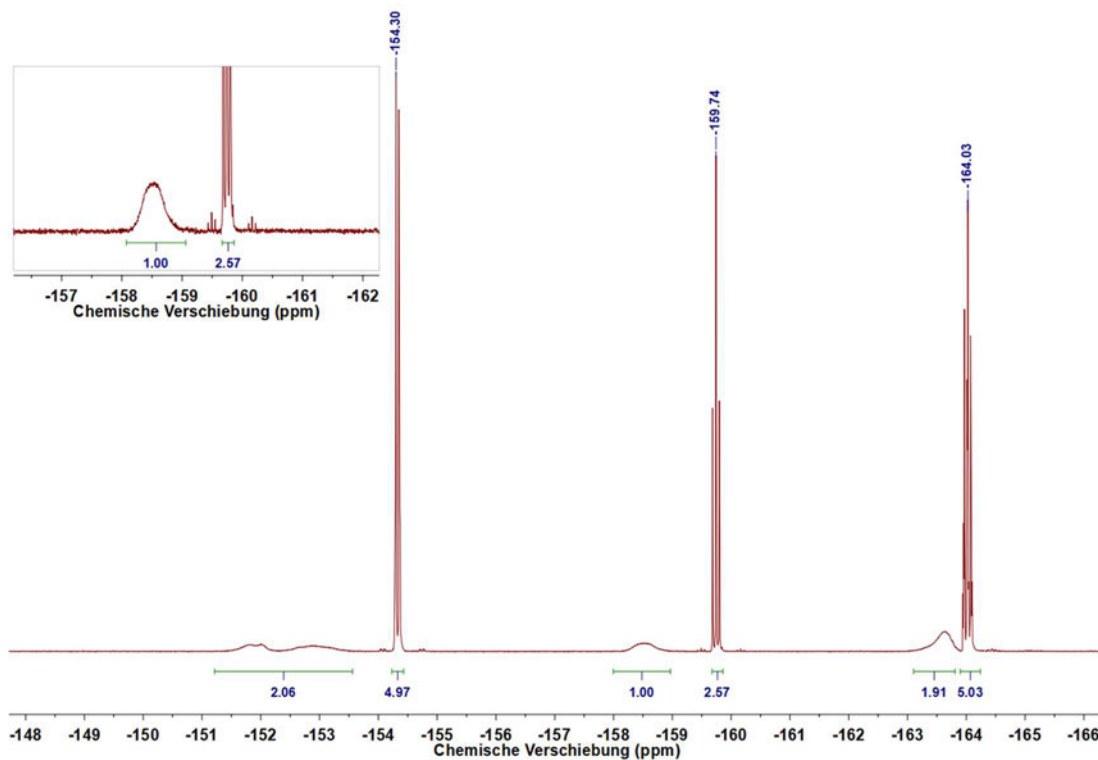


Abbildung 26: ^{19}F -NMR Spektrum als Umsatzkontrolle der Reaktionslösung von P(PFPMA)_{27} (H5) zur Bestimmung des Umsatzes der Polymerisation, (CDCl_3 , 400 MHz).

Die synthetisierten P(PFPMA) Homopolymere und die dazugehörigen Molekulargewichte sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: P(PFPMA)_x Homopolymere

Polymer	Kettenlänge	Molekulargewicht M _n * [g/mol]	Đ
H1	P(PFPMA) ₃₅	9580 (UV) 10210 (RI)	1.35 1.35
H2	P(PFPMA) ₂₅	7040 (UV) 7480 (RI)	1.37 1.38
H3	P(PFPMA) ₃₄	8570 (UV) 7600 (RI)	1.30 1.32
H4	P(PFPMA) ₃₈	10110 (UV) 9010 (RI)	1.40 1.43
H5	P(PFPMA) ₂₇	7440 (UV) 6680 (RI)	1.30 1.32
H6	P(PFPMA) ₂₇	7470 (UV) 6780 (RI)	1.45 1.47
H7	P(PFPMA) ₄₃	11450 (UV) 10410 (RI)	1.31 1.32
H8	P(PFPMA) ₂₃	6550 (UV) 5850 (RI)	1.30 1.31
H9	P(PFPMA) ₂₄	6800 (UV) 5980 (RI)	1.29 1.31

* Das Molekulargewicht wurde aus den GPC-Messungen mit THF als Elutionsmittel erhalten. Die angegebenen Kettenlängen wurden auf Basis der THF-GPC Daten berechnet.

Die Charakterisierung der erhaltenen P(PFPMA) Polymere erfolgte mittels ¹H-NMR Spektroskopie (Abbildung 29), ¹⁹F-NMR Spektroskopie (Abbildung 28) und THF-GPC (Abbildung 27).

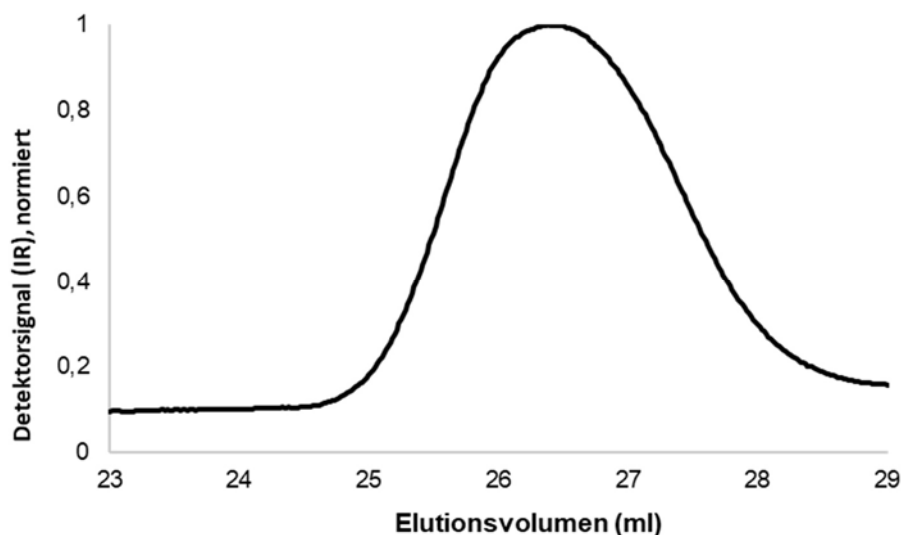


Abbildung 27: Elugramm der THF-GPC von P(PFPMA)₂₅ (H2).

Aufgrund der kurzen Blocklängen der P(PFPMA) Polymere weisen diese im Elugramm der THF-GPC eine breitere Molekulargewichtsverteilung auf als P(PFPMA) Polymere mit einer Blocklänge von etwa 50 Einheiten.

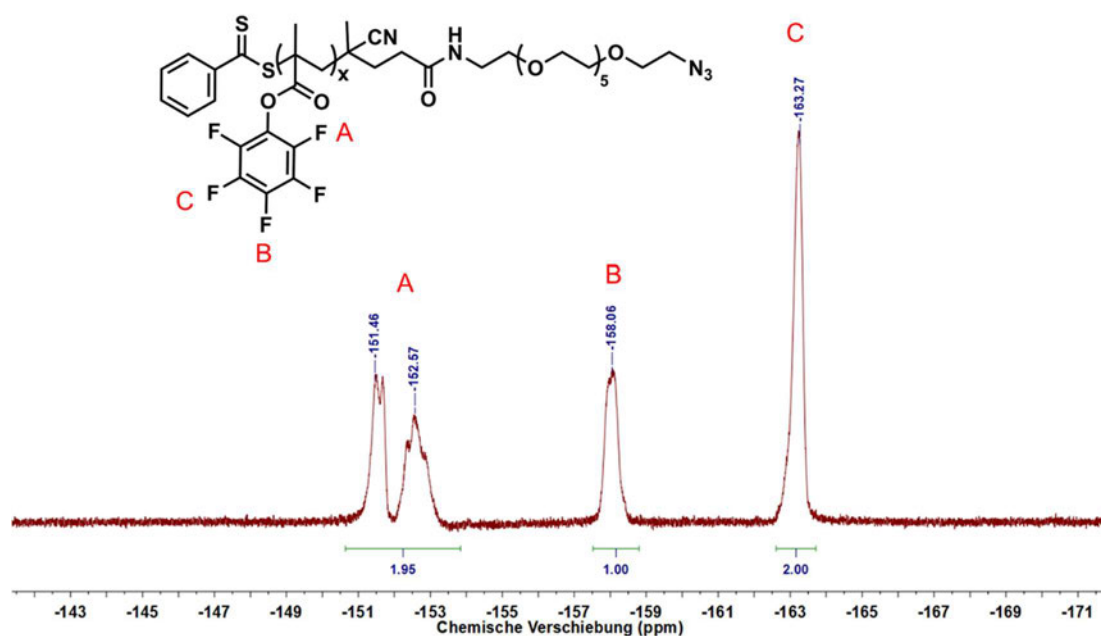


Abbildung 28: ¹⁹F-NMR Spektrum von P(PFPMA)₂₃ (H8), (CDCl₃, 400 MHz).

In dem ^{19}F -NMR Spektrum sind die charakteristischen *meta*- (-163.27 ppm), *para*- (-158.06 ppm) und *ortho*-ständigen (-153.84 ppm bis -150.70 ppm) Fluor-Signale des PFPMA's erkennbar. Das NMR-Spektrum von Polymeren zeigt typischerweise verbreitete Signale, verglichen mit den Signalen des Monomers.

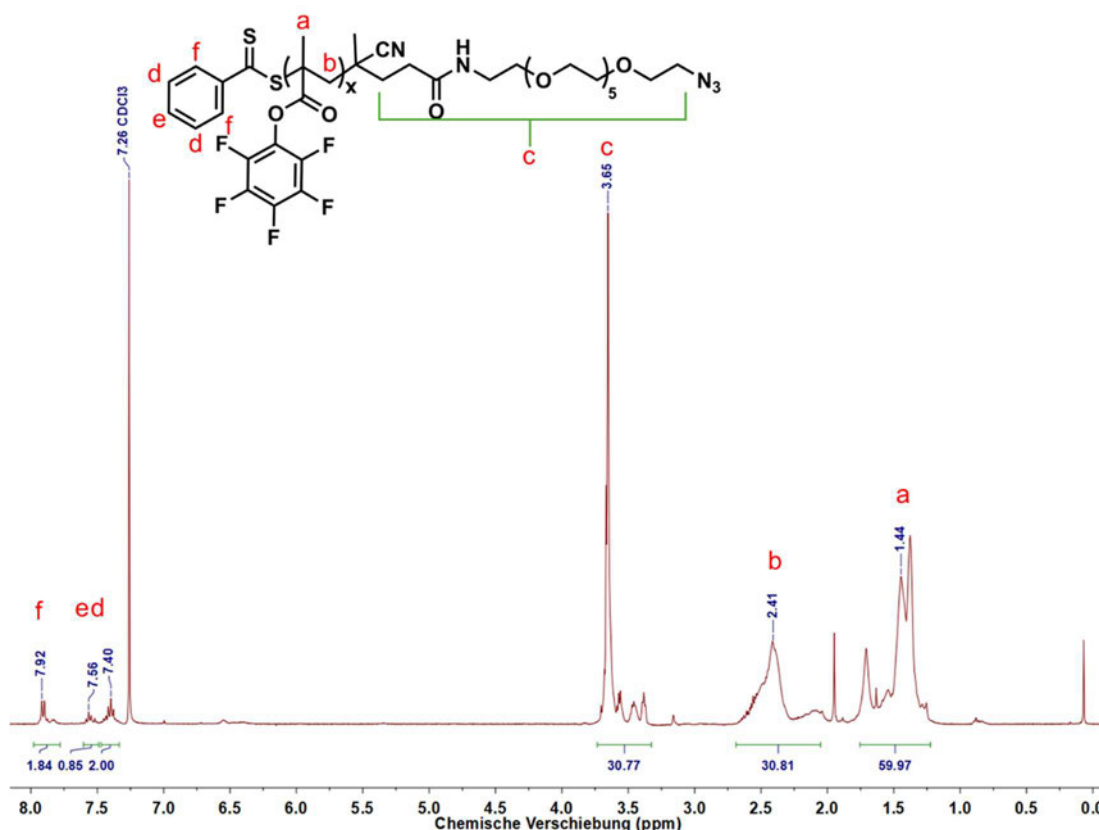


Abbildung 29: ^1H -NMR Spektrum vom Polymer P(PFPMA)₂₃ (H8), (CDCl_3 , 400 MHz).

Im ^1H -NMR Spektrum von P(PFPMA) entsprechen die Signale mit einer chemischen Verschiebung von 1.24 ppm bis 1.76 ppm der Methylgruppe und die Signale bei 2.05 ppm bis 2.67 ppm der Methylengruppe der sich wiederholenden PFPMA-Einheiten. Die 30 aliphatischen Wasserstoffatome des CTAs können der chemischen Verschiebung von 3.32 ppm bis 3.73 ppm zugeordnet werden. Die drei Signale von δ 7.92 bis 7.40 ppm entsprechen den fünf aromatischen Protonen der CTA-Gruppe. Hieraus kann geschlossen werden, dass die CTA-Endgruppe nach der RAFT-Reaktion intakt ist und das Polymer als Makro-CTA für die Polymerisation eines zweiten Blocks verwendet werden kann. Dies unterstreicht den lebenden Charakter der RAFT-Polymerisation.

3.3.2. RAFT-Polymerisation der Laurylmethacrylat

Diblockcopolymere

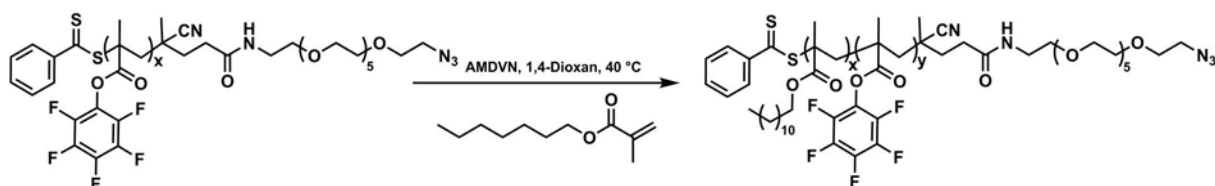


Abbildung 30: Polymerisation von $P(\text{PFPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_y$.

Auf Basis der im ersten Schritt erhaltenen $P(\text{PFPMA})$ Homopolymere wurde als zweiter Block Laurylmethacrylat (LMA) polymerisiert. Der Makro-CTA wurde mit dem Monomer LMA und dem Tieftemperatur-Initiator AMDVN bei 42°C mittels RAFT-Polymerisation umgesetzt. Die so erhaltenen $P(\text{PFPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_y$ Diblock-Copolymere wurden mittels THF-GPC und $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie charakterisiert. Die erhaltenen Diblock-Copolymere und die dazugehörigen Molekulargewichte sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: $P(\text{PFPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_y$ Diblock Polymere mit Molekulargewichten und Polydispersitäten

Polymer	Zusammensetzung*	Molekulargewicht M_n^* [g/mol]	$\bar{D}$	Makro-CTA
L1	$P(\text{PFPMA})_{35}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_{41}$	18830	1.29	H1
L2	$P(\text{PFPMA})_{25}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_{28}$	11770	1.24	H2
L3	$P(\text{PFPMA})_{34}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_{13}$	11930	1.25	H3
L4	$P(\text{PFPMA})_{27}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_{27}$	14470	1.16	H5
L5	$P(\text{PFPMA})_{23}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_{21}$	11970	1.15	H8
L6	$P(\text{PFPMA})_{24}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_{25}$	13300	1.22	H9

*Die Zusammensetzungen wurden mittels THF-GPC abgeleitet.

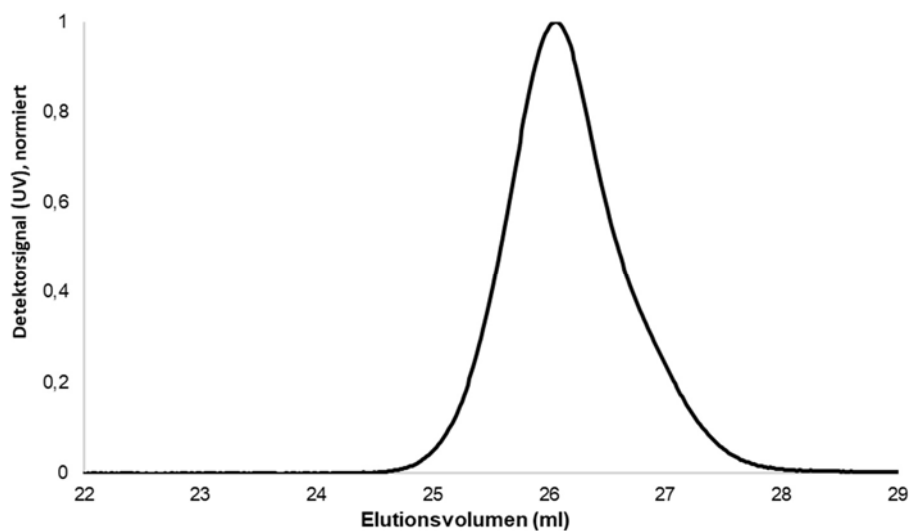


Abbildung 31: Elugramm der THF-GPC des Diblockpolymers.

Zusätzlich zu dem Molekulargewicht M_n , das mittels THF-GPC ermittelt wurde, kann das Molekulargewicht der $P(\text{PFPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_y$ Diblockpolymere mit ^1H -NMR Spektroskopie bestimmt werden.

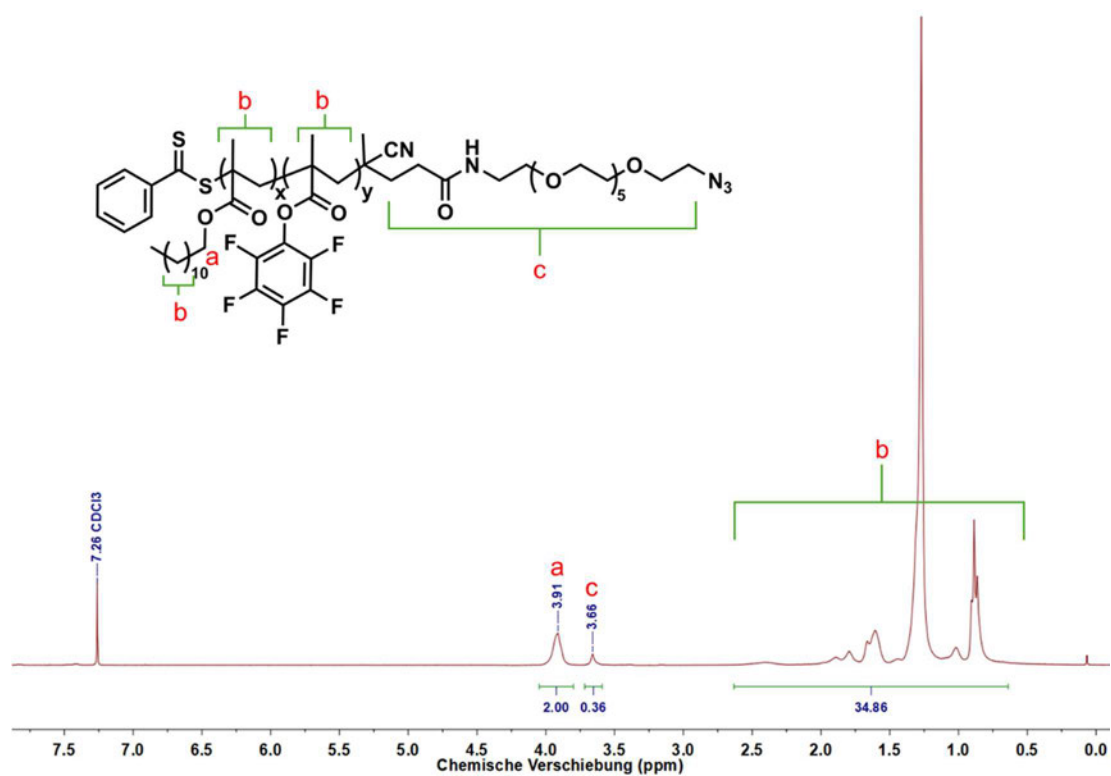


Abbildung 32: ^1H -NMR Spektrum von $P(\text{PFPMA})_{27}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_{27}$ (L4), (CDCl_3 , 400 MHz).

Dem ^1H -NMR Spektrum (Abbildung 32) konnten die charakteristischen Signale des Polymers zugeordnet werden. Das Signal (a) bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 3.91$ ppm entspricht der α -Methylengruppe der LMA-Einheiten, da es zwei Protonen entspricht wurde es auf 2 integriert. Das Signal (b) bei $\delta = 3.66$ ppm kann den Signalen der PEG-Einheiten des eingesetzten Azid-CTAs zugeordnet werden. Die Signale des Polymerrückrates und die restlichen 23 Protonen der Lauryl-Seitenkette können im Bereich von $\delta = 0.63 - 2.62$ ppm (b) mit einem Integral von 34.86 gefunden werden. Um das Verhältnis der PFPMA-Einheiten zu den LMA-Einheiten zu ermitteln, werden die 28 Protonen der Lauryleinheit, die sich im Bereich des Integrals (b) befinden, von diesem Integral abgezogen. Der Anteil des Integrals nach der Subtraktion von 28 Protonen beinhaltet dann die fünf Protonen des PFPMA-Rückgrats. Der erhaltene Wert des Integrals wird durch fünf geteilt und gibt das Verhältnis der Anzahl an PFPMA-Einheiten pro LMA-Einheit an. Somit können die Polymerisationsgrade X_n durch die nachfolgende Gleichung 5 berechnet werden.

$$\frac{X_n(\text{PFPMA})}{X_n(\text{LMA})} = \frac{34.86 - 28}{5} = 1.4$$

Gleichung 5: Verhältnis der Polymerisationsgrade X_n .

So ergibt sich nach umstellen der Gleichung nach $X_n(\text{LMA})$ für das Polymer L4 ein Polymerisationsgrad von 19 LMA-Einheiten.

3.3.3. Statistische RAFT-Polymerisation von LMA und DDEMA Monomeren als zweiten Block

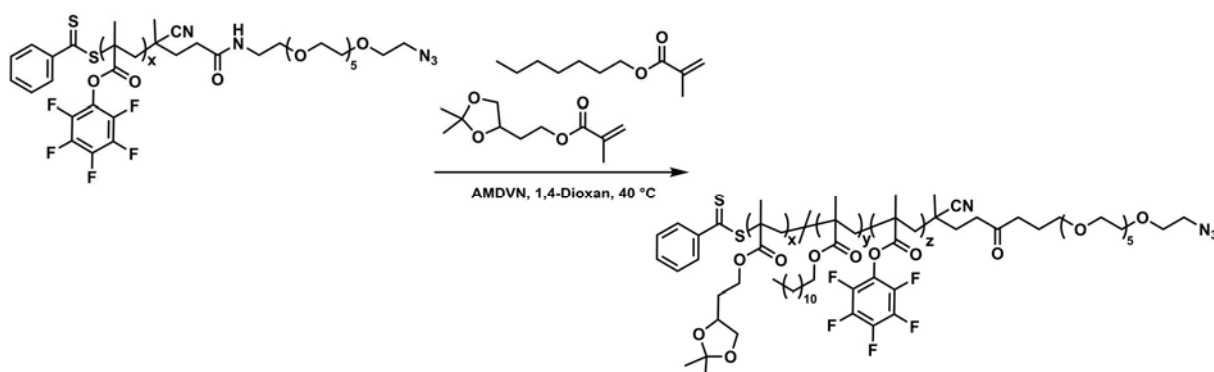


Abbildung 33: Polymerisation von $P(\text{PFPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_y\text{-stat-DDEMA}_z)$.

Als weiterer Baustein wird das Ketalmonomer DDEMA statistisch in den LMA-Block des Polymers eingebaut. Die so in den hydrophoben Block eingeführte Ketalgruppe hydrolysiert bei einer Absenkung des pH-Wertes zur Hydroxylgruppe unter Abspaltung von Aceton. Dadurch wird die Polarität des hydrophoben Blocks erhöht und der Block wird hydrophiler. Geschieht die Spaltung der Ketalgruppe im assemblierten Polymersom, wird die Anordnung der Doppelschichtmembran gestört. Die Membran wird durchlässiger und der Partikel instabiler, so können eingekapselte Substanzen aus dem Inneren der Polymersome erleichtert freigesetzt werden. In der Zelle herrscht während der Aufnahme der Polymersome ein pH-Gefälle, deshalb kann die Ketalgruppe beim Zelltransport hydrolysiert werden.

Auf Basis der im ersten Schritt erhaltenen $P(\text{PFPMA})$ Homopolymere erfolgte die statistische Polymerisation des zweiten Blockes mit Laurylmethacrylat (LMA) und 2-(2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethylmethacrylat (DDEMA). Der Makro-CTA wurde mit den Monomeren LMA, DDEMA und dem Tieftemperatur-Initiator AMDVN bei 42 °C mittels RAFT-Polymerisation umgesetzt. Die so erhaltenen Diblocke $P(\text{PFPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_y\text{-stat-DDEMA}_z)$ wurden durch THF-GPC und $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie charakterisiert.

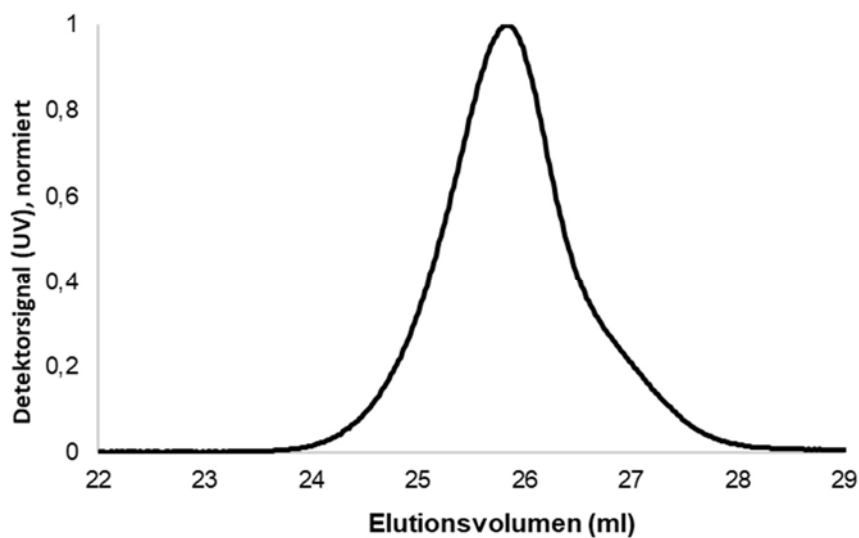


Abbildung 34: THF-GPC von $P(\text{PFPMA})_{27}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{21}\text{-}stat\text{-DDEMA}_8)$ (D4).

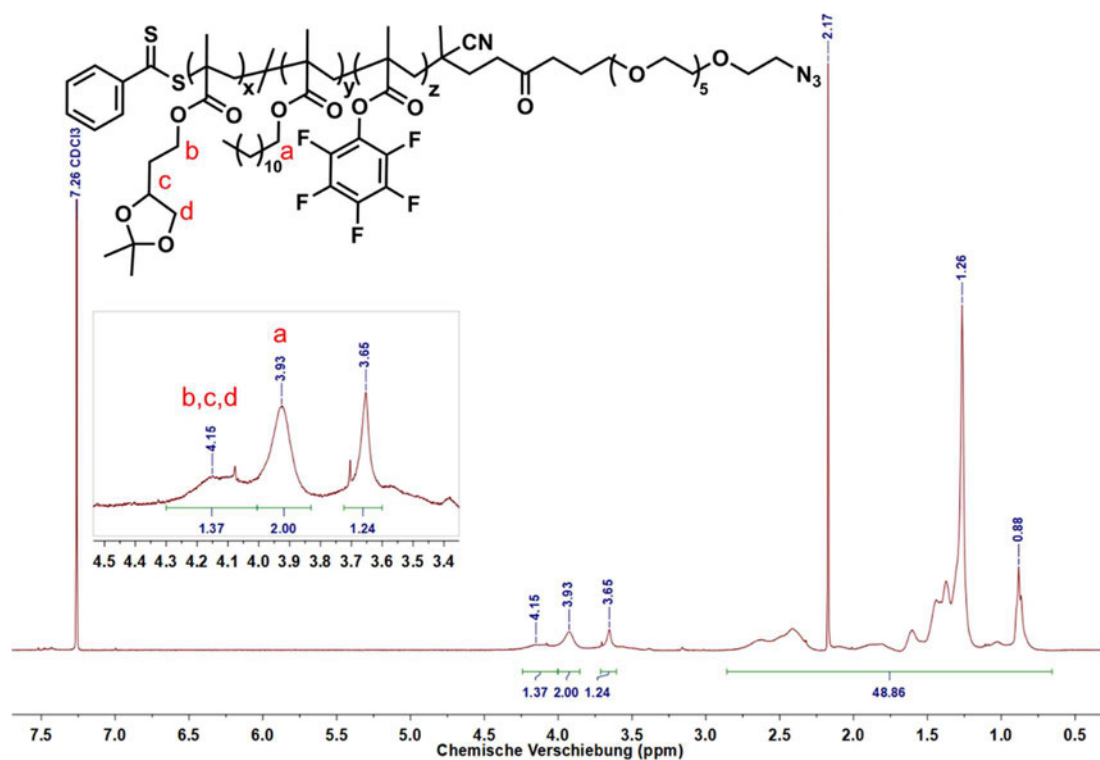


Abbildung 35: ^1H -NMR Spektrum von $P(\text{PFPMA})_{27}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{21}\text{-}stat\text{-DDEMA}_8)$ (D4), (CDCl_3 , 400 MHz).

Im ^1H -NMR Spektrum können charakteristische Signale der Lauryl- und Dioxolan-Einheit zugeordnet werden. Darüber ist es möglich ein Verhältnis der statistisch copolymerisierten Einheiten zu erhalten.

Wie bereits im ^1H -NMR Spektrum von $\text{P}(\text{PFPMA})_{27}\text{-}b\text{-P}(\text{LMA})_{27}$ (L4) (Abbildung 32), entspricht das Signal (a) bei $\delta = 3.91$ ppm, der α -Methylengruppe der Lauryl-Einheit und wurde auf zwei Protonen normiert. Das breite Signal bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 4.02 - 4.26$ ppm entspricht den vier Protonen der DDEMA Einheit. Dieses Signal setzt sich zusammen aus der α -Methylengruppe (b), der Methingruppe (c), des Dioxolans und einem Proton der Methylengruppe (d) des heterocyclischen Fünfrings. Indem man das Integral des Signals (b,c,d) durch vier teilt erhält man die Anzahl an DDEMA Einheiten pro LMA Einheit.

$$\frac{1,37}{4} = 0,34$$

Daraus folgt, dass pro LMA-Einheit 0,34 DDEMA-Einheiten vorhanden sind. Das für die Polymerisation gewählte Stoffmengenverhältnis waren 0,77 DDEMA-Einheiten pro LMA-Einheit. Daher lässt sich ableiten, dass im Verhältnis mehr LMA Monomere als DDEMA Monomere in die Polymerkette aufgenommen wurden. Im Vergleich zur homogenen Polymerisation von LMA als zweiten Block des Diblock-Copolymers, erhielt man bei gleichen Reaktionszeiten einen höheren Polymerisationsgrad bei der statistischen Copolymerisation von LMA und DDEMA. Der erhaltene zweite Block ist dabei um etwa 3000 g/mol größer, obwohl nur ungefähr die Hälfte an LMA-Äquivalenten eingesetzt wurde.

Eine Übersicht der erhalten statistischen Copolymere ist in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: P(PFPMA)_x-*b*-P(LMA_y-*stat*-DDEMA_z) Polymere mit Molekulargewichten und Polydispersitäten.

Polymer	Zusammensetzung*	Molekulargewicht M _n * [g/mol]	Đ	Makro-CTA
D1	P(PFPMA) ₃₅ - <i>b</i> - P(LMA ₅₁ - <i>stat</i> - DDEMA ₂₀)	27440 (RI) 21671 (UV)	1.25 1,41	H1
D2	P(PFPMA) ₂₅ - <i>b</i> - P(LMA ₁₆ - <i>stat</i> - DDEMA ₆)	12787 (RI) 13804 (UV)	1.19 1.21	H2
D3	P(PFPMA) ₃₃ - <i>b</i> - P(LMA ₃₀ - <i>stat</i> - DDEMA ₁₂)	17744 (RI) 16767 (UV)	1.21 1,33	H3
D4	P(PFPMA) ₂₇ - <i>b</i> - P(LMA ₂₁ - <i>stat</i> - DDEMA ₈)	13523 (RI) 14450 (UV)	1.20 1.22	H4

*Die Zusammensetzungen wurden mittels THF-GPC abgeleitet.

Es fällt auf, dass die Polydispersitäten Đ der statistischen Copolymere eine engere Verteilung aufweisen als die der eingesetzten Homopolymere. Das kann an der engeren Verteilung bei der Polymerisation des zweiten Blocks liegen, gleichzeitig wird der Anteil oligomerer Strukturen und Polymere mit sehr niedrigem Polymerisationsgrad mit jedem weiteren Fällungsschritt verringert.

3.3.4. Statistische RAFT-Polymerisation der LMA, DDEMA und HHMA Monomeren als zweiten Block

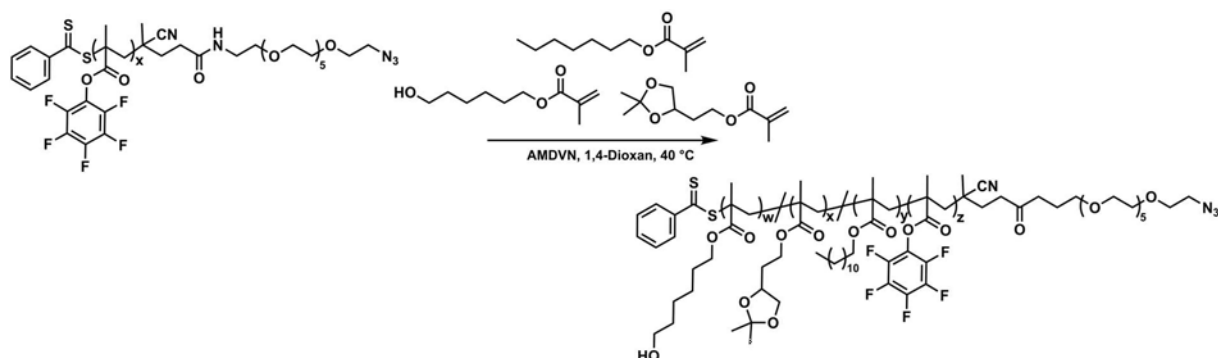


Abbildung 36: Polymerisation von P(PFPMA)_x-b-P(LMA_y-stat-DDEMA_z-stat-HHMA_w).

Als dritte Variation wurde bei der statistischen Polymerisation der LMA-Einheiten, zusätzlich zum DDEMA das Monomer HHMA eingesetzt. Dadurch hat der hydrophobe Block zusätzlich HHMA als Bestandteil. Die relativ lange Alkylkette der HHMA-Einheiten, ist ähnlich der Alkylkette des LMAs. Deshalb passt die zusätzliche HHMA-Einheit gut in den hydrophoben Block des Polymers. Die Hydroxygruppe am Ende der Alkylkette unterstützt durch ihre Polarität die Hydrolyse des DDEMA-Ketals.

Ausgehend von den im ersten Schritt erhaltenen P(PFPMA) Homopolymeren wird der zweite Block aus LMA, DDEMA und HHMA polymerisiert. Der Makro-CTA wurde mit den Monomeren LMA, DDEMA, HHMA und dem Tieftemperatur-Initiator AMDVN bei 42 °C mittels RAFT-Polymerisation umgesetzt. Die so erhaltenen P(PFPMA)_x-b-P(LMA_y-stat-DDEMA_z-stat-HHMA_w) Copolymere wurden durch THF-GPC und ¹H-NMR Spektroskopie charakterisiert.

Im ¹H-NMR Spektrum können charakteristische Signale der Lauryl- und Hydroxyhexyl-Einheit zugeordnet werden. Darüber ist es möglich, ein Verhältnis der statistisch copolymerisierten Einheiten zu erhalten.

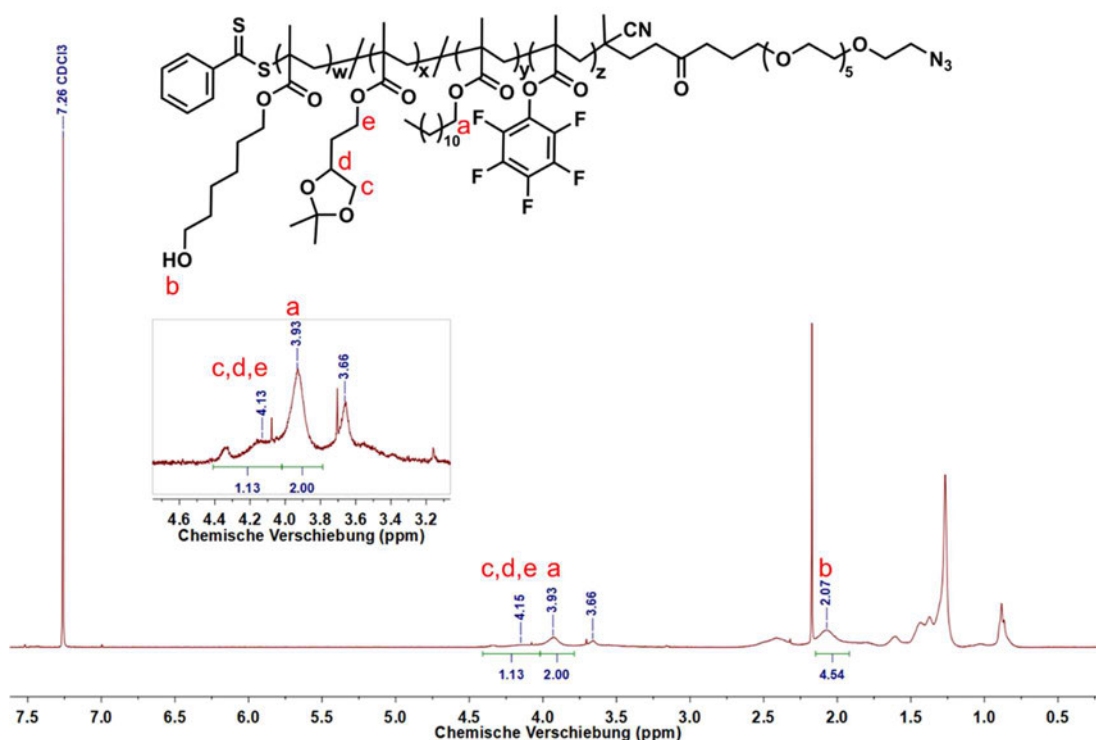


Abbildung 37: ¹H-NMR-Spektrum von P(PFPMA)_x-b-P(LMA_y-stat-DDEMA_z-stat-HHMA_w) (HH3) (CDCl₃, 400 MHz).

Wie bereits im ¹H-NMR Spektrum von P(PFPMA)₂₇-b-P(LMA)₂₇ (L4) (Abbildung 32), entspricht das Signal (a) bei δ = 3.91 ppm, der α-Methylengruppe der Lauryl-Einheit und wurde auf zwei Protonen normiert. Das Signal b bei einer chemischen Verschiebung von δ = 2.05 ppm entspricht einem Proton der Hydroxygruppe der Hydroxyhexyl-Einheit. Das breite Signal c,d,e, bei einer chemischen Verschiebung von δ = 4.04 – 4.41 ppm, entspricht vier Protonen der DDEMA-Einheit. Dieses Signal besteht aus der α-Methylengruppe (b), der Methingruppe (c) des Dioxolans und einem Proton der Methylengruppe (d) des heterocyclischen Fünfrings. Indem man das Integral des Signals (b,c,d) durch vier teilt erhält man die Anzahl an DDEMA Einheiten pro LMA-Einheit.

$$\frac{1,13}{4} = 0,28$$

Daraus folgt, dass pro LMA-Einheit 0,28 DDEMA-Einheiten vorhanden sind. Dies entspricht in etwa dem Verhältnis von 0,32 bei der Polymerisation von P(PFPMA)_x-b-P(LMA_y-stat-DDEMA_z). Anhand des Signales b zeigt sich, dass die HHMA-Einheiten ebenfalls in das Polymer eingebaut wurden. Das dazugehörige Integral kann nicht

genutzt werden, um das Verhältnis an HHMA im Polymer zu ermitteln. Integrale von Hydroxylgruppen sind aufgrund ihres Protonenaustauschs mit dem Lösungsmittel nicht gut geeignet, um auf Blocklängenverhältnisse zurückzuschließen und zusätzlich dazu liegt eine Überlappung mit dem Lösungsmittelpeak von Dioxan bei 3.70 ppm vor. Durch das ^1H -NMR konnte gezeigt werden, dass alle drei eingesetzten Einheiten im Polymer statistisch copolymerisiert sind.

Im Vergleich zur Polymerisation von nur LMA- auf die PFPMA-Einheiten, bei gleicher Reaktionszeit, erhält man einen größeren Block bei der Copolymerisation in Anwesenheit von DDEMA und HHMA. Der erhaltene zweite Block ist dabei um etwa 2000 g/mol größer, obwohl nur ungefähr die Hälfte an LMA-Äquivalenten eingesetzt wurde. Das deckt sich mit der Copolymerisation von LMA und DDEMA. Der Zusatz einer weiteren Monomer-Art zum LMA erleichtert die Polymerisation von LMA auf den PFPMA basierten Makro-CTA. In vorhergehenden Arbeiten von Martin Scherer (Quelle), wurde LMA erfolgreich, mit hohen Umsätzen und langen Blocklängenverhältnissen auf P(PFPMA) Homopolymere synthetisiert. Die Kinetik dieser Polymerisationen verändert sich stark, wenn wie in dieser Arbeit, statt dem Säure-CTA der Azid-CTA eingesetzt wird. Daraus ergibt sich eine deutlich erschwerte Polymerisation der LMA Monomere auf den PFPMA-Block mit Azid-CTA. Um das benötigte Blocklängenverhältnis zur Polymersomen Bildung zu erhalten, ist es nötig kurze Homopolymere von etwa 24 Einheiten PFPMA zu synthetisieren, da man im darauffolgenden Schritt synthetisch keine langen LMA-Blöcke erhält.

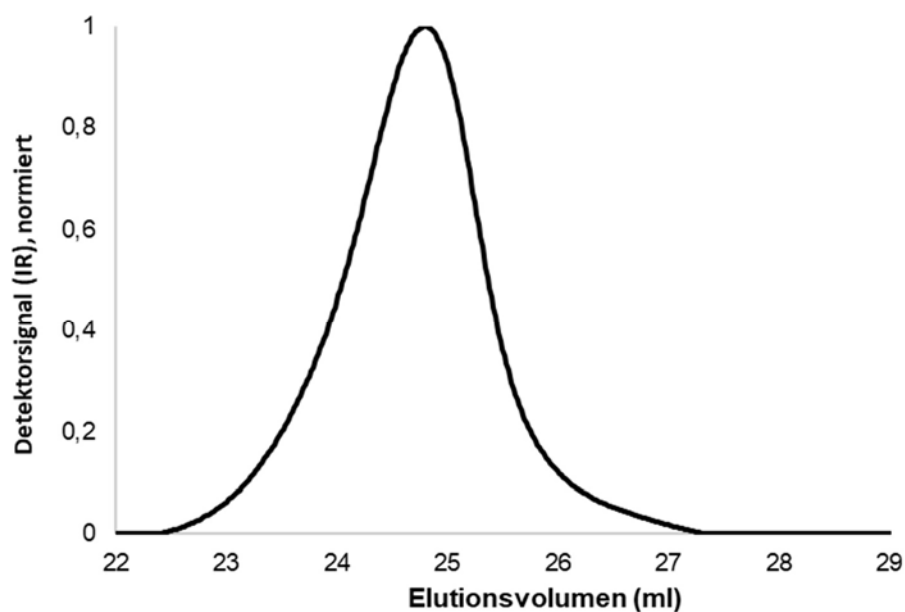


Abbildung 38: THF GPC von $P(\text{PFPMA})_{35}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{49}\text{-stat-DDEMA}_{17}\text{-stat-HHMA}_3)$ (HH1).

Tabelle 4: Polymerzusammensetzung

$P(\text{PFPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_y\text{-stat-DDEMA}_z\text{-stat-HHMA}_w)$

Polymer	Zusammensetzung*	Molekulargewicht M_n^* [g/mol]	$\bar{D}$	Makro-CTA
HH1	$P(\text{PFPMA})_{35}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{49}\text{-stat-DDEMA}_{17}\text{-stat-HHMA}_3)$	26880 (RI) 20840 (UV)	1.27 1,43	H1
HH2	$P(\text{PFPMA})_{33}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{19}\text{-stat-DDEMA}_7\text{-stat-HHMA}_3)$	14500 (RI) 14350 (UV)	1.24 1.31	H3
HH3	$P(\text{PFPMA})_{27}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{24}\text{-stat-DDEMA}_8\text{-stat-HHMA}_3)$	16130 (RI) 16000 (UV)	1.23 1,28	H6

*Die Zusammensetzungen wurden mittels THF-GPC abgeleitet.

3.3.5. Entfernung der Dithiobenzoat-Endgruppe des Azid-CTAs

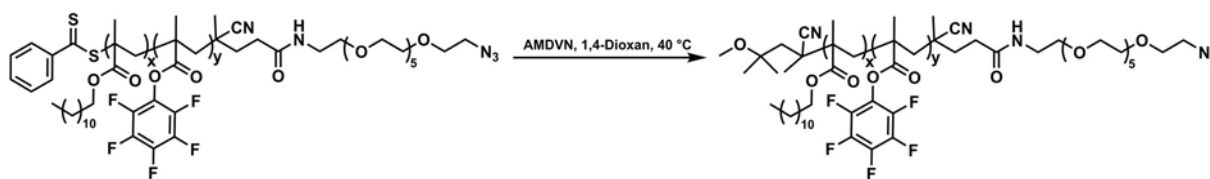


Abbildung 39: Abspaltung der Dithiobenzoatgruppe

Die in den vorhergehenden Abschnitten hergestellten drei Polymervarianten (L,D,HH,) haben durch die Verwendung des Kettentranferreagenz für die RAFT-Polymerisation eine reaktive Dithiobenzoatgruppe am Kettenende. Diese wird vor der polymeranalogen Umsetzung entfernt, um mögliche Nebenreaktionen im nächsten Reaktionsschritt zu verhindern. Dafür werden die Polymere mit einem Überschuss an AMDVN-Initiator (30 Äq) bei 42°C in Dioxan versetzt und über Nacht reagieren gelassen. Um den entstehenden Stickstoff aus der Reaktion zu verdrängen wird Argon durch die Reaktionslösung geleitet. Bei der Umsetzung erfolgt ein Farbumschwung von intensivem rosa zu hellgelb bis farblos. Es wurde ein Überschuss an Initiator von 30 Äquivalenten gewählt, die daraus entstehenden 60 Äquivalente an Radikalfragmenten tauschen statistisch mit der Dithiobenzoatgruppe aus, und ersetzen diese.

3.3.6. Polymeranaloge Umsetzung zu P(DHPMA)_x-b-P(LMA)_y

Die Verwendung von 2,3-Dihydroxypropylamin (DHP) als hydrophiler Block erfolgt auf Basis vorhergehender Arbeiten von Dr. Martin Scherer. In diesen wurde gezeigt, dass es möglich ist, aus LMA- und DHPMA-Blockcopolymeren Polymersome zu assemblieren.

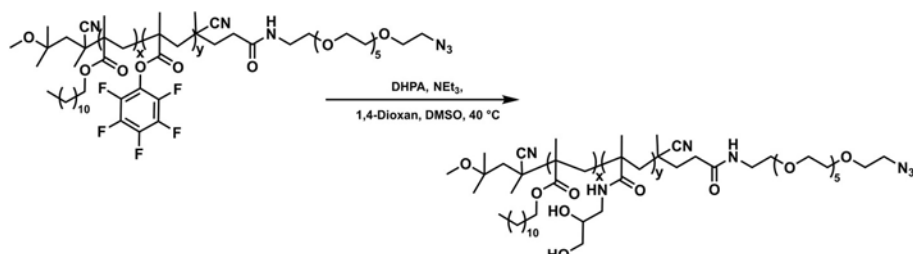


Abbildung 40: Polymeranaloge Reaktion von PFPMA zu DHPMA.

In einer Aminolyse mit Triethylamin werden die PFPMA-Reaktivestereinheiten des Polymers mit dem 2,3-Dihydroxypropylamin umgesetzt. Dadurch wurde der hydrophobe reaktive PFPMA-Block durch einen hydrophilen Block P(DHPMA) ersetzt. So erhält man ein amphiphiles Diblockpolymer der Zusammensetzung P(DHPMA)_x-b-P(LMA)_y (Tabelle 5).

Tabelle 5: Polymere der Zusammensetzung P(DHPMA)_x-b-P(LMA)_y

Polymer	Zusammensetzung	M _n [*] [g/mol]	Đ	wt% (DHPMA)	Aggregation
DL1	P(DHPMA) ₃₅ -b-P(LMA) ₄₁	Nicht löslich	-	34,8%	Ø
DL2	P(DHPMA) ₂₅ -b-P(LMA) ₂₈	14190 (UV)	1.53	35,8%	Ja
DL3	P(DHPMA) ₃₄ -b-P(LMA) ₁₃	bimodal		61,4%	Ø
DL4	P(DHPMA) ₂₇ -b-P(LMA) ₂₇	Nicht löslich		38,5%	Ø
DL5	P(DHPMA) ₂₃ -b-P(LMA) ₂₁	12300 (UV)	1.44	40,7%	Ja

* Die Zusammensetzungen wurden mittels THF-GPC der PFPMA basierten Polymere bestimmt (siehe Tabelle 2).

Die erfolgreiche Umsetzung mit dem Amin kann mittels ^{19}F -NMR Spektroskopie nachverfolgt werden, wie anhand des Polymers $\text{P}(\text{DHPMA})_x\text{-}b\text{-}\text{P}(\text{LMA-}stat\text{-DDEMA})_y$ im nächsten Kapitel (Abbildung 42) gezeigt wird.

3.3.7. Polymeranaloge Umsetzung zu $\text{P}(\text{DHPMA})_x\text{-}b\text{-}\text{P}(\text{LMA}_y\text{-}stat\text{-DDEMA}_z)$

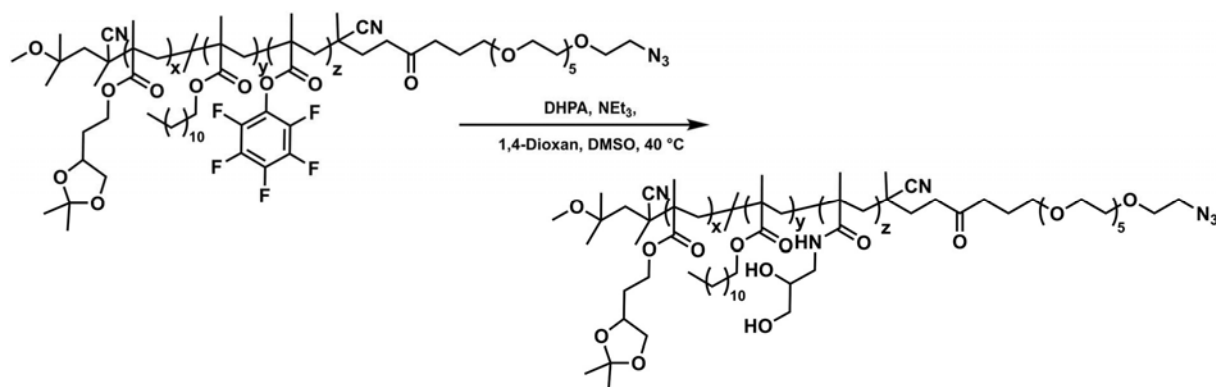


Abbildung 41: Polymeranaloge Reaktion von PFPMA zu DHPMA.

Die Aminolyse erfolgte analog wie in Kapitel 3.3.6. beschrieben. Die so erhaltenen amphiphilen Diblockpolymere der Zusammensetzung $\text{P}(\text{DHPMA})_x\text{-}b\text{-}\text{P}(\text{LMA}_y\text{-}stat\text{-DDEMA}_z)$ sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Der Umsatz der Aminolyse der PFPMA-Einheiten zu DHPMA kann mittels ^{19}F -NMR Spektroskopie nachverfolgt werden (Abbildung 42). Die Fluorsignale des Polymers (-151.6 bis -163.2 ppm) lassen sich eindeutig von den Fluorsignalen (-169.6 bis -185.8 ppm) des freien Pentafluorphenols unterscheiden. Dadurch kann anhand des NMRs der Reaktionslösung der Umsatz der Aminolyse nachvollzogen werden.

Tabelle 6: Polymere der Zusammensetzung $P(\text{DHPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_y\text{-stat-DDEMA}_z)$

Polymer	Zusammensetzung*	Molekulargewicht M_n^* [g/mol]	$\bar{D}$	wt%	Bildung Polymersome
DD1	$P(\text{DHPMA})_{35}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{51}\text{-stat-DDEMA}_{20})$	Nicht löslich in HFIP		24,4%	Ja
DD2	$P(\text{DHPMA})_{25}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{16}\text{-stat-DDEMA}_6)$	13110(RI) 15280 (UV)	1.46 1.38	42,6	Ja
DD3	$P(\text{DHPMA})_{33}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{30}\text{-stat-DDEMA}_{12})$	19360 (RI) 20160(UV)	1.43 1,53	34,0	Ø Polymersome
DD4	$P(\text{DHPMA})_{27}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{21}\text{-stat-DDEMA}_8)$	Nicht löslich in HFIP		37,9	Ja

* Die Zusammensetzungen wurden mittels THF-GPC der PFPMA basierten Polymere bestimmt (siehe Tabelle 3).

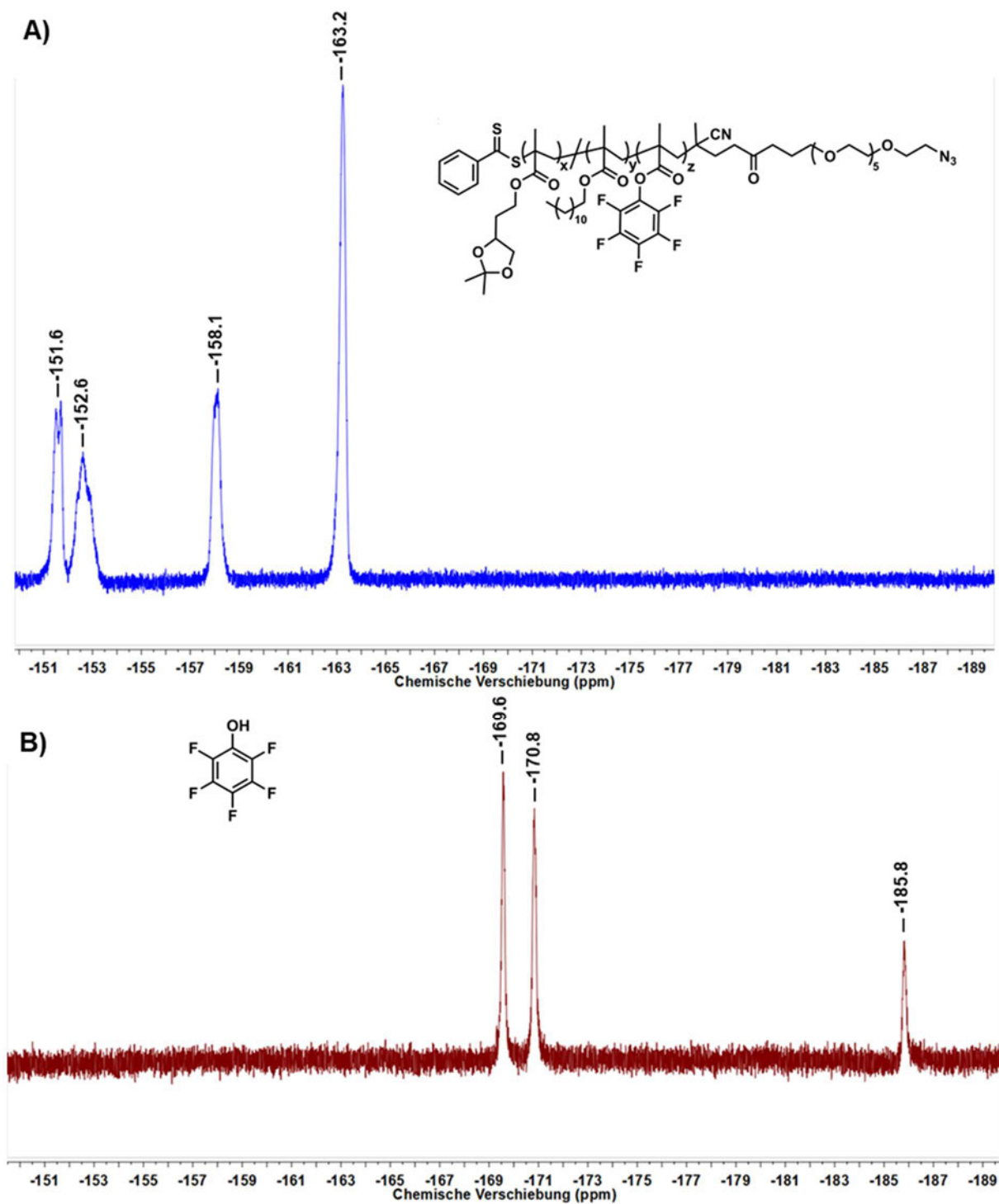


Abbildung 42: ^{19}F -NMR Spektrum der Aminolyse von PFPMA zu DHPMA. A) ^{19}F -NMR des Polymers $P(\text{PFPMA})_{25}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{16}\text{-stat-DDEMA}_6)_x$ (D2). B) ^{19}F -NMR der Reaktionslösung von $P(\text{DHPMA})_{25}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{16}\text{-stat-DDEMA}_6)$ zeigt die fertige Umsetzung unter Abspaltung des freien Pentafluorphenols. (CDCl_3 , 400 MHz).

Die Charakterisierung der umgesetzten Polymere mittels HFIP-GPC zeigte eine enge Molekulargewichtsverteilung. Die so erhaltenen Molekulargewichte lassen sich nicht mit den Molekulargewichten aus der THF-GPC vergleichen. Die Messungen unterscheiden sich im verwendeten Lösungsmittel, was zu unterschiedlichen Quellverhalten der Polymere führt. Außerdem wurde die THF-GPC mit Polystyrol-Standards kalibriert und die HFIP-GPC hingegen mit Polymethylmethacrylat-Standards.

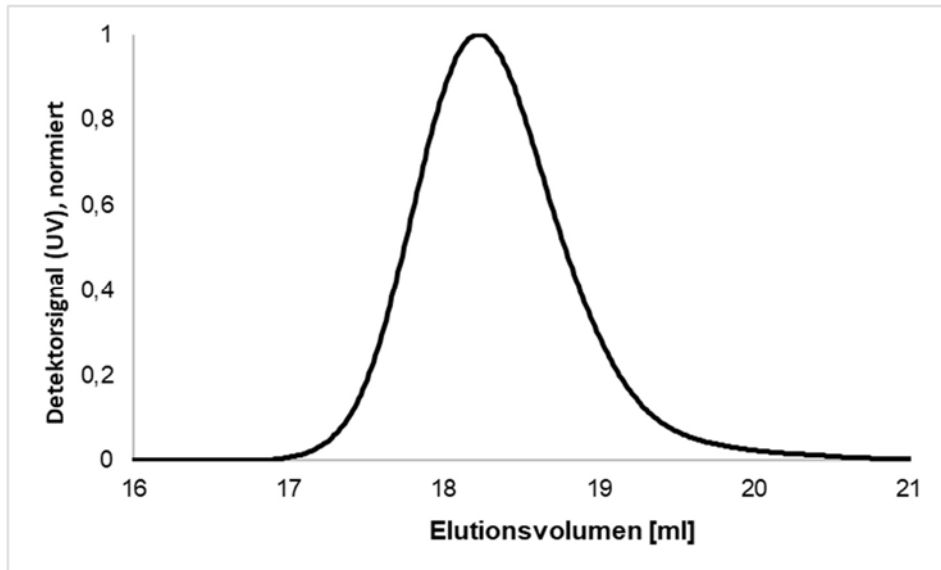


Abbildung 43: HFIP-GPC von $P(\text{DHPMA})_{25}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{16}\text{-}stat\text{-}\text{DDEMA}_6)$ (DD2).

3.3.8. Polymeranaloge Umsetzung zu P(DHPMA)_x-*b*-P(LMA_y-*stat*-DDEMA_z-*stat*-HHMA_w)

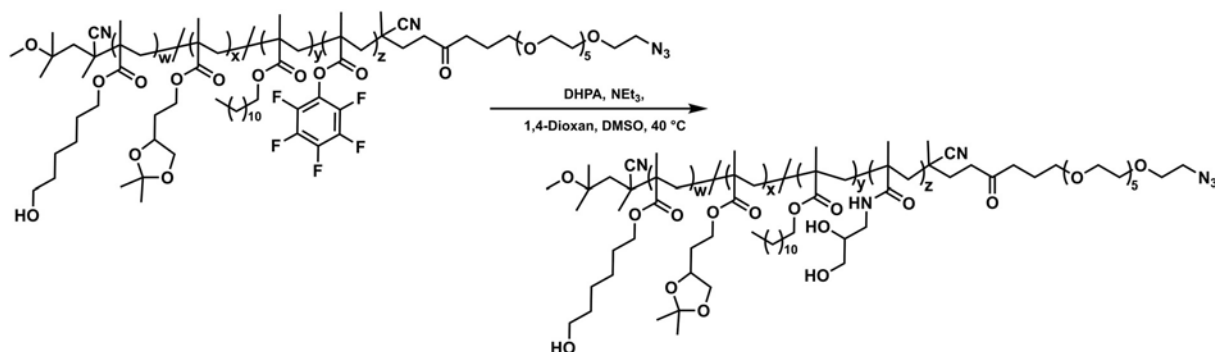


Abbildung 44: Polymeranaloge Reaktion von PFPMA zu DHPMA.

Die Aminolyse erfolgte wie bereits in Kapitel 3.3.6 beschrieben. Die so erhaltenen amphiphilen Diblockpolymere der Zusammensetzung P(DHPMA)_x-*b*-P(LMA_y-*stat*-DDEMA_z-*stat*-HHMA_w) sowie die berechneten hydrophilen Gewichtanteile (wt%) sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Polymere der Zusammensetzung
P(DHPMA)_x-*b*-P(LMA_y-*stat*-DDEMA_z-*stat*-HHMA_w).

Polymer	Zusammensetzung*	Molekulargewicht M _n * [g/mol]	Đ	wt%	Bildung Polymersome
DH1	P(DHPMA) ₃₅ - <i>b</i> - P(LMA ₄₉ - <i>stat</i> - DDEMA ₁₇ - <i>stat</i> - HHMA ₃)	Nicht löslich in HFIP		25,1	Ja
DH2	P(DHPMA) ₃₃ - <i>b</i> - P(LMA ₁₉ - <i>stat</i> - DDEMA ₇ - <i>stat</i> - HHMA ₃)	19360(RI) 20160 (UV)	1.43 1.53	35,7	Ø Polymersome
DH3	P(DHPMA) ₂₇ - <i>b</i> - P(LMA ₂₄ - <i>stat</i> - DDEMA ₈ - <i>stat</i> - HHMA ₃)	Nicht löslich in HFIP		33,9	Ja

*Die Zusammensetzungen wurden mittels THF-GPC der PFPMA basierten Polymere bestimmt (siehe Tabelle 4).

Die Charakterisierung erfolgte mittels HFIP-GPC und zeigt eine enge Molekulargewichtsverteilung. Die Lösungsmittel HFIP und THF erwiesen sich nicht als ideale Lösungsmittel zur Charakterisierung der erhaltenen amphiphilen Polymere, da einige Blocklängenverhältnisse nicht vollständig darin gelöst werden konnten.

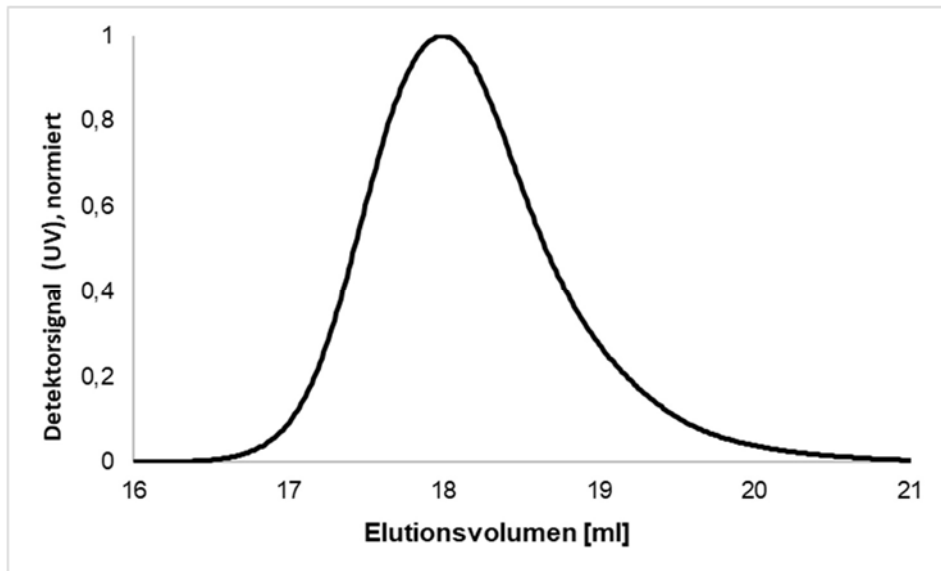


Abbildung 45: HFIP-GPC von $P(\text{DHPMA})_{25}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{19}\text{-}stat\text{-DDEMA}_7\text{-}stat\text{-HHMA}_3)$ (DH2).

3.4. Assemblierung zu Polymersomen mittels dualer asymmetrischer Zentrifuge

Polymersome aus amphiphilen Polymeren können in ihrem Kern mit hydrophilen und in der Doppelschicht mit hydrophoben Stoffen beladen werden.

Auf Basis der in Kapitel 3.1 synthetisierten Polymere mit drei verschiedenen Blockzusammensetzungen wurden im nächsten Schritt Aggregate gebildet. Die Assemblierung wurde mit der dualen asymmetrischen Zentrifuge durchgeführt. Diese spezielle Zentrifuge rotiert zusätzlich zur klassischen Zentrifugation um die eigene vertikale Achse (Abbildung 46). Durch die zusätzliche Rotation wirken starke Scherkräfte auf die Probe ein. Der weitere Einsatz von Keramikkügelchen in der Lösung verstärkt die einwirkenden mechanischen Kräfte auf die Probe. Zuvor zeigten Massing et al., dass mit Hilfe der dualen asymmetrischen Zentrifuge Liposome erfolgreich präpariert werden können.¹⁵⁴ Ein bedeutender Vorteil dieser Methode ist, dass wässrige Lösungsmittel verwendet werden können. Deshalb ist diese Präparationsmethode besonders geeignet für den Einsatz im medizinischen Bereich.

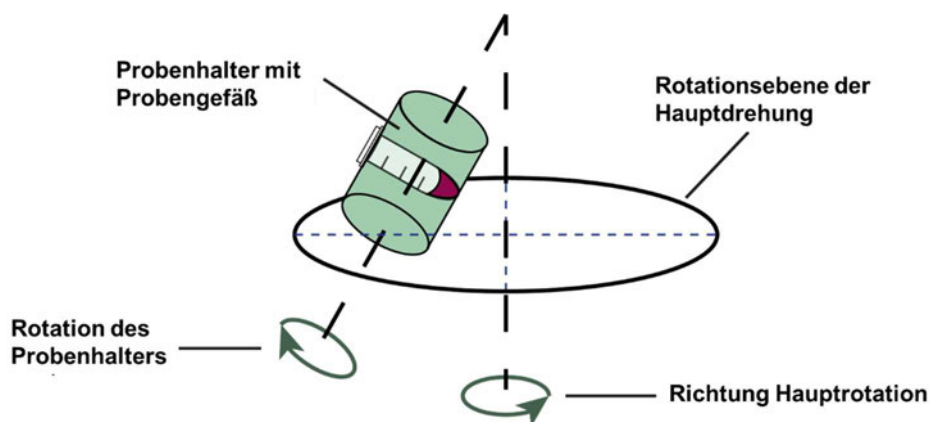


Abbildung 46: Schematische Darstellung der Funktion einer dualen asymmetrischen Zentrifuge.

Zur Bildung von Polymersomen wird das Polymer mit einem geringen Volumen Wasser über Nacht quellen gelassen. Zum so erhaltenen Gel werden Silicakügelchen dazugegeben und anschließend wird die Mischung in einem Eppendorf Reaktionsgefäß in die duale asymmetrische Zentrifuge gegeben. Der verwendeten wässrigen Lösung können Substanzen zugesetzt werden, die dadurch in die erhaltenen Partikel verkapselt werden.

Nach der Zentrifugation erhält man eine hochkonzentrierte Lösung, die im Anschluss verdünnt wird. Die so erhaltene Lösung enthält Aggregate und nicht assembliertes Monomer und muss vor der weiteren Verwendung aufgereinigt werden. Die so gebildeten Polymersome können für eine Vielzahl an unterschiedlichen Substanzen als Trägermaterial eingesetzt werden.

Das Polymer wird zuerst in Chloroform gelöst und in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Das Chloroform verdampft über Nacht und hinterlässt einen Polymerfilm, dieser wird mit Wasser beziehungsweise Wirkstofflösung versetzt und quillt im Anschluss. Danach wird das Reaktionsgefäß mit der Polymerlösung in der dualen Zentrifuge zentrifugiert.

3.5. Aufreinigung der erhaltenen Aggregate mittels HPLC

Polymere Trägersysteme müssen für den Einsatz in vivo frei von Verunreinigungen sein. Zusätzlich ist es für ihren therapeutischen Einsatz entscheidend die Menge an eingeschlossenem Wirkstoff zu kennen, um eine Dosierung der Therapie zu ermöglichen.

In einem nächsten Schritt wurden die durch die duale asymmetrische Zentrifuge erhaltenen Aggregate aufgereinigt. Diese werden von überschüssigen Polymeren und im Falle einer Substanz-Verkapselung von den nicht eingeschlossenen freien Stoffen aufgereinigt werden.

In vorhergehenden Arbeiten wurde für die Aufreinigung von beladenen Aggregaten händisch durch eine selbst gepackte Größenausschlusssäule (Sephacryl CL-2B). Zur Aufreinigung wurde die aus der dualen asymmetrischen Zentrifuge erhaltene trübe Lösung auf die ungefähr 10 cm lange Säule gegeben und tropfenweise eluiert. Anhand der Trübung der Tropfen konnte die Fraktion mit den enthaltenen Aggregaten abgetrennt werden.

Die Methode der manuellen Abtrennung anhand der Trübung von Tropfen birgt einige Tücken. So ist durch die visuelle Bestimmung der Trübung und damit einhergehend der Zeitpunkt, ab der die aufgereinigte Fraktion gesammelt wird, subjektiv vom Betrachter abhängig. Zusätzlich konnte nicht immer zum selben Zeitpunkt ein trüber

Tropfen gesammelt werden, da die Elutionszeiten variierten. Das ist darauf zurückzuführen, dass kein externer konstanter Lösungsmittelfluss und damit einhergehender gleichmäßiger Druck auf die Säule wirkt. Viel mehr war die Elutionszeit und die damit einhergehende Trennleistung nicht konstant, sondern von Faktoren wie dem Lösungsmittelstand über der verwendeten Säule und dem manuell mit einer Kanüle ausgeübten Druck abhängig. Parameter wie Druck und Fließgeschwindigkeiten von Lösungen haben einen großen Einfluss auf die Trennleistung und sind möglichst konstant zu wählen. Beispielsweise zeigt sich bei unzureichendem Druck, beziehungsweise zu langsamer Fließgeschwindigkeit des Lösungsmittels, Longitudinal-Diffusion innerhalb der Säule. Dies würde sich in einer Signalverbreiterung zeigen, eine solche Diffusion innerhalb der Säule würde zu weniger trüben Tropfen und dadurch zu einem Verlust an Aggregaten führen. Dagegen würde zu hoher Druck auf der Säule zu einer schnelleren Elution mit schlechterer Auftrennungsleistung führen. Deshalb wurde nach Alternativen zur Aufreinigung der erhaltenen Polymeraggregate gesucht.

Anforderungen an eine solche Methode zur Aufreinigung sind konstant bleibende Bedingungen, um Schwankungen in der Qualität der erhaltenen Aggregate zu minimieren und die erhaltenen sauberen Aggregate auch bei unterschiedlicher Zusammensetzung und Art untereinander vergleichen zu können.

Ein geschlossenes System bietet den Vorteil, sensible Proben vor äußeren Einflüssen wie Licht zu schützen oder im Falle von medizinischen Anwendungen eine möglichst sterile Umgebung bei der Präparation zu gewährleisten. Ein automatisiertes System, bei dem auch durch mehrere Benutzer gleichbleibende Ergebnisse erzielt werden, ist besonders von Vorteil. Nicht zuletzt ist der Vorteil einer erheblichen Zeitersparnis zu nennen, da in einem automatisierten Verfahren mehrere Proben in kürzester Zeit hintereinander in gleichbleibender Qualität aufgereinigt werden können.

Der Einsatz von geeigneten Detektoren, wie eines UV/-Vis Detektors, bietet die Möglichkeit, Aggregate in deutlich geringeren Konzentrationsbereichen reproduzierbar zu detektieren und die gegebenenfalls freien Substanzen von den Aggregaten gezielt abzutrennen. Der Ansatz der Aufreinigung über Größenausschluss Säulen soll dabei beibehalten werden, da sich dies als besonders effektiv erwiesen hat.

Die zuvor genannten Anforderungen erfüllt eine HPLC-Anlage (High Pressure Liquid Chromatography) mit nachgeschaltetem UV/Vis-Detektor. Zudem bietet sie den Vorteil, dass diese Methode bereits standardisiert für die Aufreinigung und Quantifizierung von Wirkstoffen eingesetzt wird. Für die hergestellten Partikel wurde deshalb die HPLC als Methode der Aufreinigung gewählt.

Die folgenden Abbildungen zeigen die bei den Aufreinigungen der Partikel erhaltenen Elugramme. Die Polymersom-Fraktion wurde etwa von 0,6 min bis 1,4 min gesammelt.

Die dazugehörigen Elugramme in Wasser können der Abbildung 47 bis Abbildung 49 entnommen werden. Die Elugramme zeigen einen eindeutigen Peak im Elutionsbereich von höher molekularen Substanzen, die gesammelte Fraktion wurde farblich hervorgehoben. Die Aufreinigung konnte bei allen drei Polymersomen-Zusammensetzungen erfolgreich gezeigt werden.

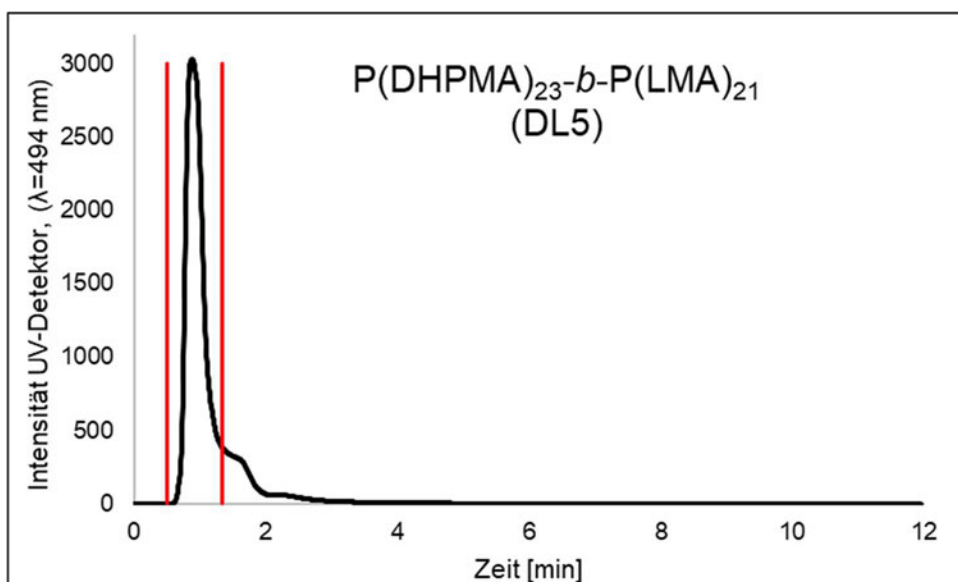


Abbildung 47: HPLC-Elugramm von $P(DHPMA)_{23}-b-P(LMA)_{21}$ (DL5) in Wasser bei einer Absorption von $\lambda = 494$ nm. Gesammelt wurde die Fraktion von 0,55 bis 1,35 min, damit erfolgten die weiteren Experimente.

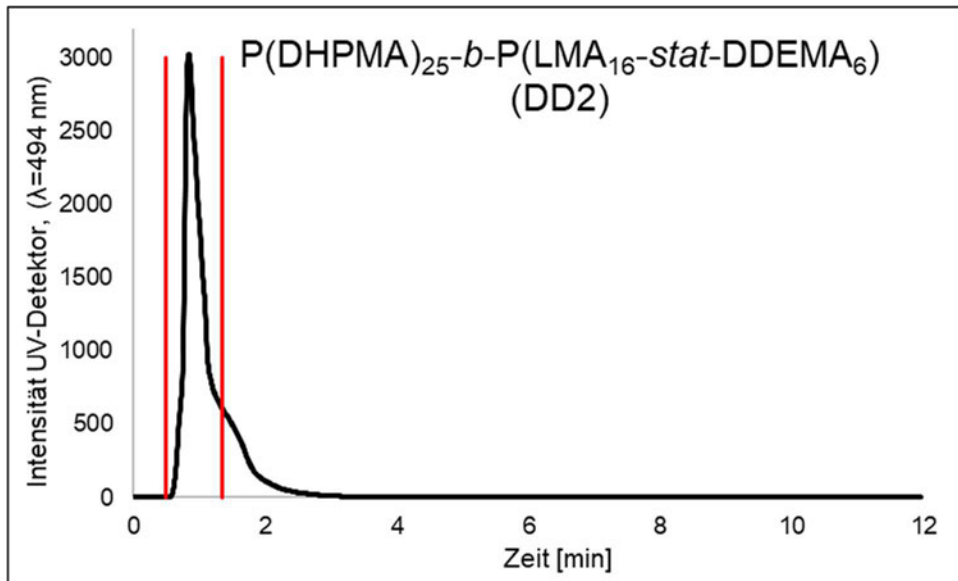


Abbildung 48: HPLC-Elugramm von $\text{P(DHPMA)}_{25}\text{-}b\text{-P(LMA}_{16}\text{-stat-DDEMA}_6)$ (DD2) in Wasser bei einer Absorption von $\lambda = 494 \text{ nm}$. Gesammelt wurde die Fraktion von 0,55 bis 1,35 min, damit erfolgten die weiteren Experimente.

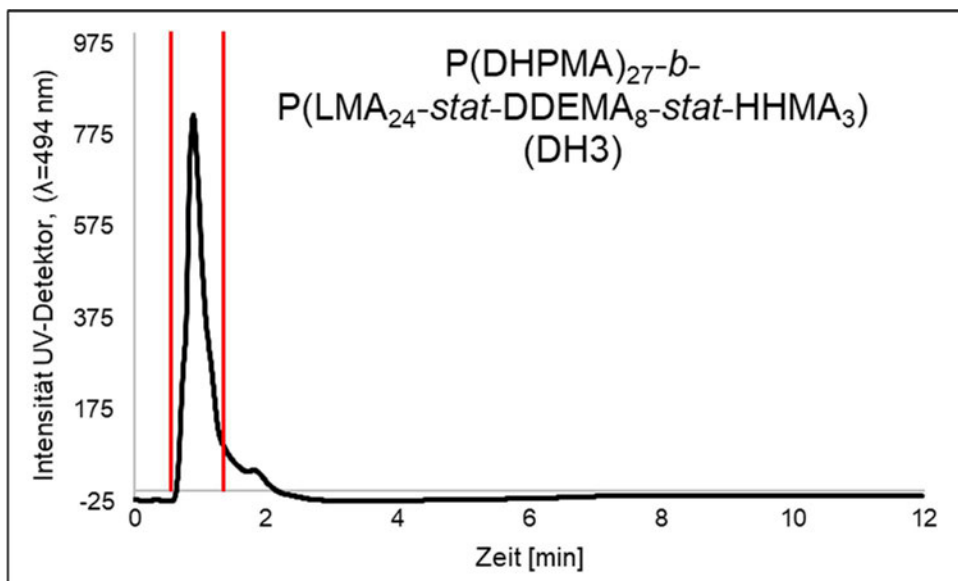


Abbildung 49: HPLC-Elugramm von $\text{P(DHPMA)}_{27}\text{-}b\text{-P(LMA}_{24}\text{-stat-DDEMA}_8\text{-stat-HHMA}_3)$ (DH3) in Wasser bei einer Absorption von $\lambda = 494 \text{ nm}$. Gesammelt wurde die Fraktion von 0,55 bis 1,35 min, damit erfolgten die weiteren Experimente.

Der Elutionsbereich der gesammelten Fraktion von etwa 0,6 bis 1,4 Minuten erwies sich in späteren Messungen der hydrodynamischen Radien als jener Bereich in dem es möglich war Partikel mit einer definierten Größe und enger Größenverteilung zu erhalten (Tabelle 8).

Auf Basis dessen wurden bei den darauffolgenden Aufreinigungen von beladenen Partikeln analog zu den leeren Polymersomen die Fraktion bei gleicher Elutionszeit gesammelt. Dies erwies sich insbesondere im Fall der Beladung mit TNF- α als nützlich, da die Anwesenheit des TNF- α durch UV-Vis Detektoren nicht erkennbar war. Die Anwesenheit des TNF- α in den Partikeln wurde im Rahmen der Bestimmung der Beladungseffizienz separat nachgewiesen (Kapitel 3.12).

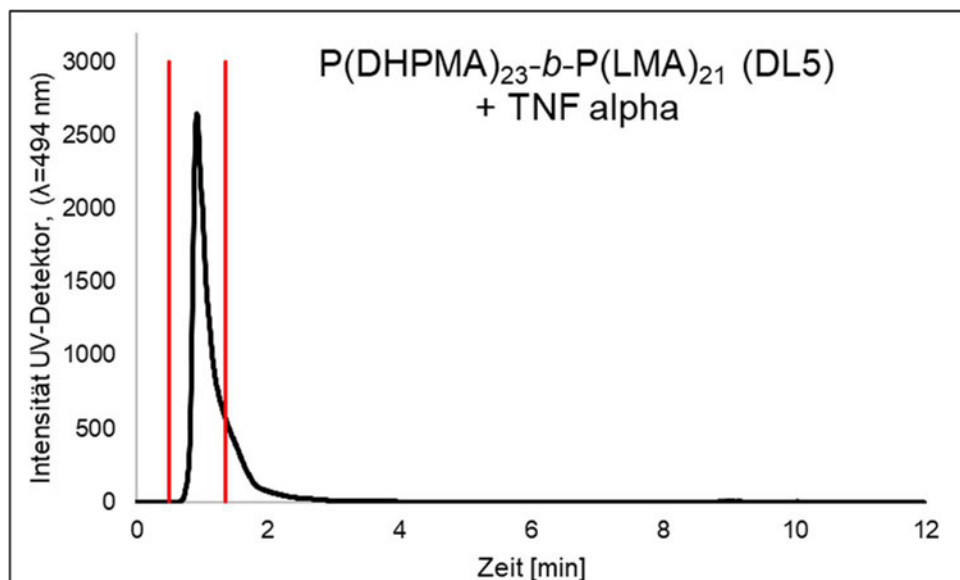


Abbildung 50: HPLC-Elugramm von P(DHPMA)₂₃-b-P(LMA)₂₁ (DL5) beladen mit TNF alpha in Wasser bei einer Absorption von $\lambda = 494$ nm. Gesammelt wurde die Fraktion von 0,55 bis 1,35 min, damit erfolgten die weiteren Experimente.

Die Abtrennung molekular kleinerer Bestandteile, die in die Polymersome verkapselt wurden, z.B. TNF-alpha oder Biotin-Liganden, konnte erfolgreich durchgeführt werden (Abbildung 50, Abbildung 51). Dadurch konnten definierte Polymersome erhalten werden, die keine freie Substanz mehr enthalten. Der Nachweis zur erfolgreichen Aufreinigung der Polymersomlösungen von freier Substanz wird in Kapitel 3.14.1 erbracht. Die quantitative Bestimmung der Beladungseffizienzen von Doxorubicin, TNF- α und Rapamycin erfolgt separat in den folgenden Kapiteln.

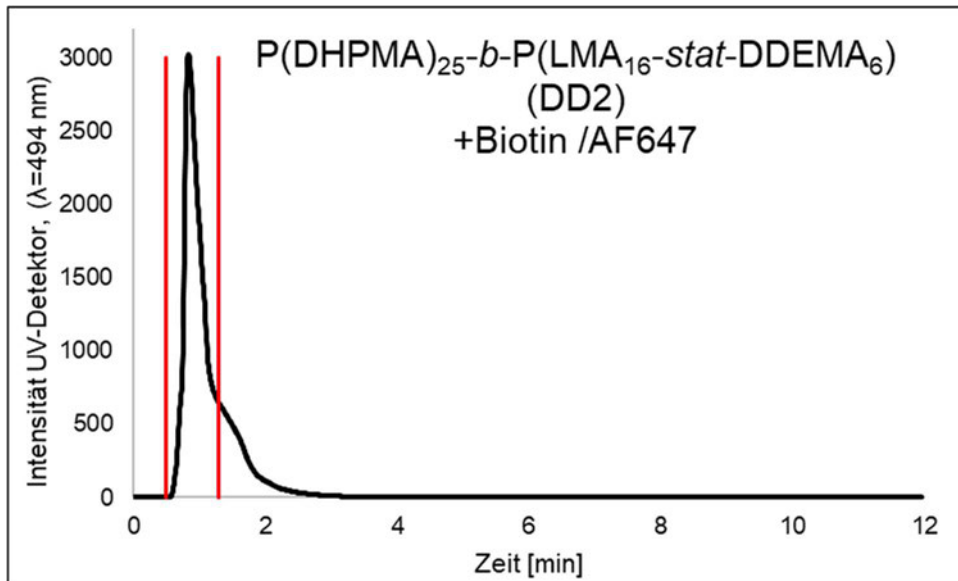


Abbildung 51: HPLC-Elugramm von $P(\text{DHPMA})_{25}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{16}\text{-stat-DDEMA}_6)$ (DD2) über Azid-Kupplung Biotin und AF647 in Wasser bei einer Absorption von $\lambda = 494 \text{ nm}$. Gesammelt wurde die Fraktion von 0,5 bis 1,3 min, damit erfolgten die weiteren Experimente.

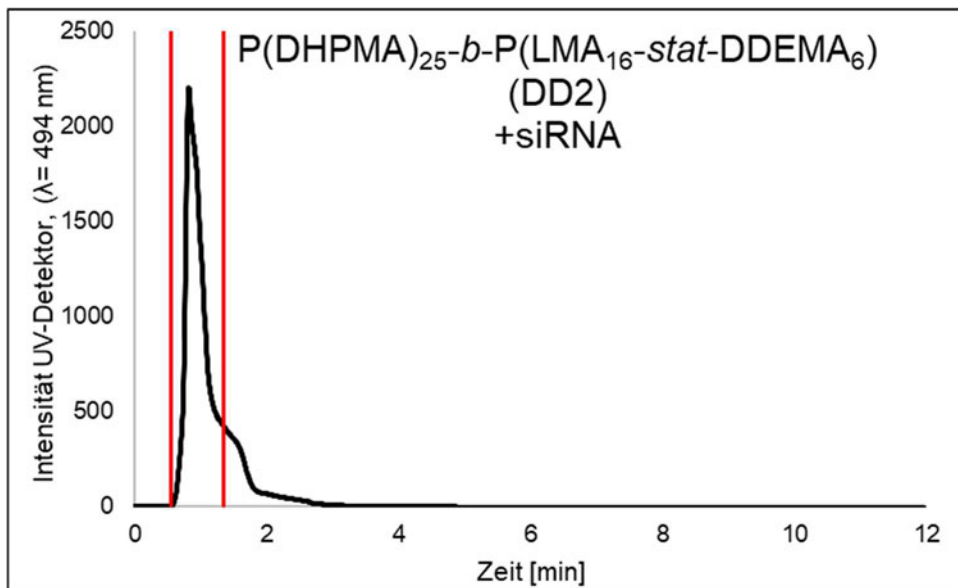


Abbildung 52: HPLC-Elugramm von $P(\text{DHPMA})_{25}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{16}\text{-stat-DDEMA}_6)$ (DD2) mit siRNA in Wasser bei einer Absorption von $\lambda = 494 \text{ nm}$. Gesammelt wurde die Fraktion von 0,55 bis 1,35 min, damit erfolgten die weiteren Experimente.

Das Absorptionsmaximum des Doxorubicins wird bei $\lambda = 555 \text{ nm}$ gemessen. Bei dem Einschluss von Doxorubicin in Polymersome kann die Anwesenheit von Doxorubicin auch im Elugramm gezeigt werden.

In Abbildung 53 ist das HPLC-Elugramm des unbeladenen Polymersoms $\text{P(DHPMA)}_{27}\text{-}b\text{-P(LMA}_{21}\text{-}stat\text{-DDEMA}_8)$ (DD4) dargestellt. Der UV-Detektor misst nur eine geringe Intensität bei $\lambda = 555 \text{ nm}$, da das reine Polymersom dort nur wenig absorbiert.

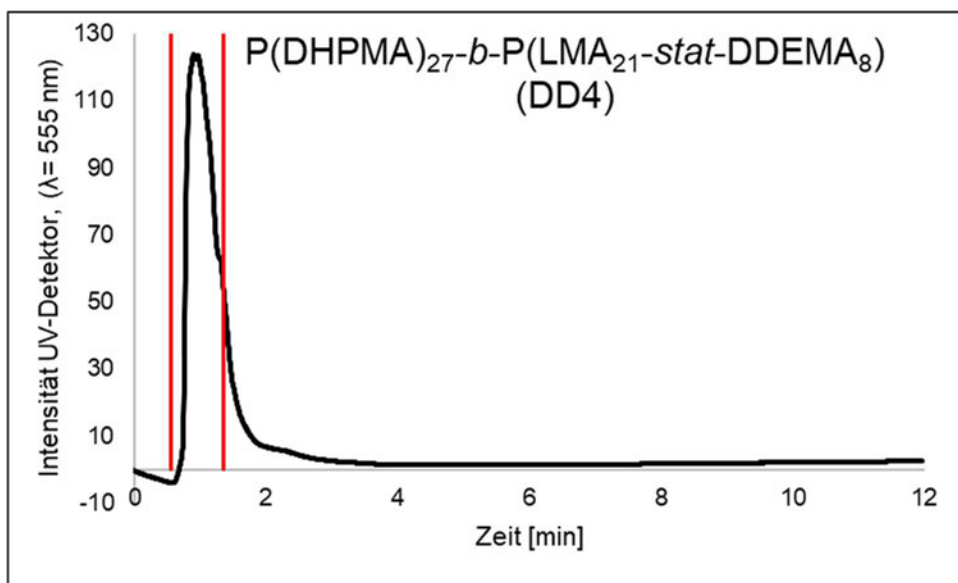


Abbildung 53: HPLC-Elugramm von $\text{P(DHPMA)}_{27}\text{-}b\text{-P(LMA}_{21}\text{-}stat\text{-DDEMA}_8)$ (DD4) in Wasser bei einer Absorption von $\lambda = 555 \text{ nm}$. Gesammelt wurde die Fraktion von 0,55 bis 1,35 min, damit erfolgten die weiteren Experimente.

Dagegen zeigt Abbildung 54 das Elugramm des mit Doxorubicin beladenen Polymersoms $\text{P(DHPMA)}_{27}\text{-}b\text{-P(LMA}_{21}\text{-}stat\text{-DDEMA}_8)$ (DD4). In der gesammelten Fraktion bis ca. 2 Minuten eluieren die Polymersome, die jetzt eine deutlich höhere Signalintensität im UV-Detektor aufweisen. Dies ist ein Zeichen dafür, dass das Doxorubicin in die Polymersome eingeschlossen wurde.

Vergleicht man die Elugramme des beladenen und unbeladenen Polymersoms $\text{P(DHPMA)}_{27}\text{-}b\text{-P(LMA}_{21}\text{-}stat\text{-DDEMA}_8)$ (DD4), so ist zu erkennen, dass im Falle des beladenen Polymersoms nach zwei Minuten noch ein Signal erkennbar ist, welches beim unbeladenen Polymersom nicht auftritt.

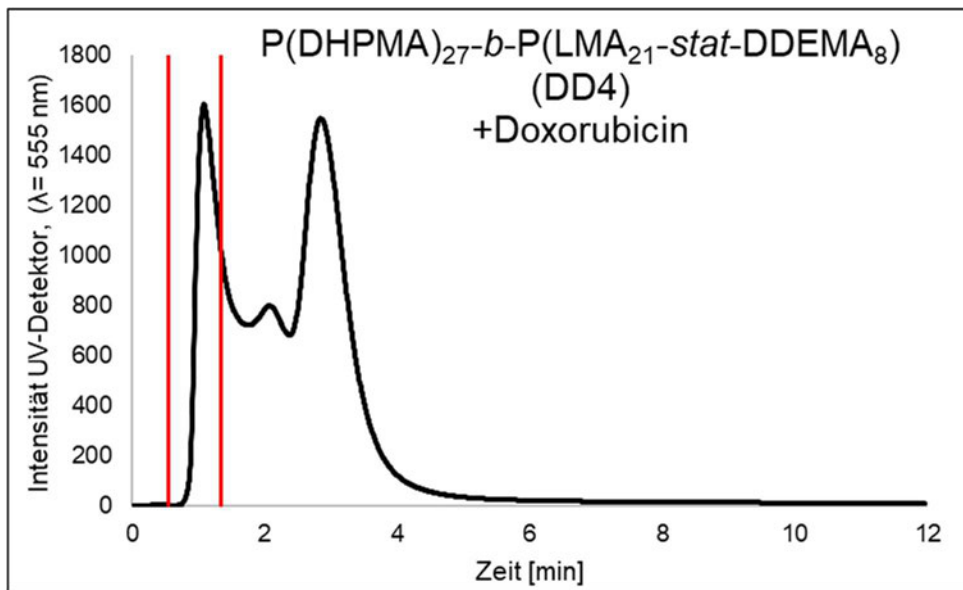


Abbildung 54: HPLC-Elugramm von $P(DHPMA)_{27}-b-P(LMA_{21}-stat-DDEMA_8)$ (DD4) mit Doxorubicin in Wasser bei einer Absorption von $\lambda = 555 \text{ nm}$. Gesammelt wurde die Fraktion von 0,55 bis 1,35 min, damit erfolgten die weiteren Experimente.

Das ist der Bereich, in dem das freie Doxorubicin eluiert. Dabei weisen sowohl die Polymersom-Fraktion als auch die restlichen Fraktionen die für Doxorubicin charakteristische rote Färbung auf.

Allgemein konnte ausschließlich die Aufreinigung mit Doxorubicin über den UV Detektor der HPLC sichtbar gemacht werden, im Fall der anderen Substanzen war es nicht möglich diese zu detektieren

Mit Hilfe der HPLC-Methode ist es möglich die gebildeten Polymersome automatisiert und reproduzierbar innerhalb von nur zwölf Minuten aufzureinigen. Dabei werden die nicht in den Polymersomen eingekapselten Substanzen abgetrennt. Im Falle einer Beladung mit Doxorubicin ist es sogar möglich die Anwesenheit des Doxorubicins im Elugramm zu detektieren.

3.6. Charakterisierung der erhaltenen Aggregate

Um die erhaltenen Aggregate zu charakterisieren, wurden Messungen der Dynamischen Lichtstreuung am Zetasizer von Malvern Panalytical durchgeführt. Dadurch konnten die hydrodynamischen Radien R_h der einzelnen Aggregate und ihre Größenverteilungen ermittelt werden.

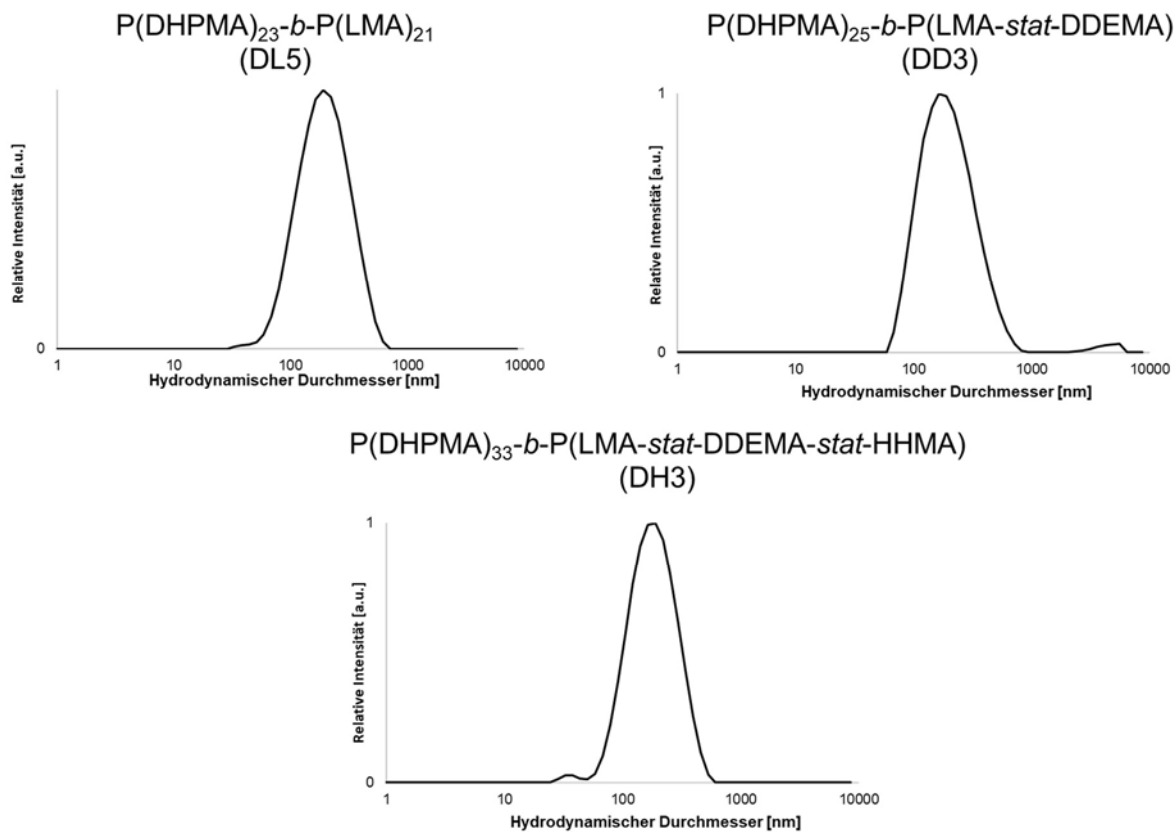


Abbildung 55: Zetasizer Messungen der Polymersome nach HPLC Aufreinigung.

Die gemessenen hydrodynamischen Durchmesser können der Tabelle 8 entnommen werden. Es konnten Polymersome hergestellt werden, die ohne einen zusätzlichen Filtrationsschritt bereits gute Polydispersitäten aufweisen. Auch im Falle von beladenen Polymersomen sind enge Größenverteilungen erhalten worden. Die Beladung der Polymersome führte zu keiner Änderung des hydrodynamischen Durchmessers. Damit zeigt sich wie gut die HPLC-Methode geeignet ist um definierte und saubere Aggregate zu erhalten. Wenn die nicht eingeschlossenen Substanzen noch in den gemessenen Lösungen wären, würde das zu breiteren Größenverteilungen führen.

Tabelle 8: Hydrodynamischer Durchmesser der erhaltenen Polymersome gemessen am Zetasizer vom Malvern Panalytical.

Polymere	Hydrodynamischer Durchmesser [nm]	PDI
P(DHPMA) ₂₅ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₈ (DL2)	194,2 nm	0,260
P(DHPMA) ₂₅ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₈ (DL2) + AF 647	189,7 nm	0,243
P(DHPMA) ₂₅ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₈ (DL2) + Biotin +AF 647	194,1 nm	0,185
P(DHPMA) ₂₃ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₁ (DL5)	176,9 nm	0,201
P(DHPMA) ₃₅ - <i>b</i> -P(LMA ₅₁ - <i>stat</i> -DDEMA ₂₀) (DD1) *	112,6 nm	0,126
P(DHPMA) ₃₅ - <i>b</i> -P(LMA ₅₁ - <i>stat</i> -DDEMA ₂₀) (DD1) *+ siRNA	115,6 nm	0,046
P(DHPMA) ₂₇ - <i>b</i> -P(LMA ₂₁ - <i>stat</i> -DDEMA ₈) (DD4)	116,4 nm	0,251
P(DHPMA) ₂₇ - <i>b</i> -P(LMA ₂₁ - <i>stat</i> -DDEMA ₈) (DD4) + Doxorubicin	104,4 nm	0,236
P(DHPMA) ₃₃ - <i>b</i> -P(LMA- <i>stat</i> -DDEMA- <i>stat</i> -HHMA) (DH1)*	128,1 nm	0,072
P(DHPMA) ₃₃ - <i>b</i> -P(LMA ₄₉ - <i>stat</i> -DDEMA ₁₇ - <i>stat</i> -HHMA ₃)* (DH1 +siRNA)	128,9 nm	0,060
P(DHPMA) ₃₃ - <i>b</i> -P(LMA ₄₉ - <i>stat</i> -DDEMA ₁₇ - <i>stat</i> -HHMA ₃) (DH1 +siRNA)	211,0 nm	0,225
P(DHPMA) ₃₃ - <i>b</i> -P(LMA- <i>stat</i> -DDEMA- <i>stat</i> -HHMA) (DH3)	160,3 nm	0,206
P(DHPMA) ₃₃ - <i>b</i> -P(LMA ₂₄ - <i>stat</i> -DDEMA ₈ - <i>stat</i> -HHMA ₃) (DH3) *	119,1 nm	0,115

*Messung nach Filtration durch einen GHP-Filter (Porengröße 200 nm).

3.7. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der hergestellten Partikel

Zur näheren Untersuchung der Partikel und der Partikelgröße wurden diese nach Aufreinigung mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) im Vakuum analysiert. Durch die Analyse im Vakuum kann es zu einer Deformation der Partikel kommen.

Zur Erhöhung des Kontrastes wurden die zuvor getrockneten Partikel mit Hilfe von einer 1% Uranylacetatlösung behandelt (negative staining). Dadurch verbessert sich der Kontrast zwischen Hintergrund und Probe, wobei es zeitgleich zu Artefakten kommen kann. Der Einsatz von elektronenreichen Schwermetallen während der Probenpräparation ist von Bedeutung, da Polymersome ohne diese Vorhandlung oftmals im TEM nicht messbar sind.¹⁵⁵

Die Oberfläche des TEM-Grids wurde durch eine Glimmentladung von Plasma behandelt, dadurch wird die Ladung auf Oberfläche der Grids homogenisiert und ungewollte Agglomeration und Aggregation verhindert.

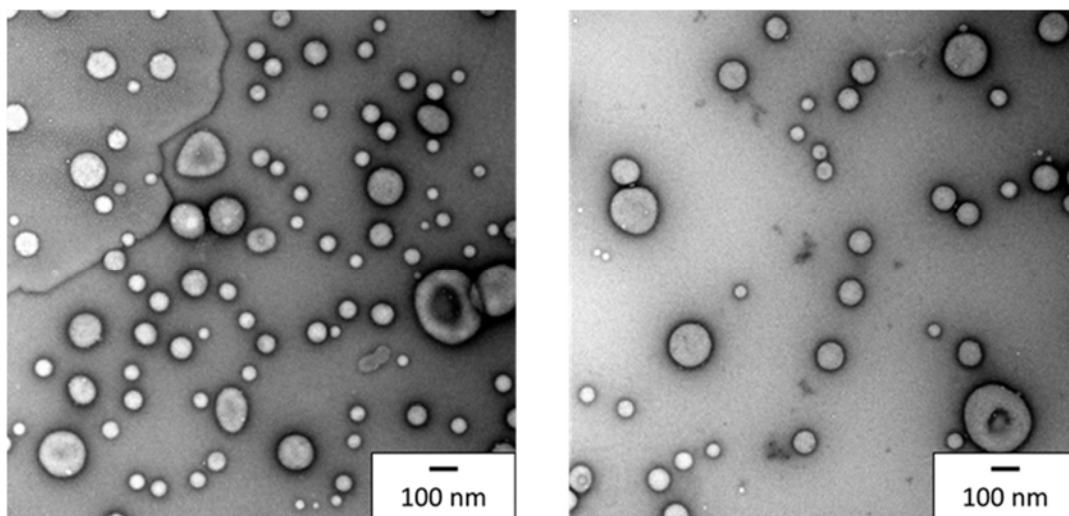


Abbildung 56: TEM-Aufnahmen der Partikel $P(DHPMA)_{46}\text{-}b\text{-}P(LMA)_{31}$, Negative staining mit 1% Uranylacetat.

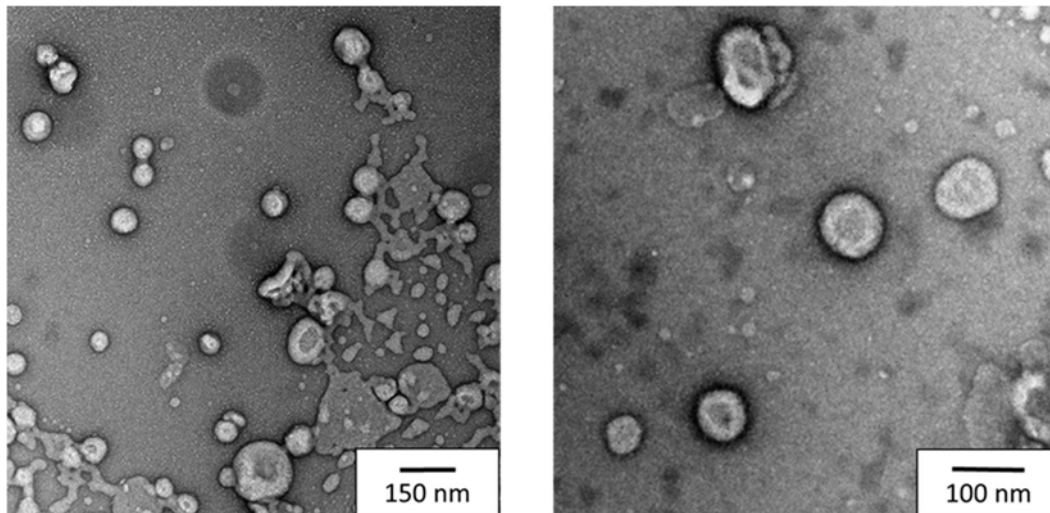


Abbildung 57: TEM-Aufnahme der Partikel $P(DHPMA)_{30}\text{-}b\text{-}P(LMA_{16}\text{-}stat\text{-}DDEMA_{20})$ Negative staining mit 1% Uranylacetat.

Auf den Aufnahmen sind kreisförmige Aggregate mit einem dunkleren Schatten in der Mitte zu erkennen. Es sind zahlreiche intakte Partikel zu erkennen, einige davon sind im Vakuum kollabiert. Die Partikel weisen einen Hohlraum in der Mitte auf und sind deshalb im Vakuum eingefallen. Die Durchmesser der gemessenen Partikel befinden sich in einem ähnlichen Größenbereich mit den erhaltenen dynamischen Lichtstreuendaten am Malvern Zetasizer. Aufgrund der Messung im Vakuum und des Einflusses der verwendeten Uranylacetatlösung ist eine definitive Strukturaufklärung nicht möglich.

Ergänzend zu den dynamischen Lichtstreuemessungen und TEM-Messungen könnte im nächsten Schritt eine Strukturaufklärung mittels Cryo-TEM erfolgen. Dies bietet den Vorteil, dass die native Struktur der Partikel in Flüssigkeit eingefroren wird und somit darstellbar wird. Ebenfalls ist keine zusätzliche Zugabe von Uranylacetat zur Kontrastverbesserung nötig und die Schichtdicke der Partikelhülle messbar.

3.8. Beladung der Polymersome

In Zusammenarbeit mit [REDACTED] wurde im Rahmen ihrer Diplomarbeit anhand erster Beladungstests gezeigt, dass es möglich war eine hydrophobe Modellschubstanz (Nile Red) sowie eine hydrophile Modellschubstanz (Sulforhodamin 101) in Partikel der Zusammensetzungen P(DHPMA)-*b*-P(LMA), P(DHPMA)-*b*-P(LMA-*stat*-DDEMA) und P(DHPMA)-*b*-P(LMA-*stat*-DDEMA-*stat*-HHMA) einzuschließen.¹⁵⁶

Dies kann als indirekter Hinweis auf eine Vesikelbildung verstanden werden, denn eine erfolgreiche Verkapselung von signifikanten Anteilen des hydrophilen Farbstoffes deutet auf das Vorliegen eines inneren wässrigen Kompartiments hin.

In einem nächsten Schritt sollen die erhaltenen Aggregate beladen werden und die Beladungseffizienz ermittelt werden. Als Einschlusskomponenten wurden die Wirkstoffe Doxorubicin und Rapamycin gewählt. Doxorubicin eignet sich besonders gut für Einschlussexperimente da es bei einer Absorption von 555 nm fluoresziert und so gut quantifiziert werden kann. Zusätzlich wurde auch siRNA in die Polymersome eingeschlossen, um zu prüfen ob sie als Transfektionsagenzien eingesetzt werden können.

3.9. Beladung mit Doxorubicin

Die Polymersome wurden mit der hydrophoben Chemotherapeutikum Doxorubicin in Form des Hydrochlorids ($\log P_{o/w} = 1,26$) beladen.¹⁵⁷ Dafür wurde Doxorubicin hydrochlorid in Wasser gelöst, um eine gesättigte Lösung (50 mg/ml) zu erhalten.

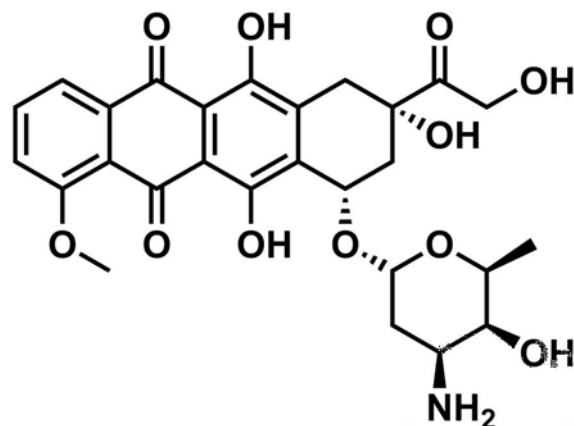


Abbildung 58: Struktur von Doxorubicin.

Das Polymer wurde mit der hergestellten Doxorubicin Lösung über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurde die Lösung mit Silicakügelchen versetzt und in die duale asymmetrische Zentrifuge gegeben. Im Anschluss folgte die Aufreinigung mittels HPLC, um eventuell vorhandenes freies Doxorubicin abzutrennen und Polymersome mit Doxorubicin Beladung zu erhalten (Abbildung 54).

3.9.1. Einschlusseffizienz von Doxorubicin

Um die Einschlusseffizienz der Polymersomen zu bestimmen, musste das eingeschlossene Doxorubicin quantifiziert werden. Das musste erst aus dem Inneren der Polymersome freigesetzt werden. Dafür wurde die Probe gefriergetrocknet, dabei wurden die Aggregate zerstört. Das so erhaltene Lyophilisat beinhaltet freies Doxorubicin, das mittels Fluoreszenz-Spektroskopie an einem Plate Reader quantifiziert wurde. Dafür wurden 30 µl der aufgereinigten Polymerlösungen gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in 500 µl Wasser resuspendiert und 200 µl davon im Plate Reader vermessen. Die Messungen wurden als Duplikate durchgeführt und jeweils der Mittelwert gebildet.

Die folgenden Polymersomen-Zusammensetzungen wurden mit Doxorubicin beladen und die Einschlusseffizienz ermittelt. $P(DHPMA)_{25}\text{-}b\text{-}P(LMA)_{28}$ (DL2), $P(DHPMA)_{27}\text{-}b\text{-}P(LMA_{21}\text{-}stat\text{-}DDEMA_8)$ (DD4) und, $P(DHPMA)_{27}\text{-}b\text{-}P(LMA_{24}\text{-}stat\text{-}DDEMA_8\text{-}stat\text{-}HHMA_3)$ (DH3). Um von der gemessenen Fluoreszenz auf die Konzentration des Doxorubicin zu schließen, wurde eine Doxorubicin Konzentrationsreihe von 1 µmol/l bis 25 µmol/l (Abbildung 59) angefertigt.

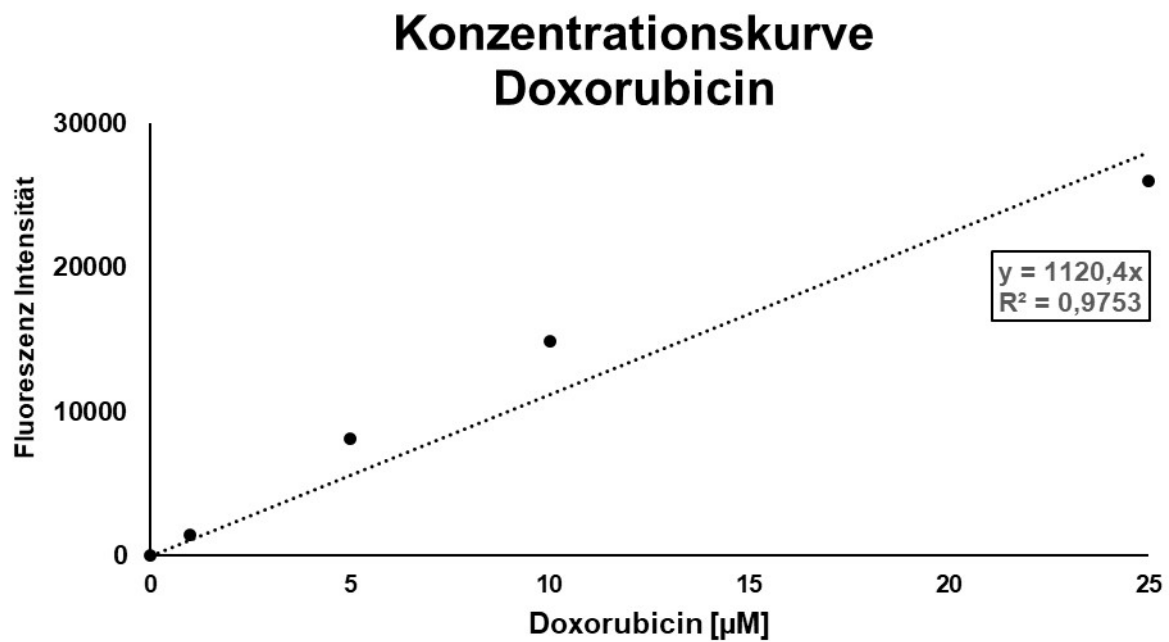


Abbildung 59: Konzentrationskurve von Doxorubicin.

Anhand der Funktion, die der Konzentrationskurve entnommen werden konnte, wurden die Konzentrationen für die eingesetzten Polymersom-Lösungen berechnet. Die gemessene Konzentrationskurve hatte ein gutes Bestimmtheitsmaß von 97,5 %. Die daraus erhaltenen Konzentrationen wurden den Verdünnungen angepasst um auf die Konzentration der ursprünglich eingesetzten Lösungen zu kommen, diese sind in Tabelle 9 aufgelistet. In einem Volumen von 15 µl einer 50 mg/ml Doxorubicin-Lösung sind 1,38 µmol an Doxorubicin enthalten. Bei der Bildung von Polymersomen ist der Wirkstoff in der gesamten Lösung verteilt. Damit besteht eine 50% Wahrscheinlichkeit, dass das Doxorubicin bei der Bildung der Polymersome in der dualen asymmetrischen Zentrifuge in den Polymersomen ist. Somit halbiert sich die maximal mögliche Einschlussmenge an Doxorubicin auf 0,69 µmol. Aus den am Plate Reader gemessenen Konzentrationen an Doxorubicin konnte auf die Gesamtmenge an Doxorubicin in den aufgereinigten Polymer-Lösungen zurückgeschlossen werden (Tabelle 9).

Tabelle 9: Berechnete Konzentrationen der Polymersommlösungen nach HPLC mittels Fluoreszenzmessungen am Plate Reader

Polymersom Zusammensetzung	Konzentration an Doxorubicin [µM]	Stoffmenge eingeschlossenes Doxorubicin	Einschlusseffizienz
P(DHPMA) ₂₅ - <i>b</i> - P(LMA) ₂₈ (DL2)	153,82 µM	0,145 µmol	10,5%
P(DHPMA) ₂₇ - <i>b</i> - P(LMA ₂₁ - <i>stat</i> -DDEMA ₈) (DD4)	140,96 µM	0,113 µmol	10,2%
P(DHPMA) ₂₇ - <i>b</i> - P(LMA ₂₄ - <i>stat</i> -DDEMA ₈ - <i>stat</i> -HHMA ₃) (DH3)	129,31 µM	0,103 µmol	9,4 %

Die Beladungseffizienzen liegen bei den drei Polymer Zusammensetzungen zwischen 10,5% und 9,4%. Dabei ist zu beachten, dass aufgrund der statistischen Verteilung von Doxorubicin und in Lösung, die theoretisch maximal mögliche Beladung bei 50% liegt.

3.9.2. Zellversuche mit Doxorubicin beladenen Polymersomen

Polymersome mit den Zusammensetzungen $P(\text{DHPMA})_{25}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_{28}$ (DL2), $P(\text{DHPMA})_{27}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{21}\text{-}stat\text{-DDEMA}_8)$ (DD4) und $P(\text{DHPMA})_{27}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{24}\text{-}stat\text{-DDEMA}_8\text{-}stat\text{-HHMA}_3)$ (DH3) wurden, wie bereits im vorhergegangenen Kapitel beschrieben, mit Doxorubicin beladen und die Konzentration an eingeschlossenem Doxorubicin bestimmt. In einem Zellversuch mit humanen Melanom-Zelllinien (MaMel-19) soll die Aufnahme in Zellen von freiem Doxorubicin gegenüber dem in Polymersomen eingeschlossenen Doxorubicin untersucht werden.

Die folgenden Experimente wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von [REDACTED] von der Doktorandin [REDACTED] an der Universität Medizin Mainz durchgeführt.

Dafür wurden die Doxorubicin-Konzentrationen 0,5 μM , 1 μM , 10 μM und 20 μM sowie 1% und 5% Volumenprozent der drei Partikellösungen auf die Zellen gegeben. Die Aufnahme an Doxorubicin in die Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting) nach 3 Stunden, 6 Stunden und 24 Stunden gemessen (Abbildung 60). Die entsprechenden Doxorubicin-Konzentrationen können Tabelle 10 entnommen werden.

Tabelle 10: Doxorubicin Konzentrationen der Polymersom-Lösungen.

10 μl Partikellösung wurde mit 990 μl Zellmedium zu einer 1 Vol% Lösung verdünnt.

50 μl Partikellösung wurde mit 950 μl Zellmedium zu einer 5 Vol% Lösung verdünnt.

Polymersom	Doxorubicin Konzentration in wässriger Partikellösung [μM]	1 Vol% Partikellösung [μM]	5 Vol% Partikellösung [μM]
$P(\text{DHPMA})_{25}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_{28}$ (DL2)	153,82	1,54	7,69
$P(\text{DHPMA})_{27}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{21}\text{-}stat\text{-DDEMA}_8)$ (DD4)	140,96	1,41	7,05
$P(\text{DHPMA})_{27}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{24}\text{-}stat\text{-DDEMA}_8\text{-}stat\text{-HHMA}_3)$ (DH3)	129,31	1,29	6,47

Es zeigte sich, dass im Fall von freiem Doxorubicin die Menge an Wirkstoff in den Zellen wie erwartet proportional zur steigenden Konzentration der verwendeten Lösungen ansteigt. Bei der Konzentration von 20 μM Doxorubicin wurde ein geringeres Fluoreszenzsignal als bei der 10 μM Konzentration gemessen. Das kann vermutlich auf Fluoreszenz-Quenching der Doxorubicin Lösung zurückgeführt werden. Da die gemessenen Intensitäten der hier eingesetzten Proben, Konzentrationen zwischen 1,29 μM und 7,69 μM haben, befinden sich die Fluoreszenzmessungen außerhalb des Bereichs in dem ein Quenching beobachtet wurde.

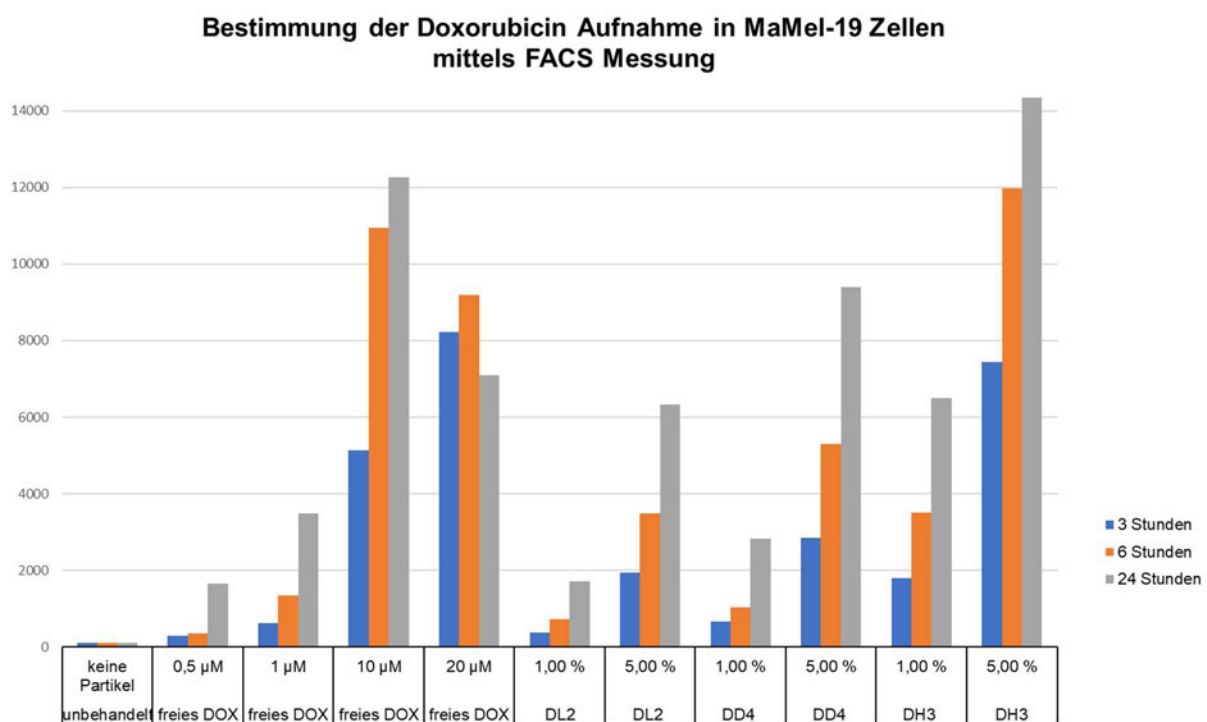


Abbildung 60: Doxorubicin Aufnahme in MaMel-19 Zellen mittels FACS Messung.

Bei allen gemessenen Proben steigt mit der Zeit die Konzentration an Doxorubicin in den Zellen an. Die Aufnahme von Doxorubicin aus den Polymersomen unterscheidet sich je nach Zusammensetzung der Polymersome. Im Falle der Polymersome, die im hydrophoben Block nur LMA haben (DL2), zeigt sich eine etwas geringere Aufnahme in die Zelle verglichen mit dem freien Doxorubicin. Die Polymersome mit LMA und DDEMA Bestandteilen (DD4) zeigen eine höhere Aufnahme von Doxorubicin in den Zellen als die reinen LMA Polymersome und das, obwohl sie eine ähnliche Doxorubicin Konzentration aufweisen. Mit den Doxorubicin Konzentrationen von 1,41 μM bei 1% und 7,05 μM bei 5% zeigen die DDEMA basierten Polymersome ein besseres

Aufnahmeverhalten als die freien Doxorubicin Proben. Die Polymersome mit dem zusätzlichen HHMA im hydrophoben Block zeigen die größte Aufnahme an Doxorubicin. Die Konzentrationen an Doxorubicin von 1,29 μM bei 1% und 6,47 μM bei 5% ungefähr so hoch wie die LMA Polymersome (DL2) und die DDEMA (DD4) Polymersome. Damit zeigen die HHMA basierten Polymersome, bei einer ähnlichen Konzentration an Doxorubicin ein besseres Aufnahmeverhalten als das freie Doxorubicin und die anderen Polymersome. Denn die Aufnahme an Doxorubicin ist in etwa um ein dreifaches erhöht verglichen mit den restlichen Polymersomen. Daraus lässt sich schließen, dass die Kombination der DDEMA und HHMA basierten hydrophoben Blöcke der Polymersomen die beste Aufnahme in die Zelle ermöglichen.

In einem weiteren Versuch wurden die Doxorubicin beladenen Polymersome auf MaMel-19 Sphäroide gegeben und unter einem EVOS Fluid Bildgebungssystem beobachtet. Dieses System ermöglicht die Aufnahme von 3-farbigem Fluoreszenz-Zellbildern. Sphäroide zeichnen sich durch Charakteristika von echten Tumoren aus. *In vitro* Versuche an Zellkulturen sind im zweidimensionalen Bereich, Sphäroide hingegen haben eine dreidimensionale Struktur, die der von Tumoren in der Realität gleicht. Sphäroide sind dichte dreidimensionale Zellaggregate, an denen Zelle an Zelle miteinander verbunden ist, sie haben Eigenschaften, die denen von *in vivo* Gewebe gleichen. Deshalb sind sie besonders gut als Modell für die Aufnahme von Wirkstoffträgern im Körper geeignet.

Bei einer Wellenlänge von 593 nm kann das Doxorubicin in den Zellen sichtbar gemacht werden. Dafür wurde freies Doxorubicin in den Konzentrationen 1 μM , 10 μM und 100 μM und 5% Volumenprozent der DD4 und DH3 Stammlösungen zweimal im Abstand von 72 Stunden auf die Zellen gegeben. Die Aufnahmen in dem EVOS Fluid Bildgebungssystem erfolgten vor Zugabe der Lösungen und 120 Stunden nach der ersten Zugabe beziehungsweise 40 Stunden nach der zweiten Zugabe der Lösungen (Abbildung 61). Bei der Doxorubicin-Lösung mit einer Konzentration von 1 μM konnte nur geringfügig Fluoreszenz in den Zellen gezeigt werden, wobei bei der 10 μM Konzentration ein intensives Leuchten im Inneren gezeigt wird. Es konnte gezeigt werden, dass im Fall der beiden Polymersome DD4 und DH3 eine Aufnahme von Doxorubicin in den Zellkern erfolgt ist. Die Konzentrationen an DD4 5% sind 7,05 μM und DH3 6,47 μM , wobei das Zellinnere mit den Polymersomen DH3 mehr leuchtet.

Das könnte auf ein besseres Aufnahmeverhalten des Polymers DH3 hinweisen, dies stimmt mit den Ergebnissen aus den FACS Messungen der Doxorubicin Aufnahme in MaMel-19 Zellen überein.

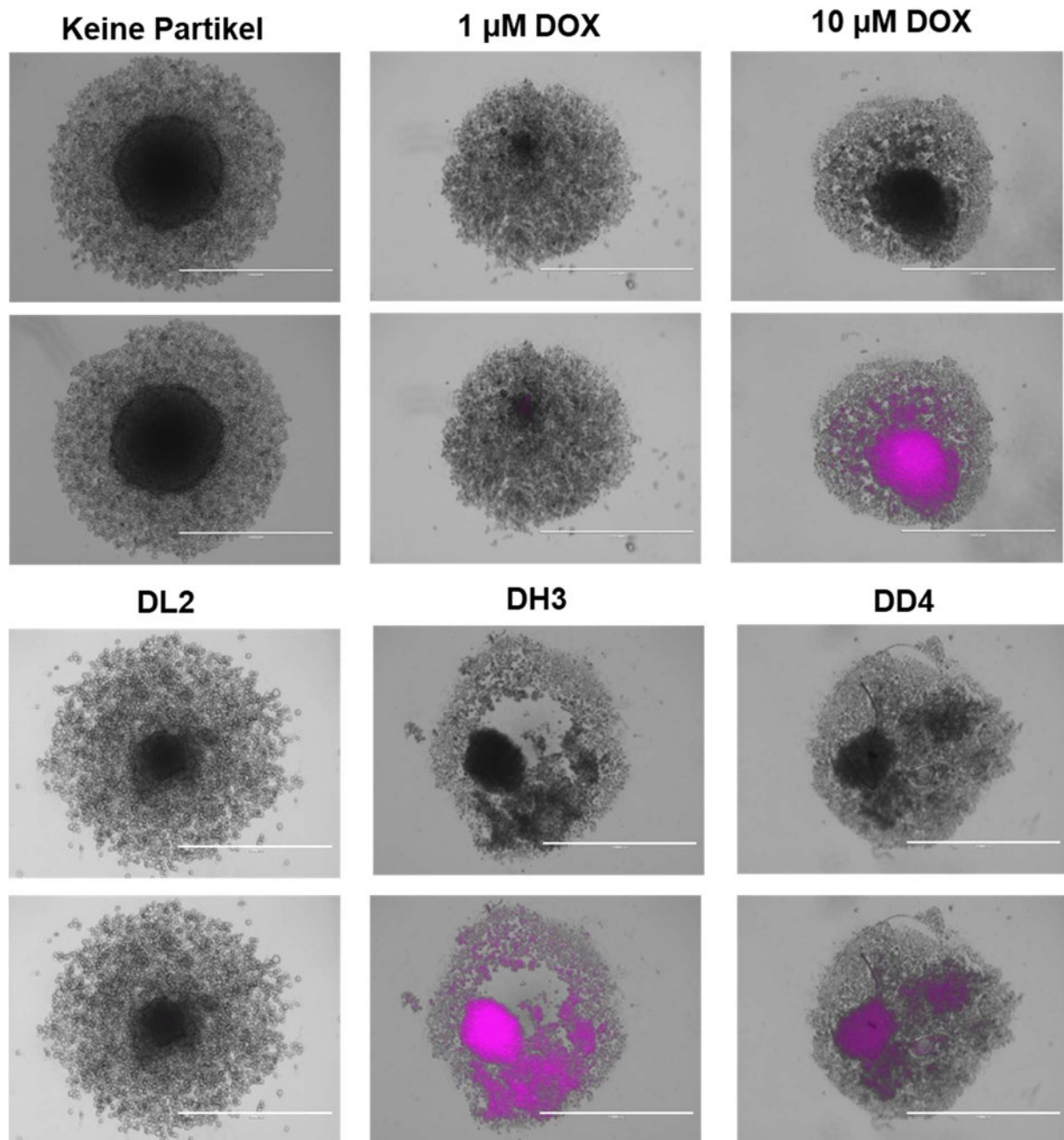


Abbildung 61: Fluoreszenz-Aufnahmen am EVOS Flouid Bildgebungssystem, überlagert bei 593 nm von MaMel-19 Sphäroid Zellen bei zweimaliger Behandlung mit freiem Doxorubicin und den Doxorubicin beladenen Polymersomen $(P(DHPMA)_{25}-b-P(LMA)_{28}$ (DL2), $P(DHPMA)_{27}-b-P(LMA_{21}-stat-DDEMA_8)$ (DD4) und $P(DHPMA)_{27}-b-P(LMA_{24}-stat-DDEMA_8-stat-HHMA_3)$ (DH3). Messbalken = 1000 µm.

Die MaMel-19 Sphäroid Zellen wurden im nächsten Versuch mit freiem Doxorubicin in den Konzentrationen 0,02 μM und 2 μM Doxorubicin pro Well und jeweils 2 μl pro Well an Polymersom-Lösungen DL2, DD4 und DH 3 behandelt. Um die Aufnahme an Doxorubicin in die Zellen zeitlich zu verfolgen, wurden die Zellen direkt nach der Zugabe, nach zwei Stunden, nach fünf Stunden und nach 20 Stunden unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet (Abbildung 62).

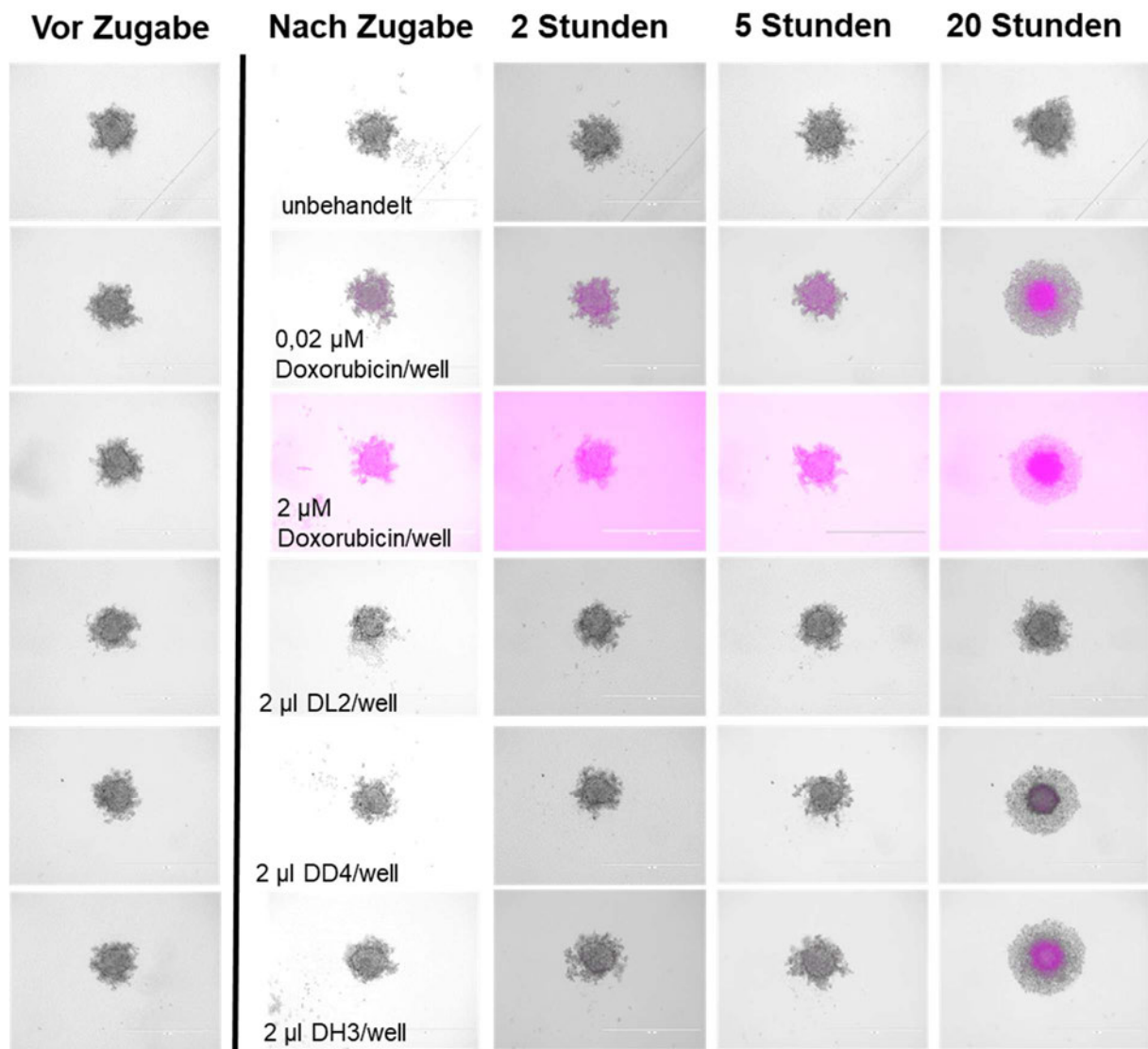


Abbildung 62: Fluoreszenzmikroskop Aufnahmen von MaMel-19 Sphäroid Zellen nach Zugabe von Doxorubicin in den Konzentrationen 0,02 μM und 2 μM und der Polymersom-Lösungen DL2, DD4 und DH3. Der Versuch wurde mit 2000 ausplattierten Zellen pro Well durchgeführt.

Im Falle vom freien Doxorubicin ist bei beiden Konzentrationen schon nach Zugabe der Lösung eine Fluoreszenz erkennbar, da das freie Doxorubicin in dem gesamten Zellmedium fluoresziert und gleichzeitig sehr schnell in die Zelle aufgenommen werden kann. Im Falle der Polymersom-Lösungen dagegen, liegt das Doxorubicin nicht frei in Lösung vor, deshalb kommt es zu keiner Fluoreszenz im Zellmedium. Das Doxorubicin muss erst aus den Polymersomen freigesetzt werden, dafür müssen diese erst in der Zelle angereichert werden. Da Sphäroide eine 2D-Struktur aufweisen, benötigt man erst eine gewisse Anreicherung an Doxorubicin im Inneren, damit eine gewisse Fluoreszenz bis nach außen detektiert werden kann. Die Sphäroide, die mit den Polymersomen behandelt wurden, zeigen direkt nach der Zugabe, nach 2 und 5 Stunden keine Floreszenz, sondern erst nach 20 Stunden. Das zeigt, dass die Polymersom-Lösungen keine größeren Mengen an freiem Doxorubicin enthalten und Doxorubicin größtenteils eingeschlossen ist und deshalb eine gewisse Zeit braucht um freigesetzt zu werden.

Größenänderung der MaMel-19-Sphäroide nach Behandlung mit Doxorubicin und Partikeln

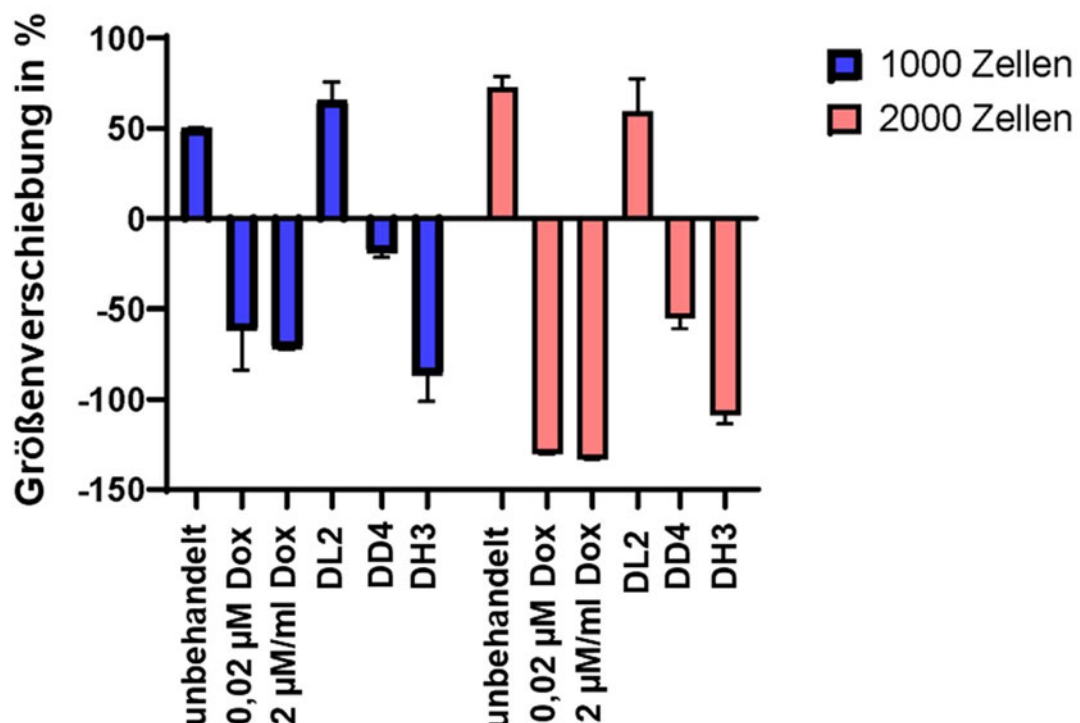


Abbildung 63: Vermessung des dichten Teils der Sphäroide vor und nach Behandlung durch Doxorubicin.

Bei der Aufnahme von Doxorubicin in die Sphäroid Zellen kommt es zu einer Größenveränderung der Sphäroide. Allgemein ist dann ein Unterscheid im Aussehen der Sphäroide erkennbar, da sich die äußeren Zellen ablösen. Das ist sowohl im Fall von freiem Doxorubicin als auch bei den Polymersom-Lösungen DD4 und DH3 zu beobachten. In Abbildung 63 zeigt die Messung des dichten Teils der Sphäroide dabei wurden die äußeren losen Zellen nicht berücksichtigt. Es wird die Veränderung der Größe des Kerns gegenüber dem gleichen Sphäroid vor Behandlung mit Doxorubicin gemessen. Ein Wachstum spiegelt sich in Werten größer Null wider, ein Schrumpfen dagegen in Werten kleiner Null. Bei der Behandlung von Sphäroiden mit Doxorubicin wird die Zellteilung eingeschränkt und es kommt teilweise zur Ablösung von Zellen in den äußeren Bereichen des Sphäroids.

3.10. Beladung von Polymersomen mit Rapamycin

Um eine Einschätzung zu erhalten wie gut die Einschlusseffizienz der Polymersome mit anderen Substanzen ist, wurde in die Partikel der hydrophobe Wirkstoff Rapamycin mit einer Löslichkeit in Wasser von 2,6 µg/ml ($\log P_{o/w} = 5,77$)¹⁵⁸ eingeschlossen.

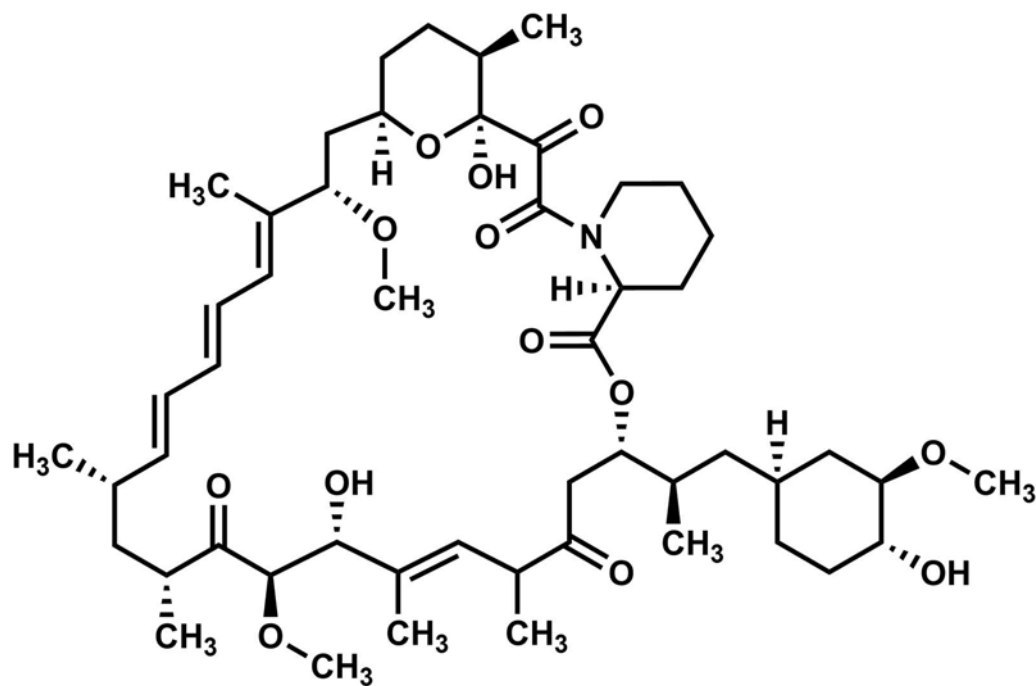


Abbildung 64: Strukturfomel von Rapamycin.

Eine in der Pharmaindustrie weit verbreitete Methode zur Konzentrationsbestimmung von Wirkstoffen erfolgt mittels analytischer HPLC. Dabei wird der Wirkstoff bei unterschiedlichen Konzentrationen über die HPLC gegeben und über die Intensität der erhaltenen Peaks eine Konzentrationskurve erstellt. Dafür wurde eine 50 mg/ml Rapamycin-Lösung in Ethanol hergestellt. Die Löslichkeit von Rapamycin in Ethanol ist besser als in Wasser. Vom Polymer P(DHPMA)₂₄-*b*-P(LMA)₂₅ (DL5) wurden 2,5 mg mit 15 µl der 50 mg/ml Rapamycin Lösung und 15 µl Wasser mit 40 mg Silica Kugeln in die duale asymmetrische Zentrifuge gegeben und zweimal bei 2500 rpm für 16 Minuten zentrifugiert. Danach wurde die Lösung mittels HPLC aufgereinigt. Um die Beladung der Polymersome zu bestimmen, wurde die Lösung gefriergetrocknet. Das erhaltene Lyophilisat wurde in Ethanol gelöst und die Lösung für 20 Minuten zentrifugiert. Das freie Rapamycin löst sich in Ethanol und das Polymer bleibt als Rückstand auf dem Boden des Reaktionsgefäßes zurück. 10µl des Überstands wurden mit 90µl Wasser verdünnt.

Davon wurden 50 µl in der analytischen HPLC gemessen, dabei wurde eine Konzentration von 0,0744 µg/µl gemessen. Damit ist in der gesamten Rapamycin HPLC Fraktion insgesamt 156,76 µg Rapamycin. In den anfangs eingesetzten 15 µl der 50 mg/ml Stammlösung sind insgesamt 750 µg Wirkstoff enthalten. Damit liegt die Einschlusseffizienz an Rapamycin von den Polymeren der Zusammensetzung P(DHPMA)₂₄-*b*-P(LMA)₂₅ (DL5) bei 20,6%. Folglich ist die Einschlusseffizienz des Wirkstoffs Rapamycin etwa doppelt so hoch wie beim Doxorubicin. Das kann darauf zurückzuführen sein, dass Rapamycin eine bessere Löslichkeit in den Polymersomen hat.

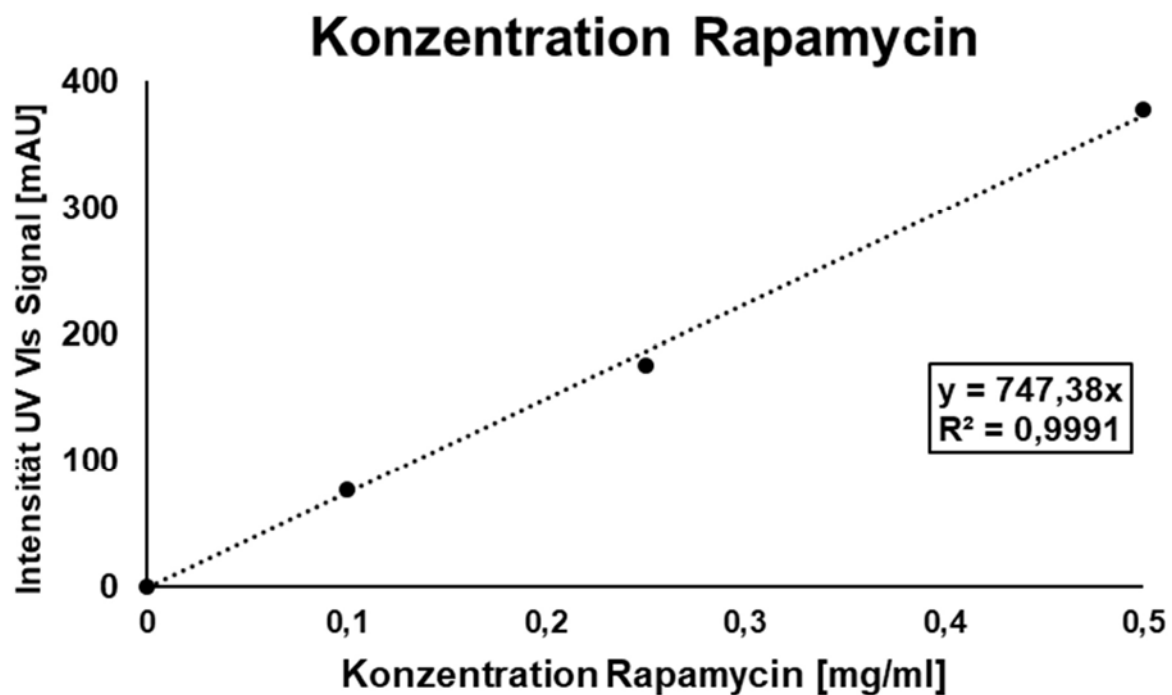


Abbildung 65: Konzentrationskurve von Rapamycin mittels analytischer HPLC.

3.11. Beladung von Polymersomen mit siRNA

Polymersome der drei Zusammensetzungen wurden mit siRNA beladen um zu prüfen ob sie sich als Transfektionsagezien für siRNA eignen.

Dafür wurden die Polymersome der Zusammensetzungen P(DHPMA)₃₅-*b*-P(LMA₅₁-*stat*-DDEMA₂₀) (DD1), P(DHPMA)₂₅-*b*-P(LMA)₂₈ (DL2) und P(DHPMA)₂₅-*b*-P(LMA₁₆-*stat*-DDEMA₆) (DD2) mit den siRNAs: siGFP (Luciferase Assay), siEG5 (MTT-Assay) und siCtrl beladen. Letztere siRNA führt zu keinem Knockdown in den Zellen und dient lediglich als Kontrolle.

Die siRNA beladenen Polymersome wurden im Luciferase und MTT-Assay auf ihre Transfektion in Tumorzellen, die stabil eGFPLuc exprimieren, untersucht. Diese Versuche wurden im Rahmen einer Kooperation im Rahmen des SFB1066 in der Arbeitsgruppe von [REDACTED] an der LMU München von [REDACTED] durchgeführt.

3.11.1. Luciferase Assay zur Bestimmung der Transfektion

Mit Hilfe des Luciferase Assays soll die Transfektionseffizienz von siRNA in Zellen überprüft werden. Dafür wurden die Polymersome jeweils mit Kontroll-siRNA und GFP siRNA beladen. Um eine erfolgreiche Transfektion nachzuweisen, muss die siRNA aus den Polymersomen freigesetzt werden. Im besten Fall im Zytosol, nachdem die Polymersome von den Zellen aufgenommen wurden. Bei erfolgreicher Transfektion erfolgt der Knockdown eines bestimmten Gens, das sogenannte Gene silencing. In diesem Fall wird das Fusionsprotein eGFPLus ausgeschaltet und im Zellversuch wäre folglich eine geringere Biolumineszenz messbar.

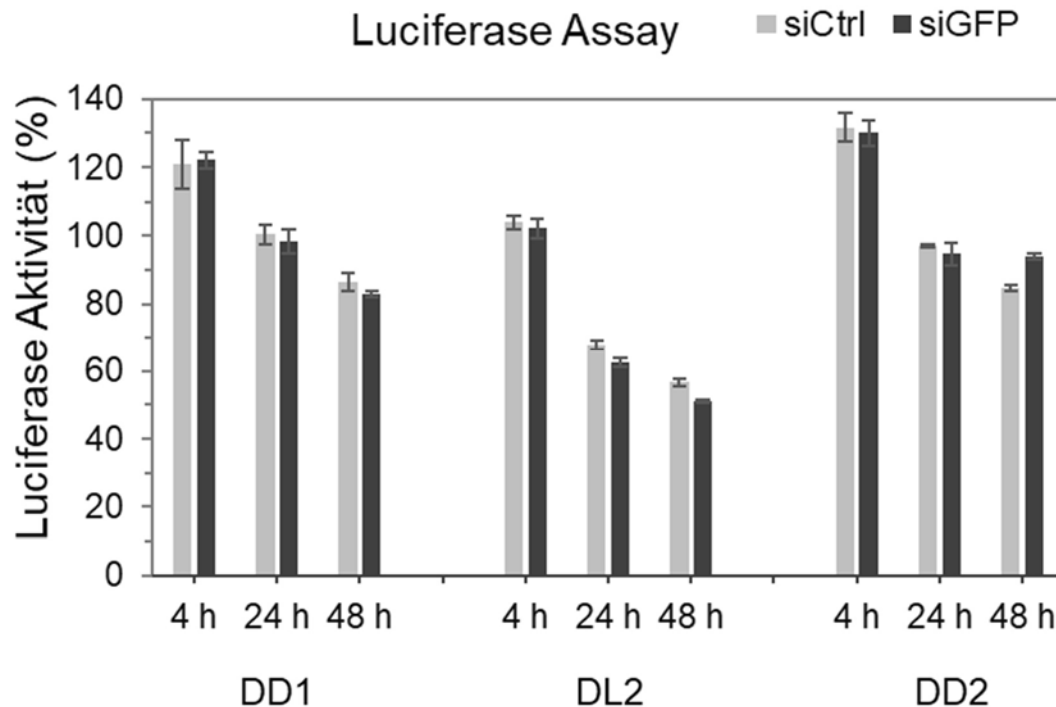


Abbildung 66: Luciferase Assay: Fluoreszenzmessungen Polymersome P(DHPMA)₃₅-*b*-P(LMA₅₁-*stat*-DDEMA₂₀) (DD1), P(DHPMA)₂₅-*b*-P(LMA)₂₈ (DL2) und P(DHPMA)₂₅-*b*-P(LMA₁₆-*stat*-DDEMA₆) (DD2).

Die mit GFP siRNA beladenen Polymersome wurden mit DU145/eGFPLuc Zellen inkubiert. Als Kontrolle wurden Polymersome mit siCtrl beladen und ebenfalls auf die Zellen gegeben. Diese siRNA führt zu keinem Knockdown in den Zellen. Die Polymersome wurden für die Zeiträume 4 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden mit den Zellen inkubiert. Anschließend wird die Luciferaseaktivität im Luminometer (Centro LB 960 plate reader Luminometer) analysiert (Abbildung 66). In diesem Fall war keine Verringerung der Luciferase Aktivität im Vergleich zu der Kontrollgruppe erkennbar. Eine Transfektion konnte bei allen drei Polymersomen zu keinem der Zeiträume nachgewiesen werden. Dies legt die Frage nahe, inwieweit die eingesetzten Polymersome geeignete Träger für siRNA-Moleküle sind. Im Fall der Polymersome DL2 zeigte sich ein Anstieg der Toxizität bei längeren Inkubationszeiten. Die anderen Polymersome zeigten keine erhöhte Toxizität auf.

3.11.2. MTT-Assay zur Bestimmung der Transfektion

Die Polymersome der drei Zusammensetzungen wurden mit der siRNA siEG5 beladen und auf Zellen gegeben. Als Kontrolle dienten die Polymersome, die mit Kontroll-siRNA beladen wurden. Das Protein EG5 ist ein Schlüsselprotein bei der Mitose von Zellen. Die eingesetzte siRNA schaltet bei erfolgreicher Transfektion das EG5 Protein aus. Dadurch wird die Zellteilung unterbrochen und die Apoptose der Zellen wird eingeleitet.

Dafür wurden die siRNA beladenen Polymersome für die Zeiträume 4 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden mit den DU145 Zellen inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe des Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT). Damit ist es möglich die Viabilität von Zellen nachzuweisen, da MTT von NADH und NADPH der Zellen zu einem lila unlöslichen Formazan-Salz reduziert wird. Im Falle einer Transfektion wäre eine deutliche Abnahme in der Zellviabilität zu erkennen.

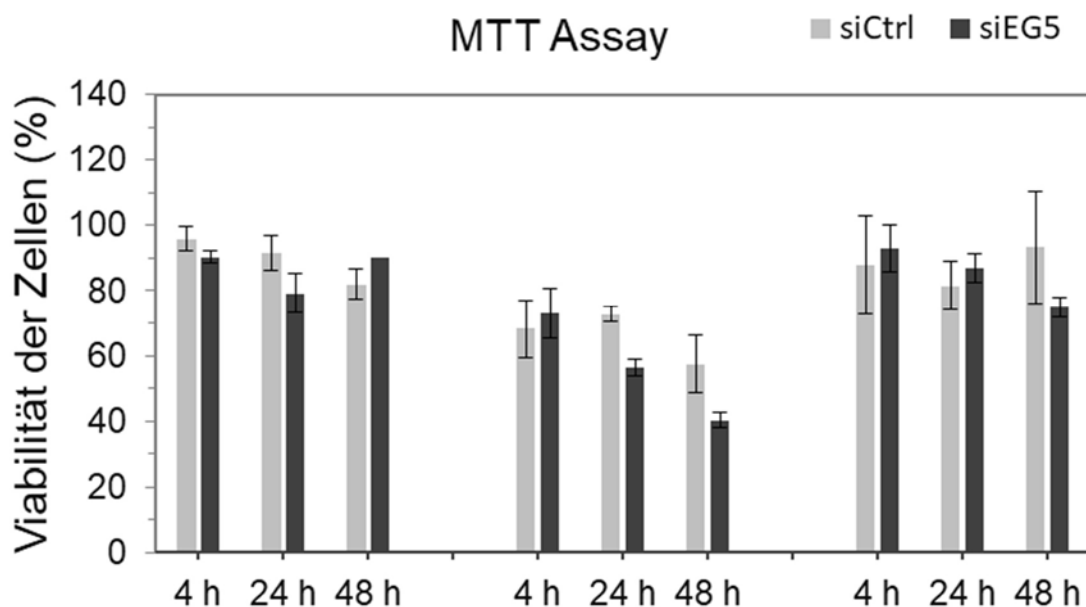


Abbildung 67: MTT-Assay der Polymersome P(DHPMA)₃₅-*b*-P(LMA₅₁-*stat*-DDEMA₂₀) (DD1), P(DHPMA)₂₅-*b*-P(LMA)₂₈ (DL2) und P(DHPMA)₂₅-*b*-P(LMA₁₆-*stat*-DDEMA₆) (DD2).

Die gemessenen Zellviabilitäten sind in Abbildung 67 gezeigt. Es konnte bei allen drei Polymersomen keine signifikante Abnahme der Zellviabilität und somit keine Transfektion nachgewiesen werden.

3.12. Beladung der Polymersome mit TNF-Alpha

Als weitere Substanz wurde der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) in die Polymersome eingeschlossen. TNF- α gehört zur Überfamilie der TNF/TNFR Zytokine und ist beteiligt bei der Aufrechterhaltung und Homöostase des Immunsystems sowie Entzündungsprozessen und Abwehrmechanismen des Organismus. TNF- α wird hinsichtlich seines Einsatzes in der Krebstherapie erforscht.¹⁵⁹

Das Polymer P(DHPMA)₂₄-*b*-P(LMA)₂₅ (DL5) wurde in Chloroform aufgenommen. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wurde der Polymerfilm in 20 μ l einer 1mg/ml TNF- α Lösung gelöst. Die Assemblierung der Partikel erfolgte mit der dualen asymmetrischen Zentrifuge und die Aufreinigung erfolgte mittels HPLC (Abbildung 50).

Die Bestimmung der Menge an eingeschlossenem TNF- α wurde im Rahmen einer Kooperation in der Arbeitsgruppe von [REDACTED] an Universitätsmedizin Mainz von [REDACTED] durchgeführt. Die Quantitative Bestimmung der Menge an TNF- α in den Partikeln erfolgte mittels Human TNF ELISA Kit. Es wurden zwei Ansätze gemessen und dabei die Mengen an TNF- α von 2,53 μ g und 3,26 μ g pro Ansatz bestimmt.

In 20 μ l der eingesetzten 1 mg/ml Stammlösung sind insgesamt 20 μ g Substanz enthalten. Damit liegt die gemessene Einschlusseffizienz an TNF- α von den Polymeren der Zusammensetzung P(DHPMA)₂₄-*b*-P(LMA)₂₅ (DL5) zwischen 12,7% und 16,3 %. Die erhaltene Einschlusseffizienz ist hiermit größer als von Doxorubicin (Kapitel 3.9.1) und kleiner als von Rapamycin (Kapitel 3.10).

Tabelle 11: Hydrodynamischer Durchmesser der erhaltenen Polymersome gemessen am Zetasizer vom Malvern Panalytical.

Polymere	Hydrodynamischer Durchmesser [nm]	PDI
P(DHPMA) ₂₃ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₁ (DL5)	176,9 nm	0,201
P(DHPMA) ₂₄ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₅ (DL5) Ansatz A mit TNF- α	169,3 nm	0,259
P(DHPMA) ₂₄ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₅ (DL5) Ansatz B mit TNF- α	183 nm	0,284

3.13. Adressierung der Azid Endgruppe zur Funktionalisierung von Aggregaten

Im nächsten Schritt soll über die sogenannte „*Strain promoted [3+2] Azide-Alkyne Cycloaddition*“ (SPAAC) eine Anbindung von funktionellen Gruppen an die Azid-Gruppe auf der äußeren Hülle der erhaltenen Aggregate erfolgen. Dafür werden nach Bildung der Aggregate, über die duale asymmetrische Zentrifuge, DBCO-funktionalisierte Bausteine zur Lösung gegeben. Die Probe wird bei Raumtemperatur für einige Stunden geschüttelt und im Anschluss erfolgt die Aufreinigung mittels HPLC wie in Kapitel 3.5 beschrieben.

Als Modellkomponenten wurden dafür die Fluoreszenzfarbstoffe Cw800 und Alexa Fluor 647 verwendet.

3.14. Körperverteilung von Polymersomen mit Cw800

Markierung über das Azid

Um die Verteilung der hergestellten Polymersome im Körper zu untersuchen wurden diese im Tierversuch Mäusen injiziert. Die im Folgenden dargestellte Ergebnisse aus den Tierversuchen wurden in Zusammenarbeit mit Frau [REDACTED] aus der Arbeitsgruppe von [REDACTED] an der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Dafür wurden Polymersome der Zusammensetzungen $P(\text{DHPMA})_{30}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_{32}$ (P1), $P(\text{DHPMA})_{30}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{10}\text{-}stat\text{-}DDEMA_8)$ (P2) und $P(\text{DHPMA})_{30}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{21}\text{-}stat\text{-}DDEMA_{17}\text{-}stat\text{-}HHMA_2)$ (P3) verwendet. Diese wurden über die Azid-Endgruppe mit dem DBCO-funktionalisierten Fluoreszenzfarbstoff Cw800 markiert. Die drei Polymerzusammensetzungen wurden in zwei unterschiedlichen Konzentrationen den Tieren injiziert. Die niedrigere Konzentration (low) wurde jeweils zwei Mäusen verabreicht und die höhere Dosis einer Maus. Zusätzlich wurde zur Referenz eine Maus ohne Injektion (control) eingesetzt.

Die Verteilung im Körper der Mäuse konnte über Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die Messungen erfolgten fünf Minuten nach Injektion, nach sechs Stunden und nach

24 Stunden. Den Mäusen wurden nach sechs Stunden und 24 Stunden die Organe entnommen und diese separat vermessen.

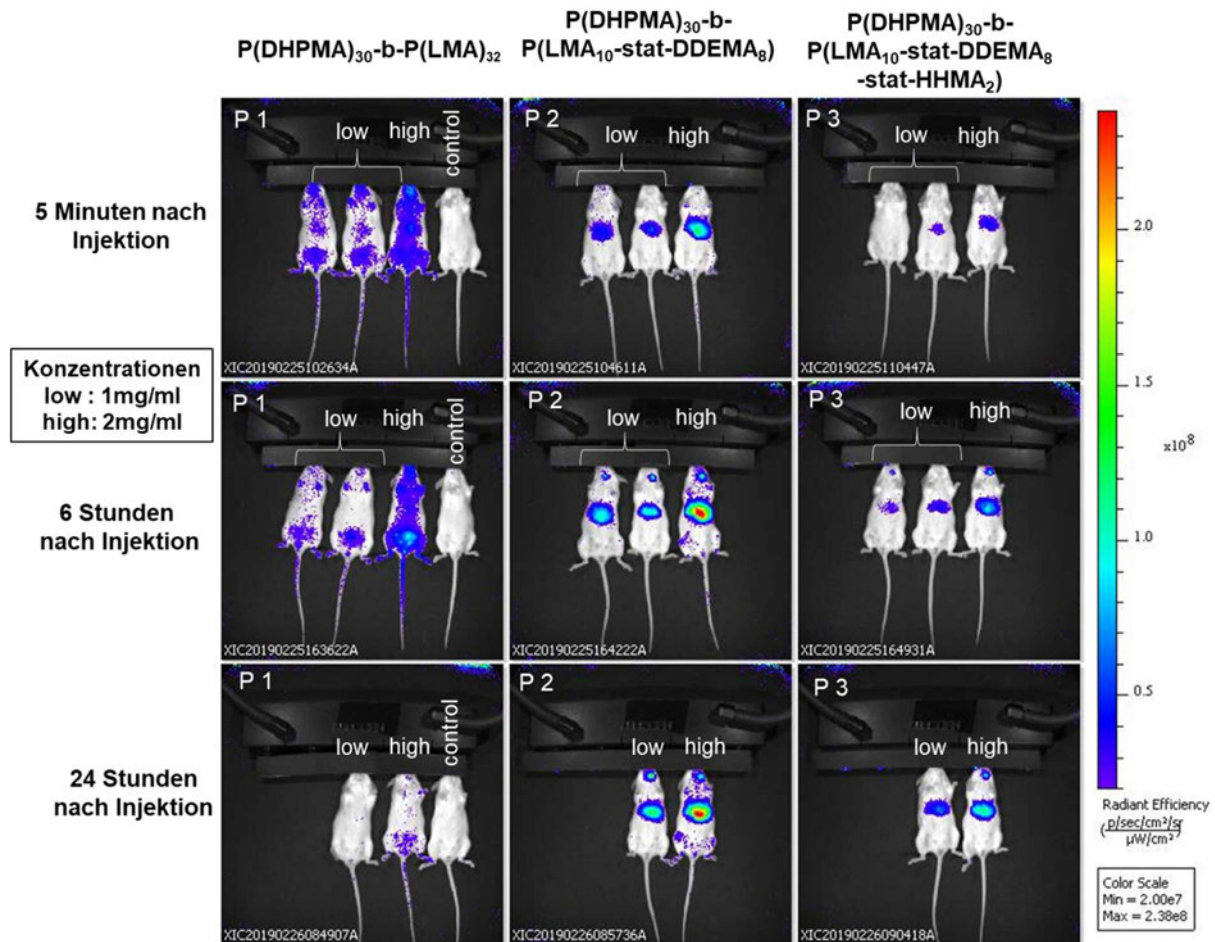


Abbildung 68: Körperverteilung der mit Cw800 fluoreszenzmarkierten Polymersome P1, P2 und P3 im Mausversuch.

Fünf Minuten nach Injektion sind im Fall vom Polymersom P1 die Fluoreszenz über den gesamten Körper der Maus zu erkennen. Die injizierten Polymersome verteilen sich im gesamten Tier. Dagegen zeigen sich bei den Polymersomen P2 und P3 eine gezielte Anreicherung in der Mitte des Körpers. Bei der nächsten Messung, sechs Stunden nach Injektion erkennt man bei P1, im Falle der geringeren Konzentration eine Anreicherung im unteren Teil der Maus. Nach 24 Stunden ist nur in der Maus mit der hohen Konzentration an P2 noch ein Fluoreszenzsignal im unteren Bereich des Maus zu erkennen. Dort ist die Blase lokalisiert, P1 scheint sich nicht angereichert zu haben, sondern wurde über die Blase ausgeschieden. Das ist ein Zeichen dafür, dass die Partikel P1 möglicherweise nicht intakt waren oder freien Fluoreszenzfarbstoff

enthalten haben. Die Polymersome könnten kaputt gegangen sein. Dagegen spricht, dass sie vor der Funktionalisierung mit Cw800 am Zetasizer vermessen wurden. Wahrscheinlicher ist es, dass es viel freien Farbstoff gab, beziehungsweise kaum Farbstoff an den Polymersomen dran war. Somit hat die Probe nur aufgrund des freien Farbstoffes ein Fluoreszenzsignal gehabt. Alle drei eingesetzten Polymersome wurden mittels Spinfiltration in mehreren Schritten an der Zentrifuge gereinigt. Hier zeigt sich erneut der Nachteil gegenüber einer Aufreinigung mit HPLC. Die Polymersome waren immer wieder Scherkräften ausgesetzt, die sie beschädigt haben könnten. Ebenfalls ist denkbar, dass nicht der gesamte freie Farbstoff mit dieser Methode entfernt werden konnte.

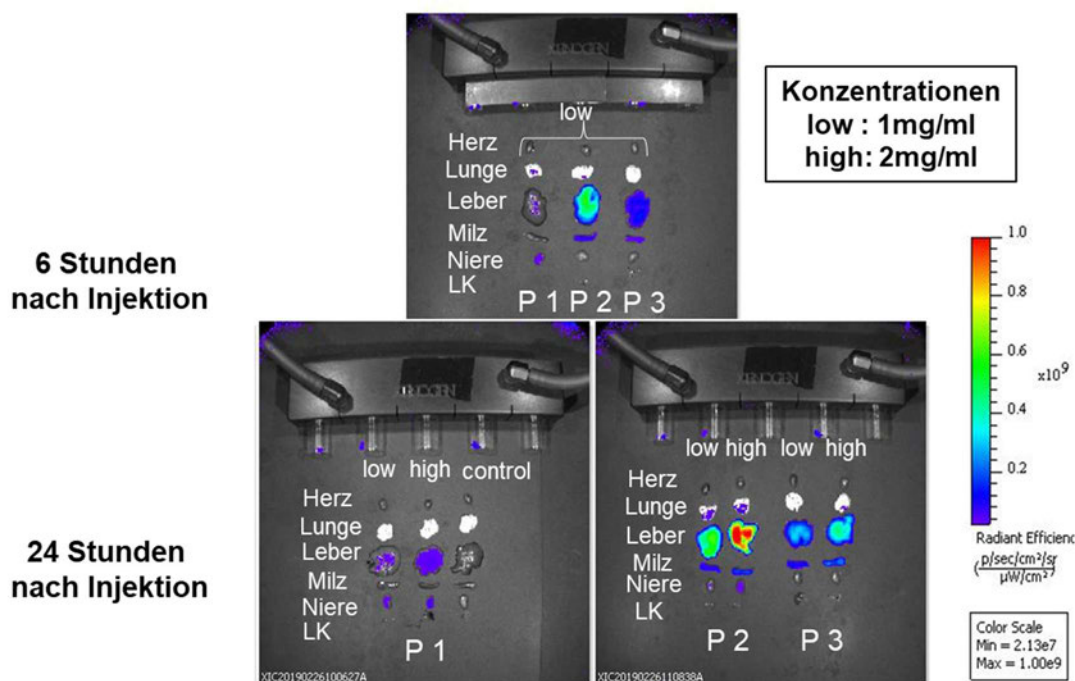


Abbildung 69: Organverteilung der Polymersome $P(\text{DHPMA})_{30}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_{32}$ (P1), $P(\text{DHPMA})_{30}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{10}\text{-}stat\text{-}DDEMA_8)$ (P2) und $P(\text{DHPMA})_{30}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_{21}\text{-}stat\text{-}DDEMA_{17}\text{-}stat\text{-}HHMA_2)$ (P3).

Die Polymere P2 und P3 zeigten nach sechs und 24 Stunden eine Anreicherung in der Mitte des Körpers der Maus. Um herauszufinden in welchen Organen die Partikel lokalisiert sind wurden den Mäusen nach sechs und nach 24 Stunden Organe entnommen und diese vermessen. Da es im Falle von P1 zu einer Ausscheidung der

Partikel innerhalb der 24 Stunden kam, wurden diese Polymersome hauptsächlich in der Niere gefunden.

Kleine Partikel neigen dazu über die Niere und die Blase ausgeschieden zu werden. Die P1 Polymersome zeigten im Vergleich zu P2 und P3 eine geringe Anreicherung in der Leber. Die Polymersome P2 und P3 sind primär in der Leber lokalisiert.

3.14.1. Quantifizierung der Menge an siRNA pro Polymersom

Für die Quantifizierung der Menge an siRNA pro Polymersom, wurden die Polymersome mit siRNA beladen und zusätzlich den DBCO-funktionalisierten Fluoreszenzfarbstoff Cw800 an die Azid-Gruppe gebunden.

Nach der Aufreinigung mittels HPLC wurden Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) Messungen am Max-Planck-Institut für Polymerforschung von dem Kooperationspartner [REDACTED] aus der Arbeitsgruppe von [REDACTED] durchgeführt.

In einem ersten Schritt wurden Polymersome gemessen die mit dem Farbstoff Cw800 mittels Click-Reaktion markiert wurden und nicht beladen waren. Abbildung 70 zeigt, die aus der Messung erhaltenen Korrelationsgraphen. Es wurde kein freier Cw800 Farbstoff gemessen wurde. Daraus lässt sich schließen, dass die Aufreinigung mittels HPLC saubere Aggregate ohne Reste an freiem Farbstoff liefert. Damit bietet diese Aufreinigungsmethode gegenüber der Aufreinigung mittels Spinfiltration einen erheblichen Zeitgewinn und ist zusätzlich schonender zu den Partikeln, da diese niedrigeren Scherkräften ausgesetzt werden. Die Aufreinigung mittels Spinfiltration an einer Zentrifuge kann durchaus mehr als zehn Waschschrte beinhalten. Trotzdem lassen sich in der FCS oftmals noch Spuren an freien Farbstoff nachweisen.

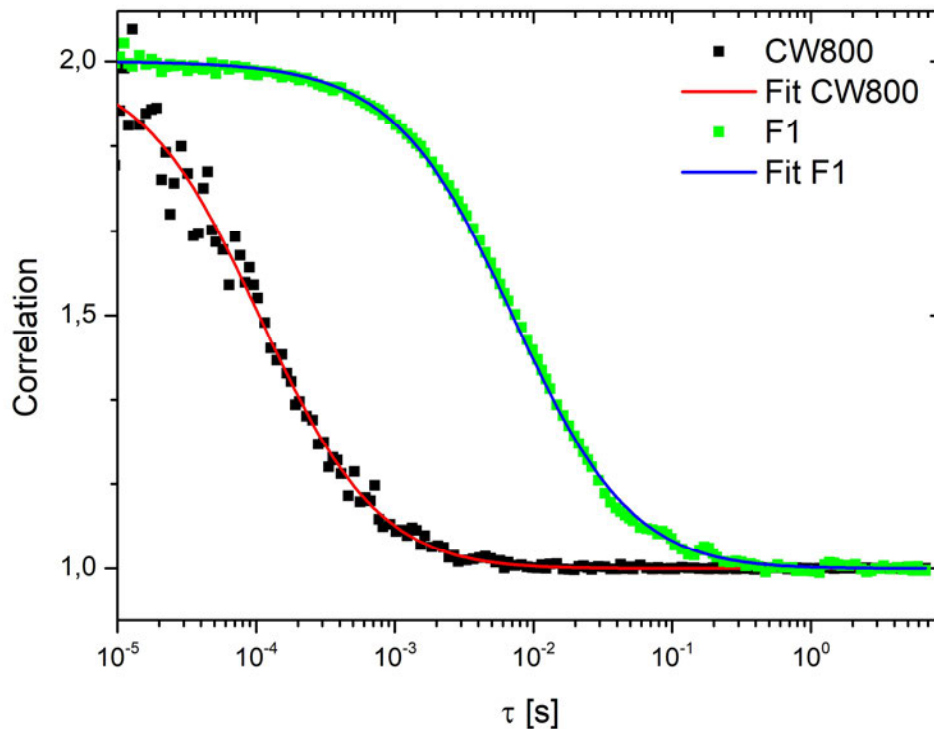


Abbildung 70: FCS Messung von dem freien Farbstoff Cw800 (rot) und dem mit Cw800 funktionalisierten Partikel (grün).

In einem nächsten Schritt wurden die Polymersome $P(\text{DHPMA})_{30}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA-}i\text{stat-DDEMA})$ mit Cy 5 markierter siRNA beladen. Ziel war es die Menge an siRNA Molekülen pro Aggregat zu quantifizieren. Anhand der FCS-Messungen konnte die Menge von 3 siRNA Molekülen pro Aggregat quantifiziert werden (Abbildung 71). Das ist eine geringe Menge pro Polymersom, somit kann es schwierig sein eine ausreichende Menge siRNA mittels Polymersome zu transportieren, um in Zellversuchen einen signifikanten Effekt nachzuweisen.

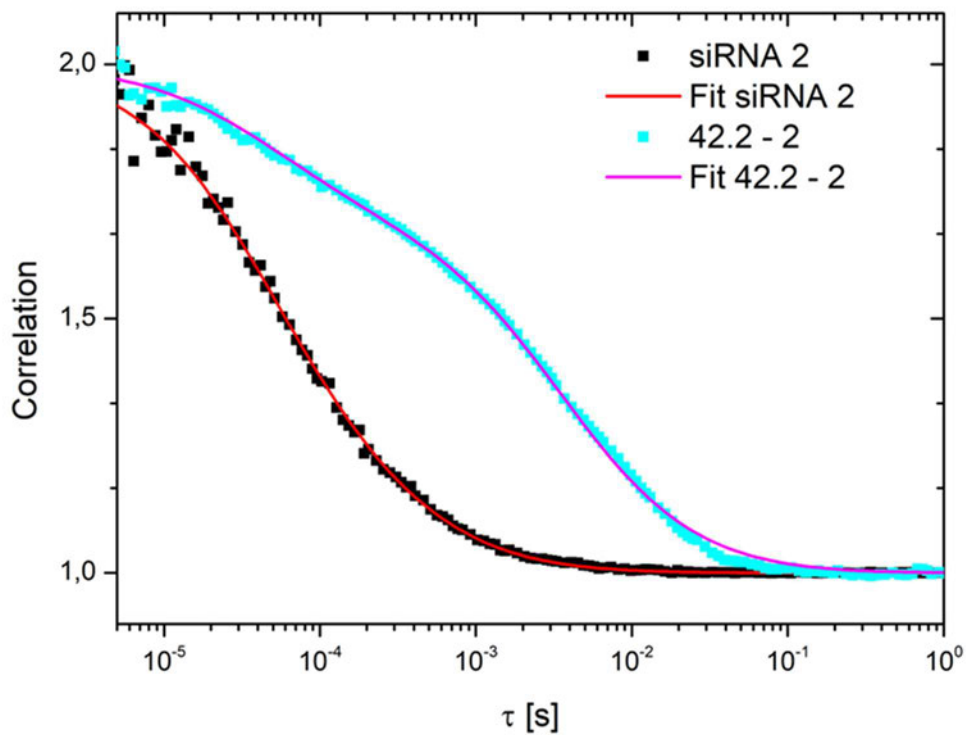


Abbildung 71: FCS Messung der siRNA beladenen Partikel.

Der gemessene hydrodynamische Radius der eingesetzten Partikel lag bei 46,67 nm. Die mit Zetasizer gemessenen hydrodynamischen Durchmesser für diese Partikel lagen bei 97,06 nm bei einem PDI von 0.138, in beiden Fällen wurden die Proben vor der Messung filtriert. Damit stimmen die gemessenen Partikelgrößen mit beiden Methoden überein.

3.14.2. Funktionalisierung der Polymersome mit Biotin

Im nächsten Schritt wurde die äußere Hülle der Polymersome mit Biotin-Molekülen funktionalisiert. Durch die Anbindung von Biotin ist es möglich Streptavidin als Brücke zu verwenden, um beispielsweise Biotin-markierte Antikörper an die Oberfläche der Polymersome anzubringen. Die Biotin-Streptavidin Bindung ist eine der stärksten bekannten nicht kovalenten Bindungen und ist deshalb in der Wissenschaft weit verbreitet. Diese Bindung findet beispielsweise Verwendung, um die Bindung von Enzymen an Antikörpern zu vereinfachen, bei der Aufreinigung über biotinierte Strukturen und zur Aufreinigung von Nukleinsäuren.

Dafür wurde an die Azid-Endgruppe der hergestellten Polymere ein Biotin-DBCO-Molekül mittels SPAAC angebunden. Um zu überprüfen, dass es zu keinen unspezifischen Bindungen zwischen Biotin funktionalisierten Polymersomen und Streptavidin kommt, wurden zusätzlich Polymersome ohne Biotin-Gruppe getestet. Beide Polymersomen Arten wurden zusätzlich mit Alexa Fluor 647-DBCO markiert. Die mittels Dynamischer Lichtstreuung gemessenen hydrodynamischen Durchmesser und Polydispersitäten sind in Tabelle 12 und Abbildung 72 aufgeführt.

Tabelle 12: Hydrodynamische Durchmesser und Polydispersitäten gemessen mittels Dynamischer Lichtstreuung.

Polymere	Hydrodynamischer Durchmesser [nm]	PDI
P(DHPMA) ₂₅ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₈ (DL2) + Biotin +AF 647	192,9 nm	0,259
P(DHPMA) ₂₅ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₈ (DL2) + Biotin +AF 647 nach 4 Monaten Lagerung	198,0 nm	0,143

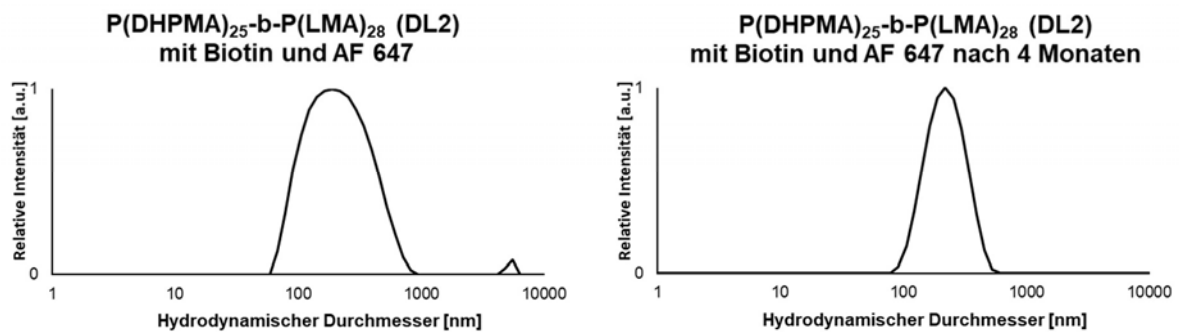


Abbildung 72: DLS-Messungen der mit Biotin und Alexa Fluor 647 funktionalisierten Polymersome der Zusammensetzung $P(\text{DHPMA})_{25}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_{28}$.

An dieser Stelle ist besonders die hohe Lagerungsstabilität hervorzuheben, die gebildeten Polymersome zeigten auch nach einem Zeitraum von vier Monaten definierte Partikel. Zusätzlich kam es durch die Lagerungszeit zur sogenannten Reifung der Aggregate. Dabei stellt sich ein gewisses Größenverteilungsgleichgewicht über die Zeit ein und die Aggregate weisen engeren Verteilungen im Hydrodynamischen Durchmesser auf.

Die folgenden Bindungsversuche mit Biotin-Streptavidin wurden an der Universitätsmedizin Mainz von dem Kooperationspartner Dr. [REDACTED] aus der Arbeitsgruppen [REDACTED] durchgeführt.

Um die Bindung zwischen Biotin-Polymersomen und Streptavidin nachzuweisen wurden sowohl Streptavidin gecoatete Silica Partikel mit Biotin-Polymersomen als auch Silica Partikel mit unfunktionalisierten Polymersomen in 0,5 ml Reaktionsgefäßen mit 200 µl DPBS Puffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde danach mit DPBS Puffer gespült und dabei bei 400 g für fünf Minuten zentrifugiert. Die Mischungen aus Silicakugeln und Polymersome wurden in 200 µl DPBS resuspendiert und am selben Tag gemessen. Die Bindung der Polymersome mit Silicapartikeln wurde über die Fluoreszenz der Alexa Fluor markierten Polymersomen quantifiziert. Dafür wurde die flow cytometry (FCS) eingesetzt. Die eingesetzten Silica Partikel hatten die Größe von 5 µm. Damit befinden sie sich im Größenbereich von Zellen und können mittels Durchflusszytometrie analysiert werden. Dabei wurde die Fluoreszenz der unmarkierten Polymersome, von dem Fluoreszenzsignal der Biotin-Polymersome abgezogen. Die so erhaltenen Daten sind in Abbildung 73 dargestellt.

Verhältnis Fluoreszenz Biotin-Polymersome zu unfunktionalisierten Polymersomen

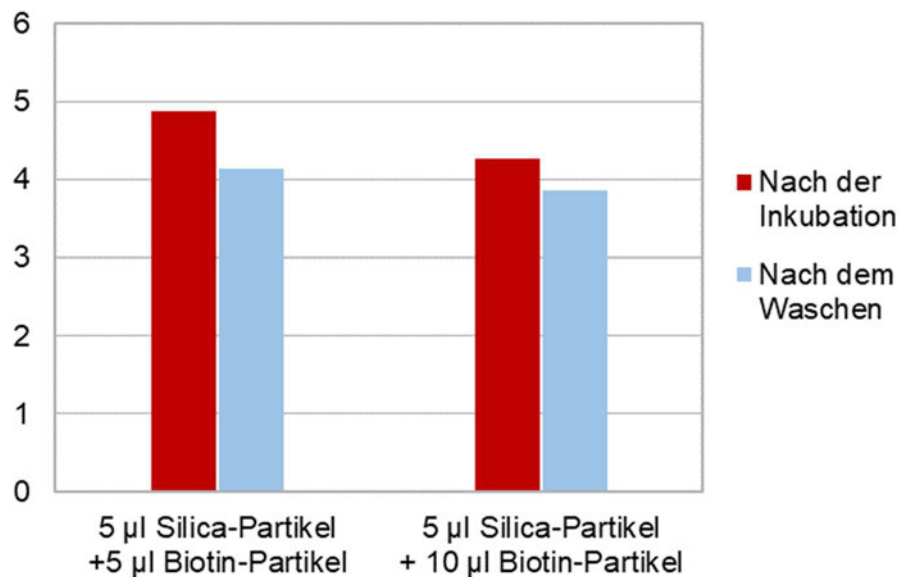


Abbildung 73: Die Fluoreszenz im Verhältnis von Biotin-Polymersomen zu unfunktionalisierten Polymersomen P(DHPMA)₂₅-b-P(LMA)₂₈ (DL2).

Es wurden jeweils drei Messungen zu jedem Fluoreszenzverhältnis gemacht und der Mittelwert im Diagramm aufgetragen. Es konnte gezeigt werden, dass die Anbindung von Streptavidin über Biotin an Polymersome erfolgreich war. Die drei Waschriffe erfolgten im Abstand von einer Woche und der Verlust an Biotin-Partikeln dabei erwies sich als minimal. Es wurden die Volumen 5 µl und 10 µl Biotin-Polymersomen zur Inkubation mit den Silicapartikeln eingesetzt. Der Einsatz der größeren Menge an Biotin-Polymersomen führte zu keiner Steigerung der Bindung von Biotin-Polymersomen an die Silicapartikel. Das weist darauf hin, dass bereits die kleinere Menge von 5 µl ausreichend ist um die zugänglichen Streptavidin Moleküle auf den Silicapartikeln zu binden. Im Fall der Inkubation mit den 10µl Biotin-Polymersomen, kam es schon beim Einsatz der unfunktionalisierten Polymersome zu einer größeren Anbindung. Deshalb fällt der Wert für das Fluoreszenzverhältnis kleiner aus.

Es konnte gezeigt werden, dass die Anbindung von Biotin über die Azid-Gruppe an die äußere Hülle der Polymersome möglich ist. Das zeigt, dass die Azid-Gruppe intakt und zugänglich für Click-Reaktionen mit sämtlichen DBCO-Liganden ist.

3.15. Herstellung von Polymeren zur Bildung von Mizellen

Als weiteres polymeres Trägersystem zum Wirkstofftransport sollen kernvernetzte und reversibel spaltbare Mizellen hergestellt werden. Im Vergleich zu den Polymersomen weisen diese kleinere hydrodynamische Durchmesser auf und eignen sich ausschließlich für den Transport von hydrophoben Substanzen.

Die Vernetzung der Mizellen im inneren Kern führt zu einer erhöhten Stabilität der Trägersysteme, da das dynamische Gleichgewicht zwischen freiem Polymer (Unimer) und Mizelle auf eine Seite fixiert wird. Das ist besonders vorteilhaft hinsichtlich eines Einsatzes *in vivo*, da der Einfluss möglicher Verdünnungseffekte minimiert wird.⁶⁷

Zur Vernetzung des Kerns der Mizelle benötigt man funktionelle Gruppen im hydrophoben Bereich des eingesetzten Polymers. Dafür eignet sich als hydrophober Bestandteil PDSM, da es ein reduktiv spaltbares Disulfid aufweist.¹⁶⁰ Dieses kann gezielt mit Thiolen reagieren und zur intermolekularen Vernetzung des Mizellkerns verwendet werden. Die Vernetzung der Disulfide basiert auf reduktiv spaltbaren Gruppen, diese können im reduktiven Milieu des Cytosols der Zelle durch Glutathion (GSH) gespalten werden.¹⁶¹ Dadurch wird die Freisetzung von Substanzen aus dem Mizellkern in die Zellen verbessert.

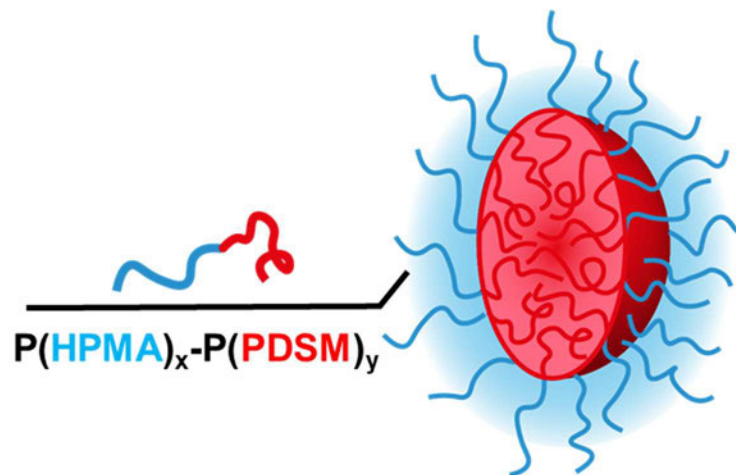


Abbildung 74: Schematischer Aufbau der $P(HPMA)_x-P(PDSM)_y$ Mizellen.

Als hydrophiler Polymerbestandteil wurde HPMA gewählt, da es bereits in Mizell-Formulierungen erfolgreich zum Wirkstofftransport eingesetzt werden konnte.¹⁵⁰ Charakteristisch für HPMA ist die Eigenschaft keine immunogene Reaktion des Körpers auszulösen.¹⁶²

In Folgenden wird die Synthese von amphiphilen Diblockpolymeren aus HPMA und PDMS vorgestellt, die zu vernetzbaren und stimuliresponsiven Mizellen aggregieren. Die synthetisierten Polymere bestehen aus einem HPMA-Block, welcher die hydrophile abschirmende Hülle der Mizellen bildet und einem über Dithiole vernetzbaren hydrophoben Kern, dem PDMS-Block.

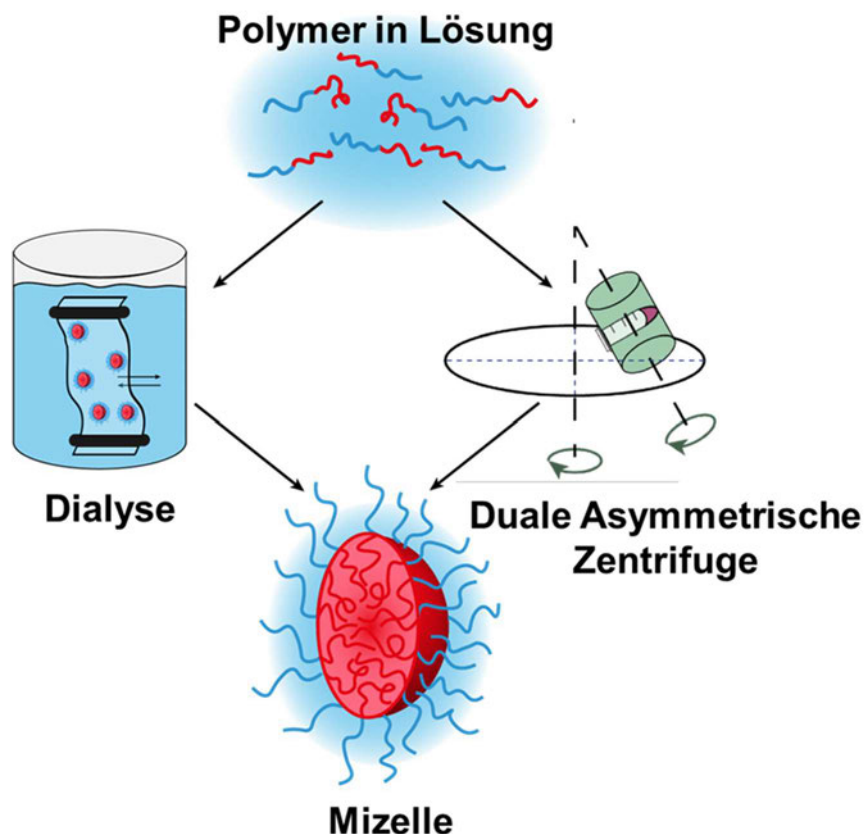


Abbildung 75: Schematische Darstellung der Mizellen mittels Dialyse und dualer Asymmetrischer Zentrifuge.

Zur Bildung von Mizellen wurden Polymere der Zusammensetzung $P(\text{HPMA})_x\text{-b-}(\text{PDMS})_y$ synthetisiert. Als Kettentransferreagenz für die RAFT-Polymerisation wurde das Azid-CTA in Kombination mit dem Tieftemperaturinitiator AMDVN eingesetzt. Die Vernetzung des Kerns erfolgt über den PDMS-Block, der nukleophil von Dithiolen angegriffen werden kann. Hierdurch findet ein Sulfidtausch unter Abspaltung von Pyridinthion statt.

Einige der nachfolgend zusammengestellten Ergebnisse basieren auf experimentellen Arbeiten, die in Kooperation mit [REDACTED] entstanden sind.

3.16. Synthese des Monomers

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

In einer zweistufigen Synthese wurde das PDSM Monomer Methacrylsäure-2-(2-pyridyldisulfid)ethylester nach Literatur¹⁶⁰ hergestellt.

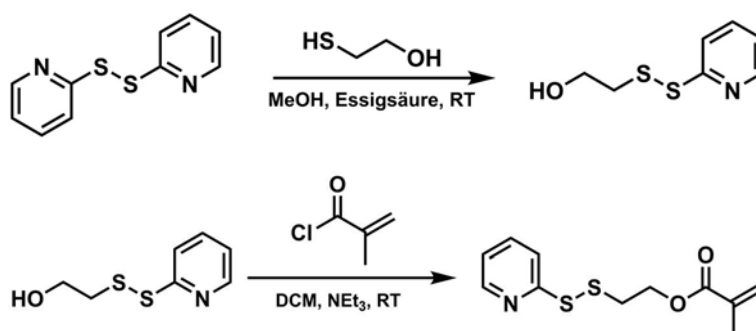


Abbildung 76: Zweistufige Synthese von PDSM.

Ausgehend von 2,2'-Dipyridyldisulfid, wird unter Zugabe von 2-Mercaptoethanol säurekatalytisch Hydroxyethyl-(2-pyridyldisulfid) (HPDS) hergestellt. Anschließend erfolgt eine Aufreinigung mittels Säulenchromatographie um ein gelbes Öl zu erhalten. Das so erhaltene HPDS wird in einem zweiten Syntheseschritt mit Methacryloylchlorid und Triethylamin zu PDSM umgesetzt. Es folgt eine Aufarbeitung mittels Säulenchromatographie zu hellgelbem viskosem PDSM. Die Charakterisierung erfolgte über ¹H-NMR Spektroskopie (Abbildung 77).

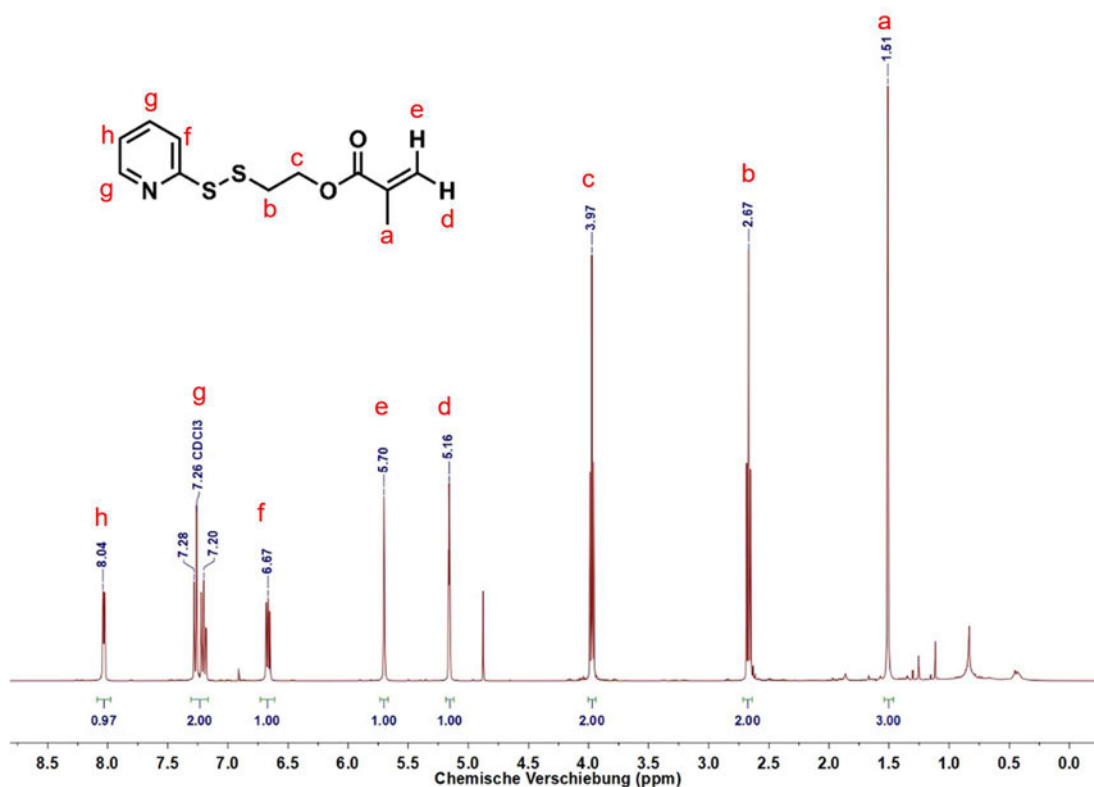


Abbildung 77: ¹H-NMR von Methacrylsäure-2-(2-pyridyldisulfid)ethylester (PDSM), (CDCl₃, 400 MHz).

Die Signale des ¹H-MMR-Spektrums von PDSM konnten folgendermaßen zugeordnet werden: Das Signal der Methylgruppe entspricht einer chemischen Verschiebung von 1,51 ppm (a) und die Methylengruppe in Nachbarschaft zum Disulfid verursacht ein Signal bei 2,67 ppm. Eine weitere Methylengruppe bei 3,97 ppm zeigt die Resonanz der zwei Protonen neben der Estergruppe. Die zwei Resonanzsignale bei einer chemischen Verschiebung von 5,16 ppm und 5,70 ppm können den charakteristischen zwei *cis*- (d) und *trans*-ständigen (e) Methacrylat Protonen zugeordnet werden. Im Tieffeldbereich des Spektrums sind die aromatischen Signale der Pyridylgruppe erkennbar: *meta*- bei 6,67 ppm (f), *ortho*- bei 7,25 ppm (g) und *para*-ständig bei 8,04 ppm (h).

3.17. Synthese der Diblockpolymere

3.17.1. Synthese Homoblock PFPMA

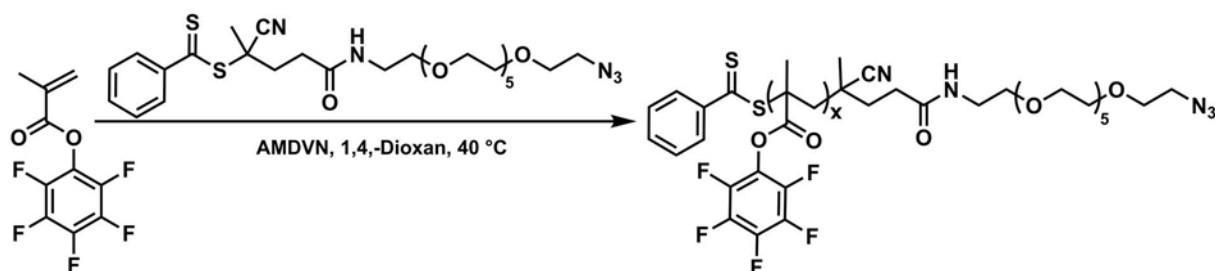


Abbildung 78: RAFT-Polymerisation von P(PFPMA).

Die Synthese und Analytik des P(PFPMA) Polymers erfolgte analog zu Kapitel 3.3.1. Die für den weiteren Verlauf der Versuche genutzten Polymere und ihre dazugehörigen Zusammensetzungen sind Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13: Zusammensetzung der Polymere P(PFPMA)_x.

Polymer	Kettenlänge	Molekulargewicht M_n^* [g/mol]	$\bar{D}$
H1.1	P(PFPMA) ₁₅₆	39800	1.47
H2.1	P(PFPMA) ₇₉	20600	1.36

**Die Zusammensetzungen wurden mittels THF-GPC abgeleitet.*

Auf Basis der erhaltenen P(PFPMA) Polymere erfolgte die RAFT-Polymerisation von Diblockcopolymeren.

3.17.2. Polymerisation von $P(\text{PFPMA})_x\text{-b-}P(\text{PDSM})_y$

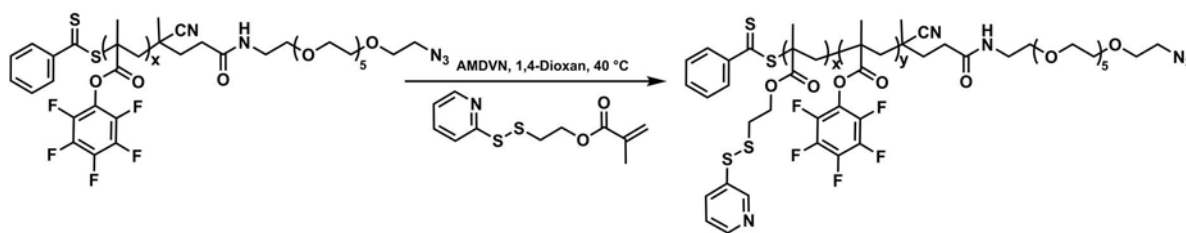


Abbildung 79: RAFT-Polymerisation von $P(\text{PFPMA})_x\text{-b-}P(\text{PDSM})_y$.

Im nächsten Schritt erfolgte die Polymerisation des Monomers PDSM auf die $P(\text{PFPMA})$ Polymere. Als Makro-CTA dienen die dafür im vorhergehenden Schritt polymerisierten $P(\text{PFPMA})$ Polymere H1.1 und H2.1. Diese wurden mit dem Monomer PDSM und dem Tieftemperatur Initiator AMDAV bei 42°C mittels RAFT-Polymerisation umgesetzt. Die Umsätze der Diblock-Polymerisationen wurden mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie der Reaktionslösungen in CDCl_3 ermittelt (Abbildung 80).

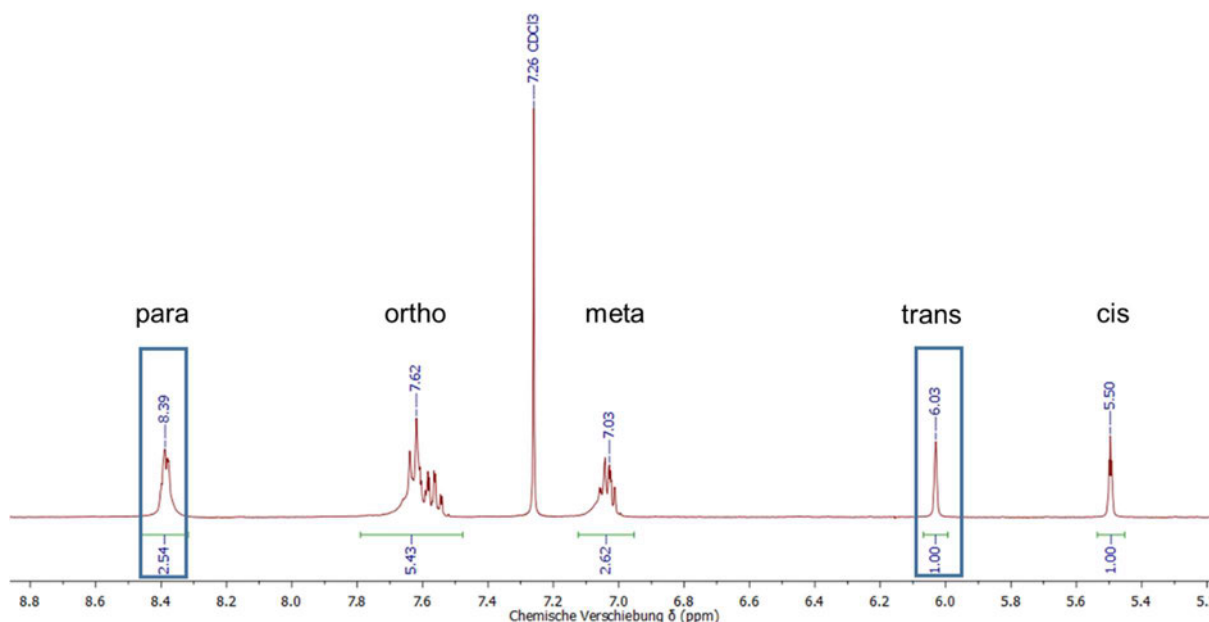


Abbildung 80: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum der Reaktionslösung zur Umsatzbestimmung des Diblocks $P(\text{PFPMA})_{79}\text{-b-}P(\text{PDSM})_y$ (P 2.1), (CDCl_3 , 400 MHz).

Im ^1H -NMR Spektrum der Reaktionslösung (Abbildung 80) entsprechen die zwei Signale bei einer chemischen Verschiebung von 5,50 ppm und 6,02 ppm den charakteristischen cis- und trans-ständigen Protonen der Methacrylatgruppe des PDSM Monomers. Das para-ständige Proton des Pyridylrests ist bei einer chemischen Verschiebung von 8,39 ppm zu finden, dieses Resonanzsignal beinhaltet sowohl das Proton des Polymers als auch das der monomeren Einheit. Da sich hier die Resonanz des para-ständigen Protons des Monomers mit dem Proton des Polymers überlagert, wurde aus dieser Signalüberlagerung der Umsatz berechnet. Die Berechnung des Umsatzes p erfolgte, indem von dem Integral des para-Signals ein Monomer Proton abgezogen wurde und dieses in ein Verhältnis mit dem ganzen Integral des para-Signals gesetzt wurde (Gleichung 6):

$$p = \frac{\int \text{Gesamt} - \int \text{Monomer}}{\int \text{Gesamt}}$$

Gleichung 6

$$p = \frac{\int 2,54 - \int 1,00}{\int 2,54} \approx 61 \%$$

Folglich ergibt sich für die RAFT-Polymerisation von $\text{P}(\text{PFPMA})_{79}\text{-b-P}(\text{PDSM})_{13}$ (P2.1) ein Umsatz von 61%.

Mit Hilfe des berechneten Reaktionsumsatzes p ist es möglich, über Gleichung 1, den Polymerisationsgrad X_n zu bestimmen:

$$X_n = p \cdot \frac{[M_0]}{[CTA_0]} \approx 37$$

Das daraus resultierende Molekulargewicht des Polymers P2.1 ergibt sich aus Gleichung 2, mit dem Molekulargewicht des Pyridyldisulfidethylmethacrylats

$M_{\text{Monomer}} = 255,36 \text{ g/mol}$ und dem Molekulargewicht des Azid-CTAs $M_{\text{CTA}} = 611,77 \text{ g/mol}$:

$$M_n = X_n \cdot M_{\text{Monomer}} + M_{\text{CTA}} \approx 33200 \text{ g/mol}$$

Die Zunahme an Molekulargewicht, und somit der Umsatz der Reaktion lässt sich anhand des $^1\text{H-NMR}$ Spektrum der Reaktionslösung nachverfolgen. Dies beträgt in diesem Fall bei ein Polymerisationsgrad von $X_n = 37$ und ein Molekulargewicht von 9400 g/mol .

Die so erhaltenen $\text{P(PFPMA)}_x\text{-}b\text{-P(PDSM)}_y$ Diblockpolymere wurden zusätzlich durch THF-GPC (Abbildung 81) charakterisiert.

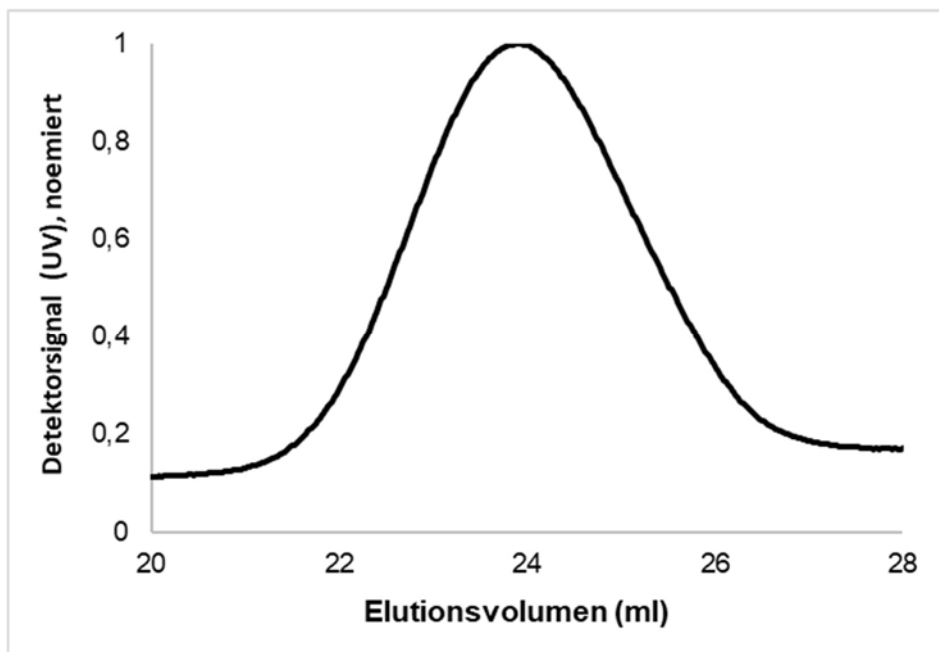


Abbildung 81: Elugramm der THF-GPC des Diblockpolymers $\text{P(PFPMA)}_{79}\text{-}b\text{-P(PDSM)}_{30}$ (P2.1).

Die Ergebnisse der THF GPC zeigen zwar einen monomoden Verlauf, die Zunahme des Molekulargewichts des Diblock-Copolymers, so wie es anhand der GPC ermittelt werden kann, beträgt jedoch lediglich 3200 g/mol . Dies stellt eine Diskrepanz zu dem anhand des Umsatzes berechneten Molekulargewichts dar. Da die GPC mit einem Polystyrolstandard kalibriert wurde, kann angenommen werden, dass sich die Abweichung auf Grund des Unterschiedes der Knäueleigenschaften des Diblockcopolymers ergibt. Die mittels THF GPC erhaltenen Molekulargewichte, die

daraus berechneten Kettenlängen sowie die Molekulargewichtsverteilungen können Tabelle 14 entnommen werden.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Polymere $P(\text{PFPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{PDSM})_y$ mittels THF-GPC.

Polymer	Kettenlänge	Molekulargewicht M_n^* [g/mol]	$\bar{D}$	X_n (GPC)
P1.1	$P(\text{PFPMA})_{156}\text{-}b\text{-}P(\text{PDSM})_5$	41200	1.44	5
P2.1	$P(\text{PFPMA})_{79}\text{-}b\text{-}P(\text{PDSM})_{13}$	23800	1.24	13

**Die Zusammensetzungen wurden mittels THF-GPC abgeleitet.*

Die über NMR-Analysen erhaltenen Kettenlängen des PDSM-Blocks sind, verglichen mit denen der durch GPC-Analysen erhaltenen, größer. Anhand des DOSY-NMR Spektrums (Abbildung 82) lässt sich erkennen, dass im Tieffeldbereich des NMR Spektrums die für PDSM charakteristischen Signale der aromatischen Protonen zwischen 8.5 und 7.0 ppm zu erkennen. Diese PDSM-Signale sind auf derselben Höhe der restlichen Polymersignale.

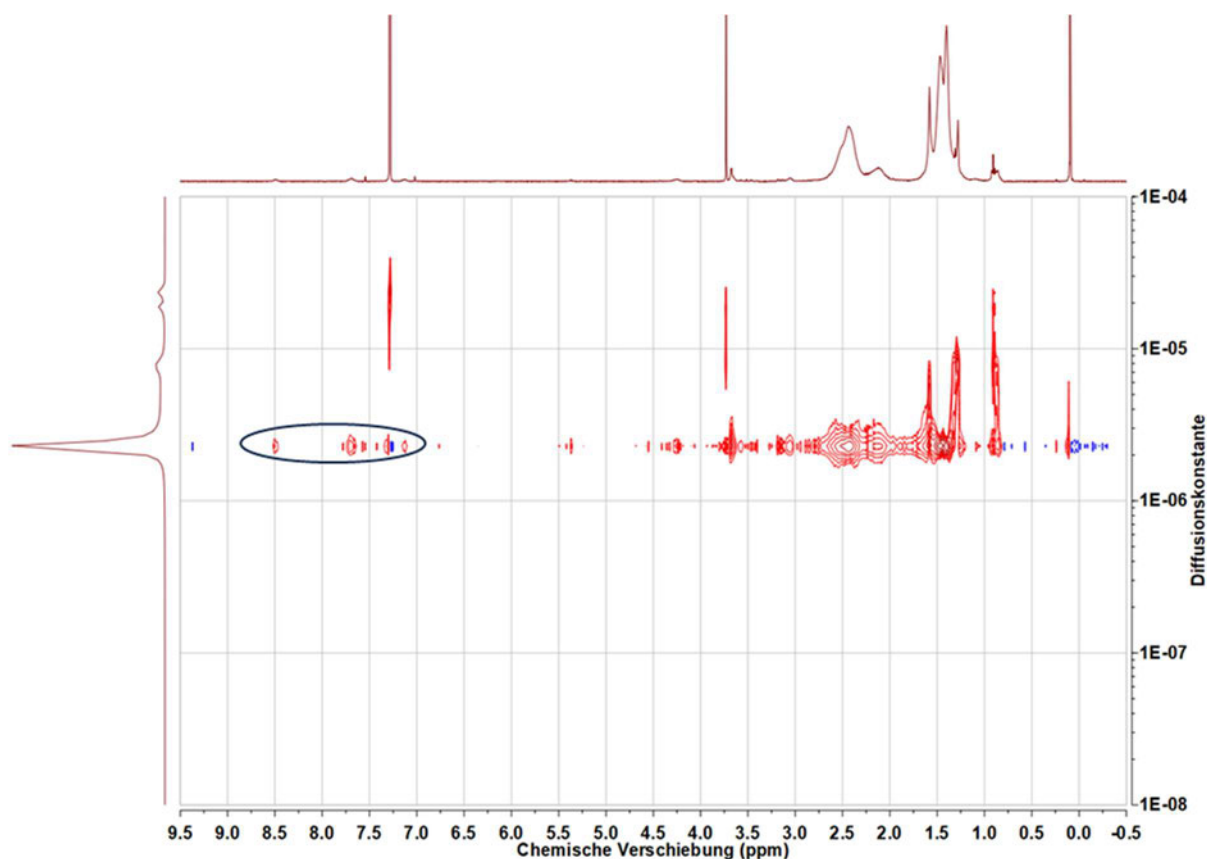


Abbildung 82: DOSY-NMR Spektrum des Diblocks $P(\text{PFPMA})_{156}\text{-}b\text{-}P(\text{PDSM})_5$ (P1.1).

Da die Signale des Polymers im Spektrum bei Diffusionsraten im hochmolekularen-Bereich zu finden sind, kann rückgeschlossen werden, dass die Polymerisation des PDSM-Blocks auf den Makro-CTA erfolgt ist.

Im niedermolekularen Bereich sind lediglich Signale der Lösungsmittel Chloroform und Dioxan zu erkennen. Das nicht umgesetzte Monomer PDSM konnte folglich erfolgreich entfernt werden.

Es konnte sowohl durch NMR-Analysen (DOSY) als auch mittels THF-GPC gezeigt werden, dass Polymere der Form $P(\text{PFPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{PDSM})_y$ mit verschiedenen Blocklängenverhältnissen und Molekulargewichten synthetisiert wurden.

3.17.3. Entfernen der Dithiobenzoatgruppe

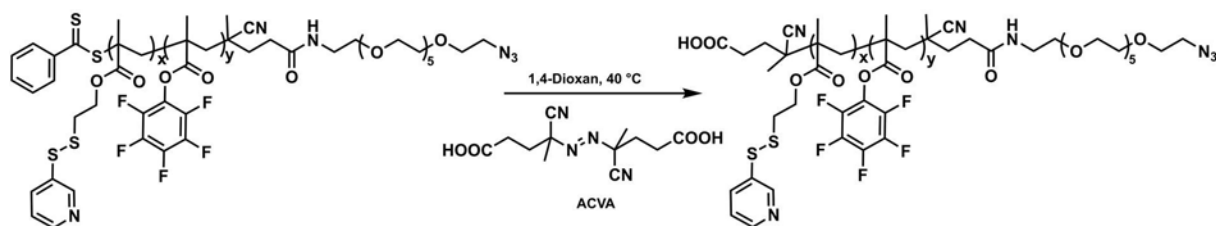


Abbildung 83: Reaktion zum Entfernen der Dithiobenzoatgruppe mit ACVA.

Für die weiteren Umsetzungen der hergestellten Diblockpolymere ist es nötig, die durch die Verwendung des Kettentransferreagenz eingeführte reaktive Dithiobenzoatgruppe am Kettenende zu entfernen. Die Gruppe wird vor der polymeranalogen Umsetzung entfernt, um mögliche Nebenreaktionen im nächsten Reaktionsschritt zu verhindern. Der Thioester am Kettenende weist eine erhöhte Reaktivität gegenüber Reduktionsmitteln, Radikalen, Nukleophilen und hohen Temperaturen auf, wodurch in den polymeranalogen Umsetzungen undefinierte Endgruppen entstehen könnten. Um dem entgegenzuwirken werden die Polymere in einer radikalischen Reaktion mit einem Überschuss an 4,4'-Azobis(4-cyanovanillicsäure) (ACVA) Initiator (35 Eq) bei 42°C in Dioxan versetzt und über Nacht unter Argon-Atmosphäre umgesetzt. Dabei wird analog zu Kapitel 3.3.5 vorgegangen. Beim Entfernen dieser Gruppe erfolgt während der Reaktion ein Farbumschlag der Polymerlösung von rosa zu farblos. Dies kann spektroskopisch nachgewiesen werden. Im UV-Vis Spektrum weisen P(PFPMA) Polymere eine charakteristische Absorptionsbande bei 306 nm auf, die Dithioesterendgruppe weist eine charakteristische Absorptionsbande bei 306 nm auf. Deshalb weist das Polymer bei einer erfolgreichen Abspaltung dieser Gruppe keine Absorptionsbande mehr bei 306 nm auf (Abbildung 84).

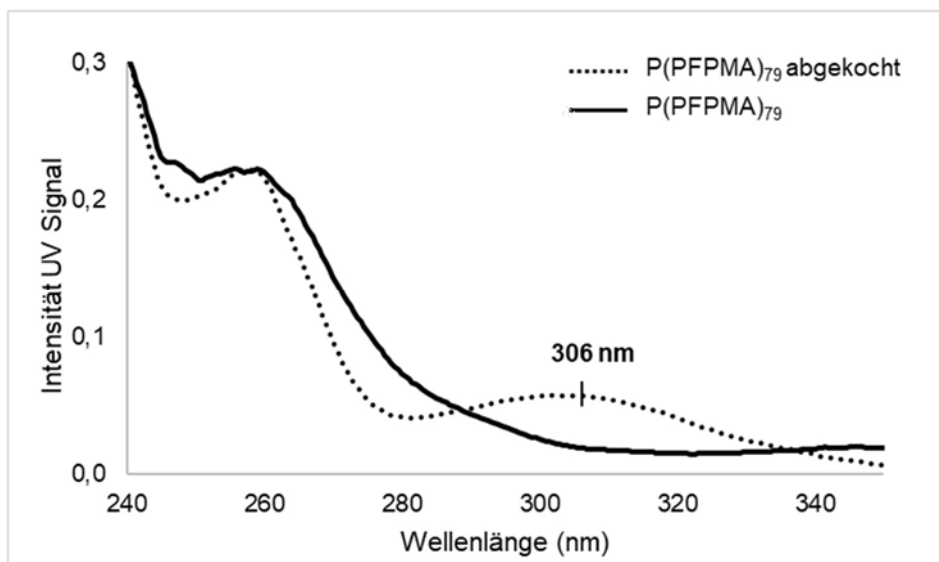


Abbildung 84: Exemplarisches UV-Vis Spektrum des Polymers P(PFPMA)₇₉ (H2.1) vor und nach entfernen der Dithiobenzoatendgruppe.

Die anschließende Charakterisierung der Polymere mittels THF-GPC zeigt nach dem Entfernen der Dithioesterendgruppe weiterhin einen monomodalen Kurvenverlauf, was auf ein Fortbestehen der Polymerintegrität hinweist (Abbildung 85). Demnach finden keine Nebenreaktionen statt, welche die Polymerstruktur beeinflussen.

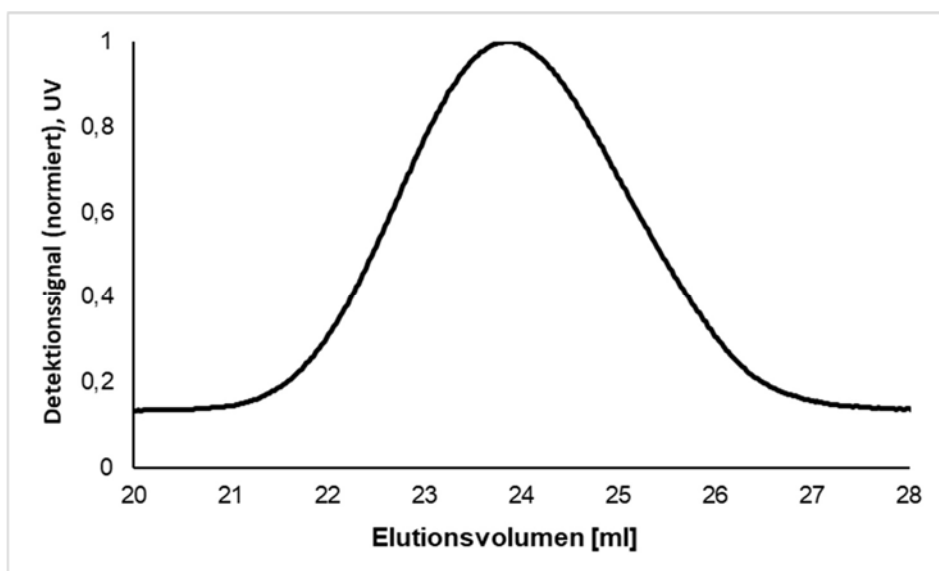


Abbildung 85: Elugramm der THF-GPC des Diblockpolymers P(PFPMA)₁₅₆-*b*-P(PDSM)₅ (P1.1).

3.17.4. Polymeranaloge Umsetzung mit 2-Hydroxypropylamin

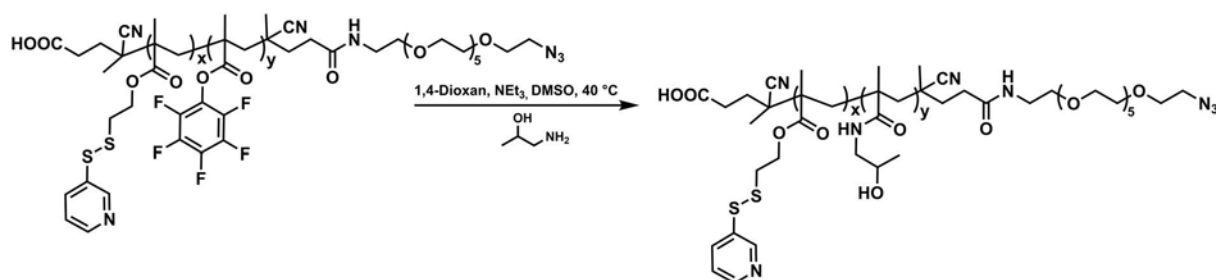


Abbildung 86: Polymeranaloge Umsetzung des PFPMA-Diblocks zum P(HPMA) Polymer mit HPA.

Da für die Bildung von Mizellen amphiphile Polymere benötigt werden, wird die Reaktivester Gruppe durch die hydrophile HPMA-Gruppe substituiert. Dafür werden die Vorläuferpolymere mit dem Reaktivesterblock basierend auf PFPMA mit 2-Hydroxypropylamin (HPA) in einer polymeranalogen Reaktion zu P(HPMA)_x-b-P(PDSM)_y Polymeren umgesetzt. Die so erhaltenen amphiphilen Blockcopolymere bestehen aus einem biokompatiblen, hydrophilen HPMA-Block und einen über Dithiole vernetzbaren hydrophoben PDSM-Block. Der Umsatz der polymeranalogen Umsetzung kann wie bereits in Kapitel 3.3.7 gezeigt, mittels ¹⁹F-NMR Spektroskopie nachverfolgt werden. Dadurch wurde das Pentafluorphenolat detektiert, das bei der PFPMA-Abspaltung freigesetzt wird. Die Charakterisierung der Poly(HPMA) Blockcopolymere erfolgte anhand von ¹H-NMR Spektroskopie (Abbildung 88) und GPC-Analyse in Hexafluorisopropanol (HFIP).

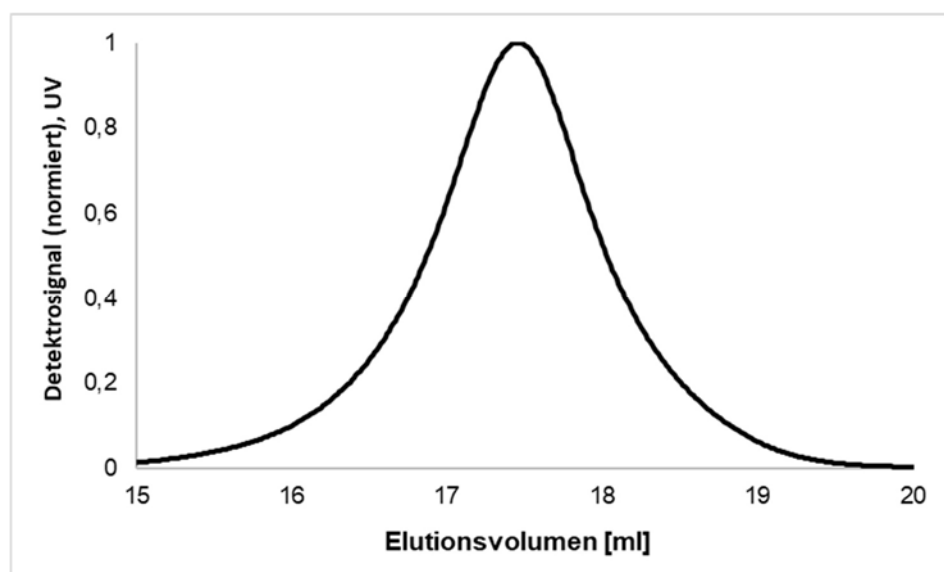


Abbildung 87: HFIP-GPC von P(HPMA)₇₉-b-P(PDSM)₁₃ (HP5).

Die GPC-Analysen wurden in HFIP durchgeführt, da das HPMA basierte Polymer nicht in THF löslich ist. Zusätzlich verhindert HFIP die Ausbildung von inter- und intramolekularen Wechselwirkungen (z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen).

Die Zusammensetzungen der $P(\text{HPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_y$ Polymere und die dazugehörigen Molekulargewichte können Tabelle 15 entnommen werden.

Tabelle 15: Überblick über die erhaltenen $P(\text{HPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_y$ Polymere.

Polymer	Molekulargewicht M_n [g/mol]	$\bar{D}$	Zusammensetzungen*
HP1	23630	1.38	$P(\text{HPMA})_{52}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_3$
HP2	28940	1.82	$P(\text{HPMA})_{52}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_8$
HP3	25700	1.51	$P(\text{HPMA})_{62}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_5$
HP4	**	**	$P(\text{HPMA})_{62}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_8$
HP5	23800	1.24	$P(\text{HPMA})_{79}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_{13}$
HP6	45340	1.68	$P(\text{HPMA})_{79}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_7$
HP7	53200	1.65	$P(\text{HPMA})_{156}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_5$

* Die Zusammensetzungen wurden den Berechnungen der $P(\text{PFPMa})$ basierten Diblockpolymeren $P(\text{PFPMa})_x\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_y$ entnommen.

** Hochmolekulare Aggregate in der HFIP GPC. Messung nicht aussagekräftig.

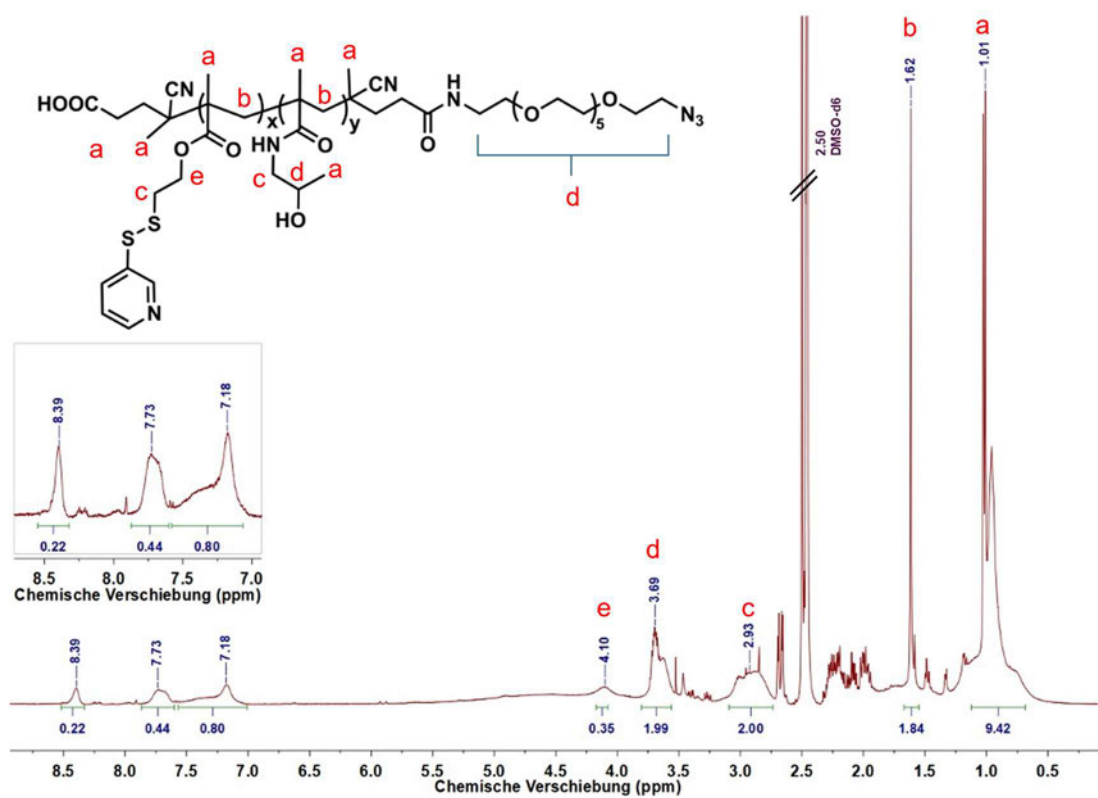


Abbildung 88: ^1H -NMR Spektrum von P(HPMA)₇₉-b-P(PDSM)₁₃ (HP5) in DMSO- d_6 (CDCl_3 , 400 MHz).

3.17.5. Polymeranaloge Umsetzung mit Farbstoff

Die polymeranaloge Umsetzung kann auch dafür verwendet werden, um über den Reaktivester Fluoreszenzfarbstoffe in die Polymerkette einzuführen. Dafür wurden im ersten Schritt 0,5 Äquivalente Alexa Fluor 647 in die Polymerkette eingeführt und anschließend wurde wie bereits in Kapitel 3.17.4 die Umsetzung mit 2-Hydroxypropylamin durchgeführt.

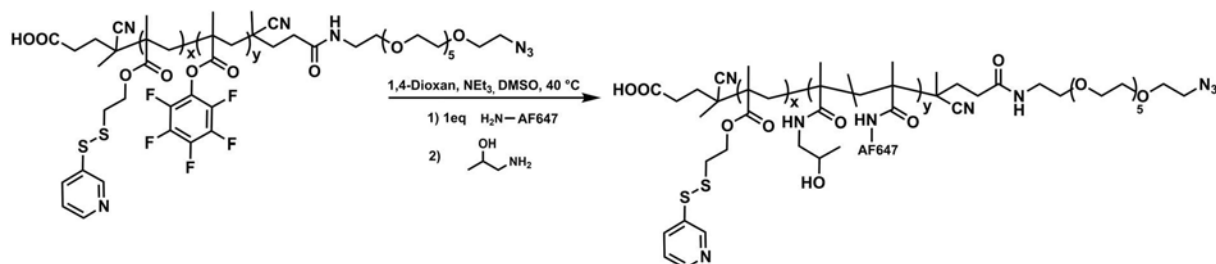


Abbildung 89: Polymeranaloge Umsetzung mit HPA und Alexa Fluor 647.

Die so erhaltenen amphiphilen Blockcopolymere bestehen aus einem biokompatiblen hydrophilen HPMA-Block mit einem inkorporierten Anteil an fluoreszierendem Alexa-647-Farbstoff zur Markierung und einen über Dithiole vernetzbaren PDSM-Block.

Der Umsatz der polymeranalogen Umsetzung kann wie in Kapitel 3.3.7 gezeigt, mittels ^{19}F -NMR Spektroskopie verfolgt werden.

Die Charakterisierung der Poly(HPMA) Blockcopolymere erfolgte anhand von ^1H -NMR Spektroskopie und GPC-Analyse in Hexafluorisopropanol (HFIP).

Die Zusammensetzungen der erhaltenen $\text{P(HPMA)}_x\text{-b-P(PDSM)}_y$ Polymere und die dazugehörigen Molekulargewichte können Tabelle 16 entnommen werden.

Tabelle 16: Überblick über die fluoreszenzmarkierten erhaltenen $\text{P(HPMA)}_x\text{-b-P(PDSM)}_y$ Polymere.

Polymer	Molekulargewicht M_n [g/mol]	$\bar{D}$	Zusammensetzungen*
HP5_AF647	28870	2.4	$\text{P(HPMA)}_{79}\text{-b-P(PDSM)}_{13}$
HP7_AF647	37560	2.5	$\text{P(HPMA)}_{156}\text{-b-P(PDSM)}_5$

* Die Zusammensetzungen wurden den Berechnungen der P(PFPMA) basierten Diblockpolymeren $\text{P(PFPMA)}_x\text{-b-P(PDSM)}_y$ entnommen.

3.18. Aggregation zu Mizellen

Aus den hergestellten Diblock Polymeren $P(\text{HPMA})_x\text{-b-}P(\text{PDMS})_y$ werden Aggregate gebildet und diese anschließend über Dithiole vernetzt.

Die Aggregation der Partikel erfolgt anhand zweier unterschiedlicher Methoden. Dem *solvent switch* Verfahren (Lösungsmittelaustausch), bei dem über Dialyse der Polymere in DMSO gegen Wasser Aggregate gebildet werden sowie über die duale Asymmetrische Zentrifuge, die durch Einwirkung von Scherkräften die Bildung von Aggregaten in Wasser ermöglicht (siehe Kapitel 3.4).

Nach der Assemblierung der Mizellen erfolgt die Vernetzung mit Hexandithiol im Kern zur Erhöhung der Stabilität (siehe Kapitel 3.19).

3.18.1 Assemblierung der $P(\text{HPMA})_x\text{-b-}P(\text{PDMS})_y$ Polymere über *solvent switch*

Die hergestellten Diblockpolymere sind nicht wasserlöslich, dafür aber gut in DMF und DMSO löslich. Zu einer Lösung des Polymers in DMSO wurde langsam Wasser hinzugegeben, dadurch kommt es zur Bildung mizellarer Strukturen.

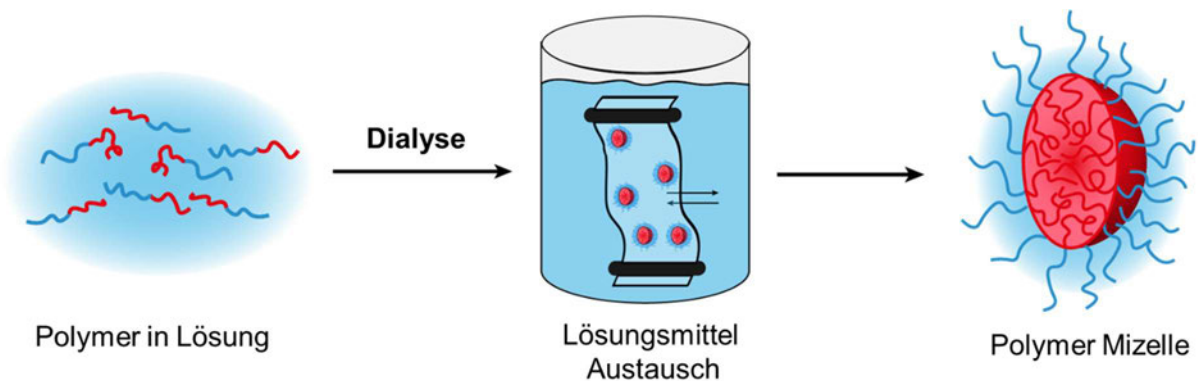


Abbildung 90: Bildung der Aggregate durch *solvent switch* (Lösungsmittelaustausch).

Zu den DMSO/Polymer Lösungen wurde schrittweise Wasser dazugegeben und die erhaltenen Lösungen über dynamische Lichtstreuung gemessen, um herauszufinden, bei welchem Verhältnis von DMSO zu Wasser es zur Ausbildung von Aggregaten kommt. Es wurde die Zählrate, welche mit der gebildeten Partikelzahl einhergeht, in

Abhängigkeit der Wasserzugabe gemessen. Die gemessene Zählrate steigt, sobald es zur Bildung von Aggregaten kommt (Abbildung 91).

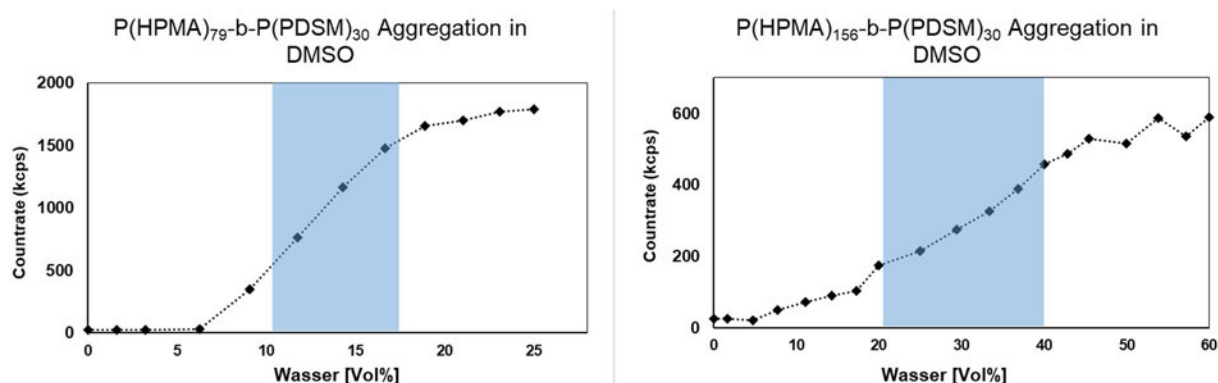


Abbildung 91: Titrationskurve von Wasserzugabe in DMSO, Zählrate (Partikelzahl) über Zetasizer gemessen.

Bei weiterer Zugabe von Wasser kann es dazu kommen, dass das wasserunlösliche Polymer ausfällt. Der Bereich in dem die Aggregatsbildung stattfindet wurde farblich markiert.

Die so ermittelten Verhältnisse zur Aggregation der Wasser/DMSO Polymerlösungen wurden eingesetzt um über Dialyse gegen Wasser Partikel zu erhalten.

Tabelle 17: Hydrodynamische Durchmesser der mittels Dialyse hergestellten Partikel.

Polymere	Zusammensetzungen**	Hydrodynamischer Durchmesser [nm]	Polydispersitätsindex (PDI)
HP1	P(HPMA) ₅₂ -b-P(PDSM) ₃	183,0	0,295
HP3	P(HPMA) ₆₂ -b-P(PDSM) ₅	499,1	0,344
HP4	P(HPMA) ₆₂ -b-P(PDSM) ₈	58,97*	0,242*
HP5	P(HPMA) ₇₉ -b-P(PDSM) ₁₃	99,94	0,304
HP6	P(HPMA) ₇₉ -b-P(PDSM) ₇	45,1*	0,246*
HP7	P(HPMA) ₁₅₆ -b-P(PDSM) ₅	47,49	0,586

*Messung nach Filtration durch einen GHP-Filter (Porengröße 200 nm).

** Die Zusammensetzungen wurden den Berechnungen der P(PFPMA) basierten Diblockpolymeren P(PFPMA)_x-b-P(PDSM)_y entnommen.

Die Größe der mittels Dialyse hergestellten Mizellen wurde mittels dynamischer Lichtstreuung ermittelt. Die verwendeten Polymer Zusammensetzungen sowie die dazugehörigen hydrodynamischen Durchmesser aus der Dynamischen Lichtstreuung können Tabelle 17 entnommen werden. Es war möglich für sechs der sieben hergestellten Polymere Aggregate zu bilden.

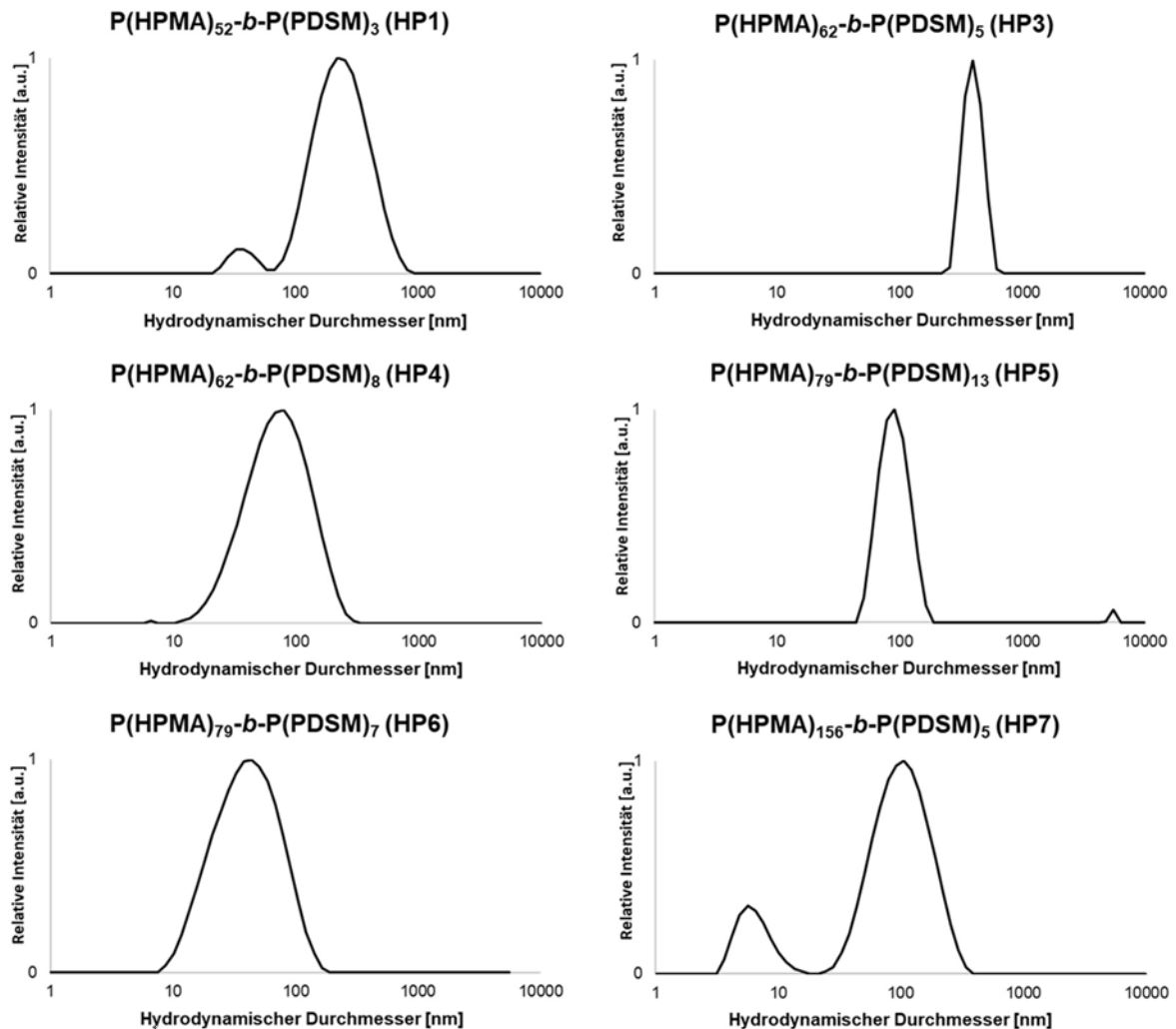


Abbildung 92: DLS-Messungen der mittels Dialyse gegen Millipore Wasser gebildeten Mizellen der Polymere : P(HPMA)₅₂-*b*-P(PDSM)₃ (HP1), P(HPMA)₆₂-*b*-P(PDSM)₅ (HP3), P(HPMA)₇₉-*b*-P(PDSM)₁₃ (HP5), P(HPMA)₁₅₆-*b*-P(PDSM)₅ (HP7); Messung nach Filtration durch einen 200 nm WWPTFE Filter : P(HPMA)₆₂-*b*-P(PDSM)₈ (HP4), P(HPMA)₇₉-*b*-P(PDSM)₇ (HP6).

3.18.2. Assemblierung der Mizellen mittels dualer asymmetrischer Zentrifuge

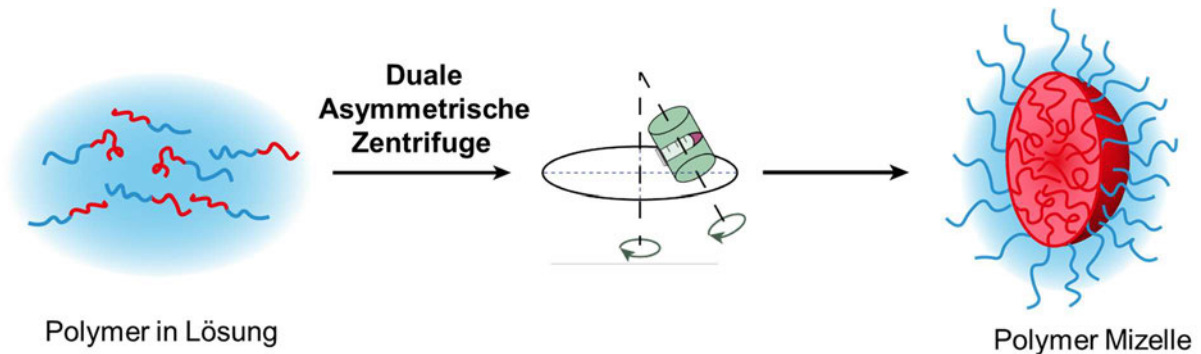


Abbildung 93: Schema Mizellenbildung mit dualer asymmetrischer Zentrifuge.

Die Partikel wurden nach der Aggregation in der dualen asymmetrischen Zentrifuge mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) im Zetasizer auf ihre Größe hin untersucht, die gemessenen hydrodynamischen Durchmesser sowie die dazugehörigen Polydispersitäten sind in Tabelle 18 aufgelistet.

Tabelle 18: Hydrodynamische Durchmesser der mittels dualer Asymmetrischer Zentrifuge hergestellten Partikeln.

Polymere	Zusammensetzungen**	Hydrodynamischer Durchmesser [nm]	Polydispersitätsindex (PDI)
HP1	P(HPMA) ₅₂ - <i>b</i> -P(PDSM) ₃	193,9	0,263
HP2	P(HPMA) ₅₂ - <i>b</i> -P(PDSM) ₈	74,11*	0,543*
HP3	P(HPMA) ₆₂ - <i>b</i> -P(PDSM) ₅	262,2	0,266
HP4	P(HPMA) ₆₂ - <i>b</i> -P(PDSM) ₈	100,8*	0,137*
HP5	P(HPMA) ₇₉ - <i>b</i> -P(PDSM) ₁₃	54,85*	0,290*
HP6	P(HPMA) ₇₉ - <i>b</i> -P(PDSM) ₇	59,53*	0,247*
HP7	P(HPMA) ₁₅₆ - <i>b</i> -P(PDSM) ₅	184,8	0,352

* Messung nach Filtration durch einen GHP-Filter (Porengröße 200 nm).

** Die Zusammensetzungen wurden den Berechnungen der P(PFPMA) basierten Diblockpolymeren P(PFPMA)_x-*b*-P(PDSM)_y entnommen.

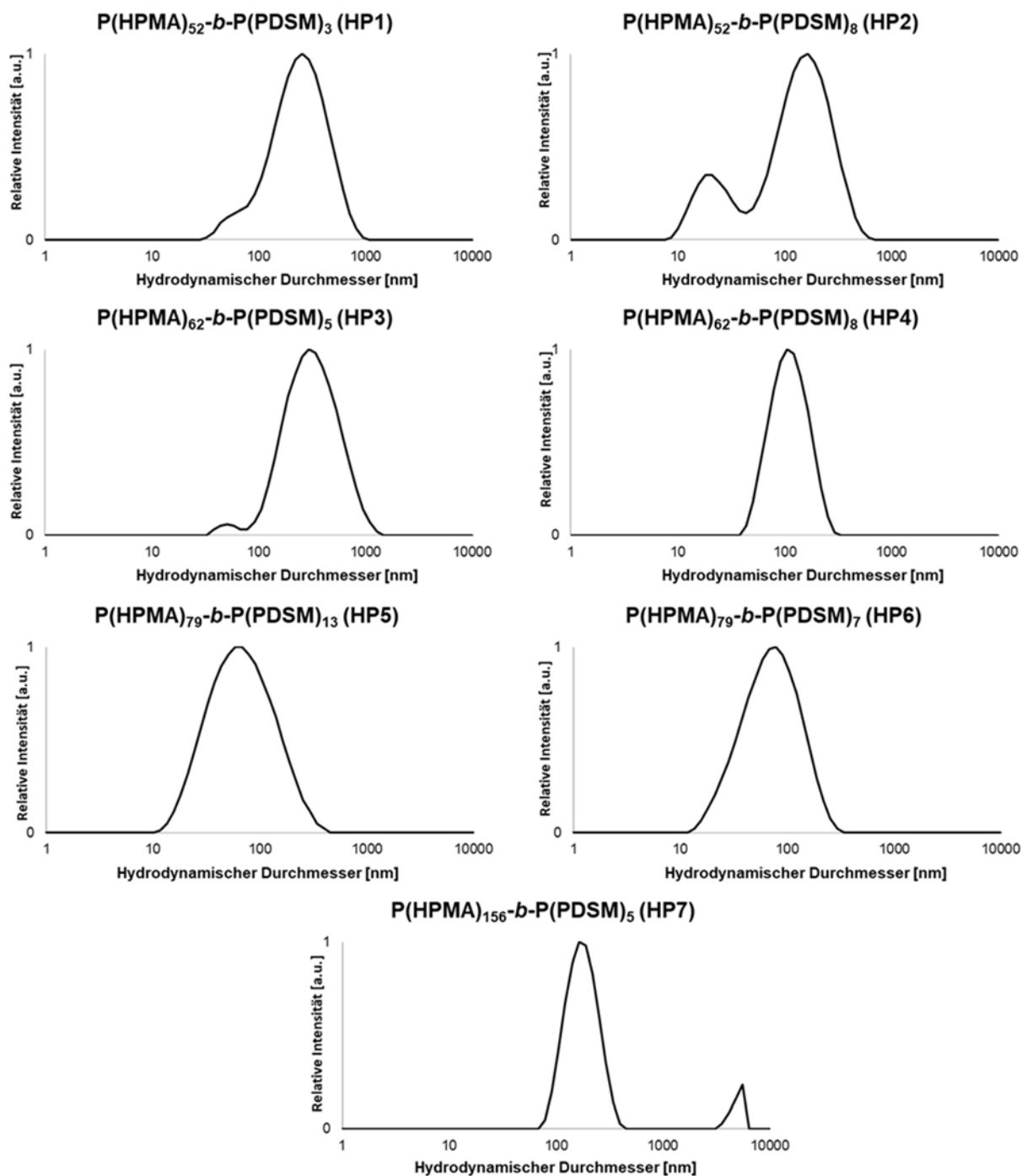


Abbildung 94: DLS-Messungen der mittels dualer Zentrifuge gebildeten Mizellen der Polymere: P(HPMA)₅₂-*b*-P(PDSM)₃ (HP1), P(HPMA)₆₂-*b*-P(PDSM)₅ (HP3), P(HPMA)₇₉-*b*-P(PDSM)₁₃ (HP5), P(HPMA)₁₅₆-*b*-P(PDSM)₅ (HP7); Messung nach Filtration durch einen 200 nm WWPTFE Filter : P(HPMA)₅₂-*b*-P(PDSM)₈ (HP2), P(HPMA)₆₂-*b*-P(PDSM)₈ (HP4), P(HPMA)₇₉-*b*-P(PDSM)₇ (HP6).

Durch die Verwendung der dualen asymmetrischen Zentrifuge war es möglich aus allen sieben Polymerzusammensetzungen (HP1-HP7) Aggregate zu erhalten. Das ist insbesondere im Fall des Polymers HP2 hervorzuheben, da diese Polymerzusammensetzung über das *solvent switch* Verfahren nicht aggregiert werden konnte. Im Fall der Partikelbildung durch die duale asymmetrische Zentrifuge wirken innerhalb von einer kurzen Zeit sehr starke Scherkräfte auf ein kleines Volumen an Polymerlösung. Dagegen findet die Aggregation beim *solvent switch* Verfahren auf Basis des Gleichgewichts zwischen den Lösungen, welches sich über eine wesentlich längere Zeit langsam bildet und einstellt. Dadurch weisen die mittels dualer asymmetrischer Zentrifuge hergestellter Aggregate im Vergleich zu den mittels *solvent switch* gebildeten Aggregaten eine engere Größenverteilung auf. Gleichzeitig zeigen diese Aggregate, das Polymer HP1 ausgeschlossen, ebenfalls kleinere hydrodynamische Durchmesser auf. Das kann auf die größere Krafteinwirkung in kürzerer Zeit und die schnellere Partikelbildung während der dualen asymmetrischen Zentrifugation zurückzuführen sein.

3.19. Vernetzung der Mizellen über Disulfidgruppen

Zur Stabilisierung der hergestellten Aggregate können die PDSM-Einheiten der Polymere, die auf der Oberfläche der Partikel sind, über die Disulfidgruppen mit Hexandithiol vernetzt werden.

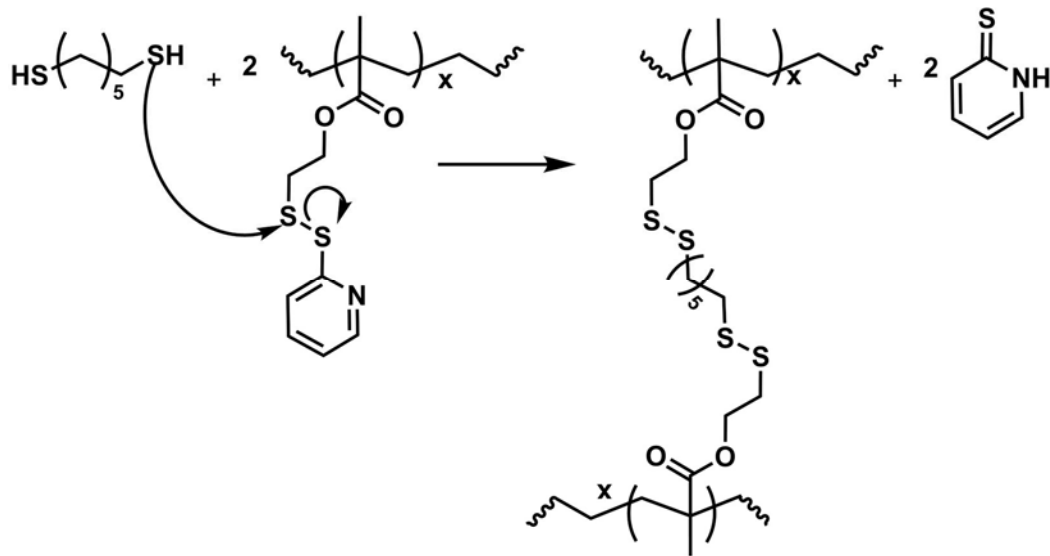


Abbildung 95: Vernetzung der Blockcopolymere mit Hexandithiol.

Durch die reduktive Spaltung der PDSM-Einheiten wird der Baustein Pyridinthiol abgespalten und so die Polymere miteinander vernetzt (Abbildung 95). Durch UV-Vis Spektroskopie kann die Stabilität der PDSM-Einheiten der Polymere nachgewiesen werden, da diese eine charakteristische Absorptionsbande bei 283 nm aufweisen. Zusätzlich kann die Vernetzung im UV-Vis Spektrum beobachtet werden, da das abgespaltene Pyridinthion eine charakteristische Absorptionsbande bei 342 nm aufweist (Abbildung 96).

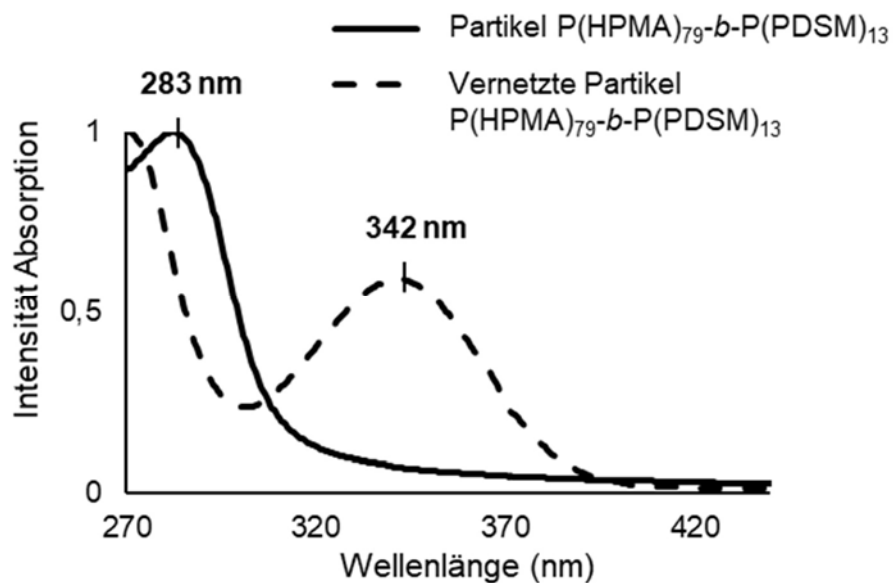


Abbildung 96: UV-Vis Spektrum des Partikels P(HPMA)₇₉-b-P(PDSM)₁₃ (HP5) vor Vernetzung in DMSO und des Vernetzten Partikels P(HPMA)₇₉-b-P(PDSM)₁₃ (HP5) nach Vernetzung mit Hexandithiol in Wasser.

Die mittels dualer asymmetrischer Zentrifuge gebildeten Partikel aus den Polymeren HP1 bis HP7 weisen vor der Vernetzung die charakteristische Absorptionsbande von P(PDSM) in DMSO bei 283 nm auf. Nach Zugabe von Hexandithiol ist im UV-Vis Spektrum die charakteristische Absorptionsbande vom Abspaltungsprodukt Pyridinthiol bei 340 nm zu erkennen.

Zur Vernetzung wurden die Aggregate mit einer Hexandithiol-Lösung versetzt und im Anschluss wurden das abgespaltene Pyridinthiol sowie das überschüssige Hexandithiol über Dialyse gegen Wasser entfernt. Durch die Dialyse und der damit einhergehenden Verdünnung mit Wasser können unvernetzte Mizellen, aufgrund ihres dynamischen Gleichgewichts, destabilisiert werden. Vernetzte Mizellen hingegen haben den Vorteil stabiler zu sein, da sie durch die Vernetzung der PDSM-Einheiten im Kern stabilisiert sind

Die hydrodynamischen Durchmesser sowie die dazugehörigen Größenverteilungen der aufgereinigten Aggregate sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: Hydrodynamische Durchmesser der mit Hexandithiol kernvernetzten Mizellen der Polymere HP1 bis HP7, aufgereinigt mittels Dialyse gegen Wasser.

Polymere	Zusammensetzungen*	Nicht Vernetzt		Nach Vernetzung	
		Hydrodynamischer Durchmesser [nm]	PDI	Hydrodynamischer Durchmesser [nm]	PDI
HP1	P(HPMA) ₅₂ - <i>b</i> -P(PDSM) ₃	193,9	0,263	202,4**	0,275
HP2	P(HPMA) ₅₂ - <i>b</i> -P(PDSM) ₈	74,11**	0,543	93,38	0,432
HP3	P(HPMA) ₆₂ - <i>b</i> -P(PDSM) ₅	262,2	0,266	-	-
HP4	P(HPMA) ₆₂ - <i>b</i> -P(PDSM) ₈	100,8**	0,137	117,3	0,166
HP5	P(HPMA) ₇₉ - <i>b</i> -P(PDSM) ₁₃	54,85**	0,290	55,60**	0,312
HP6	P(HPMA) ₇₉ - <i>b</i> -P(PDSM) ₇	59,53**	0,247	69,85	0,398
HP7	P(HPMA) ₁₅ - <i>b</i> -P(PDSM) ₅	184,8	0,352	208,7	0,273

* Die Zusammensetzungen wurden den Berechnungen der P(PFPMA) basierten Diblockpolymeren $P(PFPMA)_x-b-P(PDSM)_y$ entnommen.

**Messung nach Filtration durch einen GHP-Filter (Porengröße 200 nm).

Es war möglich sechs stabile und vernetzte Aggregate aus den sechs Ausgangspolymeren zu erhalten. Lediglich im Fall des Aggregats auf Basis des Polymers HP3 konnte nach der Vernetzung und Aufreinigung keine definierten Partikel mittels Zetasizer Messung nachgewiesen werden.

Die hydrodynamischen Durchmesser der vernetzten Partikel reichen von 70 nm bis 209 nm. Alle Aggregate weisen nach der Vernetzung und Aufreinigung eine leichte Zunahme an Größe auf. Die Mizellen der Polymere HP1, HP4, HP5 und HP6 zeigen zusätzlich noch eine breitere Größenverteilung auf. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass es durch die Vernetzung und Dialyse zu einer Quellung der Partikel in Wasser kam. Gleichzeitig verging einige Zeit seit der Bildung der Mizellen. Dies führt ebenfalls dazu, dass es zu einer breiteren Größenverteilung kommt.

3.20. Stabilität der vernetzten Mizellen gegenüber Gefriertrocknung

Bei der Gefriertrocknung von Mizellen werden diese mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend unter Vakuum behandelt, wodurch ihnen das Wasser entzogen wird. Nicht stabilisierte Partikel können durch diesen Prozess beschädigt werden und zerfallen. Um zu zeigen, dass die hier vernetzten Mizellen eine erhöhte Stabilität aufweisen, wurden die Partikel aus den Polymeren HP1, HP2, HP3, HP4 und HP6 gefriergetrocknet und anschließend erneut in Wasser aufgenommen. Anschließend wurden die erhaltenen Lösungen mittels DLS gemessen.

Tabelle 20: Hydrodynamische Durchmesser der vernetzten Mizellen der Polymere HP2, HP4 und HP6 nach Gefriertrocknung und anschließendem rehydrieren.

Polymere	Zusammensetzungen	Hydrodynamischer Durchmesser [nm]	PDI
HP2	P(HPMA) ₅₂ - <i>b</i> -P(PDSM) ₈	104,3	0,647
HP4	P(HPMA) ₆₂ - <i>b</i> -P(PDSM) ₈	139,5	0,251
HP6	P(HPMA) ₇₉ - <i>b</i> -P(PDSM) ₇	62,69	0,391

Dabei zeigten sich die Aggregate der Polymerzusammensetzungen HP2, HP4 und HP6 auch gegenüber dem Entzug von Flüssigkeit stabil und konnten in Wasser resuspendiert werden (Tabelle 20/Abbildung 97).

Im Fall der Aggregate auf Basis von HP2 zeigten diese nach der Rehydrierung ein breitere Größenverteilung. Dagegen zeigten sich die Aggregate HP1 und HP3 nicht gegenüber Gefriertrocknung stabil. Dies könnte auf eine unzureichende Vernetzung der PDSM-Einheiten zurückzuführen sein. Denn in den Polymeren HP1 und HP3 wurden weniger PDSM-Einheiten nachgewiesen im Vergleich zu den anderen Polymeren. Um eine erhöhte Stabilität zu erhalten ist ein gewisser Anteil an vernetzten PDSM-Einheiten erforderlich. Das Gefriertrocknen und anschließende rehydrieren von Aggregaten kann dafür genutzt werden, Partikel besser zu lagern und führt zu einer verbesserten Handhabung dieser.

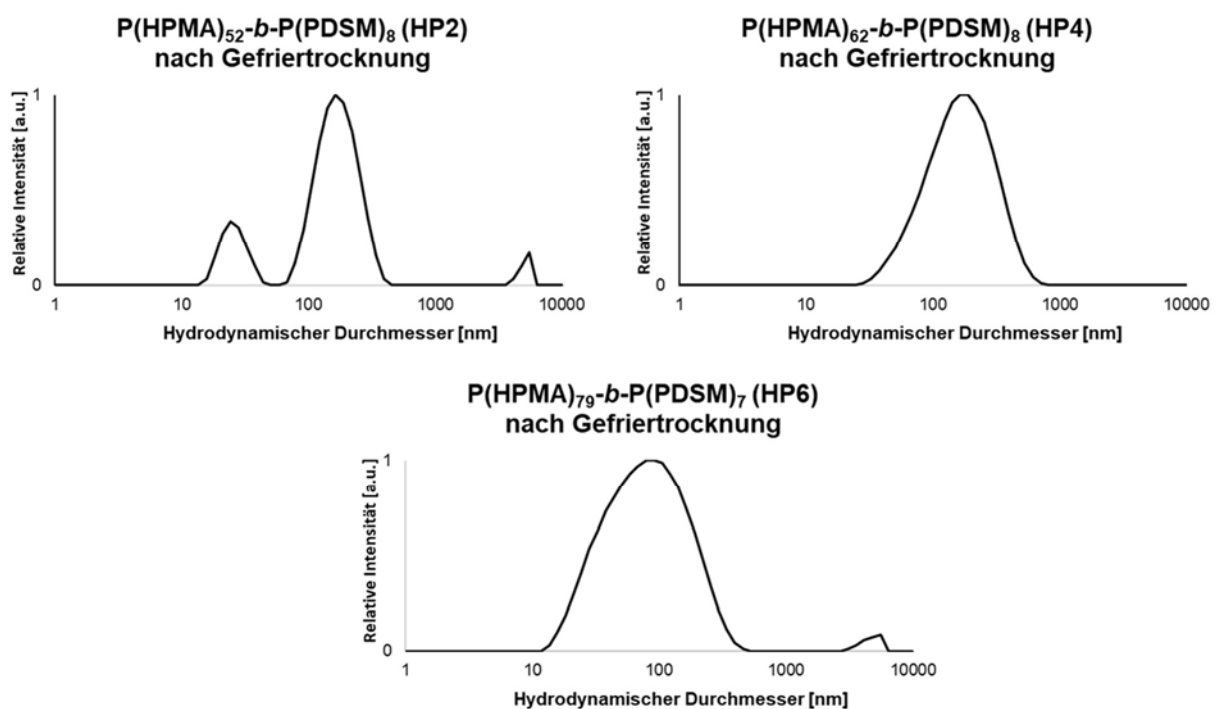


Abbildung 97: DLS-Messeungen der mit Hexandithiol vernetzen Aggregate HP2 P(HPMA)₅₂-b-P(PDSM)₈, HP4 P(HPMA)₆₂-b-P(PDSM)₈ und HP6 P(HPMA)₇₉-b-P(PDSM)₇ nach Gefriertrocknung und Zugabe von Wasser.

3.21. Lagerungsstabilität der vernetzten Mizellen

Die Lagerfähigkeit der gebildeten Aggregate in Lösung über Zeit wurde mittels DLS-Messungen untersucht. Die Vergleichsparameter waren mögliche Veränderungen im hydrodynamischen Durchmesser und die Größenverteilung. Dafür wurden die vernetzten Mizellen über einen Zeitraum von 11 Wochen in Wasser bei 3°C gelagert.

Tabelle 21: Hydrodynamische Durchmesser und Polydispersitäten der DLS-Messungen der vernetzten Mizellen der Polymerzusammensetzungen P(HPMA)₇₉-*b*-P(PDSM)₁₃ (HP5) und (HP7) in Wasser nach Herstellung und nach einer Lagerzeit von 11 Wochen bei 3°C in Wasser.

Polymere	Zusammensetzungen	Nach Vernetzung		Nach 11 Wochen	
		Hydrodynamischer Durchmesser [nm]	PDI	Hydrodynamischer Durchmesser [nm]	PDI
HP5	P(HPMA) ₇₉ - <i>b</i> -P(PDSM) ₁₃	70,86*	0,281	67,57*	0,264
HP7	P(HPMA) ₁₅₆ - <i>b</i> -P(PDSM) ₅	101,1*	0,099	95,20*	0,131

*Messung nach Filtration durch einen GHP-Filter (Porengröße 200 nm).

Es konnte gezeigt werden, dass die Aggregate über eine Zeit von 11 Wochen gelagert werden können und stabil sind. Die Aggregate zeigten Veränderungen hinsichtlich einer Verkleinerung des hydrodynamischen Durchmessers um 5-6 Prozent sowie leicht engere Polydispersitäten der gemessenen Größenverteilungen.

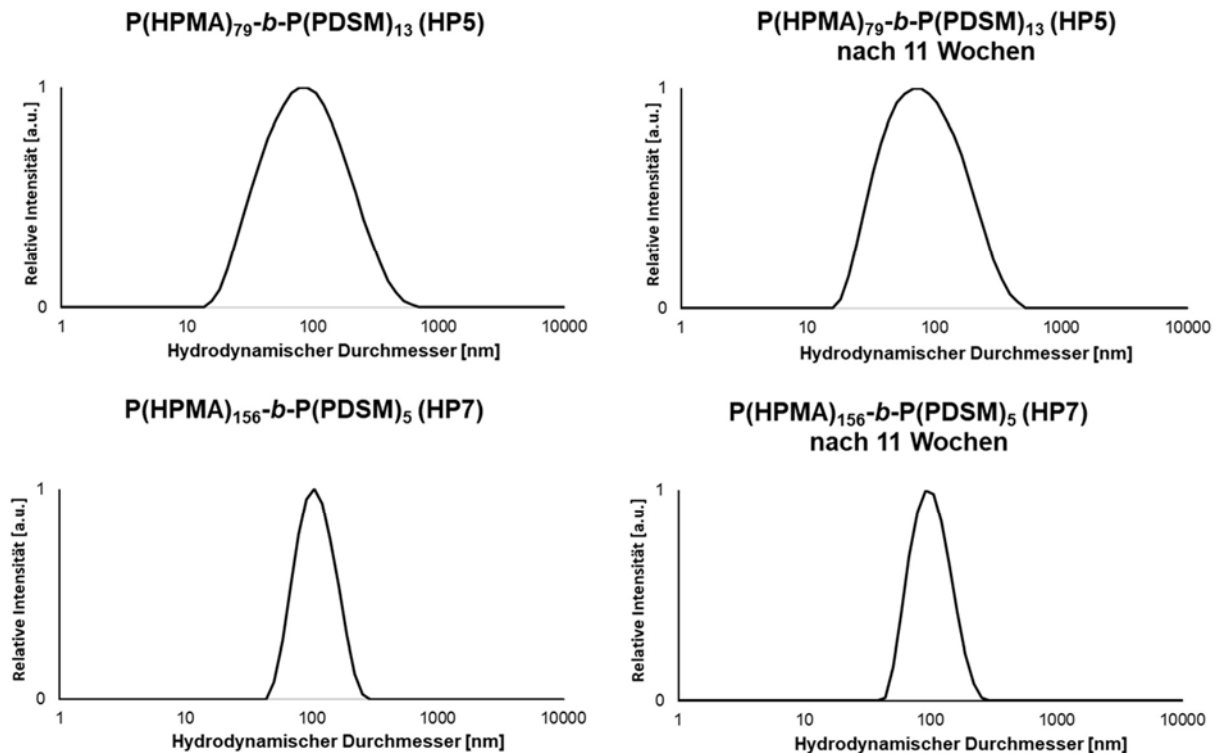


Abbildung 98: DLS-Messungen der vernetzten Mizellen der Polymerzusammensetzungen $P(\text{HPMA})_{79}\text{-}b\text{-}P(\text{PDSM})_{13}$ (HP5) und (HP7) in Wasser nach Herstellung und nach einer Lagerzeit von 11 Wochen bei 3°C in Wasser.

Die Differenzen der Messergebnisse liegen innerhalb der Messunsicherheit der verwendeten Methode. Folglich weisen die vernetzten Aggregate eine hohe Lagerstabilität in Lösung aus, was besonders von Vorteil bei einer späteren Handhabung, Herstellung und Verteilung solcher Systeme von Bedeutung ist.

3.22. Einschluss des hydrophoben Farbstoffs Nile Red

Um die hergestellten Aggregate hinsichtlich ihrer Eignung als Transportsystem für Wirkstoffe zu untersuchen, wurden diese in einem nächsten Schritt mit dem hydrophoben Farbstoff Nile Red beladen. Die Polymerzusammensetzungen $P(\text{HPMA})_{62}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_8$ (HP4), $P(\text{HPMA})_{79}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_{13}$ (HP5) und $P(\text{HPMA})_{79}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_7$ (HP6) wurden zusammen mit dem Farbstoff Nile Red in die duale asymmetrische Zentrifuge gegeben und so Aggregate gebildet. Anschließend wurden die beladenen Partikel mit Hexandithiol vernetzt.

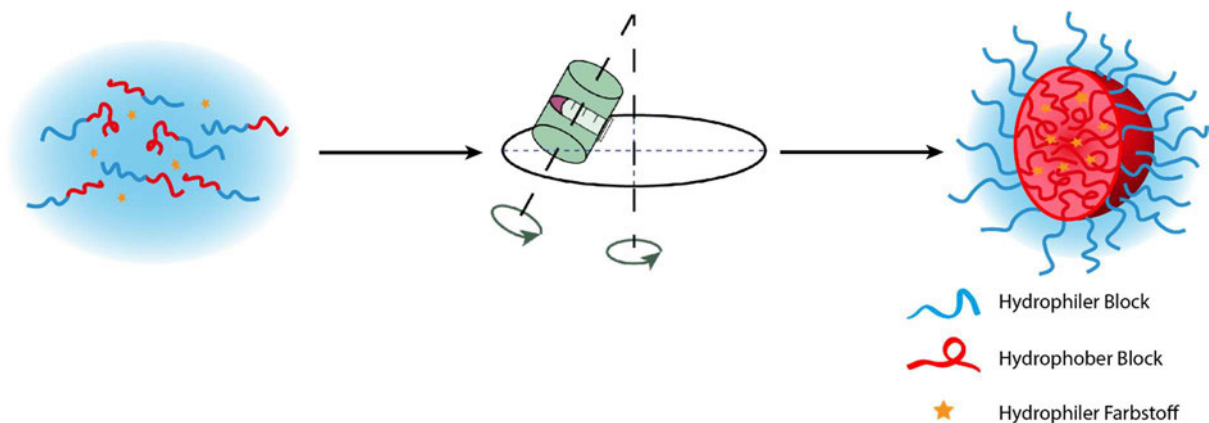


Abbildung 99: Schema Beladung der Mizellen mit Farbstoff mittels dualer asymmetrischer Zentrifuge.

Die Aufreinigung der vernetzten Aggregate von überschüssigem Vernetzer und freiem Farbstoff erfolgte über eine Dialyse gegen Wasser, da die so gebildeten Aggregate nach Vernetzung gegenüber Dialyse stabil sind.

Tabelle 22: Hydrodynamische Durchmesser der mit Nile Red beladenen und mit Hexandithiol vernetzen Partikel der Polymere HP4 und HP6.

Polymere	Zusammensetzungen	Hydrodynamischer Durchmesser [nm]	PDI
HP4	$P(\text{HPMA})_{62}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_8$	115,4	0,169
HP6	$P(\text{HPMA})_{79}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_7$	85,61	0,427

Im Fall der beladenen Aggregate, auf Basis des Polymers der Zusammensetzung $P(\text{HPMA})_{62}\text{-}b\text{-}P(\text{PDSM})_8$ (D3), weisen diese einen marginal größeren hydrodynamischen Durchmesser auf und haben einen größeren Polydispersitätsindex im Vergleich zu den unbeladenen Aggregaten.

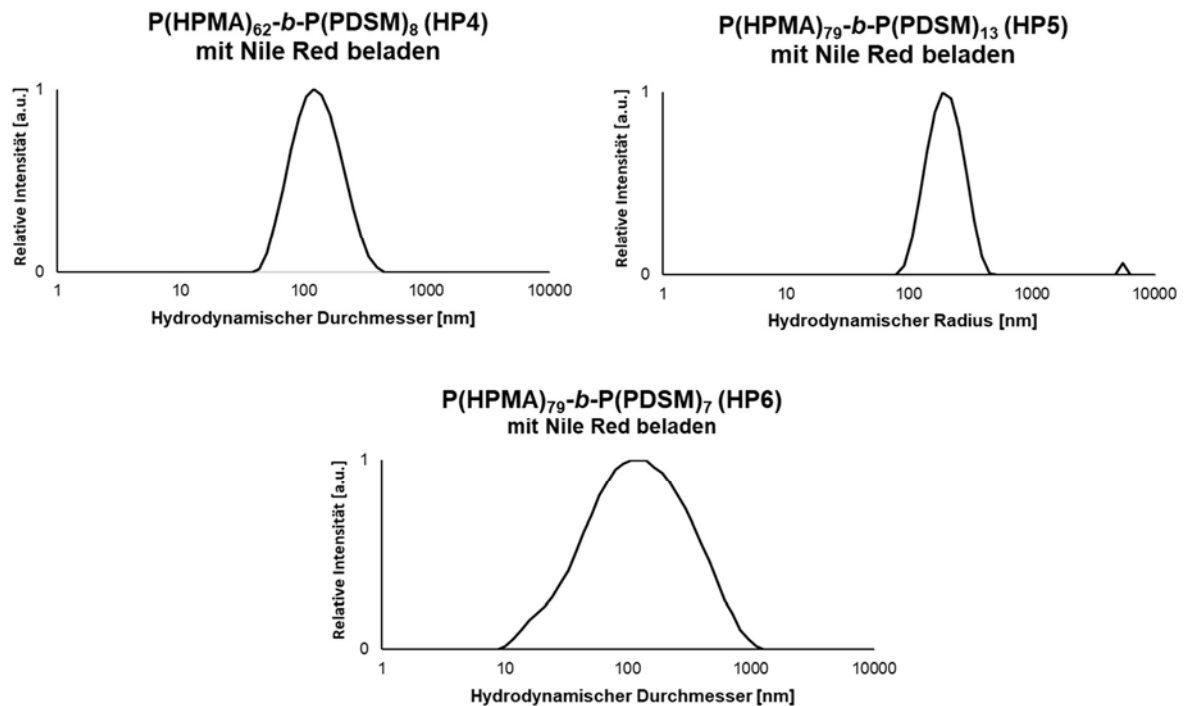


Abbildung 100: DLS-Messungen der mit Nile Red beladenen und über Hexandithiol vernetzte Partikel der Zusammensetzungen $P(\text{HPMA})_{62}\text{-}b\text{-}P(\text{PDSM})_8$ (HP4), $P(\text{HPMA})_{79}\text{-}b\text{-}P(\text{PDSM})_{13}$ (HP5) und $P(\text{HPMA})_{79}\text{-}b\text{-}P(\text{PDSM})_7$ (HP6).

Die Mizellen aus dem Polymer $P(\text{HPMA})_{120}\text{-}P(\text{PDSM})_7$ (D5) zeigen dagegen im Vergleich zu den unbeladenen Partikeln eine geringere Zunahme hinsichtlich der Größe und Polydispersitätsindex auf (Abbildung 100).

Die Partikel wurden mittels Spinfiltration von freiem Nile Red befreit und wiesen nach dieser Aufreinigung eine hell rötliche Färbung auf, was für den erfolgreichen Einschluss von Nile Red in die Mizellen spricht. Der Einschluss des Farbstoffs konnte über UV-Vis-Spektroskopie nachgewiesen werden, da die wässrigen Lösungen der Mizellen eine, für Nile Red charakteristische, Absorption bei 545 nm aufweisen.

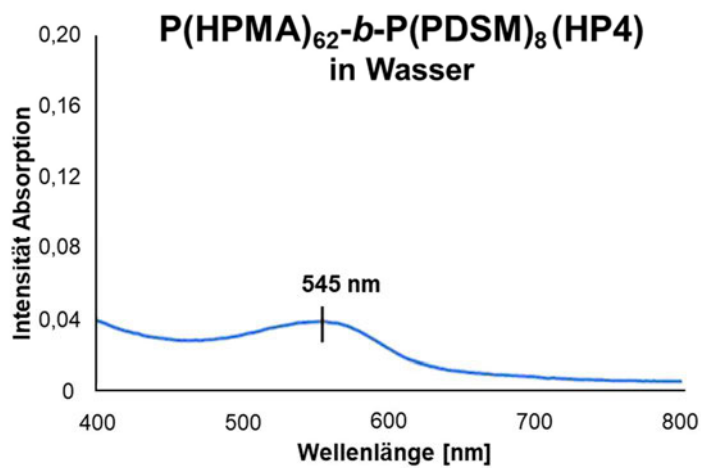


Abbildung 101: UV-Vis-Spektrum der Polymerlösung aus mit Nile Red beladenen und über Hexandithiol vernetzte Partikel der Zusammensetzungen P(HPMA)₆₂-*b*-P(PDSM)₈ (HP4) in Wasser.

4. Zusammenfassung & Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, polymere Trägersysteme zum Transport von Wirkstoffen herzustellen. Dafür wurden auf Basis zweier unterschiedlicher Polymersysteme Aggregate gebildet, die dazu geeignet sind unterschiedliche Substanzen mit verschiedenen Eigenschaften einzuschließen. Aus den DHPMA basierten Polymeren der Zusammensetzungen $P(\text{DHPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_y$, $P(\text{DHPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_y\text{-}stat\text{-}DDEMA_z)$ und $P(\text{DHPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_y\text{-}stat\text{-}DDEMA_z\text{-}stat\text{-}HHMA_w)$ wurden Polymersome aggregiert. Auf Basis der HPMA-Polymere der Zusammensetzung $P(\text{HPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{PDSM})_y$, konnten über eine Vernetzung der Disulfide der PDSM-Einheiten kernvernetzte Mizellen erhalten werden.

4.1. Polymersome

Die RAFT-Polymerisation des Monomers Pentafluorphenylmethacrylat (PFPMA) mit dem Azid-funktionalisierten Kettentransferreagenz (Azid-CTA) konnte erfolgreich in Kombination mit dem Niedrigtemperatur-Initiator 2,2'-Azobis-(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril) (AMDVN) durchgeführt werden.

Es wurden reproduzierbar $P(\text{PFPMA})$ Homopolymere mit einem Molekulargewicht im Bereich von 7500 g/mol bis 8500 g/mol und enger Molekulargewichtsverteilung synthetisiert.

Im nächsten Schritt konnten ausgehend von den $P(\text{PFPMA})$ Homopolymeren erfolgreich drei Diblockcopolymere unterschiedlicher Zusammensetzungen mit Blocklängenverhältnissen hergestellt werden, die sich zur Aggregation von Partikeln eignen. Bei den Polymerisationen bestand die Herausforderung darin reproduzierbar kurze PFPMA-Blöcke sowie im Anschluss einen möglichst langen zweiten Block zu synthetisieren. Dies wurde gelöst indem die Reaktionsbedingungen und Reaktionszeiten angepasst wurden, die in Verbindung mit dem eingesetzten Azid-CTA sehr strikt eingehalten werden müssen um, gezielt und reproduzierbar Aggregate zu erhalten.

Ausgehend von diesen Reaktivester-Vorläuferpolymeren auf PFPMA-Basis wurden durch eine polymeranaloge Umsetzung mit 2,3-Dihydroxypropylamin (DHPA) die amphiphilen Blockcopolymere der Zusammensetzungen $P(\text{DHPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_y$, $P(\text{DHPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_y\text{-}stat\text{-}DDEMA_z)$ und $P(\text{DHPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{LMA}_y\text{-}stat\text{-}DDEMA_z\text{-}stat\text{-}HHMA_w)$ erhalten.

Die Aggregation der Partikel erfolgte mittels dualer asymmetrischer Zentrifuge. Aus den amphiphilen Blockcopolymeren der drei unterschiedlichen Zusammensetzungen konnten erfolgreich vesikuläre Strukturen gebildet werden.

Im nächsten Schritt wurde eine automatisierte Methode zur Aufreinigung der hergestellten Partikel entwickelt. Dazu wurde die Methode der HPLC mit einer Größenausschlusssäule kombiniert. Die Partikel konnten dadurch von überschüssigem Unimer sowie später von anderen Bestandteilen wie Fluoreszenzmarkierungen oder von nicht eingeschlossenen Wirkstoffen getrennt werden. Im Fall der erhaltenen fluoreszenzmarkierten Partikel wurden nach der HPLC-Aufreinigung keine nachweisbaren freien Farbstoffmoleküle gemessen, was ein eindeutiger Beweis für eine hohe Reinheit der erhaltenen Partikel ist. Damit bietet die entwickelte Aufreinigungsmethode die Möglichkeit ein sehr sauberes Partikelsystem zu erhalten welches gleichzeitig automatisierbar, skalierbar und reproduzierbar ist. Somit erfüllt das System wichtige Voraussetzungen hinsichtlich eines späteren Einsatzes als Transportsystem in der Pharmaindustrie.

Die mittels dualer asymmetrischer Zentrifuge gebildeten und durch HPLC aufgereinigten Aggregate wurden mit der Dynamischen Lichtstreuung analysiert und zeigten hydrodynamische Durchmesser zwischen 104 nm und 211 nm und gleichzeitig enge Größenverteilungen.

Die Struktur der erhaltenen Partikel konnte mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) genauer untersucht werden und definierte Partikel mit enger Größenverteilung nachgewiesen werden. Um eine weitere Strukturaufklärung zu erreichen könnten die erhaltenen Polymersome zusätzlich mit Hilfe von Cryo-TEM weiter untersucht werden.

Um eine Eignung der entwickelten Polymersysteme hinsichtlich ihres Potentials als Wirkstoffträger zu untersuchen, wurden diese mit verschiedenen Substanzen in der dualen asymmetrischen Zentrifuge beladen und die dazugehörigen Beladungseffizienzen ermittelt.

Als Einschlusskomponenten wurden die Wirkstoffe Doxorubicin und Rapamycin gewählt. Doxorubicin eignete sich besonders gut für erste Einschlussexperimente, da es bei einer Absorption von 555 nm fluoresziert und dadurch gut mittels UV-Vis-Spektroskopie quantifiziert werden konnte. Für den Einschluss von Doxorubicin wurde eine Einschlusseffizienz im Bereich von 10 % ermittelt.

Die hergestellten Partikel eigneten sich ebenfalls zum Einschluss des Wirkstoffs Rapamycin. Die Menge an eingeschlossenem Rapamycin wurde anhand einer eigens für diesen Zweck angepassten Methode mittels analytischer HPLC quantifiziert. Die Einschlusseffizienz an Rapamycin der Polymere mit der Zusammensetzung $P(\text{DHPMA})_{24}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_{25}$ (DL5) lag bei 20,6%. Damit war die Einschlusseffizienz für den Wirkstoff Rapamycin etwa doppelt so hoch wie die des Doxorubicins.

Die mit Doxorubicin beladenen Partikel wurden in Zelltests weiter untersucht, um die Aufnahme an Doxorubicin in die Zellen zu quantifizieren. Dabei wurde die Aufnahme an Doxorubicin in Zellen aus den Partikeln mit der Aufnahme an freiem Doxorubicin verglichen. Es konnte bei allen gemessenen Partikeln eine erfolgreiche Aufnahme von Doxorubicin aus den Polymersomen in die Zellen gezeigt werden. Die Freisetzung des eingeschlossenen Doxorubicins sowie die davon abhängige Aufnahme von Doxorubicin in die Zellen unterscheidet sich je nach Zusammensetzung der Polymersome. Im Falle der Polymersome, deren hydrophober Block nur aus Laurylmethacrylat (LMA) bestand (DL2), zeigte sich im Vergleich zu dem freien Doxorubicin, eine etwas geringere Aufnahme in die Zelle. Die Polymersome mit LMA und 2-(2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethylmethacrylat (DDEMA) Bestandteilen (DD4) zeigten eine höhere Aufnahme von Doxorubicin in den Zellen, als die reinen LMA Polymersome und das freie Doxorubicin. Die Polymersome mit dem zusätzlichen Bestandteil 6-(Hydroxyhexyl)methacrylat (HHMA) im hydrophoben Block zeigten die größte Aufnahme an Doxorubicin in die Zelle und somit ein besseres Aufnahmeverhalten als das freie Doxorubicin und die anderen Polymersome.

Die Aufnahme an Doxorubicin ist in etwa um ein Dreifaches erhöht verglichen mit den DDEMA Polymersomen. Sowohl die DDEMA als auch die HHMA basierten Polymersomen zeigen eine bessere Aufnahme in die Zelle im Vergleich zu reinem Doxorubicin.

Als nächstes wurde versucht siRNA in die Polymersome einzuschließen, um zu prüfen ob diese als Transfektionsagenzien eingesetzt werden können. Die mit siRNA beladenen Polymersome der drei unterschiedlichen Zusammensetzungen wurden im Luciferase- und MTT-Assay auf ihre Transfektionseffizienz in Tumorzellen hin untersucht, die stabil eGFPLuc exprimieren. Im Luciferase-Assay konnte bei keiner der drei Polymersom-Zusammensetzungen zu irgendeinem Zeitpunkt eine Transfektion nachgewiesen werden. Im MTT-Assay konnte ebenfalls bei allen drei Polymersom-Zusammensetzungen keine signifikante Abnahme der Zellviabilität und somit keine Transfektion nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen warum keine Transfektion der siRNA in Zellen erfolgt ist, wurde die Menge an eingeschlossener siRNA pro Polymersom quantifiziert.

Dafür wurden die Polymersome der Zusammensetzung $P(\text{DHPMA})_{30}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA-}stat\text{-DDEMA})$ mit Cy5 fluoreszenzmarkierter siRNA beladen und die Oberfläche der Partikel über die Azid-Gruppe mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cw800 funktionalisiert. Ziel war es die Menge an siRNA Molekülen pro Aggregat zu quantifizieren. Anhand der FCS-Messungen konnte die Menge von 3 siRNA Molekülen pro Aggregat quantifiziert werden. Diese relativ geringe Menge an siRNA im Partikel steht wahrscheinlich im Zusammenhang damit, dass keine Transfektion von siRNA in Zellen beobachtet werden konnte. Damit erwiesen sich die hergestellten Partikel als geeigneter, um kleinere Moleküle wie Wirkstoffe einzuschließen, als geladene große Makromoleküle wie siRNA.

In einem nächsten Schritt konnte die Integrität der Azid-Gruppe an den hydrophilen Enden der Polymere nachgewiesen werden. Denn auch nach der Assemblierung zu Partikeln war die Azid-Gruppe intakt und weiterhin zugänglich für Click-Reaktionen mit sämtlichen DBCO-Liganden auf der Oberfläche der Partikel.

Über die Azid-Gruppe wurde mittels Click-Reaktion der mit Dibenzocyclooctin (DBCO) funktionalisierte Fluoreszenzfarbstoff Cw800 an die Polymersome gebunden. Die Cw800 markierten Polymersome wurden mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) analysiert. Mit Hilfe dieser sehr sensiblen Methode konnte nach der Aufreinigung kein freier Cw800 Farbstoff in der Lösung gemessen werden. So konnte gezeigt werden, dass die Aufreinigung mittels HPLC saubere Aggregate ohne Reste an freiem Farbstoff liefert. Damit bietet diese Aufreinigungsmethode gegenüber der Aufreinigung mittels Spinfiltration einen erheblichen Vorteil, da im Falle der Spinfiltration sich in der FCS oftmals noch Spuren an freiem Farbstoff nachweisen lassen. Zudem ist die Methode der Spinfiltration deutlich zeitaufwändiger und nicht automatisiert.

Über die Azid-Endgruppe der hergestellten Polymere wurden mittels „*Strain promoted [3+2] Azide-Alkyne Cycloaddition*“ SPAAC auch Biotin-DBCO-Moleküle als weitere Funktionalität auf die äußere Hülle der Polymersome eingeführt. Durch die Anbindung von Biotin ist es möglich Streptavidin zu binden, welches wiederum als Brücke verwendet werden kann, um beispielsweise andere Biotin gebundene Strukturen an das Polymersom zu binden. Es konnte gezeigt werden, dass die mit Biotin funktionalisierten Polymersome eine spezifische Bindung zwischen Biotin und Streptavidin ermöglichen. In einem nächsten Schritt könnten Streptavidin funktionalisierte Gruppen als Brücke verwendet werden, um über das Biotin auf die Oberfläche der Aggregate Biotin-markierte Antikörper einzuführen.

Im Zuge der Azid-Funktionalisierung wurde auch die hohe Lagerungsstabilität der erhaltenen Biotin-Polymer Aggregate nachgewiesen. Die mit Alexa Fluor und Biotin funktionalisierten Aggregate wiesen auch nach 4 Monaten Lagerung gleichbleibende hydrodynamische Durchmesser auf. Zusätzlich kam es im Zuge der Lagerung zu einer etwas engeren Größenverteilung.

Um die Verteilung der hergestellten Polymersome im Körper zu untersuchen, wurden über das Azid gebundene Cw800 markierte Polymersome Mäusen im Tierversuch injiziert. Die fluoreszenzmarkierten Polymersome P(DHPMA)₃₀-*b*-P(LMA₁₀-*stat*-DDEMA₈) (P2) und P(DHPMA)₃₀-*b*-P(LMA₂₁-*stat*-DDEMA₁₇-*stat*-HHMA₂) (P3) zeigten nach 24 Stunden eine Anreicherung in der Leber. Im Vergleich dazu wurden kleinere Partikel über die Blase renal ausgeschieden.

Damit konnte gezeigt werden, dass die hergestellten Polymersome im Blut zirkulieren können ohne zu aggregieren und in der Leber akkumulieren. Deshalb eignen sie sich potentiell als Transportsysteme für Wirkstoffe in die Leber. Der nächste Schritt wäre das Injizieren von mit Wirkstoff beladenen Partikeln in Mäusen mit Tumoren, um zu zeigen ob das entwickelte Polymersystem zur Therapie von Lebertumoren eingesetzt werden kann.

Insgesamt erwies sich das auf Basis von DHPMA entwickelte polymere Trägersystem als ein versatiles System zur Einkapselung und zum Transport von Molekülen verschiedener Größen und Löslichkeiten. Vor allem die erfolgreiche und zeitgleich gut verträgliche Applikation in Mäusen ist ein vielversprechendes Ergebnis für einen späteren Einsatz im menschlichen Organismus.

4.2. Polymermizellen

Zur Herstellung kernvernetzter Mizellen wurden Diblöcke aus den Einheiten HPMA und PDSM synthetisiert. Die Synthese der Homopolymere $P(\text{PFPMA})_x$, sowie der HPMA/PDSM Blockcopolymere verschiedener Blocklängenverhältnisse und Molekulargewichte über den RAFT-Prozess war erfolgreich. Die polymeranaloge Umsetzung bietet die Möglichkeit, unterschiedliche Blöcke und Bestandteile in das Polymer einzufügen. Neben der Umsetzung mit HPA zu HPMA konnte als weiterer Bestandteil auch der Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 647 (AF647) in den hydrophilen Block eingeführt werden. Die erfolgreiche polymeranaloge Umsetzung mit Alexa Fluor 647 zeigt, dass die über den PFPMA-Reaktivester-Ansatz erhaltenen Polymere auch durch andere Funktionalitäten modifiziert werden können.

Die Integrität der PDSM-Einheiten in den erhaltenen Blockcopolymeren $P(\text{HPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{PDSM})_y$ konnte mittels UV/Vis-Spektroskopie bewiesen werden.

Die hergestellten Polymere $P(\text{HPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{PDSM})_y$ konnten sowohl über das *solvent switch* Verfahren als auch über die duale asymmetrische Zentrifuge gebildet werden. Die Ausbildung von Überstrukturen aus $P(\text{HPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{PDSM})_y$ in wässrigem Medium konnte mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) nachgewiesen werden. Alle synthetisierten Polymere aggregierten zu Partikeln mit hydrodynamischen Radien zwischen 45 nm und 262 nm. Es konnte beobachtet werden, dass die vernetzten Aggregate größere hydrodynamischen Radien aufweisen als vor der Vernetzung. Dies wurde auf ein Quellen der Aggregate im Lösungsmittel zurückgeführt.

Der hydrophobe Block aus PDSM wurde als vernetzbare Einheit eingeführt. Durch das Einführen der PDSM-Einheiten befanden sich nach Assemblierung die reaktiven Disulfid-Seitenketten im Kern der Mizellen und ermöglichten somit eine Kernvernetzung der Mizellen durch Thiole. Anhand der UV/Vis-spektroskopischen Analysen konnte die Vernetzbarkeit des PDSM-Blocks mit Hexandithiol nachgewiesen werden. Um in das System weitere Variabilität einzubauen, wäre es möglich andere Vernetzer als Hexandithiol einzusetzen. Es konnte gezeigt werden, dass die vernetzten Aggregate eine hohe Stabilität aufweisen, da sie gegenüber dem Entziehen von Wasser über Gefriertrocknung und Wiederaufnahme in Lösungsmittel stabil waren.

Eine hohe Lagerungsstabilität über 11 Wochen konnte ebenfalls über DLS-Messungen nachgewiesen werden. Für den weiteren Einsatz dieses Partikelsystems stellt dies einen großen Vorteil dar, da eine zeitnahe Verwendung kein kritischer Faktor ist. Zusätzlich können die Partikel als Pulver gelagert werden und bei Bedarf in Lösung aufgenommen werden.

Erste Experimente zur Beladung der Mizellen zeigten sich vielversprechend. Es war möglich die Partikel mit dem hydrophoben Farbstoff Nile Red zu beladen. Dies ist ein guter Hinweis dafür, dass das hier entwickelte Partikelsystem zum Einschluss und Transport von Wirkstoffen geeignet ist. Der nächste Schritt wäre auch hier der Einschluss eines Wirkstoffs mit anschließender Quantifizierung der Einschlusseffizienz.

Weiteihin bietet die endständige Azid-Gruppe die Möglichkeit eine weitere Funktionalität in das Polymer, beziehungsweise auf die Oberfläche der Partikel einzuführen. Dies macht das hergestellte Partikelsystem für eine weite Anzahl an Anwendungen interessant. In einem nächsten Schritt könnten Fluoreszenzmarkierungen über die Azid-Gruppe eingeführt werden, um die Partikel in biologischen Systemen sichtbar zu machen. Oder es könnten beispielsweise Peptid- oder Zuckerstrukturen auf die Oberfläche eingeführt werden, die die Aufnahme in bestimmten Zellen unterstützen.

Weiterhin könnte, nachdem eine erfolgreiche Einkapselung von Nile Red erfolgt ist, weitere hydrophobe Substanzen eingeschlossen werden. Darauf aufbauende Arbeiten sollten der Quantifizierung der eingeschlossenen Menge an Substanz gewidmet werden. Zusätzlich steht noch die Testung im Zellversuch aus, um hinsichtlich Zellaufnahme, Freisetzung und Toxizität Informationen zu erhalten.

Aus dem entwickelten $P(\text{HPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_y$ Polymersystem lassen sich kernvernetzte Mizellen bilden, die sich für den Einschluss von hydrophoben Substanzen eignen. Ein weiterer Vorteil sind die hohe Lagerstabilität des Systems in Kombination mit der wasserfreien Lagerung als Pulver.

5. Experimentalteil

5.1. Materialien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Herstellern Fisher Scientific, Sigma Aldrich, Honeywell, Wako Chemicals und Acros Organics bezogen. Diese wurden, falls nicht gesondert angegeben, ohne zusätzliche Aufreinigung eingesetzt. Alle Lösungsmittel wurden mit dem Reinheitsgrad pro analysi (p.a.) verwendet. Für die NMR-Analysen wurden deuterierte Lösungsmittel der Firma Deutero GmbH verwendet. Für die säulenchromatographischen Aufreinigungen wurden technische Lösungsmittel verwendet und diese davor destillativ aufgereinigt. Das Lösungsmittel 1,4-Dioxan wurde bei Bedarf über Natrium getrocknet und vor Verwendung frisch destilliert. Dichlormethan wurde über CaCl_2 getrocknet und bei Bedarf frisch destilliert. Die Chemikalie 2-Hydroxypropylamin (HPA) wurde vor Gebrauch unter Vakuum destilliert. Der Wirkstoff Rapamycin wurde von der Firma AdipoGen Life Sciences gekauft.

Zur dünnschichtchromatographischen Trennung wurden Alugram® Sil G/UV₂₅₄ Kieselgel Aluminium-Fertigfolien (40x80 mm) mit einer Schichtdicke von 0,2 mm der Firma Macherey-Nagel eingesetzt. Chromatographiesäulen wurden mit Silicagel 0,035-0,070 mm, 60 Å von Acros Organics bepackt.

Es wurden Dialyseschläuche der Größen MWCO 3.500 der Firma ZelluTrans Roth und MWCO 6.000-8.000 von Spectra/Por SpectrumLabs verwendet.

Zur Filtration der Partikel wurden Acrodisc GHP-Filter (Polypropylen Membran) der Porengröße 200 nm der Firma Pall Lab verwendet.

Zur Aufreinigung wurden die Polymere vom Fällungsmittel mithilfe der Zentrifugen der Firma Sigma des Modells 2-16KL und Thermo Scientific™ Heraeus™ Labofuge™ 400R abgetrennt.

Das Gerät VirTis Benchtop Pro (SP Scientific) wurde zur Lyophilisation (Gefriertrocknung) verwendet. Die Polymerlösung wurde in MilliQ-Wasser gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren und für 3 Tage lyophilisiert.

5.2. Analytische Methoden & Geräte

5.2.1. Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Analysen wurden an Geräten der Firma Bruker durchgeführt. ^1H - und ^{19}F -Spektren wurden am Avance II bei 400 MHz gemessen. Die 2-D DOSY Analysen erfolgten am Avance III HD 400 bei 400 MHz. Als interner Standard wurde die chemische Verschiebung (ppm) des verwendeten deuterierten Lösungsmittels verwendet. Zur Auswertung der Spektren wurde die Software MestReNova verwendet.

5.2.2. Gelpermentationschromatographie (GPC)

Die im Rahmen dieser Arbeit aufgeführten Gel-Permeations-Chromatographie Analysen wurden in den Elutionsmitteln Tetrahydrofuran (THF) und Hexafluorisopropanol (HFIP) durchgeführt.

Die THF-Anlage der Firma Jasco besteht aus einer Pumpe des Modells PU-1580, einem UV-Detektor des Modells UV-1575, einem Brechungsindexdetektor des Modells RI-1530 und einem Autosampler des Modells AS-1555. Die Kalibrationen der GPCs erfolgten im Falle von THF mittels Polystyrol-Standards der Firma PSS Polymer Standards Service (Mainz).

Die eingesetzte Gelpermeationssäule (MZ-Analysentechnik) war mit quervernetzten Styrol-Divinylbenzol Copolymeren der Porengrößen 102, 104 und 106 Å befüllt.

Als Laufmittel wurde Tetrahydrofuran (Reinheitsgrad p.a.) von Sigma Aldrich verwendet. Die Probenkonzentration betrug 2 mg/mL, das Injektionsvolumen betrug 100 µL. Als interner Standard wurde den Proben Toluol (Acros Organics) zu einem Anteil von ca. 0,2% zugegeben. Die Flussrate betrug 1 ml/min.

Die HFIP-GPC-Anlage der Firma Jasco besteht aus einer HPLC-Pumpe vom Typ PU2080+, einem Autosampler AS 1555 und den Detektoren UV2075+ (UV-Detektion, $\lambda=254$ nm) und RI 2080+ (Brechungsindex-Detektion). Die Gelpermeationssäule (MZ-Analysentechnik) war mit modifiziertem Kieselgel (PFG) der Porengröße 102 und 103 Å befüllt. Die Partikelgröße betrug 7 µm. Zur Kalibrierung wurden PMMA-Standards der Firma PSS Polymer Standards Service (Mainz) verwendet. Als Laufmittel wurde Hexafluorisopropanol der Firma Thermo Fisher Scientific mit einem Zusatz von 3 g/L Kaliumtrifluoressigsäure verwendet.

Die Probenkonzentration betrug 2 mg/mL, das Injektionsvolumen betrug 100 µL. Als interner Standard wurde den Proben Toluol (Acros Organics) zu einem Anteil von ca. 0,2% zugegeben. Die Anlage wurde auf 40 °C temperiert und die Flussrate betrug 0,8 mL/min.

5.2.3. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) zur Aufreinigung der Partikel

Zur Aufreinigung der hergestellten Partikel wurde das Agilent 1100 HPLC System (Agilent, Santa Clara, USA) verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 100 µl und die Flussgeschwindigkeit war 1 ml/min MilliQ Wasser. Als Säule wurde die BioRad UNO Q1 (Bio Rad Laboratories, Hercules, USA) mit dem Säulenmaterial Sephacryl S500-HR (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zur Detektion der UV-Vis Signale wurde ein Multiwellenlängen Detektor (G1365A Agilent 1100 Series, Germany) eingesetzt, die gemessenen Wellenlängen waren 230 nm, 494 nm, 555 nm 644 nm und 773 nm. Die Injektion erfolgte mittels Autosampler und die Fraktionen wurden mit Hilfe eines automatischen Fraktions Sammler erhalten.

5.2.4. Analytische HPLC zur Bestimmung der Wirkstoffkonzentration

Zur Bestimmung der Rapamycin Konzentration wurde das Thermo Fischer Scientific Dionex Ultimate 3000 HPLC System eingesetzt. Die eingeeetzte Säule war die reversed phase column Nucleosil 100-5-C18, 4.6 x 250 mm.

5.2.5. UV-Vis Messungen

Die UV-Vis-Messungen erfolgten an einem UV-Vis-Spektrometer der Firma Jasco mit dem Modell V- 630 Spectrophotometer. Auswertungen erfolgten mir der Software Spectra Manager. Es wurden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet.

5.2.6. Plate Reader

Die Quantifizierung des Doxorubicins in den Partikeln erfolgte, indem 50 µl der Polymersommlösungen in ein PCR Gefäß zu 100 µl Dimethylformamid zum lösen gegeben wurde. Anschließend wurden die Polymersommlösungen in 96-Well-Platten (Art.Nr.: 655083, Greiner BioOne, Österreich) pipettiert. Zur Kalibrierung wurden Doxorubicin Lösungen in den Konzentrationen 1 µmol/l bis 25 µmol/l verwendet. Das Fluoreszenzsignal wurde an einem Infinitesimal M1000 Platereader (Tecan, Schweiz) gemessen.

5.2.7. Duale asymmetrische Zentrifuge

Die Assemblierungen der Partikel wurden an der dualen asymmetrischen Zentrifuge von der Firma Hauschild Engineering des Modells SpeedMixer™DAC 150.1 CM41. Dafür wurden 0,2mL PCR Vials von Kisker Biotech und Sigmund Lindner und Keramikkügelchen (Silibeads) Silibeads ZY (Ø= 0,3-0,4mm) der Firma Sigmund Lindner mit einem Durchmesser von 0,3 bis 0,4 mm verwendet.

5.2.8. Dynamische Lichtstreuung (Zetasizer)

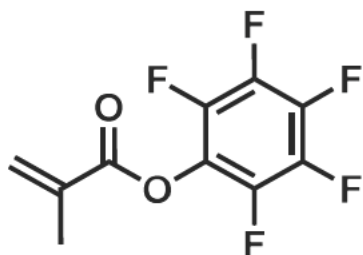
Die Lichtstreuungs-Messungen wurden am Zetasizer Nano-ZS der Firma Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK mit der Modellnummer ZEN3600 durchgeführt. Dabei wurden die 1,5 – 3,0 mL Halb-Mikro PS Einmalküvetten der Firma BRAND verwendet. Bei einem Winkel von 173° gemessen bei 25°C. He/NE Laser für eine Anregung der Probe bei 633 nm. Die Datenanalyse erfolgte anhand der Malvern Zetasizer Software 8.01.4906.

5.2.9. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Als Probenträger wurden CARBON FILM Kupfernetze (quadratische Öffnung, 300 Mesh, Electron Microscopy Sciences) verwendet und vor Gebrauch im Sauerstoffplasma hydrophilisiert. Es wurde ein Tropfen Probe auf die CARBON FILM Kupfernetze gegeben, anschließend erfolgte das negativ-staining mit 5 µl einer 2 wt% Uranylacetatlösung. Die TEM-Bilder wurden an einem FEI Tecnai 12 TWIN LaB6 bei 120 kV gemessen. Verwendet wurde eine Gatan US1000 CCD-Kamera (16-bit, 2048 x 2048 Pixel) in Kombination mit der Gatan Digital Micrograph Software.

5.3. Monomersynthesen

5.3.1. Pentafluorphenylmethacrylat

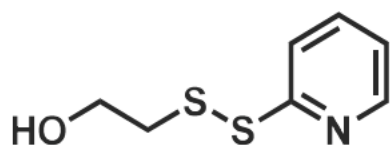


In einem 500 ml Dreihalskolben mit Rührfisch, Dimrothkühler, Septum und Tropftrichter wurden unter Argonatmosphäre 20 g Pentafluorphenol (0,119 mol; 1 eq) in 200 ml absolutiertem Dichlormethan gelöst. Über ein Septum wurde mit einer Spritze 16,6 ml Triethylamin (0,119 mol; 1eq) langsam hineingegeben. Über den Tropftrichter wurden 10,8 g Methacrylchlorid (0,103 mol; 1 eq) langsam dazu getropft während mit einem Eisbad gekühlt wurde. Nach Zugabe wurde die Mischung für weitere 15 min gekühlt. Anschließend wurde bei Raumtemperatur und über Nacht gerührt. Die Lösung wurde drei Mal mit jeweils 100 ml destilliertem Wasser extrahiert und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt. Es folgte eine fraktionierte Destillation unter Vakuum (Sdp. (PFPMA) 27°C bei 10-3 mbar). Das Destillat (Rohausbeute 15 g) wurde zusätzlich säulenchromatographisch (SiO₂, 100% Petrolether) aufgereinigt (R_f = 0,36) mit einer Ausbeute von 11,21 g (0,044 mol, 41%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 2.09 (s, 3H, -CH₃); 5.91 (s, 1H, C=CH₂-*cis*); 6.45 (s, 1H, C=CH₂-*trans*).

¹⁹F-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = - 163.78 – - 163.63 (m, 2F, *m*-ArF); - 159.42 (t, 1H, *p*-ArF); -153.94 – -154.04 (m, 2H, *o*-ArF).

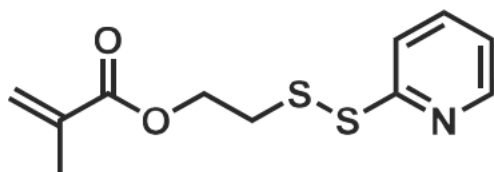
5.3.2. Hydroxyethylpyridyldisulfid (HPDS)



In einem 250 ml Dreihalskolben mit Rührfisch, Dimrothkühler, Septum und Tropftrichter wurden unter Argonatmosphäre 10 g Aldrithiol (0,045 mol; 1,55 eq) in 54 ml Methanol gelöst. Über ein Septum wurde mit einer Spritze 0,8 ml Essigsäure dazugegeben. Über den Tropftrichter wurden 2,29 g Mercaptoethanol (0,103 mol; 1 eq) in 26 ml Methanol langsam dazu getropft. Nach Zugabe wurde die Mischung für weitere 15 min gekühlt. Anschließend wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt. Das Rohprodukt 12,89 g wurde zusätzlich säulenchromatographisch (SiO₂, 1:1 Essigester : Cyclohexan) aufgereinigt (*R_f* = 0,41) mit einer Ausbeute von 4,78 g (0,014 mol, 49%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 2.90 (s, 2H, -S-CH₂); 3.76 (s, 2H, CH₂-OH); 5.68 (s, 1H, -OH); 7.10 (m, 1H, *m*-Ar); 7.39 (d, 1H, *o*-Ar); 7.55 (td, 1H, *o*-Ar); 8.45 (m, 1H, *p*-Ar).

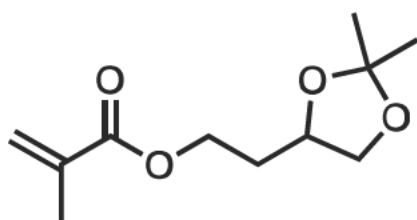
5.3.3. Pyridyldisulfidethylmethacrylat (PDSM)



In einem 250 ml Dreihalskolben mit Rührfisch, Dimrothkühler, Septum und Tropftrichter wurden unter Argonatmosphäre 4,78 g des Edukts Hydroxyethylpyridyldisulfid (0,026 mol; 1 eq) in 25 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Die Lösung wurde mit einem Eisbad gekühlt. Über ein Septum wurden mit einer Spritze 4,27 ml Triethylamin (0,031 mol, 1,2 eq) dazugegeben. Über den Tropftrichter wurde eine Lösung aus 1,80 g Methacryloylchlorid (0,030 mol; 1,2 eq) in 25 ml trockenem Dichlormethan langsam dazu getropft. Nach Zugabe wurde die Mischung für weitere 15 min gekühlt. Anschließend wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Lösung wurde 1 Mal gegen VE Wasser ausgeschüttelt. Danach wurde 3 Mal gegen gesättigte NaCl Lösung ausgeschüttelt. Im Anschluss wurde die organische Phase mit MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt. Das Rohprodukt (ca. 10 g) wurde zusätzlich säulenchromatographisch (SiO₂, 1:2 Essigester : Cyclohexan) aufgereinigt mit einer Ausbeute von 5,13 g (0,020 mol, 82%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 1.51 (t, 3H, -CH₃); 2.67(t, 2H, -S-CH₂); 3.97 (t, 2H, CH₂-O-); 5.15-5.17(m, 1H, C=CH₂-cis); 5.70 (s, 1H, C=CH₂-trans); 6.65-6.69 (m, 1H, *m*-Ar); 7.18-7.28 (m, 2H, *o*-Ar); 8.03 (d, 1H, *p*-Ar).

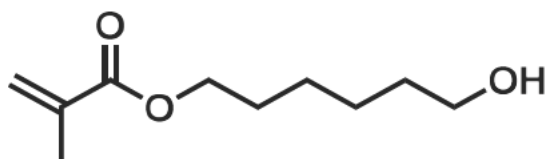
5.3.4. 2-(2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethylmethacrylat (DDEMA)



In einem 500 ml Dreihalskolben mit Rührfisch, Dimrothkühler, Septum und Tropftrichter wurden unter Argonatmosphäre 2 g 4-(2-Hydroxyethyl)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolan (0,014 mol; 1 eq) in 40 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Über ein Septum wurden mit einer Spritze 2,28 ml Triethylamin (0,016 mol, 1,2 eq) dazugegeben. Der Kolben wurde mit einem Eisbad auf 0°C gekühlt. Über den Tropftrichter wurde langsam eine Lösung aus 1,57 g Methacryloylchlorid (0,015 mol; 1,1 eq) in 10 ml trockenem Dichlormethan dazu getropft. Anschließend wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Die Lösung wurde 3 Mal gegen VE Wasser ausgeschüttelt. Im Anschluss wurde die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt. Das Rohprodukt (11,88 g) wurde zusätzlich säulenchromatographisch (SiO₂, 1:8 Essigester : Cyclohexan) aufgereinigt mit einer Ausbeute von 1,7662 g (0,0082 mol, 60%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 1.33 (s, 3H, C-CH₃); 1.39 (s, 3H, C-CH₃); 1.86-2.01 (m, 5H, CH₂-CH₂-O- ; -CH₃); 3.57 (dd, 1H, CH-CH₂-O-); 4.05-4.09 (m, 1H, CH-CH₂-O-); 4.15-4.22 (m, 2H, CH₂-O-); 4.27-4.32 (m, 1H, -CH-O-); 5.54-5.55 (m, 1H, C=CH₂-cis); 6.08 (s, 1H, C=CH₂-trans).

5.3.5. 6-(Hydroxyhexyl)methacrylat (HHMA)

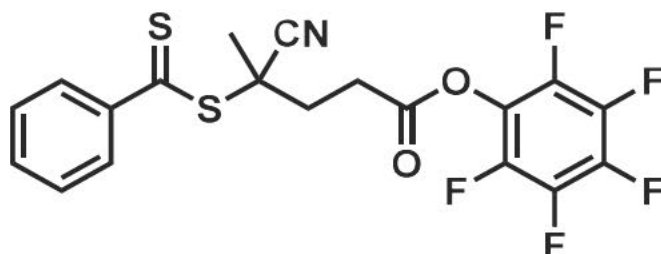


In einem 500 ml Dreihalskolben mit Rührfisch, Dimethalkühler, Septum und Tropftrichter wurden unter Argonatmosphäre 72,6 g 1,6-Hexandiol (0,614 mol; 10 eq) in 200 ml trockenem Tetrahydrofuran (THF) gelöst. Die Lösung wurde mit einem Eisbad auf ca. 10°C gekühlt. Über ein Septum wurde mit einer Spritze 10,22 ml Triethylamin (0,074 mol, 1,2 eq) dazugegeben. Über den Tropftrichter wurde langsam eine Lösung aus 6,42 g Methacryloylchlorid (0,061 mol; 1,0 eq) in 10 ml trockenem Tetrahydrofuran dazu getropft. Anschließend wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat mit Hilfe eines Rotationsverdampfers eingedunstet. Die Lösung wurde über Nacht im Kühlschrank gekühlt. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, dabei wurde mit 30 ml kaltem THF gewaschen. Das erneut eingedunstete Filtrat wurde in ca. 50 ml Chloroform gelöst. Die organische Phase wurde 2 Mal gegen verdünnte Salzsäure ausgeschüttelt und danach weitere 2 Mal gegen VE Wasser. Im Anschluss wurde die organische Phase über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt. Es wurde 6,86 g Produkt erhalten (0,037 mol, 60%).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 1.37-1.43 (m, 4H, -CH₂-); 1.55-1.60 (m, 2H, CH₂-CH₂-OH); 1.66-1.71 (m, 2H, CH₂-CH₂-O-); 1.75-1.81 (m, 1H, -OH); 1.93 (t, 3H, -CH₃); 3.64 (t, 2H, CH₂-OH); 4.14 (t, 2H, -CH₂-O-); 5.54-5.55 (m, 1H, C=CH₂-cis); 6.08-6.09 (m, 1H, C=CH₂-trans).

5.4. Synthese des Kettentransferreagenz

5.4.1. 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)-sulfanyl)-pentansäure-pentafluorphenylester (PFP-Aktivester-CTA)

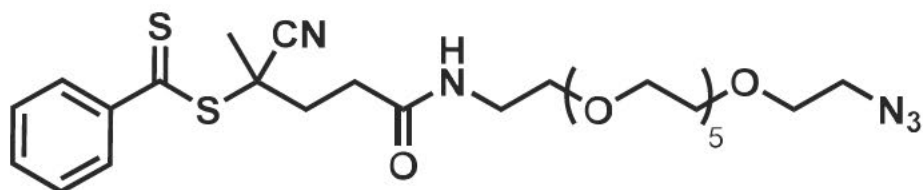


1,74 g des Säure-CTAs (4-Cyano-4-((thiobenzoyl)-sulfanyl)pentansäure) (6,25 mmol; 1 eq) wurde in einem Zweihalsrundkolben mit Dimrothkühler, Rührfisch und Septum in 50 ml absolutem THF unter Argon Atmosphäre vorgelegt. Es wurden 1,73 ml Triethylamin (1,25 mmol; 2eq) sowie 3,5 g Pentafluorphenyltrifluoracetat (1,25 mmol; 2eq) hinzugefügt. Die Reaktionslösung wurde für vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel THF am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in DCM aufgenommen. Die organische Phase wurde drei Mal mit destilliertem Wasser extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel DCM wurde mittels Rotationsverdampfer entfernt. Der rot gefärbte Rückstand wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel mit den Lösungsmitteln Petrolether : Ethylacetat im Verhältnis 15:1 aufgereinigt. Der Pentafluorphenyl-Aktivester-CTA wurde als roter Feststoff mit einer Ausbeute von 1,14 g (41 %; 0,0026 mol) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 1.99 (s, 3H, -CH₃); 2.52-2.60 (m, 1H, CH₂-C); 2.73-2.81 (m, 1H, CH₂-C); 3.03-3.09 (m, 2H, CH₂=CO-); 7.40-7.61 (m, 2H, *m*-Ar); 7.57-7.61 (tt, 1H, *p*-Ar); 7.92-7.94 (m, 2H, *o*-Ar).

¹⁹F-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = -163.08 bis -162.92 (m, 2H, *m*-Ar); -158.39 (t, 1H, *p*-Ar); -153.70 bis -153.60 (m, 2H, *o*-Ar).

5.4.2. 1-Azido-25-cyano-22-oxo-3,6,9,12,15,18,21-hepta- 24-azaheptacosan-28-yl-benzodithioat (Azid-CTA)

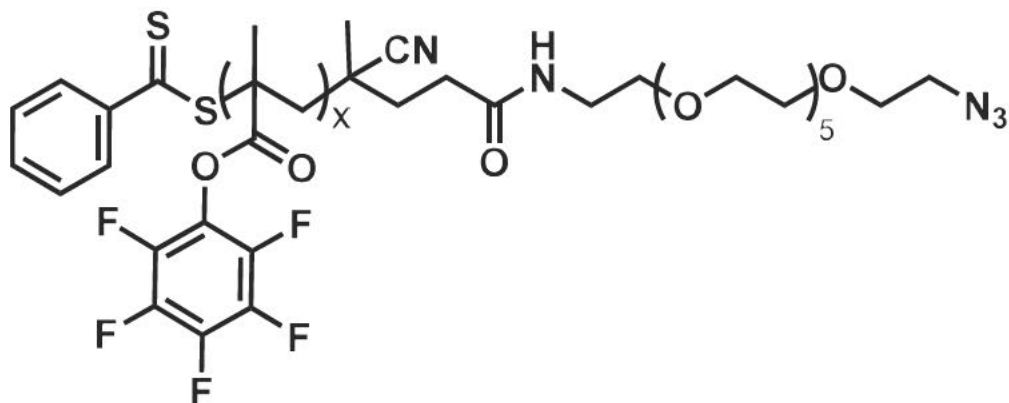


1,14 g des PFP-Aktivester-CTAs (2,56 mmol; 1 eq) wurde in einem Zweihalsrundkolben mit Dimrothkühler, Rührfisch und Septum in 50 ml absolutiertem THF unter Argon Atmosphäre vorgelegt. Anschließend wurden über das Septum 0,41 ml Triethylamin (2,94 mmol; 1,15 eq) und H₂N-PEG6-N₃ (1,97 mmol; 0,77 eq) dazugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel THF am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 150 ml DCM aufgenommen. Die organische Phase wurde drei Mal mit destilliertem Wasser und ein Mal mit gesättigter Natriumchloridlösung extrahiert und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel DCM wurde mittels Rotationsverdampfer entfernt. Der rote Rückstand wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel mit den Lösungsmitteln Ethylacetat : Methanol im Verhältnis 20:1 aufgereinigt. Der Azid-CTA wurde als roter Feststoff in Ausbeuten von 604,6 mg (39%; 0,001 mmol) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 1.97(s, 3H, -CH₃); 2.41-2.68 (m, 4H, NC-C-CH₂-CH₂-); 3.40 (t, 2H, CH₂-N₃); 3.47-3.51 (m, 2H, HN-CH₂); 3.59 (t, 2H, HN-CH₂-CH₂-O); 3.62-3.72 (m, 24 H; -O-CH₂, CH₂-O); 6,60 (s, 1H, -NH-); 7.42 (t, 2H, *m*-Ar); 7.56-7.61 (tt, 1H, *p*-Ar); 7.92-7.94 (m, 2H, *o*-Ar).

5.5. RAFT-Polymerisationen

5.5.1. Poly(Pentafluorophanylemethacrylat) P(PFPMA)



In einem Schlenkrohr wurden 27 mg des Azid-CTAs, 2,7 mg AMDVN und 4 g PFPMA in 6 ml absolutiertem 1,4-Dioxan vorgelegt. Um Feuchtigkeit und Sauerstoff aus dem Reaktionsgefäß zu entfernen, wurde das Reaktionsgemisch drei Mal sekuriert und danach für 48 Stunden im Ölbad bei 40°C gerührt. Das erhaltene Polymer wurde drei Mal in Hexan gefällt und anschließend über Nacht im Vakuumtrockenschrank bei Raumtemperatur getrocknet. Das Polymer wurde mit einer Ausbeute von 55% als rosafarbener Feststoff erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 1.24 - 1.76 (m, 3H, -CH₃); 2.05 - 2.67 (m, 2H, -CH₂); 3.32 - 3.73 (m, 30H; -CH₂-N₃; -HN-CH₂, -O-CH₂-); 7.32 - 7.46 (m, 2H, *m*-Ar); 7.49 - 7.61 (m; 1H, *p*-Ar); 7.78 - 7.98 (m, 2H, *o*-Ar).

¹⁹F-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = -163.27 (s, 2H, *m*-Ar); -158.06 (s, 1H, *p*-Ar); -153.84 bis -150.70 (m, 2H, *o*-Ar).

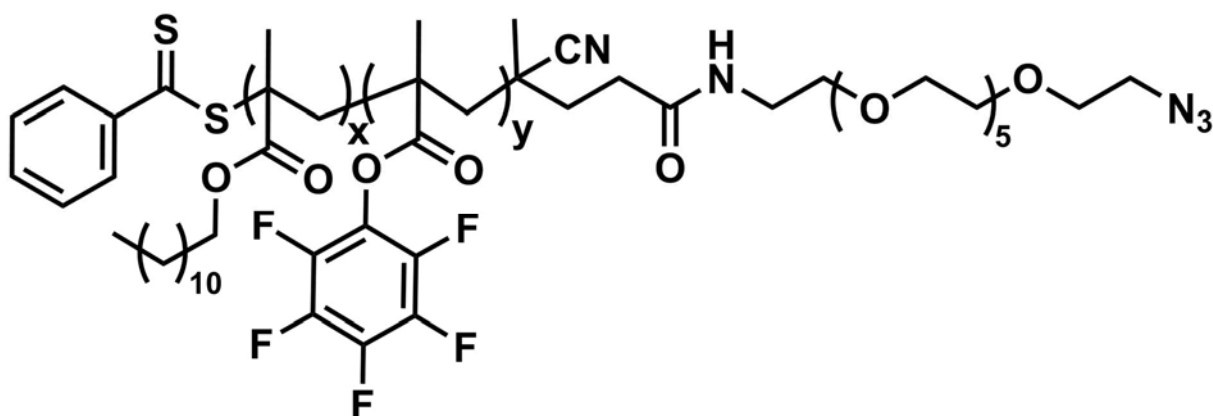
THF-GPC: M_n = 39800 g/mol, Đ = 1.47

Analog dazu wurde bei der Synthese der anderen Homopolymere verfahren, die Ansätze können Tabelle 23 entnommen werden.

Tabelle 23: Ansatzberechnung der P(PFPMA) Polymere

	X_n (soll)	$M_n(\text{soll})$ [g/mol]	n_{CTA} [mmol]	m_{CTA} [g]	n_{Monomer} [mmol]	m_{Monomer} [g]	$n_{\text{Initiator}}$ [mmol]	$m_{\text{Initiator}}$ [g]	Zeit
H1	30	8220	0,1322	0,087	3,9662	1,0	0,0264	0,008	4,5h
H2	31	8472	0,1266	0,083	3,7967	0,96	0,0253	0,008	4,0h
H3	30	8220	0,1322	0,087	3,9662	1,0	0,0264	0,008	4,0h
H4	30	8220	0,1322	0,087	3,9662	1,0	0,0264	0,008	4,0h
H5	25	6960	0,1111	0,073	2,7763	0,7	0,022	0,007	4,0h
H6	30	8220	0,1322	0,087	3,9662	1,0	0,0264	0,008	4,0h
H7	50	13260	0,0793	0,052	3,9662	1,0	0,0159	0,005	3,5h
H8	25	6960	0,1111	0,073	2,7763	0,7	0,022	0,007	3,5h
H1.1	180	45997	$4,4 \times 10^{-5}$	0,03	16	4	0,0088	0,0027	48 h
H1.2	60	15740	$1,3 \times 10^{-4}$	0,08	16	4	0,026	0,0081	48 h

5.5.2. $P(\text{PFPMA})_x\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_y$



Als Makro-CTA dienten die unter (5.5.1) hergestellten $P(\text{PFPMA})$ Polymere (H1 bis H2). In einem Schlenkrohr wurden 701 mg des Makro-CTAs (H1) in 1-2 ml absolutem 1,4-Dioxan gelöst. 2,19 g LMA wurden ebenfalls in 1ml Dioxan gelöst und in das Schlenkrohr über eine Kanüle gegeben. Es wurde eine Stammlösung des Initiators AMDVN in 1,4-Dioxan hergestellt. Die entsprechende Menge an dieser Lösung (0,0052 g AMDVN) wurde ebenfalls in das Schlenkrohr überführt. Um Feuchtigkeit und Sauerstoff aus dem Reaktionsgefäß zu entfernen, wurde das Reaktionsgemisch drei Mal sekuriert und danach für 4 Tage im Ölbad bei 42°C gerührt. Das erhaltene Polymer wurde drei Mal in kaltem Ethanol gefällt und anschließend über Nacht im Vakuumtrockenschrank bei Raumtemperatur getrocknet. Es wurde 2,1 g rosafarbenes Pulver erhalten.

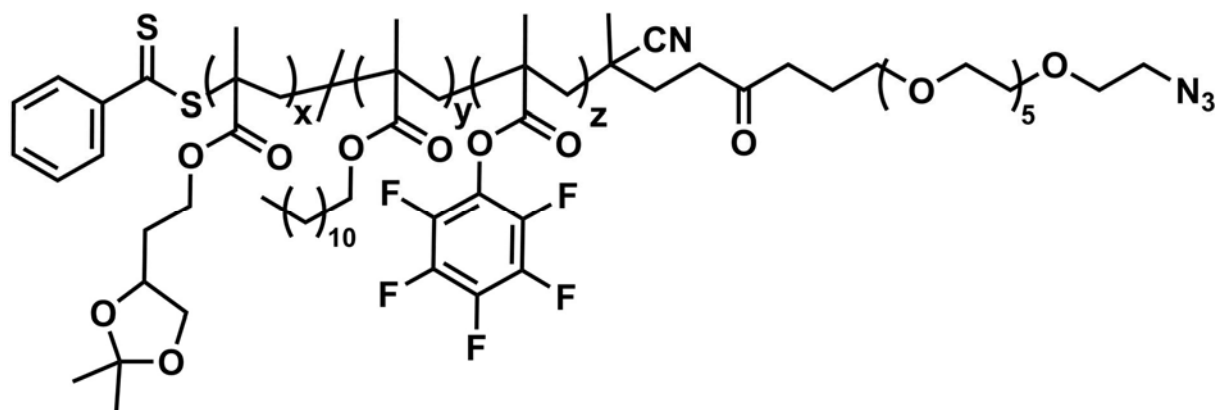
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 4.06 -3.80 (br, $-\text{O}-\text{CH}_2$ /LMA-Einheit), 3.72 – 3.59 (br, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$); 2.63 - 0.60 (br, $-\text{CH}_2-$ (Rückgrat PFPMA/LMA), $-\text{CH}_3$ (Rückgrat PFPMA/LMA))

THF-GPC: $M_n = 18832 \text{ g/mol}$, $\text{Đ} = 1.29$

Tabelle 24: P(PFPMA)_x-b-P(LMA)_y Polymere

	n _{Makro-CTA} [mmol]	n _{Monomer} [mmol]	n _{Initiator} [mmol]	Ausbeute [mg]
L1	0,0847	8,6420	0,0169	2001,0
L2	0,0236	1,7452	0,0047	310,53
L3	0,0187	1,8296	0,0037	272,22
L4	0,0294	2,2371	0,0059	378,24
L5	0,0247	1,4345	0,0049	137,30
L6	0,0259	1,7087	0,0052	198,40

5.5.3. P(DHPMA)_x-*b*-P(LMA_y-*stat*-DDEMA_z)



Als Makro-CTA dienten die unter (5.5.1) hergestellten P(PFPMA) Polymere (H1 bis H2). In einem Schlenkrohr wurden 700 mg des Makro-CTAs (H1) in 1-2 ml absolutiertem 1,4-Dioxan gelöst. 1,33 g LMA und 0,87 g DDEMA wurden ebenfalls in 1ml Dioxan gelöst und in das Schlenkrohr über eine Kanüle gegeben. Es wurde eine Stammlösung des Initiators AMDVN in 1,4-Dioxan hergestellt. Die entsprechende Menge an dieser Lösung (0,0052 g AMDVN) wurde ebenfalls in das Schlenkrohr überführt. Um Feuchtigkeit und Sauerstoff aus dem Reaktionsgefäß zu entfernen, wurde das Reaktionsgemisch drei Mal sekuriert und danach für 4 Tage im Ölbad bei 42°C gerührt. Das erhaltene Polymer wurde drei Mal in kaltem Ethanol gefällt und anschließend über Nacht im Vakuumtrockenschrank bei Raumtemperatur getrocknet. Es wurde 1,6 g rosafarbenes Pulver erhalten.

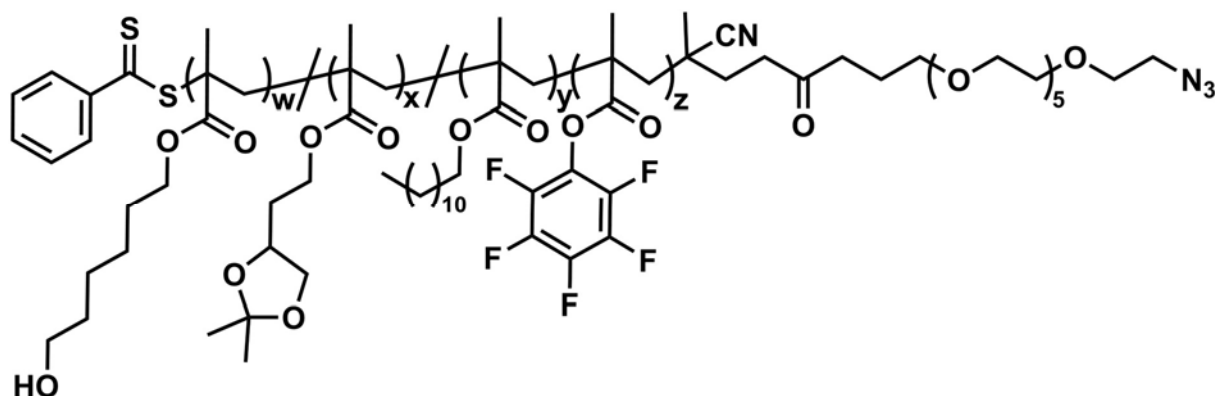
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 4.23 – 4.05 (br, -O-CH₂, -O-CH / DDEMA-Einheit), 4.03 -3.81 (br, -O-CH₂ /LMA-Einheit), 3.73 – 3.59 (br, O-CH₂-CH₂-); 2.74 - 0.66 (br, -CH₂- (Rückgrat PFPMA/LMA), -CH₃ (Rückgrat PFPMA/LMA))

THF-GPC: Mn = 14450 g/mol, Đ= 1.22

Tabelle 25: P(DHPMA)_x-b-P(LMA_y-stat-DDEMA_z) Polymere.

	n _{Makro-CTA} [mmol]	n _{LMA} [mmol]	n _{DDEMA} [mmol]	n _{Initiator} [mmol]	Ausbeute [mg]
D1	0,0847	5,2530	4,0668	0,0169	1006
D2	0,0259	1,1389	0,8801	0,0052	116,4
D3	0,0309	1,8527	1,3587	0,0062	616,3
D4	0,0260	1,1439	0,8839	0,0052	161,5

5.5.4. P(DHPMA)_x-b-P(LMA_y-stat-DDEMA_z-stat-HHMA_w)



Als Makro-CTA dienten die unter (5.5.1) hergestellten P(PFPMA) Polymere (H1 bis H2). In einem Schlenkrohr wurden 183 mg des Makro-CTAs (H6) in 1-2 ml absolutiertem 1,4-Dioxan gelöst. 331,8 mg LMA, 204,9 mg DDEMA und 24,3 mg wurden ebenfalls in 1ml Dioxan gelöst und in das Schlenkrohr über eine Kanüle gegeben. Es wurde eine Stammlösung des Initiators AMDVN in 1,4-Dioxan hergestellt. Die entsprechende Menge an dieser Lösung (1,34 mg AMDVN) wurde ebenfalls in das Schlenkrohr überführt. Um Feuchtigkeit und Sauerstoff aus dem Reaktionsgefäß zu entfernen, wurde das Reaktionsgemisch drei Mal sekuriert und danach für 4 Tage im Ölbad bei 42°C gerührt. Das erhaltene Polymer wurde drei Mal in kaltem Ethanol gefällt und anschließend über Nacht im Vakuumtrockenschrank bei Raumtemperatur getrocknet. Es wurden 115,1 mg rosafarbenes Pulver erhalten.

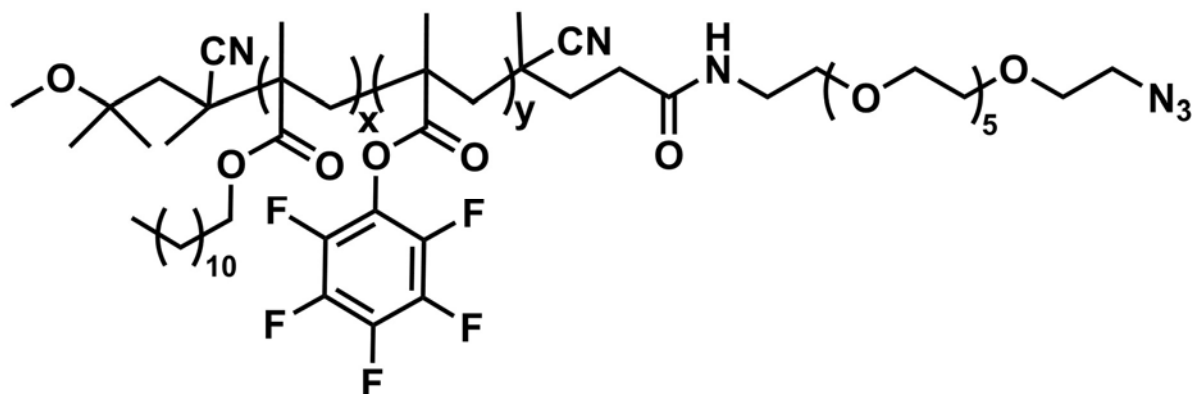
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm]: 4.42 – 4.02 (br, -O-CH₂, -O-CH / DDEMA-Einheit), 4.01 -3.78 (br, -O-CH₂ /LMA-Einheit), 3.77 – 3.58 (br, O-CH₂-CH₂-); 2.16 - 1.92 (br, -OH), 2.56 - 0.76 (br, -CH₂- (Rückgrat PFPMA/LMA), -CH₃ (Rückgrat PFPMA/LMA))

THF-GPC: Mn = 16130 g/mol, Đ= 1.23

Tabelle 26: P(DHPMA)_x-b-P(LMA_y-stat-DDEMA_z-stat-HHMA_w) Polymere.

	n _{Makro-CTA} [mmol]	n _{LMA} [mmol]	n _{DDEMA} [mmol]	n _{HHMA} [mmol]	n _{Initiator} [mmol]	Ausbeute [mg]
HH1	0,0847	5,2530	4,0668	0,5084	0,0169	1100
HH2	0,0273	1,6390	1,2019	1,6390	0,0055	312,77
HH3	0,0217	1,3040	0,9563	0,1304	0,0043	115,12

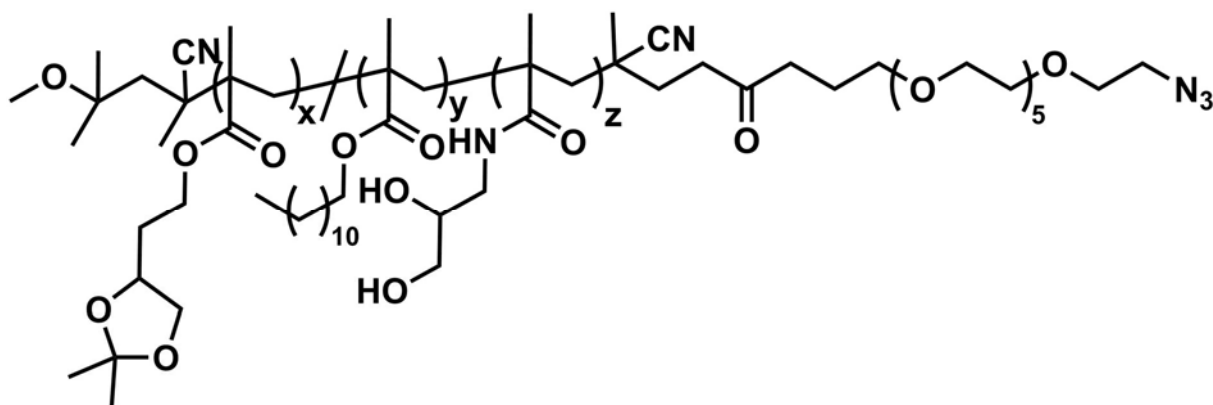
5.5.5. Entfernen der Dithioestergruppe



In einem Schlenkrohr wurden 311 mg (1eq) des Blockcopolymers L2 mit 244 mg (30 eq) AMDVN in 4 ml absolutiertem 1,4-Dioxan vorgelegt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Argonatmosphäre für drei Stunden im Ölbad bei 45°C gerührt. Die Reaktionslösung wurde drei Mal in Methanol gefällt und der Niederschlag anschließend über Nacht im Vakuumtrockenschrank bei Raumtemperatur getrocknet. Es wurden 168 mg farbloses Pulver erhalten.

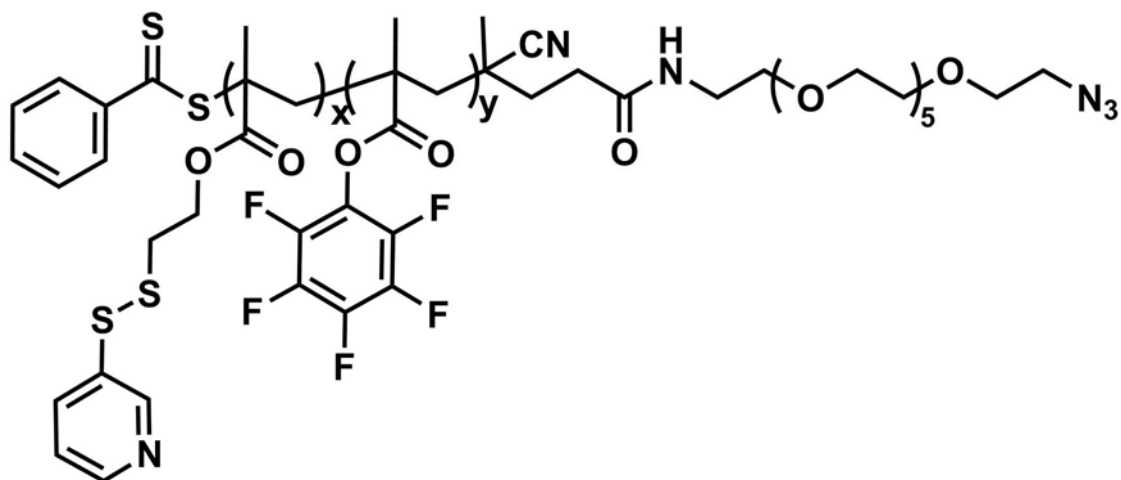
Die Substitution der Dithioestergruppe erfolgte mit den Polymerzusammensetzungen D1-4 und HH1-3 analog dazu.

5.5.6. Polymeranaloge Umsetzung der Polymere



158 mg des $P(\text{PFPMA})_{25}\text{-}b\text{-}P(\text{LMA})_{28}$ (L2) mit entfernter Dithioesterendgruppe (50 eq, 2,0 eq pro PFPMA-Einheit) wurde in 4 ml 1,4-Dioxan in einem Schlenkrohr gelöst. Es wurde 79 μl Triethylamin (50 eq, 2,0 eq pro PFPMA-Einheit) dazugegeben. In 1 ml DMSO wurden 52 mg 2-Hydroxypropylamin (50 eq, 2 eq pro PFPMA-Einheit) gelöst und in und in über eine Kanüle in das Schlenkrohr gegeben. Es wurde unter Argonatmosphäre über Nacht im Ölbad bei 40°C gerührt. Am nächsten Morgen erfolgte eine weitere Zugabe an 79 μl Triethylamin und 52 mg 2-Hydroxypropylamin in DMSO. Nach fünf Stunden wurde die Reaktion beendet. Über die ^{19}F -NMR Spektroskopie wurde der vollständige Umsatz der Reaktion überprüft. Die Reaktionslösung wurde in Diethylether gefällt, der Niederschlag in wenig DMSO gelöst und gegen MP-H₂O dialysiert und gefriertrocknet.

5.5.7. P(PFPMA)_x-b-P(PDSM)_y



Als Makro-CTA dienten die unter (5.5.1) hergestellten P(PFPMA) Polymere (H 1.1 und H 1.2). In einem Schlenkrohr wurden 500 mg des Makro-CTAs (H 1.2), 1,5 mg AMDVN und 0,37 g PDSM in 6 ml absolutiertem 1,4-Dioxan vorgelegt. Um Feuchtigkeit und Sauerstoff aus dem Reaktionsgefäß zu entfernen, wurde das Reaktionsgemisch drei Mal sekuriert und danach für 48 Stunden im Ölbad bei 40°C gerührt. Das erhaltene Polymer wurde drei Mal in Hexan gefällt und anschließend über Nacht im Vakuumtrockenschrank bei Raumtemperatur getrocknet. Das Polymer wurde mit einer Ausbeute von 61% (564 mg) als rosafarbener Feststoff erhalten.

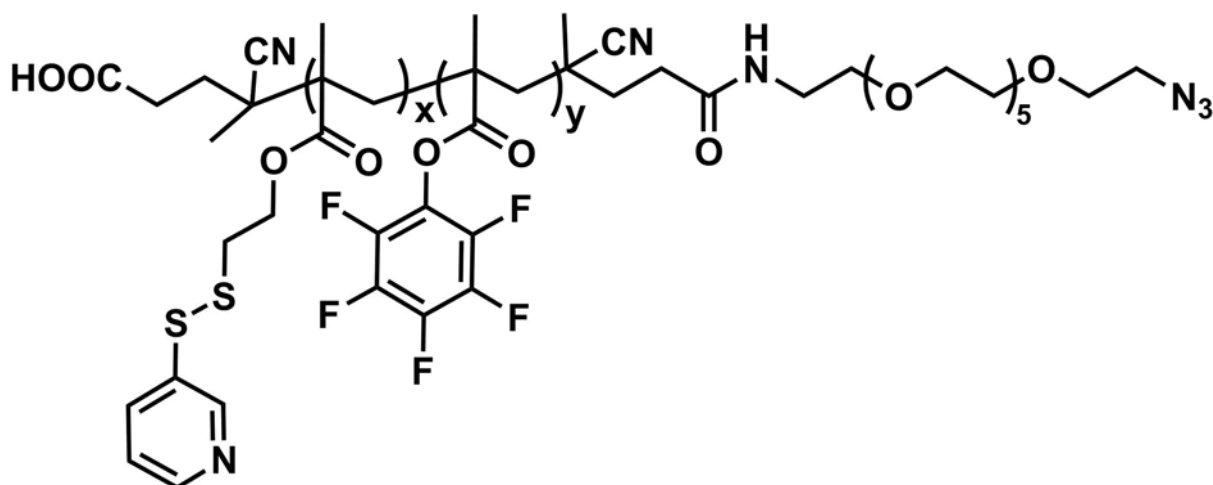
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.26-1.44 (m, 6H, -CH₃ PDSM/PFPMA); 2.03-2.42 (m, 4H, -CH₂, PDSM/PFPMA); 3.65-3.70 (m, 28H; -CH₂-N₃; -O-CH₂-)

THF GPC: M_n = 23800 g/mol, Đ = 1,24

Tabelle 27: Ansatzberechnung der P(PFPMA)_x-b-P(PDSM)_y Polymere

	X _n (soll)	M _{n(soll)} [g/mol]	n _{CTA} [mmol]	m _{CTA} [g]	n _{Monomer} [mol]	m _{Monomer} [g]	n _{Initiator} [mmol]	m _{Initiator} [g]	Zeit
P 1.1	30	46365	0,013	0,5	7,5 x 10 ⁻⁴	0,19	0,0025	7,7 x 10 ⁻⁴	48 h
P 2.1+	30	23400	0,024	0,5	1,5 x 10 ⁻³	0,37	0,0049	1,5 x 10 ⁻³	48 h

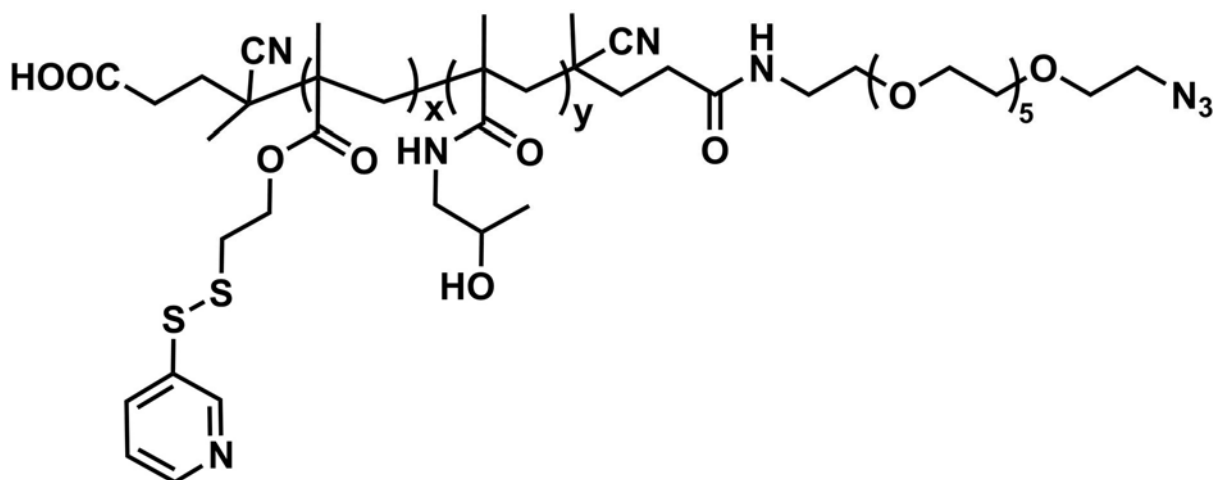
5.5.8. Entfernen der Dithioestergruppe der P(PFPMA)_x-b-P(PDSM)_y Polymere



In einem Schlenkrohr wurden 455 mg (1eq) des Blockcopolymers P 1.1 mit 108 mg (35 eq) ACVA in 4 ml absolutiertem 1,4-Dioxan vorgelegt. Das Reaktionsgemisch wurde unter Argonatmosphäre für drei Stunden im Ölbad bei 60°C gerührt. Die Reaktionslösung wurde drei Mal in Hexan gefällt und der Niederschlag anschließend über Nacht im Vakuumtrockenschrank bei Raumtemperatur getrocknet.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.28-1.59 (m, 6H, -CH₃ PDSM/PFPMA); 2.11-2.42 (m, 4H, -CH₂, PDSM/PFPMA); 3.67-3.73 (m, 28H, -CH₂-N₃; -O-CH₂-);

5.5.9. Polymeranaloge Umsetzung der PFPMA-Einheiten zu P(HPMA)



697,9 mg des P(PFPMA)₇₉-*b*-P(PDSM)₁₃ (P 1.2') mit entfernter Dithioesterendgruppe (60 eq, bezogen auf die Anzahl an PFPMA-Einheiten) wurde in 4 ml 1,4-Dioxan und 1 ml DMSO gelöst. Es wurde 835 µl Triethylamin (120 eq, 2,0 eq pro PFPMA-Einheit) und 362,52 µl 2-Hydroxypropylamin (156 eq, 2,6 eq pro PFPMA-Einheit) dazugegeben und unter Argonatmosphäre für 24 Stunden im Ölbad bei 40°C gerührt. Über die ¹⁹F-NMR Spektroskopie wurde der vollständige Umsatz der Reaktion überprüft. Die Reaktionslösung wurde in Diethylether gefällt, der Niederschlag in wenig DMSO gelöst und gegen MP-H₂O dialysiert und gefriertrocknet.

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 0.80 -1.23 (m, 9H, -CH₃); 1.47-2.01 (m, 4H, -CH₂); 2.80-3.04 (m, 2H, -S-CH₂); 3.51-3.67 (m, 28H, -CH₂-N₃; -O-CH₂- (PEG Einheit)); 4.14 (s, 2H, -O-CH₂-); 4.71 (s, 1H, -OH); 7.20-7.47 (m, 2H, *m*-Ar, HN-); 7.69-7.77 (m, 2H, *o*-Ar); 8.43 (s, 1H, *p*-Ar).

Tabelle 28: HFIP-GPC Messungen der Polymere

Polymer	Molekulargewicht M _n * [g/mol]	Đ	Zusammensetzungen**
HP5	23800	1.24	P(HPMA) ₇₉ - <i>b</i> -P(PDSM) ₁₃
HP7	53200	1.65	P(HPMA) ₁₅₆ - <i>b</i> -P(PDSM) ₅

6. Anhang

6.1. Literaturverzeichnis

1. Moad, G. & Solomon, D. H. *The Chemistry of Radical Polymerization. Book* (Elsevier, 2006).
2. Moad, G., Rizzardo, E. & Thang, S. H. Toward living radical polymerization. *Acc Chem Res* **41**, 1133–42 (2008).
3. Moad, G., Rizzardo, E. & Thang, S. H. Living Radical Polymerization by the RAFT Process – A Third Update. *Aust J Chem* **65**, 985 (2012).
4. Georges, M. K., Veregin, R. P. N., Kazmaier, P. M. & Hamer, G. K. Narrow molecular weight resins by a free-radical polymerization process. *Macromolecules* **26**, 2987–2988 (1993).
5. Braunecker, W. A. & Matyjaszewski, K. Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives. *Prog Polym Sci* **32**, 93–146 (2007).
6. Nicolas, J. *et al.* Nitroxide-mediated polymerization. *Prog Polym Sci* **38**, 63–235 (2013).
7. Wang, J.-S. & Matyjaszewski, K. Controlled/"living" radical polymerization. atom transfer radical polymerization in the presence of transition-metal complexes. *J Am Chem Soc* **117**, 5614–5615 (1995).
8. Chiefari, J. *et al.* Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process. *Macromolecules* **31**, 5559–5562 (1998).
9. Hawthorne, D. G., Moad, G., Rizzardo, E. & Thang, S. H. Living Radical Polymerization with Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer (RAFT): Direct ESR Observation of Intermediate Radicals. *Macromolecules* **32**, 5457–5459 (1999).
10. Tieke, B. *Makromolekulare Chemie*. (Wiley-VCH Verlag, 2014).
11. Moad, G., Rizzardo, E. & Thang, S. H. Living Radical Polymerization by the RAFT Process - A Second Update. *Aust J Chem* **62**, 1402 (2009).

12. Tappertzhofen, K. *et al.* Poly-L-Lysine-Poly[HPMA] Block Copolymers Obtained by RAFT Polymerization as Polyplex-Transfection Reagents with Minimal Toxicity. *Macromol Biosci* **15**, 1159–1173 (2015).
13. Eberhardt, M., Mruk, R., Zentel, R. & Théato, P. Synthesis of pentafluorophenyl(meth)acrylate polymers: New precursor polymers for the synthesis of multifunctional materials. *Eur Polym J* **41**, 1569–1575 (2005).
14. Stenzel, M. H. & Davis, T. P. Star polymer synthesis using trithiocarbonate functional β -cyclodextrin cores (reversible addition–fragmentation chain-transfer polymerization). *J Polym Sci A Polym Chem* **40**, 4498–4512 (2002).
15. Hong, C., You, Y., Liu, J. & Pan, C. Dendrimer-star polymer and block copolymer prepared by reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization with dendritic chain transfer agent. *J Polym Sci A Polym Chem* **43**, 6379–6393 (2005).
16. Krivorotova, T., Jonikaite-Svegziene, J., Radzevicius, P. & Makuska, R. Synthesis by RAFT polymerization and properties of anionic cylindrical molecular brushes bearing poly(acrylic acid) side chains. *React Funct Polym* **76**, 32–40 (2014).
17. Barz, M. *et al.* From Defined Reactive Diblock Copolymers to Functional HPMA-Based Self-Assembled Nanoaggregates. *Biomacromolecules* **9**, 3114–3118 (2008).
18. Gauthier, M. A., Gibson, M. I. & Klok, H. Synthesis of Functional Polymers by Post-Polymerization Modification. *Angew Chem, Int Ed* **48**, 48–58 (2009).
19. Batz, H., Franzmann, G. & Ringsdorf, H. Model Reactions for Synthesis of Pharmacologically Active Polymers by Way of Monomeric and Polymeric Reactive Esters. *Angew Chem, Int Engl* **11**, 1103–1104 (1972).
20. Théato, P. & Zentel, R. Formation of Lipid Bilayers on a New Amphiphilic Polymer Support. *Langmuir* **16**, 1801–1805 (2000).
21. Favier, A., D'Agosto, F., Charreyre, M.-T. & Pichot, C. Synthesis of N-acryloxysuccinimide copolymers by RAFT polymerization, as reactive building

- blocks with full control of composition and molecular weights. *Polymer (Guildf)* **45**, 7821–7830 (2004).
22. Theato, P. Synthesis of well-defined polymeric activated esters. *J Polym Sci A Polym Chem* **46**, 6677–6687 (2008).
 23. Mohr, N., Barz, M., Forst, R. & Zentel, R. A Deeper Insight into the Postpolymerization Modification of Polypenta Fluorophenyl Methacrylates to Poly(*N* -(2-Hydroxypropyl) Methacrylamide). *Macromol Rapid Commun* **35**, 1522–1527 (2014).
 24. Ulbrich, K. & Šubr, V. Structural and chemical aspects of HPMA copolymers as drug carriers☆. *Adv Drug Deliv Rev* **62**, 150–166 (2010).
 25. Scherer, M. *et al.* Pentafluorophenyl Ester-based Polymersomes as Nanosized Drug-Delivery Vehicles. *Macromol Rapid Commun* **37**, 60–66 (2016).
 26. Scherer, M. Polymersome für die medizinische Anwendung: Vesikel basierend auf Aktivester-Blockcopolymeren und Blockcopolypeptiden als Wirkstoffträger in der Nanomedizin. (Johannes Gutenberg Universität Mainz, Mainz, 2015).
 27. Bertozzi, C. R. A Decade of Bioorthogonal Chemistry. *Acc Chem Res* **44**, 651–653 (2011).
 28. Agrahari, A. K. *et al.* Cu(I)-Catalyzed Click Chemistry in Glycoscience and Their Diverse Applications. *Chem Rev* **121**, 7638–7956 (2021).
 29. Breugst, M. & Reissig, H. The Huisgen Reaction: Milestones of the 1,3-Dipolar Cycloaddition. *Angew Chem, Int Ed* **59**, 12293–12307 (2020).
 30. Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem, Int Ed* **40**, 2004–2021 (2001).
 31. Huisgen, Rolf., Mloston, Grzegorz. & Langhals, Elke. The first two-step 1,3-dipolar cycloadditions: non-stereospecificity. *J Am Chem Soc* **108**, 6401–6402 (1986).
 32. Tornøe, C. W., Christensen, C. & Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar

- Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J Org Chem* **67**, 3057–3064 (2002).
33. Rostovtsev, V. V *et al.* A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective TMLigation of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie* **114**, (2002).
 34. Meldal, M. & Tornøe, C. W. Cu-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *Chem Rev* **108**, 2952–3015 (2008).
 35. Agard, N. J., Prescher, J. A. & Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J Am Chem Soc* **126**, 15046–15047 (2004).
 36. Huisgen, R., Knorr, R., Möbius, L. & Szeimies, G. 1,3-Dipolare Cycloadditionen, XXIII. Einige Beobachtungen zur Addition organischer Azide an CC-Dreifachbindungen. *Chem Ber* **98**, 4014–4021 (1965).
 37. Sivakumar, K. *et al.* A Fluorogenic 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction of 3-Azidocoumarins and Acetylenes. *Org Lett* **6**, 4603–4606 (2004).
 38. Flemming, C. A. & Trevors, J. T. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water Air Soil Pollut* **44**, 143–158 (1989).
 39. Wittig, G. & Krebs, A. Zur Existenz niedergliedriger Cycloalkine, I. *Chem Ber* **94**, 3260–3275 (1961).
 40. Li, N. & Binder, W. H. Click-chemistry for nanoparticle-modification. *J Mater Chem* **21**, 16717 (2011).
 41. Yi, G., Son, J., Yoo, J., Park, C. & Koo, H. Application of click chemistry in nanoparticle modification and its targeted delivery. *Biomater Res* **22**, (2018).
 42. Shahin, M., Ahmed, S., Kaur, K. & Lavasanifar, A. Decoration of polymeric micelles with cancer-specific peptide ligands for active targeting of paclitaxel. *Biomaterials* **32**, 5123–5133 (2011).
 43. Ariga, K., Hill, J. P. & Ji, Q. Biomaterials and Biofunctionality in Layered Macromolecular Assemblies. *Macromol Biosci* **8**, 981–990 (2008).

44. Guo, P. The emerging field of RNA nanotechnology. *Nat Nanotechnol* **5**, 833–842 (2010).
45. Rogers, M. A. Naturally occurring nanoparticles in food. *Curr Opin Food Sci* **7**, 14–19 (2016).
46. Salentinig, S., Phan, S., Hawley, A. & Boyd, B. J. Self-Assembly Structure Formation during the Digestion of Human Breast Milk. *Angew Chem* **127**, 1620–1623 (2015).
47. Mai, Y. & Eisenberg, A. Self-assembly of block copolymers. *Chem Soc Rev* **41**, 5969 (2012).
48. Grzelczak, M., Vermant, J., Furst, E. M. & Liz-Marzán, L. M. Directed Self-Assembly of Nanoparticles. *ACS Nano* **4**, 3591–3605 (2010).
49. Li, M., Schnablegger, H. & Mann, S. Coupled synthesis and self-assembly of nanoparticles to give structures with controlled organization. *Nature* **402**, 393–395 (1999).
50. Kulkarni, C. Lipid Self-Assemblies and Nanostructured Emulsions for Cosmetic Formulations. *Cosmetics* **3**, 37 (2016).
51. Sung, J. C. *et al.* Formulation and Pharmacokinetics of Self-Assembled Rifampicin Nanoparticle Systems for Pulmonary Delivery. *Pharm Res* **26**, 1847–1855 (2009).
52. Du, Z. *et al.* Self-Assembled Egg Yolk Peptide Micellar Nanoparticles as a Versatile Emulsifier for Food-Grade Oil-in-Water Pickering Nanoemulsions. *J Agric Food Chem* **67**, 11728–11740 (2019).
53. Hartley, G. S. *Aqueous Solutions of Paraffin-Chain Salts: A Study in Micelle Formation*. (Paris: Hermann, 1936).
54. Ramanathan, M. *et al.* Amphiphile nanoarchitectonics: from basic physical chemistry to advanced applications. *Phys Chem Chem Phys* **15**, 10580 (2013).
55. Halperin, A. Polymeric Micelles: A Star Model. *Macromolecules* **20**, 2943–2946 (1987).

56. Israelachvili, J. N. *Intermolecular and Surface Forces. Intermolecular and Surface Forces: Third Edition* (Elsevier, 2011).
57. Vinson, P. K., Bellare, J. R., Davis, H. T., Miller, W. G. & Scriven, L. E. Direct imaging of surfactant micelles, vesicles, discs, and ripple phase structures by cryo-transmission electron microscopy. *J Colloid Interface Sci* **142**, 74–91 (1991).
58. Zhang, L. & Eisenberg, A. Multiple Morphologies of ‘Crew-Cut’ Aggregates of Polystyrene- *b* -poly(acrylic acid) Block Copolymers. *Science* (1979) **268**, 1728–1731 (1995).
59. Lin, W., Zheng, C., Wan, X., Liang, D. & Zhou, Q. Transition of Large Compound Micelles into Cylinders in Dilute Solution: Kinetic Study. *Macromolecules* **43**, 5405–5410 (2010).
60. Cao, H. *et al.* Synthesis and Self-Assembly of Brush-Rod Diblock Copolymers in the Mixed Solvent of THF/H₂O. *Macromol Rapid Commun* **28**, 1883–1888 (2007).
61. Southall, N. T., Dill, K. A. & Haymet, A. D. J. A View of the Hydrophobic Effect. *J Phys Chem B* **106**, 521–533 (2002).
62. Chandler, D. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature* **437**, 640–647 (2005).
63. Kahlweit, M. & Strey, R. Phase Behavior of Ternary Systems of the Type H₂O-Oil-Nonionic Amphiphile (Microemulsions). *Angew Chem, Int Ed Engl* **24**, 654–668 (1985).
64. Biswas, S., Kumari, P., Lakhani, P. M. & Ghosh, B. Recent advances in polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **83**, 184–202 (2016).
65. Kwon, G. S. & Kataoka, K. Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles. *Adv Drug Deliv Rev* **64**, 237–245 (2012).
66. Sun, X. *et al.* An Assessment of the Effects of Shell Cross-Linked Nanoparticle Size, Core Composition, and Surface PEGylation on in Vivo Biodistribution. *Biomacromolecules* **6**, 2541–2554 (2005).

67. Talelli, M., Rijcken, C. J. F., Hennink, W. E. & Lammers, T. Polymeric micelles for cancer therapy: 3 C's to enhance efficacy. *Curr Opin Solid State Mater Sci* **16**, 302–309 (2012).
68. Talelli, M. *et al.* Core-crosslinked polymeric micelles: Principles, preparation, biomedical applications and clinical translation. *Nano Today* **10**, 93–117 (2015).
69. Danson, S. *et al.* Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of pluronic polymer-bound doxorubicin (SP1049C) in patients with advanced cancer. *Br J Cancer* **90**, 2085–2091 (2004).
70. Shuai, X., Merdan, T., Schaper, A. K., Xi, F. & Kissel, T. Core-Cross-Linked Polymeric Micelles as Paclitaxel Carriers. *Bioconjug Chem* **15**, 441–448 (2004).
71. Matsumoto, S. *et al.* Environment-Responsive Block Copolymer Micelles with a Disulfide Cross-Linked Core for Enhanced siRNA Delivery. *Biomacromolecules* **10**, 119–127 (2009).
72. Meier, W. Polymer nanocapsules. *Chem Soc Rev* **29**, 295–303 (2000).
73. Bangham, A. D. & Horne, R. W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J Mol Biol* **8**, 660–IN10 (1964).
74. Torchilin, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 145–160 (2005).
75. Barenholz, Y. (Chezy). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J Control Release* **160**, 117–134 (2012).
76. Đorđević, S. *et al.* Current hurdles to the translation of nanomedicines from bench to the clinic. *Drug Deliv Transl Res* **12**, 500–525 (2022).
77. Sainz, V. *et al.* Regulatory aspects on nanomedicines. *Biochem Biophys Res Commun* **468**, 504–510 (2015).
78. Zhang, L., Yu, K. & Eisenberg, A. Ion-Induced Morphological Changes in “Crew-Cut” Aggregates of Amphiphilic Block Copolymers. *Science* (1979) **272**, 1777–1779 (1996).

79. Aranda-Espinoza, H., Bermudez, H., Bates, F. S. & Discher, D. E. Electromechanical Limits of Polymersomes. *Phys Rev Lett* **87**, 208301 (2001).
80. Lee, J. C.-M., Santore, M., Bates, F. S. & Discher, D. E. From Membranes to Melts, Rouse to Reptation: Diffusion in Polymersome versus Lipid Bilayers. *Macromolecules* **35**, 323–326 (2002).
81. Discher, D. E. & Ahmed, F. Polymersomes. *Annu Rev Biomed Eng* **8**, 323–341 (2006).
82. Matsen, M. W. & Schick, M. Self-assembly of block copolymers. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **1**, 329–336 (1996).
83. Bleul, R., Thiermann, R. & Maskos, M. Techniques To Control Polymersome Size. *Macromolecules* **48**, 7396–7409 (2015).
84. Pijpers, I. A. B. *et al.* Adaptive Polymersome and Micelle Morphologies in Anticancer Nanomedicine: From Design Rationale to Fabrication and Proof-of-Concept Studies. *Adv Ther (Weinh)* **1**, (2018).
85. Kim, M. *et al.* Development of a Polymersome-Based Nanomedicine for Chemotherapeutic and Sonodynamic Combination Therapy. *Int J Mol Sci* **24**, 1194 (2023).
86. Mohammadi, M., Ramezani, M., Abnous, K. & Alibolandi, M. Biocompatible polymersomes-based cancer theranostics: Towards multifunctional nanomedicine. *Int J Pharm* **519**, 287–303 (2017).
87. Al-Hatamleh, M. A. I. *et al.* COVID-19 infection and nanomedicine applications for development of vaccines and therapeutics: An overview and future perspectives based on polymersomes. *Eur J Pharmacol* **896**, 173930 (2021).
88. Andersson, B. European Science Foundation Policy Briefing 2. in *Nanomedicine* (Le Bischenberg, 2005).
89. Duncan, R. & Gaspar, R. Nanomedicine(s) under the Microscope. *Mol Pharm* **8**, 2101–2141 (2011).
90. Riehemann, K. *et al.* Nanomedicine—Challenge and Perspectives. *Angew Chem Int Ed* **48**, 872–897 (2009).

91. Svenson, S. Theranostics: Are We There Yet? *Mol Pharm* **10**, 848–856 (2013).
92. Ringsdorf, H. Structure and properties of pharmacologically active polymers. *J polym sci, C Polym symp* **51**, 135–153 (1975).
93. Ingle, R. G. & Fang, W.-J. An Overview of the Stability and Delivery Challenges of Commercial Nucleic Acid Therapeutics. *Pharmaceutics* **15**, 1158 (2023).
94. Harris, J. M. & Chess, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 214–221 (2003).
95. Vicent, M. J. *et al.* Polymer Therapeutics Designed for a Combination Therapy of Hormone-Dependent Cancer. *Angew Chem* **117**, 4129–4134 (2005).
96. Nishiyama, N. & Kataoka, K. Nanostructured Devices Based on Block Copolymer Assemblies for Drug Delivery: Designing Structures for Enhanced Drug Function. in *Polymer Therapeutics II* vol. 193 67–101 (Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 2006).
97. Wu, J. & Eisenberg, A. Proton Diffusion across Membranes of Vesicles of Poly(styrene-*b*-acrylic Acid) Diblock Copolymers. *J Am Chem Soc* **128**, 2880–2884 (2006).
98. Tros de Ilarduya, C., Sun, Y. & Düzgüneş, N. Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur J Pharm Sci* **40**, 159–170 (2010).
99. Du, X. *et al.* Comprehensive Evaluation of Lipid Nanoparticles and Polyplex Nanomicelles for Muscle-Targeted mRNA Delivery. *Pharmaceutics* **15**, 2291 (2023).
100. Lächelt, U. & Wagner, E. Nucleic Acid Therapeutics Using Polyplexes: A Journey of 50 Years (and Beyond). *Chem Rev* **115**, 11043–11078 (2015).
101. Kwon, G. S. & Kataoka, K. Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles. *Adv Drug Deliv Rev* **16**, 295–309 (1995).
102. Rösler, A., Vandermeulen, G. W. M. & Klok, H.-A. Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers. *Adv Drug Deliv Rev* **53**, 95–108 (2001).

103. Lipinski, C. A. & Discovery, M. Poor aqueous solubility-An industry wide problem in drug discovery. *Am Pharm Rev* **85** (2002).
104. Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K. & Farokhzad, O. C. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Mol Pharm* **5**, 505–515 (2008).
105. Hoshyar, N., Gray, S., Han, H. & Bao, G. The Effect of Nanoparticle Size on *In Vivo* Pharmacokinetics and Cellular Interaction. *Nanomedicine* **11**, 673–692 (2016).
106. Kim, J. O., Sahay, G., Kabanov, A. V. & Bronich, T. K. Polymeric Micelles with Ionic Cores Containing Biodegradable Cross-Links for Delivery of Chemotherapeutic Agents. *Biomacromolecules* **11**, 919–926 (2010).
107. Maeda, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv Enzyme Regul* **41**, 189–207 (2001).
108. Matsumura, Y. 35 years of discussions with Prof. Maeda on the EPR effect and future directions. *J Controlled Release* **348**, 966–969 (2022).
109. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
110. Maeda, H., Nakamura, H. & Fang, J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* **65**, 71–79 (2013).
111. Maeda, H. Polymer therapeutics and the EPR effect. *J Drug Target* **25**, 781–785 (2017).
112. Jain, R. K. Vascular and interstitial barriers to delivery of therapeutic agents in tumors. *Cancer Metastasis Rev* **9**, 253–266 (1990).
113. Nichols, J. W. & Bae, Y. H. EPR: Evidence and fallacy. *J Controlled Release* **190**, 451–464 (2014).
114. Longmire, M., Choyke, P. L. & Kobayashi, H. Clearance Properties of Nano-Sized Particles and Molecules as Imaging Agents: Considerations and Caveats. *Nanomedicine* **3**, 703–717 (2008).

115. Sun, T. *et al.* Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Angew Chem Int Ed* **53**, 12320–12364 (2014).
116. Yoo, J., Park, C., Yi, G., Lee, D. & Koo, H. Active Targeting Strategies Using Biological Ligands for Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Cancers (Basel)* **11**, 640 (2019).
117. Ahmad, A., Khan, F., Mishra, R. K. & Khan, R. Precision Cancer Nanotherapy: Evolving Role of Multifunctional Nanoparticles for Cancer Active Targeting. *J Med Chem* **62**, 10475–10496 (2019).
118. Béduneau, A., Saulnier, P. & Benoit, J.-P. Active targeting of brain tumors using nanocarriers. *Biomaterials* **28**, 4947–4967 (2007).
119. Alibakhshi, A. *et al.* Targeted cancer therapy through antibody fragments-decorated nanomedicines. *Journal of Controlled Release* **268**, 323–334 (2017).
120. Salahpour Anarjan, F. Active targeting drug delivery nanocarriers: Ligands. *Nano-Structures & Nano-Objects* **19**, 100370 (2019).
121. Aina, O. H., Sroka, T. C., Chen, M. & Lam, K. S. Therapeutic cancer targeting peptides. *Peptide Science* **66**, 184–199 (2002).
122. Genta, I. *et al.* GE11 Peptide as an Active Targeting Agent in Antitumor Therapy: A Minireview. *Pharmaceutics* **10**, 2 (2017).
123. Prencipe, F., Diaferia, C., Rossi, F., Ronga, L. & Tesauro, D. Forward Precision Medicine: Micelles for Active Targeting Driven by Peptides. *Molecules* **26**, 4049 (2021).
124. Golombek, S. K. *et al.* Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses. *Adv Drug Deliv Rev* **130**, 17–38 (2018).
125. Marcucci, F. & Lefoulon, F. Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress. *Drug Discov Today* **9**, 219–228 (2004).
126. Bertrand, N. & Leroux, J.-C. The journey of a drug-carrier in the body: An anatomo-physiological perspective. *J Controlled Release* **161**, 152–163 (2012).

127. Nel, A., Ruoslahti, E. & Meng, H. New Insights into “Permeability” as in the Enhanced Permeability and Retention Effect of Cancer Nanotherapeutics. *ACS Nano* **11**, 9567–9569 (2017).
128. Chauhan, V. P., Stylianopoulos, T., Boucher, Y. & Jain, R. K. Delivery of Molecular and Nanoscale Medicine to Tumors: Transport Barriers and Strategies. *Annu Rev Chem Biomol Eng* **2**, 281–298 (2011).
129. Diop-Frimpong, B., Chauhan, V. P., Krane, S., Boucher, Y. & Jain, R. K. Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **108**, 2909–2914 (2011).
130. Nagamitsu, A., Greish, K. & Maeda, H. Elevating Blood Pressure as a Strategy to Increase Tumor-targeted Delivery of Macromolecular Drug SMANCS: Cases of Advanced Solid Tumors. *Jpn J Clin Oncol* **39**, 756–766 (2009).
131. Li, C. J., Miyamoto, Y., Kojima, Y. & Maeda, H. Augmentation of tumour delivery of macromolecular drugs with reduced bone marrow delivery by elevating blood pressure. *Br J Cancer* **67**, 975–980 (1993).
132. Qiao, Y. *et al.* A Robust Approach to Enhance Tumor-selective Accumulation of Nanoparticles. *Oncotarget* **2**, 59–68 (2011).
133. Ojha, T. *et al.* Pharmacological and physical vessel modulation strategies to improve EPR-mediated drug targeting to tumors. *Adv Drug Deliv Rev* **119**, 44–60 (2017).
134. Kong, G., Braun, R. D. & Dewhirst, M. W. Hyperthermia Enables Tumor-specific Nanoparticle Delivery: Effect of Particle Size. *Cancer Res* **60**, 4440–4445 (2000).
135. Kong, G., Braun, R. D. & Dewhirst, M. W. Characterization of the Effect of Hyperthermia on Nanoparticle Extravasation from Tumor Vasculature. *Cancer Res* **61**, 3027–3032 (2001).
136. Mi, Y., Shao, Z., Vang, J., Kaidar-Person, O. & Wang, A. Z. Application of nanotechnology to cancer radiotherapy. *Cancer Nanotechnol* **7**, 11 (2016).
137. Lammers, T. *et al.* Image-guided and passively tumour-targeted polymeric nanomedicines for radiochemotherapy. *Br J Cancer* **99**, 900–910 (2008).

138. Koczera, P. *et al.* PBCA-based polymeric microbubbles for molecular imaging and drug delivery. *J Controlled Release* **259**, 128–135 (2017).
139. Güvener, N. *et al.* Recent advances in ultrasound-based diagnosis and therapy with micro- and nanometer-sized formulations. *Methods* **130**, 4–13 (2017).
140. Lammers, T. *et al.* Effect of radiotherapy and hyperthermia on the tumor accumulation of HPMA copolymer-based drug delivery systems. *J Controlled Release* **117**, 333–341 (2007).
141. Vasey, P. A. *et al.* Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of PK1 [N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymer Doxorubicin]: First Member of a New Class of Chemotherapeutic Agents-Drug-Polymer Conjugates 1. *Clin Cancer Res* **5**, 83–94 (1999).
142. Ronckers, C., Spix, C., Trübenbach, C. & Katalinic, A. *Krebs in Deutschland Für 2019/2020*. 14. Ausgabe.
https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/11438/krebs_in_deutschland_2023-1.pdf?sequence=1 (2023) doi:10.25646/11357.
143. Pelaz, B. *et al.* Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano* **11**, 2313–2381 (2017).
144. Cheng, Z., Li, M., Dey, R. & Chen, Y. Nanomaterials for cancer therapy: current progress and perspectives. *J Hematol Oncol* **14**, 85 (2021).
145. Duncan, R. Polymer therapeutics at a crossroads? Finding the path for improved translation in the twenty-first century. *J Drug Target* **25**, 759–780 (2017).
146. Chytil, P., Kostka, L. & Etrych, T. HPMA Copolymer-Based Nanomedicines in Controlled Drug Delivery. *J Pers Med* **11**, 115 (2021).
147. Bobde, Y., Biswas, S. & Ghosh, B. Current trends in the development of HPMA-based block copolymeric nanoparticles for their application in drug delivery. *Eur Polym J* **139**, 110018 (2020).
148. Krini, R. Polymer functionalized Nanoparticles and Smart Polymersomes for Medical Applications. (Johannes Gutenberg Universität Mainz, Mainz, 2017).

149. Packer, R. K. & Dunson, W. A. Effects of low environmental pH on blood pH and sodium balance of brook trout. *Journal of Experimental Zoology* **174**, 65–71 (1970).
150. Hemmelmann, M. *et al.* HPMa Based Amphiphilic Copolymers Mediate Central Nervous Effects of Domperidone. *Macromol Rapid Commun* **32**, 712–717 (2011).
151. Scherer, M. *et al.* Functionalization of Active Ester-Based Polymersomes for Enhanced Cell Uptake and Stimuli-Responsive Cargo Release. *Biomacromolecules* **17**, 3305–3317 (2016).
152. Eberhardt, M. & Théato, P. RAFT Polymerization of Pentafluorophenyl Methacrylate: Preparation of Reactive Linear Diblock Copolymers. *Macromol Rapid Commun* **26**, 1488–1493 (2005).
153. Nuhn, L., Kaps, L., Diken, M., Schuppan, D. & Zentel, R. Reductive Decationizable Block Copolymers for Stimuli-Responsive mRNA Delivery. *Macromol Rapid Commun* **37**, 924–933 (2016).
154. Hirsch, M., Ziroli, V., Helm, M. & Massing, U. Preparation of small amounts of sterile siRNA-liposomes with high entrapping efficiency by dual asymmetric centrifugation (DAC). *J Controlled Release* **135**, 80–88 (2009).
155. Habel, J. *et al.* Selecting analytical tools for characterization of polymersomes in aqueous solution. *RSC Adv* **5**, 79924–79946 (2015).
156. Carmen Fischer. Amphiphile Blockcopolymere zur Herstellung von Polymersomen. (Johannes Gutenberg Universität Mainz, Mainz, 2018).
157. Maksimenko, O. *et al.* Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development. *Int J Pharm* **572**, 118733 (2019).
158. Sun, M. *et al.* The influence of co-solvents on the stability and bioavailability of rapamycin formulated in self-microemulsifying drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm* **37**, 986–994 (2011).
159. Balkwill, F. TNF- α in promotion and progression of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **25**, 409–416 (2006).

160. Ghosh, S., Basu, S. & Thayumanavan, S. Simultaneous and Reversible Functionalization of Copolymers for Biological Applications. *Macromolecules* **39**, 5595–5597 (2006).
161. Liu, L. & Liu, P. Synthesis strategies for disulfide bond-containing polymer-based drug delivery system for reduction-responsive controlled release. *Front Mater Sci* **9**, 211–226 (2015).
162. Říhová, B. & Kovář, M. Immunogenicity and immunomodulatory properties of HPMA-based polymers☆. *Adv Drug Deliv Rev* **62**, 184–191 (2010).

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismus der RAFT-Polymerisation nach Rizzardo et al ⁸	3
Abbildung 2: Reaktivesterpolymere. Poly(N-hydroxysuccinimideacrylat) P(NHSA); Poly(N-Hydroxysuccinimidemethacrylat) P(NHSMA); Poly(Pentafluorphenylacrylat) P(PFPA); Poly(Pentafluorphenylmethacrylaten) P(PFPMA).	7
Abbildung 3: Kupfer katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition. " <i>c promoted [3+2] Azide-Alkyne Cycloaddition</i> " (SPAAC): Kupferfreie Azid-Alkin Cycloaddition getrieben von der Ringspannung. ³⁵	10
Abbildung 4: Mizellen Bildung überhalb der kritischen Mizellenkonzentration im Gleichgewicht mit den Unimeren.....	12
Abbildung 5: Morphologien von Amphiphilen und dazugehörige Krümmung, modifiziert nach ⁵⁴	14
Abbildung 6: Dynamisches Gleichgewicht zwischen Unimeren und Mizellen in Lösung.....	15
Abbildung 7: Vernetzung von Mizellen mittels Radikalischer Polymerisation, Bifunktionalen Vernetzern und Thiolgruppen.....	16
Abbildung 8: Polymere Thereapeutika nach dem Ringsdorf Modell.	19
Abbildung 9: Transport von Nanopartikeln in verschiedenen Größen und Wirkstoffmolekülen durch normales Gewebe (links) und Tumor Gewebe (rechts) zur Demonstrierung des EPR Effekts (<i>enhanced permeability and retention</i>). ¹¹⁵	21
Abbildung 10: pH-Abbau Studie eines Polymers der Zusammensetzung P(DHPMA)- <i>b</i> -P(LMA- <i>stat</i> -DDEMA). ¹⁴⁸	27
Abbildung 11: pH-Abbau Studie eines Polymers der Zusammensetzung P(DHPMA)- <i>b</i> -P(LMA- <i>stat</i> -DDEMA- <i>stat</i> -HHMA). ¹⁴⁸	27
Abbildung 12: Syntheschema der DHPMA basierten Polymere.	29
Abbildung 13: Synthese von Pentafluorphenylmethacrylat.....	30
Abbildung 14: ¹⁹ F-NMR von Pentafluorphenylmethacrylat (CDCl ₃ , 400 MHz).	30
Abbildung 15: ¹ H-NMR Pentafluorphenylmethacrylat (CDCl ₃ , 400 MHz).....	31
Abbildung 16: Synthese von 2-(2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethylmethacrylat (DDEMA).	32

Abbildung 17: ^1H -NMR Spektrum von 2-(2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethylmethacrylat (DDEMA) (CDCl_3 , 400 MHz).	32
Abbildung 18: Synthese des Hydroxyhexylmethacrylat (HHMA).	33
Abbildung 19: ^1H -NMR Spektrum von Hydroxyhexylmethacrylat (HHMA) (CDCl_3 , 400 MHz).	33
Abbildung 20: Synthese des Pentafluorphenyl-CTA/ PFP-CTA (4-Cyano-4- ((thiobenzoyl)-sulfanyl)-pentansäure-pentafluorphenylester).	34
Abbildung 21: ^1H -NMR Spektrum des Pentafluorphenyl-CTAs (4-Cyano-4- ((thiobenzoyl)-sulfanyl)-pentansäure-pentafluorphenylester) (CDCl_3 , 400 MHz)	35
Abbildung 22: ^{19}F -NMR Spektrum des Pentafluorphenyl-CTAs (4-Cyano-4-((thiobenzoyl)-sulfanyl)-pentansäure-pentafluorphenylester) (CDCl_3 , 400 MHz).	35
Abbildung 23: Synthese des Azid-CTAs (1-Azido-25-cyano-22-oxo- 3,6,9,12,15,18,21-hepta-oxa-24-azaheptacosan-28-yl-benzodithioat).	36
Abbildung 24: ^1H -NMR Spektrum des Azid-CTAs (1-Azido-25-cyano-22-oxo- 3,6,9,12,15,18,21-hepta-oxa-24-azaheptacosan-28-yl-benzodithioat (CDCl_3 , 400 MHz).	36
Abbildung 25: RAFT-Polymerisation von $\text{P}(\text{PFPMA})_x$.	38
Abbildung 26: ^{19}F -NMR Spektrum als Umsatzkontrolle der Reaktionslösung von $\text{P}(\text{PFPMA})_{27}$ (H5) zur Bestimmung des Umsatzes der Polymerisation, (CDCl_3 , 400 MHz).	39
Abbildung 27: Elugramm der THF-GPC von $\text{P}(\text{PFPMA})_{25}$ (H2).	41
Abbildung 28: ^{19}F -NMR Spektrum von $\text{P}(\text{PFPMA})_{23}$ (H8), (CDCl_3 , 400 MHz).	41
Abbildung 29: ^1H -NMR Spektrum vom Polymer $\text{P}(\text{PFPMA})_{23}$ (H8), (CDCl_3 , 400 MHz).	42
Abbildung 30: Polymerisation von $\text{P}(\text{PFPMA})_x$ - <i>b</i> - $\text{P}(\text{LMA})_y$.	43
Abbildung 31: Elugramm der THF-GPC des Diblockpolymers	44
Abbildung 32: ^1H -NMR Spektrum von $\text{P}(\text{PFPMA})_{27}$ - <i>b</i> - $\text{P}(\text{LMA})_{27}$ (L4), (CDCl_3 , 400 MHz).	44
Abbildung 33: Polymerisation von $\text{P}(\text{PFPMA})_x$ - <i>b</i> - $\text{P}(\text{LMA}_y$ - <i>stat</i> -DDEMA _z).	46
Abbildung 34: THF-GPC von $\text{P}(\text{PFPMA})_{27}$ - <i>b</i> - $\text{P}(\text{LMA}_{21}$ - <i>stat</i> -DDEMA ₈) (D4).	47

Abbildung 35: ^1H -NMR Spektrum von $\text{P}(\text{PFPMA})_{27}\text{-}b\text{-P}(\text{LMA}_{21}\text{-}stat\text{-DDEMA}_8)$ (D4), (CDCl_3 , 400 MHz).....	47
Abbildung 36: Polymerisation von $\text{P}(\text{PFPMA})_x\text{-}b\text{-P}(\text{LMA}_y\text{-}stat\text{-DDEMA}_z\text{-}stat\text{-HHMA}_w)$	50
Abbildung 37: ^1H -NMR-Spektrum von $\text{P}(\text{PFPMA})_x\text{-}b\text{-P}(\text{LMA}_y\text{-}stat\text{-DDEMA}_z\text{-}stat\text{-HHMA}_w)$ (HH3) (CDCl_3 , 400 MHz).....	51
Abbildung 38: THF GPC von $\text{P}(\text{PFPMA})_{35}\text{-}b\text{-P}(\text{LMA}_{49}\text{-}stat\text{-DDEMA}_{17}\text{-}stat\text{-HHMA}_3)$ (HH1).....	53
Abbildung 39: Abspaltung der Dithiobenzoatgruppe.....	54
Abbildung 40: Polymeranaloge Reaktion von PFPMA zu DHPMA.....	55
Abbildung 41: Polymeranaloge Reaktion von PFPMA zu DHPMA.....	56
Abbildung 42: ^{19}F -NMR Spektrum der Aminolyse von PFPMA zu DHPMA. A) ^{19}F - NMR des Polymers $\text{P}(\text{PFPMA})_{25}\text{-}b\text{-P}(\text{LMA}_{16}\text{-}stat\text{-DDEMA}_6)_x$ (D2). B) ^{19}F -NMR der Reaktionslösung von $\text{P}(\text{DHPMA})_{25}\text{-}b\text{-P}(\text{LMA}_{16}\text{-}stat\text{-DDEMA}_6)$ zeigt die fertige Umsetzung unter Abspaltung des freien Pentafluorphenols. (CDCl_3 , 400 MHz).	58
Abbildung 43: HFIP-GPC von $\text{P}(\text{DHPMA})_{25}\text{-}b\text{-P}(\text{LMA}_{16}\text{-}stat\text{-DDEMA}_6)$ (DD2).	59
Abbildung 44: Polymeranaloge Reaktion von PFPMA zu DHPMA.....	60
Abbildung 45: HFIP-GPC von $\text{P}(\text{DHPMA})_{25}\text{-}b\text{-P}(\text{LMA}_{19}\text{-}stat\text{-DDEMA}_7\text{-}stat\text{-HHMA}_3)$ (DH2).....	61
Abbildung 46: Schematische Darstellung der Funktion einer dualen asymmetrischen Zentrifuge.	62
Abbildung 47: HPLC-Elugramm von $\text{P}(\text{DHPMA})_{23}\text{-}b\text{-P}(\text{LMA})_{21}$ (DL5) in Wasser bei einer Absorption von $\lambda = 494$ nm. Gesammelt wurde die Fraktion von 0,55 bis 1,35 min, damit erfolgten die weiteren Experimente.....	65
Abbildung 48: HPLC-Elugramm von $\text{P}(\text{DHPMA})_{25}\text{-}b\text{-P}(\text{LMA}_{16}\text{-}stat\text{-DDEMA}_6)$ (DD2) in Wasser bei einer Absorption von $\lambda = 494$ nm. Gesammelt wurde die Fraktion von 0,55 bis 1,35 min, damit erfolgten die weiteren Experimente.	66
Abbildung 49: HPLC-Elugramm von $\text{P}(\text{DHPMA})_{27}\text{-}b\text{-P}(\text{LMA}_{24}\text{-}stat\text{-DDEMA}_8\text{-}stat\text{-HHMA}_3)$ (DH3) in Wasser bei einer Absorption von $\lambda = 494$ nm. Gesammelt wurde die Fraktion von 0,55 bis 1,35 min, damit erfolgten die weiteren Experimente.	66

Abbildung 50: HPLC-Elugramm von P(DHPMA) ₂₃ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₁ (DL5) beladen mit TNF alpha in Wasser bei einer Absorption von $\lambda = 494$ nm. Gesammelt wurde die Fraktion von 0,55 bis 1,35 min, damit erfolgten die weiteren Experimente.....	67
Abbildung 51: HPLC-Elugramm von P(DHPMA) ₂₅ - <i>b</i> -P(LMA ₁₆ - <i>stat</i> -DDEMA ₆) (DD2) über Azid-Kupplung Biotin und AF647 in Wasser bei einer Absorption von $\lambda = 494$ nm. Gesammelt wurde die Fraktion von 0,5 bis 1,3 min, damit erfolgten die weiteren Experimente.....	68
Abbildung 52: HPLC-Elugramm von P(DHPMA) ₂₅ - <i>b</i> -P(LMA ₁₆ - <i>stat</i> -DDEMA ₆) (DD2) mit siRNA in Wasser bei einer Absorption von $\lambda = 494$ nm. Gesammelt wurde die Fraktion von 0,55 bis 1,35 min, damit erfolgten die weiteren Experimente.....	68
Abbildung 53: HPLC-Elugramm von P(DHPMA) ₂₇ - <i>b</i> -P(LMA ₂₁ - <i>stat</i> -DDEMA ₈) (DD4) in Wasser bei einer Absorption von $\lambda = 555$ nm. Gesammelt wurde die Fraktion von 0,55 bis 1,35 min, damit erfolgten die weiteren Experimente.	69
Abbildung 54: HPLC-Elugramm von P(DHPMA) ₂₇ - <i>b</i> -P(LMA ₂₁ - <i>stat</i> -DDEMA ₈) (DD4) mit Doxorubicin in Wasser bei einer Absorption von $\lambda = 555$ nm. Gesammelt wurde die Fraktion von 0,55 bis 1,35 min, damit erfolgten die weiteren Experimente.	70
Abbildung 55: Zetasizer Messungen der Polymersome nach HPLC Aufreinigung. ..	71
Abbildung 56: TEM-Aufnahmen der Partikel P(DHPMA) ₄₆ - <i>b</i> -P(LMA) ₃₁ , Negative staining mit 1% Uranylacetat.	73
Abbildung 57: TEM-Aufnahme der Partikel P(DHPMA) ₃₀ - <i>b</i> -P(LMA ₁₆ - <i>stat</i> -DDEMA ₂₀) Negative staining mit 1% Uranylacetat.	74
Abbildung 58: Struktur von Doxorubicin.	75
Abbildung 59: Konzentrationskurve von Doxorubicin.	77
Abbildung 60: Doxorubicin Aufnahme in MaMel-19 Zellen mittels FACS Messung..	80
Abbildung 61: Fluoreszenz-Aufnahmen am EVOS Flouid Bildgebungssystem, überlagert bei 593 nm von MaMel-19 Sphäroid Zellen bei zweimaliger behandlung mit freiem Doxorubicin und den Doxorubicin beladenen Polymersomen (P(DHPMA) ₂₅ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₈ (DL2), P(DHPMA) ₂₇ - <i>b</i> -P(LMA ₂₁ - <i>stat</i> -DDEMA ₈) (DD4) und P(DHPMA) ₂₇ - <i>b</i> -P(LMA ₂₄ - <i>stat</i> -DDEMA ₈ - <i>stat</i> -HHMA ₃) (DH3). Messbalken = 1000 μ m.	82
Abbildung 62: Fluoreszenzmikroskop Aufnahmen von MaMel-19 Sphäroid Zellen nach Zugabe von Doxorubicin in den Konzentrationen 0,02 μ M und 2 μ M und	

der Polymersom-Lösungen DL2, DD4 und DH3. Der Versuch wurde mit 2000 ausplattierten Zellen pro Well durchgeführt.	83
Abbildung 63: Vermessung des dichten Teils der Sphäroide vor und nach Behandlung durch Doxorubicin.	84
Abbildung 64: Strukturformel von Rapamycin.	86
Abbildung 65: Konzentrationskurve von Rapamycin mittels analytischer HPLC.	87
Abbildung 66: Luciferase Assay: Fluoreszenzmessungen Polymersome P(DHPMA) ₃₅ - <i>b</i> -P(LMA ₅₁ - <i>stat</i> -DDEMA ₂₀) (DD1), P(DHPMA) ₂₅ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₈ (DL2) und P(DHPMA) ₂₅ - <i>b</i> -P(LMA ₁₆ - <i>stat</i> -DDEMA ₆) (DD2).	89
Abbildung 67: MTT-Assay der Polymersome P(DHPMA) ₃₅ - <i>b</i> -P(LMA ₅₁ - <i>stat</i> -DDEMA ₂₀) (DD1), P(DHPMA) ₂₅ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₈ (DL2) und P(DHPMA) ₂₅ - <i>b</i> -P(LMA ₁₆ - <i>stat</i> - DDEMA ₆) (DD2).	90
Abbildung 68: Körperverteilung der mit Cw800 fluoreszenzmarkierten Polymersome P1, P2 und P3 im Mausversuch.	93
Abbildung 69: Organverteilung der Polymersome P(DHPMA) ₃₀ - <i>b</i> -P(LMA) ₃₂ (P1), P(DHPMA) ₃₀ - <i>b</i> -P(LMA ₁₀ - <i>stat</i> -DDEMA ₈) (P2) und P(DHPMA) ₃₀ - <i>b</i> -P(LMA ₂₁ - <i>stat</i> - DDEMA ₁₇ - <i>stat</i> -HHMA ₂) (P3).	94
Abbildung 70: FCS Messung von dem freien Farbstoff Cw800 (rot) und dem mit Cw800 funktionalisierten Partikel (grün).	96
Abbildung 71: FCS Messung der siRNA beladenen Partikel.	97
Abbildung 72: DLS-Messungen der mit Biotin und Alexa Fluor 647 funktionalisierten Polymersome der Zusammensetzung P(DHPMA) ₂₅ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₈	99
Abbildung 73: Die Fluoreszenz im Verhältnis von Biotin-Polymersomen zu unfunktionalisierten Polymersomen P(DHPMA) ₂₅ - <i>b</i> -P(LMA) ₂₈ (DL2).	100
Abbildung 74: Schematischer Aufbau der P(HPMA) _x -P(PDSM) _y Mizellen.	101
Abbildung 75: Schematische Darstellung der Mizellen mittels Dialyse und dualer Asymmetrischer Zentrifuge.	102
Abbildung 76: Zweistufige Synthes von PDSM.	103
Abbildung 77: ¹ H-NMR von Methacrylsäure-2-(2-pyridyldisulfid)ethylester (PDSM), (CDCl ₃ , 400 MHz).	104
Abbildung 78: RAFT-Polymerisation von P(PFPMA).	105
Abbildung 79: RAFT-Polymerisation von P(PFPMA) _x - <i>b</i> -P(PDSM) _y	106

Abbildung 80: ^1H -NMR Spektrum der Reaktionslösung zur Umsatzbestimmung des Diblocks $\text{P}(\text{PFPMA})_{79}\text{-b-P}(\text{PDSM})_y$ (P 2.1), (CDCl_3 , 400 MHz).	106
Abbildung 81: Elugramm der THF-GPC des Diblockpolymers $\text{P}(\text{PFPMA})_{79}\text{-b-P}(\text{PDSM})_{30}$ (P2.1).	108
Abbildung 82: DOSY-NMR Spektrum des Diblocks $\text{P}(\text{PFPMA})_{156}\text{-b-P}(\text{PDSM})_5$ (P1.1).	110
Abbildung 83: Reaktion zum Entfernen der Dithiobenzoatgruppe mit ACVA.....	111
Abbildung 84: Exemplarisches UV-Vis Spektrum des Polymers $\text{P}(\text{PFPMA})_{79}$ (H2.1) vor und nach entfernen der Dithiobenzoatendgruppe.	112
Abbildung 85: Elugramm der THF-GPC des Diblockpolymers $\text{P}(\text{PFPMA})_{156}\text{-b-P}(\text{PDSM})_5$ (P1.1).	112
Abbildung 86: Polymeranaloge Umsetzung des PFPMA-Diblocks zum $\text{P}(\text{HPMA})$ Polymer mit HPA.	113
Abbildung 87: HFIP-GPC von $\text{P}(\text{HPMA})_{79}\text{-b-P}(\text{PDSM})_{13}$ (HP5).	113
Abbildung 88: ^1H -NMR Spektrum von $\text{P}(\text{HPMA})_{79}\text{-b-P}(\text{PDSM})_{13}$ (HP5) in DMSO-d^6 (CDCl_3 , 400 MHz).	115
Abbildung 89: Polymeranaloge Umsetzung mit HPA und Alexa Fluor 647.....	116
Abbildung 90: Bildung der Aggregate durch <i>solvent switch</i> (Lösungsmittelaustausch).	117
Abbildung 91: Titrationskurve von Wasserzugabe in DMSO, Zahlrate (Partikelzahl) über Zetasizer gemessen.	118
Abbildung 92: DLS-Messungen der mittels Dialyse gegen Millipore Wasser gebildeten Mizellen der Polymere : $\text{P}(\text{HPMA})_{52}\text{-b-P}(\text{PDSM})_3$ (HP1), $\text{P}(\text{HPMA})_{62}\text{-b-P}(\text{PDSM})_5$ (HP3), $\text{P}(\text{HPMA})_{79}\text{-b-P}(\text{PDSM})_{13}$ (HP5), $\text{P}(\text{HPMA})_{156}\text{-b-P}(\text{PDSM})_5$ (HP7); Messung nach Filtration durch einen 200 nm WWPTFE Filter : $\text{P}(\text{HPMA})_{62}\text{-b-P}(\text{PDSM})_8$ (HP4), $\text{P}(\text{HPMA})_{79}\text{-b-P}(\text{PDSM})_7$ (HP6).	119
Abbildung 93: Schema Mizellenbildung mit dualer asymmetrischer Zentrifuge.	120
Abbildung 94: DLS-Messungen der mittels dualer Zentrifuge gebildeten Mizellen der Polymere: $\text{P}(\text{HPMA})_{52}\text{-b-P}(\text{PDSM})_3$ (HP1), $\text{P}(\text{HPMA})_{62}\text{-b-P}(\text{PDSM})_5$ (HP3), $\text{P}(\text{HPMA})_{79}\text{-b-P}(\text{PDSM})_{13}$ (HP5), $\text{P}(\text{HPMA})_{156}\text{-b-P}(\text{PDSM})_5$ (HP7); Messung nach Filtration durch einen 200 nm WWPTFE Filter : $\text{P}(\text{HPMA})_{52}\text{-b-P}(\text{PDSM})_8$ (HP2), $\text{P}(\text{HPMA})_{62}\text{-b-P}(\text{PDSM})_8$ (HP4), $\text{P}(\text{HPMA})_{79}\text{-b-P}(\text{PDSM})_7$ (HP6).	121
Abbildung 95: Vernetzung der Blockcopolymere mit Hexandithiol.....	123

Abbildung 96: UV-Vis Spektrum des Partikels $P(\text{HPMA})_{79}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_{13}$ (HP5) vor Vernetzung in DMSO und des Vernetzen Partikels $P(\text{HPMA})_{79}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_{13}$ (HP5) nach Vernetzung mit Hexandithiol in Wasser.....	124
Abbildung 97: DLS-Messeungen der mit Hexandithiol vernetzen Aggregate HP2 $P(\text{HPMA})_{52}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_8$, HP4 $P(\text{HPMA})_{62}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_8$ und HP6 $P(\text{HPMA})_{79}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_7$ nach Gefriertrocknung und Zugabe von Wasser.....	127
Abbildung 98: DLS-Messungen der vernetzen Mizellen der Polymerzusammensetzungen $P(\text{HPMA})_{79}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_{13}$ (HP5) und (HP7) in Wasser nach Herstellung und nach einer Lagerzeit von 11 Wochen bei 3°C in Wasser.	129
Abbildung 99: Schema Beladung der Mizellen mit Farbstoff mittels dualer asymmetrischer Zentrifuge	130
Abbildung 100: DLS-Messungen der mit Nile Red beladenen und über Hexandithiol vernetze Partikel der Zusammensetzungen $P(\text{HPMA})_{62}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_8$ (HP4), $P(\text{HPMA})_{79}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_{13}$ (HP5) und $P(\text{HPMA})_{79}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_7$ (HP6).	131
Abbildung 101: UV-Vis-Spektrum der Polymerlösung aus mit Nile Red beladenen und über Hexandithiol vernetze Partikel der Zusammensetzungen $P(\text{HPMA})_{62}\text{-}b\text{-}P(\text{PDMS})_8$ (HP4) in Wasser.	132

6.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: P(PFPMA) _x Homopolymere	40
Tabelle 2: P(PFPMA) _x - <i>b</i> -P(LMA) _y Diblock Polymere mit Molekulargewichten und Polydispersitäten	43
Tabelle 3: P(PFPMA) _x - <i>b</i> -P(LMA _y - <i>stat</i> -DDEMA _z) Copolymere mit Molekulargewichten und Polydispersitäten.	49
Tabelle 4: Polymerzusammensetzung.....	53
Tabelle 5: Polymere der Zusammensetzung P(DHPMA) _x - <i>b</i> -P(LMA) _y	55
Tabelle 6: Polymere der Zusammensetzung P(DHPMA) _x - <i>b</i> -P(LMA _y - <i>stat</i> -DDEMA _z)	57
Tabelle 7: Polymere der Zusammensetzung P(DHPMA) _x - <i>b</i> -P(LMA _y - <i>stat</i> -DDEMA _z - <i>stat</i> -HHMA _w).	60
Tabelle 8: Hydrodynamischer Durchmesser der erhaltenen Polymersome gemessen am Zetasizer vom Malvern Panalytical.	72
Tabelle 9: Berechnete Konzentrationen der Polymersomlösungen nach HPLC mittels Fluoreszenzmessungen am Plate Reader.....	78
Tabelle 10: Doxorubicin Konzentrationen der Polymersom-Lösungen	79
Tabelle 11: Hydrodynamische Durchmesser und Polydispersitäten gemessen mittels Dynamischer Lichtstreuung.	98
Tabelle 12: Zusammensetzung der Polymere P(PFPMA) _x	105
Tabelle 13: Zusammensetzung der Polymere P(PFPMA) _x - <i>b</i> -P(PDSM) _y mittels THF GPC.....	109
Tabelle 14: Überblick über die erhaltenen P(HPMA) _x - <i>b</i> -P(PDSM) _y Polymere.	114
Tabelle 15: Überblick über die fluoreszenzmarkierten erhaltenen P(HPMA) _x - <i>b</i> -P(PDSM) _y Polymere.	116
Tabelle 16: Hydrodynamische Durchmesser der mittels Dialyse hergestellten Partikel.	118
Tabelle 17: Hydrodynamische Durchmesser der mittels dualer Asymmetrischer Zentrifuge hergestellten Partikeln.....	120
Tabelle 18: Hydrodynamische Durchmesser der mit Hexandithiol kernvernetzten Mizellen der Polymere HP1 bis HP7, aufgereinigt mittels Dialyse gegen Wasser.	125

Tabelle 19: Hydrodynamische Durchmesser der vernetzen Mizellen der Polymere HP2, HP4 und HP6 nach Gefriertrocknung und anschließendem rehydrieren.	126
Tabelle 20: Hydrodynamische Durchmesser und Polydispersitäten der DLS- Messungen der vernetzen Mizellen der Polymerzusammensetzungen P(HPMA) ₇₉ - <i>b</i> -P(PDSM) ₁₃ (HP5) und (HP7) in Wasser nach Herstellung und nach einer Lagerzeit von 11 Wochen bei 3°C in Wasser.	128
Tabelle 21: Hydrodynamische Durchmesser der mit Nile Red beladenen und mit Hexandithiol vernetzen Partikel der Polymere HP4und HP6.	130
Tabelle 22: Ansatzberechnung der P(PFPMA) Polymere	153
Tabelle 23: P(PFPMA) _x - <i>b</i> -P(LMA) _y Polymere	155
Tabelle 24: P(DHPMA) _x - <i>b</i> -P(LMA _y - <i>stat</i> -DDEMA _z) Polymere	157
Tabelle 25: P(DHPMA) _x - <i>b</i> -P(LMA _y - <i>stat</i> -DDEMA _z - <i>stat</i> -HHMA _w) Polymere	158
Tabelle 26: Ansatzberechnung der P(PFPMA) _x - <i>b</i> -P(PDSM) _y Polymere	161
Tabelle 27: HFIP-GPC Messungen der Polymere	163

6.4. Abkürzungsverzeichnis

ACVA	4,4'-Azobis-(4-Cyanovaleriansäure)
AF 647	Alexa Fluor 647
AMDVN	2,2'-Azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitril)
ATRP	Atom-Transfer radikalische Polymerisation (<i>atom transfer radical polymerization</i>)
CDCl ₃	Chloroform (deuteriert)
CTA	<i>chain transfer agent</i>
Đ	Dispersität
DBCO	Dibenzocyclooctin
DCM	Dichlormethan
DDEMA	2-(2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethylmethacrylat
DHPA	2,3-Dihydroxypropylamin
DLS	Dynamische Licht Streuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOSY	Diffusionsgeordnete (Kernresonanz-) Spektroskopie (<i>diffusion ordered spectroscopy</i>)
EPR	<i>Enhanced permeability and retention</i>
eq	Äquivalente
FACS	Fluoreszenz-aktivierte/r Zellsortierung / Zell-Scan (<i>fluorescence-activated cell sorting / cell scanning</i>)
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
g	Gramm
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
GSH	Glutathion
h	Stunde
HFIP	Hexafluorisopropanol

HHMA	Hydroxyhexylmethacrylat
HPA	2-Hydroxypropylamin
HPDS	Hydroxyethyl-(2-pyridyldisulfid)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HPMA	<i>N</i> -(2-Hydroxypropyl)methacrylat
LMA	Laurylmethacrylat
$\log P_{o/w}$	Logarithmischer n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
m	Masse
<i>m</i> -	<i>Meta</i> -
MP-H ₂ O	Millipore Wasser
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
ml	Milliliter
mol	Millimol
M _n	Zahlenmittel der Molmasse
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
M _w	Massenmittel der Molmasse
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
n	Stoffmenge
NEt ₃	Triethylamin
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie (<i>Nuclear magnetic Resonance</i>)
<i>o</i> -	<i>Ortho</i> -
<i>p</i> -	<i>Para</i> -
PDSM	Pyridylsulfidethylmethacrylat
PFP	Pentafluorphenol

PFP-CTA	4-Cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentansäure Pentafluorophenylester
PFPMA	Pentafluorphenylmethacrylat
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
ppm	Parts per million
RAFT	<i>Reversible addition-fragmentation chain transfer</i>
RI	Brechungsindex (<i>reflective index</i>)
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SPAAC	<i>Strain-promoted alkyne-azide-cycloaddition</i>
-stat-	statistisches Copolymer
TEM	<i>Transmissionselektronenmikroskopie</i>
THF	<i>Tetrahydrofuran</i>
μl	<i>Mikroliter</i>
UV/VIS	<i>Ultraviolet/visible</i>
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
X_n	Polymerisationsgrad