

5. Komplexe aus Diminazen und Poly-(ethylenoxid)-*block*-poly-(glutaminsäure)

5.1. Einleitung

Die Verwendung von Blockcopolymeren und den daraus durch Selbstorganisation gebildeten Mizellen ist sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der Industrie von großem Interesse.^{1,2,3} Blockcopolymere aus Poly-(ethylenoxid) (PEO) und Poly-(L-Aminosäuren) stellen im Hinblick auf eine spätere Anwendung *in vivo* besonders interessante Systeme dar, da sie im Körper durch Hydrolyse und enzymatischen Abbau zu biokompatiblen Fragmenten abgebaut werden.⁴ Kataoka *et al.* berichten beispielsweise über Poly-(ethylenoxid)-*block*-poly-(α,β -asparaginsäure) mit kovalent an die Asparaginsäure gebundenem Doxorubicin.⁵ Es ist auch möglich, Arzneistoffe nicht kovalent sondern durch Komplexierung an ein Blockcopolymer zu binden. So entstehen Nanopartikel mit einem Durchmesser von 60 nm bei der Komplexierung von all-*trans*-Retinsäure mit dem Poly-(L-lysin)-Block von PEO-*block*-poly(L-lysin). Durch die Komplexierung der all-*trans*-Retinsäure wird der zuvor wasserlösliche Poly-(L-lysin)-Block wasserunlöslich und es bilden sich Kern-Schale-Teilchen.^{6,7} Zusätzlich stabilisiert die amphiphile all-*trans*-Retinsäure die α -Helix des Poly-(L-lysin)-Blocks bei niedrigen pH-Werten. Durch Selbstorganisation entstehen auch Mizellen aus PEO-poly-(α,β -asparaginsäure) und *cis*-Diammindichloroplatin(II) (Cisplatin).⁸ Das Blockcopolymer ist dabei durch Komplexierung des Platins am Arzneistoff gebunden.

Bei diesen Beispielen gewährleistet die äußere Hülle der Teilchen aus PEO-Ketten die Stabilität der Nanopartikel in wässriger Lösung. Ohne den PEO-Block würde eine Aggregation der Partikel mit anschließender Sedimentation auftreten.

Bei Komplexen von nicht kovalent gebundenen amphiphilen Substanzen (Tensiden) werden unterschiedlichste mesomorphe Strukturen beobachtet.⁹ Im Gegensatz zu den Komplexen mit Tensiden¹⁰ ist bisher nur wenig über die Komplexierung von hydrophilen Molekülen mit Poly-(L-Aminosäuren) bekannt. Eine Ausnahme bildet der Arzneistoff Diminazen. Das niedermolekulare Diminazen ist gut wasserlöslich und besitzt eine positive Ladung. Als Arzneistoff wird Diminazen für die Behandlung eines Trypanosomen-Befalls bei Tieren, besonders bei Wiederkäuern, eingesetzt.

Stolnik *et al.* benutzten Diminazen als Modellsubstanz, um dessen Komplexbildung mit Poly-(L-asparaginsäure) (PAsp)¹¹ und PEO-*b*-(PAsp)¹² zu unter-

suchen. Der Komplex aus Diminazen und PEO-*b*-(PAsp) bildete dabei Nanopartikel von 22 bis 60 nm mit einem Zetapotential im neutralen Bereich. Die Komplexbildungskonstanten wurden für den Diminazen-PAsp-Komplex bestimmt und lagen bei 1×10^{-5} bis 7×10^{-3} in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Natriumchlorid-Konzentration. Die Untersuchungen ergaben auch, dass Diminazen mit beiden Amidin-Gruppen je eine Asparaginsäure-Einheit von PAsp komplexiert. Auch Untersuchungen der Komplexbildung von Diminazen mit DNA ergaben Hinweise darauf, dass beide positiv geladene Amidin-Gruppen des Diminazens an der Komplexbildung mit DNA beteiligt sind.¹³

Stolnik *et al.* führten allerdings keine Untersuchungen durch, ob durch die Komplexbildung Konformationsänderungen des Asparaginsäure-Blocks auftreten und welchen Einfluss die Anzahl der Asparaginsäure-Einheiten im Peptid-Block auf die Komplexbildung hat.

Gegenstand dieses Kapitels ist das physiko-chemische Verständnis der Komplexbildung des Modellarzneistoffs Diminazen mit einem anionischen Poly-(glutaminsäure)-Block. PEO-*block*-poly-(glutaminsäure) (PEO-*b*-Glu) wurde als einfaches Modell ausgewählt, um die Komplexbildung und Selbstorganisation zu untersuchen. Diminazen besitzt zwei Amidin-Gruppen, die mit der Carboxyl-Funktion der Glutaminsäure komplexieren können (Abbildung 5.1). Die Komplexbildung zwischen Amidinium-Ion und der Carboxylat-Gruppe kommt durch eine Kombination von elektrostatischer Wechselwirkung und Wasserstoffbrücken zustande.¹⁴

Es sollte daher untersucht werden, ob Diminazen nur mit einer oder mit beiden seiner möglichen Bindungsstellen an PEO-*b*-Glu bindet und wie groß die Bindungskonstanten bei unterschiedlichen Längen des Poly-(glutaminsäure)-Blocks sind. Zusätzlich sollte mit Hilfe des Circular dichroismus gezeigt werden, ob Diminazen bei einer Veränderung des pH-Wertes einen Einfluss auf die Konformation des Glutaminsäure-Blocks hat, vergleichbar mit dem stabilisierenden Einfluss von Tensiden. Schließlich soll in einem Vergleich der Sekundärstrukturen von Poly-(glutaminsäure) (Glu) und PEO-*b*-Glu nach der Komplexbildung mit Diminazen untersucht werden, ob der PEO-Block einen Einfluss auf die Sekundärstruktur des Peptid-Blocks hat.

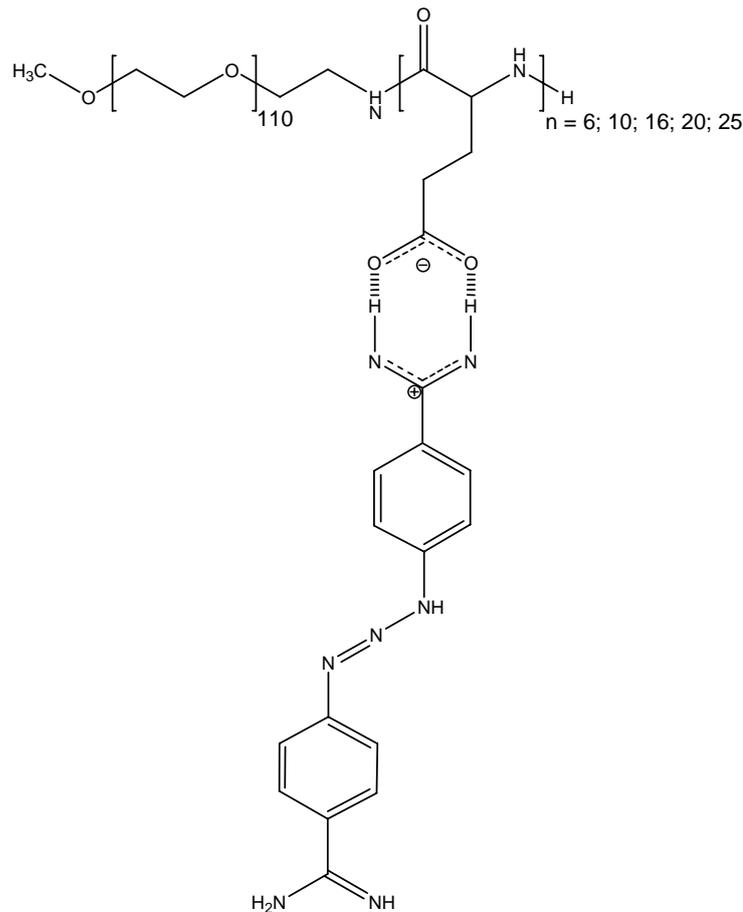


Abbildung 5.1 Komplexierung von PEO-*b*-Glu_n mit Diminazen über elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken.

5.2. Ergebnisse und Diskussion

5.2.1. Komplexbildung mit PEO-*block*-poly-(glutaminsäure)

Durch das Vermischen von Diminazen mit PEO-*b*-Glu entstehen Komplexe, die sowohl durch ionische Bindungen als auch durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden (Abbildung 5.1). Diminazen komplexiert dabei über seine Amidin-Gruppe eine Carboxyl-Gruppe der Seitenkette der Glutaminsäure. Dabei besteht die Möglichkeit, dass Diminazen das Blockcopolymer über eine seiner beiden Amidin-Gruppen bindet oder dass beide vorhandenen Amidin-Gruppen an der Komplexbildung beteiligt sind. Der pK_a -Wert der Carboxyl-Gruppe in der Seitenkette der Glutaminsäure ist 4.38.¹⁵ Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass der Glutaminsäure-Block während der Komplexbildung bei pH 7.4 deprotoniert vorliegt.

Bilden sich aus Diminazen und PEO-*b*-Glu Komplexe, so sollte sich das UV-Spektrum der Komplexe von den Spektren der unkomplexierten Substanzen

unterscheiden. Diese Annahme konnte durch die Messung der UV-Differenz-Spektren der Diminazen-PEO-*b*-Glu-Mischung (Proben-Küvette) und der nicht vermischten Lösungen (Referenz-Küvette) bestätigt werden (Abbildung 5.2 und Abbildung 5.3).

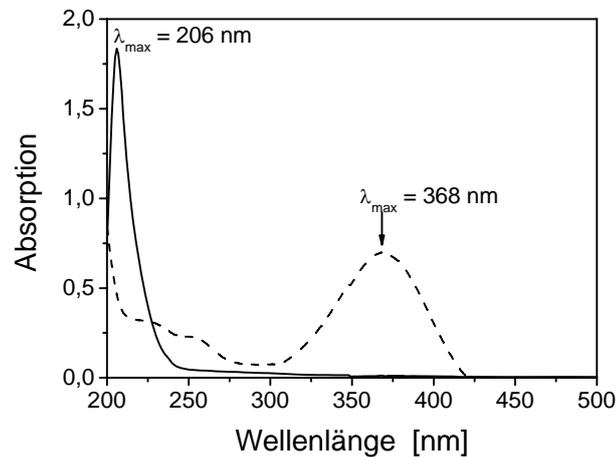


Abbildung 5.2 UV-Spektren von PEO-*b*-Glu₁₆ (durchgezogene Linie) ($c_{\text{Glutaminsäure}} = 0.8 \text{ mM}$) und Diminazen (gestrichelte Linie) ($c_{\text{Diminazen}} = 0.025 \text{ mM}$) in 25 mM Tris-HCl (Referenz 25 mM Tris-HCl).

In Abbildung 5.3 ist zu sehen, dass mit ansteigender PEO-*b*-Glu-Konzentration die Differenz der Absorptionen größer wird.

Die direkt nach Mischung der Lösungen erhaltene Form der UV-Differenz-Spektren bleibt konstant. Sie enthalten fünf isosbestische Punkte bei 260 nm, 308 nm und 407 nm, die ein Hinweis auf das Vorliegen eines Zwei-Zustands-Systems sind. Diminazen liegt demnach in einer komplexierten und einer nicht komplexierten Form vor. Das Auftreten der isosbestischen Punkte schließt allerdings nicht aus, dass nicht zusätzlich noch andere Zustandsformen mit genau dem gleichen Spektrum und Absorptionskoeffizienten vorliegen könnten. Die maximale positive Differenz der UV-Absorption liegt bei 426 nm.

Aus diesem Grund wurde die Differenz der Absorptionen bei einer Wellenlänge von 426 nm benutzt, um die Komplexbildung zu verfolgen. Aus den großen Beträgen der Differenzen der gemessenen Absorptionen direkt nach Mischung der Lösungen lässt sich schließen, dass sich die Diminazen-PEO-*b*-Glu-Komplexe spontan beim Vermischen der Diminazen- und PEO-*b*-Glu-Lösungen bilden. Dabei ist der Anteil an komplexiertem Diminazen umso größer je höher die PEO-*b*-Glu-Konzentration ist (Abbildung 5.3).

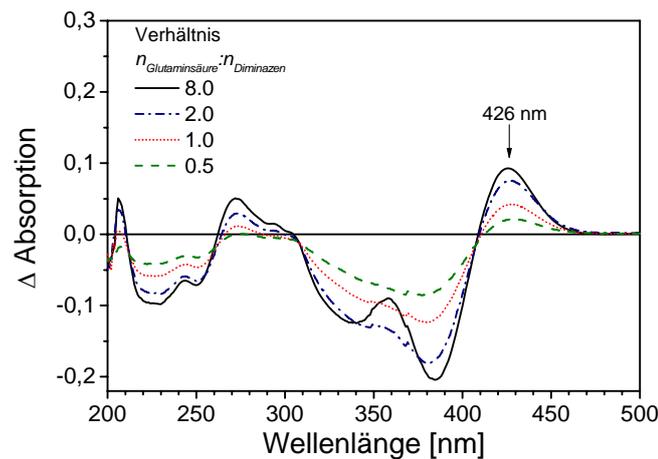


Abbildung 5.3 UV-Differenz-Spektren der Komplexe aus Diminazen mit PEO-*b*-Glu₁₆. Es wurden unterschiedliche Verhältnisse von Glutaminsäure zu Diminazen vermessen. Die molaren Verhältnisse waren ($n_{\text{Glutaminsäure}}:n_{\text{Diminazen}}$) 8.0 (—), 2.0 (---), 1.0 (···) und 0.5 (---). Die Diminazen-Konzentration betrug 0.05 mM.

5.2.2. Bindungs-Konstante

Um die Frage zu beantworten, mit wie vielen Bindungsstellen Diminazen das Blockcopolymer PEO-*b*-Glu komplexiert, wurde von einer einfachen Komplexierungsreaktion ausgegangen, bei der Diminazen (D) und die Glutaminsäure-Einheiten (M) den Komplex DM_n bilden. Das Reaktionsschema ist



wobei n die Anzahl der Glutaminsäure-Monomere ist, die ein Diminazen-Molekül bindet. Die Komplexbildungskonstante (K) kann durch eine Verbindung des Massenwirkungsgesetz mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet werden. Das Massenwirkungsgesetz wird durch

$$K = c_{DM_n} / (c_D c_M^n) \quad \text{Gleichung 5.2}$$

beschrieben, wobei c_{DM_n} , c_D und c_M die Konzentration des Komplexes, des Diminazens und der Glutaminsäure-Monomere sind. Das Lambert-Beer'sche Gesetz lautet

$$\Delta A = \Delta c \Delta \varepsilon_\lambda d = c_{DM_n} \Delta \varepsilon_\lambda d \quad \text{Gleichung 5.3}$$

wobei $\Delta\varepsilon_\lambda$ die Änderung des Extinktionskoeffizienten bei einer gegebenen Wellenlänge ist, in diesem Fall bei 426 nm.

Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass Diminazen sowohl nur mit einer seiner beiden Amidin-Gruppen ($n = 1$) als auch mit beiden Amidin-Gruppen ($n = 2$) die Carboxyl-Gruppen des PEO-*b*-Glu komplexieren kann. Diese beiden unterschiedlichen Möglichkeiten ergaben verschiedene Funktionen zur Anpassung der Messkurven bei der Berechnung der Komplexbildungskonstanten.

5.2.2.1. Eine Bindungsstelle ($n = 1$)

Bildet Diminazen mit PEO-*b*-Glu einen Komplex nur über eine der beiden möglichen Bindungsstellen, dann wird die Konzentration an freiem Diminazen (c_D) beschrieben durch

$$c_D = c_{D, t=0} - c_{DM} \quad \text{Gleichung 5.4}$$

die Konzentration an komplexierten Glutaminsäure-Monomeren ($c_{M, b}$) durch

$$c_{M, b} = c_{DM} \quad \text{Gleichung 5.5}$$

und die Konzentration an freien Glutaminsäure-Monomeren (c_M) durch

$$c_M = c_{M, t=0} - c_{M, b} \quad \text{Gleichung 5.6}$$

Daraus ergibt sich für die Komplexbildungskonstante

$$K = \frac{c_{DM}}{(c_{D, t=0} - c_{DM})(c_{M, t=0} - c_{DM})} \quad \text{Gleichung 5.7}$$

Zusammen mit der Differenz der Absorptionen, die über die Gleichung

$$\Delta A = c_{DM} \Delta\varepsilon_\lambda \quad d = c_{DM} \Delta ext_\lambda \quad \text{Gleichung 5.8}$$

mit der Konzentration des gebildeten Komplexes verbunden ist, berechnet sich die Funktion zur Kurvenanpassung für die Bestimmung von K über

$$\Delta A = \frac{\Delta ext_\lambda}{2} (c_{M, t=0} + c_{D, t=0} + 1/K - \sqrt{(c_{M, t=0} + c_{D, t=0} + 1/K)^2 - 4c_{M, t=0}c_{D, t=0}}) \quad \text{Gleichung 5.9}$$

5.2.2.2. Zwei Bindungsstellen (n = 2)

Komplexiert Diminazen mit beiden Bindungsstellen PEO-*b*-Glu, dann ist die Konzentration an freiem Diminazen (c_D)

$$c_D = c_{D,t=0} - c_{DM_2} \quad \text{Gleichung 5.10}$$

die Konzentration an gebundenen Glutaminsäure-Monomeren ($c_{M,b}$)

$$c_{M,b} = 2c_{DM_2} \quad \text{Gleichung 5.11}$$

und die Konzentration an freien Glutaminsäure-Monomeren (c_M)

$$c_M = c_{M,t=0} - c_{M,b} \quad \text{Gleichung 5.12}$$

Daraus berechnet sich die Komplexbildungskonstante

$$K = \frac{c_{DM_2}}{(c_{D,t=0} - c_{DM_2})(c_{M,t=0} - 2c_{DM_2})^2} \quad \text{Gleichung 5.13}$$

Durch Einsetzen von

$$a = c_{M,t=0} + c_{D,t=0} \quad \text{Gleichung 5.14}$$

$$b = \frac{(c_{M,t=0})^2}{4} + c_{M,t=0} c_{D,t=0} + \frac{1}{4K} \quad \text{Gleichung 5.15}$$

und

$$c = \frac{(c_{M,t=0})^2 c_{D,t=0}}{4} \quad \text{Gleichung 5.16}$$

ergibt sich für die Bestimmung der Komplexbildungskonstanten

$$\Delta A = \frac{\Delta \text{ext}_\lambda}{6} \left\{ \begin{array}{l} 2a - \frac{2 \cdot 2^{1/3} (a^2 - 3b)}{\left(-2a^2 + 9ab - 27c + \sqrt{(2a^2 - 9ab + 27c)^2 - 4(a^2 - 3b)^3} \right)^{1/3}} \\ - 2^{2/3} \left(-2a^2 + 9ab - 27c + \sqrt{(2a^2 - 9ab + 27c)^2 - 4(a^2 - 3b)^3} \right)^{1/3} \end{array} \right\}$$

Gleichung 5.17

5.2.3. Bestimmung der Bindungsstellen

Beide Anpassungsfunktionen für ΔA wurden getestet um zu ermitteln, ob die Annahme von einer ($n = 1$) oder von zwei ($n = 2$) Bindungsstellen des Diminazens bei der Komplexierung mit Glutaminsäure wahrscheinlicher ist. Der Korrelationskoeffizient R^2 wurde als Kriterium zur Unterscheidung der beiden möglichen Modelle herangezogen. Der Korrelationskoeffizient R^2 kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei $R^2 = 1$ einer perfekten Kurvenanpassung entspricht.

Die Funktion mit $n = 1$ für eine Komplexierungsreaktion nach folgendem Schema



ergibt einen Korrelationskoeffizienten von $R^2 = 0.996$, während die Funktion mit $n = 2$ und



einen Korrelationskoeffizienten von $R^2 = 0.636$ ergibt. Beide Korrelationskoeffizienten sind Mittelwerte der Blockcopolymeren PEO-*b*-Glu₆ bis PEO-*b*-Glu₂₅. Aus den unterschiedlichen Werten für R^2 lässt sich schließen, dass Diminazen nur mit einer seiner beiden möglichen Bindungsstellen PEO-*b*-Glu komplexiert (Abbildung 5.4). Dieses Verhalten kann in einer eventuellen sterischen Hinderung bei der Komplexierung begründet sein. Die Ausbildung einer zweiten Bindungsstelle ist möglicherweise zumindest an der gleichen Polymer-Kette sterisch gehindert.

Bei der Untersuchung der Komplexierung von Diminazen und PAsp mit Hilfe von kalorimetrischen Messungen durch Stolnik *et al.* wurden die erhaltenen Ergebnisse dahingehend interpretiert, dass jedes Diminazen-Molekül mit den verwendeten Polymeren Poly-(asparaginsäure) und PEO-*b*-(asparaginsäure) mehr als ein Aminosäure-Monomer (1.35 bis 1.88) komplexiert.^{11,12} Der Grund für die unterschiedliche Komplexierung von Polymeren aus Asparaginsäure und Glutaminsäure durch Diminazen ist noch nicht geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die gemessenen Werte für ΔA sind für die unterschiedlichen Längen des Glutaminsäure-Blocks eine Funktion von $c_{M, t=0}$ und wurden mit den Modellen für eine und zwei Bindungsstellen angepasst, um die Komplexbildungskonstanten zu berechnen ($\Delta \epsilon_{\lambda} d = 1762 \text{ mol}^{-1}$). Die Komplexbildungskonstante K

steigt mit der Kettenlänge des Glutaminsäure-Blocks an und hat bei $2.38 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (PEO-*b*-Glu₁₆) ihr Maximum (Tabelle 5.1 und Abbildung 5.6).

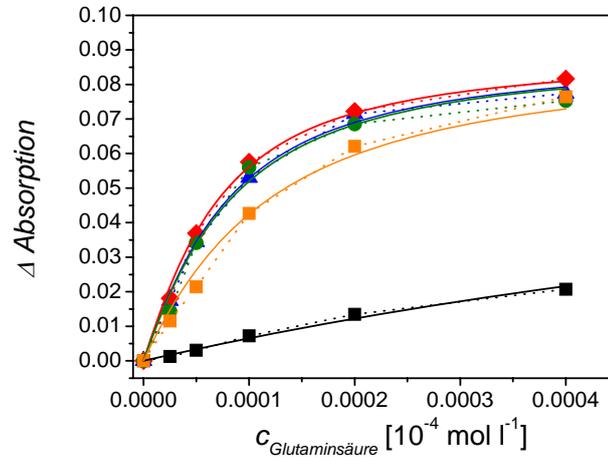


Abbildung 5.4 Konzentrationsabhängigkeit von Δ Absorption bei $\lambda = 426 \text{ nm}$ in den UV-Differenz-Spektren der Komplexe aus Diminazen und PEO-*b*-Glu mit $n = 6$ (■), 10 (■), 16 (●), 20 (▲) und 25 (◆). Die Konzentration von Diminazen betrug 0.05 mM . Zusätzlich wurden für Kurven anhand Gleichung 5.9 unter der Annahme nur einer Bindungsstelle des Diminazens berechnet (durchgezogene Linien,).

Danach fällt der Wert für K auf $1.16 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (PEO-*b*-Glu₂₅). Die Komplexbildungskonstanten für PEO-*b*-Glu liegen in derselben Größenordnung wie die bereits für den Komplex Diminazen-Poly-(asparaginsäure) veröffentlichten ($K \approx 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$).¹¹

	Molekulargewicht Peptid-Block ^a M_n [g mol ⁻¹]	Anzahl der Glutaminsäure-Einheiten	K [10^4 M^{-1}]	Anteil an gebundenem Diminazen ^b [%]	
				$n_{\text{Glu}}:n_{\text{Diminazen}}$ 1:1	$n_{\text{Glu}}:n_{\text{Diminazen}}$ 8:1
PEO- <i>b</i> -Glu ₆	770	6	0.08 ± 0.1	7	43
PEO- <i>b</i> -Glu ₁₀	1290	10	1.98 ± 1.3	50	95
PEO- <i>b</i> -Glu ₁₆	2060	16	2.38 ± 1.6	53	96
PEO- <i>b</i> -Glu ₂₀	2580	20	1.9 ± 1.2	49	95
PEO- <i>b</i> -Glu ₂₅	3230	25	1.16 ± 0.7	41	91

^a Molekulargewichte M_n aus ⁷

^b Werte berechnet für $C_{\text{Diminazen}} = 0.05 \text{ mM}$

Tabelle 5.1 Charakterisierung der zur Komplexierung mit Diminazen verwendeten Blockcopolymere und der entstehenden Komplexe.

Ähnliche Komplexbildungskonstanten im Bereich von $1\text{-}2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ werden auch bei anderen Wirt-Gast-Komplexen gefunden.^{16,17,18} Eine Ausnahme bildet nur die Bindungskonstante des kürzesten hier verwendeten Blockcopolymers PEO-*b*-Glu₆ mit einem Wert von $0.08 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Der Umsatz von Diminazen (U_D), d.h. der Anteil an Diminazen-Molekülen, der mit PEO-*b*-Glu komplexiert, wird definiert als

$$U_D = 1 - (c_D / c_{D,t=0}) \quad \text{Gleichung 5.20}$$

und wurde über folgende Gleichung berechnet

$$U_D = 1 - \frac{Kc_{D,t=0} - Kc_{M,t=0} - 1 + \sqrt{(Kc_{D,t=0} - Kc_{M,t=0} - 1)^2 + 4Kc_{D,t=0}}}{2Kc_{D,t=0}}$$

Gleichung 5.21

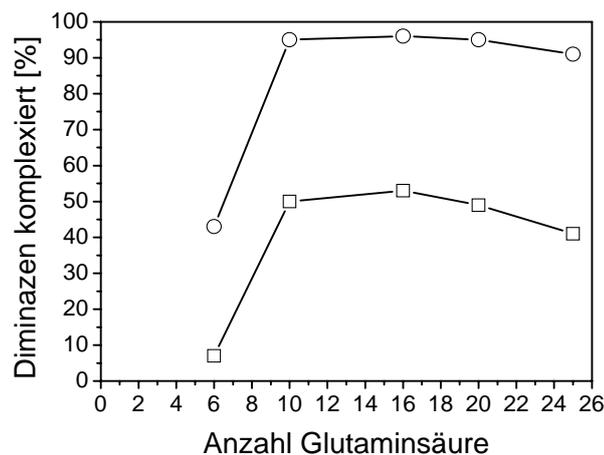


Abbildung 5.5 Anteil an komplexiertem Diminazen als Funktion der Anzahl der Glutaminsäure-Einheiten im Polymer. Das Verhältnis von Glutaminsäure zu Diminazen ($n_{\text{Glutaminsäure}}:n_{\text{Diminazen}}$) war 1:1 (□) und 8:1 (○).

Der Anteil an gebundenem Diminazen wurde für zwei unterschiedliche Verhältnisse PEO-*b*-Glu zu Diminazen bestimmt. Die Diminazen-Konzentration betrug dabei 0.05 mM und das Verhältnis von Glutaminsäure zu Diminazen ($n_{\text{Glutaminsäure}}:n_{\text{Diminazen}}$) war 1:1 und 8:1 (siehe Tabelle 5.1 und Abbildung 5.5).

Der Anteil an gebundenem Diminazen liegt für die Glutaminsäure-Blocklängen 10 bis 25 bei einem Verhältnis der Glutaminsäure zu Diminazen von 1:1 bei 40 - 50 % und bei einem Verhältnis von 8:1 bei über 90 %. Nur der Anteil an gebun-

denem Diminazen bei PEO-*b*-Glu₆ weicht davon ab, er beträgt 7 % (1:1) und 43 % (8:1).

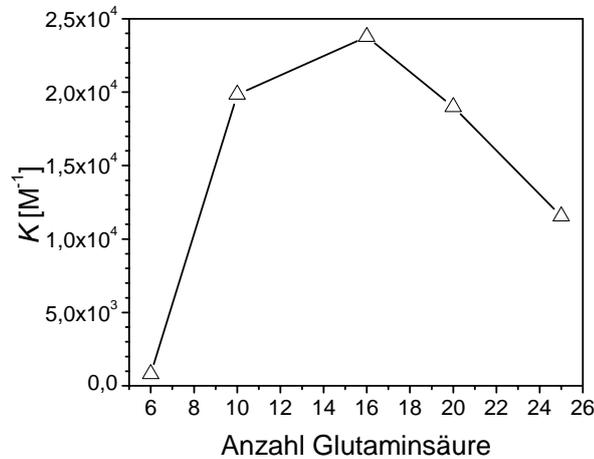


Abbildung 5.6 Die Komplexbildungskonstanten K (Δ) als Funktion der Anzahl der Glutaminsäure-Einheiten im Polymer PEO-*b*-Glu.

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass der Glutaminsäure-Block von PEO-*b*-Glu mindestens 10 Glutaminsäure-Einheiten besitzen muss, um Diminazen effektiv komplexieren zu können und dass der Anteil des komplexierten Diminazen bei einem Überschuss an Glutaminsäure nahe 100 % liegt.

5.2.4. Stabilisierung der Sekundärstruktur

Es ist bekannt, dass eine Änderung der Konformation der Poly-(glutaminsäure) von einer Knäuel-Struktur zu einer α -Helix durch bestimmte Tenside induziert wird.^{19,20} Dieses Verhalten wurde bis jetzt aber noch nicht bei gut wasserlöslichen, nicht oberflächenaktiven Substanzen wie Diminazen beobachtet. Für die Ausbildung einer α -Helix muss eine Mindestanzahl von 20 Aminosäuren vorhanden sein.^{21,22} Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Diminazen auf die Sekundärstruktur von PEO-*b*-Glu₂₅ (25 Glutaminsäure-Einheiten) untersucht. Dabei wurde die Sekundärstruktur des Polymeres und des Diminazen-Polymer-Komplexes in Abhängigkeit vom pH-Wert mit Hilfe des Circular-dichroismus (CD) bestimmt.

Abbildung 5.7 zeigt die Elliptizität θ von unkomplexiertem PEO-*b*-Glu₂₅ in einem Wellenlängenbereich von 190 bis 260 nm in Abhängigkeit vom pH-Wert. Das typische Spektrum einer α -Helix zeigt sich bei pH 3.4 mit zwei Minima bei 208 nm und 222 nm und einem Maximum bei etwa 192 nm.

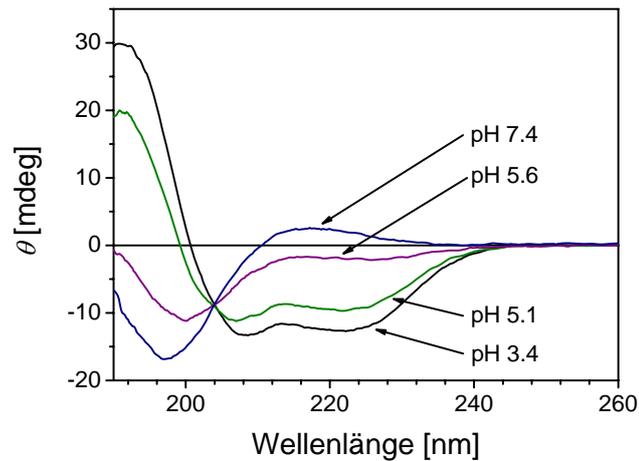


Abbildung 5.7 CD-Spektren von PEO-*b*-Glu₂₅ bei unterschiedlichen pH-Werten. Die pH-Werte betragen 3.4; 5.1; 5.6 und 7.4. Beim pH-Wert 3.4 zeigt das CD-Spektrum den Verlauf für eine α -Helix und am pH-Wert 7.4 den Verlauf für eine Knäuel-Konformation.

Das CD-Spektrum beim pH-Wert 7.4 mit einem Minimum bei 197 nm und einem Maximum bei 218 nm hat die typische Form einer Knäuel-Konformation, bei 222 nm hat θ einen positiven Wert angenommen. Bei Anhebung des pH-Wertes von 3.4 auf 7.4 zeigen die CD-Spektren eine schrittweise Umwandlung der α -Helix des Glutaminsäure-Blocks in eine Knäuel-Konformation an.

Abbildung 5.8 zeigt die CD-Spektren des Diminazen-PEO-*b*-Glu₂₅-Komplexes in Abhängigkeit vom pH-Wert. Bei Wellenlängen über 200 nm hat das Signal eine gute Qualität, unterhalb von 200 nm ist es nicht mehr auswertbar. Ein Grund dafür kann die starke Färbung des Diminazens sein, die eine Verminderung der Signalqualität unterhalb 200 nm verursacht. Aus diesem Grund wurden bei den CD-Spektren des Diminazen-PEO-*b*-Glu₂₅-Komplexes nur Wellenlängen größer als 200 nm zur Interpretation herangezogen.

Bei den CD-Spektren des Komplexes lässt sich die α -Helix-Konformation deutlich bis zu einem pH-Wert von 11.5 erkennen. Es finden sich zwei Minima bei 206 nm und 224 nm, die charakteristisch für eine α -Helix sind. Das Minimum bei 206 nm ist, verglichen mit dem Minimum bei 224 nm, deutlich verstärkt. Ein ähnlicher Effekt konnte bei Dodecylammonium-Poly-(glutaminsäure)-Komplexen beobachtet werden.¹⁹ Die Verstärkung des Minimums bei 206 nm des Diminazen-PEO-*b*-Glu-Komplexes kann daher ebenfalls als ein Effekt der Komplexbildung interpretiert werden. Beim pH-Wert 12.4 zeigt das CD-Spektrum eine Knäuel-Konformation an, die Elliptizität θ hat bei 222 nm einen positiven Wert angenommen.

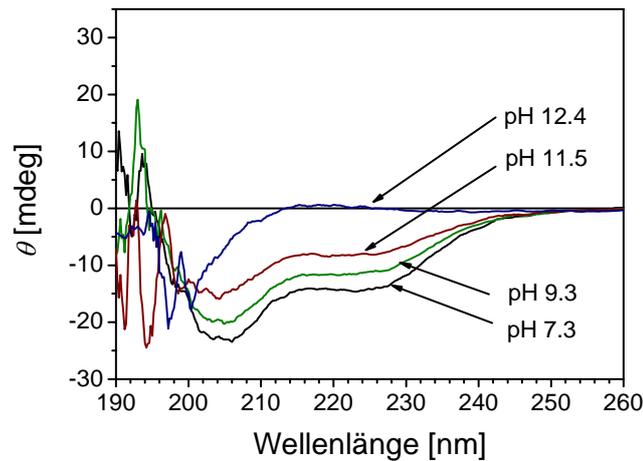


Abbildung 5.8 CD-Spektren des Komplexes von Diminazen mit PEO-*b*-Glu₂₅ bei unterschiedlichen pH-Werten. Die pH-Werte betragen 12.4; 11.5; 9.3 und 7.3.

Abbildung 5.9 zeigt die Elliptizität θ_{222} als Funktion des pH-Wertes, um den Übergang der α -Helix in eine Knäuel-Konformation für PEO-*b*-Glu₂₅ und den Diminazen-PEO-*b*-Glu₂₅-Komplex genau zu bestimmen. Für die α -Helix des PEO-*b*-Glu₂₅ beträgt die Elliptizität $\theta_{222} = -2$ bei einem pH-Wert von 3.6, für eine Knäuel-Konformation ist $\theta_{222} = 0.4$ bei einem pH-Wert von 8. Der Übergang findet deutlich bei einem pH-Wert zwischen 5 und 6 statt, der Kurvenverlauf besitzt einen Wendepunkt bei pH 5.3.

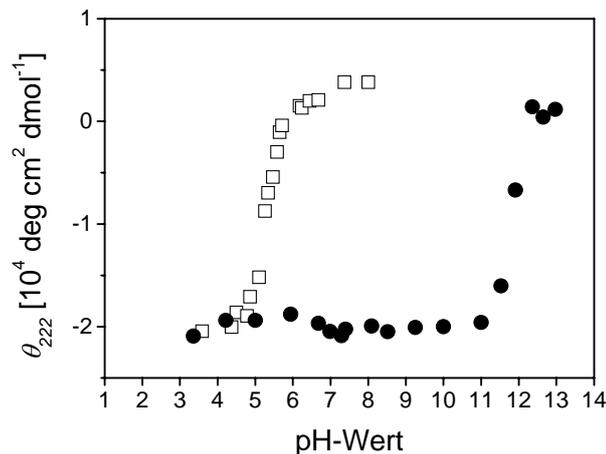


Abbildung 5.9 Molare Elliptizität θ_{222} von PEO-*b*-Glu₂₅ (□) und des Diminazen-PEO-*b*-Glu₂₅-Komplexes (●) als Funktion des pH-Wertes bei einer Wellenlänge von 222 nm. θ_{222} ist angegeben als die molare Elliptizität einer Glutaminsäure-Einheit.

Die Elliptizität θ_{222} des Diminazen-PEO-*b*-Glu₂₅-Komplexes zeigt eine deutliche Verschiebung der Kurve zu höheren pH-Werten. Die Werte für θ_{222} variieren nur leicht zwischen -1.9×10^4 und -2.1×10^4 über einen pH-Bereich von 3.4 bis 11.0. Damit liegt der Diminazen-PEO-*b*-Glu₂₅-Komplex in diesem pH-Bereich stabil mit einem gleich bleibenden Anteil an α -Helix vor. Der Übergang von α -Helix zur Knäuel-Konformation findet bei einem pH-Wert zwischen 11.5 und 12.5 statt, der Kurvenverlauf besitzt einen Wendepunkt bei pH 12.

Der Anteil an α -Helix (f_H) kann berechnet werden mit

$$f_H = \frac{\theta_C - \theta_{222}}{\theta_C - \theta_H} \quad \text{Gleichung 5.22}$$

wobei θ_{222} die Elliptizität bei 222 nm, θ_H die Elliptizität bei 222 nm für die α -Helix des Glutaminsäure-Blocks bei pH 3.4 und θ_C die Elliptizität bei 222 nm für die Knäuel-Konformation des Glutaminsäure-Blocks bei pH 12 darstellt.²⁰ In Abbildung 5.10 ist der Anteil an α -Helix (f_H) in Abhängigkeit vom pH-Wert angegeben. Es wurde dabei die Konformation des unkomplexierten PEO-*b*-Glu₂₅ mit der des Diminazen-PEO-*b*-Glu₂₅-Komplexes verglichen.

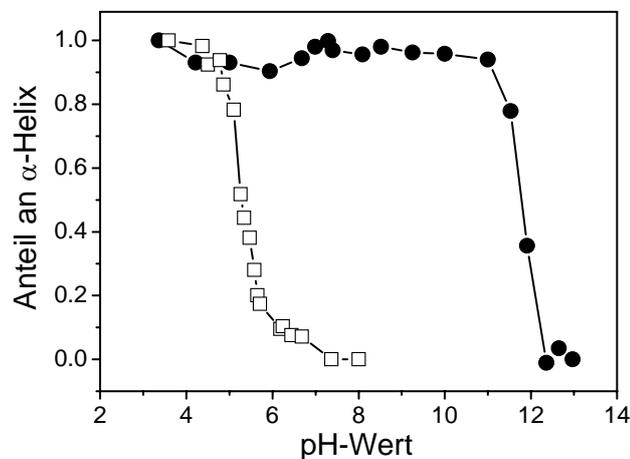


Abbildung 5.10 Änderung der Konformation des Blockcopolymers PEO-*b*-Glu₂₅ (□) und des Komplexes Diminazen-PEO-*b*-Glu₂₅ (●) in Abhängigkeit vom pH-Wert. Der Anteil an α -Helix (f_H) ist als Funktion des pH-Wertes angegeben.

5.2.5. Größe und Struktur der Nanopartikel

Messungen des hydrodynamischen Durchmessers (D_H) der Diminazen-PEO-*b*-Glu₂₅-Komplexe beim pH-Wert 7.4 zeigten, dass diese als diskrete Nanopartikel mit einem D_H von 32 nm und einem niedrigen Polydispersitätsindex^{23,24} (PDI)

von 0.1 vorliegen. In Abbildung 5.11 sind der D_H und der PDI für den Komplex aus Diminazen mit PEO-*b*-Glu₂₅ als Funktion des pH-Wertes aufgetragen. Bis zu einem pH-Wert von 11.5 liegen die Komplexe konstant als Nanopartikel mit einem D_H von 32 nm und einem PDI von 0.1 vor. Bei einer weiteren Erhöhung des pH-Wertes steigt die Größe der Partikel stark an, beim pH-Wert 12.4 beträgt der Durchmesser der Komplexe 210 nm und der PDI 0.53. Der Anstieg des PDI von 0.1 auf 0.53 beruht auf einer Veränderung der Partikelgrößenverteilung der gemessenen Komplexe. Der PDI = 0.1 zeigt eine enge Größenverteilung der vermessenen Partikel, während der PDI von 0.53 bei einem pH-Wert von 12.4 auf eine sehr breite Partikelgrößenverteilung hinweist. Die Komplexe der anderen Blockcopolymeren mit Diminazen zeigen das gleiche Verhalten bei einer Änderung des pH-Wertes. Im Gegensatz dazu zeigt nicht komplexiertes PEO-*b*-Glu₂₅ in Tris-HCl bei Messung der dynamischen Lichtstreuung nur Signale im Bereich von 5 nm, die einzelnen Polymer-Ketten entsprechen könnten.

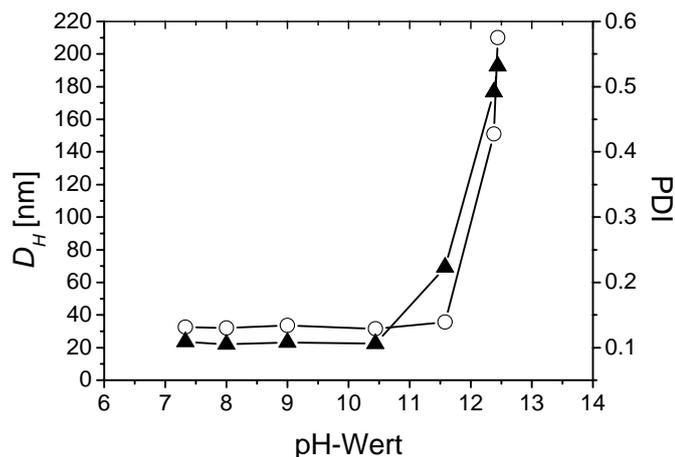


Abbildung 5.11 Hydrodynamischer Durchmesser D_H (○) und Polydispersitätsindex (PDI, ▲) des Diminazen-PEO-*b*-Glu₂₅-Komplexes als Funktion des pH-Wertes.

Es ist bekannt, dass die Aminosäurereste einer Poly-(aminosäure) in einer α -Helix sich über 0.15 nm erstrecken.²⁵ Für PEO-*b*-Glu₂₅ berechnet sich die Größe der α -Helix auf 3.75 nm. In verschiedenen Veröffentlichungen wurde der *end-to-end*-Abstand von PEO in völlig gestreckter Form, Mäander- und Knäuel-Konformation berechnet.²⁶ Für PEO mit einem Molekulargewicht von 5000 g mol⁻¹ beträgt die geschätzte Länge des Moleküls als gestreckte Kette 40 nm, in der Mäanderkonformation 20 nm und als Knäuel 2.5 nm. Kombiniert man diese geometrischen Charakteristika mit den gemessenen Daten der Diminazen-PEO-*b*-Glu-Komplexe, so kann man als Modell des gebildeten Komplexes eine sphärische Kern-Schale-Struktur, ähnlich einer Mizelle, annehmen.

Dabei komplexiert Diminazen den Glutaminsäure-Block in seiner α -helikalen Form und die PEO-Blöcke bilden eine abschließende äußere Hülle. Diese Nanopartikel mit einer Kern-Schale-Struktur sind stabil bis zu einem pH-Wert von 11.5 und werden bei höheren pH-Werten instabil. Die Instabilität der Komplexe bei höheren pH-Werten als 11.5 ist eine Folge der Deprotonierung des Diminazens. Die Deprotonierung führt zu einer Aufhebung der ionischen Bindung des Diminazens an die Glutaminsäure-Einheiten. Die bei einem pH-Wert über 11.5 mit der dynamischen Lichtstreuung gemessenen größeren schlecht definierten Aggregate (PDI = 0.53 entspricht einer breiten Partikelgrößenverteilung) könnten aufgrund einer Bindung des Diminazens durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und van-der-Waals-Kräfte an das PEO-*b*-Glu₂₅ entstehen. In einer früheren Untersuchung mit PEO-poly-(L-lysin) konnte gezeigt werden, dass die α -helikale Struktur von Kern-Schale-Teilchen ($D_H = 100$ bis 120 nm) aus all-*trans*-Retinsäure und PEO-poly-(L-lysin) solange stabil bleibt, wie eine intakte Bindung zwischen der all-*trans*-Retinsäure und dem PEO-poly-(L-lysin) besteht.⁶

Die Aufnahmen der CD-Spektren haben deutlich gezeigt, dass die Diminazen-Blockcopolymer-Komplexe über einen breiten pH-Bereich als α -Helix stabil vorliegen. Da die Komplexierung des Diminazens mit den Blockcopolymeren bei einem pH-Wert durchgeführt wurde, bei dem sich der Glutaminsäure-Block des unkomplexierten Polymers in einer Knäuel-Konformation befindet und nicht als α -Helix vorliegt (pH 7.4 Tris HCl Puffer), kann daraus gefolgert werden, dass die Komplexierung mit Diminazen die Konformationsänderung des Glutaminsäure-Blocks in eine α -Helix induziert.

Um die Induzierung der Konformationsänderung zu untersuchen, wurde PEO-*b*-Glu₂₅ in 25 mM Tris HCl Puffer, pH 7.4, mit unterschiedlichen Mengen Diminazen komplexiert und von diesen Proben CD-Spektren aufgenommen. Zum Vergleich wurde ein Homopolymer aus Glutaminsäure mit 26 Einheiten Glutaminsäure (Glu₂₆) ebenfalls in 25 mM Tris HCl Puffer, pH 7.4, mit unterschiedlichen Mengen Diminazen komplexiert, um einen möglichen Einfluss des PEO-Blockes auf die Konformationsänderung des Glutaminsäure-Blockes zu untersuchen. Abbildung 5.12 zeigt die CD-Spektren des Homopolymers Glu₂₆ und seiner Komplexe mit Diminazen, Abbildung 5.13 die CD-Spektren von PEO-*b*-Glu₂₅ und seiner Komplexe mit Diminazen. Die CD-Spektren der unkomplexierten Polymere (Kurve 1 in Abbildung 5.12 und Abbildung 5.13) zeigen bei pH 7.4 den für beide Polymere typischen Verlauf einer Knäuel-Konformation. Durch die Komplexierung mit Diminazen verändern sich die CD-Spektren und zeigen bei beiden Polymeren den Kurvenverlauf einer α -Helix. Bis zu einer Diminazen-Konzentration von 0.29 mM zeigt das CD-Spektrum für Glu₂₆ den Verlauf einer α -Helix (Abbildung 5.12, Kurve 3), bei einer weiteren

Zugabe von Diminazen verändert sich das CD-Signal stark und zeigt weder den Kurvenverlauf für eine α -Helix noch für die Knäuel-Konformation (Abbildung 5.12, Kurve 4).

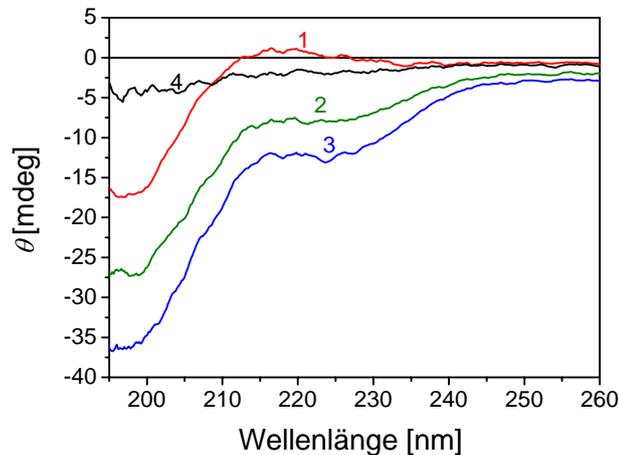


Abbildung 5.12 CD-Spektren von Glu₂₆ bei pH 7.4 in 25 mM Tris HCl Puffer und als Komplex mit Diminazen. Diminazenzkonzentrationen: (1) ohne Diminazen; (2) 0.19 mM; (3) 0.29 mM; (4) 0.49 mM. Die Konzentration der Glutaminsäure-Monomere betrug 1.34 mM.

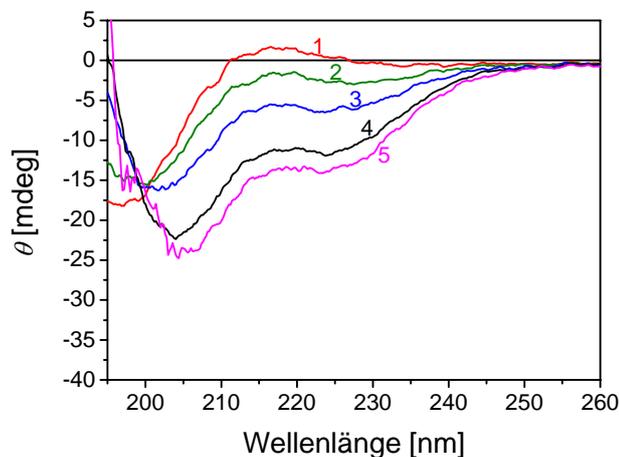


Abbildung 5.13 CD-Spektren von PEO-*b*-Glu₂₅ bei pH 7.4 in 25 mM Tris HCl Puffer und als Komplex mit Diminazen. Diminazenzkonzentrationen: (1) ohne Diminazen; (2) 0.19 mM; (3) 0.29 mM; (4) 0.49 mM; (5) 0.97 mM. Die Konzentration der Glutaminsäure-Monomere betrug 1.34 mM.

Dagegen zeigt das CD-Spektrum von PEO-*b*-Glu₂₅ über den vermessenen Konzentrationsbereich bis 0.97 mM Diminazen den Kurvenverlauf für eine α -Helix (Abbildung 5.13, Kurven 4 und 5).

Der PEO-Block hat keinen Einfluss auf eine Ausbildung der α -Helix, bei beiden Polymeren führt die Zugabe von Diminazen jedoch zu einer Änderung des Knäuels zur α -Helix. Nur der Kurvenverlauf der Komplexe unterscheidet sich bei beiden Polymeren deutlich in der Ausbildung des Minimums bei $\lambda = 200$ nm. Die Elliptizität θ erreicht bei Komplexen mit dem Homopolymer Glu₂₆ deutlich geringere Werte als beim Blockcopolymer PEO-*b*-Glu₂₅. Dies könnte durch eine sterische Hinderung der Komplexierung durch den PEO-Block verursacht sein.

Der PEO-Block führt zu einer sterischen Stabilisierung der Komplexe von Diminazen mit dem Blockcopolymer PEO-*b*-Glu₂₅. Der Diminazen-Glu₂₆-Komplex beginnt dagegen ab einem molaren Verhältnis von Diminazen zu Glutaminsäure-Einheiten von 0.22 auszufallen.

Abbildung 5.14 zeigt die molare Elliptizität θ_{222} der Komplexe von PEO-*b*-Glu₂₅ und Glu₂₆ mit Diminazen als Funktion der Diminazen-Konzentration. Deutlich ist bei beiden Polymeren die Änderung der Konformation durch eine Zugabe des Diminazens zu erkennen.

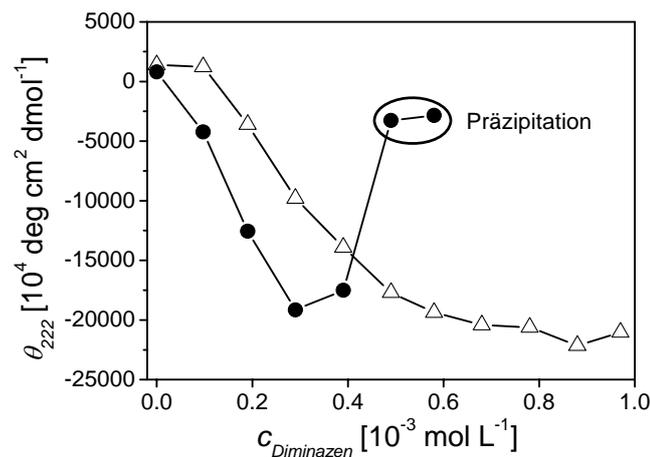


Abbildung 5.14 Molare Elliptizität θ_{222} der Komplexe von PEO-*b*-Glu₂₅ (Δ) und Glu₂₆ (\bullet) mit Diminazen als Funktion der Diminazen-Konzentration. Die Konzentration der Glutaminsäure-Monomere betrug 1.34 mM. θ_{222} ist angegeben als die molare Elliptizität einer Glutaminsäure-Einheit.

Die molare Elliptizität θ_{222} sinkt bei beiden Diminazen-Polymer-Komplexen von positiven Werten auf stark negative Werte und zeigt damit die Ausbildung einer α -Helix an. Der Diminazen-Glu₂₆-Komplex präzipitierte bei einem molaren Verhältnis von Diminazen zu Glutaminsäure-Einheiten von 0.22, die molare Elliptizität θ_{222} stieg dabei gleichzeitig wieder an. Dieses Verhalten konnte beim Diminazen-PEO-*b*-Glu₂₅-Komplex innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs nicht beobachtet werden. Die unterschiedliche Stabilität der Komplexe

kann durch den Einfluss der sterischen Stabilisierung der PEO-Ketten erklärt werden.

5.3. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde das Komplexierungsverhalten des gut wasserlöslichen Arzneistoffs Diminazen mit Blockcopolymeren aus PEO und der Aminosäure Glutaminsäure untersucht. Dabei blieb der PEO-Block konstant und die Länge der Glutaminsäure-Blöcke variierte. Die Anzahl der Glutaminsäure-Monomere im Poly-(glutaminsäure)-Block der Polymere betrug 6, 10, 16, 20 und 25. Durch die Komplexierung und Selbstorganisation von Diminazen mit PEO-*b*-Glu bilden sich Nanopartikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 32 nm und einem PDI von 0.1.

Diminazen bindet nur mit einer seiner beiden möglichen Bindungsstellen an PEO-*b*-Glu mit einer Bindungskonstante K in der Größenordnung von 10^4 M^{-1} . Der Anteil an gebundenem Diminazen liegt bei einem molaren Verhältnis von Glutaminsäure zu Diminazen von 8:1 nahe 100 %. Durch die Komplexbildung mit Diminazen wird die pH-abhängige Umwandlung der α -Helix des Poly-(glutaminsäure)-Blocks in die Knäuel-Konformation deutlich von pH 5 auf pH 12 verschoben. Diminazen stabilisiert damit effektiv die Sekundärstruktur der Poly-(glutaminsäure). Diminazen induziert durch Komplexierung die Bildung der α -Helix des Poly-(glutaminsäure)-Blocks bei pH-Werten, an denen der Glutaminsäure-Block ohne Diminazen in der Knäuel-Konformation vorliegt. Dieser stabilisierende Effekt des Diminazens könnte durch Ausbildung einer schützenden Schicht aus Diminazen und den PEO-Ketten als äußere Hülle bei Formierung der Nanopartikel entstehen.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der PEO-Block des Blockcopolymeren bei der Komplexierung mit Diminazen keinen Einfluß auf die Konformationsänderung der Poly-(glutaminsäure) hat.

Es ist daher zu vermuten, dass Diminazen ebenfalls die Sekundärstruktur von Peptiden mit einem großen Anteil an α -Helices bei Veränderung des pH-Wertes stabilisieren kann.

Referenzen

- ¹ Allen, C.; Maysinger, D.; Eisenberg, A. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1999**, *16*, 3-27
- ² Lavasanifar, A.; Samuel, J.; Kwon, G. S. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 169-190
- ³ Kwon, G. S.; Kataoka, K. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **1995**, *16*, 295-309
- ⁴ Lavasanifar, A.; Samuel, J.; Kwon, G. S. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 169-190
- ⁵ Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *47*, 113-131
- ⁶ Thünemann, A. F.; Beyermann, J.; Kukula, H. *Macromolecules* **2000**, *33*, 5906-5911
- ⁷ Thünemann, A. F.; M. Müller, Dautzenberg, H.; J.-F. Joanny, Löwen, H.; in *Advances in Polymer Science: Polyelectrolytes with Defined Molecular Architecture II*, Ed. Schmidt, M.; Springer-Verlag Berlin **2004**, Vol. 166, 113-171
- ⁸ Nishiyama, N.; Yokoyama, M.; Aoyagi, T.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K. *Langmuir* **1999**, *15*, 377-383
- ⁹ Thünemann, A. F. *Prog. Polym. Sci.* **2002**, *27*, 1473-1572
- ¹⁰ Thünemann, A. F.; Müller, M.; Dautzenberg, H.; Joanny, J.-F.; Löwen H. in *Adv. Polym. Sci.*, Vol. 168: Polyelectrolytes with Defined Molecular Architecture II, Springer: Berlin, **2004** pp. 113-171
- ¹¹ Ehtezazi, T. Govender, T.; Stolnik, S. *Pharmaceutical Research* **2000**, *17*, 871-878
- ¹² Govender, T.; Stolnik, S.; Xiong, C.; Zhang, S.; Illum, L.; Davis, S. S. *Journal of Controlled Release* **2001**, *75*, 249-258
- ¹³ Pilch, D. S.; Kirolos, M. A.; Liu, X. Y.; Plum, G. E.; Breslauer, K. J. *Biochemistry* **1995**, *34*, 9962-9976
- ¹⁴ Knorr, K.; Amidopyrazolylguanidine - Neue Haftmonomere für molekular geprägte Polymere, Dissertation **2003**, 11-12
- ¹⁵ Nilsson, S.; Zhang, W. *Macromolecules* **1990**, *23*, 5234-5239
- ¹⁶ Ravoo, B. J.; Jacquier, J.-C. *Macromolecules* **2002**, *35*, 6412-6416
- ¹⁷ Funasaki, N.; Sumiyoshi, T.; Ishikawa, S.; Neya, S. *Molecular Pharmaceutics* **2004**, *1*, 166-172

- ¹⁸ D'Amico, M. L.; Paiotta, V.; Secco, F.; Venturini, M. J. *Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 12635-12641
- ¹⁹ Liu, J.; Takisawa, N.; Kodama, H.; Shirahama, K. *Langmuir* **1998**, *14*, 4489-4494
- ²⁰ Wang, Y.; Chang, C. *Macromolecules* **2003**, *36*, 6503-6510
- ²¹ Harada, A.; Cammas, S.; Kataoka, K. *Macromolecules* **1996**, *29*, 6183-6188
- ²² Rinaudo, M.; Domard, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 6360-6364
- ²³ Finsy, R. *Advances in Colloid and Interface Science* **1994**, *52*, 79-143
- ²⁴ Gun'ko, V. M.; Klyueva, A. V.; Levchuk, Y. N.; Leboda, R. *Advances in Colloid and Interface Sciences* **2003**, *105*, 201-328
- ²⁵ Richardson, J. S.; Richardson, D. C. *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*; Plenum Press: New York, **1989**, pp 1-98
- ²⁶ Tanford, C.; Nozaki, Y.; Rohde, M. F. *J. Phys. Chem.* **1977**, *81*, 1555-1560