

6. Synthese von Blockcopolymeren durch Polymerisation von *N*-Carboxyanhydriden (NCA)

6.1. Einleitung

Lineare Blockcopolymere aus Polyethylenoxid (PEO) und einem Polypeptid-Block besitzen ein großes Potential für die Applikation *in vivo*, da sie aus biokompatiblen Bausteinen aufgebaut sind.¹ Copolymere aus PEO-*b*-poly-(glutaminsäure) und PEO-*b*-poly-(asparaginsäure) wurden intensiv untersucht, um sie als *drug delivery*-Systeme anzuwenden.^{2,3} PEO-*b*-poly-(lysin) hat sich beispielsweise als potentieller Vektor für den intrazellulären Transport von DNA erwiesen.⁴ Im Hinblick auf die Anwendung dieser Blockcopolymere *in vivo* ist es von besonderer Bedeutung, dass Polymere mit kontrollierbarem Molekulargewicht und enger Molekulargewichtsverteilung synthetisierbar sind, die eine Selbstorganisation der Polymere zu definierten Nanostrukturen gewährleisten.^{5,6}

Blockcopolymere aus PEO und einem Polypeptid-Block können mit Hilfe der ringöffnenden Polymerisation von α -Aminosäure-N-carboxyanhydriden (NCA) synthetisiert werden. Als Makroinitiator der Polymerisation dient dabei das primäre Amin α -Methoxy- ω -amino-poly-(ethylenoxid).^{7,8} Diese Methode führt allerdings unter Standardlaborbedingungen oft zu nicht definierten Produkten.⁹ Idealerweise verläuft das Kettenwachstum der Polymerisation von NCA mit α -Methoxy- ω -amino-poly-(ethylenoxid) (Makroinitiator) über eine nukleophile ringöffnende Reaktion, die als Amin-Mechanismus bekannt ist (Abbildung 6.1 a) und zu definierten Blockcopolymeren führt.^{9,10} Dieser Mechanismus kann als lebende Polymerisationsreaktion eingestuft werden, solange keine Nebenreaktionen während der Synthese auftreten.^{11,12} Aufgrund der basischen Eigenschaften der primären Aminfunktion am Makroinitiator ist gleichzeitig ein zweiter Reaktionsweg möglich. Dieser anionische Prozess ist bekannt als „Aktivierter Monomer-Mechanismus“ (Abbildung 6.1 b) und führt zu wenig definierten Polymeren.^{9,10}

In den letzten Jahren wurden drei unterschiedliche Möglichkeiten vorgeschlagen, den Anteil des aktivierten Monomer-Mechanismus bei der NCA-Polymerisation gering zu halten. Deming *et al.* berichten über die Verwendung von Übergangsmetallkomplexen zur Polypeptid-Synthese.⁹ Organo-Nickel-Verbindungen zeigten sich dabei als geeignet, um die Polymerisation verschiedenster NCA zu kontrollieren und definierte Blockcopolymere zu synthetisieren.¹³

Eine andere Möglichkeit, um den Reaktionsverlauf in Richtung der lebenden Polymerisation zu verschieben, wurde von Hadjichristidis *et al.* veröffentlicht.¹⁴

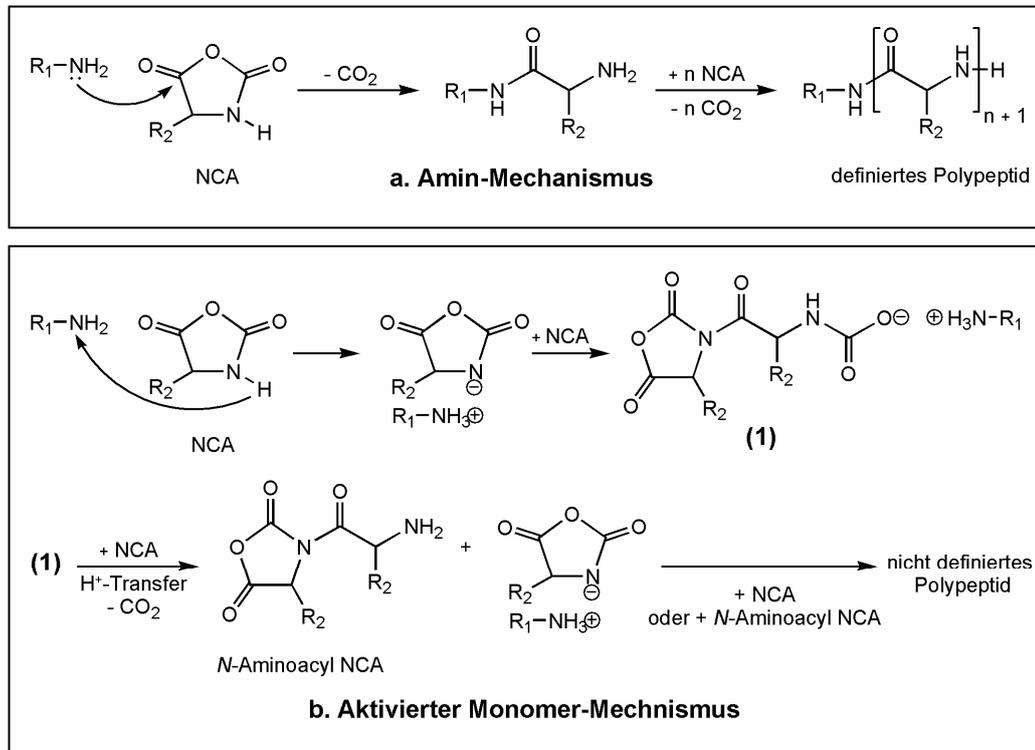


Abbildung 6.1 Mechanismus der Polymerisation der N-Carboxyanhydride von α -Aminosäuren. Der Amin-Mechanismus (a) führt zu definierten Blockcopolymeren. Als unerwünschte Nebenreaktion kann der aktivierte Monomer-Mechanismus (b) auftreten.

Bei dieser Methode wird die Verwendung von sehr starken nucleophilen Initiatoren mit einer Hochvakuum-Technik kombiniert. Dadurch kann der Anteil an Nebenreaktionen, der durch Verunreinigungen verursacht wird, sehr stark vermindert werden. Mit dieser Technik ist es möglich, Homopolypeptide und Blockcopolymere mit Polypeptid-Block mit einer sehr engen Molekulargewichtsverteilung zu erhalten.¹⁴ Schlaad *et al.* synthetisierten definierte Diblock-Copolymere aus Polystyren und einem Polypeptid-Block, indem sie das mit einer primären Aminogruppe funktionalisierte Polystyren (Makroinitiator) als Hydrochlorid einsetzten.¹⁵ Während der Polymerisation dissoziiert die Ammoniumchlorid-Funktion des Makroinitiators zu einem nucleophilen primären Amin und einem Proton, wodurch der aktivierte Monomer-Mechanismus verhindert wird.

In diesem Kapitel wird die Synthese der Diblock-Copolymere PEO-*b*-poly-(γ -benzylglutaminsäure) (PEO-*b*-poly-(BGlü)) und PEO-*b*-poly-(β -benzylasparaginsäure) (PEO-*b*-poly-(BAsp)) beschrieben, die die Vorstufen für die Blockcopolymere PEO-*b*-poly-(glutaminsäure) und PEO-*b*-poly-(asparaginsäure) darstellen. Die Carboxylfunktionen in den Seitenketten der Aminosäuren müssen dabei

eine Schutzgruppe tragen, um durch Phosgenierung eine Synthese der NCA aus den Aminosäuren zu ermöglichen.

Es wurde untersucht, ob die gewünschten Blockcopolymeren mit γ -Benzylglutaminsäure (BGlu) bzw. β -Benzylasparaginsäure (BAsp) und einem Ammoniumchlorid-funktionalisierten PEO-Makroinitiator¹⁵ synthetisiert werden können. Die Methode nach Schlaad *et al.* wurde ausgewählt, da sie mit vertretbarem experimentellem Aufwand durchgeführt werden kann. Darüber hinaus wird mit ihr der Einsatz von Übergangsmetallen vermieden, was im Hinblick auf eine spätere Anwendung der Copolymeren *in vivo* von besonderer Bedeutung ist.

6.2. Ergebnisse und Diskussion

Es wurde die Synthese der Blockcopolymeren PEO-*b*-poly-(BGlu) und PEO-*b*-poly-(BAsp) mit Initiierung durch PEO-NH₃⁺ Cl⁻ (Ammoniumchlorid-Methode nach Schlaad *et al.*) bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen untersucht. Der verwendete Makroinitiator α -Methoxy- ω -amino-poly-(ethylenoxid) besitzt einen Polymerisationsgrad (DP, *degree of polymerization*) von 110 und ein Molekulargewicht $M_n = 5000 \text{ g mol}^{-1}$. DP und M_n des PEO wurden durch ¹H-NMR bestimmt. Als Größe für den Peptid-Block wurde bei den Synthesen jeweils eine Länge von 10 Aminosäure-Einheiten angestrebt.

Tabelle 6.1 zeigt die experimentellen Bedingungen der Versuchsreihe, das Molekulargewicht (M_n), den Polymerisationsgrad DP und die Polydispersität (M_w/M_n) der synthetisierten Polymere. Der DP wurde mit Hilfe der ¹H-NMR berechnet. Eine weitere Methode zur Bestimmung des Molekulargewichts ist die Größenausschlußchromatographie. Unterschiede bei den durch ¹H-NMR und Größenausschlußchromatographie bestimmten Molekulargewichten können durch eine Wechselwirkung des Peptid-Blocks des Polymers mit der stationären Phase der Chromatographiesäule entstehen.

Die Verwendung von PEO-NH₃⁺Cl⁻ als Makroinitiator führt zu gut definierten Blockcopolymeren. Wird die Polymerisation durch PEO-NH₃⁺Cl⁻ initiiert, hat das resultierende Blockcopolymer eine deutlich engere Molekulargewichtsverteilung (M_w/M_n) als bei der Verwendung von PEO-NH₂ bei gleichen Reaktionsbedingungen (Tabelle 6.1, 1 und 2).

| | Makroinitiator | NCA | c_{NCA} [mol l ⁻¹] | $c_{NCA} : c_{Initiator}$ | T [°C] | Zeit [d] | M_n^a [g mol ⁻¹] | DP ^b | M_w/M_n^a |
|---|--|------|-------------------------------------|---------------------------|-----------|-------------|-----------------------------------|-----------------|-------------|
| 1 | PEO-NH ₂ | BGlu | 0.08 | 10 | 40 | 3 | 7600 | 12 | 1.20 |
| 2 | PEO-NH ₃ ⁺ Cl ⁻ | BGlu | 0.08 | 10 | 40 | 3 | 6400 | 6 | <1.05 |
| 3 | PEO-NH ₃ ⁺ Cl ⁻ | BGlu | 0.08 | 35 | 40 | 3 | 6000 | 8 | <1.05 |
| 4 | PEO-NH ₃ ⁺ Cl ⁻ | BAsp | 0.08 | 10 | 40 | 3 | 4500 | 2 | <1.05 |
| 5 | PEO-NH ₃ ⁺ Cl ⁻ | BAsp | 0.12 | 10 | 60 | 7 | 5400 | 8 | <1.05 |
| 6 | PEO-NH ₂ PEO-NH ₃ ⁺ Cl ⁻ | BAsp | 0.12 | 35 | 60 | 5 | 5900 | 8 | <1.05 |

^a Größenausschluss-Chromatographie in NMP

^b ¹H-NMR

Tabelle 6.1 Experimentelle Bedingungen und Eigenschaften der durch NCA-Polymerisation synthetisierten PEO-*b*-poly-(benzylaminosäuren). Angegeben sind die molaren Verhältnisse NCA zu Makroinitiator ($c_{NCA} : c_{Initiator}$), die Reaktionstemperatur (T), die Reaktionsdauer, das Molekulargewicht (M_n), der Polymerisationsgrad (DP) und die Polydispersität (M_w/M_n) der Polymere.

Das deutet darauf hin, dass die Verwendung von PEO-NH₃⁺ Cl⁻ bei der Polymerisation zu einer Reduktion der Nebenreaktionen führt und den Amin-Mechanismus bevorzugt. Gleichzeitig verringert sich aber auch die Umsatzrate des NCA- γ -BGlu bei gleichen Reaktionsbedingungen.

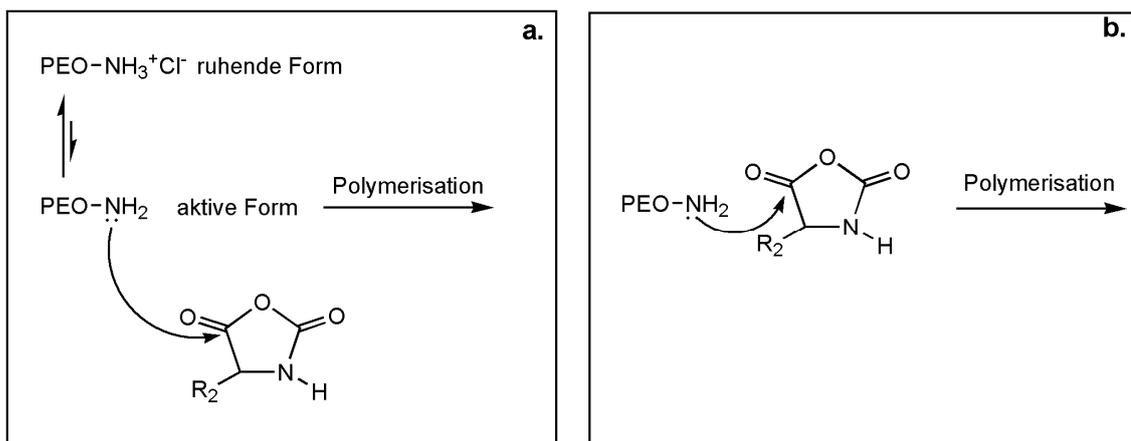


Abbildung 6.2 Mechanismus der NCA-Polymerisation initiiert durch PEO-NH₃⁺Cl⁻ (a) und durch PEO-NH₂ (b).¹⁵

Mit PEO-NH₂ als Makroinitiator entsprach nach einer Reaktionsdauer von drei Tagen der erreichte DP von 12 dem angestrebten DP. Im Gegensatz dazu war

der DP mit $\text{PEO-NH}_3^+ \text{Cl}^-$ nach drei Tagen deutlich niedriger als erwartet (Tabelle 6.1, 2). Dieses Ergebnis ist wahrscheinlich eine Folge der Initiierung der Polymerisation durch $\text{PEO-NH}_3^+ \text{Cl}^-$. Für die Initiierung mit $\text{PEO-NH}_3^+ \text{Cl}^-$ wurde vorgeschlagen, dass der Initiator in einem Gleichgewicht aus protonierter ruhender Form und einem kleinen Anteil deprotonierter aktiver Form vorliegt (Abbildung 6.2 a). Nur die deprotonierte Form ist in der Lage, die Polymerisationsreaktion zu starten.¹⁵ Dabei ist die Umsetzungsrate an NCA geringer als im Amin-System mit PEO-NH_2 (Abbildung 6.2 b). Der geringe DP ist dann die Folge der unvollständigen Umsetzung der NCA-Monomere.

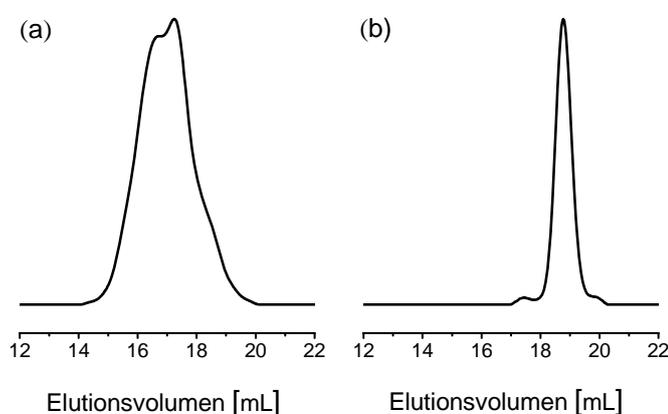


Abbildung 6.3 Elugramme der Größenausschluss-Chromatographie für $\text{PEO-}b\text{-poly-}(\gamma\text{-BGlu})$. Die Polymerisation erfolgte mit PEO-NH_2 (a) und $\text{PEO-NH}_3^+ \text{Cl}^-$ (b) als Makroinitiator (Tabelle 6.1, 1 und 3).

Um mit Hilfe der Ammoniumchlorid-Methode einen DP von 10 zu erhalten, wurde die Polymerisation von BGlu bei einem größeren Verhältnis von NCA zu Makroinitiator durchgeführt (Tabelle 6.1, 3). Unter diesen Verhältnissen wurde nach 3 Tagen Reaktionszeit ein DP näher an 10 erreicht. Die Struktur des dabei erhaltenen Blockcopolymeres wurde mit Größenausschlusschromatographie (Abbildung 6.3 b) und $^1\text{H-NMR}$ (Abbildung 6.4) untersucht. Die Molekulargewichtsverteilung (M_w/M_n) ist deutlich enger als bei Verwendung von PEO-NH_2 , der DP ist größer. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sind deutlich sowohl PEO als auch Poly-(BGlu) zu erkennen. Da das Polymer vor Messung des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums mit DMF bei -20°C aufgereinigt wurde, können die Signale der Poly-(BGlu) nicht von einer Verunreinigung der Probe mit Homopolymer der BGlu stammen. Der PEO-Block und der Poly-(BGlu)-Block sind somit kovalent miteinander verbunden. Die Signale des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums zeigen damit das Blockcopolymer $\text{PEO-}b\text{-poly-}(\text{BGlu})$.

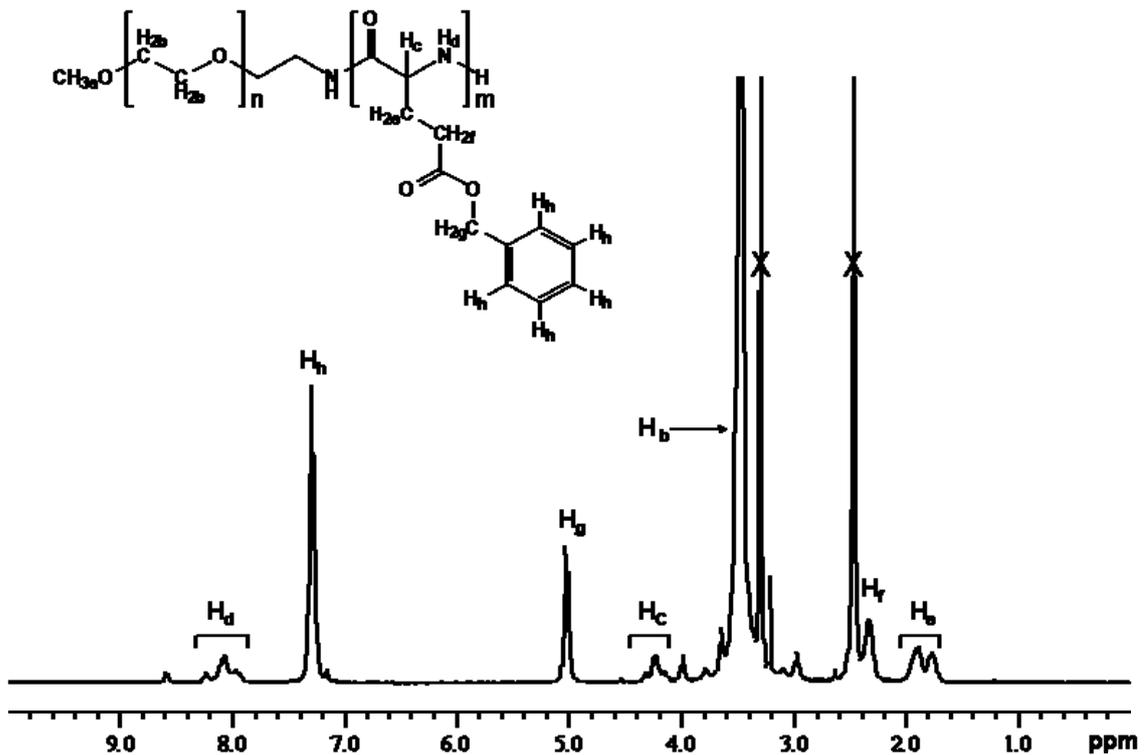


Abbildung 6.4 ¹H-NMR-Spektrum von PEO-*b*-poly(γ -Benzylglutaminsäure) (Tabelle 6.1, 3). Die Initiierung der Polymerisation erfolgte durch PEO-NH₃⁺ Cl⁻. Das Spektrum wurde in DMSO-*d*₆ bei 25 °C aufgenommen (X = DMSO-*d*₆, HDO).

Die Ammoniumchlorid-Makroinitiator-Methode wurde ebenfalls erfolgreich auf die Polymerisation von NCA-BAsp zu PEO-*b*-poly-(BAsp) angewendet. Zuerst wurde die Polymerisation mit PEO-NH₃⁺Cl⁻ als Makroinitiator unter den gleichen Bedingungen wie bei NCA-BGlu durchgeführt (vergleiche Tabelle 6.1, 2 und 4). Nach einer Reaktionszeit von 3 Tagen bei 40 °C hatte das entstandene Polymer einen sehr niedrigen DP von 2 (Tabelle 6.1, 4). Die Polymerisationsgeschwindigkeit von NCA-BAsp verläuft bei Initiierung mit PEO-NH₃⁺Cl⁻ sehr viel langsamer, verglichen mit der Polymerisation von NCA-BGlu unter identischen Reaktionsbedingungen. Um den Grad der Polymerisation der NCA-BAsp zu erhöhen, wurde die Polymerisation bei 60 °C und höherer Konzentration an NCA-BAsp durchgeführt (Tabelle 6.1, 5). Der DP konnte dadurch auf 8 erhöht werden, die Reaktionsdauer war aber mit 7 Tagen immer noch mehr als doppelt so lang wie für BGlu.

Um die benötigte Reaktionszeit für einen DP von 10 weiter zu verringern, wurde die Polymerisation von NCA-BAsp bei einem größeren Verhältnis von NCA-BAsp zu Initiator durchgeführt. Als Makroinitiator wurde eine 1:1-Mischung von PEO-NH₂ und PEO-NH₃⁺Cl⁻ (Tabelle 6.1, 6) verwendet. Die erhöhte Temperatur von 60 °C und die erhöhte Konzentration an NCA wurde beibehalten. Die 1:1-Mischung von PEO-NH₂ und PEO-NH₃⁺Cl⁻ wurde verwendet, um den Anteil des

an aktiver Spezies im Makroinitiator zu erhöhen (Abbildung 6.2) und damit die Reaktionsdauer der Polymerisation zu verringern, ohne dabei den aktivierten Monomer-Mechanismus zu fördern. Unter diesen Reaktionsbedingungen hatte das Copolymer PEO-*b*-poly-(BAsp) nach 5 Tagen einen DP von 8 (Tabelle 6.1, 6). Die Größenausschluss-Chromatographie ergab eine sehr enge Molekulargewichtsverteilung M_w/M_n von 1.05. Es ist also möglich, durch Einsatz einer Mischung aus PEO-NH₂ und PEO-NH₃⁺Cl⁻ die Reaktionsgeschwindigkeit der Polymerisation von NCA-BAsp zu erhöhen, ohne dass das Blockcopolymer eine breitere Molekulargewichtsverteilung erhält. Die Verwendung einer Mischung aus PEO-NH₂ und PEO-NH₃⁺Cl⁻ als Makroinitiator ermöglicht die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit und drängt gleichzeitig das Auftreten von Nebenreaktionen zurück.

6.3. Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde die Synthese von Blockcopolymeren, bestehend aus einem PEO-Block und einem Poly(benzylaminosäure)-Block, beschrieben. α -Methoxy- ω -amino-poly-(ethylenoxid) diente dabei als Makroinitiator. Als Aminosäuren wurden γ -Benzylglutaminsäure und β -Benzylasparaginsäure verwendet. Mit Hilfe der ringöffnenden Polymerisation der NCA der Benzylaminosäuren sollten Blockcopolymere mit enger Molekulargewichtsverteilung synthetisiert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass eine enge Molekulargewichtsverteilung durch den Einsatz der Ammoniumchlorid-Methode erreicht wird, indem PEO-NH₃⁺Cl⁻ als Makroinitiator verwendet wurde. Der als Nebenreaktion auftretende aktivierte Monomer-Mechanismus wurde zurückgedrängt, die Molekulargewichtsverteilung der synthetisierten Polymere war dabei sehr eng ($M_w/M_n < 1.05$). Gleichzeitig verlangsamte sich aber die Reaktionsgeschwindigkeit, verglichen mit einer durch PEO-NH₂ initiierten Polymerisationsreaktion bei ansonsten identischen Reaktionsbedingungen. Durch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur und die Verwendung einer Mischung von PEO-NH₃⁺Cl⁻ und PEO-NH₂ konnte die benötigte Reaktionsdauer deutlich vermindert werden. Dabei entstanden ebenfalls Polymere mit enger Molekulargewichtsverteilung.

Die Verwendung von PEO-NH₃⁺Cl⁻ als Makroinitiator bei der ringöffnenden Polymerisation von NCA-Benzylglutaminsäure bzw. NCA-Benzylasparaginsäure erlaubt die Synthese von Blockcopolymeren bestehend aus einem PEO-Block und einem Poly-(aminosäure)-Block mit enger Molekulargewichtsverteilung und definierter molekularer Struktur, was eine Selbstorganisation der Polymere zu definierten Nanostrukturen gewährleistet.

Referenzen

- ¹ Vandermeulen, G. W. M.; Klok, H. A. *Macromolecular Bioscience* **2004**, 4, (4), 383-398.
- ² Lavasanifar, A.; Samuel, J.; Kwon, G. S. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, (2), 169-190.
- ³ Li, C. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, (5), 695-713.
- ⁴ Kakizawa, Y.; Kataoka, K. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, (2), 203-222.
- ⁵ Klok, H. A.; Lecommandoux, S. *Advanced materials* **2001**, 13, (16), 1217-1229.
- ⁶ Förster, S.; Plantenberg, T. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, 41, (5), 688-714.
- ⁷ Deming, T. J. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, (8), 1145-1155.
- ⁸ Schlaad, H.; Antonietti, M. *European Physical Journal E* **2003**, 10, (1), 17-23.
- ⁹ Deming, T. J. *Journal Of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* **2000**, 38, (17), 3011-3018.
- ¹⁰ Penczek, S., *Models of Biopolymers by Ring-Opening Polymerization*. ed.; CRC Press, Inc.: Boca Raton, **1990**; p 388.
- ¹¹ Penczek, S.; Kubisa, P.; Szymanski, R. *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications* **1991**, 12, (2), 77-80.
- ¹² Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **1993**, 26, (7), 1787-8.
- ¹³ Deming, T. J. *Nature* **1997**, 390, (6658), 386-389.
- ¹⁴ Aliferis, T.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N. *Biomacromolecules* **2004**, 5, (5), 1653-1656.
- ¹⁵ Dimitrov, I.; Schlaad, H. *Chemical Communications* **2003**, (23), 2944-2945.