

Darstellung multivalenter
Peptid-Polymerkonjugate ausgehend
von Thioester-HPMA-Copolymeren zur
Beantwortung biologischer
Fragestellungen *in vitro* und *in vivo*

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

M. Sc.

Katharina Koschek

aus Neustadt in Oberschlesien

Berlin, August 2012

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2007 bis August 2012 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) im Forschungsverbund Berlin e.V. und am Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin unter Anleitung von Prof. Dr. Jörg Rademann durchgeführt.

1. Gutachter Prof. Dr. Jörg Rademann
2. Gutachter Prof. Dr. Rainer Haag

Tag der Disputation: 30.11.2012

Das Forschen ist an sich schon beinah die Entdeckung. Man findet immer, wenn man innig genug sucht; auf jede dringlich gestellte Frage kommt schließlich die Antwort. Oft zu unserem Schmerz.

Klaus Mann, aus „Der Wendepunkt“

Danksagung

Die folgenden Zeilen sind all denen gewidmet, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. J. Rademann für die interessante Themstellung, sein mir entgegen gebrachtes Vertrauen und den Freiraum während meiner Forschung. Prof. Dr. R. Haag danke ich für die Übernahme des Coreferates und des Prüfungsvorsitzes.

Danken möchte ich auch allen Kooperationspartnern für die gelungene Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich mich an dieser Stelle bei Dr. E. Brandenburg, Dr. O. Krylova und A. Bujotzek bedanken. An dieser Stelle möchte ich auch Dr. M. Dathe für die gute Zusammenarbeit und die Diskussionsbereitschaft danken.

Dafür, dass es meinen Zellkulturen immer gut ging, habe ich C. Eckert, S. Kleissle, S. Wojtke und J. Eckhard zu danken, die mich in zeitlichen Engpässen tatkräftig unterstützt haben. Der Screening Unit unter der Leitung von Dr. J.-P. von Kries möchte ich für die Bereitstellung eines Zellkulturarbeitsplatzes danken. J. Eichhorst danke ich für die Einführung in die konfokale Laserscanning-Mikroskopie sowie die Unterstützung bei komplizierten Fragestellungen. H. Nikolenko gilt ein großes Dankeschön für die zahlreichen Geräteeinführungen und die Einweisung in das Arbeiten mit Zellen und Dr. P. Schmieder für die Hilfe beim Messen von NMR-Spektren. Bedanken möchte ich mich außerdem bei meinen Korrekturlesern Dr. A. Horatscheck, Dr. K. Holland-Nell, Dr. V. Martos, Dr. J. Preidl und Dr. M. Röben, die sich meinem flotten Zeitplan angepasst haben.

Ich möchte mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die tolle Arbeitsatmosphäre bedanken. Des Weiteren danke ich Dr. S. Meyer, Dr. S. Grosskopf, F. Gottschalk, Dr. V. Martos, Dr. K. Holland-Nell, Dr. R. Raz, Dr. J. Preidl, Dr. G. Schäfer, Dr. A. Horatscheck, Dr. I. Fernández und Dr. A. El-Dashan für die vielen Diskussionen über chemische und nicht chemische Fragen und die ein oder andere gemeinsame Freizeitaktivität. Insbesondere danke ich Dr. S. Grosskopf für die speziellen Kulturerelebnisse in Berlin und Dr. I. Nickeleit für die zahlreichen Gespräche über die Zukunft und die Wissenschaft selbst.

M. Dreissigacker danke ich für die Unterstützung bei der Planung von Dienstreisen und Dr. L. Perepelitschenko danke ich recht herzlich für ihre stete Hilfsbereitschaft und ihre ansteckend gute Laune.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Förderung dieser Arbeit im Rahmen des SFB 765.

Ein besonders großes Dankeschön geht an meine Familie, die mich stets seelisch und moralisch unterstützt hat und an Marco, der ohne Wenn und Aber immer für mich da ist.

Zusammenfassung

Die Konjugation eines Wirkstoffs an ein biokompatibles Polymer generiert Systeme, die die bioaktive Substanz nicht nur zielgerichtet transportieren, sondern bei Bedarf kontrolliert abgeben können. Im Gegensatz zu ihrer freien Form verfügen polymergebundene Liganden, sowohl peptidischer als auch nicht-peptidischer Natur, über eine veränderte Pharmakokinetik und diverse Vorteile. Auf dem Gebiet der Polymertherapeutika ist Poly(*N*-2-Hydroxypropylmethacrylamid) (poly(HPMA)) gegenwärtig eines der aussichtsreichsten biokompatiblen Polymere, dessen Vielseitigkeit im Rahmen dieser Arbeit aufgezeigt wird.

Auf Basis von poly(HPMA) wurde ein thioesterfunktionalisiertes Copolymer entwickelt, welches an die vorliegenden biochemischen und medizinischen Fragestellungen flexibel angepasst werden konnte. RAFT-vermittelte Copolymerisationen von HPMA mit einem thioesterfunktionalisierten Monomer lieferten Thioester-HPMA-Copolymere, die mit cysteinylierten Liganden in NCL-Reaktionen beladen wurden und so einen schnellen und flexiblen Zugang zu maßgeschneiderten Peptid-Polymerkonjugaten lieferten.

Die zelluläre Aufnahme von Peptid-HPMA Konjugaten wurde in Abhängigkeit von ihrer Oberflächenladungen untersucht. Ausschließlich positiv geladene Peptid-Polymerkonjugate wurden in HeLa-Zellen internalisiert. Mit einer exzellenten Biokompatibilität und effizienten zellulären Aufnahme, stellten argininbeladende HPMA-Konjugate eine Alternative zum toxischen Zell-penetrierenden Peptid Nonaarginin dar und könnten als effiziente Trägersysteme biologisch relevanter Liganden für intrazelluläre Studien eingesetzt werden.

Die positiven Auswirkungen der Peptidkonjugation an die Thioester-HPMA-Copolymere im Hinblick auf den gezielten Transport an den Wirkort und den Schutz vor proteolytischem Abbau wurden in einem Projekt zur Früherkennung von Pankreaskrebs mit nichtinvasiven bildgebenden Verfahren genutzt. Für die Matrix-Metalloprotease 11 (MMP-11) als Biomarker für Bauchspeicheldrüsenkrebs wurden Substrat-Polymerkonjugate konzipiert, deren Umsatz bei der Spaltung durch das Enzym MMP-11 ein auf dem FRET-Effekt beruhendes Fluoreszenzsignal lieferte. Die ersten *in vivo*-Versuche an MIA PACA-Xenograft-Mäusen waren vielversprechend.

Zur Untersuchung der amyloidbildenden Eigenschaften von Modellpeptiden in Neuroblastomzellen wurde ein photolysierbarer Cumarinlinker zwischen das zu transportierende Peptid und den polymeren Träger eingeführt, der eine kontrollierte, photoinduzierte Freisetzung des bioaktiven Liganden am Wirkort ermöglichte. Die Konjugation der fluoreszenzmarkierten Peptide an ein HPMA-Linker-System sorgte nicht nur für den Transport, den Schutz und die photoinduzierte Freisetzung, sondern maskierte zudem die amyloidbildenden Eigenschaften. Nach erfolgter Internalisierung

zeigte das Modellpeptid nach Freisetzung Auswirkungen auf die Zellvitalität.

Im Hinblick darauf, dass viele biologische Prozesse auf Protein-Protein-Interaktionen beruhen, stellt die Konjugation mehrerer Kopien monovalenter Liganden an ein biokompatibles Polymer einen wichtigen Zugang zu multivalenten Systemen dar. Der Einfluss der polymeren Trägersysteme poly(HPMA), hyperverzweigtes Polyglycerin und Dextran auf die Interaktion mit den Tandem WW-Domänen (tWW) des forminbindenden Proteins FBP21 wurde kalorimetrisch bestimmt und in MD-Simulationen modelliert. Die multivalente Präsentation der Erkennungssequenz resultierte für alle betrachteten Polymere in einer signifikanten Steigerung der Bindungsaffinitäten, die in Abhängigkeit vom verwendeten Polymer und der Peptidbeladungsdichte variierten.

Im Rahmen dieser breit gefächerten Projekte konnte die Vielseitigkeit der HPMA-basierten Copolymere beispielsweise als Transportsystem biologisch relevanter Liganden für *in vitro* und *in vivo* Anwendungen oder als Trägersystem zur Darstellung multivalenter Liganden gezeigt werden.

Abstract

The conjugation of a drug on a biocompatible polymer generates drug delivery systems which transport and deliver the therapeutic agent into the tissue of interest. Polymer bound drugs of a peptidic or non-peptidic nature exhibit modified pharmacokinetics and diverse advantages compared to their free state. In the field of polymertherapeutics poly(*N*-2-hydroxypropylmethacrylamide) is one of the most promising biocompatible polymers. The versatile applications of poly(HPMA) will be shown within the scope of this work.

A thioester functionalized copolymer was developed based on poly(HPMA) which could be adapted to particular biochemical or medical problem at hand. RAFT-mediated copolymerisation of HPMA with a thioester functionalized monomer provided thioester-HPMA copolymers that enabled an NCL-reaction of cysteinylated ligands. Accordingly, thioester-HPMA copolymers provided fast and flexible access to tailor-made peptide-polymer conjugates.

The surface charge dependence of the cellular uptake of peptide-HPMA conjugates was studied. Exclusively positively charged conjugates were internalized into HeLa cells. Arginine loaded HPMA-conjugates showed not only an efficient internalization but exhibit an excellent biocompatibility in comparison to the cell-penetrating peptide nonaarginine. Accordingly, positively charged HPMA-conjugates could be applied as transport systems for biologically relevant ligands in intracellular studies.

The advantageous impact of peptide conjugation with respect to drug targeting and the stealth effect was used in pilot studies for the early diagnosis of pancreatic cancer using noninvasive imaging. The matrix-metallo-protease 11 (MMP-11) is a biomarker for pancreatic cancer. FRET based substrate-polymer conjugates have been developed that present a fluorescence signal upon enzymatic cleavage of MMP-11. Preliminary *in vivo* experiments on MIA PACA-xenograft mice showed promising results.

Targeted delivery was instrumental for determining the amyloid forming properties of model peptides in neuroblastoma cells. Therefore, a photocleavable coumarine linker was incorporated into the peptide-polymer conjugate which enabled a controlled, photoinducible delivery of the peptide onto the site of action. The conjugation of fluorescence labeled peptides on an HPMA-linker-system provided the transport, protection and photoinduced delivery of the peptide. Additionally, the polymer conjugation disabled amyloid formation. After internalization, the delivery of the peptide affected the cell viability.

As most biological processes are based on protein-protein-interactions, the conjugation of multiple copies of monovalent ligands on a biocompatible polymer provides an important access point to multivalent systems. The impact of the polymer scaffolds poly(HPMA), hyperbranched polyglycerol, and dextran on the interaction with tan-

dem WW-domains of the formin binding protein FBP21 was examined by isothermal calorimetry and was calculated in MD-simulations. The multivalent presentation of the recognition sequence resulted in a significant increase in the binding affinity for all polymers. The affinity varied slightly with a dependence on the polymer scaffold and the peptide loading density.

In the scope of the diverse projects, the versatility of the HPMA-based copolymers as drug carriers for *in vitro* and *in vivo* applications, or as polymer scaffold for the design of multivalent ligands was shown.

Inhaltsverzeichnis

I. Allgemeiner Teil	1
1. Einleitung	2
2. Polymertherapeutika	4
2.1. Eigenschaften und Vorteile polymerer Konjugate	4
2.1.1. Passives und aktives Drug Targeting	5
2.1.2. Multivalenzeffekt	7
2.2. Relevante Ligand-Polymerkonjugate	9
3. Poly(HPMA)	12
3.1. Freie Radikalische Polymerisation (FRP)	12
3.1.1. CTA-vermittelte radikalische Polymerisation	13
3.2. Lebende freie radikalische Polymerisation (LFRP)	14
3.2.1. ATRP	15
3.2.2. RAFT-Polymerisation	16
3.3. Synthesemethoden zur Darstellung von Ligand-HPMA-Konjugaten .	21
3.3.1. Polymeranaloge Reaktionen - Ligationsmethoden	22
4. Zielsetzung	25
II. Ergebnisse und Diskussion	27
5. HPMA-Thioester-Copolymere	28
5.1. Entwicklung des monomeren Bausteins	28
5.2. Monomersynthese	29
5.2.1. Reaktivität des Thioesters in einer NCL-Reaktion	31
5.2.2. Stabilität des Thioesters unter radikalischen Bedingungen . .	33
5.3. Copolymerisation mittels FRP und RAFT	34
5.3.1. FRP-vermittelte Copolymerisation	35
5.3.2. RAFT-vermittelte Copolymerisation	36
5.3.3. Chemische Homogenität der Copolymere	39
5.3.4. Abspaltung der RAFT-Funktionalität	40
5.4. Zusammenfassung	41

6. Projekt A: Zelluläre Aufnahme von Peptid-HPMA-Konjugaten	43
6.1. Zielsetzung	44
6.2. Peptid-HPMA-Konjugate	45
6.2.1. Zetapotential der Peptid-HPMA-Konjugate	46
6.2.2. Cytotoxizität der Peptid-HPMA-Konjugate	47
6.2.3. Zelluläre Aufnahme in Abhängigkeit von der Oberflächenladung	49
6.2.4. Untersuchungen zum Aufnahmehemodus	51
6.3. Zusammenfassung	53
7. Projekt B: Peptid-HPMA-Konjugate in bildgebenden Verfahren	55
7.1. Zielsetzung	57
7.2. Konzept zur <i>in vivo</i> -Anwendung peptidischer MMP-11 Substrate . .	57
7.2.1. Synthese NIRF-markierter Substrat-Polymerkonjugate	58
7.2.2. Charakterisierung der NIRF-Konjugate	60
7.3. <i>In vitro</i> -Imaging von NIRF-markierten Peptid-Polymerkonjugaten . .	62
7.3.1. Umsatzbestimmung auf Zellebene	62
7.3.2. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	62
7.4. <i>In vivo</i> -Imaging von NIRF-markierten Peptid-Polymerkonjugaten . .	64
7.5. Zusammenfassung	65
8. Projekt C: Intrazelluläre Freisetzung amyloidogener Peptide	67
8.1. Zielsetzung	69
8.2. Konzept	70
8.3. Synthese eines cysteinylierten Cumarinderivates	72
8.3.1. Darstellung von <i>N</i> -Boc- <i>N</i> '-(Bhcm)-ethylendiamin	72
8.3.2. Cystein-Kupplung an <i>N</i> -(Bhcm)-ethylendiamin	72
8.3.3. Acetylierung der freien Aminogruppe	75
8.4. Vorversuche zur Einführung photolabiler Gruppen	76
8.4.1. Testaktivierungen mit Bhc als Modellsubstanz	76
8.4.2. Testkupplung des Peptids VW18 an das aktivierte Bhc	76
8.4.3. Testabspaltung zur Peptidfreisetzung	78
8.5. Amyloidogene Peptid-HPMA-Konjugate	79
8.5.1. Labeling des VW18-Peptids	79
8.5.2. <i>Caging</i> des TAMRA-VW18 Peptids	81
8.5.3. NCL des <i>caged</i> -TAMRA-VW18 an ein Thioester-HPMA-Copolymer	81
8.5.4. Charakterisierung der <i>caged</i> -Verbindungen	82
8.6. Zelluläre Aufnahme des <i>caged</i> -TAMRA-VW18-HPMA-Konjugats . .	86
8.7. Zusammenfassung	90
9. Projekt D: Multivalenzeffekt in Abhängigkeit von der Polymerstruktur	92
9.1. Zielsetzung	94
9.2. Darstellung multivalenter Peptid-Polymerkonjugate	95
9.2.1. Polyglycerinbasierte Peptid-Polymerkonjugate	96

9.2.2. Dextranbasierte Peptid-Polymerkonjugate	97
9.2.3. poly(HPMA)-basierte Peptid-Polymerkonjugate	97
9.3. Multivalenzeffekte in Abhängigkeit von der Polymerstruktur	98
9.3.1. Bindungsaffinitäten der Ligand-Protein-Interaktionen	100
9.3.2. Bindungsmodus der Ligand-Protein-Interaktionen	104
9.4. Zusammenfassung	106
10. Zusammenfassung	107
10.1. Entwicklung von Thioester-HPMA-Copolymeren	107
10.2. Zelluläre Aufnahme von Peptid-HPMA-Konjugaten	108
10.3. Peptid-HPMA Konjugate in bildenden Verfahren	109
10.4. Intrazelluläre Freisetzung amyloidogener Peptide	110
10.5. Multivalenzeffekt in Abhängigkeit von der Polymerstruktur	111
III. Experimenteller Teil	112
11. Allgemein	113
11.1. Verwendete Methoden und Geräte	113
11.2. Spektroskopische Methoden	114
11.3. Chromatographische Methoden	114
11.4. Reinigung von Polymeren	116
11.5. Biophysikalische Methoden	116
11.5.1. Zetapotential	116
11.5.2. Cirkulardichroismus (CD)	117
11.5.3. Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	118
11.6. Zellbiologische Methoden	119
11.6.1. Allgemeine Verfahrensweisen zur Zellkultivierung	119
11.6.2. Verwendete Zelllinien	119
11.6.3. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)	120
11.6.4. Durchflusszytometrie (FACS)	120
12. Synthesevorschriften	122
12.1. Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	122
12.1.1. AAV 1 - Copolymerisation	122
12.1.2. AAV 2 - Peptidsynthese	122
12.1.3. AAV 3 - Native Chemische Ligation	123
12.1.4. AAV 4 - Native Chemische Ligation im Puffer	123
12.1.5. AAV 5 - Thiol-Maleimid-Kupplung	124
12.2. Darstellung der Monomere	125
12.2.1. Darstellung der Thioester als Monomervorläufer	125
12.2.2. <i>N</i> -Methacryloyl- β -alanin- <i>S</i> -benzylthioester (NMAS) (4)	125
12.3. RAFT-Reagenzien (CTAs)	128
12.3.1. 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)sulfanyl)pentansäure (3)	128

12.3.2. 4-Cyano-4-(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanylpentansäure (12)	129
12.4. Reaktivität des Thioesterfragments 8 in NCL-Reaktionen	131
12.5. Stabilität des Thioesterfragments 8 unter radikalischen Bedingungen	131
12.6. Copolymerisationen	133
12.6.1. Freie radikalische Polymerisation	133
12.6.2. RAFT-Polymerisationen	133
12.7. Projekt A: Zelluläre Aufnahme von Peptid-HPMA-Konjugaten . . .	138
12.7.1. Darstellung von <i>N</i> -L-Cysteinyl-5-aminofluorescein (13)	138
12.7.2. Peptidsynthese	140
12.7.3. Darstellung von Peptid-HPMA-Konjugaten	141
12.7.4. Bestimmung der Zetapotentiale	143
12.7.5. Bestimmung der Cytotoxizität - MTT-Test	143
12.7.6. Zelluläre Aufnahme in HeLa-Zellen	144
12.8. Projekt B: Peptid-HPMA-Konjugate in bildgebenden Verfahren . . .	145
12.8.1. Verwendete Peptidsequenzen - MMP-11-Substrate	145
12.8.2. Kupplung der Substrate an poly(HPMA)	145
12.9. Projekt C: Intrazelluläre Freisetzung amyloidogener Peptide	147
12.9.1. <i>N</i> -(<i>N</i> -Boc-S-Trt-L-Cys)- <i>N</i> '-Ac- <i>N</i> '-(Bhcm)-ethylendiamin (15)	147
12.9.2. Verwendete Peptidsequenzen	152
12.9.3. Optimierung der Aktivierungsbedingungen am Bhc	152
12.9.4. Testkupplungen am VW18-Wang-Harz mit aktiviertem Bhc .	153
12.9.5. Kupplung der photolabilen Schutzgruppe an die Lysin-Seitenkette des TAMRA-VW18-Peptids	153
12.9.6. Kupplung amyloidogener Peptide an poly(HPMA)	154
12.9.7. Zelluläre Aufnahme des <i>caged</i> -TAMRA-VW18-HPMA Konjugats	154
12.9.8. Bestimmung der Sekundärstruktur	155
12.10 Projekt D: Multivalenzeffekte in Abhängigkeit von der Polymerstruktur	155
12.10.1. Verwendete Peptidsequenzen	155
12.10.2. Kupplung prolinreicher Liganden an poly(HPMA)	155
12.10.3. Kupplung prolinreicher Liganden an hyperverzweigtes Polygly- cerin (hPG)	156
12.10.4. Kupplung prolinreicher Liganden an Dextran	156
12.10.5. Proteinexpression FBP21	157
12.10.6. ITC-Messungen	157
12.10.7. Theoretische Betrachtungen der Ligand-Protein-Interaktion mit Hilfe von MD-Simulationen	157
13. Literatur	159
A. Anhang	176
A.1. NMR-Spektren	176
A.2. LC-MS-Daten	187
A.3. ITC-Daten	191

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Ac	Acetyl
Ahx	Aminohexansäure
Äq.	Äquivalente
Ar	Aromat
ATRP	Atom Transfer Radical Polymerization
Bhc	(6-Bromo-7-hydroxy-4-hydroxymethyl)cumarin
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bu	Butyl
bzw.	beziehungsweise
bzgl.	bezüglich
CD	Circulardichroismus
CDI	Carbonyldiimidazol
CNP	Chlorameisensäure-4-nitrophenylester
CPP	cell-penetrating peptide (Zell-penetrierendes Peptid)
CTA	chain transfer agent (Kettenübertragungsreagenz)
DC	Dünnschichtchromatographie, Dünnschichtchromatogramm
DCM	Dichlormethan
DIC	<i>N, N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAc	Dimethylacetamid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Disuccinimidcarbonat
E	Diethylether
EE	Ethylacetat
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et	Ethyl
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting)
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FMP	Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie
ges.	gesättigt
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde
halbges.	halbgesättigt
HATU	2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorophosphat
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
hPG	hyperverzweigtes Polyglycerin

HPMA	<i>N</i> -2-Hydroxypropylmethacrylamid
HSPG	Heparansulfatproteoglykan(e)
<i>i</i>	iso
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
kat.	katalytisch
K _D	Dissoziationskonstante
konz.	konzentriert
M	Molekül der charakteristischen Verbindung (Massenspektrometrie)
MD	Molekulardynamik
Me	Methyl
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
MMP	Matrix-Metalloprotease
MS	Massenspektrum, Massenspektrometrie, Molsieb
N	Stöchiometrie
NCL	Native Chemische Ligation
NIRF	Near-Infrared-Fluorophore (Fluorophor im nahe Infrarotbereich)
NMAS	<i>N</i> -Methacryloyl- β -alanin- <i>S</i> -benzylthioester
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (magnetische Kernresonanz)
PEG	Polyethylenglykol
Pfp	pentaffluorphenyl
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
PGA	Polyglutamat
PHNS	poly(HPMA- <i>co</i> -NMAS)
PRS	Prolin-rich-sequence(s) (Prolin-reiche Sequenz(en))
Ph	Phenyl
q	quartär
RAFT	Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer
R _f	Ratio of front (Retentionswert für die DC)
RT	Raumtemperatur
Smp.	Schmelzpunkt
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEA	Triethylamin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
Trt	Trityl
u. a.	unter anderem
ver.	verdünnt
WE	Wiederholungseinheit(en)

Teil I.

Allgemeiner Teil

1. Einleitung

Don Juan Manuel begründet die Art und Weise, wie er seine Lebensweisheiten in Geschichten verpackt, folgendermaßen¹: „Dies tat ich, dem Beispiele der Ärzte folgend, die, wenn sie eine Medizin zum Nutzen der Leber bereiten wollen, Zucker, Honig oder eine andere süße Sache hinzutun, weil die Leber das Süße liebt. Und wegen der Neigung der Leber zum Süßen zieht sie es an sich, und mit ihm die Medizin, die ihr guttut. Das Gleiche macht man mit dem beliebigen Organ, das einer Medizin bedarf, indem man sie jeweils mit demjenigen mischt, welchem das Organ von Natur aus zuneigt.“^[1]

In seinem Vorwort thematisiert Don Juan Manuel bereits im 14. Jahrhundert ein großes Problem der Pharmakotherapie und beschreibt gleichzeitig eine sehr einfache Grundvorstellung dessen, was heute als *Drug Targeting* bezeichnet wird.

Bei den meisten klinisch verwendeten Medikamenten handelt es sich um niedermolekulare Substanzen (typischerweise > 500 g/mol), die sowohl in krankes als auch in gesundes Gewebe diffundieren und sich im gesamten Körper gleichmäßig verteilen. Das führt dazu, dass am gewünschten Zielort nur ein Teil der applizierten Dosis wirkt. Der Arzneistoff muss aufgrund des fehlenden zielgerichteten Wirkstofftransportes in hohen effektiven Dosen verabreicht werden (z. B. Hochdosis-Chemotherapie bei Krebserkrankungen), wobei der überschüssige Teil der Dosis für negative systemische Nebenwirkungen sorgt. Insbesondere im Hinblick auf die Toxizität von Zytostatika und die Langzeitanwendung von Antirheumatika und Immunsuppressiva sind die negativen Auswirkungen ihres geringen therapeutischen Indices (Verhältnis der letalen zur wirksamen Dosierung LD_{50}/ED_{95}) gravierend. Darüber hinaus ist die Halbwertszeit polarer, niedermolekularer Substanzen im Blutkreislauf relativ kurz, weil sie über die Niere schnell ausgeschieden werden (*Renal Clearance*).^[2,3]

Neben den konventionellen Medikamenten gelten zahlreiche Peptide und Proteine aufgrund ihrer biologischen Aktivität als potentielle Therapeutika. Das Interesse an peptidischen Strukturen ist enorm und liegt darin begründet, dass alle zellulären Prozesse, wie die Signaltransduktion, der Metabolismus und die interzelluläre Kommunikation auf Protein-Protein Interaktionen basieren.^[4] Im Wesentlichen sind kurze, spezifische Peptidmotive für die eigentliche Interaktion verantwortlich. Peptide als Therapeutikum oder als biochemisches Tool sind daher von großer Relevanz für die Aufklärung diverser Wechselwirkungsprozesse auf molekularer Ebene.

Der fehlenden Selektivität und Bioverfügbarkeit sowohl peptidischer als auch nicht-peptidischer Arzneistoffe steht das Konzept des Drug Targeting (gezielte Pharmakotherapie) gegenüber, welches eine zielgerichtete und selektive Anreicherung des

¹Auszug aus dem Vorwort zu einer Sammlung von Lebensweisheiten von Don Juan Manuel, „El conde de Lucanor“, Manuskript erschien um 1335, Erstdruck Clásicos Castalia, Madrid 1575

Arzneistoffs am gewünschten Ort ermöglicht. Dazu werden die Arzneistoffe bzw. die entsprechenden bioaktiven Moleküle mit polymeren Materialien anstatt mit „Honig“ oder „Zucker“ zu polymeren Therapeutika „gemischt“, die über die chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften der Polymere gezielt Organe und Zellen adressieren können. Bei der Kosmetik- und Arzneimittelherstellung war die bisherige Rolle der Polymere darauf beschränkt in Form von Additiven (als Füllstoff, Stabilisator, Trägersubstanz), den Arzneistoff in die richtige Darreichungsform zu bringen. Inzwischen hat sich die Kombination von Polymeren mit Arzneistoffen zu polymeren Pharmaka als innovatives und zukunftsweisendes Forschungsgebiet erwiesen.

2. Polymertherapeutika

Eine Reihe sogenannter Drug Delivery Systeme (DDS) ist Gegenstand vergangener und aktueller Forschung. DDS sind Arzneiträgersysteme, die pharmazeutische Wirkstoffe oder andere bioaktive Substanzen an den gewünschten Wirkort ausliefern. Systeme, in denen die Liganden lediglich über physikalische Wechselwirkungen in Nanopartikeln (Emulsionen, Liposomen) eingeschlossen sind, werden als nanopartikuläre DDS bezeichnet. Im Gegensatz dazu sind in Ligand-Polymerkonjugaten die bioaktiven Moleküle kovalent an polymere Systeme gebunden.^[2] Proteine wie Albumin, als auch natürliche Polymere wie Dextran und synthetische Polymere wie Polyethylenglykol (PEG) und Poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamid) (poly(HPMA)) werden als polymere Basis verwendet. Zu dieser Art der DDS zählen polymere Arzneimittel, Wirkstoff-Polymerkonjugate, Polymer-Proteinkonjugate, polymere Mizellen und Polyplexe (Polyelectrolyt-Komplexe mit Oligonukleotiden) und repräsentieren die Klasse der „Polymertherapeutika“. ^[5] Ringsdorf hat das Potential der Polymerkonjugate in der Medizin erkannt und in einem allgemein gültigen Modell (Abbildung 2.1) ein polymeres System skizziert, dessen pharmakokinetische Eigenschaften durch die Kombination von Transportgruppen (z. B. Antikörpern oder Zuckerresten) mit Funktionalitäten, die als Löslichkeitsvermittler fungieren, und durch die multiple Präsentation eines Pharmakons maßgeschneidert werden können. ^[6]

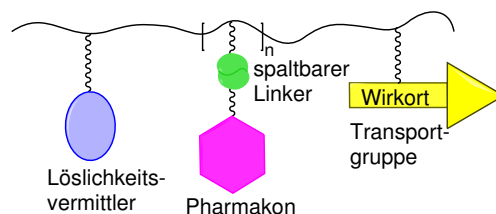


Abbildung 2.1.: Ringsdorfs Modell.^[2,6]

Die für die Darstellung der Ligand-Polymerkonjugate eingesetzten synthetischen Polymere sollten biokompatibel, wasserlöslich, nicht toxisch und biologisch abbaubar oder eliminierbar sein. Mit seinen Vorstellungen über den grundsätzlichen Aufbau solcher Systeme hat Ringsdorf die Entwicklung auf dem Gebiet entscheidend mitgeprägt. ^[6]

2.1. Eigenschaften und Vorteile polymerer Konjugate

Durch die Kombination eines Wirkstoffs mit einem Polymer (kovalent gebunden oder eingebettet) werden DDS generiert, die die bioaktive Substanz nicht nur zielge-

richtet transportieren (Drug Targeting),^[7] sondern bei Bedarf kontrolliert abgeben können (Controlled Drug Release).^[8] Im Gegensatz zu ihrer freien Form verfügen die Ligand-Polymerkonjugate, sowohl peptidischer als auch nicht-peptidischer Natur, über eine veränderte Pharmakokinetik und diverse Vorteile. Die schützende Funktion des Polymers (Stealth Effekt) ermöglicht längere Zirkulationszeiten und sorgt für den Erhalt der biologischen Aktivität während des Transportes zum Wirkungsort der Substanzen.^[9] Der Stealth Effekt ist insbesondere für Peptide und Proteine wichtig, die durch proteolytischen Abbau systemisch schnell eliminiert werden. Darüber hinaus bewirkt die Konjugation peptidischer Liganden an polymere Trägersysteme eine Reduktion der Antigenität und folglich auch das Ausbleiben einer Immunantwort.^[9,10]

Im Hinblick auf nicht-peptidische Moleküle steigert die Immobilisierung an oder die Einbettung in ein Polymer zudem die Wasserlöslichkeit und damit die Bioverfügbarkeit der oftmals hydrophoben und schlecht löslichen Substanzen.^[10]

2.1.1. Passives und aktives Drug Targeting

Die Verbesserung der Pharmakokinetik geht außerdem mit der Fähigkeit der DDS einher, durch passives oder aktives Drug Targeting organ- bzw. zellspezifisch zu agieren.^[10] Die passive Anreicherung von Makromolekülen in Tumorgewebe wurde in den 1980er Jahren von Maeda *et al.* als Enhanced Permeability and Retention Effekt (EPR) beschrieben.^[11,12] Dieses Phänomen basiert auf den physiologischen und biochemischen Unterschieden maligner Tumoren im Vergleich zum gesunden Gewebe. Die erhöhte Permeabilität von Makromolekülen geht auf die Fenestrierungen (größere Öffnungen) der Endothelzellen von Kapillargefäßen zurück. Im Vergleich zu kleinen Molekülen, die sowohl durch die Kapillarwände von Endothelzellen im gesunden als auch im kranken Gewebe diffundieren, ist die Diffusion der Makromoleküle ausschließlich auf krankes Gewebe beschränkt. Die limitierte Lymphdrainage trägt zusätzlich zur Akkumulation der polymeren Systeme in Tumoren bei. Allerdings spielt die Größe der Polymere eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme ins Tumorgewebe, da ausschließlich für Polymere mit einem Molekulargewicht größer 20 kDa der EPR-Effekt beobachtet wurde. Beim Design des polymeren Trägers sollte bei der Entscheidung über die Größe des polymeren Trägers zusätzlich die Nierenschwellenwerte für Substanzen mit Molekulargewichten in der Größenordnung von 30 bis 50 kDa berücksichtigt werden, da ein Ausscheiden über den Harn in dieser Größenordnung nicht möglich ist.^[13]

Neben dem molekulargewichtsabhängigen, passiven (EPR-Effekt-vermitteltem) Drug Targeting können pathologische Zellen spezifisch adressiert werden.^[7] Für diese aktive gezielte Pharmakotherapie werden Polymerkonjugate mit entsprechenden Transportgruppen (homing devices) versehen wie z. B. Antikörpern, Oligosacchariden oder Peptiden, die mit im Zielgewebe charakteristischen, überexprimierten Rezeptoren oder Antigenen interagieren und so den zielgerichteten Transport der Makromoleküle verstärken. Vor allem im Hinblick auf malignes Gewebe, welches sich in einer frühen Entwicklungsphase befindet und dementsprechend nur unvollständig ausgebildete Blutgefäße besitzt, erweist sich das aktive Drug Targeting als essentiell.^[9]

Zelluläre Aufnahme von Makromolekülen

Auf zellulärer Ebene findet die Internalisierung makromolekularer Systeme über endozytotische Mechanismen statt.^[14] Endozytose ist ein energieabhängiger Transportprozess und wird in die beiden Kategorien Phagozytose (Zellfressen) und Pinozytose (Zelltrinken) unterteilt, wobei in beiden Fällen die Aufnahme in Vesikeln stattfindet. Die Phagozytose wird ausschließlich zur Aufnahme und zur Beseitigung großer Partikel, wie Pathogene und tote Zellen, von spezialisierten Zellen betrieben (Makrophagen, Monozyten). Im Gegensatz dazu findet die Pinozytose in allen eukaryotischen Zellen statt und dient der Aufnahme gelöster Partikel. Je nachdem, ob die Substanzen aus dem extrazellulären Zellmedium oder durch vorherige Adsorption und Akkumulation an der inneren Membran des sich ausbildenden Vesikels aufgenommen werden, wird zwischen Fluid-Phase und adsorptiver Endozytose unterschieden.^[15] Eine spezifische und sehr effiziente Form der Pinozytose ist die rezeptorvermittelte Endozytose, bei der Liganden der aufzunehmenden Substanz an hoch-affine Rezeptoren in der Zellmembran binden und über endozytotische Vesikel aufgenommen werden.^[16]

Bei der Ausbildung der Transportvesikel wird zwischen vier Endozytosetypen unterschieden: der Makropinozytose, der clathrin- und caveolinvermittelten Endozytose und der clathrin- und caveolinunabhängigen Endozytose.^[17] Bei der Makropinozytose wird ein großes Volumen der extrazellulären Umgebung durch aktintriebene Membranausstülpungen in großen Vesikeln ($>1 \mu\text{m}$) aufgenommen. Bei der clathrin- und caveolinvermittelten Endozytose werden Einstülpungen der Membran ausgebildet. Im Fall der caveolinvermittelten Aufnahme ist das dimere Protein Caveolin beteiligt, welches Cholesterin in der Plasmamembran bindet und durch Selbstassoziation das Vesikel mit einer Schicht aus dünnen Streifen überzieht.

Bei der clathrinvermittelten Endozytose (CME) handelt es sich bei den Membranausstülpungen um sogenannte Clathrin-Coated Pits, aus denen durch Anlagerung von weiterem Clathrin die Clathrin-coated Vesikel (CCV) entstehen.^[17,18] Die Ausbildung der beschichteten Ausstülpungen wird durch die Bindung von Liganden an hoch-affine Rezeptoren ausgelöst (rezeptorvermittelte Endozytose), wie z. B. LDL (Low-Density-Lipoprotein), welches an spezifische LDL-Rezeptoren an der Zelloberfläche bindet.^[19,20] Die CCVs werden unter Beteiligung des Proteins Dynamin in einem GTP-getriebenen Vorgang abgeschnürt und als endozytotische Vesikel von der Membran abgelöst. Nach Abstreifen der Clathrinhülle fusionieren diese frühen Endosomen mit anderen Vesikeln zu späten Endosomen, die einen pH-Wert von 5-6 aufweisen. In den späten Endosomen dissoziieren Liganden und Rezeptoren und werden recycelt, während das Vesikel mit den aufgenommenen Substanzen mit Lysosomen fusioniert, in denen ein pH-Wert von 4 herrscht. Für die Regulierung des niedrigen pH-Wertes sorgen eine V-Typ ATPase, die pro ATP-Molekül zwei Protonen in die Lysosomen transportiert, und ein entsprechender Gegenionentransporter.^[21] Unter diesen aciden Bedingungen sind in den Lysosomen Enzyme wie Proteasen, Esterasen, Lipasen und Phosphatasen aktiv. Der pH-Wert und die enzymatische Aktivität können beim Design der Ligand-Polymerkonjugate durch das Einbringen entsprechend spaltbarer Gruppen genutzt werden.^[8] DeDuve hat bereits in den 1970er Jahren das Potenti-

al der Akumulation von Pharmaka in Lysosomen (Lysosomotropie) und die hohe enzymatische Aktivität für das Drug Delivery erkannt.^[22] Die Lysosomotropie oder auch acid trapping bezeichnet die Akkumulation schwacher Basen mit lipophilen Eigenschaften in Lysosomen, deren Membran ausschließlich für neutrale, ungeladene Moleküle durchlässig ist.

2.1.2. Multivalenzeffekt

Im Hinblick darauf, dass viele biologische Prozesse auf multivalenten Protein-Protein und Protein-Ligand Wechselwirkungen basieren, stellen Ligand-Polymerkonjugate einen wichtigen Ausgangspunkt zur Entwicklung potenter Wirkstoffe dar. Die Relevanz der Multivalenz für die Spezifität von Protein- und Zellinteraktionen hat Ehrlich bereits Ende der 1970er Jahre beschrieben.^[23] Insbesondere auf dem Gebiet der Protein-Kohlenhydrat Wechselwirkungen, die eine wichtige Rolle bei der Bindung des Influenzavirus an die Zelloberfläche spielen, wurden multivalente Interaktionen von der Gruppe um Whitesides intensiv erforscht.^[24]

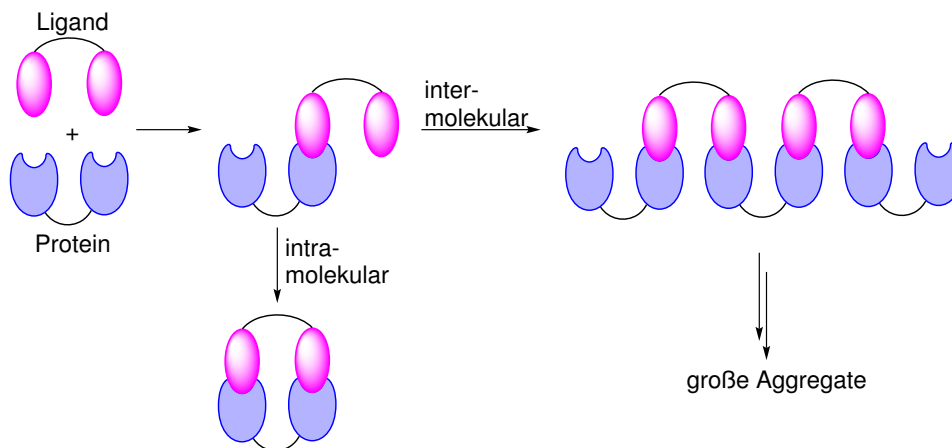


Abbildung 2.2.: Intramolekulare (multivalente) *vs.* intermolekulare Bindungen.

Der Multivalenzeffekt tritt bei Bindungsvorgängen auf, an denen gleichzeitig Interaktionen zwischen einer Mehrzahl von Liganden und Rezeptoren beteiligt sind.^[25] Dabei finden nicht nur multivalente Interaktionen im Sinne von intramolekularen Bindungen statt, sondern es sind auch intermolekulare Wechselwirkungen möglich (Abbildung 2.2). Welcher der beiden unterschiedlichen Bindungsmodi in multivalenten Interaktionen bevorzugt auftritt, hängt von der sogenannten effektiven Konzentration C_{eff} ab.^[26] Die C_{eff} steht für die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Interaktion zwischen zwei reaktiven Gruppen stattfindet und stellt eine reale bzw. lokale Konzentration eines der Interaktionspartner aus Sicht des Gegenspielers dar. Das Konzept der C_{eff} beschreibt folglich multivalente Interaktionen als konzentrationsabhängig, wobei bei niedrigen Konzentrationen bevorzugt intramolekulare und bei hohen Konzentrationen intermolekulare Wechselwirkungen stattfinden.^[26–28] Im Gegensatz zu den definierten

Strukturen, die aus multivalenten Bindungen resultieren, führen intermolekulare Bindungen zur Ausbildung großer und damit einhergehend unlöslicher Aggregate. Die Wechselwirkungen polyvalenter Rezeptoren und Liganden können durchaus eine Kombination aus intra- und intermolekularen Bindungsprozessen darstellen.^[26] Vor diesem Hintergrund spielen Größe und Form der Polymere bei der Entwicklung multivalenter Systeme eine große Rolle. Beispielsweise gelten partikuläre Systeme und Dendrimere mit ihren dreidimensionalen Strukturen im Nanometermaßstab als intermolekular bindende Interaktionspartner.^[29,30]

Die Thermodynamik multivalenter Wechselwirkungen wurde von Whitesides *et al.* in einem Review ausführlich beschrieben.^[25] Die Änderung der freien Energie ΔG in multivalenten Bindungsprozessen ergibt sich aus den Anteilen der dabei auftretenden Enthalpie ΔH - und Entropieänderungen ΔS und wird durch die beiden Gleichungen 2.1 und 2.2 beschrieben:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.1)$$

$$\Delta G = -RT\ln K \quad (2.2)$$

Im Hinblick auf die Enthalpie kann der Beitrag zur Änderung der freien Energie in Abhängigkeit von der Beschaffenheit der miteinander wechselwirkenden Systeme enthalpisch günstig oder ungünstig sein. Geht die Interaktion des zweiten und n -ten Liganden mit einem, im Vergleich zur Bindung des ersten Liganden, größeren Enthalpiegewinn einher, ist die Wechselwirkung enthalpisch begünstigt. Nimmt der Ligand jedoch eine für den Bindungsvorgang ungünstige Konformation ein, kann die multivalente Interaktion enthalpisch ungünstig sein.

Der Entropiebeitrag ist eine Summe von einzelnen Entropieanteilen, die sich aus den Änderungen der Translations-, Rotations-, und Konformationsentropie und aus dem Beitrag der Entropieänderung der das System umgebenden Wassermoleküle ergibt (Gleichung 2.3).

$$\Delta S = \Delta S_{\text{trans}} + S_{\text{rot}} + S_{\text{conf}} + S_{\text{H}_2\text{O}} \quad (2.3)$$

Ursprünglich wurde angenommen, dass der Multivalenzeffekt der Interaktionen größtenteils von der Entropieänderung bestimmt wird. Für den Fall einer intramolekularen und enthalpisch begünstigten Wechselwirkung ist die Bindungsenthalpie proportional zur Anzahl der stattfindenden Bindungsprozesse und der dabei auftretende Entropieverlust entspricht lediglich demjenigen einer monovalenten Interaktion. Der daraus resultierende Entropiegewinn begünstigt daher intramolekulare Wechselwirkungen, deren Energiebilanz allein von der Änderung der Konformationsentropie abhängt. Übersteigt der Beitrag der Konformationsentropie den Gewinn ändert sich der Bindungsmodus entsprechend zu intermolekularen Interaktionen. Diese Überlegungen setzen allerdings voraus, dass der Entropiebeitrag multivalenter im Vergleich zu den entsprechenden monovalenten Bindungen generell günstig für die Gesamtbilanz ist.^[25,26]

Diese idealisierte Vorstellung steht allerdings im Kontrast zu den stark negativen Entropieänderungen, die tatsächlich in multivalenten Systemen auftreten können.^[31] Letztendlich resultiert die Bindungsaffinität einer multivalenten Interaktion aus der Summe von Enthalpie- und Entropiebeiträgen, die sich verstärken oder kompensieren können, so dass beide Beiträge bei der Entwicklung multivalenter Systeme berücksichtigt werden müssen.^[26]

2.2. Relevante Ligand-Polymerkonjugate

Bereits seit den 1950er Jahren wird intensiv am Design polymerbasierter Wirkstoffe geforscht. Zu den wichtigen Errungenschaften gehören im Jahr 1955 die von Jatzkewitz durchgeführte Synthese von *N*-Vinylpyrrolidin-Konjugaten mit Glycyl-L-Leucin-Mescaline als Wirkstoff und die ersten klinischen Tests des von Breslow entwickelten ersten synthetischen polymeren Antitumormittels Divinylethermaleinsäureanhydrids (DIVEMA) in den 60er Jahren. Beim erstgenannten handelt es sich um eine neue Formulierung des Arzneimittels, die durch das Drug Targeting für eine Anreicherung des Medikaments sorgt.^[10] Das Pyran-Copolymer DIVEMA stellt selbst ein Antitumormittel dar, welches allerdings aufgrund hoher Toxizität in der klinischen Studie gescheitert ist.^[5]

Das Fundament für den nächsten Meilenstein haben in den 1970er Jahren die Pionierarbeiten von Davis, Abuchowski und ihre Kollegen gelegt, die das erste PEG-Proteinkonjugat hergestellt haben. Diese Technik (PEGylierung) erhöht die Löslichkeit und die Stabilität der Proteine und reduziert die Induktion einer Immunantwort.^[32,33] 1990 ist schließlich die PEGylierte Adenosindeaminase (Monomethoxypolyethylenglykolsuccinimidyl)-11, 17-adenosindeaminase (Adagen[®]) als erstes Protein-Polymerkonjugat auf dem Markt erschienen.

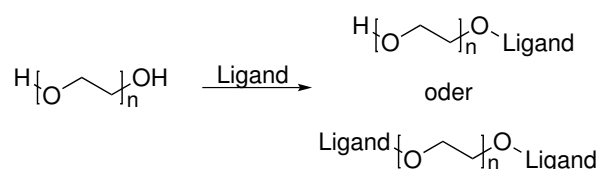


Abbildung 2.3.: PEGylierung.

Ein Nachteil der PEG-Systeme ist allerdings, dass ausschließlich die beiden Endgruppen der PEG-Kette zur Anknüpfung von Liganden zur Verfügung stehen (Endgruppen-System)(Abbildung 2.3).^[34] Die sich daraus ergebende geringe Wirkstoff bzw. Ligand-Kapazität limitiert die Anwendung der PEG-Systeme als Wirkstoff-Polymerkonjugate beispielsweise in der Krebstherapie.^[35]

Die Anwendung natürlicher, bioabbaubarer Polymere wie z. B. Dextran und Polyglutaminsäure (PGA) ist ein naheliegender Gedanke im Hinblick auf deren Biokompatibilität. Die nötigen Modifikationen am Dextranrückgrat für die Anknüpfung von Wirkstoffen haben allerdings die Eigenschaften des Dextrans grundlegend verändert.

2. Polymertherapeutika

Betragen die Modifikationen mehr als 5%, wird aus dem vorher bioabbaubarem Dextran ein biostabiles Polymer, welches sogar eine Immunantwort induzieren kann. Im speziellen Fall des Doxorubicin-Dextran-Konjugats wurde im Laufe der Phase I Studie eine unerwartet hohe Toxizität beobachtet.^[35-37]

Im Gegensatz dazu erwies sich das Paclitaxel-PGA-Konjugat mit hohen tolerierbaren Verabreichungsdosen und einer guten Resonanz gegenüber nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (non-small-cell lung cancer (NSCLC)) als effizientes Konjugat in Phase I/II und befindet sich bereits in der klinischen Phase III.^[38] Im Vergleich zu anderen bioabbaubaren Polymeren zeichnet sich PGA dadurch aus, dass es in nicht toxische Metabolite abgebaut wird. Die Kenntnisse über die Abbaumechanismen und die dabei gebildeten Produkte fehlen oftmals, sind aber wichtige Entscheidungskriterien beim Einsatz bioabbaubarer Polymere für medizinische Anwendungen. Wird das Polymerrückrat zu früh abgebaut, führt dies zu einer unkontrollierten Freisetzung des Wirkstoffes vor Erreichen des eigentlichen Wirkortes. Im Fall von Paclitaxel-PGA werden 14% der Substanz durch unspezifischen hydrolytischen Abbau vorzeitig abgegeben.^[35]

Im Bereich der synthetischen nicht-bioabbaubaren Polymere, die auf dem Ringsdorf Modell¹ basieren, hat es 1994 ein Doxorubicin-Polymerkonjugat als Chemotherapeutikum (FCE 28068) auf Basis von *N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid (HPMA) (Abbildung 2.4) in die klinische Studie geschafft.^[39,40] HPMA war in den frühen

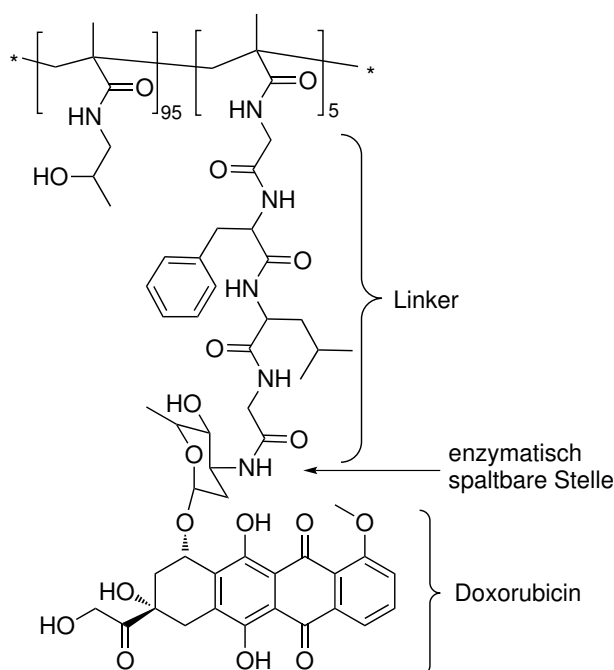


Abbildung 2.4.: HPMA copolymer-Gly-Phe-Leu-Gly-Doxorubicin (PK1; FCE28068).

¹Kapitel 2, Abbildung 2.1

1970er Jahren das Resultat einer systematischen Erforschung der Zusammenhänge von der Struktur hydrophiler Polymere und ihrer Biokompatibilität. J. Kopeček und seine Kollegen haben HPMA als Methacrylamidmonomer aufgrund seiner kristallinen Beschaffenheit, seiner hydrolytisch stabilen Seitenketten in der polymerisierten Form und seiner hydrophilen Eigenschaften und der damit einhergehenden Löslichkeit ausgewählt und die ersten Homo- und Copolymerisationen etabliert.^[41-43] Poly(HPMA) und HPMA-Copolymere haben in Versuchen mit Ratten keine Immunantwort induziert und erfüllen daher eine der wichtigsten Grundvoraussetzungen als biopolymere Trägersysteme, die Biokompatibilität.^[44] Seit seiner Entdeckung wurden in den Gruppen und in Kooperationen von Kopeček, Duncan, Ulbrich und Ringsdorf zahlreiche HPMA-Copolymer-basierte Wirkstoffkonjugate hergestellt, von denen sich einige in der klinischen Entwicklung befinden. Das Platinat-HPMA-Konjugat ProLindac[™] (AP5346) ist eines der zahlreichen Konjugate und ist zur Zeit der vielversprechendste Kandidat aus der HPMA-Schmiede.^[45] Einen Überblick über die vielfältigen HPMA-basierten Konjugate geben diverse Reviews.^[46-50]

Poly(HPMA) ist gegenwärtig das aussichtsreichste Biopolymer, dessen Potential und vielseitige Anwendbarkeit im Fokus dieser Arbeit stehen.

3. Poly(HPMA)

Die Anwendung von poly(HPMA) als biologisches Tool in der Medizinischen Chemie erfordert einen Zugang zu entsprechend funktionalisierten HPMA-Copolymeren. Die ersten Untersuchungen von Kopeček haben gezeigt, dass HPMA mit hydrophoben Monomeren, wie z. B. Styrol oder Methacrylsäure copolymerisiert werden kann.^[42] Darauf basierend wurden diverse HPMA-Copolymere durch das Anwenden verschiedener Polymerisationsarten dargestellt.

3.1. Freie Radikalische Polymerisation (FRP)

Copolymere von HPMA mit reaktiven *N*-methacryloylierten Funktionalitäten oder *N*-methacryloylierten Peptiden bzw. Wirkstoffen wurden anfänglich durch radikalische Fällungscopolymerisationen^[43] oder freie radikalische Lösungscopolymerisation^[51–53] synthetisiert.

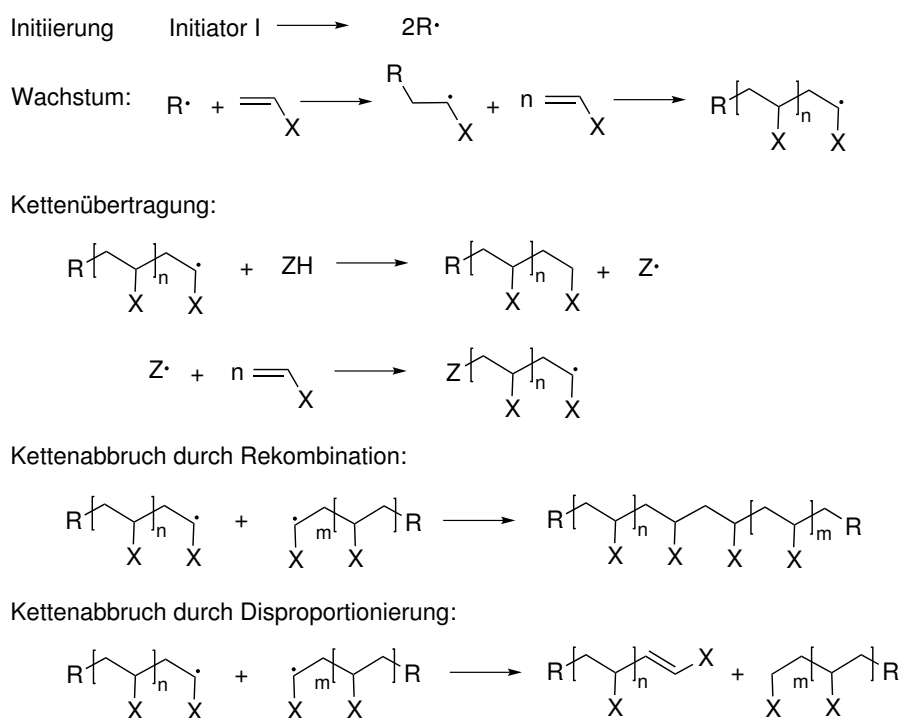


Abbildung 3.1.: Mechanismus der FRP am Beispiel einer Vinylverbindung.

Radikalische Polymerisationen zeichnen sich generell durch einen Initiierungsschritt aus, bei dem aus einem Initiator oder auch Radikalstarter durch thermischen oder photolytischen Zerfall freie Radikale gebildet werden (Abbildung 3.1). Diese lagern in der Wachstumsreaktion Monomermoleküle an, bis das Kettenwachstum durch eine der Abbruchreaktionen wie Rekombination, Disproportionierung und Kettenübertragung beendet wird. Ein entscheidender Nachteil der freien radikalischen Polymerisation ist die breite Molmassenverteilung der erhaltenen Polymere, die eine Folge der Abbruchreaktionen ist. Die Molmassenverteilungen von Polymeren können mathematisch mit den Verteilungsfunktionen nach Gauss, Poisson und Schulz-Flory beschrieben werden. Die Schulz-Flory-Verteilung ist charakteristisch für Polymerisationen mit Kettenabbruchreaktionen, wie sie in freien radikalischen Polymerisationen vorliegen. Die Polydispersität, also das Verhältnis von Masse- und Zahlenmittel der Molmasse ($PDI = M_w/M_n$) einer Schulz-Flory-Verteilung entspricht exakt zwei. Bei höheren Umsätzen ist die Verteilung der Polymere aus radikalischen Polymerisationen breiter und folgt nicht mehr der Schulz-Flory-Verteilung.^[54]

Die Anwendung HPMA-basierter Copolymere in biologischen Systemen insbesondere im Hinblick auf *in vivo* Versuche erfordert allerdings definierte Systeme mit entsprechend engen Molmassenverteilungen. Dementsprechend müssen Polymere einer freien radikalischen Polymerisation vor ihrem Einsatz mit Größenausschlussssäulen in Fraktionen mit engverteilten Molmassen fraktioniert werden.

3.1.1. CTA-vermittelte radikalische Polymerisation

Bis zu einem gewissen Grad kann die Molmassenverteilung einer freien radikalischen Polymerisation durch den Einsatz von Thiol-basierten Kettenüberträgern (chain transfer agent (CTA)) beeinflusst werden. Durch die Wahl der eingesetzten Thiole können die Eigenschaften und die Funktionalitäten der dabei gebildeten semitelechelen Polymere¹ (ST-Polymere) beeinflusst werden.^[55] Mechanistisch betrachtet

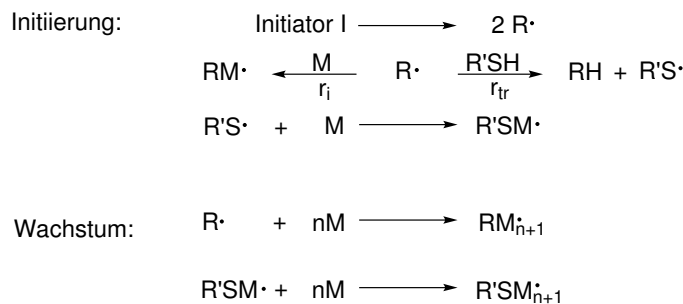


Abbildung 3.2.: Mechanismus der CTA-vermittelten Polymerisation.^[55]

unterscheidet sich die CTA-vermittelte Polymerisation von der klassischen FRP durch

¹Telechele Polymere sind Polymere mit reaktiven funktionellen Gruppen an den Polymerkettenenden.

3. Poly(HPMA)

zwei unterschiedliche Initiierungsschritte. Das Kettenwachstum kann also entweder von einem Radikal aus dem Initiatorzerfall oder einem Thiol-Radikal initiiert werden (Abbildung 3.2). Es ist daher wichtig, eine niedrige Initiatorkonzentration im Vergleich zur CTA-Konzentration einzusetzen, um mögliche Konkurrenzreaktionen auszuschließen. Beim Terminierungsschritt wird im Idealfall die wachsende Kette auf den Regler

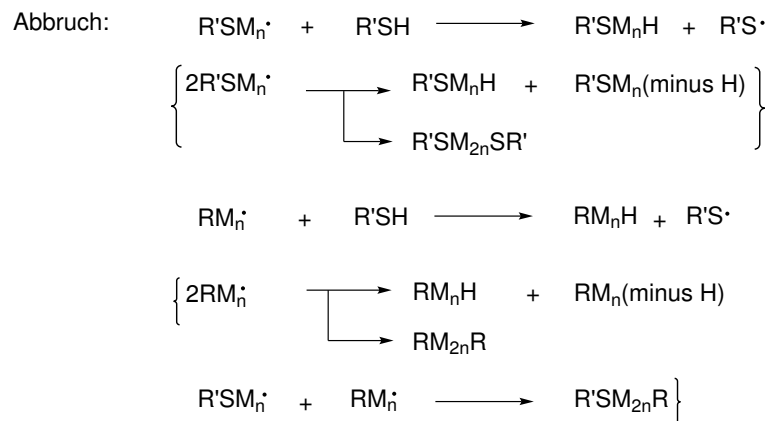


Abbildung 3.3.: Terminierungsschritt der CTA-vermittelten Polymerisation.^[55]

übertragen, so dass hauptsächlich ein ST-Polymer mit enger Molmassenverteilung erhalten wird.

Z.-R. Lu aus der Gruppe von Kopeček hat Ende der 1990er Jahre die freie radikalische Polymerisation von HPMA in Gegenwart von Methyl-3-mercaptopropionat (MMP) als CTA durchgeführt und erhielt poly(HPMA) als ST-Polymer mit endständigen Carboxyfunktionalitäten. Bei höheren Umsätzen resultieren allerdings unerwünschte Abbruchreaktionen in nicht-Regler terminierten Polymerketten, Disproportionierungsprodukten und Rekombinationsprodukten, die eine breitere Molmassenverteilung nach sich zogen (Abbildung 3.3). Die CTA-vermittelte Polymerisation von HPMA ist lediglich zur Synthese von poly(HPMA) mit kleinen Molmassen bei geringen Umsätzen geeignet, was den generellen Einsatz dieser Methode limitiert.^[55,56]

3.2. Lebende freie radikalische Polymerisation (LFRP)

Einen direkten Zugang zu engverteilten Polymeren liefern die von Szwarc^[57] entdeckten, „lebende“ freie radikalische Polymerisationen (LFRP), in denen durch die Wahl der Reaktionsbedingungen und den Zusatz spezieller Reagenzien der kinetische Verlauf der Polymerisation kontrolliert wird. In lebenden Polymerisationen bleibt das polymerisierende Kettenende aktiv, bis es kontrolliert terminiert wird. Eine Grundvoraussetzung dafür ist die Abwesenheit von Übertragungs- und Abbruchreaktionen. Der entscheidende Vorteil von LFRP ist, dass Konstitution, Kettenaufbau und Kettenlänge der Polymere maßgeschneidert konstruiert werden können. Charakteristisch für Polymere nach einer LFRP ist die enge Molmassenverteilung, die sich in

niedrigen Polydispersitäten (PDI <1.5) widerspiegelt und mathematisch durch eine Poisson-Verteilung beschrieben werden kann.^[54]

Es existieren verschiedene Verfahren, der LFRP: i) Stable Free Radical Polymerization (SFRP), bei der Nitroxyl-Radikale verwendet werden (TEMPO), ii) Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP), bei der Komplexe von Übergangsmetallen in Kombination mit Alkylhalogeniden eingesetzt werden und iii) Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Polymerization (RAFT) unter Verwendung von Di- und Trithioestern in Kombination mit einem Radikalstarter. Diese Verfahren sind sogenannte inifertervermittelte Polymerisationen. Iniferter sind Substanzen, die gleichzeitig als *Initiator*, *transfer agent* (Kettenüberträger) und *Terminierungsgenz* wirken (Ini-fer-ter) und spielen eine entscheidende Rolle in lebenden Polymerisationen.^[58] Im Folgenden werden lediglich die HPMA-relevanten Verfahren ATRP und RAFT diskutiert.

3.2.1. ATRP

Eine übergangsmetallkatalysierte lebende radikalische Polymerisation ist die Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP), die im Jahr 1995 von M. Sawamoto und von K. Matyjaszewski unabhängig voneinander entdeckt und beschrieben wurde.^[59,60] Das Herzstück der Reaktion ist ein Übergangsmetallkatalysator, der für das einheitliche Kettenwachstum und dementsprechend niedrige PDIs verantwortlich ist. Der Katalysator sorgt dafür, dass ein Gleichgewicht zwischen der aktiven wachsenden Polymerkette und einer nicht-aktiven, sogenannten schlafenden Form der Polymerkette besteht. Das Gleichgewicht liegt bevorzugt auf Seite der inaktiven, stabileren schlafenden Spezies, so dass die Konzentration wachsender Ketten gering ist und Nebenreaktionen wie Abbruch- und Rekombinationsreaktionen minimiert werden. Als Katalysatoren werden am häufigsten Kupfersalze aufgrund ihrer Redoxeigenschaften, ihrer Affinität zu Halogeniden und ihrem Komplexierungsvermögen verwendet. Das eingesetzte Cu(I)-Salz wird als Komplex mit bidentaten Stickstoff-Liganden eingesetzt, die zum einen die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln und zum anderen die Position des Redoxgleichgewichts beeinflussen.

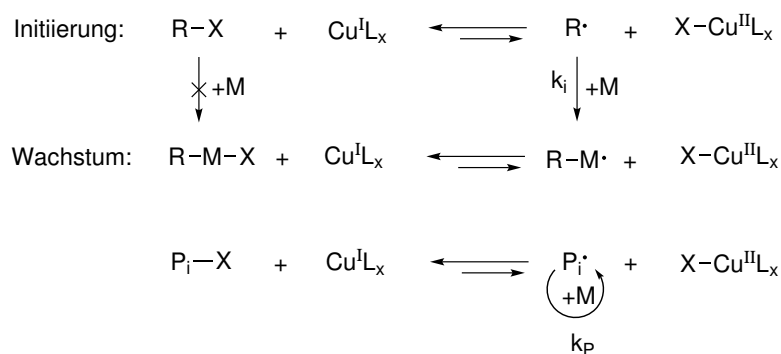


Abbildung 3.4.: Mechanismus der ATRP.^[60]

3. Poly(HPMA)

Der Initiierungsschritt einer ATRP ist eine Redoxreaktion zwischen einer Kupfer(I)-Spezies als Katalysator und einem Alkylhalogenid RX als Initiator, bei der das Halogen-Atom X auf das oxidierte Kupfer ($X-Cu(II)-L_x$) übertragen und gleichzeitig ein Alkylradikal ($R\cdot$) ausgebildet wird. Das so erzeugte Radikal reagiert mit Monomeren und erzeugt eine wachsende Kette, die wiederum mit der $Cu(II)$ -Spezies reagiert, dabei die reduzierte Form des Katalysators regeneriert und selbst in die Form der schlafenden Spezies übergeht. Diese schnelle Redoxreaktion zwischen der wachsenden Kette und der oxidierten Form des Katalysators ist verantwortlich für eine geringe Radikalkonzentration während der Polymerisation und die Unterdrückung von Terminierungsreaktionen (Abbildung 3.4). Das fertige Polymer zeichnet sich durch eine enge Molmassenverteilung aus und eine ATRP-charakteristische Halogenfunktionalität.^[60]

Matyjaszewski *et al.* konnten die ATRP auf eine Vielzahl von Monomeren in Gegenwart diverser Funktionalitäten erfolgreich anwenden. Eine Ausnahme bilden Methacrylamide und insbesondere das Monomer HPMA. Wang und Matyjaszewski verwendeten für die Polymerisation von HPMA einen Cu -Komplex mit Me_6TREN (Tris(2-dimethylaminoethyl)amin) und MCP (Methyl-2-chlorpropionat) (Abbildung 3.5).^[61,62]

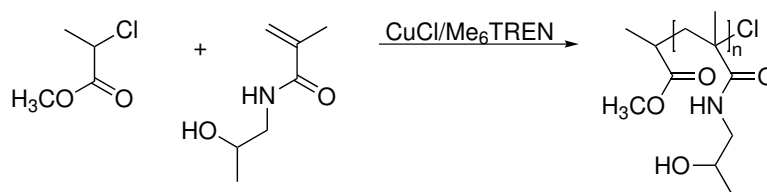


Abbildung 3.5.: ATRP-vermittelte Polymerisation von HPMA.^[61,62]

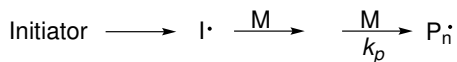
Das so gebildete poly(HPMA) zeichnete sich zwar durch einen geringen PDI (1.3) aus, die Molmassen waren allerdings größer als theoretisch berechnet und die Umsätze waren auch nach langen Reaktionszeiten gering. In weiterführenden Experimenten wurden die geringen Umsätze mit der Inaktivierung des Katalysators begründet, die mechanistischen Hintergründe sind allerdings nicht vollständig geklärt.^[62]

3.2.2. RAFT-Polymerisation

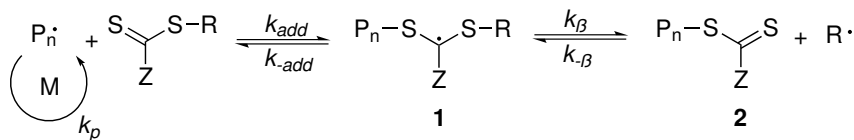
In einer typischen FRP ist die relativ hohe Radikaldichte für Abbruchreaktionen verantwortlich und die daraus resultierende breite Molmassenverteilung. Es ist daher plausibel, dass in einer kontrolliert ablaufenden Polymerisation die wachsenden Polymerketten nicht gleichzeitig aktiv sein dürfen. In einem RAFT-Prozess werden reaktive Transfersubstanzen eingesetzt, die ein Gleichgewicht zwischen aktiven und inaktiven Polymerketten herstellen und so das Molekulargewicht und die Polydispersität einer konventionellen radikalischen Polymerisation kontrollieren. Als Iniferter werden Dithioester, Dithiocarbamate, Xanthate oder Trithiocarbonate verwendet.^[63,64] Vergleichbar zur FRP werden die Radikale durch die Verwendung typischer thermisch labiler Initiatoren generiert, die anschließend an Monomermoleküle addieren (Initia-

tion, Abbildung 3.6). Diese wachsenden Polymerkettenradikale ($P_n\cdot$) reagieren mit der Kohlenstoff-Schwefel-Doppelbindung eines RAFT-Moleküls, bilden ein labiles Intermediat **1**, welches fragmentiert und dabei eine inaktivierte schlafende Form der Polymerkette (**2**) und ein Radikal $R\cdot$ ausbildet (reversible Kettenübertragung und Wachstum), das wiederum eine neue wachsende Polymerkette ($P_m\cdot$) initiiert (Reinitiation). Die schlafende Kette **2** zeichnet sich wie das eingesetzte RAFT-Molekül durch eine Dithiocarbonatfunktionalität aus und ist dementsprechend selbst ein Kettenüberträger. Es bildet sich ein Gleichgewicht zwischen wachsenden und schlafenden Ketten aus, die in einer Serie von reversiblen Additions-, und Fragmentierungsschritten involviert sind (Kettengleichgewicht und Wachstum).

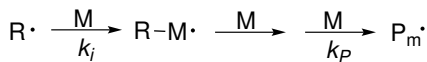
Initiierung:



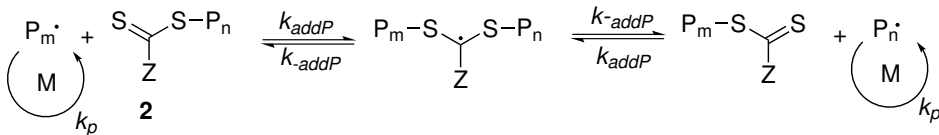
Reversible Kettenübertragung / Wachstum:



Reinitiiierung:



Kettengleichgewicht / Wachstum:



Abbruch:

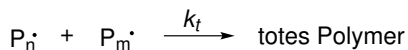


Abbildung 3.6.: Mechanismus der RAFT-vermittelten Polymerisation.^[65]

Aus dem Mechanismus der RAFT-Polymerisation ergeben sich bestimmte Kriterien, die für einen kontrollierten Ablauf erfüllt sein müssen: i) die Kettenübertragung muss schnell sein, ii) der Rest R muss eine gute homolytisch spaltbare Abgangsgruppe sein und gleichzeitig eine neue Polymerisation initiieren können und iii) die Anzahl an Polymerketten muss während der gesamten Polymerisation konstant bleiben.^[66]

Für eine effiziente Übertragung muss das gebildete Intermediat durch die Spaltung der schwachen S-R Bindung fragmentieren. Ist dieser Schritt zu langsam, wird zum einen die Polymerisation gebremst und das Intermediat fragmentiert zu den Ausgangsprodukten. Zum anderen steigt durch die höhere Lebensdauer freier Radikale

die Wahrscheinlichkeit von Nebenreaktionen durch Rekombination. Der Rest R muss daher sowohl eine bessere Abgangsgruppe sein als die oligomere Polymerkette, als auch effizient eine neue wachsende Polymerkette reinitiiieren. Der Rest Z dagegen verändert die Reaktivität des RAFT-Moleküls und beeinflusst die Additions-, und Fragmentierungsgeschwindigkeiten. Für eine gute RAFT-Effizienz müssen die Reste Z und R passend zu den Monomer-, bzw. Oligomerreaktivitäten ausgewählt werden.^[65]

Für eine kontrolliert ablaufende Reaktion ist es wichtig, dass die Anzahl wachsender Ketten konstant ist. Das setzt voraus, dass das Wachstum für alle Ketten gleichzeitig startet und so eine einheitliche Kettenlänge gewährleistet ist. Vorausgesetzt, dass alle RAFT-Moleküle jeweils eine schlafende Polymerkette ergeben, ist die Anzahl bzw. die Konzentration gestarteter Polymerketten identisch mit der Anfangskonzentration der RAFT-Substanz ($[\text{RAFT}]_0$). Am Ende der Polymerisation kann die Konzentration der Polymerketten durch Gleichung 3.1 beschrieben werden:

$$[\text{Polymerkette}] = [\text{RAFT}] + 2 \cdot f \cdot ([\text{I}] - [\text{I}]_0) \quad (3.1)$$

Die Gesamtkettenkonzentration $[\text{Polymerketten}]$ ist die Summe aus der Konzentration schlafender Polymerketten ($[\text{RAFT}]$), die der Anfangskonzentration $[\text{RAFT}]_0$ entspricht, und der Anzahl der Ketten, die durch den Radikalstarter selbst initiiert worden sind ($[\text{I}] - [\text{I}]_0$). Die Initiatoreffizienz wird durch den Faktor f beschrieben. Aus dieser Gleichung wird ersichtlich, dass eine konstante Kettenanzahl gewährleistet werden kann, wenn der Initiatorbeitrag vernachlässigbar klein ist. Dementsprechend sollte die in einer RAFT-Polymerisation eingesetzte Initiatorkonzentration deutlich kleiner als die RAFT-Konzentration (typischerweise: $[\text{Initiator}]/[\text{RAFT}] = 1:5$) sein.

Charakteristisch für die aus einer RAFT-Polymerisation stammenden Polymere ist das Vorhandensein einer Dithio-, bzw. Trithiofunktionalität. Das endgültige Endprodukt ist nichts anderes als die schlafende Form einer Polymerkette, die durch die erneute Zugabe eines Radikalstarters und eines neuen Monomers weiter umgesetzt werden kann. Die RAFT-Polymerisation bietet so einen Zugang zu maßgeschneiderten Polymerarchitekturen, wie z. B. Diblock-, und Triblockcopolymeren.

RAFT-Polymerisation von HPMA

Die erste direkte kontrollierte Polymerisation von HPMA unter RAFT-Bedingungen und im wässrigen Milieu haben Scales *et al.* im Jahr 2005 etabliert.^[67] Die RAFT-Polymerisation von HPMA wurde mit 4-Cyanopentansäuredithiobenzoat (CTP) (**3**) als RAFT-Reagenz und 4,4'-Azobis(4-cyanopentansäure) (ACPA) als Initiator durchgeführt. Um das Hydrolyserisiko der Dithioester zu minimieren, erfolgte die Reaktion im Acetat-Puffer bei einem pH-Wert von 5.2. Der lebende Charakter der Polymerisation wurde in einer „quasi“-Blockpolymerisation bewiesen, indem poly(HPMA) als Makro-CTA in einer weiteren Polymerisation von HPMA eingesetzt wurde und das entsprechende Diblockcopolymer poly(HPMA-*b*-HPMA) ergab. Kurze Zeit später konnten Scales *et al.* mit diesen Polymerisationsbedingungen ein Blockcopolymer aus HPMA und *N*-[3-(dimethylamino)propyl]methacrylamid (DMAPMA) darstel-

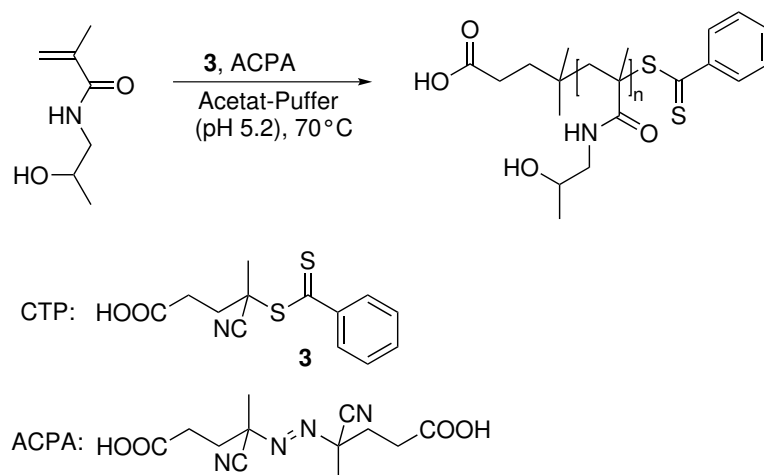


Abbildung 3.7.: Mechanismus der RAFT-vermittelten Polymerisation von HPMA.^[65]

len und in Komplexierungs-, und Freisetzungsexperimenten mit siRNA erfolgreich anwenden.^[68–71]

Seit diesen Pionierarbeiten wurde das RAFT-Reagenz CTP (**3**) für etliche Copolymerisationen von HPMA verwendet. Jia *et al.* haben beispielsweise unter Verwendung von CTP (**3**) und AIBN ein amphiphiles Blockcopolymer bestehend aus HPMA und 2-(2-Pyridyldisulfid)ethylmethacrylat (PDSM) dargestellt. Die Redox Eigenschaften der PDS-Gruppe des poly(PDSM)-Blocks wurden zur Doxorubicin-Konjugation und zum Crosslinking der sich ausbildenden Mizellen verwendet.^[72]

Pan *et al.* haben CTP (**3**) in ein bifunktionales peptidisches RAFT-Reagenz überführt, welches eine enzymatisch spaltbare Peptidsequenz aufwies. Die anschließende Polymerisation von HPMA in Gegenwart des Peptid-CTP lieferte einen Zugang zu abbaubaren Multiblock-HPMA-Polymeren.^[73] Abgesehen von CTP (**3**) wurden folgende RAFT-Substanzen in der Homo-, und Copolymerisation von HPMA verwendet (Abbildung 3.8): 4-Cyano-4-(ethylsulfonylthio carbonyl)sulfanylpentansäure (CETP),^[74] *S,S'*-Bis(α, α' -dimethyl- α'' -essigsäure)trithiocarbonat (BDAT)^[75] und 2-Cyanoisopropylthiobenzoat (CIDB).^[76]

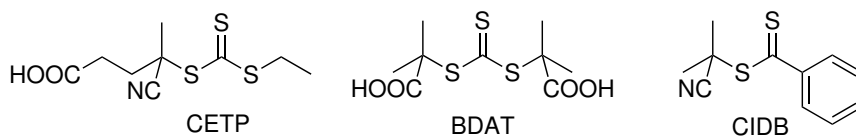


Abbildung 3.8.: Bisher verwendete CTAs zur RAFT-vermittelten Polymerisation von HPMA.

RAFT-Abspaltung

Die im Polymerprodukt verbliebene RAFT-Gruppe am ω -Ende einer Polymerkette stellt eine reaktive Funktionalität dar, die für den weiteren Aufbau polymerer Strukturen nützlich sein kann. Für die Verwendung des eigentlichen Endproduktes kann die labile C-S Bindung allerdings von Nachteil sein. Die RAFT-Funktionalität kann entweder restlos entfernt oder in eine funktionelle Gruppe überführt werden, die für postpolymere Modifikationen genutzt werden kann. Dementsprechend existieren diverse Möglichkeiten der RAFT-Abspaltung. Zu den am häufigsten verwendeten Methoden gehören die thermische Eliminierung,^[77] die radikalinduzierte Reduktion mit^[78,79] oder ohne H-Atom Donor^[80] oder die Reaktion mit einem Nukleophil^[81] (Abbildung 3.9). Die thermische Eliminierung generiert eine endständige Doppelbin-

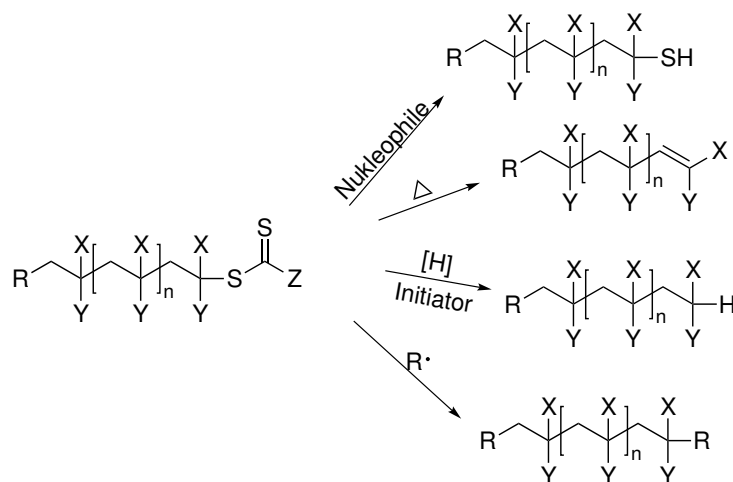


Abbildung 3.9.: Methoden zur Entfernung der RAFT-Gruppe.^[80,82]

dung, die für weitere postpolymere Modifikationen genutzt werden kann. Allerdings müssen das Polymer bzw. die Ligand-Polymerkonjugate unter den Bedingungen der Thermolyse stabil genug sein. Bei der Reaktion mit Nukleophilen wie Aminen,^[83] Hydroxiden^[84,85] oder ionischen Reduktionsmitteln wie Borhydriden^[86] wird die Thiocarbonylthio-Gruppe in ein freies Thiol überführt, welches in Kupplungsreaktionen wie z. B. Michael-Addition und Disulfidbildung reagieren und für postpolymere Kupplung von Proteinen^[87] oder Fluoreszenzfarbstoffen^[69] genutzt werden kann.

Im Gegensatz dazu wird bei der radikalischen Kreuzkupplung mit einem Überschuss eines beispielsweise Azo-Initiators die RAFT-Gruppe vollständig aus der Polymerkette entfernt und das RAFT-Reagenz wiederhergestellt.^[88] Bei diesem Prozess kann auf die sonst notwendige Verwendung von Tributylzinn als H-Donor verzichtet werden, dessen toxischen Rückstände im Produkt problematisch sind.^[79,89] Andere H-Donoren, die alternativ zu Tributylzinn eingesetzt wurden, wie Silane oder 2-Propanol waren weniger effektiv und führten oftmals zu Nebenreaktionen. Eine weitere Alternative sind die von Cong *et al.* verwendeten Hypophosphit-Salze, wie z. B. *N*-Ethylpiperidin Hypo-

phosphit (EPHP) als H-Donor, die erfolgreich zur Entfernung von Trithiocarbonaten und Dithioestern in Polymeren eingesetzt wurde.^[80]

3.3. Synthesemethoden zur Darstellung von Ligand-HPMA-Konjugaten

Aus der Menge der bisher veröffentlichten Ligand-Polymerkonjugate sowohl basierend auf HPMA als auch auf anderen polymeren Systemen kristallisieren sich zwei grundsätzliche Strategien zur Darstellung der Konjugate heraus: i) Einführung der Liganden während des Polymerisationsprozesses und ii) Einführung der Liganden in polymeranalogen² Reaktionen.^[90]

i) Bei Verwendung der ersten Strategie werden die bioaktiven Moleküle durch Methacrylieren in Monomere überführt und anschließend mit den nicht-funktionlierten Monomeren copolymerisiert. Whitesides hat diese Methode zur Darstellung von Sialinsäure-Polymerkonjugaten als Hemagglutinin-Inhibitoren angewandt.^[91]

HPMA-Copolymere mit methacrylierten Peptiden wurden beispielsweise von Johnson *et al.* als DDS für Nucleinsäuren synthetisiert.^[92] Wu *et al.* haben HPMA-Peptid-Copolymere mit methacrylierten Peptiden generiert, die eine Coiled-Coil Konformation ausbilden und anschließend die Selbstassoziation der Konjugate zum Hydrogel untersucht.^[93] Den Einfluss methacrylierter Coiled-Coil Peptid-Derivate auf den Copolymerisationsverlauf mit HPMA haben Apostolovic *et al.* untersucht. Sie haben einen signifikanten Unterschied in der Reaktivität der Monomere festgestellt, der einen Versatz in der Monomerzusammensetzung im Endprodukt nach sich ziehen kann.^[90,94]

Ein Vorteil dieser Strategie ist, dass die gewünschten bioaktiven Polymere direkt aus dem Polymerisationsprozess erhalten werden. Von Nachteil ist allerdings, dass die dafür eingesetzten Liganden vor jeder Polymerisation durch eine Methacrylatgruppe in das entsprechende Monomer überführt werden müssen. Die der Polymerisation vorausgehende Monomersynthese bedeutet zusätzlichen synthetischen Aufwand und lässt wenig Spielraum für Variationen. Darüber hinaus kann eine Mischung aus Monomeren, die sich stark in ihrer Größe und physikalisch-chemischen Eigenschaften unterscheiden zu Inhomogenitäten im finalen Polymer führen.^[90]

ii) Polymerkonjugate können darüber hinaus durch Aktivierung des Polymerrückrats und einem anschließenden polymeranalogen Konjugationsschritt generiert werden. Huynh *et al.* haben diese Methode für die Derivatisierung von Dextran durch Carboxymethylierung etabliert. Der nachgelagerte Kupplungsschritt bietet einen modularen Zugang zu diversen Ligand-Polymerkonjugaten. Allerdings ist diese Methode nur eingeschränkt einsetzbar, da das Polymerrückrat der typischerweise verwendeten biokompatiblen Polymere wie poly(HPMA) nicht problemlos modifiziert werden kann. Dieses Problem wird gelöst, wenn das Prinzip der polymeranalogen Reaktionen mit entsprechend funktionalisierten Copolymeren realisiert wird. Reaktive Monomere

²chemische Modifikation von Polymeren unter Erhalt des Polymerisationsgrades^[54]

werden mit nicht-funktionalisierten Monomeren copolymerisiert und resultieren in biokompatiblen Polymeren mit für postpolymeren Reaktionen geeigneten Funktionalitäten. Dieser modulare Zugang ist nicht nur variabel bezogen auf die Auswahl der Liganden, sondern ist zudem flexibel bezogen auf die Art der Aktivierung und die Beladungsdichte mit Liganden.

Im Hinblick auf HPMA-basierte Konjugate wurde diese Methode vielfach von Kopeček und seinen Kollegen angewandt.^[46,95–100] Bereits Ende der 1970er setzte er reaktive HPMA-Copolymere mit *N*-methacrylierten *p*-Nitrophenylestern zur postpolymeren Konjugation von Aminen^[53] ein und später zur Kupplung eines Antikörpers an ein HPMA-Copolymer-Aminopropylgeladanamycin-Konjugat.^[101]

Succinimidaktivierte HPMA-Copolymere wurden durch Copolymerisation von HPMA mit *N*-Methacryloyloxysuccinimid generiert.^[102] Die anschließende Kupplung eines Peptids über die ϵ -Aminogruppe eines Lysin lieferte einen polyvalenten Inhibitor von Anthrax-Toxin, der eine deutlich höhere Cytotoxizität aufwies, als das monovalente Peptid.^[76]

Die Gruppe von Zentel beschränkte die polymeranaloge Reaktion nicht nur auf die Einführung bioaktiver Liganden, sondern generierte multifunktionelle Copolymere ausgehend von einem Vorläuferaktivesterpolymer. Ausgehend von poly(Pentafluorphenylmethacrylat) wurden HPMA-basierte Copolymere nach Umsetzung des Aktivesters mit 2-Hydroxypropylamin für den HPMA-Anteil und dem entsprechenden Liganden erhalten.^[103,104]

In polymeranalogen Reaktionen werden Aktivester mit verschiedenen Nucleophilen meist in trockenen organischen Lösungsmitteln umgesetzt. Für die Kupplung von Peptiden oder sogar Peptidmischungen wird ein aktiviertes HPMA-Copolymer benötigt, welches die Einführung ungeschützter Peptide und/oder nicht-peptidischer Substanzen unter milden und möglichst wässrigen Bedingungen ermöglicht.

3.3.1. Polymeranalogue Reaktionen - Ligationsmethoden

Die Einführung peptidischer und nicht-peptidischer Liganden in polymeranalogen Reaktionen erfolgt meist durch Addition eines Nucleophils an aktivierte HPMA-Copolymere unter typischen organisch-chemischen Bedingungen (trockene, organische Lösungsmittel). Für die Kupplung von Peptiden oder sogar Peptidmischungen wird ein aktiviertes HPMA-Copolymer benötigt, welches die Einführung ungeschützter Peptide und/oder nicht-peptidischer Substanzen unter milden und möglichst wässrigen Bedingungen ermöglicht. Diverse chemische Ligationstechniken erfüllen diese Voraussetzungen und wurden bereits für die Synthese von Peptid-Polymerkonjugaten eingesetzt.

Die dipolare Cycloaddition von Alkinen und Aziden, die sogenannte Click-Reaktion ist hoch chemoselektiv, deren Anwendung benötigt allerdings den Einsatz eines Kupfer(I)-Katalysators, der aufgrund seiner Biokompatibilität anschließend wieder restlos entfernt werden muss.^[105,106]

Eine vielfach eingesetzte Ligationstechnik zur Biokonjugation ist die Thiol-Maleimid-Kupplung, mit der die freien Thiolgruppen an Polyglycerolen in einer Michael-Addition

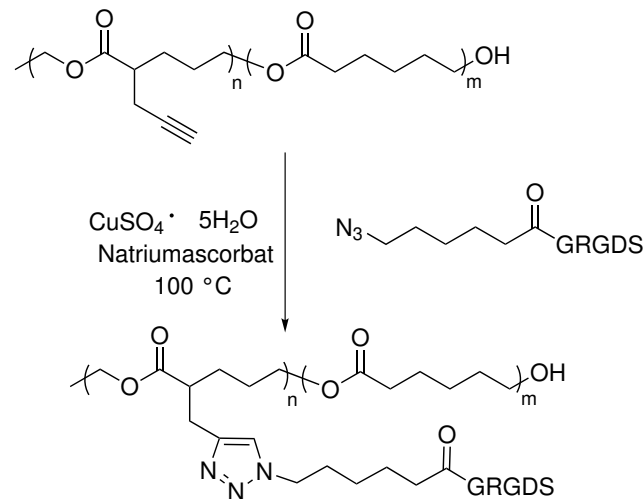
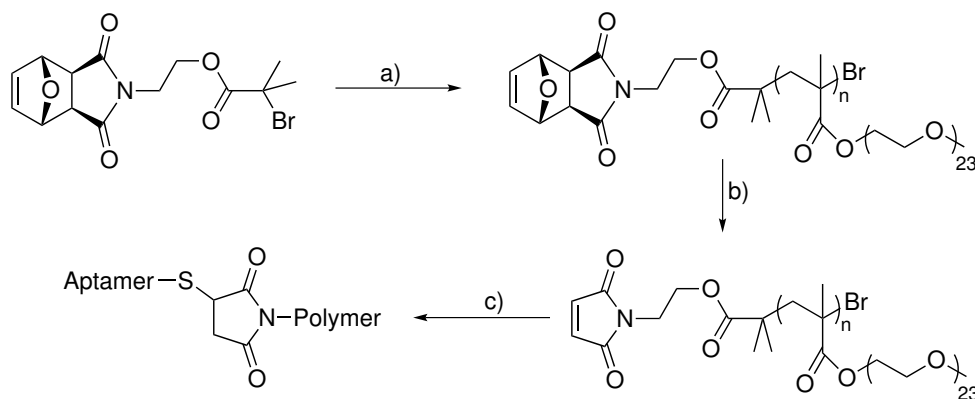


Abbildung 3.10.: Click-Chemie zur Darstellung von Peptid-Polyesterkonjugaten.^[105]

mit maleimidhaltigen Wirkstoffen funktionalisiert wurden.^[107] Für den umgekehrten Fall allerdings muss bei der Einführung von Maleimidfunktionalitäten in ein Copolymer die Maleimidgruppe während der eigentlichen Polymerisation geschützt vorliegen, um Nebenreaktionen wie die Michael-Addition bei einer Ring-Öffnungs-Polymerisation oder unkontrollierte Abbruchreaktionen bei radikalischen Polymerisationen zu vermeiden.^[108,109] Die Thiol-Maleimid-Kupplung gilt als sehr effektiv,



a) Cu(I)Br/*N*-(ethyl)-2-pyridylmethanimin/(methoxyPEG1100)methacrylat, Toluol, 50 °C;
b) Toluol reflux, 6 h; c) immobilisiertes TCEP, Ammoniumformiat, Puffer pH 4, 37 °C.

Abbildung 3.11.: Thiol-Maleimid-Konjugation eines Aptamers.^[109]

verläuft jedoch nicht selektiv in Gegenwart von unterschiedlichen freien Thiolen.

Die einzelnen Vorteile der bisher genannten Ligationsmethoden werden in der von Dawson und Kent entwickelten Nativen Chemischen Ligation (NCL) vereint.^[110]

3. Poly(HPMA)

Ursprünglich wurde die NCL zur Darstellung von Proteinen durch kovalente Verknüpfung zweier ungeschützter Peptidsegmente durchgeführt, die mit einem *N*-terminalen Cystein und einem *C*-terminalen Thioester ausgestattet sind. Dabei bildet sich in dieser thioestervermittelten Reaktion eine native Peptidbindung zwischen den beiden legierten Peptidfragmenten aus.^[111,112]

Die essentiellen Schritte der NCL sind die reversible Bildung eines thioesterverknüpften Produktes, welches durch einen intramolekularen nukleophilen Angriff des freien Amins zum gewünschten amidverknüpften Produkt irreversibel umlagert. Die Reversibilität des vorgelagerten Thiol-Thioester-Austausches garantiert die Chemoselektivität der NCL auch in Anwesenheit interner Cysteine, bei denen die irreversible Umlagerung nicht stattfinden kann. Dieser Austausch wird durch die Zugabe entsprechender Thiol-Katalysatoren unterstützt, die unreaktive Alkylthioester in reaktivere Thioester überführen (Abbildung 3.12).^[112,113] Die NCL-Reaktion zeichnet sich durch ihre Chemoselektivität, die Möglichkeit ungeschützte Peptide einzusetzen, die milden wässrigen Reaktionsbedingungen, gute Ausbeuten und die Ausbildung einer nativen Bindung aus.^[113] Die Anwendung der NCL-Reaktion blieb seit ihrer Entwicklung

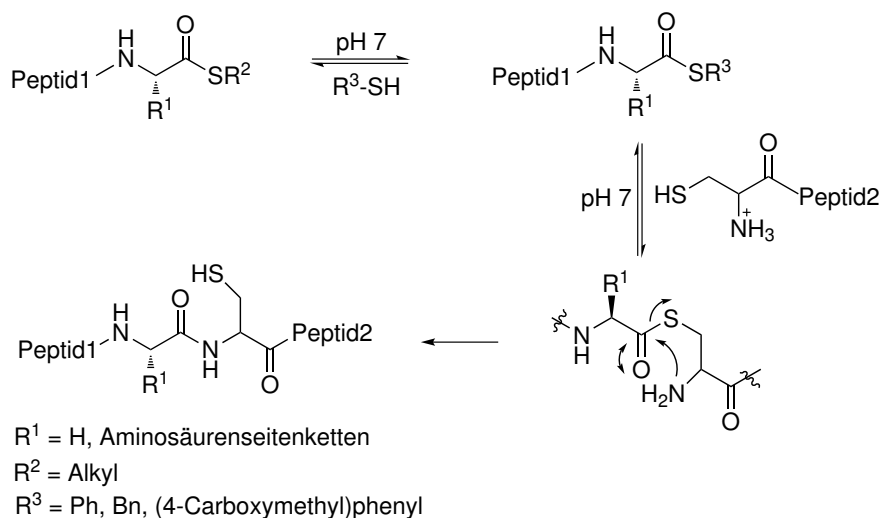


Abbildung 3.12.: Mechanismus der NCL-Reaktion.^[113]

nicht nur auf die Synthese von Proteinen beschränkt. In der Gruppe von Meijer wurde die NCL als generelle Synthesestrategie zur Darstellung multivalenter Peptid- und Protein-Dendrimere auf Basis von Poly(propylenimin) beschrieben. Dabei wurden cysteinfunktionalisierte Dendrimere mit thioesterfunktionalisierten Peptiden und Proteinen beladen.^[114] Diese Strategie haben sie ebenfalls zur Darstellung multivalenter peptidbasierter Dendrimere verfolgt, die durch die Ligation zweier unterschiedlich ausgestatteter poly(Lysin) Dendrone entstanden sind.^[115]

4. Zielsetzung

Die Native Chemische Ligation wurde vor allem für die Darstellung zahlreicher biologisch aktiver Proteine verwendet. Das Potential dieser chemoselektiven Synthesestrategie wurde inzwischen auch auf dem Gebiet der Biokonjugation erkannt.^[113]

Brock und Rademann haben bereits gezeigt, dass thioesterfunktionalisierte Copolymere *in situ* aus *p*-nitrophenylesteraktiviertem HPMA-Copolymer generiert und anschließend mit vollständig geschützten Peptiden umgesetzt werden können.^[116,117] Bei dieser mehrstufigen polymeranalogen Reaktion muss ausgehend von dem Aktives-ter poly(HPMA-*co*-methacrylat-Gly-Gly-*p*-nitrophenylester) der für die NCL benötigte Thioester in einer vorgeschalteten Umesterung mit Thiolen unter nicht-wässrigen Bedingungen erzeugt werden. Darüber hinaus ist bzw. war das inzwischen nicht mehr kommerziell erhältliche Ausgangspolymer aufgrund seiner reaktiven Aktives-tergruppen nicht lagerstabil und ließ sich aufgrund der vorgegebenen Beladung nicht flexibel auf spezifische Fragestellungen anpassen. Es ist daher von großem Interesse, biokompatible thioesterfunktionalisierte HPMA-Copolymere zu entwickeln, die als generell anwendbares Biomaterial einen schnellen und flexiblen Zugang zu Peptid-Polymerkonjugaten bieten.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war, die Synthese thioesterfunktionalisierter Monomere und die sich anschließende Copolymerisation mit HPMA zu etablieren (Abbildung 4.1). Engverteilte und genau definierte Polymere sind essentiell für weiterführende Anwendungen im medizinischen Bereich. Dementsprechend sollte angelehnt an die Arbeiten von Scales *et al.* die RAFT-Polymerisation als eine Methode der lebenden radikalischen Polymerisation für die Darstellung der Thioester-HPMA-Copolymere etabliert werden.^[67] Die einfache Handhabung der Thioester-HPMA-Copolymere und

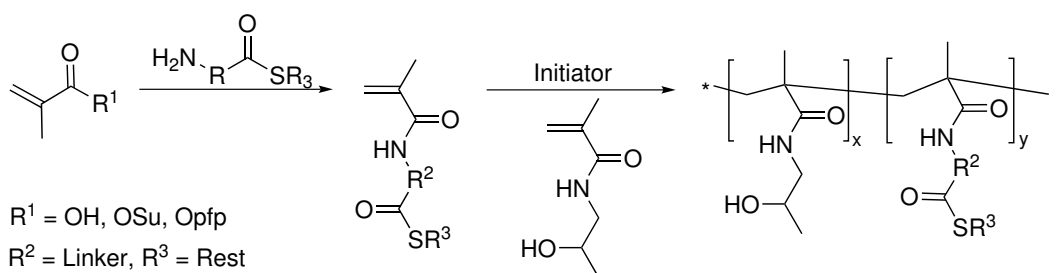


Abbildung 4.1.: Synthesepfad zur Darstellung von Thioester-HPMA Copolymeren.

der flexible und schnelle Zugang zu maßgeschneiderten Ligand-HPMA-Konjugaten sollte in der Anwendung des HPMA-Polymers bei der Beantwortung unterschiedlicher biochemischer Fragestellungen veranschaulicht werden.

Für die vorliegende Arbeit ergaben sich für die Anwendung peptidischer Ligand-HPMA-Konjugate die folgenden vier Projekte:

- **Projekt A:**
Studien zur zellulären Aufnahme von poly(HPMA) in Abhängigkeit der Oberflächenladung
- **Projekt B:**
In vivo-Studien poly(HPMA)-gebundener MMP-11-Substrate zur Früherkennung von Pankreaskrebs
- **Projekt C:**
Photoinduzierte Freisetzung poly(HPMA)-gebundener, amyloidogener Peptide in Neuroblastomzellen
- **Projekt D:**
Untersuchung der multivalenten Interaktion von PRS-Liganden mit Tandem WW-Domänen in Abhängigkeit von der Struktur des polymeren Trägers

Teil II.

Ergebnisse und Diskussion

5. HPMA-Thioester-Copolymere

Thioesterfunktionalisierte Copolymere auf Basis von HPMA stellen einen flexiblen und variablen Zugang zu Ligand-Polymerkonjugaten dar. Die Einführung der Liganden erfolgt in einer NCL-Reaktion als eine sehr milde und chemoselektive polymeranaloge Reaktion. Ein HPMA-Thioester-Copolymer muss dabei bestimmten Anforderungen gerecht werden wie der Löslichkeit und Stabilität unter physiologischen Bedingungen aber auch einer guten Reaktivität in einer NCL-Reaktion.

5.1. Entwicklung des monomeren Bausteins

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Copolymers werden im Wesentlichen durch die Beschaffenheit des neben HPMA eingesetzten methacrylierten Thioesters bestimmt. Bei dessen Entwicklung standen daher die an das Endprodukt gestellten Anforderungen im Vordergrund.

Typischerweise werden in NCL-Reaktionen Alkylthioester verwendet. Sie sind zwar generell weniger reaktiv als Arylthioester, aber dafür stabiler und daher leichter zu handhaben. Um trotzdem einen schnellen Thiol-Thioester Austausch als ersten Schritt der NCL zu gewährleisten, werden Arylthiole als Katalysatoren zugegeben.^[118,119] Für die Monomerentwicklung wurde daher ein Benzylthioester gewählt, der aufgrund seiner moderaten Reaktivität dafür sorgt, dass das Endprodukt sowohl lagerstabil als auch reaktiv gegenüber Cysteinen in einer NCL-Reaktion ist.

Für die radikalische Polymerisation als Methode zur Darstellung des Thioester-HPMA Copolymers musste der Benzylthioester mit einer Methacrylfunktionalität ausgestattet werden. Dafür konnte die Thioestergruppe entweder i) direkt methacryliert werden oder ii) über einen Alkyllinker mit der Methacrylgruppe versehen werden. In einer Wiederholungseinheit im Polymer wäre im erstgenannten Fall der Thioester unmittelbar am Polymerrückgrat lokalisiert, so dass das C_{α} -Kohlenstoffatom benachbart zum Thioester ein quartäres C-Atom, während es im zweitgenannten Fall ein sekundäres Kohlenstoffatom wäre.

Detaillierte Untersuchungen von Dawson an Modellpeptiden haben gezeigt, dass die Reaktivität des Thioesters in einer NCL-Reaktion, neben der Beschaffenheit des Thioesters selbst, von seiner direkten chemischen Nachbarschaft stark beeinflusst wird.^[119,120] Die schnellsten Umsätze in einer NCL-Reaktion wurden für Glycin beobachtet. Sterisch gehinderte Thioester führten dagegen zu einer deutlichen Verlangsamung der Reaktion. Mit Prolin und Aminosäuren mit Verzweigungen in den Seitenketten wie Valin und Isoleucin wurden trotz langer Reaktionszeiten keine quantitativen Umsätze erreicht.

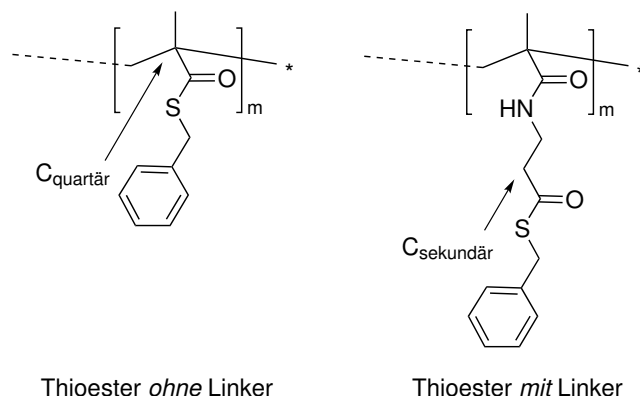


Abbildung 5.1.: Chemische Umgebung des Benzylthioester-Restes.

Im Gegensatz zu einem direkt methacrylierten Benzylthioester ist in den Modellpeptiden von Dawson das C_{α} -Atom des C -terminalen Thioesterpeptids entweder ein tertiäres oder im Fall von Glycin als Nachbarn ein sekundäres Kohlenstoffatom. Dawsons Untersuchungen zur Reaktivität der Thioester legten nahe, dass die sterische Abschirmung des Thioesters in Nachbarschaft zu einem quartären C -Atom seine NCL-Reaktivität negativ beeinflusst. Aufgrund dessen wurde ein Monomer konzipiert, dessen Reaktivität durch die Einführung eines β -Alaninlinkers zwischen Methacryl- und Benzylthioesterfunktionalität gewährleistet war (Abbildung 5.1).

5.2. Monomersynthese

Zur Darstellung des Monomers *N*-Methacryloyl- β -alaninyl-S-benzylthioester (NMAS) (**4**) wurden zwei unterschiedliche Syntheserouten verfolgt (Abbildung 5.2):

- a) Methacrylierung von β -Alanin mit anschließender Thioveresterung^[52]
- b) Thioveresterung von Boc- β -alanin mit anschließender Methacrylierung^[121]

Syntheseweg a)

β -Alanin wurde unter Schotten-Baumann Bedingungen mit Methacryloylchlorid umgesetzt (Abbildung 5.3).^[52,122] Bei dieser nach C. Schotten und E. Baumann benannten Methode werden Nucleophile wie Amine, Alkohole oder Phenole mit Carbonsäurechloriden in Gegenwart wässriger Alkalihydroxid-Lösungen umgesetzt, die die bei der Acylierung freiwerdende Säure neutralisieren. Das gewünschte Produkt (**5**) konnte zwar isoliert werden, die Ausbeute betrug allerdings nur 25 %. Das methacryloylierte β -Alanin **5** wurde im nächsten Schritt in einer Testreaktion mit Ethanthiol in Gegenwart von DCC und katalytischen Mengen an DMAP zum entsprechenden Thioestermonomer **6** verestert. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung wurde jedoch lediglich ein Gemisch aus Produkt und Michael-Addukt isoliert.

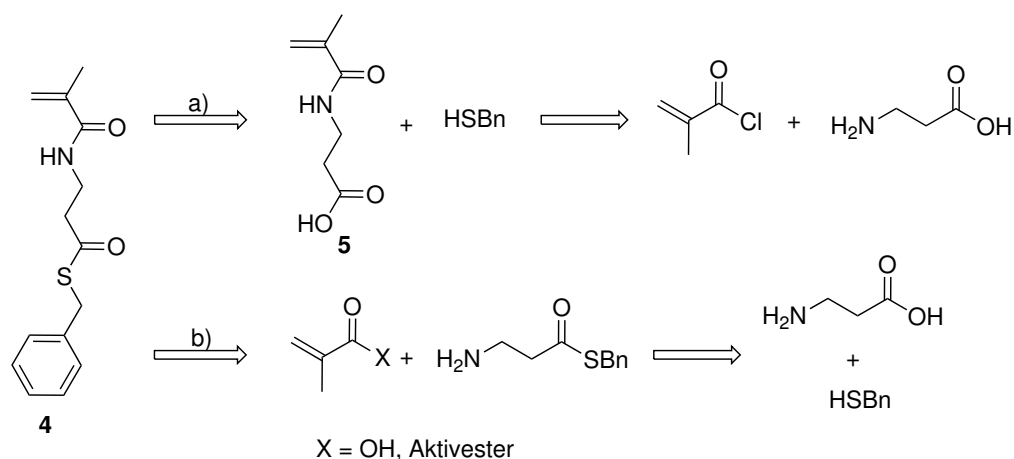


Abbildung 5.2.: Retrosynthese zur Monomerdarstellung: a) Schotten-Baumann Reaktion und anschließende Thioveresterung, b) Thioveresterung mit anschließender Methacrylierung.

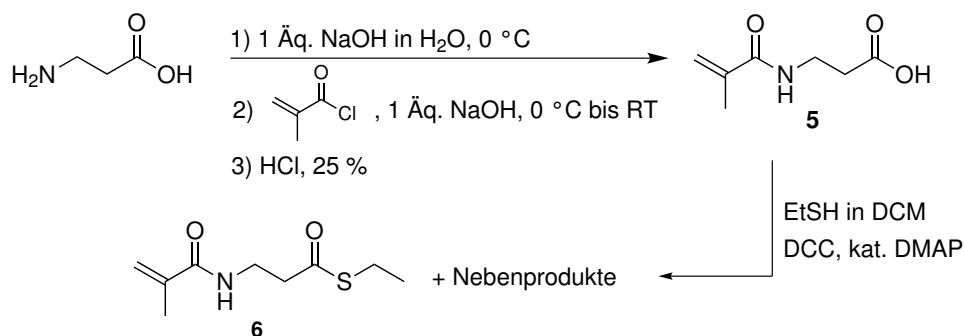


Abbildung 5.3.: Syntheseroute a) Schotten-Baumann Reaktion mit anschließender Thioveresterung.

Syntheseweg b)

Im zweiten Syntheseweg wurde *N*-Boc-geschütztes β -Alanin zunächst zum entsprechenden Thioester umgesetzt. Im Anschluß an die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit TFA/H₂O wurde das freie Amin des Thioesters **7** mit Methacrylsäure und DCC zum gewünschten Produkt **4** umgesetzt und nach säulenchromatographischer Reinigung in moderater Ausbeute (48 %) erhalten (Abbildung 5.4). Nicht umgesetztes Edukt konnte dabei vollständig zurück gewonnen werden.

Die Ausbeute des Methacrylierungsschrittes konnte erhöht werden, indem statt einer *in situ* Aktivierung der Methacrylsäure ihre Aktivesterderivate *N*-Methacryloxysuccinimid (**9**) oder Pentafluorphenylmethacrylat (**10**) mit **8** umgesetzt wurden. *N*-Methacryloxysuccinimid (**9**) wurde durch Umsetzung des Methacryloylchlorids mit *N*-Hydroxysuccinimid dargestellt, während für die Darstellung der pentafluor-

phenolaktivierten Methacrylsäure (**10**) das Methacryloylchlorid entsprechend mit Pentafluorphenol umgesetzt wurde (Abbildung 5.5).^[103,104,123] In der anschließen-

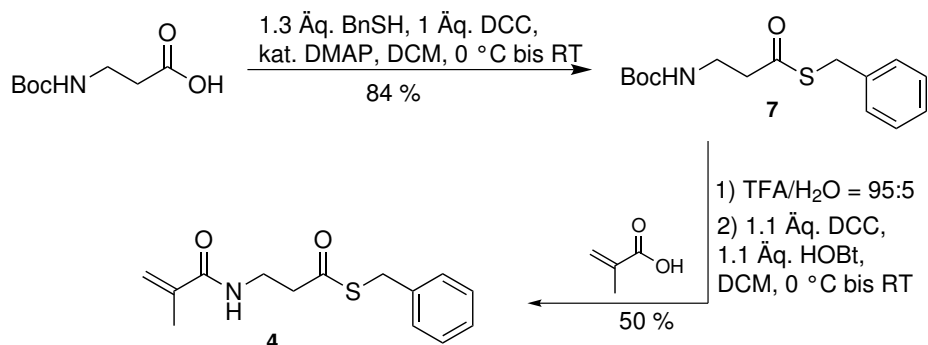


Abbildung 5.4.: Syntheseroute b) Darstellung des Monomers NMAS (**4**).

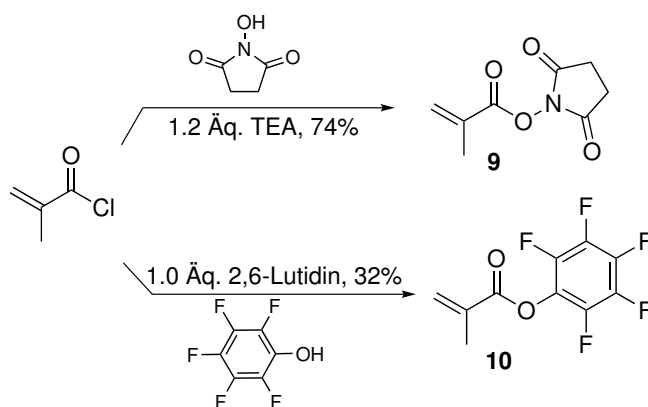


Abbildung 5.5.: Darstellung der Aktivester der Methacrylsäure.

den Umsetzung des Aktivesters **9** mit dem thioesterfunktionalisierten β -Alanin **8** konnte die Ausbeute marginal von 48 auf 56 % gesteigert werden. Eine deutliche Verbesserung der Ausbeute auf 76 % lieferte hingegen die Umsetzung des Amins mit Pentafluorphenylmethacrylat **10**.

In der zweiten Syntheseroute wurde durch die geänderte Reihenfolge der Thioveresterung und des Methacrylierens die Michael-Addition als Konkurrenzreaktion umgangen, was die Isolierung des Monomers NMAS (**4**) vereinfachte und durch den Einsatz aktivierter Methacrylsäuren in besseren Ausbeuten resultierte.

5.2.1. Reaktivität des Thioesters in einer NCL-Reaktion

Vor der eigentlichen Copolymerisation mit HPMA wurde die Reaktivität des monomeren Thioesters in einer NCL-Testreaktion untersucht. Als repräsentatives Fragment des NMAS Monomers **4** wurde die thioesterfunktionalisierte Zwischenstufe **8** mit

5. HPMA-Thioester-Copolymere

ungeschütztem Cystein im Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.4) umgesetzt (Abbildung 5.6). Das bei der NCL-Reaktion gebildete Ligationsprodukt **11** konnte in LC-ToF-

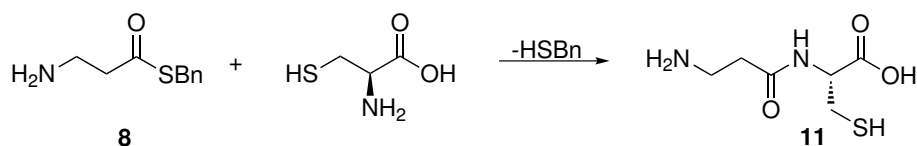


Abbildung 5.6.: NCL-Testreaktion des Thioesterfragments **8**.

Messungen bei einer Retentionszeit von $t_R = 0.43$ min ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3\text{S} [\text{M}+\text{H}]^+$: 193.06, Δ 0.05 ppm) nachgewiesen werden. Die UV-Spur wies außerdem einen Peak bei $t_R = 2.5$ min auf, der der Abgangsgruppe Benzylmercaptan zugeordnet werden konnte. Die NCL-Testreaktion zwischen Fragment **8** und Cystein wurde darüber hinaus in einem Gemisch aus DMSO und Phosphatpuffer (DMSO/Puffer 4:1) und Dioxan und Phosphatpuffer (Dioxan/Puffer 2:1) erfolgreich durchgeführt. Unter allen genannten Bedingungen war das Benzylthioesterfragment so reaktiv, dass die NCL-Reaktionen auch ohne den Zusatz von Thiolen als Katalysatoren ablief.

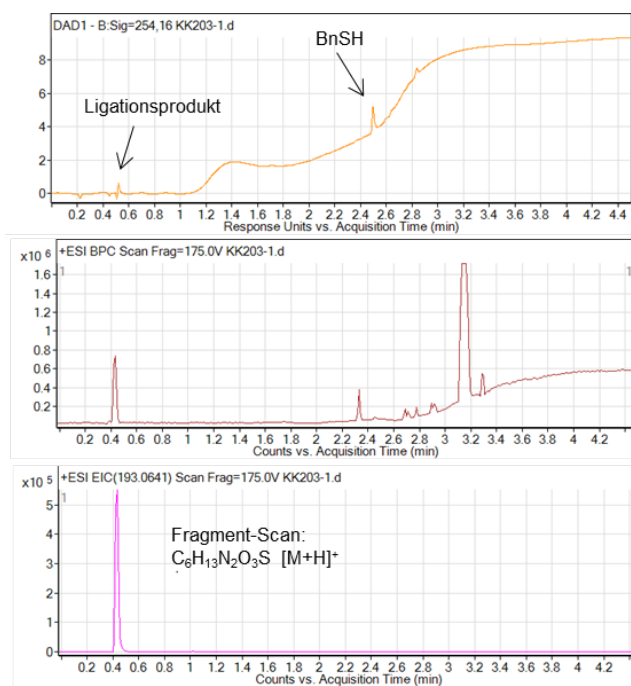


Abbildung 5.7.: LC-ToF der NCL-Reaktion zwischen Fragment **8** und Cystein, oben) UV-Chromatogramm 254 nm, unten) Fragmentscan eines ESI-Massenspektrums.

5.2.2. Stabilität des Thioesters unter radikalischen Bedingungen

Neben der für die Ligationsreaktion benötigten Reaktivität ist die Stabilität der S-Benzylthioester unter radikalischen Bedingungen eine wichtige Grundvoraussetzung für die Anwendung des Thioesterbausteins **4** als Monomer. Fragment **8** wurde daher in Anwesenheit von A) 0.5 Äq. 2,2'-Azobisobutyronitril (AIBN) als typischen Radikalstarter und B) 1.5 Äq. RAFT-Reagenz **12** und AIBN (RAFT/AIBN 5:1) in einem entgasten Lösungsmittelgemisch aus Dioxan und Methanol (Dioxan/MeOH 3:1) bei 60 °C erhitzt (Abbildung 5.8).

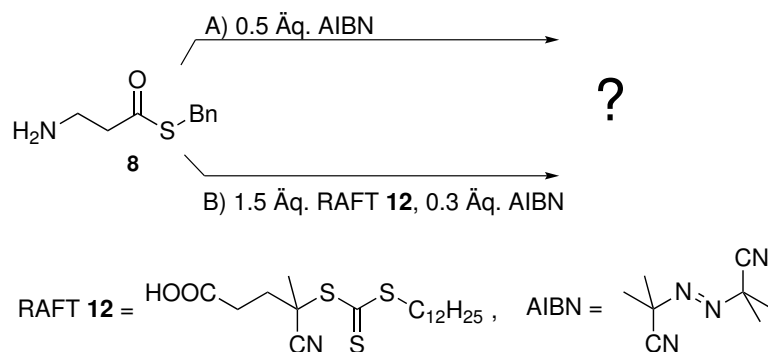


Abbildung 5.8.: Stabilität des Thioesterfragments **8** unter A) FRP- und B) RAFT-Bedingungen.

Die Reaktion wurde in bestimmten Zeitabständen chromatographisch (LC-ToF) verfolgt, wobei zur Bestimmung der Stabilität die Peakflächen der detektierten UV-Peaks des Naphthalens als internen Standard und des Thioesters ins Verhältnis gesetzt wurden (Abbildung 5.9). Die nach 1, 6 und 22 Stunden gemessenen Naphthalen/Fragment

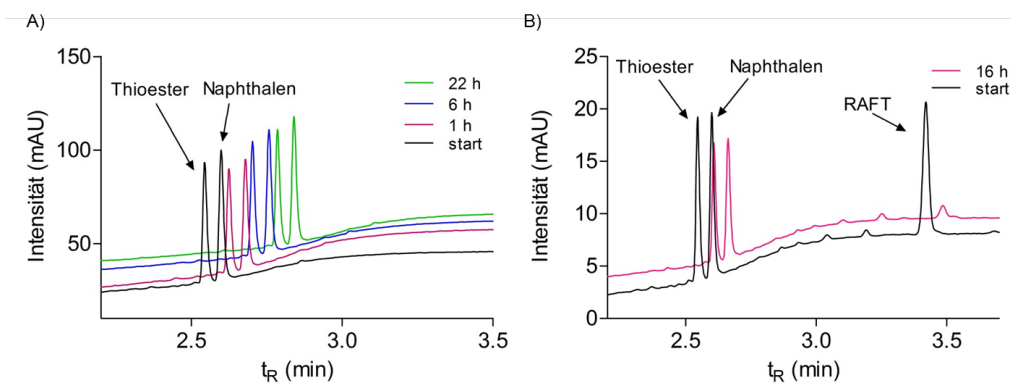


Abbildung 5.9.: Chromatographische Bestimmung der Stabilität des Thioesterfragments **8** unter A) FRP- und B) RAFT-Bedingungen.

8-Verhältnisse wurden mit der zum Startzeitpunkt bestimmten Zusammensetzung

der Reaktionsmischung bzw. dem Ausgangsverhältnis von internem Standard und Fragment **8** verglichen. Dabei wurde gezeigt, dass der Thioester **8** sowohl unter A) FRP-Bedingungen als auch B) RAFT-Bedingungen über einen Zeitraum von 16 bzw. 22 h stabil bleibt. Es wurde lediglich eine Intensitätsabnahme für das UV-Signal des RAFT-Reagenzes beobachtet (Abbildung 5.9).

Das Thioesterfragment **8** hat sich in NCL-Testreaktionen als reaktiv und unter radikalischen Bedingungen als stabil erwiesen. Es erfüllt demnach alle zuvor an das System gestellten Anforderungen.

5.3. Copolymerisation mittels FRP und RAFT

Im Folgenden Kapitel wurde das Polymerisationsverhalten der beiden Monomere NMAS (**4**) und HPMA in radikalischen Copolymerisationen untersucht. Dabei wurden Reaktionen unter Anwendung der beiden Polymerisationstechniken FRP und RAFT durchgeführt, wobei der Fokus auf der Etablierung der RAFT-Polymerisation lag.

Alle hergestellten Copolymere poly(HPMA-*co*-NMAS) (PHNS) wurden mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) und NMR-Spektroskopie charakterisiert. Die mit einem Viskositäts- und Brechungsindexdetektor ausgestattete GPC erlaubte als Relativmethode die Bestimmung der Molmasse und Molmassenverteilung nach universeller Kalibrierung mit Dextranstandards. Bei dieser Methode werden die Makromoleküle ausschließlich nach ihrer Größe getrennt, so dass durch entsprechende Probenvorbereitung und Eluentenauswahl mögliche adsorptive Wechselwirkungen ausgeschlossen werden müssen. Um Wechselwirkungen des aromatischen Thioesterrestes mit der stationären Phase der GPC zu vermeiden, musste der Thioester durch Hydrolyse mit LiOH/MeOH vor der GPC-Analyse entfernt werden. Zur Bestimmung der Beladung des Polymers mit Thioestergruppen wurde die Benzyl-CH₂-Gruppe genutzt, die in ¹H-NMR Spektren der Copolymere ein breites Singulett bei (a) 4.13 ppm (Abbildung 5.10) aufwies. Die Integration des Thioestersignals relativ zum Signal der Isopropyl-CH-Gruppe des HPMA bei (b) at 3.70 ppm ergab den entsprechenden Thioesteranteil in % bzw. die Beladung in mmol/g im Endprodukt.

Um die Auswirkungen unterschiedlicher Reaktionsbedingungen auf die Thioesterbeladung, die Molmassenverteilung und die Verteilung der chemischen Zusammensetzung (chemical composition distribution CCD) zu ermitteln, wurde eine Reihe RAFT-vermittelter Testpolymerisationen in Gegenwart von Naphthalen als internen Standard durchgeführt. Der Umsatz der Polymerisationen wurde bestimmt, indem die Peakflächen der detektierten UV-Peaks des Monomers NMAS (**4**) bzw. HPMA und des internen Standards Naphthalen zum Start- und Endzeitpunkt ins Verhältnis gesetzt wurden. Die GPC-Analyse der hydrolysierten Copolymere lieferte die Molmassenverteilung und das Zahlen- und Gewichtsmittel der Molmassen, wobei zur Einschätzung der RAFT-vermittelten Kontrolle über die Molmassen die experimentelle Molmasse M_n^{exp} mit der theoretischen Molmasse M_n^{theor} verglichen wurde. M_n^{theor} wurde entsprechend der Formel 5.1 aus den Anfangskonzentration des RAFT-Reagenzes c_0^{RAFT} und der Monomere c_0^{M} und deren Molmassen M_w bezogen auf den

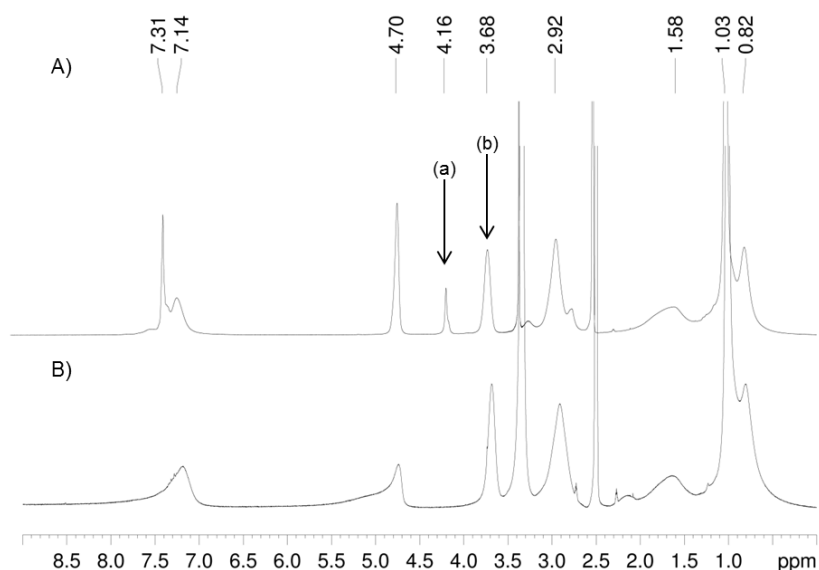


Abbildung 5.10.: ^1H -NMR-Spektren: A) PHNS-1; B) PHNS-1 nach Hydrolyse.

Umsatz X der Polymerisation berechnet.

$$M_n^{\text{theor}} \approx \frac{X \cdot c_0^M \cdot M_{wM}}{c_0^{\text{RAFT}}} + M_{w\text{RAFT}} \quad (5.1)$$

5.3.1. FRP-vermittelte Copolymerisation

Die Monomere NMAS und HPMA (NMAS/HPMA = 1:5) wurden in einer freien radikalischen Polymerisation mit AIBN als Initiator copolymerisiert. Das Copolymer PHNS-1 wurde nach der in Aceton durchgeführten Fällungspolymerisation als farbloser Feststoff erhalten. Die Integration des Thioestersignals relativ zum Signal der Isopropyl-CH-Gruppe des HPMA ergab einen Thioesteranteil von 12% und eine Beladung von 0.7 mmol/g. Bestimmung des Schwefelgehaltes in einer Elementaranalyse bestätigte die NMR-spektroskopischen Ergebnisse. Die Charakterisierung des hydrolysierten Thioester-Copolymers PHNS-1 in einer GPC-Analyse ergab eine mittlere Molmasse von $M_n = 41.0 \text{ kDa}$ und einen für die FRP typischen Polydispersitätsindex von 2.1. Das aus der FRP resultierende Copolymer PHNS-1 zeichnete sich allerdings durch eine für medizinisch chemische Anwendungen ungünstige breite Molmassenverteilung aus (PDI 2.1). Daher wurde im folgenden die RAFT-Polymerisation als lebende radikalische Polymerisationstechnik zur Darstellung engverteilter Thioester-HPMA-Copolymere etabliert.

5.3.2. RAFT-vermittelte Copolymerisation

Zur Ermittlung optimaler Bedingungen einer RAFT-vermittelten Copolymerisation wurden Reaktionen unter Variation des i) RAFT Reagenzes, ii) Lösungsmittels und iii) Initiators bzw. der Polymerisationstemperatur durchgeführt (Abbildung 5.11). Die in Tabelle 5.1 zusammengefassten Ergebnisse wurden im Hinblick auf die erreichten mittleren Molmassen, der PDIs und des Thioestereinbaus miteinander verglichen.

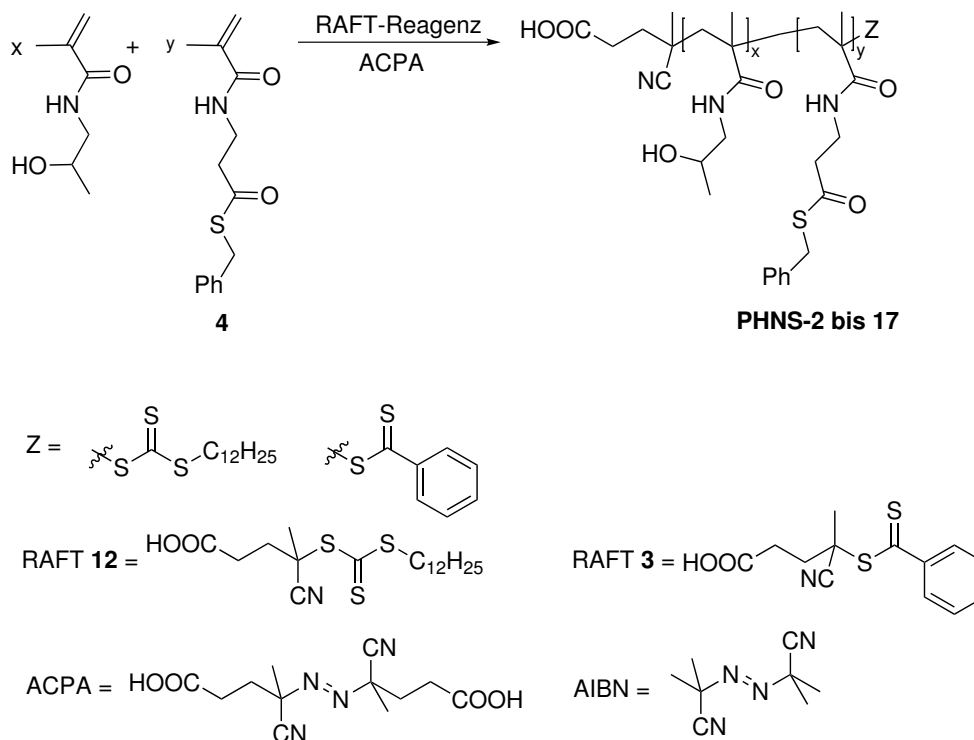


Abbildung 5.11.: RAFT-Copolymerisation von HPMA und NMA 4.

Einfluss des RAFT-Reagenzes

Da die richtige Wahl des RAFT-Reagenzes entscheidend für den Erfolg einer RAFT-vermittelten Polymerisation ist, wurde zum einen das in der Homopolymerisation von HPMA bereits erfolgreich eingesetzte RAFT-Reagenz CTP (**3**) (PHNS-16, PHNS-17) und zum anderen 4-Cyano-4-(dodecylsulfonylthiocarbonyl)-sulfanylpentansäure (RAFT-Reagenz **12**) (PHNS-5, PHNS-14) als CTA verwendet. Die beiden CTAs wurden für Copolymerisationen von HPMA mit NMA (NMA/HPMA = 1:10) mit einem Monomer zu CTA Verhältnis von M/CTA = 308:1 und einem CTA zu Initiator Verhältnis von 5:1 eingesetzt. Die Polymerisationen wurden jeweils in den zwei unterschiedlichen Lösungsmitteln Dioxan/H₂O (PHNS-5, PHNS-16) und Dimethylacetamid (DMAc) (PHNS-14, PHNS-17) durchgeführt, wobei der Einfluss

des Lösungsmittels erst im folgenden Abschnitt detailliert diskutiert wird.

Ein Vergleich der Polymerisationen PHNS-5 mit PHNS-16 und PHNS-14 mit PHNS-17 zeigte, dass der Einsatz beider RAFT-Reagenzien in vergleichbaren Copolymeren resultierte. Das RAFT-Reagenz **12** ist allerdings hydrolysestabiler und ermöglicht aufgrund der vorhandenen Trithiocarbonatfunktionalität einen Zugang zu Triblockcopolymeren.^[78] Aufgrund dessen wurde das RAFT-Reagenz **12** für die weiteren Optimierungsschritte eingesetzt.

Tabelle 5.1.: Test-Copolymerisationen von HPMA mit NMAS **4**.

PHNS-	M/CTA, CTA/I	Lösungsm.	Umsatz HPMA (NMAS) [%]	Thioester- Anteil [%]	M_n^{theor}	M_n^{exp} [kDa], PDI
1		Aceton	n.b.	12.0	n.b.	41.0, 2.1
2	(130, 5) ^{a, c}	Diox/H ₂ O 3:1 ^e	n.b.	6.3	n.b.	15.1, 1.2
3	(130, 5) ^{a, c}	Diox/H ₂ O 3:1 ^e	73 (55)	7.0	13.8	17.6, 1.2
4	(308, 5) ^{a, c}	Diox/H ₂ O 3:1 ^e	50 (36)	6.3	22.0	17.7, 1.4
5	(308, 3) ^{a, c}	Diox/H ₂ O 3:1 ^e	60 (45)	6.2	26.0	19.2, 1.3
6	(130, 3) ^{a, c}	Diox/H ₂ O 3:1 ^f	65 (52)	15	12.4	15.7, 1.3
7	(58, 5) ^{a, c}	Diox/H ₂ O 3:1 ^f	81 (69)	14	7.0	13.3, 1.1
8	(308, 5) ^{a, c}	MeOH/Diox 3:1 ^e	30 (28)	8.0	14.8	12.8, 1.4
9	(308, 3) ^{a, c}	MeOH/Diox 3:1 ^e	42 (38)	8.0	20.6	12.4, 1.5
10	(308, 5) ^{a, c}	DMAC/MeOH 1:1 ^e	51 (44)	7.4	22.6	13.4, 1.7
11	(308, 5) ^{a, c}	DMAC/MeOH 1:1 ^{e, g}	28 (26)	7.3	12.8	14.0, 1.5
12	(308, 5) ^{b, c}	DMAC/MeOH 1:1 ^e	62 (57)	8.0	27.5	14.2, 1.6
13	(130, 5) ^{a, c}	DMAC ^e	42 (39)	8.5	8.2	13.7, 1.3
14	(308, 5) ^{a, c}	DMAC ^e	88 (88)	9.0	39.1	8.70, 1.3
15	(308, 5) ^{b, c}	DMAC ^e	72 (72)	9.0	32.2	10.8, 1.3
16	(308, 3) ^{a, d}	Diox/H ₂ O 3:1 ^e	34 (27)	6.0	15.1	18.7, 1.3
17	(308, 5) ^{a, d}	DMAC ^e	73 (71)	9.0	34.6	13.8, 1.4

^a I = ACPA (70 °C)

^b I = AIBN (65 °C)

^c CTA = RAFT-Reagenz **12**

^d CTA = RAFT-Reagenz **3**

^e NMAS/HPMA = 1:10

^f NMAS/HPMA = 1:5

^g 90 °C

Einfluss des Lösungsmittels

Dioxan/Wasser - Mischung Zunächst wurden Testpolymerisationen von HPMA and NMAS (NMAS/HPMA = 1:5 und 1:10) in einer Mischung aus Dioxan und Wasser (Dioxan/H₂O 3:1) mit RAFT-Reagenz **12** und ACPA als Initiator durchgeführt. Die finalen Copolymere zeichneten sich bei beiden Monomerzusammensetzungen durch eine enge Molmassenverteilung (PDI 1.2-1.4) und gute Kontrolle der Molmassen aus ($M_n^{\text{exp}} \approx M_n^{\text{theor}}$) (PHNS-2-6). Lediglich im Fall eines kleinen Monomer und

RAFT-Reagenz **12** Verhältnisses zur Darstellung von Copolymeren mit kleinen Molmassen ($M/CTA = 58:1$) war die experimentell bestimmte Molmasse für das resultierende Copolymer größer als die berechnete theoretische Molmasse (PHNS-7). Bei der Copolymerisation des Copolymers PHNS-3 mit einem Monomer zu RAFT-Reagenz **12** Verhältnis von 130:1 zeichnete sich bereits ab, dass M_n^{exp} bei steigender RAFT-Konzentration M_n^{theor} übersteigt (PHNS-3 und 6). Dabei zeigte eine Erhöhung der Initiatorkonzentration ($CTA/I = 1:3$), sowohl für kleinere (PHNS-4 und 5) als auch größere RAFT-Konzentrationen (PHNS-3 und 6) keinen signifikanten Einfluss auf das Verhältnis von M_n^{exp} und M_n^{theor} (PHNS-5 und 6).

Zuletzt wurden die in Dioxan/Wasser durchgeführten Copolymerisationen anhand der Monomerzusammensetzung vor und nach der Copolymerisation miteinander verglichen. Das eingesetzte Thioestermonomer wurde auch für unterschiedliche Monomerverhältnisse (NMA/HPMA = 1:5 und 1:10) grundsätzlich zu 65-75 % in das jeweilige Copolymer eingebaut (PHNS-2 bis 5 im Vergleich zu PHNS-6 und 7). Die in dieser Lösungsmittelmischung auftretenden Abweichungen im Thioestereinbau deuteten auf unterschiedliche Reaktivitäten der eingesetzten methacrylamidbasierten Monomere HPMA und NMA **4** hin.

Dioxan/Methanol - Mischung Wurde das Wasser in einer Mischung mit Dioxan durch Methanol (Diox/MeOH 2:1) ersetzt, hat sich die Abweichung des Thioestereinbaus marginal verkleinert. Die resultierenden Copolymere zeichneten sich jedoch durch eine breitere Molmassenverteilung (PDI 1.4-1.5) und kleinere Molmassen als erwartet aus ($M_n^{\text{exp}} < M_n^{\text{theor}}$) (PHNS-8 und 9). Offensichtlich führte diese Lösungsmittelzusammensetzung zu einer Verlangsamung der kontrollierten radikalischen Polymerisation. Der mechanistische Hintergrund des sogenannten Retardationseffektes ist zur Zeit noch nicht vollständig verstanden.

DMAc/Methanol - Mischung und reines DMAc Ein Retardationseffekt wurde ebenfalls für Copolymerisationen beobachtet, die in Gemischen von Methanol mit DMAc statt Dioxan (DMAc/MeOH 1:1) (PHNS-10 bis 12) und reinem DMAc (PHNS-13 bis 15) durchgeführt wurden. Im Gegensatz zu DMAc/MeOH-Mischungen lieferten die in reinem DMAc durchgeführten Reaktionen Copolymere, in denen das eingesetzte NMA nahezu vollständig eingebaut war. Das polar aprotische Lösungsmittel DMAc wirkte sich im Gegensatz zur protischen Dioxan/H₂O-Mischung positiv auf die Reaktivität des Monomers NMA aus. Allerdings beschränkte der starke Retardationseffekt die Anwendung dieser Reaktionsbedingungen auf Copolymere mit kleinen Molmassen.

Einfluss des Initiators bzw. der Temperatur

Die in DMAc und in DMAc/MeOH durchgeführten Copolymerisationen wurden unter Variation des Initiators bzw. der Temperatur wiederholt. Dabei wurde die Temperatur einerseits auf 90 °C erhöht und andererseits beim Einsatz von AIBN als Initiator auf 60 °C gesenkt (PHNS-11 und 12). Der für diese Lösungsmittelgemische beobachtete Retardationseffekt konnte allerdings nicht unterdrückt werden.

Fazit

Bei einer genaueren Betrachtung der RAFT-vermittelten Polymerisationen PHNS-2 bis 17 lassen sich an dieser Stelle drei Kernaussagen formulieren:

- einheitliche Copolymere mit guter Molmassenkontrolle und gutem Thioesterinbau waren in einer Mischung aus Dioxan und Wasser zugänglich
- die Molmassenverteilungen wurden breiter, wenn Methanol ein Teil des Lösungsmittelgemisches war
- die in DMAc durchgeführten Copolymerisationen waren aufgrund des sehr guten Thioesterinbaus und der guten Molmassenverteilung vielversprechend, führten aber lediglich zu Polymeren, deren Molmassen deutlich unter den theoretisch erwarteten lagen

Aufgrund einer besseren Kontrolle über die Molmassen wurden Thioester-HPMA-Copolymere daher bevorzugt in dem Lösungsmittelgemisch bestehend aus Dioxan und Wasser und in Gegenwart des RAFT-Reagenzes **12** dargestellt.

5.3.3. Chemische Homogenität der Copolymere

Zu den wichtigen Eigenschaften von Copolymeren zählt neben der Molmassenverteilung die Verteilung der chemischen Zusammensetzung (chemical composition distribution (CCD)). Der reduzierte Einbau des Monomers NMA **4** während der Copolymerisation deutete auf einen Unterschied in den Reaktivitäten der Monomere HPMA und NMA **4**, was in chemisch uneinheitlichen Copolymeren resultieren kann. Aus diesem Grund wurde die CCD der Copolymere durch Trennungsversuche an Reversed Phase HPLC Säulen (RP C18) untersucht. Mögliche Mischungen von Copolymeren mit unterschiedlichen chemischen Zusammensetzungen sollten aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften chromatographisch trennbar sein. Mit einem linearen Gradienten (5-99 ACN, 35 °C) wurden Copolymere analysiert, die aus verschiedenen Copolymerisationen stammen. Die HPLC-Spektren der Polymere PHNS-1 und 2 zeigten einheitliche und unimodale Peaks, die sich lediglich in der Retentionszeit t_R unterschieden. Die beiden Polymere wurden zwar mit unterschiedlichen Polymerisationstechniken hergestellt und unterscheiden sich daher sowohl in der Molmasse als auch in der Molmassenverteilung, die unterschiedlichen t_R sind allerdings allein auf die Unterschiede in den chemischen Eigenschaften zurück zu führen. PHNS-1 und 2 wurden mit unterschiedlichen Mengen an NMA Monomer (**4**) copolymerisiert (PHNS-1: NMA/HPMA = 1:10, PHNS-2: NMA/HPMA = 1:5). Dementsprechend eluierte PHNS-1 aufgrund seines höheren Thioester-Anteils bei einem höheren Acetonitril-Anteil der mobilen Phase als das polarere Copolymer PHNS-2.

Die Anwendung dieser Methode auf andere Copolymere zeigte, dass die UV-Spuren einiger Copolymere, bimodale Peaks aufwies. Beispielsweise zeigte ein Vergleich der Copolymere PHNS-7 und 8, dass die identischen Thioester-Anteile zwar in vergleichbaren t_R resultieren, aber lediglich PHNS-7 einen unimodalen Peak

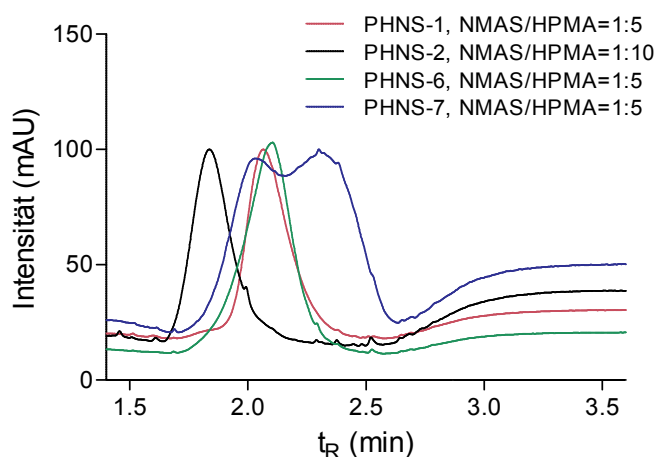


Abbildung 5.12.: Chromatographische Trennung der Copolymere.

aufwies. Die Copolymerisation von PHNS-7 wurde im Gegensatz zu PHNS-8 bereits nach einem Umsatz von 65 % abgebrochen, während PHNS-8 bis zu einem Umsatz von 81 % polymerisiert wurde. Im Gegensatz dazu zeigten die UV-Spektren der in DMAc synthetisierten Copolymere für alle Polymerisationsumsätze einheitliche CCDs, worin sich der zuvor beobachtete nahezu vollständige Einbau des Monomers NMAS widerspiegelt.

Die chemische Einheitlichkeit der in einer Mischung aus Dioxan und Wasser synthetisierten Copolymere hing stark vom Umsatz ab, so dass Copolymerisationen in diesem Lösungsmittelgemisch nicht über einen Umsatz von 60 % durchgeführt werden sollten.

5.3.4. Abspaltung der RAFT-Funktionalität

Die mit der RAFT-Technologie synthetisierten Polymere enthalten eine reaktive Thiocarbonat- oder Thioestergruppe am ω -Kettenende. Diese Funktionalität kann für weitere polymeranalogue Reaktionen ein Problem darstellen, so dass verschiedene Ansätze zur Beseitigung dieser reaktiven Kettenenden existieren, die bereits in Kapitel 3.2.2 diskutiert wurden. Von den dort aufgeführten Möglichkeiten zur Entfernung der RAFT-Funktionalität erwies sich die Verwendung von Nucleophilen im Hinblick auf das in der NCL-Reaktion eingesetzte Thiophenol als der geeignetste Weg. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Umwandlung des RAFT-Reagenzes **12** unter NCL-Bedingungen (Phosphatpuffer/Dioxan 2/1, 1 % v/v Thiophenol) wurde nach bestimmten Reaktionszeiten chromatographisch analysiert. Die Quantifizierung erfolgte durch den Vergleich der Peakflächen des RAFT-Reagenzes **12** und des internen Standards Naphthalen. Der Zeitpunkt t_0 repräsentiert eine Mischung bestehend aus RAFT-Reagenz **12** und Naphthalen im NCL-Lösungsmittel unmittelbar vor der Thiophenolzugabe. Bereits 15 min nach der Zugabe waren 93 % des RAFT-Reagenzes

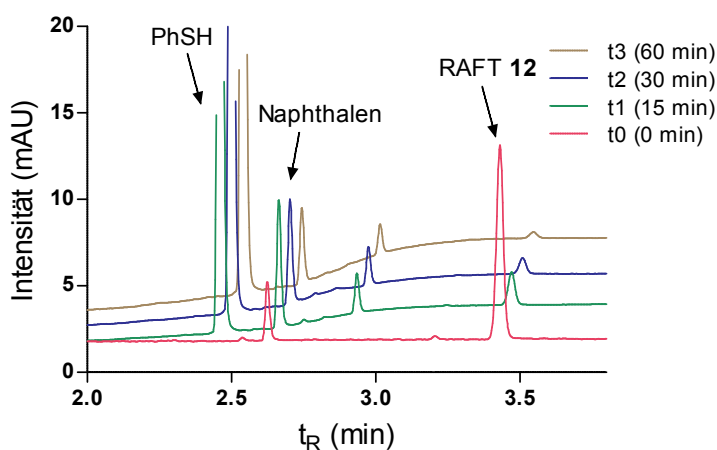


Abbildung 5.13.: Nukleophile RAFT-Abspaltung.

umgesetzt. Neben dem Verschwinden des RAFT-Signals wurde ein Abbauprodukt des RAFT-Reagenzes bei einer Retentionszeit von $t_R = 2.9$ min beobachtet. Die sehr schnelle Umsetzung des RAFT-Reagenzes **12** unter NCL-Bedingungen machte eine vorgeschaltete Beseitigung der RAFT-Funktionalitäten überflüssig.

5.4. Zusammenfassung

Zur Darstellung thioesterfunktionalisierter HPMA-Copolymere wurde das Monomer NMAS **4** konzipiert, welches mit einem β -Alaninlinker zwischen der Thioesterfunktionalität und dem Polymerrückrat ausgestattet war. NMAS **4** wurde in einer zweistufigen Reaktion ausgehend von der Thioveresterung des β -Alanins und einer sich anschließenden Methacrylierung mit Pentafluorphenylmethacrylat **10** dargestellt. Die Eigenschaften des Thioesterfragments **8** als Monomervorläufer wurden vorab untersucht, um einerseits die Stabilität unter radikalischen Bedingungen und andererseits die Reaktivität in NCL-Reaktionen sicher zu stellen. Copolymerisationen der Monomere HPMA und NMAS **4** wurden mit den beiden Polymerisationstechniken FRP und RAFT durchgeführt und resultierten in den gewünschten Copolymeren PHNS.

Eine Reihe von Reaktionen wurde durchgeführt, um die RAFT-vermittelte Polymerisation bezüglich der Molmassenkontrolle und Molmassenverteilung sowie der chemischen Zusammensetzung zu optimieren. Dabei konnten Zusammenhänge zwischen den gewählten Reaktionsbedingungen insbesondere der Zusammensetzung des Lösungsmittels und den daraus resultierenden Polymereigenschaften gezeigt werden. Besonders auffällig waren die negativen Auswirkungen von Methanol auf die Molmassenverteilung der Polymere und der ausgeprägte Retardationseffekt der im Lösungsmittel DMAc durchgeführten Copolymerisationen. Im Gegensatz dazu wurden

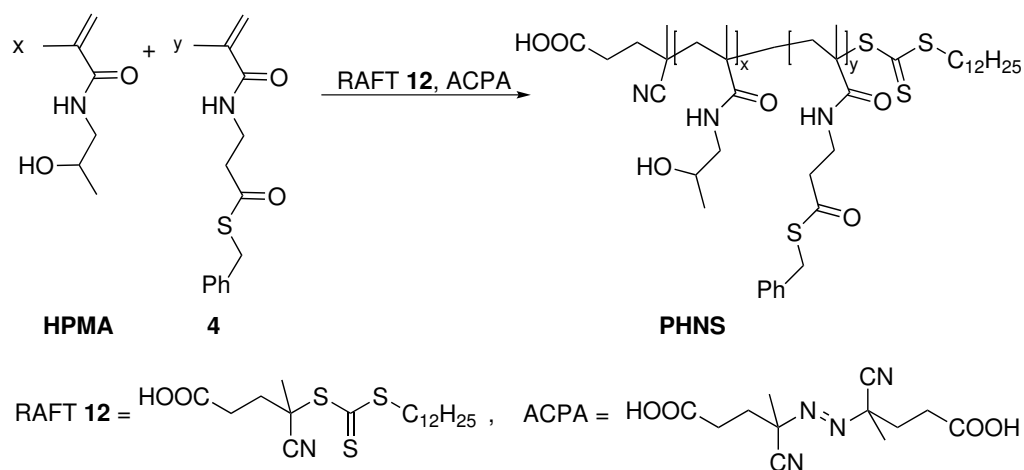


Abbildung 5.14.: RAFT-vermittelte Copolymerisation von HPMA und NMA 4.

in einer Mischung aus Dioxan und Wasser definierte Copolymere erhalten, die sich bis zu einem Umsatz von 60% auch durch eine chemisch einheitliche Verteilung der Zusammensetzung auszeichneten. Dabei hat sich 4-Cyano-4-(dodecylsulfonylthio-carbonyl)-sulfanyl-pentansäure (**12**) als geeignetes RAFT-Reagenz im Vergleich zum bisher bekannten RAFT-Reagenz **3** erwiesen. Die Entfernung des an den Kettenenden der Copolymerie eingebauten RAFT-Reagenzes gelang *in situ* unter den nukleophilen Reaktionsbedingungen in den anschließenden NCL-Reaktionen zur Kupplung cysteinylierter Liganden.

Polymere der Form poly(HPMA-*co*-NMA) wurden daher bevorzugt in einer Mischung aus Dioxan und Wasser, in Gegenwart des RAFT-Reagenzes **12** und ACPA als Initiator synthetisiert. Die Möglichkeit, Parameter wie Größe und Thioesterbeladung zu variieren, macht diesen Syntheseweg zu einem eleganten Zugang zu maßgeschneiderten Polymeren als reaktive Vorstufe von Ligand-Polymerkonjugaten.

6. Projekt A: Untersuchung der zellulären Aufnahme unterschiedlich geladener Peptid-HPMA-Konjugate

Die zelluläre Aufnahme sowohl niedermolekularer als auch makromolekularer Substanzen ist für eine erfolgreiche Diagnostik und Pharmakotherapie ebenso essentiell wie für die Erforschung molekular-biologischer Prozesse. Allerdings verhindern die lipophilen Eigenschaften der Plasmamembran die Aufnahme der meisten medizinisch relevanten Substanzen. Für den Membrantransport niedermolekularer Stoffe existieren passive und aktive Membrantransportmechanismen, die allerdings auf Substanzen mit entsprechenden physikalischen und chemischen Eigenschaften beschränkt sind.^[124] Im Gegensatz dazu können größere Partikel wie Proteine und Makromoleküle unabhängig von ihren chemischen Eigenschaften über endozytotische Prozesse wie Makropinozytose internalisiert werden. Die Endozytose gilt allerdings als ineffizient im Hinblick auf die niedrige Transportgeschwindigkeit und auf das verhältnismäßig kleine Volumen der endozytotischen Vesikel, woraus eine geringe zelluläre Gesamtkonzentration resultiert.^[125,126] Dieser Prozess kann durch gezieltes Adressieren adsorptiver und rezeptorvermittelter Endozytose optimiert werden. Heparansulfate (HS), die sich an der Oberfläche aller eukaryotischer Zellen befinden, spielen dabei eine wichtige Rolle.^[127] HS sind lineare Polysaccharide und sie gehören zur Gruppe der Glykosaminoglykane. Kovalent gebunden an Proteoglykane stellen die Heparansulfatproteoglykane (HSPG) den Hauptbestandteil der Kohlenhydrathülle (Glykokalyx) dar, die die extrazelluläre Seite der Plasmamembran umgibt. Die HSPGs regulieren zahlreiche Ligand-Rezeptor-Interaktionen und wechselwirken mit einer Vielzahl extrazellulärer Liganden. Einige dieser Liganden wie z. B. Wachstumsfaktoren binden selektiv. Generell sind HSPGs aufgrund ihres polyanionischen Charakters in der Lage, über unspezifische elektrostatische Interaktionen kationische Moleküle auf der Membran zu akkumulieren, die anschließend über Makropinozytose aufgrund des natürlichen Umsatzes des HSPG internalisiert werden.^[128] Die adsorptive Endozytose kann durchaus ein effizienter Transportmechanismus sein und wird als möglicher Aufnahmeweg für Zell-penetrierende Peptide (cell-penetrating peptides CPP) diskutiert.

Als CPPs werden Peptide bezeichnet, die in der Lage sind, verschiedene Substanzen in Zellen zu internalisieren. Viele der CPPs basieren auf kurzen Protein-Transduktionsdomänen, die für die zelluläre Aufnahme von Proteinen wie dem *Drosophila* Antennapedia Homeoprotein HIV-1 Tat verantwortlich sind. Neben den von den Proteinen abgeleiteten CPPs wurden Peptide mit definierten Strukturen konzipiert,

die bekannte CPPs imitieren (Modell-CPPs) oder aus Domänen unterschiedlichen Ursprungs zusammengesetzt sind (chimäre Peptide). Die meist kurzen Peptidsequenzen (< 30 Aminosäuren) zeichnen sich durch amphipathische Eigenschaften und die Anwesenheit positiver Ladungen aus (Tat, Penetratin).^[129] Eine Ausnahme bezüglich der Amphipathizität stellen die polykationischen Polyarginine, Polylysine und Polyornithine dar, die vollständig aus positiv geladenen Aminosäuren aufgebaut sind. Neben zahlreichen CPPs sind Tat und Nonaarginin die am häufigsten verwendeten CPPs, um den Transport verschiedener Substanzen zu vermitteln.

6.1. Zielsetzung

Der Aufnahmemechanismus der CPPs wurde in den letzten Jahren kontrovers diskutiert. Es wurde zunächst angenommen, dass die Peptide direkt durch die Membran ohne Beteiligung endozytotischer Prozesse oder spezifischer Proteintransporter internalisieren.^[130] Richard *et al.* konnten allerdings in ihrer Studie zur Internalisierung von Tat und R₉ belegen, dass die Fixierung der Zellen für mikroskopische Untersuchungen zum einen zu einer künstlichen intrazellulären Umverteilung der CPPs sorgt. Zum anderen konnten sie für die beiden untersuchten CPPs zeigen, dass die zelluläre Aufnahme auf endozytotischen Prozessen basiert.^[131] Darüber hinaus hat die Arbeitsgruppe von Brock für hohe Konzentrationen von Nonaarginin einen energieunabhängigen sphingomylinasevermittelten Aufnahmemechanismus beschrieben.^[117,132] Diese direkte Translokation führte zu einer gleichmäßigen Verteilung der Substanzen im Cytoplasma, wurde allerdings nur für niedermolekulare R₉-gekoppelte Substanzen beobachtet und nicht für ein R₉-HPMA-Konjugat (28 kDa poly(HPMA)). Neben Brock sind inzwischen viele Wissenschaftler von einer Koexistenz endozytotischer Prozesse und einer direkten Translokation überzeugt.^[133,134]

Im Hinblick auf Polykationen haben Mitchell *et al.* gezeigt, dass Guanidingruppen in Argininen aufgrund ihrer Fähigkeit, stabile bidentate Wasserstoffbrückenbindungen mit den extrazellulär präsentierten Anionen der Plasmamembran auszubilden, vorteilhafte Eigenschaften in Bezug auf die zelluläre Aufnahme besitzen.^[135] Die Internalisierung von Polyargininen über die Bindung an Heparansulfate (HS) mit anschließender Endozytose wurde ebenfalls von Fuchs *et al.* bestätigt.^[136] Darüber hinaus wurde mit peptoiden Strukturen der Einfluss des Rückrats auf die zelluläre Aufnahme untersucht und festgestellt, dass Modifikationen am Rückrat keine Auswirkungen zeigten. Allerdings war die Anwesenheit und eine minimale Anzahl der Guanidin-Kopfgruppe entscheidend für eine effiziente Aufnahme.^[137,138]

Im Hinblick auf diese Arbeiten sollten im Rahmen dieses Projektes durch Ligations entsprechender Aminosäuren unterschiedlich geladene Peptid-HPMA-Konjugate hergestellt werden und deren Aufnahmeeffizienz in Abhängigkeit von ihrer Oberflächenladung untersucht werden (Abbildung 6.1). Die Performance der multivalenten Konjugate sollte mit der eines nonaargininbeladenen HPMA Copolymers in Bezug auf das Zetapotential und die Aufnahme in Zellen verglichen werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, welche Mechanismen für die zelluläre Aufnahme

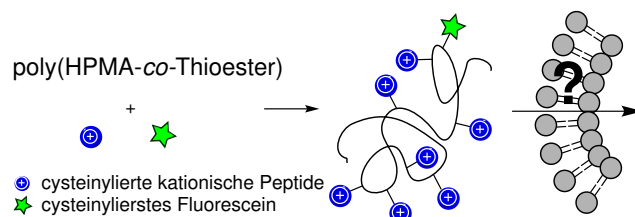


Abbildung 6.1.: Oberflächenladungsabhängige Internalisierungsstudien.

verantwortlich sind. Dieses Projekt sollte einerseits einen Beitrag zur Aufklärung der CPP-vermittelten Internalisierung leisten und andererseits Alternativen zum Einsatz von CPPs aufzeigen.

6.2. Darstellung und Charakterisierung unterschiedlicher Peptid-HPMA-Konjugate

Unterschiedlich geladene HPMA-Konjugate wurden durch NCL-Reaktionen entsprechend geladener Peptide an die Thioester-HPMA-Copolymere PHNS-1 und PHNS-2 erhalten. PHNS-1 und 2 unterscheiden sich in ihren Molmassen (41 kDa bzw. 15.1 kDa), Molmassenverteilungen und der Thioesterbeladung (Tabelle 6.1).

Tabelle 6.1.: Eigenschaften der Thioester-HPMA Copolymere.

Copolymer	Abk.	Methode	Beladung ^a (mmol/g)	M _n ^b (g/mol)	M _w ^b (g/mol)	PDI ^b
poly(HPMA-co-NMAS)	PHNS-1	FRP	0.7	41000	85380	2.1
	PHNS-2	RAFT	0.4	15120	17820	1.2

^a ¹H-NMR-Spektroskopie,

^b Größenausschlusschromatographie

Einführung der Oberflächenladung. Positive und negative Ladungen wurden durch Einführung der jeweils entsprechenden Dipeptide Cys-Arg (CR) und Cys-Glu (CE) erzeugt. Das Dipeptid Cys-Thr (CT), welches genauso wie die Polymerseitenketten einen 2-Hydroxypropylrest trägt, wurde verwendet, um ein elektrisch neutrales Konjugat zu generieren. Darüber hinaus wurde im Vergleich zu HPMA-Konjugaten mit unterschiedlichen Oberflächenladungen *N*-cysteinyliertes Nonaarginin (CR₉) als bekanntes CPP an PHNS-1 und 2 gekuppelt.^[129,139,140] Alle eingesetzten Peptide wurden durch Fmoc-basierte Festphasensynthese auf Rinkamid-Harz synthetisiert und als vollständig geschützte Peptid-Amide mit *N*-terminalem Cystein erhalten. In den sich anschließenden NCL-Reaktionen konnten gleichzeitig verschiedene Peptide im Sinne einer Eintopfreaktion an das Polymer gekuppelt werden. Die endgültige Peptidzusammensetzung im Konjugat wurde mit quantitativer, gaschromatographischer

Aminosäureanalyse bestimmt (Firma *Genaxxon bioscience GmbH*).

Fluorophorlabeling. Neben den eigentlichen Peptiden wurde *N*-L-Cysteinyl-5-amino-fluorescein (**13**) als Fluorophormarker an die Polymere gekuppelt, um zum einen die Quantifizierung und zum anderen die Lokalisation der Peptid-Polymerkonjugate in zellulären Experimenten zu ermöglichen. Aufgrund der begrenzten Löslichkeit des Fluoresceinderivates **13** im Phosphatpuffer wurden alle NCL-Reaktionen in einer Mischung aus Phosphatpuffer und Dioxan (2:1) in Gegenwart von Thiophenol als Katalysator durchgeführt.^[141]

Simultane Ligation mehrere Liganden. Die Kupplung unterschiedlicher Liganden und des Fluorophormarkers **13** konnte simultan in einer Eintopf-NCL-Reaktion erfolgen. Dabei wurden alle NCL-Reaktionen mit einem Peptidüberschuss und einem Fluoresceinanteil von 0.1 Äq. bei einer Gesamtreaktionszeit von 32 Stunden durchgeführt.

Generell lieferten alle NCLs gute Ausbeuten (71 % - 99 %) und hohe Beladungen in Bezug auf kurze Peptidsequenzen (PHN-CR, -CT and -CE-1, 19-24 Peptide pro Polymerkette, entspricht 61-77 % Kupplungseffizienz). Moderate Peptidbeladungen wurden im Fall der längeren Peptidsequenz CR₉ (48% Kupplungseffizienz, 15 Peptide pro Polymerkette) erhalten. Die elektrostatische Abstoßung der positiv geladenen CPPs könnte für die geringe Kupplungseffizienz verantwortlich sein.

6.2.1. Zetapotential der Peptid-HPMA-Konjugate

Die Kupplung unterschiedlich geladener Peptide an die Copolymere PHNS-1 und 2 ergab Konjugate mit unterschiedlichen Oberflächenladungen, die durch Messungen des Zetapotentials¹ quantifiziert wurden. Bei der Messung des Zetapotentials wird die elektrophoretische Mobilität der Partikel durch Messung ihrer Geschwindigkeit in einem elektrischen Feld beim Wandern zur entgegen gesetzt geladenen Elektrode bestimmt.^[142]

Auswirkungen der Aminosäurereste Erwartungsgemäß wurde für das glutaminsäurebeladene HPMA-Konjugat ein negatives Zetapotential gemessen, während das neutrale, mit Threonin beladene Konjugat ein schwaches negatives Potential aufwies. Im Vergleich dazu zeigten alle argininhaltigen Konjugate positive Zetapotentiale (Tabelle 6.2). Die Zetapotentiale der positiv geladenen Peptid-Polymerkonjugate wurden im Folgenden mit der Anzahl der potentiellen positiven Ladungen korreliert.

Korrelation der Zetapotentiale mit der Anzahl der Ladungen. Das Konjugat PHN-CR-1 trug 19 Cys-Arg Dipeptide und zeigte ein Zetapotential von 17.8 mV. Bezogen auf die 19 potentiell möglichen Ladungen der einzelnen Guanidingruppen ergab

¹ siehe Methodenbeschreibung in Kapitel 11.5.1

Tabelle 6.2.: Zusammensetzung der Peptid-HPMA-Konjugate und ihre Zetapotentiale.

Peptid-Polymer-konjugat	Anzahl Peptide^a (Anzahl positiver Ladungen)	Zetapotential^b [mV]
PHN-CR-1	19 (19)	17.8±1.6
PHN-CT-1	24	-4.6±0.8
PHN-CE-1	23	-11.5±1.7
PHN-CR ₉ -1	15 (135)	23.5±5.1
PHN-CT/CR ₉ -1	22; 1 (9)	10.4±1.2
PHN-CR-2	5 (5)	11.4±1.5
PHN-CR ₉ -2	3 (27)	9.1±1.1

^a GC-Aminosäureanalyse^b 0.14 mg/ml an PHNS-1 und 0.25 mg/ml an PHNS-2-Konjugaten in 1.5 mM NaCl-Lösung

sich ein relatives Zetapotential von 0.9 mV pro potentielle Ladung (17.8 mV/19 Guanidingruppen). Das Nonaargininkonjugat PHN-CT/CR₉-1 trug ein einzelnes Nonaargininpeptid und zeigte ein vergleichbares relatives Zetapotential von 1.15 mV pro potentielle Ladung. Im Gegensatz dazu wurde für das Konjugat PHN-CR₉-2, ausgestattet mit drei CR₉-Peptiden, ein signifikant geringeres relatives Zetapotential von 0.33 mV pro potentielle Ladung gemessen. Eine weitaus stärkere Abnahme des Zetapotentials pro potentiell geladene Gruppe wurde für das Konjugat PHN-CR₉-1 bestimmt, welches mit insgesamt 135 Guanidingruppen lediglich ein relatives Zetapotential von 0.17 mV pro potentielle Ladung aufwies.

Die Korrelation der gemessenen Potentiale mit den vorhandenen Gruppen machte deutlich, dass der Beitrag einer jeden positiven Ladung zum Zetapotential stark variiert und von der Anzahl und der Länge der gekuppelten Peptide abhängt. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass nur ein Teil der Guanidingruppen protoniert vorliegt, so dass der potentiell mögliche Beitrag zum Zetapotential viel geringer ausfällt. Im folgenden wurde untersucht, welche Auswirkungen unterschiedlich geladene Peptid-Polymerkonjugate im Vergleich zum poly(HPMA)-gebundenen Nonaarginin als bekanntes CPP auf die Zellvitalität und die zelluläre Aufnahme in HeLa-Zellen² haben.

6.2.2. Cytotoxizität der Peptid-HPMA-Konjugate

Polykationische Polymere sind wie mehrfach beschrieben wurde für ihre Cytotoxizität bekannt. Beispielsweise sind Polyethylenimin und Polylysin in höheren Konzentrationen toxisch, wobei die Toxizität mit höheren Molmassen zunimmt.^[143] Im Vorfeld zu den Internalisationsstudien wurde daher die Cytotoxizität aller Peptid-HPMA-Konjugate in HeLa-Zellen mit 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-

²Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs)

bromid (MTT) untersucht (Abbildung 6.2).^[144] Der MTT-Test ist ein kolorimetrischer Assay, der die Aktivität von Enzymen in einer Reduktionsreaktion des gelben MTT zum blau-violetten Formazan kolorimetrisch bestimmt. Die im MTT-Assay eingesetzte

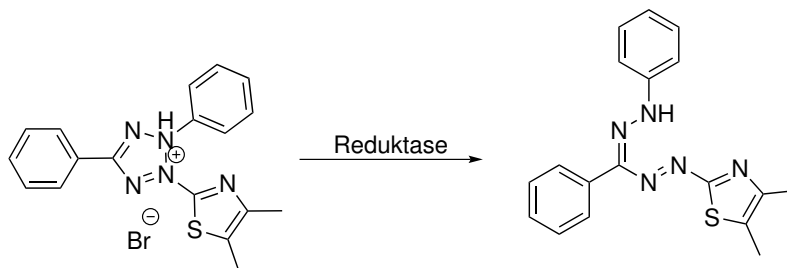


Abbildung 6.2.: Reduktionsreaktion des MTT.

Gesamtkonzentration der Konjugate lag zwischen 0.001 und 0.2 mg/ml. Das mit 15 CPPs beladene PHN-CR₉-1 zeigte bereits bei einer Konzentration von 0.1 mg/ml eine Zellvitalität von nur 50 %. Das kleine HPMA-Konjugat mit drei CPPs (PHN-CR₉-2) wurde sogar bis zu einer Konzentration von 0.35 mg/ml getestet und zeigte bei einer Konzentration von 0.175 mg/ml nur eine geringfügige Abnahme in der Zellvitalität. Im

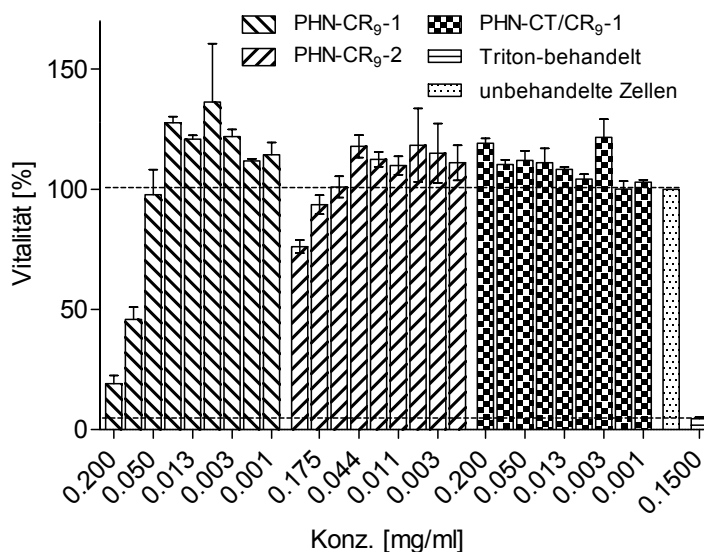


Abbildung 6.3.: MTT-Assay zur Bestimmung der Cytotoxizität der Peptid-HPMA-Konjugate.

Gegensatz dazu wurde für PHN-CT/CR₉ mit einem R₉-Peptid keine Cytotoxizität bis zu einer Konzentration von 0.2 mg/ml gemessen. Im Hinblick auf die CPP-beladenen Konjugate PHN-CT/CR₉-1, PHN-CR₉-2 and PHN-CR₉-1 konnte die Cytotoxizität

durch eine niedrige CPP-Beladung signifikant reduziert werden (1 vs. 3 vs. 15 Kopien von R₉ pro Polymerkette) (Abbildung 6.3).

Bis auf das hochbeladene Konjugat PHN-CR₉-1 waren alle Peptid-HPMA-Konjugate im Konzentrationsbereich von 0.1 bis 0.2 mg/ml gut verträglich (entspricht im Fall von PHN-CR-1 einer Peptidkonzentration von 43-86 µM).

6.2.3. Zelluläre Aufnahme in Abhängigkeit von der Oberflächenladung

Im nächsten Schritt wurde untersucht, welchen Einfluss die verschiedenen Oberflächenladungen der Peptid-HPMA-Konjugate im Vergleich zu den Nonaarginin-Polymerkonjugaten auf die zelluläre Aufnahme in HeLa-Zellen haben. Dafür wurden HeLa-Zellen mit allen nicht-toxischen Peptid-HPMA-Konjugaten inkubiert (30 min für CLSM- und 60 min für FACS-Experimente). Lediglich das hoch-toxische Nonaarginin-konjugat PHN-CR₉ wurde von den Zellversuchen ausgeschlossen. Die Internalisierung und intrazelluläre Lokalisation wurden mit konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) verfolgt, während für die Quantifizierung die Durchflusszytometrie (FACS)³ diente (Kapitel 11.6.4).

Da die Fluoresceinbeladungen der Konjugate geringfügig voneinander abwichen, wurden relative Fluoreszenzintensitäten bestimmt, um die relative zelluläre Aufnahme der Polymerkonjugate direkt aus den FACS-Daten ableiten zu können (Tabelle 6.3).

Tabelle 6.3.: Auswertung der FACS-Daten mit relativen Fluoreszenzintensitäten.

Peptid-Polymer-konjugat	Fluoreszenz-intensität ^a [a.u.]	Faktor ^b	FACS-Daten (37 °C)	korrig. Daten (37 °C)	FACS-Daten (4 °C)	korrig. Daten (4 °C)
PHN-CR-1	1227.8	1	64.5	64.5	7.1	7.1
PHN-CT-1	1373.3	1.1	4.6	4.1		
PHN-CE-1	2040.5	1.7	4.7	2.8		
PHN-CT/CR ₉ -1	978.3	0.8	63	79.1	10.1	7.7
PHN-CR-2	613.8	0.5	6.7	13.4	4.0	8.0
PHN-CR ₉ -2	1593	1.3	89.1	68.7	10.0	7.7

^a 0.14 mg/ml bezogen auf PHNS-1 und 0.25 mg/ml bezogen auf PHNS-2 Konjugate im Boratpuffer (0.1 M, pH 9.0)

^b bezogen auf Fluoreszenzintensität von PHN-CR-1

Voraussetzung für eine effiziente Internalisierung. Eine signifikante Internalisierung und Membranakkumulation wurden für die positiv geladenen Konjugate PHN-CR-1, PHN-CR-2, PHN-CT/CR₉-1 und PHN-CR₉-2 beobachtet (Abbildung 6.4, 6.5). Im Gegensatz dazu zeigten sowohl die negativ geladenen als auch die neutralen Konjugate keine zelluläre Aufnahme. Die Beobachtungen, dass ein positives Zetapotential eine wichtige Grundvoraussetzung für die Internalisierung ist, stimmt mit den von Kopeček und seinen Kollegen durchgeführten Studien zu HPMA-Copolymeren

³FACS = Fluorescence activated cell sorting

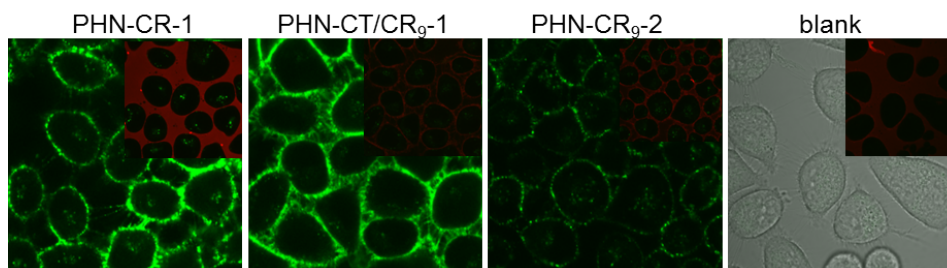


Abbildung 6.4.: Zelluläre Aufnahme in Hela-Zellen nach 30 min Inkubation mit den angegebenen Konjugaten bei 37 °C (0.043 mg/ml im Fall der PHNS-1-basierten Konjugate und 0.075 mg/ml im Fall der PHNS-2-basierten Konjugate); grün: Fluoreszenzkanal, rot: Trypanblaufärbung.

überein.^[145] Signifikante Unterschiede zwischen den positiv geladenen Konjugaten wurden bei einer genaueren Betrachtung der Aufnahmeeffizienz und des Zetapotentials in Korrelation zur Anzahl vorhandener Guanidiniumgruppen deutlich.

Monoargininkonjugate. Das Konjugat PHN-CR-1, ausgestattet mit 19 Guanidiniumgruppen, wies ein Zetapotential von 18 mV auf und wurde sehr gut internalisiert (ca. 65 a.u.). Im Gegensatz dazu wurde das mit fünf Guanidiniumgruppen beladene Konjugat PHN-CR-2 und einem Zetapotential von 11 mV nur geringfügig aufgenommen. Im Hinblick auf die Monoargininkonjugate war offensichtlich ein Minimum an Beladungsdichte für eine effiziente zelluläre Aufnahme notwendig.

CPP-Konjugate. Für beide nonaargininbeladenen Polymere PHN-CT/CR₉-1 und PHN-CR₉-2 wurden, trotz völlig unterschiedlicher CPP-Beladungen (1 bzw. 3 CPPs), nahezu identische Zetapotentiale (10.4 bzw. 9.1 mV) bestimmt, die in ebenfalls vergleichbar guten Internalisierungen resultierten (79 bzw. 69 mV). Im Hinblick auf die Verwendung von CPPs war bereits eine geringe Beladungsdichte für eine effiziente zelluläre Aufnahme ausreichend. Offensichtlich waren nicht allein die kationischen Eigenschaften der Guanidine, sondern ebenso ihre Anordnung in Form eines strukturell definierten Nonapeptids vorteilhaft für die zelluläre Aufnahme.

Vergleich zwischen Arginin- und Nonaargininkonjugaten. Das mit einzelnen Argininen beladene Konjugat PHN-CR-1 und das nonaargininbeladene Polymer PHN-CT/CR₉-1 zeigten in FACS-Messungen vergleichbare zelluläre Aufnahmen (64.5 bzw. 79.1 a.u.), obwohl das Zetapotential des Arginin- im Vergleich zu dem des Nonaargininkonjugats PHN-CT/CR₉-1 nahezu doppelt so groß war (17.8 bzw. 10.4 mV). Im Gegensatz dazu wurde von den niedermolekularen und gering beladenen Konjugaten PHN-CR-2 und PHN-CR₉-2 trotz ähnlicher Zetapotentiale (PHN-CR-2: 11.4 bzw. PHN-CR₉-2: 9.1 mV) das Nonaargininkonjugat signifikant stärker internalisiert (68.7 bzw. 13.4 a.u.).

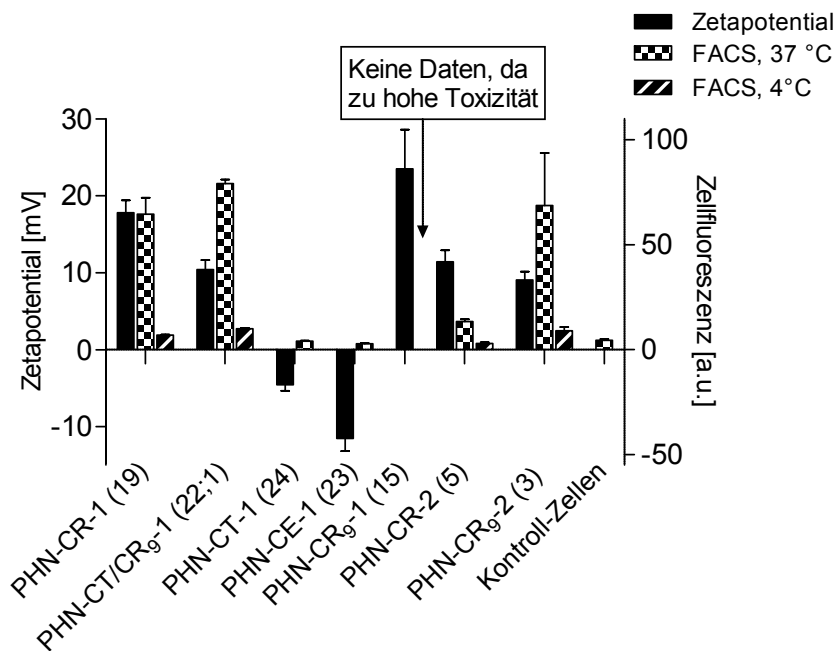


Abbildung 6.5.: Korrelation des Zetapotentials mit der Zellfluoreszenz der FACS-Messungen bei 4 und 37 °C, 0.14 mg/ml bezogen auf PHNS-1 und 0.25 mg/ml bezogen auf PHNS-2 Konjugate; (Anzahl gekuppelter Peptide).

Fazit. Die Korrelation der Zetapotentiale mit dem Internalisierungsverhalten unterschiedlich geladener Konjugate zeigte, dass positive Ladungen zwar eine Grundvoraussetzung für eine effiziente zelluläre Aufnahme darstellen, aber nicht das ausschließlich bestimmende Kriterium sind.

Die Anwesenheit des CPPs Nonaarginin hat sich mit einem vergleichsweise geringen Zetapotential auf die Internalisierung der Peptid-Polymerkonjugate positiv ausgewirkt. Im Gegensatz dazu resultierten multivalent präsentierte Arginine in Peptid-Polymerkonjugaten mit einer vergleichbar starken Internalisierung, zeichneten sich aber zudem durch eine exzellente Biokompatibilität aus.

6.2.4. Untersuchungen zum Aufnahmemodus

Die bisherigen Experimente haben gezeigt, dass die positiv geladenen Arginin- und Nonaargininkonjugate PHN-CR-1, PHN-CT/CR₉-1 und PHN-CR₉-2 effizient in HeLa-Zellen internalisieren. Die zelluläre Aufnahme der Konjugate wurde im Folgenden im Hinblick auf die Energieabhängigkeit und die spezifischen Endozytosewege untersucht. Zur Unterdrückung aller energiegetriebener zellulärer Prozesse wurden einerseits Experimente bei 4 °C und andererseits unter Verwendung eines energiereduzierten

Mediums (ED-Medium)⁴ durchgeführt.

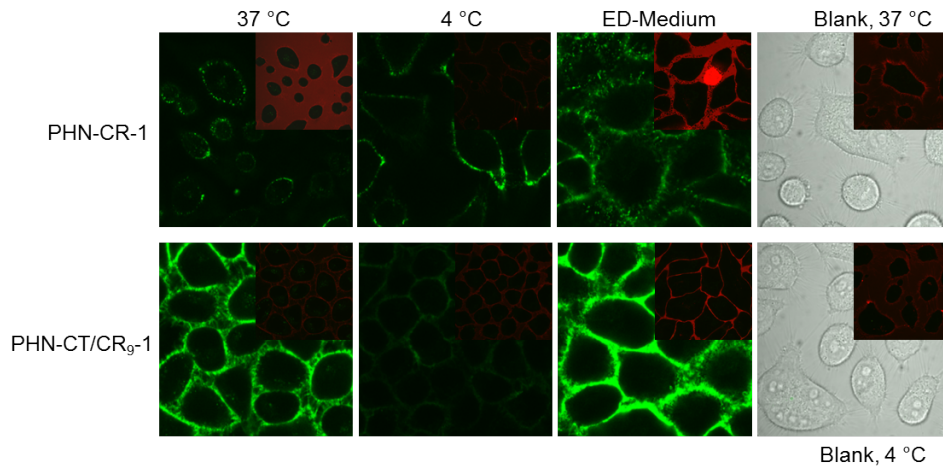


Abbildung 6.6.: Untersuchung energieabhängiger Aufnahmeprozesse der Konjugate PHN-CR-1 und PHN-CR₉/CT-1 (0.043 mg/ml); grün: Fluoreszenzkanal, rot: Trypanblaufärbung.

Energieabhängigkeit der Internalisierung. Nach Inkubation der Zellen mit den Konjugaten PHN-CR-1, PHN-CT/CR₉-1 und PHN-CR₉-2 bei 4 °C hat im Vergleich zum Versuch bei 37 °C keine zelluläre Aufnahme stattgefunden, sondern lediglich eine Adsorption der Konjugate an der extrazellulären Membran. Diese Beobachtungen konnten in FACS-Messungen quantifiziert werden (Abbildung 6.5, 6.6). Ein vergleichbares Ergebnis wurde nach Inkubation mit den Konjugaten PHN-CR-1 und PHN-CT/CR₉-1 im ED-Medium erhalten (nur CLSM)(Abbildung 6.6). Das Ausbleiben der Internalisierung unter energiereduzierten Bedingungen deutete darauf hin, dass bei der Aufnahme der kationischen Peptid-HPMA-Konjugate energieabhängige Prozesse beteiligt sind. Diese Vermutung wurde durch die Lokalisation der Polymere in Vesikeln, bei denen es sich wahrscheinlich um Endosomen handelt, unterstützt. Damit konnte die Beteiligung direkter Translokationsprozesse ausgeschlossen werden.

Spezifische Endozytosewege. Für eine detaillierte Untersuchung der endozytosevermittelten Internalisierung wurde die zelluläre Aufnahme von PHN-CR-1 and PHN-CT/CR₉-1 bei gleichzeitiger Inhibierung der einzelnen endozytotischen Wege untersucht. Cytochalasin D wurde als unspezifischer Inhibitor für aktinbasierte Endozytose,^[146,147] Chlorpromazin als spezifischer Inhibitor für clathrinvermittelte Endozytose^[148] eingesetzt, während in Gegenwart von Nystatin die caveolinvermittelte Endozytose^[149] inhibiert werden sollte. Die Makropinozytose wurde durch den

⁴Energy-Depletion Medium, welches aus den beiden Komponenten 2-Desoxyglucose, einem kompetitiven Antagonisten der Glukose, und dem Cytochrom-Oxygenase Inhibitor Natriumazid besteht

Einsatz der beiden Phosphoinositid 3-kinase (PI3K) Inhibitoren Wortmannin und LY294002^[150] untersucht.

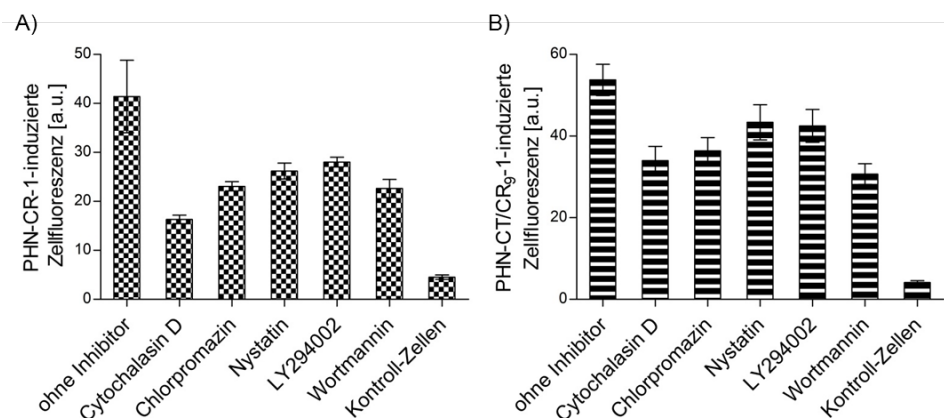


Abbildung 6.7.: Inhibition einzelner endozytotischer Wege bei der Aufnahme der Konjugate A) PHN-CR-1 und B) PHN-CT/CR₉-1, jeweils 0.14 mg/ml; grün: Fluoreszenzkanal, rot: Trypanblaufärbung.

Eine reduzierte Aufnahme der beiden Konjugate PHN-CR-1 and PHN-CT/CR₉-1 wurde für alle genannten Inhibitoren beobachtet, allerdings sind die Unterschiede in der Wirksamkeit der Inhibitoren nicht signifikant (Abbildung 6.7). Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass kein spezifischer endozytotischer Mechanismus die zelluläre Aufnahme dominierte, sondern die zur Verfügung stehenden alternativen endozytotischen Routen schienen vielmehr den Aufnahmemodus zu bestimmen.

6.3. Zusammenfassung

Zur Darstellung multivalenter, detektierbarer Peptid-Polymerkonjugate, die sich durch unterschiedliche Oberflächenladungen auszeichnen, wurden *N*-cysteinylierte Dipeptide entsprechend geladener Aminosäuren gleichzeitig mit *N*-cysteinyliertem Fluorescein in NCL-Reaktionen gekuppelt. Die unterschiedlich geladenen Polymere wurden mit Konjugaten verglichen, die Nonaarginine als kationische CPPs in Kombination mit Fluorescein tragen. Das Zetapotential aller Konjugate zeigte keine Linearität zwischen der Oberflächenladung und der Anzahl der potentiellen Ladungen. Dieser Effekt war besonders ausgeprägt beim Vergleich des mit einzelnen Argininen ausgestatteten Konjugats PHN-CR-1 und des nonaargininbeladenen PHN-CR₉-1. Offensichtlich war nicht jede Guanidingruppe protoniert und trug daher nicht zum Zetapotential bei.

Untersuchungen der Cytotoxizität aller Monoargininkonjugate auf HeLa-Zellen zeigte grundsätzlich nur leichte toxische Effekte im für zelluläre Experimente relevanten Konzentrationsbereich. Im Gegensatz dazu wirkten Nonaargininkonjugate insbesondere bei einer hohen CPP-Beladung, wie z. B. im Fall des Konjugats PHN-CR₉-1, signifikant toxisch auf die behandelten Zellen.

Internalisierungsstudien haben gezeigt, dass für eine effiziente zelluläre Aufnahme positive Ladungen notwendig sind. Die Korrelation der Internalisierung mit den dazugehörigen Zetapotentialen zeigte allerdings, dass nicht allein das Zetapotential für eine effiziente Aufnahme ausschlaggebend war. CPP-beladene Konjugate, die mit nur einem oder drei Peptiden ausgestattet waren, wiesen im Vergleich zum PHN-CR-1 Konjugat mit 19 einzelnen Argininen ein deutlich geringeres Zetapotential auf. Die Internalisierungen der Mono- und Nonaargininkonjugate waren allerdings vergleichbar hoch. Daraus konnte geschlossen werden, dass nicht allein die kationischen Eigenschaften der Guanidine, sondern ebenso ihre Anordnung in Form eines strukturell definierten Nonapeptids vorteilhaft für die zelluläre Aufnahme sind (PHN-CT/CR₉-1 und PHN-CR₉-2).

Zur Aufklärung des Aufnahmemodus wurde spezifische Inhibitoren eingesetzt, wobei allerdings keiner der untersuchten Endozytosewege vollständig inhibiert wurde. Dementsprechend konnte auf keinen spezifischen Endozytoseweg geschlossen werden. Das Vorhandensein endosomaler Strukturen und die energieabhängige Internalisierung deuteten jedoch generell auf Endozytose als Aufnahmemodus hin.

Mit einer exzellenten Biokompatibilität im Gegensatz zu Nonaargininkonjugaten und ihrer vergleichbar effizienten zellulären Aufnahme stellen monoargininbeladene Konjugate eine Alternative zum toxischen Nonaarginin als CPP dar und wurden als effizientes Transport-Tool für intrazelluläre Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen entdeckt.

7. Projekt B: HPMA-gebundene MMP-11 Substrate zur Früherkennung von Pankreaskrebs

Der Bauchspeicheldrüsenkrebs macht nach Angaben der Deutschen Krebsgesellschaft nur einen Anteil von etwa drei Prozent aller Krebserkrankungen in Deutschland aus und tritt im Vergleich zu anderen Krebsarten wie Brustkrebs relativ selten auf. Für Betroffene sind die Prognosen allerdings sehr schlecht, da der Pankreaskrebs aufgrund der schnellen Ausbreitung besonders bösartig und für sechs Prozent aller Krebstodesfälle verantwortlich ist.^[151] Das Gefährliche an diesem Krebs ist, dass Beschwerden erst im bereits weit fortgeschrittenen Stadium des Wachstums auftreten. Für die Früherkennung des Pankreaskrebs fehlen charakteristische Symptome und die entsprechenden diagnostischen Methoden. Bei einer Größe von 1 cm, die typischerweise von konventionellen bildgebenden Verfahren abgebildet werden kann, hat der Bauchspeicheldrüsenkrebs bereits Metastasen gebildet.^[152]

Dr. Sina Meyer hat sich während ihrer Promotion mit der Früherkennung von Pankreaskrebs beschäftigt und ihre Dissertation zu diesem Thema mit dem Titel: „Design, Synthesis, and Evaluation of MMP-11 FRET Substrates for the Early Detection of Pancreatic Cancer“ angefertigt.^[153] Der Fokus ihrer Arbeit lag auf der Entwicklung peptidbasierter Substrate, die in bildgebenden Verfahren (Imaging) potentielle Vorläufer des Adenokarzinoms bereits auf Proteinebene in einem frühen Stadium der Läsion optisch markieren sollten. Das Zielprotein ihrer Substrate war die Matrix Metalloprotease-11 (MMP-11), die im Rahmen des EU Projektes „Novel molecular diagnostic tools for the prevention and diagnosis of pancreatic cancer“ (MolDiag-PaCa) als geeigneter Biomarker für Bauchspeicheldrüsenkrebs identifiziert und validiert worden ist.

Matrix Metalloproteasen (MMPs) sind Endopeptidasen, die die extrazelluläre Matrix von Proteinen abbauen und folglich die Metastasierung und Angiogenese des Tumors erleichtern.^[154] Die Struktur der MMPs zeichnet sich durch drei charakteristische Domänen aus i) dem Pro-Peptid, ii) der katalytischen und iii) C-terminalen Domäne. Typischerweise befindet sich im aktiven Zentrum der katalytischen Domäne der MMPs ein katalytisches Zinkatom, das durch drei Histidine einer konservierten Peptidsequenz gebunden wird. Das Enzym befindet sich in seiner inaktiven Form, wenn der Cysteinrest der Pro-Peptid Domäne durch Koordination an das katalytische Zink, die Substratspaltung verhindert. Die hämopexinartige C-terminale Domäne hilft dem Enzym bei der Verankerung in der extrazellulären Matrix oder Zellmembran, bestimmt darüber hinaus die Substratspezifität und bildet das Zentrum für

Wechselwirkungen mit TIMPs¹.^[155] MMPs werden typischerweise in der extrazellulären Membran gebildet und aktiviert. Für das MMP-11 wurde allerdings gezeigt, dass eine proMMP-11 Form intrazellulär aktiviert und dann erst extrazellulär sezerniert wird.^[156] Darüber hinaus wurde sogar eine Isoform des MMP-11 intrazellulär detektiert, dessen biologische Rolle allerdings noch nicht aufgeklärt ist.^[157]

Als optische Tracer hat Dr. Sina Meyer peptidische Substrate entwickelt, die von der Protease MMP-11 erkannt und geschnitten werden. Um den Vorgang des Substratumsatzes zu visualisieren, wurden die Substrate mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen nach dem Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) ausgestattet. FRET ist ein Prozess der Energieübertragung, bei dem die Energie des Donor-Farbstoffs strahlungsfrei auf den Akzeptor-Farbstoff übertragen wird. Die Intensität des FRET-Effektes hängt dabei zum einen vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor ab, der im Bereich von bis zu 10 nm liegt, und zum anderen von der Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors. Dementsprechend wird im Fall eines intakten Substrates die Fluoreszenz aufgrund der räumlichen Nähe gequenchet und bei erfolgter Spaltung durch das Enzym mit der Wellenlänge des Donors emittiert.

Darauf basierend hat Dr. S. Meyer eine Substratbibliothek mit dem FRET-Paar Fluorescein und 4-(4'-(Dimethylamino)phenylazo)benzoesäure (Dabcyl) synthetisiert. In Abbildung 7.1 wird am Beispiel SMP124 die typische Struktur der Substrate veranschaulicht. Fluorescein in orange und Dabcyl als Quencher in rot dargestellt

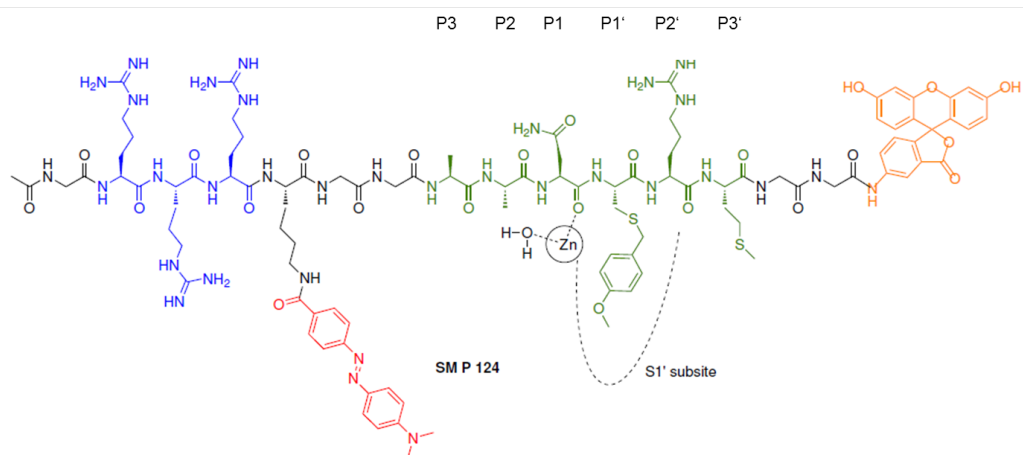


Abbildung 7.1.: Generelle Struktur der FRET-Substrate für MMP-11.^[153]

sind so angeordnet, dass sie in der FRET-entsprechenden räumlichen Nähe sind. Die drei in blau dargestellten Arginine wirken sich mit ihren hydrophilen Eigenschaften positiv auf das Lösungsverhalten und die Zellgängigkeit der Substrate aus. In grün ist die MMP-11 Erkennungssequenz dargestellt. Dabei bindet das Methoxybenzyl (MeOBn)-geschützte Cystein wahrscheinlich in die katalytische S' Unterseite des

¹tissue inhibitor of metalloproteinases

Enzyms. Der Sauerstoff der Carbonylgruppe in Peptidposition P1 koordiniert dagegen das katalytische Zinkion. Die Spaltung der Substrate durch Hydrolyse findet zwischen P1 und P1' statt und benötigt dafür ein Wassermolekül.

Die Substratbibliothek wurde auf ihre Aktivität und Selektivität gegenüber MMP-11 im Vergleich zu anderen MMPs getestet und lieferte das Substrat SMP124 als das am besten geeignete FRET-Substrat. Die Aktivität von SMP124 wurde darüber hinaus *in vitro* an der humanen Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2 und der Brustkrebszelllinie MCF-7 erfolgreich validiert.

7.1. Zielsetzung

Die *in vivo*-Anwendung der MMP-11-Substrate war allerdings problematisch, da sie aufgrund des proteolytischen Abbaus über die Niere und Galle schnell aus dem Körper eliminiert wurden.

Probleme der Löslichkeit, Plasmastabilität und der Bioverfügbarkeit können wie bereits in der Einleitung diskutiert durch die Konjugation der Peptide an ein hydrophiles, biokompatibles Polymer gelöst werden. Der EPR-Effekt² sorgt darüber hinaus für eine erhöhte Akkumulation der Peptid-Polymerkonjugate im Tumorgewebe (Kapitel 2.1).

Im Rahmen einer Kooperation mit Dr. S. Meyer sollte daher das biologisch aktivste MMP-11-Substrat SMP124 als Konjugat mit poly(HPMA) als Trägerpolymer dargestellt werden, um bei der *in vivo*-Anwendung einen gezielten Transport der Konjugate und ihren Schutz vor proteolytischem Abbau zu gewährleisten. Fluoresceinmarkierte Peptid-Polymersubstrate konnten aufgrund der geringen Penetrationstiefe des Fluoresceins und der Autofluoreszenz des Körpergewebes ausschließlich für das endoskopische Fluoreszenz imaging eingesetzt werden.^[153] Um den Substratumsatz mit einem nichtinvasiven Verfahren *in vivo* detektieren zu können, sollten die Peptid-Polymerkonjugate mit einem Near-Infrared Fluorophor (NIRF)³ markiert werden (Abbildung 7.2).

Die im Rahmen dieser Kooperation entstandenen Ergebnisse sind Hauptbestandteil der genannten Dissertation,^[153] so dass im Folgenden der Schwerpunkt auf der Entwicklung der Peptid-Polymerkonjugate liegt.

7.2. Konzept zur *in vivo*-Anwendung peptidischer MMP-11 Substrate

Die für *in vivo*-Experimente notwendige Polymerkonjugation sollte über eine NCL-Reaktion an das Thioester-HPMA Copolymer PHNS-1 erfolgen. Die ursprüngliche Peptidsequenz des Substrates SMP124 musste dementsprechend *N*-terminal durch das für die Kupplungsreaktion notwendige Cystein erweitert werden.

²Kapitel 2.1.1

³nahes Infrarot (NIR)

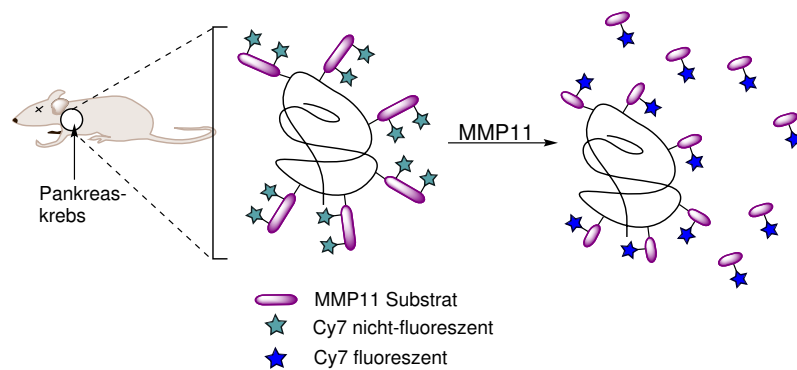


Abbildung 7.2.: Anwendung polymerer Substrate in der molekularen Diagnostik.

Die Visualisierung des Substratumsatzes *in vivo* erforderte darüber hinaus eine Modifizierung des FRET-Systems mit NIR-Fluorophoren, um ein nichtinvasives Imaging zu ermöglichen. Als NIR-Fluorophor wurde ein Cyaninfarbstoff verwendet, der bereits von Bremer *et al.* als Label in einem MMP-2-Tracer Peptid-Polymerkonjugat basierend auf poly(Lysin-graft-MPEG⁴) eingesetzt wurde.^[158] Cyanine zeichnen sich durch eine große Überlappung ihrer Anregungs- und Emissionsspektren aus, was bei räumlicher Nähe im Sinne eines FRET-Effektes in Selbstauslöschung resultiert. Diese Klasse der Fluorophore benötigt keine weiteren Donor- oder Akzeptorfluorophore, sondern kann bei gegebener räumlicher Nähe mit sich selbst ein FRET-Paar ausbilden. Die Substrat-HPMA-Konjugate sollten mit dem Cyaninfarbstoff NIR797 (Cy 7) markiert werden, der über eine Isothiocyanatfunktionalität an ein ϵ -Lysinamin des Peptids kovalent gebunden werden kann.

7.2.1. Synthese NIRF-markierter Substrat-Polymerkonjugate

Im Hinblick auf die beiden notwendigen synthetischen Schritte i) NCL-Reaktion für die Anknüpfung an den polymeren Träger poly(HPMA) und ii) die Kupplung des isothiocyanatfunktionalisierten Cyaninfluorophors wurde die auf SMP124-basierende Peptidsequenz entsprechend modifiziert und die Peptide SMP110, SMP137 und SMP192 synthetisiert (Tabelle 7.1, 1-3). Sie tragen alle ein für die Polymeranknüpfung benötigtes *N*-terminales Cystein und unterscheiden sich zum einen in der Anzahl der vorhandenen Lysine und zum anderen in der An- bzw. Abwesenheit von drei Argininen (Tabelle 7.1, 3). Die Lysine sind für die Einführung des Cy 7 Labels notwendig, während die zusätzlichen Arginine ursprünglich die Lösungseigenschaften und die Zellgängigkeit der Substratsequenzen verbessert haben. In Kombination mit dem hydrophilen poly(HPMA) sind sie allerdings überflüssig, so dass mit SMP110 und SMP137 zwei argininlose Varianten des SMP124 dargestellt wurden. Darüber hinaus wurde das mit Cy 7 bereits markierte Peptid SMP190 als Fluoreszenzstandard synthetisiert (Tabelle 7.1, 4) und ein Cy 7-markiertes poly(HPMA) als Kontrolle für

⁴Methoxy-polyethylenglykol (MPEG)

in vivo-Experimente eingesetzt (Tabelle 7.1, 5). Die Kontrolle wurde durch Kupplung eines Ethylendiamin-Linkers an ein HPMA-Copolymer und anschließender Umsetzung mit NIR797 hergestellt.

Tabelle 7.1.: Verwendete Peptidsequenzen.

Nr.	Bezeichnung	Peptidsequenz
1	SMP110	H-CGGAANC(MeOBn)RMGGK(NH ₂)-NH ₂
2	SMP137	H-CGGK(NH ₂)GGAANC(MeOBn)RMGGK(NH ₂)-NH ₂
3	SMP192	H-CGRRRK(NH ₂)GGAANC(MeOBn)RMGGK(NH ₂)-NH ₂
4	SMP190	Ac-C(MeOBn)RMGGK(Cy7)-NH ₂ ^a
5	PHN-MA-Et-NH ₂	poly(HPMA-co-MA-NH-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂) ^b

^a Fluoreszenzstandard

^b poly(HPMA) ohne Substrat als Kontrolle, MA = Methacrylat

Da die Einführung des Cy7 Fluorophors an die Lysinamine der jeweiligen Peptidsequenzen an der Festphase nicht erfolgreich war, wurden die Substrate zuerst über NCL-Reaktion and das Thioester-HPMA-Copolymer gekuppelt und in einer nachgelagerten Reaktion mit NIR797 umgesetzt. Als polymerer Träger wurde das Thioester-HPMA Copolymer PHNS-1 mit einer Molmasse von $M_n = 41.0$ kDa, einem Polydispersitätsindex von 2.1 und einem Thioester-Anteil von 12 % bzw. einer Beladung von 0.7 mmol/g eingesetzt. In einer NCL-Reaktion wurde das Copolymer (10 mg/ml) im Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.4) gelöst und mit 1.5 Äq. des entsprechenden Peptids in Anwesenheit von Benzylmercaptan und Thiophenol (1 v/v %) umgesetzt. Die Peptid-Polymerkonjugate wurden nach einer Reaktionszeit von 15 h über Gelfiltration und Dialyse (3500 Da cut-off) aufgereinigt. Die genaue Beladung der Polymerkonjugate mit den jeweiligen Peptiden wurde von der Firma *Genaxxon* durch gaschromatographische Analyse der hydrolysierten Konjugate bestimmt. Generell wurden alle Peptid-Polymerkonjugate in sehr guten Ausbeuten von über 95 % und moderaten Peptidbeladungen erhalten (Kupplungseffizienzen von über 25 %) (Tabelle 7.2).

Tabelle 7.2.: Substrat-HPMA-Konjugate.

Polymerkonjugate	Original- ^a -bezeichnung	Peptidbeladung [mmol/g]	Anzahl Peptide pro Polymer
PHN-SMP110-1	KK299II	0.14	7
PHN-SMP137-1	KK244	0.15	8
PHN-SMP192-1	KK252	0.21	12

^a Bezeichnung aus Dissertation von Dr. S. Meyer

Im Anschluss wurden die Peptid-Polymerkonjugate mit dem Cyaninfluorophor NIR797 umgesetzt, wobei im Fall des Konjugats PHN-SMP110-1, welches nur ein

C-terminales Lysin besitzt, ein einzelnes Cyaninmolekül pro Peptid und im Fall der beiden Konjugate PHN-SMP137-1 und PHN-SMP192-1 jeweils zwei Cyaninmoleküle pro Peptid gekuppelt wurden (zwei Lysine pro Peptid). Der für die Visualisierung benötigte FRET-Effekt wurde mit diesen einfach und doppelt markierten Konjugaten auf zwei unterschiedliche Weisen erzeugt. Beim Konjugat PHN-SMP110-1 wurde die für den FRET-Effekt relevante räumliche Nähe der mit einem Cy 7-Molekül markierten Peptid durch ihre multivalente Präsentation am Polymer erlangt. Dieser von der Polymeranknüpfung abhängige FRET-Effekt wird im Folgenden als Polymer-FRET-Effekt bezeichnet. Im doppelt markierten Fall wurde aufgrund der Anordnung von zwei Cy 7-Molekülen in der Peptidsequenz bereits ohne Polymerkonjugation ein FRET-Effekt erzeugt. Die Anknüpfung ans Polymer ist für den eigentlichen FRET-Effekt nicht notwendig, kann aber aufgrund der multivalenten Präsentation zu seiner Verstärkung führen. Diese Art von Selbstausschöpfung ist durch das Peptid selbst bedingt und wird dementsprechend im Folgenden als Peptid-FRET-Effekt bezeichnet (Abbildung 7.3).

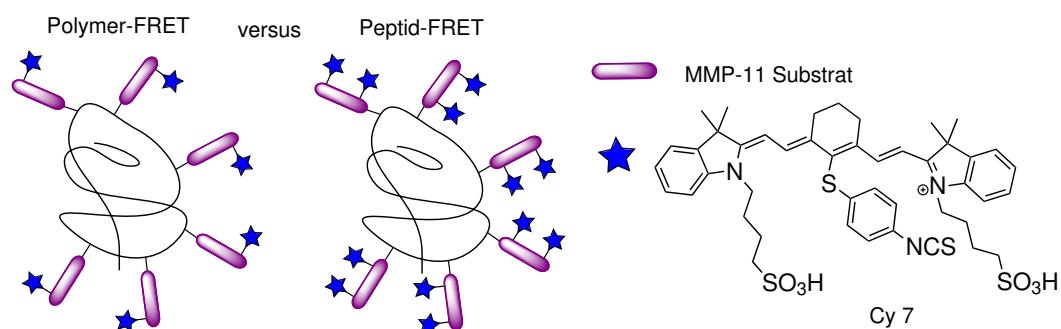


Abbildung 7.3.: NIRF-markierte Peptid-Polymerkonjugate – Polymer-FRET bzw. Peptid-FRET-Effekt.

7.2.2. Charakterisierung der NIRF-Konjugate

Die Beladung der fluorophormarkierten Peptid-Polymerkonjugate mit Cy 7 wurde UV-spektroskopisch mit der fluorophormarkierten Peptidsequenz SMP190 als Standard bestimmt (Tabelle 7.1). Dabei wiesen die beiden doppelt-Cy 7-markierten Polymerkonjugate PHN-SMP192-Cy₂ und PHN-SMP137-1-Cy₂ zu hohe Beladungen auf. Insbesondere die Cy 7-Beladung des PHN-SMP192-Cy (KK263) Konjugats war mit 275% überproportional hoch (Tabelle 7.3). Trotz mehrerer Dialyse und Gelfiltrationsschritte konnte der überschüssige, im Polymer kovalent gebundene oder über adsorptive Wechselwirkungen eingelagerte Fluorophor nicht restlos entfernt werden. Im Gegensatz dazu wurde für das einfach markierte Polymerkonjugat PHN-SMP110-1-Cy eine quantitative Fluoreszenzbeladung gemessen.^[153]

Im nächsten Schritt wurden die Fluoreszenzintensitäten der beiden FRET-Systeme Peptid-FRET- und Polymer-FRET-Effekt in Fluoreszenzmessungen bei der Emissions-

Tabelle 7.3.: NIRF-Labeling der Substrat-HPMA-Konjugate.

Polymerkonjugate	Original- ^a -bezeichnung	NIRF- Beladung [%]	Anzahl Cy 7-Moleküle	FRET -Bezeichnung
PHN-SMP110-1-Cy	SM P 117	99	1	(Polymer-FRET)
PHN-SMP137-1-Cy ₂	KK249	139	2	(Peptid-FRET)
PHN-SMP192-1-Cy ₂	KK263	275	2	(Peptid-FRET)
PHN-MA-Et-NH-Cy ^b	KK241	38	1	(Polymer-FRET)

^a Bezeichnung aus Dissertation von Dr. S. Meyer

^b poly(HPMA) ohne Substrat als Kontrolle, MA = Methacrylat

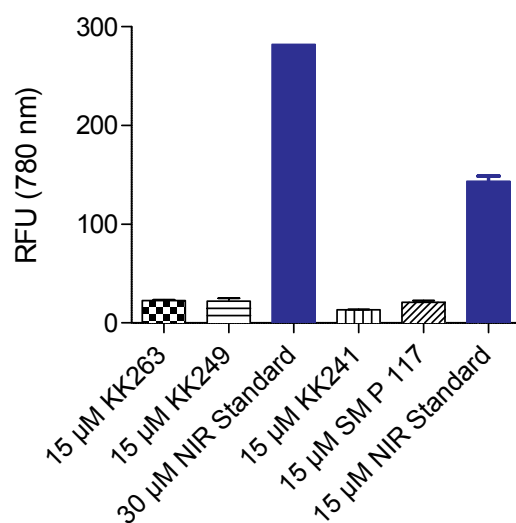


Abbildung 7.4.: Fluoreszenzintensitäten der NIRF-markierten Peptid-Polymerkonjugate bei der Emissionswellenlänge 780 nm vor der Spaltung mit MMP-11.

wellenlänge von 780 nm ermittelt und mit dem NIR-Standard SMP190⁵ ins Verhältnis gesetzt. Für die beiden doppelt markierten Polymerkonjugate PHN-SMP137-1-Cy₂ (KK249) und PHN-SMP192-1-Cy₂ (KK263) wurde eine 12-fache und für das einfach markierte Konjugat PHN-SMP110-1-Cy (SM P 117) und die Kontrolle eine 7-fache Abnahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich zum NIR-Standard beobachtet. Trotz der zuvor für das Konjugat PHN-SMP192-1-Cy₂ (KK263) bestimmten zu hohen Fluorophorbeladung, wurde bezüglich des FRET-Effektes kein Unterschied im Vergleich zu den anderen Konjugaten beobachtet. Das im Überschuss eingeschlossene Cy 7 hat dementsprechend keine negativen Auswirkungen auf das FRET-System. Generell, hat die Bestimmung der FRET-Effizienz gezeigt, dass die Selbstausschöpfung der Cyanine

⁵30 µM NIR-Standard für den Vergleich mit 15 µM doppelt markierten und 15 µM NIR-Standard für den Vergleich mit 15 µM einfach markierten Konjugaten

in beiden generierten FRET-Systemen funktioniert. Beim direkten Vergleich der beiden Systeme zeigte das Peptid-FRET System erwartungsgemäß ein effizienteres Quenching.

7.3. *In vitro*-Imaging von NIRF-markierten Peptid-Polymerkonjugaten

Die Aktivität der polymergebundenen Substrate gegenüber MMP-11 wurde zunächst in Enzym- und *in vitro*-Assays validiert. In den Zelllinien MIA Paca 2, MCF-7 und Jurkat als nicht MMP-11 überexprimierende Zelllinie wurden die beiden Konjugate PHN-SMP137-1-Cy₂ (KK249) und PHN-SMP192-1-Cy₂ (KK263) und die Kontrolle PHN-MA-Et-NH-Cy (KK241) untersucht. Beide Substrat-Polymerkonjugate sind zweifach mit Cyanin markiert (Peptid-FRET-Effekt) und unterscheiden sich in der Anwesenheit von drei *N*-terminalen Argininen im Konjugat PHN-SMP192-1-Cy₂ (KK263).

Ein Vergleich der Peptid-Polymerkonjugate PHN-SMP137-1-Cy₂ (KK249) und PHN-SMP192-1-Cy₂ (KK263) sollte zeigen, inwieweit die An- oder Abwesenheit der Arginine den zellulären Substratumsatz beeinflusst und darüber hinaus zur zellulären Aufnahme der Konjugate beiträgt. Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst.^[153]

7.3.1. Umsatzbestimmung auf Zellebene

Der Umsatz der Konjugate PHN-SMP137-1-Cy₂ (KK249) und PHN-SMP192-1-Cy₂ (KK263) und der Kontrolle PHN-MA-Et-NH-Cy (KK241) wurde in den Zelllinien MIA Paca 2, MCF-7 und Jurkat über eine Zeit von 10 h verfolgt und alle 30 min aufgezeichnet. Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass die Konjugate als Substrate in MMP-11 überexprimierenden Zellen geschnitten werden, wobei die Umsatzgeschwindigkeit in MIA Paca-2-Zellen am höchsten war. Darüber hinaus hatten die im Konjugat PHN-SMP192-1-Cy₂ (KK263) vorhandenen Arginine keinen Einfluss auf den Substratumsatz.^[153]

7.3.2. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Der zuvor im FRET-Assay bestimmte Substratumsatz der Konjugate PHN-SMP137-1-Cy₂ (KK249) und PHN-SMP192-1-Cy₂ (KK263) und der Kontrolle PHN-MA-Et-NH-Cy (KK241) wurde mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie nach erfolgter Inkubation der Zellen MIA Paca-2, MCF-7 und Jurkat mit den Konjugaten optisch verfolgt und bestätigt.

Ein auffällig großer Effekt bezüglich der Fluoreszenzintensität wurde für das Konjugat PHN-SMP192-1-Cy₂ (KK263) beobachtet. Das argininhaltige Konjugat wurde von den beiden Zelllinien MIA Paca-2 und MCF-7 sehr gut aufgenommen, intrazellulär gespalten und zeigte daher eine starke Fluoreszenz (Abbildung 7.5, oben). Bereits die

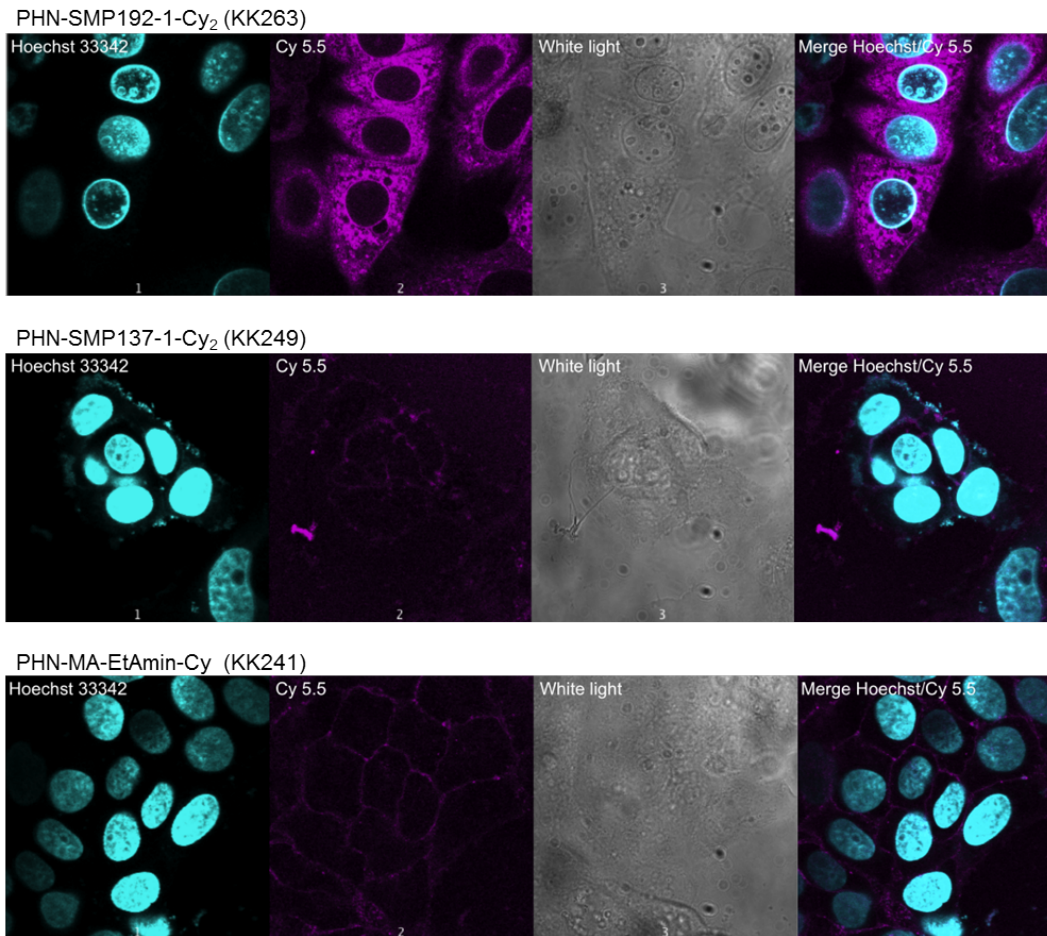


Abbildung 7.5.: MCF-7 Zellen nach Inkubation mit einer 5 μ M-Lösung der Substrat-Polymerkonjugate.

Anzahl von nur drei Argininen reichte aus, um die Internalisierung des Polymerkonjugats zu vermitteln. Ein Einfluss des in diesem Konjugat ungebundenen Fluorophors auf die zelluläre Aufnahme und damit verbunden auf das starke Fluoreszenzsignal konnte in entsprechend durchgeführten Vergleichsexperimenten mit Cy7 widerlegt werden.

Das argininlose Substratkonjugat PHN-SMP137-1-Cy₂ (KK249) wurde dagegen zellulär nicht internalisiert und zeigte nur eine geringe membranassoziierte Fluoreszenz. Nachdem das Substrat geschnitten worden war, blieb es nicht länger an der extrazellulären Membran assoziiert, sondern verteilte sich gleichmäßig in der Lösung. Dieser Verdünnungseffekt ist wahrscheinlich für die geringe Fluoreszenzintensität verantwortlich (Abbildung 7.5, mitte). Erwartungsgemäß zeigte die Kontrolle nach Inkubation der MMP-11 überexprimierenden Zelllinien mit KK241 eine vernachlässigbare Fluoreszenzintensität (Abbildung 7.5, unten) und die Vergleichszelllinie Jurkat

wies in den Experimenten mit den entsprechenden Konjugaten ebenfalls ein kaum meßbares Fluoreszenzsignal auf (hier nicht gezeigt).

Generell führten die zellulären Experimente zu vielversprechenden Ergebnissen, so dass die Konjugate im nächsten Schritt *in vivo* getestet wurden.

7.4. *In vivo*-Imaging von NIRF-markierten Peptid-Polymerkonjugaten

Zur *in vivo*-Untersuchung der MMP-11 Aktivität wurden MIA Paca-2 Xenograft Mäuse generiert⁶. Dazu wurden immunschwachen weiblichen Nacktmäusen subkutan⁷ MIA Paca-2 Zellen (10×10^6 Zellen) in die Brust gespritzt wurden. Die Versuche an Xenograft Mäusen wurden 2 bis 3 Wochen nach Injektion durchgeführt, wenn der Tumor eine Größe von ca. 2 bis 5 mm hatte. Der Substratumsatz in Xenograft Mäusen wurde mit dem nichtinvasiven bildgebenden Verfahren Fluorescence Reflectance Imaging (FRI) ermittelt, bei dem die Mäuse von oben oder unten mit einem Halogenstrahler ausgestattet mit Cy 7 Breitbandfiltern für die Anregungs- und Emissionswellenlängen (730 nm ex, 790 nm em) bestrahlt. Die emittierten Fluoreszenzsignale werden mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet.

Über Injektion in den Mausschwanz wurden den Mäusen die Konjugate PHN-SMP137-1-Cy₂ (KK249), PHN-SMP192-1-Cy₂ (KK263) und PHN-SMP110-1-Cy (SMP117) und die Kontrolle PHN-MA-Et-NH-Cy (KK241) verabreicht.^[153] Die Fluor-

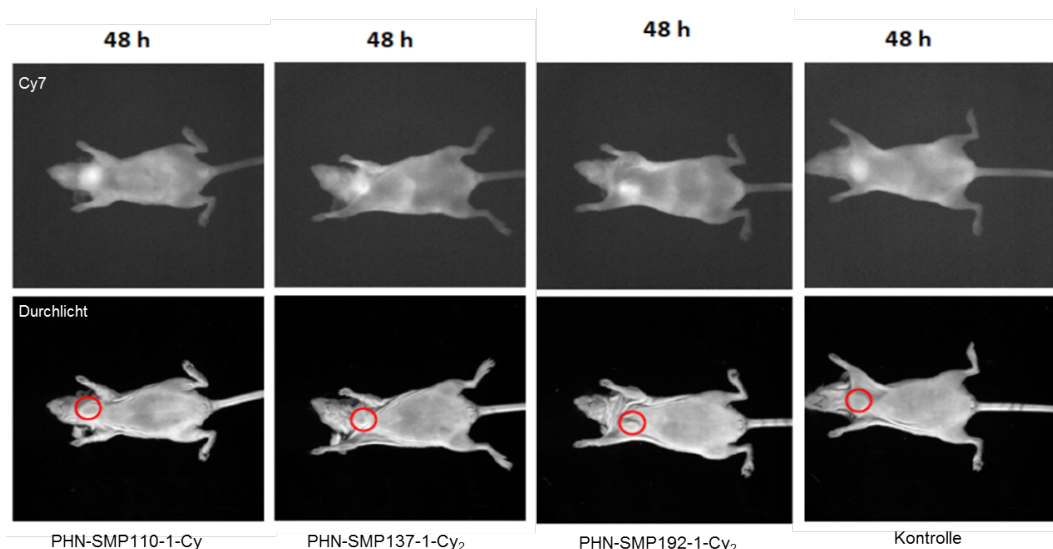


Abbildung 7.6.: Verteilung der Peptid-HPMA-Konjugate in Xenograft Mäusen 48 h nach Injektion; roter Kreis: Tumor.

⁶im Labor von Charles River

⁷unter die Haut

reszenzsignalstärken im Verhältnis zum Muskelgewebe wurden in der Zeitspanne von 30 min bis 48 Stunden nach der Injektion zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. In Abbildung 7.6 sind die FRI-Abbildungen der Mäuse dargestellt, in deren Brustbereich sich der Tumor befindet. Insbesondere 48 h nach Injektion wurde die stärkste Differenz zwischen der Signalstärke des Tumor- zum Muskelgewebesignals beobachtet. Die Kontrolle KK241 zeigte nach dieser Zeit ein 1.25-fach höheres Signal als das Hintergrundsignal des Muskelgewebes, was auf eine geringe Akkumulation im Tumor deutete. Im Gegensatz dazu wurde für die drei Substrat-HPMA-Konjugate ein 1.4-faches Tumorsignal gemessen und damit eine höhere Lokalkonzentration und ein dementsprechend stärkeres Fluoreszenzsignal im Tumor. Diese Beobachtung kann auf den EPR-Effekt zurückgeführt werden, der zur Anreicherung der am Polymer konjugierten Peptide führt. Im Hinblick auf die unterschiedlichen FRET-Systeme und die An- und Abwesenheit von Arginin konnten in der Tumoranreicherung und Signalstärke keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konjugaten festgestellt werden. Insgesamt konnte in den Experimenten gezeigt werden, dass die Konjugation der MMP-11-Substrate an poly(HPMA) in einer erhöhten Stabilität der Substrate resultierte und *in vivo*-Studien ermöglichte. Entgegen der Erwartungen führte der Umsatz der makromolekularen Substrate in MIA Paca-2 Xenograft Mäusen im Vergleich zur Kontrolle zu keinem signifikanten Unterschied in der Fluoreszenzsignalstärke.

7.5. Zusammenfassung

Im Rahmen der Kooperation mit Dr. S. Meyer wurden HPMA-basierte Peptid-Polymerkonjugate dargestellt und in einem nichtinvasiven bildgebenden Verfahren zur Früherkennung von Pankreaskrebs eingesetzt. Die von Dr. S. Meyer entwickelten MMP-11 Substrate wurden zur Verbesserung ihrer Stabilität und Bioverfügbarkeit chemisch so modifiziert, dass sowohl die Anknüpfung an das poly(HPMA) über NCL-Reaktion als auch die Einführung des NIR-Fluorophors Cy 7 über eine Isothiocyanatfunktionalität möglich war. Nach erfolgter Polymerkonjugation und Cy 7-Kupplung wurden drei Konjugate erhalten, die sich in der Art des FRET-Systems und in der Anwesenheit zusätzlicher Arginine unterschieden. Mit der Anzahl gekuppelter Cy 7-Moleküle wurden die beiden Systeme Polymer-FRET und Peptid-FRET generiert, die jeweils eine gute FRET-Effizienz zeigten.

Vor der *in vivo*-Anwendung wurden die Peptid-Polymerkonjugate von Dr. S. Meyer in Enzymkinetik- und Zellassays als MMP-11 aktive Substrate validiert. In den *in vitro*-Versuchen mit den Zelllinien MIA Paca-2 und MCF-7 wurde das argininhaltige Konjugat PHN-SMP192-1-Cy₂ (KK263) internalisiert und zeigte durch die lokale Konzentration des Konjugates eine dementsprechend hohe Fluoreszenzintensität bei der Substratspaltung. Im Gegensatz dazu wurde das argininlose Konjugat zellulär nicht aufgenommen, sondern zeigte lediglich eine schwache extrazelluläre Membranassoziation. Beim extrazellulären Substratumsatz dieses Konjugats wurde aufgrund der Verdünnung im Medium außerhalb der Zellen nur ein schwaches Fluoreszenzsignal beobachtet.

Experimente an MIA Paca-2 Xenograft Mäusen haben für alle Peptid-Polymerkonjugate ein tumorlokalisiertes Fluoreszenzsignal gezeigt, wobei kein Unterschied zwischen den argininhaltigen und argininlosen Substratkonjugaten und den beiden FRET-Systemen festgestellt wurde. Die Konjugation der MMP-11-Substrate an poly(HPMA) resultierte nicht nur in einer erhöhten Stabilität der Substrate *in vivo*, sondern führte zu einer erhöhten Anreicherung der polymergebundenen Substrate im Tumor aufgrund des EPR-Effektes. Trotz der geringen Fluoreszenzunterschiede zwischen den Substratkonjugaten und der Kontrolle zeigen diese Ergebnisse, welches Potential in den NIRF-basierten HPMA-Konjugate für die nichtinvasive Diagnostik von Pankreaskrebs steckt.

8. Projekt C: Photoinduzierte Freisetzung amyloidogener Peptide in Neuroblastomzellen

Proteine spielen eine wichtige Rolle in vielen zellulären Prozessen und sind unter anderem an der Signaltransduktion, der Immunabwehr, der Genexpression und an Transportprozessen beteiligt.^[4] Ihre jeweilige spezifische Funktion wird dabei durch die räumliche Struktur bedingt, die durch die vier Organisationsebenen Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur beschrieben wird. Als Primärstruktur wird die Aminosäureabfolge bezeichnet, während sich die Sekundärstruktur auf die räumliche Anordnung von Aminosäureresten bezieht.^[159] Als Folge von Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen nahe beieinander liegenden Aminosäureresten der linearen Sequenz werden Sekundärstrukturen wie α -Helices, β -Faltblätter, β -Schleifen oder ungeordnete Random-Coil-Strukturen ausgebildet. Die der Sekundärstruktur übergeordnete Tertiärstruktur wird von kovalenten (Disulfidbrücken) und nichtkovalenten Bindungen zwischen weit voneinander entfernten Aminosäureresten innerhalb einer linearen Sequenz stabilisiert. Besteht ein Protein aus mehreren Untereinheiten, wird ihre räumliche Anordnung durch die Quartärstruktur beschrieben.

Beim Prozess der Proteinfaltung können Fehlfaltungen auftreten, die zum Verlust der Funktion der Proteine und zu ihrem Abbau in der Zelle über das Ubiquitin-Proteasom-System führen. Bedingt durch genetische Faktoren, Änderung der Umgebungsbedingungen als auch durch Wechselwirkung mit anderen Proteinen können diese auch aus ihrem nativen Zustand teilweise entfalten, was eine Fehlfaltung und darauf folgende Aggregation zu sehr stabilen amyloiden Fibrillen ermöglicht. Diese Aggregate zeigen eine enorme Stabilität gegenüber Abbaumechanismen des Proteasoms.^[160]

Eine Reihe neurodegenerativer Krankheiten u. a. Alzheimer und Parkinson ist auf die Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen zurückzuführen. Die Erkrankungen werden zwar von verschiedenen Proteinen ausgelöst, die keine sequentielle oder strukturelle Homologie aufweisen, die dabei gebildeten Aggregate besitzen aber auf molekularer Ebene charakteristische Gemeinsamkeiten.^[161] Sie bestehen aus unlöslichen, hoch geordneten Strukturen, den sogenannten Amyloidfibrillen, deren Sekundärstruktur einen hohen β -Faltblattanteil aufweist. Die Assemblierung einer Vielzahl solcher Amyloidfibrillen ergibt die Amyloidablagerungen, die auch als Amyloid-Plaques bezeichnet werden (Abbildung 8.1).¹

¹Urheber der Abbildung ist C. Soto.^[161] Diese Abbildung wird verwendet mit Erlaubnis der Macmillan Publishers Ltd: © 2003 Nature Reviews

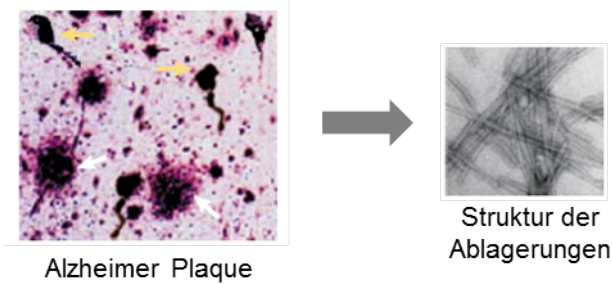


Abbildung 8.1.: links) zerebrale Amyloidablagerungen in einem Gewebeschnitt einer Alzheimer Erkrankung, rechts) Elektronenmikroskopieaufnahme der Ablagerungen.¹

Der Mechanismus der Amyloidbildung ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem teilweise entfaltete oder lokal mißgefaltete Proteine oder Peptide zunächst instabile aber lösliche Aggregate (präfibrilläre Oligomere) bilden, die ihrerseits fibrillenartige Aggregate ausbilden (Protofibrillen) und schließlich zu Amyloidfibrillen assemblieren.^[160] Der genaue Zusammenhang zwischen Erkrankung und Amyloidablagerungen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Während in der Vergangenheit ausschließlich die Amyloide an sich für die Toxizität verantwortlich gemacht wurden, sind inzwischen die löslichen präfibrillären Oligomere in den Fokus der aktuellen Forschung gerückt.^[162] Abgesehen von der detaillierten Aufklärung der mechanistischen Zusammenhänge, werden trotz lückenhafter Kenntnisse Strategien zur Inhibierung der Proteinaggregation entwickelt, die sich durchaus als vielversprechend herausgestellt und ihrerseits einen Beitrag zur Aufklärung der Amyloidbildung geleistet haben. An dieser Stelle wird auf den Review von Härd und Lendel verwiesen, der eine Übersicht über die verschiedenen Herangehensweisen der Inhibierung von Amyloidaggregation und den Stand der Forschung gibt.^[163]

Eine für diese Arbeit interessante Strategie der Amyloidinhibierung ist der Einsatz peptidischer Inhibitoren. Generell orientiert sich die Entwicklung peptidbasierter Inhibitoren typischerweise an der amyloidogenen Peptidsequenz des zu inhibierenden Proteins, bei der davon ausgegangen werden kann, dass sie *per se* sich selbst bindet. Die Wirkungsweise peptidischer Inhibitoren basiert darauf, an das Rückrat des β -Faltblattes zu binden und so die weitere Anlagerung peptidischer Monomere oder Oligomere zu verhindern. Die Folge dieser Strategie ist allerdings, dass die Inhibierung der Fibrillenbildung eine Konzentrationserhöhung der präfibrillären Oligomere nach sich zieht, die im Verdacht stehen, selbst toxisch zu sein.^[162] Ein weiterer Nachteil dieser Peptide ist, dass sie teilweise selbst Amyloidfibrillen ausbilden.^[163] Aufgrund der Tatsache, dass die meisten Amyloide abhängig von den Umgebungsbedingungen α -helikale Strukturen in ihrer nativen Form enthalten,^[164] wurde die Stabilisierung dieser α -helikalen Konformation als Inhibitorstrategie vorgeschlagen.^[165]

8.1. Zielsetzung

Mit der Erforschung der α -Helix stabilisierenden Peptide und deren Wirkungsweise beschäftigt sich u. a. der Arbeitskreis von Prof. Kokschi an der Freien Universität Berlin. Um die Ligand-Protein-Interaktionen unterschiedlicher Inhibitorstrategien auf molekularer Ebene besser aufklären zu können, haben sie amyloidogene Modellpeptide als weniger komplexe Stellverteter der Proteine entwickelt. Diese Modellpeptide sind aus 26 Aminosäuren aufgebaut und weisen ein sogenanntes Heptadenmuster¹ auf, welches für Coiled-Coil Strukturen charakteristisch ist. Coiled-Coil als stabile und lineare Domäne wird aus mindestens zwei α -Helices aufgebaut, die wiederum zu einer Helix mit größerem Radius gewunden sind (Superhelix).^[166,167]

Für den bereits erwähnten Ansatz, die Amyloidbildung durch die Stabilisierung der α -helikalen Konformation zu inhibieren, entwickelten Brandenburg *et al.* ein idealisiertes helikales Peptid VW01 als Inhibitorpeptid.^[168] Dessen Wirkung wurde am idealisierten amyloidbildenden Modellpeptid VW18 untersucht. Die Sequenzen beider Peptide, sowohl die des Amyloid- als auch die des Inhibitorpeptids, basieren auf bekannten α -helikalen Coiled-Coil-bildenden Heptadenmotiven, die durch hydrophobe Wechselwirkungen entsprechender Aminosäuren an den Positionen a und d eines Heptadenabschnitts stabilisiert werden. Sie unterscheiden sich lediglich in den drei Positionen b, c und f, in denen die polaren Reste jeweils gegen Valin ausgetauscht wurden, das für die amyloidbildenden Eigenschaften des VW18-Peptids verantwortlich ist (Abbildung 8.2).

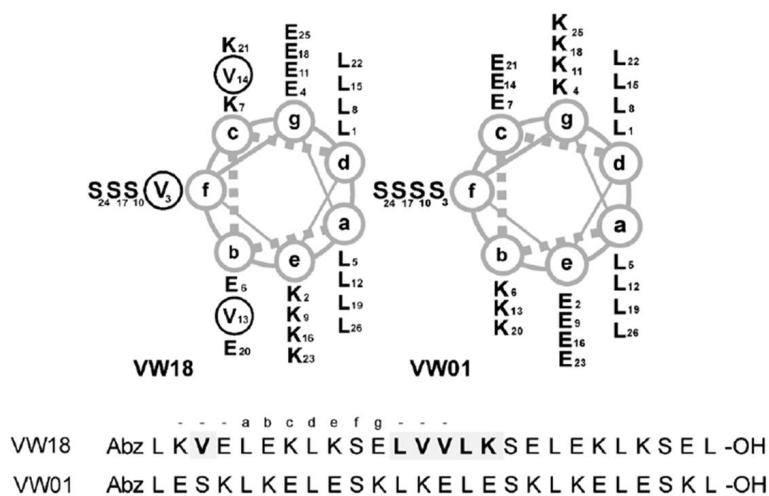


Abbildung 8.2.: Heptadenmuster einer Helix des VW18 und VW01 Peptids.²

Brandenburg *et al.* bestimmten zunächst die jeweils zu erwartenden Konformationen

¹ein sieben Aminosäuren umfassender Abschnitt einer Helix

²Diese Abbildung wurde von Dr. E. Brandenburg zur Verfügung gestellt

von VW18 und VW01 durch Messung von Circular dichroismus-Spektren (CD)³ und bewiesen darüber hinaus in einem Thioflavin-Fluoreszenz-Assay,^[169] dass das VW18 Modellpeptid nach einer Inkubationszeit von 15 Stunden bei einem pH-Wert von 7.4 Amyloidfibrillen ausbildet. In einer ausführlichen Studie haben sie die inhibitorische Aktivität des α -helikalen Peptids VW01 untersucht und konnten zeigen, dass die Amyloidbildung des Peptids VW18 in Gegenwart des Inhibitors VW01 unterdrückt wurde, indem das Modellpeptid durch kooperative Faltung in einer heteromeren helikalen Konformation verblieb. Diese Peptid-Komplexe haben sich sogar bei Zugabe von Nukleationskeimen in Form von amyloiden Fibrillfragmenten zur Beschleunigung der Amyloidbildung als sehr stabil erwiesen. Darüber hinaus war der Coiled-Coil-basierte Inhibitor sogar in der Lage, bereits bestehende fibrillenartige Strukturen aufzulösen.^[168]

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen erahnen, welches Potential Coiled-Coil Peptide besitzen, die in der Lage sind, starke helikale Komplexe mit amyloidogenen Gegenspielern auszubilden.

Im Zuge einer Kooperation mit Dr. E. Brandenburg sollte untersucht werden, inwieweit das Peptid VW18 auch in einer nativen Umgebung ein realistisches Modell für natürliche amyloidbildende Proteine darstellt. Da sich die bisherigen Arbeiten auf die Erforschung der Modellpeptide und ihrer Inhibierung außerhalb von lebenden Systemen beschränkten, war das Ziel der Kooperation, das Verhalten und die Wirkung des Modellpeptids VW18 in Zellen zu studieren. Daraus ergaben sich folgende Projektunkte:

- Entwicklung eines Systems zur Vermittlung der zellulären Aufnahme auf Basis von poly(HPMA)
- Transport und intrazelluläre Freisetzung des Modellpeptids
- Untersuchung des intrazellulären Verhaltens und Wirkung auf neuronale Zellen

8.2. Konzept

Um das Verhalten des amyloidogenen Peptids in einer zellulären Umgebung untersuchen zu können, sollte das Peptid VW18 an das biokompatible Polymer poly(HPMA) gekuppelt werden. Die Polymerkonjugation sollte dabei nicht nur die zelluläre Aufnahme und den Schutz vor proteolytischem Abbau sicherstellen, sondern gleichzeitig eine Freisetzung des Modellpeptids am Wirkort ermöglichen.

Die auf dem Gebiet der Polymertherapeutika üblicherweise eingesetzten spaltbaren Linkersysteme enthalten beispielsweise säurelabile Hydrazongruppen, die aufgrund des signifikant niedrigeren pH-Wertes im Tumorgewebe, in Endosomen und Lysosomen gespalten werden. Darüber hinaus werden enzymatisch spaltbare Linker verwendet, die z. B. esterasespaltbare Estergruppen enthalten oder eine vom lysosomalen Enzym Cathepsin B spaltbare Peptidsequenz (Gly-Phe-Leu-Gly). Trifft eines dieser

³siehe Kapitel 11.5.2

Linkersystem auf entsprechende Bedingungen in der zellulären Umgebung, wird der transportierte Wirkstoff durch Spaltung des Linkers freigesetzt.

Für die Erforschung physiologischer Vorgänge werden dagegen Linkersysteme benötigt, die eine kontrollierte Freisetzung zu einem bestimmten Zeitpunkt an einem bestimmten Ort ermöglichen. Typischerweise werden dafür photospaltbare Moleküle eingesetzt, die als photolabile Schutzgruppen das biologisch aktive Molekül durch kovalente Bindung in eine inaktive Form eine sogenannte *caged*-Verbindung überführen. Die photochemische Spaltung (*uncaging*) der Verbindung setzt dann das eigentliche Biomolekül wieder frei. Ideale photolysierbare Gruppen sollten sich durch eine hohe Wiedergewinnungsrate und eine hohe Photolysegeschwindigkeit bei für Zellen akzeptablen Wellenlängen auszeichnen. Darüber hinaus sollten die bei der Photolyse gebildeten Produkte zu keinen unerwünschten Nebenreaktion führen oder toxisch sein.^[170]

Es existiert eine Reihe ganz unterschiedlicher Gruppen, die für die Herstellung von *caged*-Verbindungen geeignet sind.^[170] Cumarinderivate erfüllen aber die meisten der zuvor genannten Kriterien. Die Fluoreszenzeigenschaften der Cumarinsysteme werden hauptsächlich vom pH-Wert des Mediums und den Substituenten am Cumaringerüst beeinflusst. Eine Erniedrigung des pK_a -Wertes der phenolischen OH-Gruppe an Position 7 sollte den Fluoreszenz- bzw. Absorptionsbereich zu physiologischen pH-Werten hin verschieben. Adamczyk *et al.* gelang dies durch die Einführung eines Aminomethylsubstituenten in Position 8 diverser Cumarinderivate.^[171] Die Fähigkeit der Aminomethylgruppe intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zur phenolischen OH-Gruppe auszubilden, führt zu einer Erniedrigung des pK_a -Wertes und ermöglicht so die photolytische Freisetzung der Biomoleküle auch bei niedrigeren pH-Werten, wie sie z.B. in Endosomen herrschen. Die von Adamczyk *et al.* beschriebene Mannich-basierte Reaktion wurde von Hagen *et al.* auf das von Furuta *et al.* beschriebene (6-Brom-7-hydroxy-4-hydroxymethyl)cumarinderivate (Bhc) angewendet und ermöglichte einen Zugang zu flexibel modifizierbaren Cumarinsystemen mit für biologische Anwendungen optimalen photochemischen Eigenschaften.^[172,173]

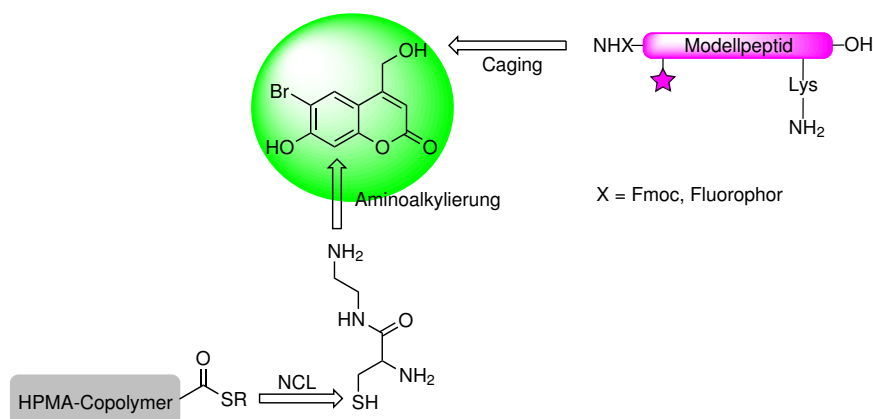


Abbildung 8.3.: Synthesekonzept zur Darstellung von *caged*-Peptid-HPMA-Konjugaten.

Vor diesem Hintergrund sollte das Bhc chemisch in dem Sinne modifiziert werden, dass es nicht nur das Modellpeptid als photoaktivierbare Gruppe schützt, sondern gleichzeitig als Linker eine kovalente Bindung der *caged*-Verbindung an das poly(HPMA) ermöglicht. Dabei sollte die Anknüpfung der photolabilen Gruppe an das Peptid über eine Carbamatfunktionalität erfolgen, die das freie Amin eines Lysins und die Hydroxyl-Gruppe des Cumarins verbindet. Die Einführung eines cysteinylierten Linkers an Position 8 des Cumarinderivates sollte schließlich die Kupplung des *caged*-Peptids über eine NCL-Reaktion an das Thioester-funktionalisierte HPMA-Copolymer ermöglichen (Abbildung 8.3).

Das Prinzip der lichtinduzierten Spaltung der photolabilen Schutzgruppe schafft so die Möglichkeit, abhängig von der biologischen Fragestellung über das Wo und Wann der Peptidfreisetzung vom Polymer-Linker-System frei zu entscheiden.

8.3. Synthese eines cysteinylierten Cumarinderivates

Retrosynthetisch betrachtet sollte das tetramethylrhodaminmarkierte Peptid-Cumarinkonjugat **14**, in welchem das Peptid über eine photolabile Carbamatgruppe kovalent gebunden ist, über Kupplung des zuvor aktivierten Cumarinderivates **15** an die freie Amingruppe des Lysin 9 des VW18-Peptids am Wang-Harz erhalten werden. Cumarin **15** wurde durch Kupplung des Boc- und Trityl-geschützten Cysteins an das freie Amin des Cumarinderivates **16** generiert, welches wiederum in einer Mannich-Reaktion des Boc-geschützten Ethylendiamins mit Bhc und Formaldehyd synthetisiert wurde (Abbildung 8.4). Das Ausgangsmolekül Bhc wurde dankend von Dr. J. Schaal und Frau Dekowski aus der Arbeitsgruppe von Dr. V. Hagen erhalten.

8.3.1. Darstellung von *N*-Boc-*N'*-(Bhcm)-ethylendiamin

Die Einführung des Alkyllinkers in das Cumarinderivat Bhc erfolgte in einer manichanalogen Reaktion, bei der eine Aminoalkylierung an Position 8 des Bhc mit Paraformaldehyd und *N*-Boc-Ethylendiamin durchgeführt wurde. Im ersten Schritt bildete sich bei der Umsetzung von Paraformaldehyd und *N*-Boc-Ethylendiamin ein Iminiumion **17**, welches mit Bhc zum entsprechenden aminomethylierten *N*-Boc-*N'*-(6-Brom-7-hydroxy-4-hydroxymethyl-cumarin-8-yl-methyl)ethylendiamin (*N*-Boc-*N'*-(Bhcm)-ethylendiamin **16**) in einer guten Ausbeute von 52% reagierte (Abbildung 8.5).

8.3.2. Cystein-Kupplung an *N*-(Bhcm)-ethylendiamin

Das für die NCL-Reaktion benötigte Cystein sollte nach erfolgter Boc-Entschützung an das freie Amin des Bhcm-Derivates **16** gekuppelt werden. Die Amidbindungsbildung erfolgte über eine nukleophile Substitutionsreaktion an der Carboxylgruppe des Cysteins, die einerseits *in situ* durch Zugabe typischer Peptidkupplungsreagenzien wie i) DIC und HOBt und ii) HATU und Collidin aktiviert wurde (Abbildung 8.6, 2a, b). Andererseits wurden das *N*-hydroxysuccinimid- (Boc-Cys(Trt)-OSu) **19** und das

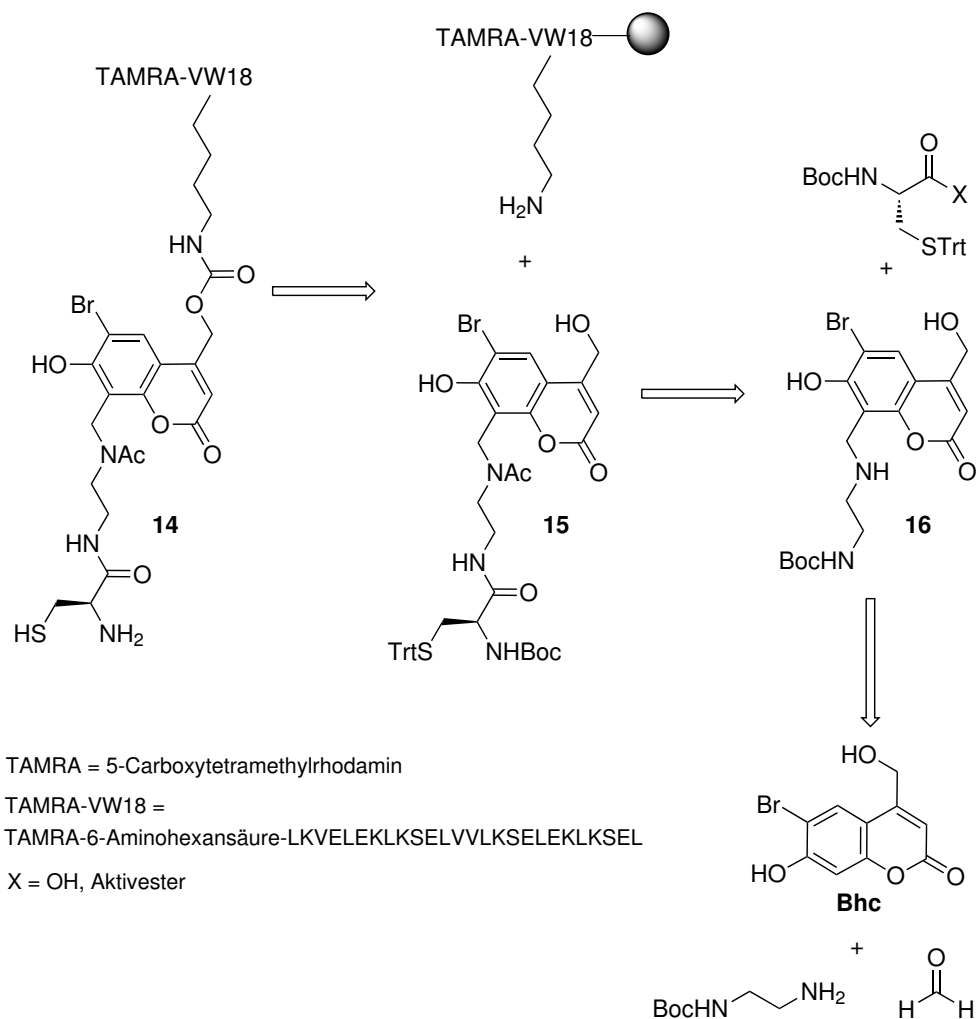
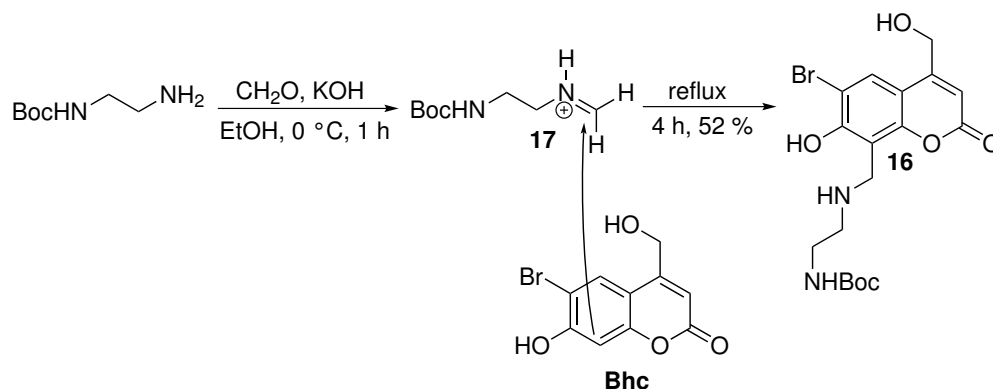
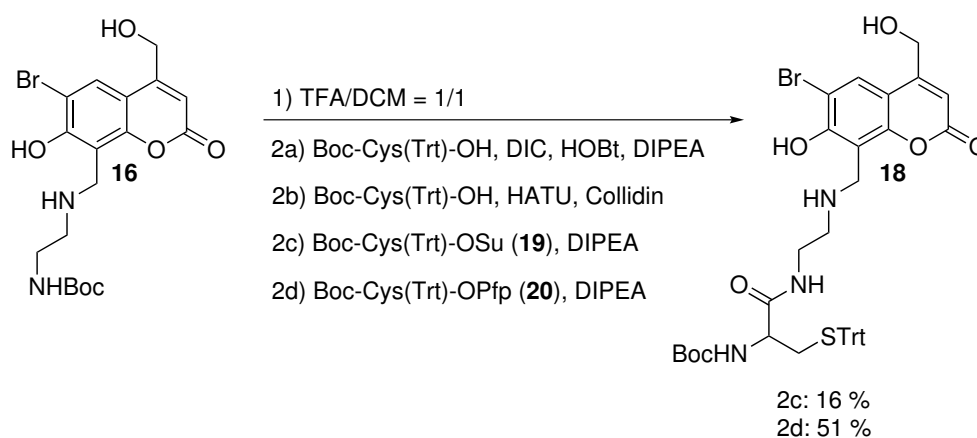
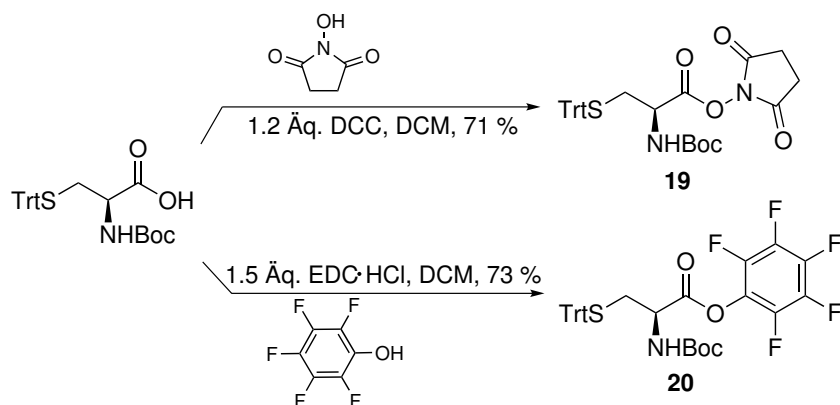


Abbildung 8.4.: Retrosynthese zur Darstellung eines cysteinylierten Cumarinderivates.

pentafluorphenolaktivierte Cystein (Boc-Cys(Trt)-OPfp) **20** (Abbildung 8.6, 2c, d) in Gegenwart einer Base mit dem freien Amin des Bhc **16** umgesetzt. Die dafür benötigten Aktivester **19** und **20** wurden durch Kupplung des *N*-Hydroxysuccinimids^[174] bzw. des Pentafluorphenols an Cystein in guten Ausbeuten erhalten (Abbildung 8.7). In allen vier Ansätzen wurde die Bildung des cysteinylierten Bhc **18** beobachtet. Allerdings begünstigte die *in situ* Aktivierung der Carbonsäure unter den Bedingungen von 2a und b gleichzeitig die Bildung eines unpolaren Nebenproduktes mit der Masse $m/z = 973$, das nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Da es für beide Reaktionen identisch war, musste es unabhängig vom verwendeten Aktivierungsreagenz gebildet worden sein. Das gewünschte Cumarinprodukt **18** wurde im Fall 2a lediglich in sehr geringen Mengen und schlechter Reinheit isoliert. Im Fall der HATU-vermittelten Reaktion 2b lagen Produkt und Nebenprodukt in einem

Abbildung 8.5.: Darstellung von *N*-Boc-*N'*-(Bhcm)-ethylendiamin **16**.Abbildung 8.6.: Amidkupplung des Cysteins an **16**.

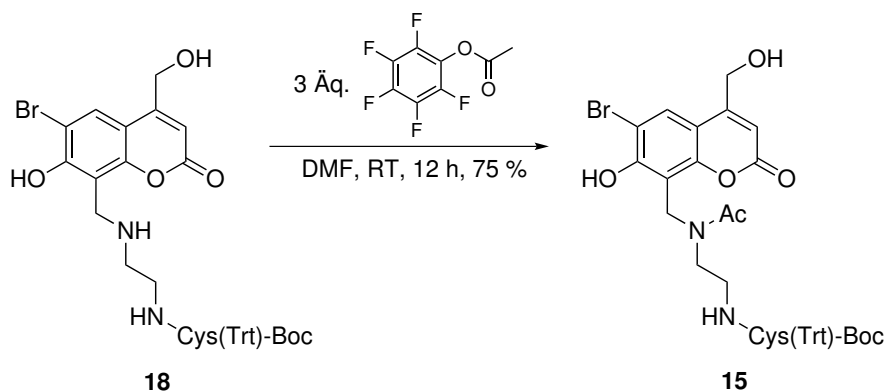
Verhältnis von 1:1 vor, so dass auf eine Aufarbeitung verzichtet wurde. Im Gegensatz dazu lieferten die Reaktionen 2c und d mit den beiden Aktivestern des Cysteins jeweils das gewünschte Produkt ohne das Auftreten des zuvor erwähnten Nebenproduktes. Dabei wurde bei der Umsetzung mit pentafluorphenolaktiviertem Cystein **20** im Vergleich zum *N*-hydroxysuccinimidaktivierten Analogon **19** mit 51% die bessere Ausbeute erhalten. Generell haben Aktivester gegenüber Aktivierungsreagenzien zur *in situ* Aktivierung Vorteile bezüglich der Aufarbeitung und Aufreinigung der Produkte. Typische Peptidkupplungsreagenzien können bei der Festphasensynthese durch Waschzyklen einfach vom Harz abgetrennt werden. Bei Reaktionen in Lösung ist die Abtrennung der Kupplungsreagenzien und ihrer Abbauprodukte oft problematisch und resultiert häufig in verunreinigten Produkten, wie es bei den *in situ*-aktivierten Reaktionen 2a und b der Fall war. Aufgrund der höheren Ausbeute und Reinheit des gewünschten Produktes **18** wurde die Cysteinylierung des Bhcm-Derivates **16** mit dem Pentafluorphenolaktivester **20** nach Methode 2d durchgeführt.

Abbildung 8.7.: Darstellung der Cystein-Aktivester **19** und **20**.

8.3.3. Acetylierung der freien Aminogruppe

Vor der eigentlichen Anwendung des cysteinylierten Bhm-Derivates **18** als photoly-sierbare Gruppe in *caged* Verbindungen wurde das interne sekundäre Amin in einer Reaktion mit Pentafluorphenylacetat als Acetat geschützt (Abbildung 8.8).

Kisfaludy *et al.* haben im Jahr 1979 Pentafluorphenylacetat als neues Acetylierungsreagenz für die Schützung von Aminen und Alkoholen unter milden Bedingungen beschrieben. In Abwesenheit einer Base werden bei der Reaktion von Pentafluorphenylacetat und Aminoalkoholen in DMF ausschließlich primäre und sekundäre Amine acetyliert. Für die Acetylierung von Alkoholen ist die Anwesenheit einer Base wie z. B. Triethylamin (TEA) notwendig. Die hohe Selektivität der Acetylierung ergibt sich aus der unterschiedlichen Reaktivität des Aktivesters gegenüber Aminen und Alkoholen und führt zur *N*-Acetylierung in Abwesenheit und *N,O*-Diacetylierung in Anwesenheit von TEA.^[175] Dementsprechend lieferte die Schützung des Cumarinderivates **18** mit Pentafluorphenylacetat in DMF ausschließlich das *N*-acetylierte Produkt **15** in guten Ausbeuten von 75 %.

Abbildung 8.8.: *N*-Acetylierung des Cumarinderivates **18**

Das photolysierbare Cumarinderivat **15** wurde in insgesamt vier Stufen von der Mannich-Reaktion, über die sich anschließende Boc-Entschützung und Kupplung des Cysteins, bis hin zur Acetylierung des internen sekundärenamins in einer Gesamtausbeute von 15.4% erhalten. Mit seiner freien Hydroxygruppe und der eingeführten Aminosäure Cystein sollte **15** als photospaltbarer Linker zur Darstellung von Peptid-Polymerkonjugaten über die NCL-Reaktion geeignet sein.

8.4. Vorversuche zur Einführung photolabiler Gruppen

Die Anknüpfung des Modellpeptids VW18 an die Cumarinringgruppe sollte am freien Amin der Lysin-Seitenkette an Position 9 der VW18 Peptidsequenz erfolgen. Dabei sollte die freie Aminogruppe mit einem aktivierten Cumarinderivat zu einer *caged* Verbindung umgesetzt werden, in der eine photolabile Carbamatfunktionalität das bioaktive Molekül und die photolysierbare Gruppe verbindet.

8.4.1. Testaktivierungen mit Bhc als Modellsubstanz

Die Aktivierung cumarinbasierter Systeme wurde zunächst in einer Reihe von Testversuchen am Ausgangscumarin Bhc mit drei verschiedenen Aktivierungsreagenzien durchgeführt, um das bestmögliche Zusammenspiel zwischen Cumarinaktivierung und -kupplung zur finalen *caged*-Verbindung zu finden (Abbildung 8.9)⁴. Bhc wurde mit Disuccinimidcarbonat (DSC) in Gegenwart der Base TEA und in trockenem THF durchgeführt. Nach einer Reaktionszeit von 4 h wurde das Bhc laut UV-Chromatogramm und Massenspektrometrie der LC-Q mit einem Umsatz von 90% in das entsprechende Succinimidcarbonat **21** überführt. Eine vergleichbar erfolgreiche Aktivierung lieferte die Testreaktion von Bhc mit Carbonyldiimidazol (CDI) in DMF zu **23**. Der Umsatz betrug nach 4 h allerdings nur 64% und konnte auch durch eine Verlängerung der Reaktionszeit nicht gesteigert werden. Eine weitere Testreaktion wurde mit dem Aktivierungsreagenz 1-Chlorameisensäure-4-nitrophenol (CNP) mit DIPEA in trockenem THF durchgeführt, bei der das Bhc zwar zu 94% umgesetzt wurde, aber mehrere nicht eindeutig zu identifizierende Nebenprodukte lieferte. Das gewünschte Aktivierungsprodukt **22** konnte nicht eindeutig identifiziert werden, da das Massenspektrum zur UV-Spur nicht die gesuchte Produktmasse enthielt. Die Aktivester des Cumarins Bhc **21**, **22** und **23** aller drei Testreaktionen wurden nicht isoliert, sondern *in situ* für Testkupplungen am Harz eingesetzt.

8.4.2. Testkupplung des Peptids VW18 an das aktivierte Bhc

Die Schützung bzw. das *caging* des VW18-Modellpeptids mit den zuvor aktivierten Cumarinderivaten **21**, **22** und **23** als photolabile Schutzgruppe wurde in einer Festphasenreaktion am Harz durchgeführt (Abbildung 8.10). Dr. E. Brandenburg hat das dafür benötigte Modellpeptid VW18 wie bereits in der Literatur beschrieben durch

⁴Chromatogramme und Massenspektren zu den Reaktionen siehe Anhang Abbildung A.21, A.22, A.23

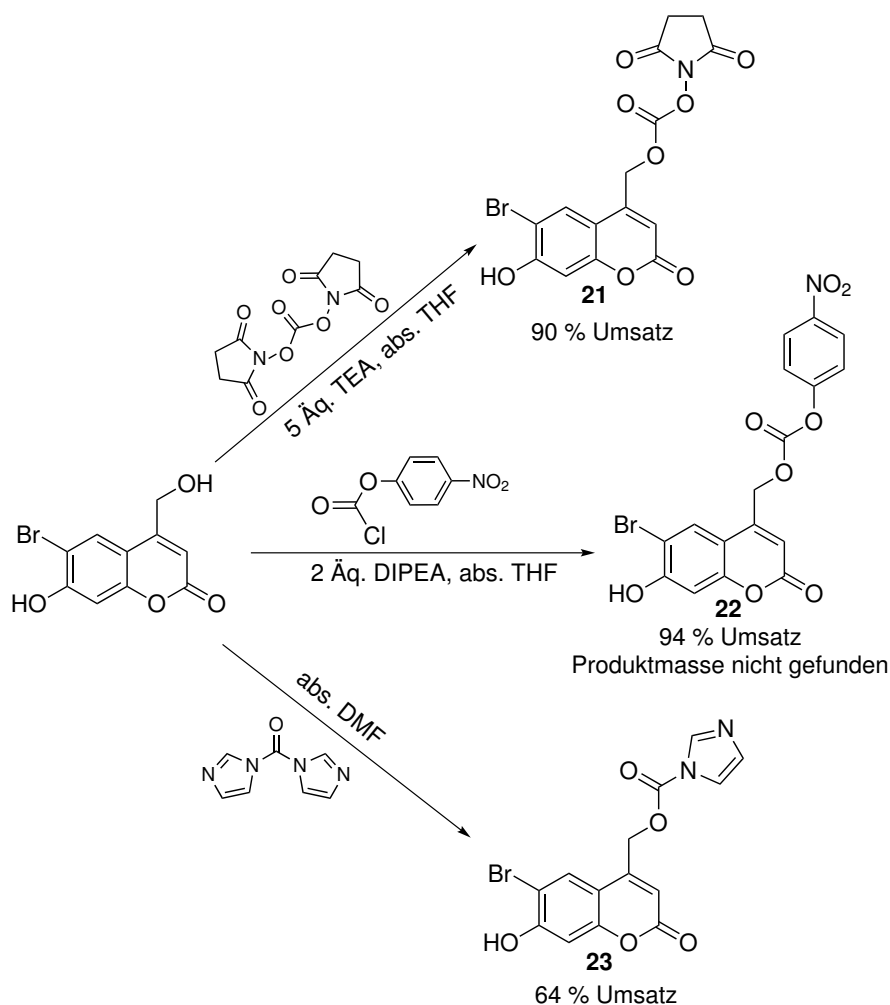


Abbildung 8.9.: Testaktivierungen mit Bhs als Modellsubstanz.

Festphasensynthese am Wang-Harz ohne zusätzliche Fluorophore synthetisiert^[168] und hat darüber hinaus die Schutzgruppe des Lysins in Position 9 gegen eine 4-Methyltrityl (Mtt)-Schutzgruppe ausgetauscht. Mtt am ϵ -Amin des Lysins ist eine stark säurelabile Gruppe und kann dementsprechend orthogonal zu den restlichen im Peptid vorhandenen Schutzgruppen mit einer 1 %-igen TFA-Lösung abgespalten werden.^[176]

Nach erfolgter Mtt-Entschützung wurde das Harz in Testreaktionen mit den zuvor *in situ* erzeugten aktivierten Coumarinen **21**, **22** und **23** umgesetzt. Dazu wurden im Fall der Succinimidcarbonat- und 4-Nitrophenylcarbonatderivate **21** und **22** das Lösungsmittel THF unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in trockenem DCM aufgenommen, mit DIPEA als Base versetzt und auf eine Testmenge an Harz gegeben. Zum Imidazolcarbonatderivat **23** wurde lediglich DIPEA zugegeben

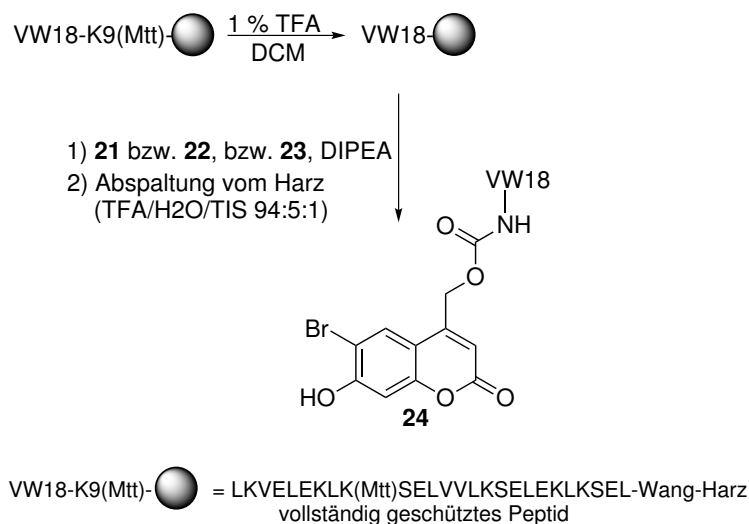


Abbildung 8.10.: Testkupplung des Peptids VW18 an die aktivierten Bhc-Derivate **21**, **22** und **23**.

und die DMF-Lösung direkt auf das Harz gegeben. Nach einer Reaktionszeit von drei Stunden wurde das Harz gewaschen, die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe entfernt und das cumaringeschützte Peptid **24** mit einer Abspatlösung vom Harz abgespalten (Abbildung 8.10). Nach erfolgter Charakterisierung der erhaltenen Niederschläge mit hochauflösender Massenspektrometrie wurde in der Reaktionslösung ausschließlich das gewünschte *caged*-VW18-Peptid **24** detektiert, die mit succinimidcarbonataktiviertem Coumarin **21** durchgeführt worden war (Analytik siehe Anhang, Abbildung A.24). DSC hat sich damit sowohl für die Aktivierung als auch für die anschließende Kupplung an das ϵ -Amin des Lysin 9 des Peptids VW18 am Wang-Harz als das Reagenz der Wahl herausgestellt.

8.4.3. Testabspaltung zur Peptidfreisetzung

Im letzten Schritt der Testreihe sollte die UV-Licht-induzierte Freisetzung des Peptids VW18 von der Coumarinverbindung *caged*-VW18 **24** überprüft werden (Abbildung 8.11).

In der Gruppe von Dr. Hagen wurde für die UV-Licht-induzierte Abspaltung ein S_N1 -Mechanismus (lösungsmittelvermittelte Photoheterolyse) vorgeschlagen.^[173,177,178] Bei Bestrahlung mit UV-Licht bilden sich demnach zunächst Ionenpaare als Intermediate, aus denen in einer nachgelagerten Decarboxylierungsreaktion der Carbonat- oder Carbamat-Zwischenstufe die Biomoleküle generiert werden (Abbildung 8.11). Gleichzeitig bildet sich bei dieser Reaktion das Coumarin Bhc als photolysierbare Gruppe zurück. Der vorgeschlagene Mechanismus wurde durch die Beobachtungen bestätigt, dass die Entschützungen in polar-protischen Lösungsmitteln (wässrige Puffersysteme) deutlich effizienter verlaufen als in unpolaren. Darüber hinaus wurde in weiterfüh-

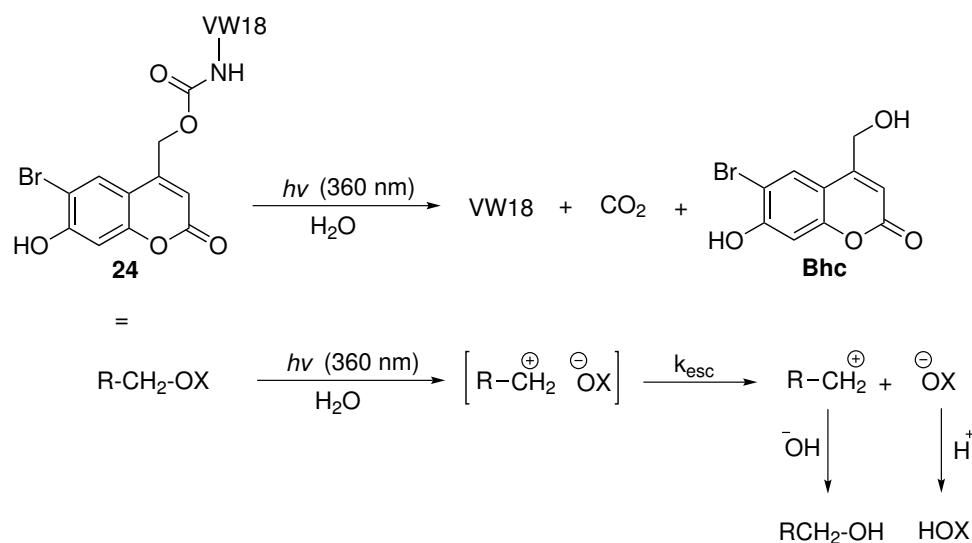


Abbildung 8.11.: Photochemische Freisetzung und mechanistische Betrachtung.

renden Untersuchungen festgestellt, dass der erste Schritt der Ionenpaarbildung sehr schnell ist, wohingegen die Decarboxylierung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt.

Die Freisetzung des VW18-Peptids erfolgte durch Bestrahlung des *caged*-VW18-Peptids **24** mit UV-Licht der Wellenlänge 360 nm in einer Mischung aus Wasser und Acetonitril (H₂O/ACN 1:1). Nach einer Bestrahlungszeit von einer Minute konnten im UV-Chromatogramm und im Massenspektrometer sowohl das bereits ungeschützte als auch noch teilweise geschütztes VW18-Peptid detektiert werden. Nach einer Bestrahlungszeit von 2.5 min wurde lediglich das freie Peptid VW18 beobachtet (Analytik siehe Anhang, Abbildung A.25).

Mit diesem Proof-of-Principle-Experiment wurde gezeigt, dass die photochemische Abspaltung der Cumaringruppe und damit die Freisetzung des Zielmoleküls VW18 nach einer kurzen Bestrahlungszeit schnell und effizient abläuft. Das Bhc-basierte System zeigte daher optimale Voraussetzungen für eine schnelle und kontrollierte Abgabe der Peptide im Cytoplasma einer Zelle.

8.5. Amyloidogene Peptid-HPMA-Konjugate

8.5.1. Auswirkungen der Fluorophormarkierung des Modellpeptids VW18 auf dessen Sekundärstruktur

Fluoreszenzmarkierung

Im Hinblick auf die spätere Anwendung des Modellpeptids VW18 in Zellexperimenten hat Dr. E. Brandenburg das VW18-Peptid am Wang-Harz mit einem Rhodaminderivat als Fluoreszenzmarker modifiziert. Das Fluoreszenzlabel ermöglicht die intrazelluläre

Lokalisation und Verfolgung des Peptids nach dessen Freisetzung vom polymeren Träger poly(HPMA). Dazu wurde der Fmoc-entschützte *N*-Terminus der VW18 Pep-

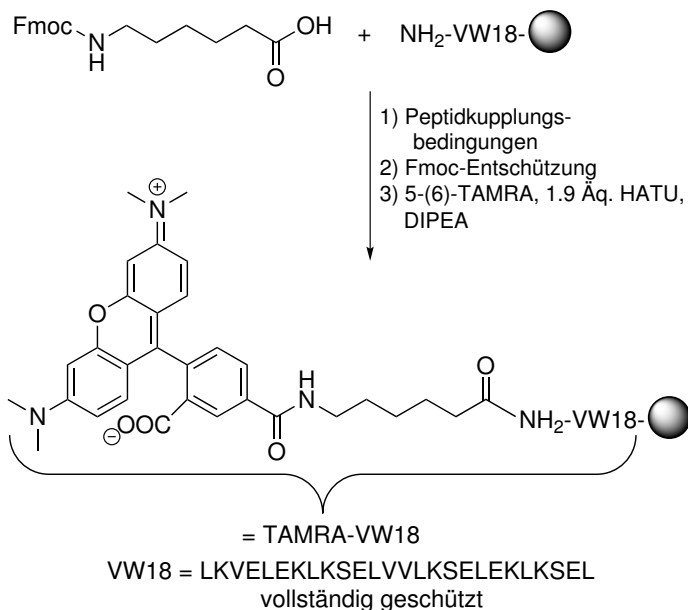


Abbildung 8.12.: Labeling des Modellpeptids VW18 mit dem Fluorophor TAMRA.

tidsequenz zunächst mit einem *N*-Fmoc-5(6)-Aminohexansäurelinker verlängert. Nach Fmoc-Entschützung des Hexanlinkers wurde dann 5(6)-Carboxytetramethylrhodamin an das freie Amin gekuppelt und so das fluoreszenzmarkierte TAMRA-VW18 am Harz erhalten (Abbildung 8.12).

Bestimmung der Sekundärstruktur

Die amyloidbildenden Eigenschaften des modifizierten Modellpeptids TAMRA-VW18 wurden von Dr. E. Brandenburg an einer abgespaltenen Testmenge Harz durch Messungen von CD-Spektren⁵ charakterisiert. Die ermittelten Sekundärstrukturen wurden mit denen des literaturbekannten Peptids Abz-VW18 verglichen, welches sich lediglich in der als Chromophor verwendeten Anthranilsäure (Abz) unterscheidet.^[168]

Für Abz-VW18 wurde zunächst eine α -helikale Konformation bestimmt. Innerhalb von 15 h änderte das Peptid seine Konformation zum β -Faltblatt und bildete innerhalb von 24 h schließlich Amyloide aus. In Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahmen (TEM-Aufnahmen) wurden die gebildeten Amyloidfibrillen und deren feine Ultrastruktur sichtbar (Abbildung 8.13 linkes TEM-Bild, durchgeführt von Dr. H. v. Berlepsch).^[168]

⁵je 100 μ M in 10 mM Phosphat-Puffer

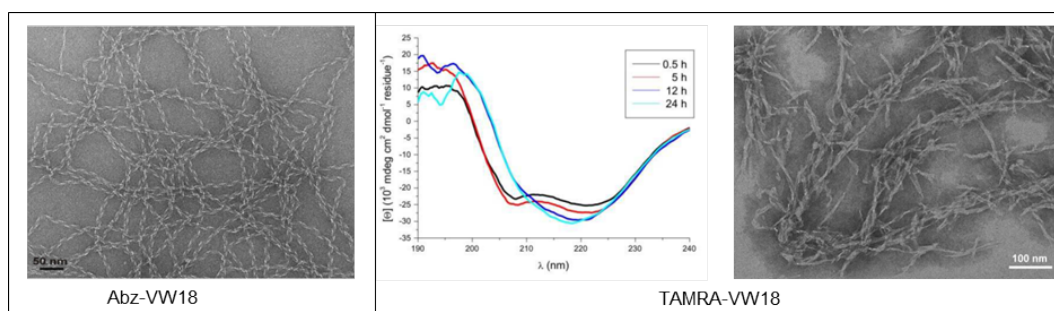


Abbildung 8.13.: Sekundärstruktur und Amyloidbildung des TAMRA-VW18 im Vergleich zu Abz-VW18.

Das TAMRA-VW18 durchlief ebenfalls eine Konformationsänderung von α -Helix zu β -Faltblatt innerhalb von ca. 12 h und bildete amyloide Fibrillen nach 24 h. Allerdings wurde in TEM-Aufnahmen sichtbar, dass die Ausbildung einer feinen Ultrastruktur im Vergleich zum Abz-VW18 gestört ist (Abbildung 8.13, mitte und rechts). Trotz Hexanlinker zwischen Fluorophor und Peptidsequenz behinderte wahrscheinlich das sterisch anspruchsvollere Rhodaminderivat teilweise die Verdrillung der Fibrillen. Da die Amyloidfibrillen im TEM grundsätzlich nachgewiesen wurden, konnte das rhodaminmodifizierte VW18 trotz gestörter Ultrastruktur als Modellpeptid für dieses Projekt genutzt werden.

8.5.2. Caging des TAMRA-VW18 Peptids

In Anlehnung an die Vorversuche am Testsystem Bhc in Kapitel 8.4 wurde das Cumarinderivat **15** mit DSC zu **25** aktiviert und anschließend mit dem Mtt-entschützten TAMRA-VW18 Peptid am Harz umgesetzt. Nach erfolgter Abspaltung wurde das *caged*-TAMRA-VW18 (**14**) in einer Ausbeute von 2.7% erhalten und wurde mit hochauflösender Massenspektrometrie als das gewünschte Produkt **14** identifiziert (Abbildung 8.14, 8.15).

8.5.3. NCL des *caged*-TAMRA-VW18 an ein Thioester-HPMA-Copolymer

Für die NCL-Reaktion wurde das Thioester-HPMA-Copolymer PHNS-18 eingesetzt, welches in einer RAFT-vermittelten Copolymerisation aus HPMA und dem Thioester-funktionalisierten Monomer NMAS dargestellt wurde und sich durch eine enge Molmassenverteilung auszeichnete ($M_n = 18.5$ kDa, $PDI = 1.2$).

Vorversuche mit der später verwendeten humanen neuronalen Zelllinie SH-SY5Y hatten bereits ergeben, dass für eine schnelle und effiziente zelluläre Aufnahme der Polymere eine CPP-Modifikation (Nonaarginin) notwendig ist. Daher wurde das Polymer PHNS-18 in der NCL-Reaktion zusätzlich zum *caged*-Peptid TAMRA-VW18 (**14**) gleichzeitig mit cysteinyliertem Nonaarginin umgesetzt.

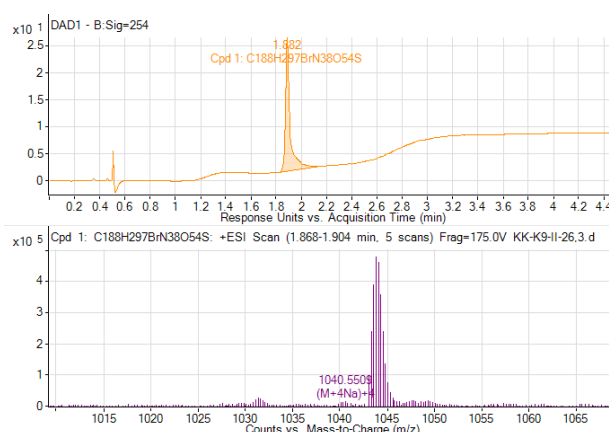


Abbildung 8.14.: Identifizierung des *caged*-TAMRA-VW18 Peptids (14).

Die NCL-Reaktion wurde in einer Mischung aus Dioxan und Phosphatpuffer (pH 7.4) (Dioxan/Puffer 2:1) in Anwesenheit von Thiophenol als Katalysator durchgeführt. Dabei sorgte Dioxan als organisches Lösungsmittel dafür, dass das Peptid während der Reaktion in einem denaturiertem Zustand vorlag. Nach erfolgter Kupplung wurde das PHN18-*caged*-TAMRA-VW18 über Gelfiltration und Größenausschlusszentrifugation mit dem Amicon-Ultra System aufgereinigt. Die endgültige Beladung der HPMA-Polymere mit dem *caged*-Peptid wurde von der Firma *Genaxxon* nach Hydrolyse des Konjugats über Gaschromatographie bestimmt. Diese Untersuchung ergab eine Beladung von 0.095 mmol/g für das *caged*-Peptid, was 2-3 Peptiden pro Polymerkette entspricht und eine Beladung von 0.014 mmol/g für das CPP Nonaarginin (0.4 Peptide/Polymerkette).

8.5.4. Charakterisierung der *caged*-Verbindungen

Peptidfreisetzung durch UV-Bestrahlung

Wichtig für die Untersuchung intrazellulärer Konformationsänderungen ist eine effiziente Abspaltung des Modellpeptids TAMRA-VW18 von seinem polymeren Träger.

Zur Bestimmung der optimalen Belichtungsdauer wurden zunächst Proben des *caged*-TAMRA-VW18 (14) mit zwei unterschiedlichen Belichtungsquellen bestrahlt. Zum einen wurde ein UV-Leuchttisch (Transilluminator, $\lambda \approx 365$ nm) und zum anderen eine HBO 50 W Lampe verwendet. Der Fortschritt der Freisetzung wurde am LC-ToF chromatographisch verfolgt und quantifiziert.

Nach einer 15-minütigen Bestrahlung mit dem Transilluminator wurden ca. 40 % des TAMRA-VW18 Peptids abgespalten (Abbildung 8.17 A). Auch bei längerer Bestrahlung und in Experimenten mit der energiereichen HBO-Lampe blieb das Verhältnis zwischen freiem und gebundenem TAMRA-VW18 gleich. Erwartungsgemäß wurde auch für das entsprechende Peptid-Polymerkonjugat PHN18-*caged*-TAMRA-VW18 nur eine Peptidfreisetzung von ca. 40 % erreicht (Abbildung 8.17, B).

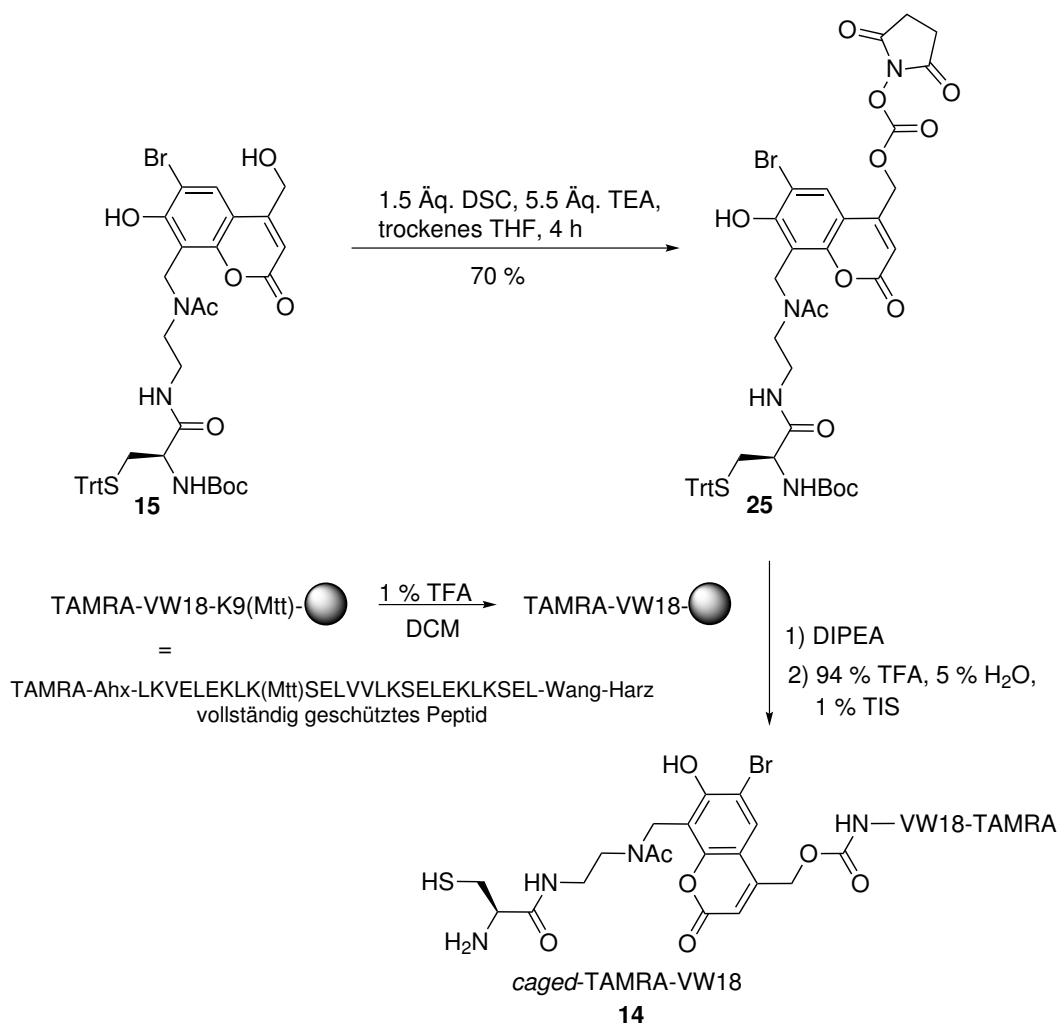


Abbildung 8.15.: Aktivierung des Cumarins **15** zum Aktivester **25** mit anschließender Peptidkupplung.

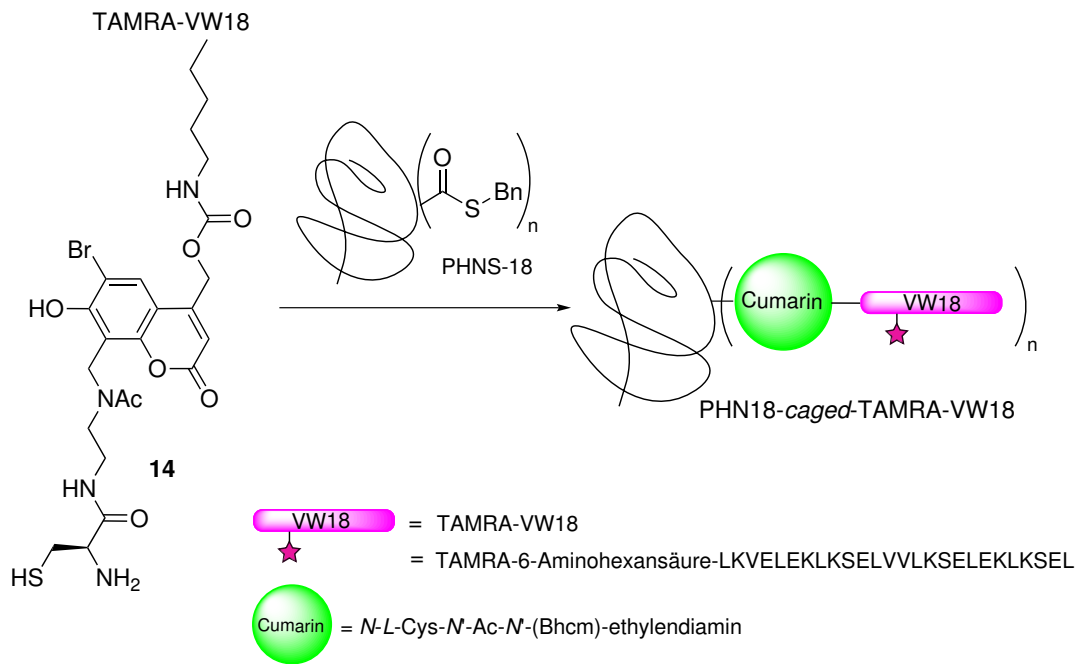


Abbildung 8.16.: NCL-Reaktion zur Darstellung amyloidogener Peptid-HPMA-Konjugate.

Die relativ niedrige Wiederfindungsrate des Peptids VW18 ist nicht plausibel, da die zuvor durchgeführten Testabspaltungen vom *Bhc-caged-VW18* **24** erfolgreich waren (Kapitel 8.4.3). Die einzigen Unterschiede zum Testsystem stellen das über einen Aminomethyl linker eingeführte Cystein und das Fluoreszenzlabel des VW18 Peptids dar. Ein negativer Einfluss des Linkersystems kann im Hinblick auf die zuvor beschriebenen Eigenschaften der Aminomethylgruppe ausgeschlossen werden (Kapitel 8.2). Die eingeführte Rhodamingruppe dagegen kann als Fluorophor durchaus die Absorptions- und damit auch die photochemischen Eigenschaften des Cumarinsystems verändern. *N*-Terminal gebunden befindet sich das Rhodamin in Position d des Heptandenmusters einer α -Helix in räumlicher Nähe zum am Lysin gebundenen Cumarinyl-System in Position e (2.5 Ganghöhen, ca. 1.4 nm). Zwischen den beiden Fluorophoren könnte ein FRET-Effekt auftreten, so dass die eingestrahlte Energie der photochemischen Reaktion nicht mehr vollständig zur Verfügung stehen würde. Diese Hypothese erklärt allerdings nicht, wieso die schnell verlaufende Photolyse bei ca. 40% des freigesetzten Peptids stoppt. Während des Freisetzung- bzw. Bestrahlungsprozesses scheint die photolysierbare Gruppe chemisch so modifiziert zu werden, dass keine weitere photochemische Freisetzung mehr möglich ist.

Sekundärstrukturen vor und nach Bestrahlung

TEM und CD-spektroskopische Untersuchungen des TAMRA-VW18 Peptids haben gezeigt, dass die Ausbildung einer feinen Ultrastruktur im Vergleich zum Abz-VW18

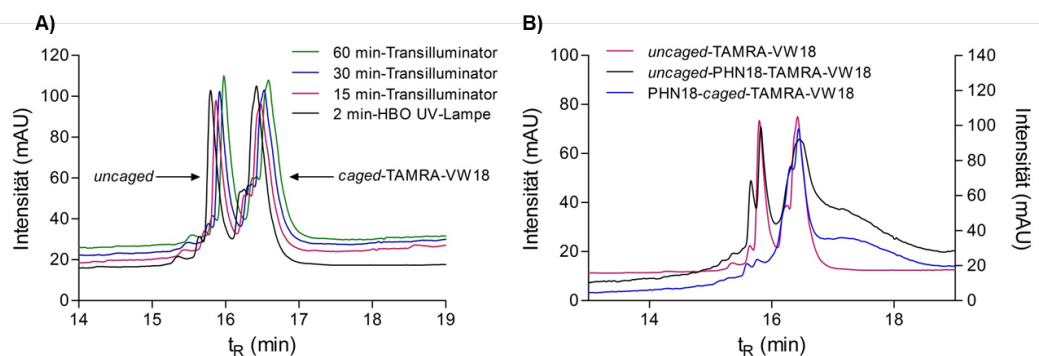


Abbildung 8.17.: *Uncaging*-Experimente A) *caged*-TAMRA-VW18 und B) PHN18-*caged*-TAMRA-VW18; Jupiter-C18, 20-60 % ACN in 20 min, $\lambda = 254$ nm.

Modellpeptid vermutlich durch die Einführung eines sterisch anspruchsvollen aromatischen Farbstoffes gestört war. Da bei der Abspaltung des Peptids das Cumarin-HPMA-Konjugat als makromolekulares Nebenprodukt zurück bleibt, wurde die Sekundärstruktur bestrahlter *caged*-Konjugate bestimmt, um sicher zu stellen, dass die Konformationsänderung und die folgende Amyloidbildung auch in Anwesenheit des Nebenproduktes funktioniert.

Dementsprechend wurden die Konformationen des Peptid-Polymerkonjugates PHN18-*caged*-TAMRA-VW18⁶ und des freien Peptids *caged*-TAMRA-VW18⁷ (**14**) jeweils vor und nach Bestrahlung mit UV-Licht bestimmt.

Konformation vor der Bestrahlung Vor der UV-Licht-induzierten Abspaltung des TAMRA-VW18 Peptids wiesen beide *caged*-Verbindungen eine α -helikale Konformation auf, die über den Zeitraum der Versuchsdauer unverändert blieb (Abbildung 8.18). Im Hinblick auf das Peptid *caged*-TAMRA-VW18 verhinderte allein die Anwesenheit des photolabilen Cumarinderivates in der Seitenkette des Lysin 9 in Position e des Heptadenmusters die für die β -Faltblattstruktur und die folgende Amyloidbildung notwendige dichte Packung. Die Ausbildung einer α -helikalen Struktur wurde dagegen durch diese Modifikationen am Lysin nicht gestört, da sich die Lysin-Seitenkette außen an der Helix befindet. Die Einführung des Cumarinderivates maskiert auf diese Weise die Eigenschaften des Modellpeptids, Amyloide auszubilden.

Bezüglich des Peptid-Polymerkonjugates PHN18-*caged*-TAMRA-VW18 war die Ausbildung einer α -helikalen Sekundärstruktur ebenfalls möglich. Die Anwesenheit des Polymers hatte keine negativen Auswirkungen auf die Interaktionen der Peptide, was in Übereinstimmung mit Arbeiten von Apostolovic *et al.*^[94,179]

Konformation nach der Bestrahlung Die photochemische Abspaltung des *caged*-TAMRA-VW18 Peptids und des PHN18-*caged*-TAMRA-VW18 Konjugats erfolgte

⁶50 μ M in 10 mM Phosphat-Puffer, pH 7.4

⁷100 μ M in 10 mM Phosphat-Puffer, pH 7.4

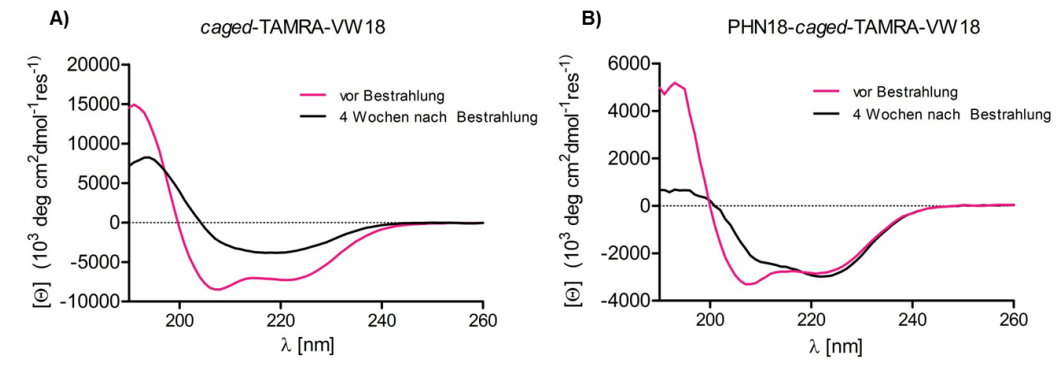


Abbildung 8.18.: CD-Spektren des A) *caged*-TAMRA-VW18 und B) PHN18-*caged*-TAMRA-VW18 vor und nach UV-Lichtbestrahlung.

mit UV-Lichtbestrahlung unter den zuvor ermittelten Bedingungen (Kapitel 8.4.3).

Die Sekundärstruktur beider Lösungen wurde sofort nach Bestrahlung bestimmt und die zu erwartenden Konformationsänderungen über einen Zeitraum von mehreren Wochen CD-spektroskopisch verfolgt. Für beide Proben wurde in einem Zeitraum von vier Wochen eine Konformationsänderung von einer α -helikalen Konformation zur β -Faltblattstruktur beobachtet.

Die erfolgreiche Ausbildung einer β -Faltblattstruktur der bestrahlten *caged*-Verbindungen bestätigte die Leistungsfähigkeit des komplexen Konstruktes aus Polymer und *caged*-Peptid. Der relativ langsame Verlauf der Konformationsänderung des TAMRA-VW18-Peptids nach photolytischer Abspaltung vom Cumarinderivat bzw. Cumarin-Polymerkonjugat im Vergleich zu unbehandeltem TAMRA-VW18-Peptid lässt sich auf die geringeren Ausgangskonzentrationen der *caged*-Proben zurückführen.

8.6. Zelluläre Aufnahme des *caged*-TAMRA-VW18-HPMA-Konjugats

Brandenburg *et al.* haben außerhalb von lebenden Systemen bereits gezeigt, dass das Peptid VW18 ein geeignetes Modell zur Erforschung der bei der Amyloidbildung auftretenden Prozesse darstellt.^[168] Im Folgenden wurde die Internalisierung des

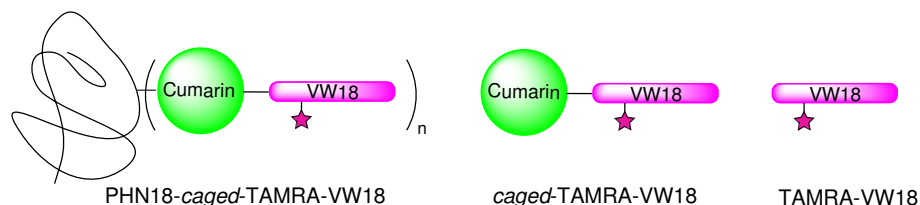


Abbildung 8.19.: Übersicht über die in Zellexperimenten verwendeten Substanzen.

Peptid-Polymerkonjugats und die Auswirkungen der amyloidogenen Eigenschaften des freigesetzten Modellpeptids TAMRA-VW18 auf die Vitalität der Zellen untersucht. Als humane Zelllinie wurden die Neuroblastomzellen SH-SY5Y verwendet. Die Auswirkungen der in Abbildung 8.19 dargestellten Verbindungen i) PHN18-*caged*-TAMRA-VW18, ii) *caged*-TAMRA-VW18 (**14**) und iii) TAMRA-VW18 auf die Zellen wurden untersucht (Abbildung 8.19). Die Lokalisation und Verfolgung des rhodaminmodifizierten Peptids erfolgten am konfokalen Laserscanning-Mikroskop (CLSM) über einen Zeitraum von 24 h.

Im ersten Schritt wurden SH-SY5Y-Zellen sowohl mit dem Konjugat PHN18-*caged*-TAMRA-VW18 (50, 100 und 300 μM) als auch mit den polymerungebundenen Peptiden *caged*-TAMRA-VW18 und TAMRA-VW18 (50 μM) für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Substanzlösungen abgenommen, die Zellen mit Medium gewaschen und für die Versuchsdauer in einem indikatorfreien Medium kultiviert.

Unmittelbar nach dem Inkubationsschritt wurde am CLSM zunächst der Status Quo vor der Bestrahlung mit UV-Licht festgehalten. Erwartungsgemäß wurde ausschließlich im Fall des polymergebundenen Peptids eine rhodaminabhängige Fluoreszenz im Cytoplasma der SH-SY5Y-Zellen beobachtet. Das Polymerkonjugat wurde in vesikulären Strukturen internalisiert, bei denen es sich vermutlich um Endosomen handelt. Die höchste eingesetzte Polymerkonzentration von 300 μM führte dazu, dass die Zellen nach der Behandlung kugelförmig waren, was ein typisches Zeichen für eintretende Apoptose ist (Abbildung 8.20). Da sich die Behandlung mit dieser sehr hohen Konzentration auf die Zellen toxisch auswirkte, wurden diese Proben im weiteren Verlauf des Versuchs nicht weiter betrachtet. Im Fall der beiden polymerungebundenen Peptide wurde lediglich eine schwache, unspezifische Fluoreszenz außen an der Zellmembran beobachtet. Die Konjugation des *caged*-Peptids an einen polymeren Träger und die Verwendung des CPP Nonaarginin sind für eine erfolgreiche Internalisierung notwendig.

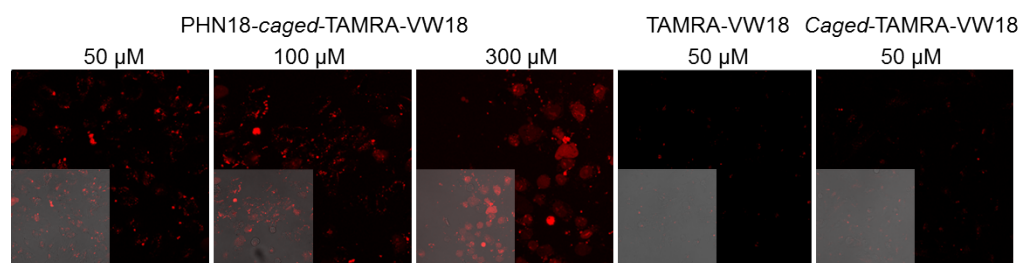


Abbildung 8.20.: CLSM-Aufnahmen nach Inkubation bei 37 °C; Überlagerung von Durchlicht- und Fluoreszenzkanal, rot: rhodaminabhängige Fluoreszenz.

Im nächsten Schritt wurden die behandelten Zellen für zwei Minuten mit UV-Licht bestrahlt, um das Cumarinderivat photolytisch zu spalten und damit einhergehend das TAMRA-VW18 Peptid intrazellulär freizusetzen. Eine mit dem Peptid-Polymerkonjugat (100 μM) behandelte Zellprobe blieb unbestrahlt, so dass das Konjugat einerseits als Vergleichsprobe diente und andererseits über das Verhalten und

den Verbleib des Makromoleküls Aufschluss gab. Um einen toxischen Effekt der UV-Bestrahlung ausschließen zu können, wurden darüber hinaus unbestrahlte Zellen bestrahlt und als Kontrolle über die Dauer der Experimente im Vergleich zu unbestrahlten und unbehandelten Zellen beobachtet.

CLSM-Aufnahmen direkt nach der Belichtung zeigten keine großen Unterschiede zu den Aufnahmen direkt vor der UV-Bestrahlung. Die bestrahlten Proben wiesen weiterhin vesikuläre Strukturen auf. Im direkten Vergleich zur unbelichteten Probe trat neben endosomalen Vesikeln zunehmend eine diffuse Fluoreszenz auf (Abbildung 8.21). Diese Beobachtung deutete daraufhin, dass das abgespaltene Peptid aus den Endosomen ins Cytosol freigesetzt wurde. Insgesamt drei Stunden nach der Peptid-

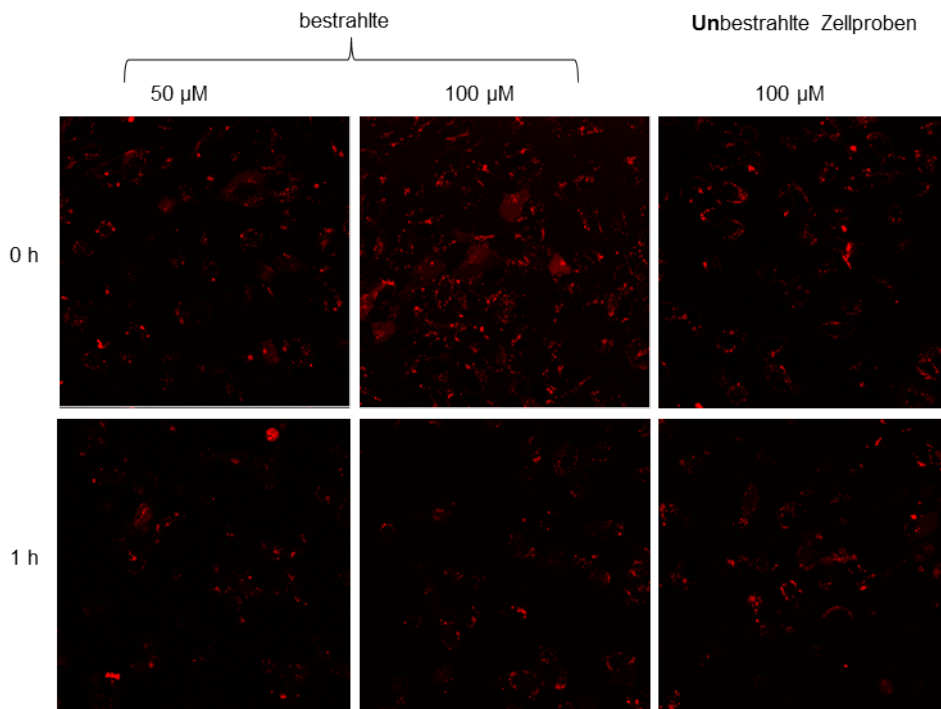


Abbildung 8.21.: CLSM-Aufnahmen direkt nach Bestrahlung mit UV-Licht und eine Stunde danach; rot: rhodaminabhängige Fluoreszenz.

freisetzung waren weiterhin vesikuläre Strukturen zu beobachten, deren Verteilung im Vergleich zur unbestrahlten Probe ungleichmäßiger wurde, so als würden sich die Vesikel lokal verdichten bzw. ihre Fluoreszenzintensität abnehmen (Abbildung 8.22 3 h).

Im Verlauf der nächsten zwei Stunden wurde die zuvor beobachtete Verdichtung und eine lokale Verschiebung der Vesikel zum Rand der Zelle immer ausgeprägter. Dieses Verhalten kann entweder Teil eines Exozytosevorgangs sein oder ist die Folge von lokaler Peptidaggregation. Darüber hinaus veränderten die Zellen im Vergleich zu bestrahlten Kontrollzellen ihre Form und begannen zu schrumpfen. Dieser Effekt war größer für

Zellen, die mit einer höheren Konzentration des Konjugats (100 μM) behandelt worden sind. Das ist ein deutlicher Hinweis auf die Apoptose der Zellen. Im Gegensatz dazu waren im Cytoplasma der unbestrahlten Probe die Vesikel weiterhin gleichmäßig im Cytoplasma verteilt (Abbildung 8.22, 5 h). Sieben Stunden nach erfolgter Bestrahlung

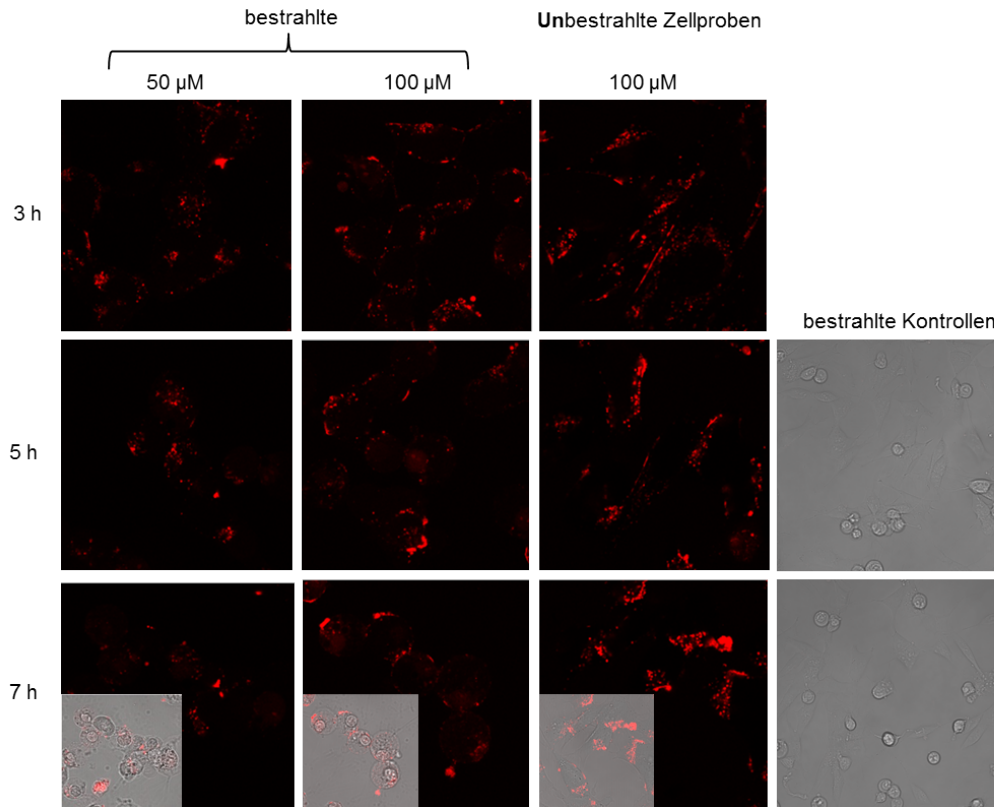


Abbildung 8.22.: CLSM-Aufnahmen direkt nach Bestrahlung mit UV-Licht und drei bis sieben Stunden danach; rot: rhodaminabhängige Fluoreszenz.

mit UV-Licht war der Zelltod im Fall der mit einer 100 μM Lösung behandelten Zellprobe bereits weit fortgeschritten. Deutliche Anzeichen von Apoptose waren auch in der Zellprobe zu beobachten, die mit der niedriger konzentrierten Polymerlösung behandelt worden ist. In der bestrahlten Kontrolle waren nach sieben Stunden dagegen nur vereinzelt verformte Zellen zu beobachten, bei denen nicht eindeutig zwischen Apoptose oder Zellteilung unterschieden werden konnte. Offensichtlich wirkte sich die Anwesenheit des Peptids TAMRA-VW18 toxisch auf die Zellen aus. Die Restfluoreszenz der Zellproben, wurde zu diesem Zeitpunkt hauptsächlich am Zellrand beobachtet. Die Zellen mit der unbestrahlten Vergleichsprobe zeigten hingegen weiterhin eine gleichmäßige cytosomale Verteilung der Vesikel in vitalen Zellen (Abbildung 8.22, 7 h).

Diese Zellexperimente zeigten die Notwendigkeit der Konjugation an einen polymeren Träger, da die zelluläre Aufnahme in SH-SY5Y-Zellen ausschließlich auf das

Peptid-Polymerkonjugat des *caged*-TAMRA-VW18 beschränkt blieb. Das in Vesikeln internalisierte Konjugat PHN18-*caged*-TAMRA-VW18 war in den beiden Konzentrationen 50 und 100 μM nicht toxisch. Nach UV-Lichtbestrahlung und der damit induzierten Freisetzung des Peptids wurden zwar Veränderungen in der Verteilung der Peptide beobachtet, allerdings konnte daraus nicht eindeutig auf die Bildung amyloidogener Strukturen geschlossen werden. Für einen direkten Nachweis müssten die Zellen mit spezifischen Farbstoffen angefärbt werden, um zwischen endosomalen, lysosomalen und fibrillären Strukturen unterscheiden zu können. Auffällig war allerdings der frühe Zelltod der behandelten und belichteten Zellen im Vergleich zu den belichteten Kontrollen und zur mit dem Konjugat behandelten aber unbelichteten Zellprobe. Das freie TAMRA-VW18 Peptid wirkte sich offensichtlich negativ auf die Vitalität der Zellen aus. Spezifische Färbungen von Endosomen, Lysosomen und amyloidogenen Fibrillen könnten zeigen, in welchen Zellkompartimenten sich das freie TAMRA-VW18 Peptid im zeitlichen Verlauf aufhält und welche Form des Peptids für die beobachteten Effekte verantwortlich ist.

Darüber hinaus hat dieses Experiment gezeigt, dass das Modellpeptid in polymergebundener Form intrazellulär in Vesikeln verbleibt und offensichtlich in dieser Konzentration keinen cytotoxischen Effekt in den Zellen hervorruft. Dieser stabile Zustand bietet die Möglichkeit, die Peptidfreisetzung zu einem deutlich späteren Zeitpunkt nach der zellulären Aufnahme durchzuführen.

8.7. Zusammenfassung

Im Rahmen einer gemeinsamen Kooperation mit Dr. E. Brandenburg (AK Prof. Kokschi) wurde mit dem Ziel, das amyloidbildende Modellpeptid VW18 intrazellulär zu studieren, ein auf poly(HPMA)-basierendes DDS entwickelt (Abbildung 8.23). Der polymere Träger, ausgestattet mit wenigen Kopien des CPPs Nonaarginin, sorgte dabei einerseits für die Internalisierung in die humane neuronale Zelllinie SH-SY5Y und schützte andererseits das Modellpeptid vor proteolytischem Abbau. Die intrazelluläre Abgabe des Peptids wurde durch einen photospaltbaren Linker basierend auf der photolysierbaren Gruppe (6-Brom-7-hydroxy-cumarin-4-yl)-methyl (Bhc) gewährleistet. In einer mehrstufigen Synthese wurde in Position 8 des Cumarins Bhc ein cysteinylierter Ethylendiaminlinker eingeführt, der eine Anknüpfung an ein Thioester-HPMA-Copolymer über die NCL-Reaktion ermöglichte. Das cysteinylierte Cumarin **15** wurde als photolabile Schutzgruppe an ein freies ϵ -Lysin-Amin des rhodaminmarkierten Peptids VW18 über eine Carbamatfunktionalität gekuppelt und lieferte das *caged*-TAMRA-VW18-Peptid **14**. Dieses wiederum ergab nach NCL-Reaktion an das Copolymer PHNS-18 das entsprechende *caged*-TAMRA-VW18-HPMA-Konjugat. In der geschützten (*caged*) Form wurde die Eigenschaft des VW18 Peptids, β -Faltblätter auszubilden und anschließend zu Amyloiden zu aggregieren, durch die kovalente Bindung an die photolabile Cumarinringgruppe maskiert und nach photolytischer Spaltung wieder regeneriert. Untersuchungen der UV-vermittelten Freisetzung des Peptids ergaben sowohl für die polymergebundene als auch -ungebundene *caged*-Verbindung

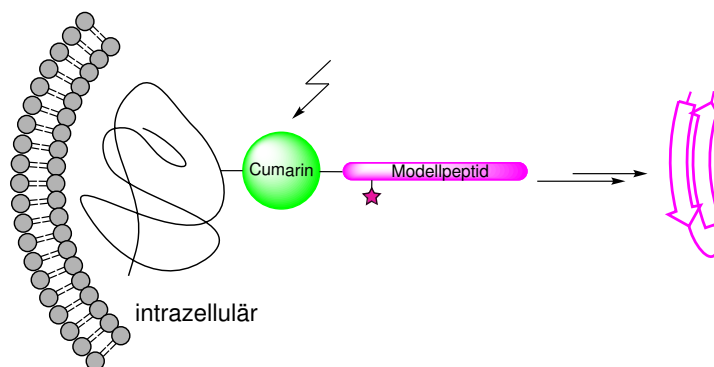


Abbildung 8.23.: Konzept zur zellulären Aufnahme und Peptidfreisetzung im Cytoplasma.

eine für dieses Cumarinderivat relativ niedrige Wiederfindungsrate des Biomoleküls. Die Anwesenheit der Rhodamingruppe hat sich wahrscheinlich negativ auf die photochemischen Eigenschaften des Cumarinderivates **14** ausgewirkt.

Die an Neuroblastomzellen SH-SY5Y durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass ausschließlich das HPMA-gebundene *caged*-TAMRA-VW18 Peptid in Anwesenheit des ebenfalls polymergebundenen CPPs Nonaarginin in vesikulären Strukturen internalisiert wurde. Ohne UV-Bestrahlung blieb dieses Konjugat über 24 h unverändert in Vesikeln und zeigte keinerlei toxische Wirkung auf die Zellen. Im Gegensatz dazu wurden für Zellproben, die nach zellulärer Aufnahme der Konjugate zur Freisetzung des TAMRA-VW18-Peptids mit UV-Licht bestrahlt worden waren, apoptotische Veränderungen beobachtet. Das deutete auf eine cytotoxische Wirkung des TAMRA-VW18 Peptids hin. Darüber hinaus hat eine Umverteilung der rhodaminvermittelten Fluoreszenz im Cytoplasma zum Zellrand hin stattgefunden. In weiterführenden Studien muss durch spezifische Färbungen gezeigt werden, welche Form des TAMRA-VW18-Peptids für die beobachteten Effekte verantwortlich ist.

Das Konjugat aus poly(HPMA) und einem Cumarinderivat als photolabilen Linker zwischen Polymer und Modellpeptid TAMRA-VW18 hat sich als praktisches Konstrukt erwiesen, unnatürliche Modellsysteme in Zellen zu transportieren und kontrolliert freizusetzen und kann in Zukunft zur Aufklärung der Amyloidbildung und ihrer Inhibierung beitragen.

9. Projekt D: Untersuchung der Wechselwirkung multivalent-präsentierter PRS-Liganden mit Tandem WW-Domänen in Abhängigkeit von der Struktur des polymeren Trägers

Protein-Protein-Interaktionen (PPI) sind der Dreh- und Angelpunkt der meisten biologischen Prozesse und stehen im Fokus der aktuellen Proteomforschung.^[159] Mit multiplen Interaktionsdomänen vermitteln Proteine spezifische Protein-Protein- und Protein-Phospholipid-Interaktionen und kontrollieren auf diese Weise viele Signalwege und Regulierungssysteme eukaryotischer Zellen.^[180] Die Erforschung der sogenannten Interaktionsnetzwerke (Interaktome), die auf PPIs basieren, trägt zum Verständnis der komplexen Protein-Protein-Wechselwirkungen bei und stellt einen Ansatz der Wirkstoffforschung dar.^[181]

Die Interaktionsfläche der Proteine in einem Protein-Protein-Komplex ist mit durchschnittlich 1600 \AA^2 sehr groß im Vergleich zu katalytischen Zentren von Enzymen.^[182] Die Wechselwirkung wird dabei durch Proteinmodule, den sogenannten PPI-Domänen, bestehend aus 40 bis 200 Aminosäuren vermittelt, die die Interaktionssequenzen des Bindungspartners erkennen.^[183] Sie werden anhand ihrer bevorzugten Bindungsmotive unterschieden. Zur Gruppe der PPI-Domänen, die modifizierte Peptidsequenzen binden, wie z. B. phosphorylierte Tyrosin- bzw. Serinseitenketten, gehören die Scr homology (SH2)-Domäne, die phosphotyrosinbindende (PTB)-Domäne^[184] und die WW-Domäne.^[185] Bestimmte Aminosäuresequenzen, wie z. B. prolinreiche Sequenzen (PRS) werden beispielsweise von Scr homology (SH3)-Domänen,^[186] WW-Domänen^[187] und Enabled/VASP Homology 1 (EVH1)-Domänen^[188] erkannt. PDZ-Domänen^[189] und sterile alpha motive (SAM)-Domänen^[190] gehören zur Gruppe der PPI-Domänen, die Homo- bzw. Heterooligomere ausbilden können. Darüber hinaus existieren PPI-Domänen, die mit Nukleinsäuren oder Phospholipiden interagieren.^[191,192]

Im Fokus dieses Projektes stehen WW-Domänen, die in viele zelluläre Prozesse involviert sind und mit einigen neurodegenerativen Erkrankungen (Alzheimer, Huntington, Krebs) in Zusammenhang gebracht werden.^[193] Typischerweise erkennen WW-Domänen die prolinreichen Sequenzen als bevorzugtes Bindungsmotiv spezifisch und binden diese im Vergleich zu anderen peptidsequenzerkennenden Proteinen, wie z. B. Antikörpern und Rezeptoren, nur im niedrig-affinen Bereich.^[186]

WW-Domänen sind kleine aus ca. 40 Aminosäuren aufgebaute Proteine, die eine stabile, 3-strängige β -Faltblattstruktur besitzen. Wie der Name schon impliziert, zeichnen sie sich durch 2 konservierte Tryptophane (WW) aus, zwischen denen ca. 20 Aminosäuren liegen.^[194,195] WW-Domänen wurden in Abhängigkeit von der Erkennungssequenz in vier Gruppen klassifiziert: Gruppe I) bindet PPxY Motive (wobei x eine beliebige Aminosäure ist), Gruppe II) PPLP Motive, Gruppe III) PPR Motive und Gruppe IV) erkennt prolinbenachbarte Phospho-Ser oder Phospho-Thr Gruppen.^[195,196]

Eine biologisch interessante WW-Domäne stellt das Protein FBP21 (Formin bindendes Protein 21) dar, welches anfangs als Bindungspartner des Zytoskelettproteins Formin identifiziert worden ist. Erst später wurde FBP21 mit der RNA-Prozessierung in Zusammenhang gebracht. Huang *et al.* haben die Struktur des Proteins in Lösung mit Hilfe der NMR-Spektroskopie aufgeklärt und dessen Bindungsverhalten auf molekularer Ebene studiert.

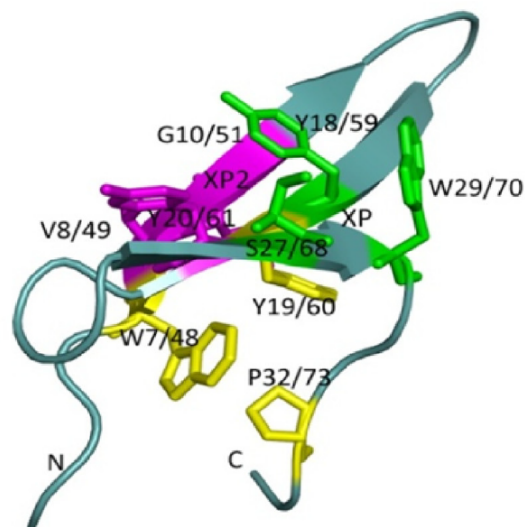


Abbildung 9.1.: XP und XP2 Bindungstaschen des Proteins FBP21.¹

Das Protein FBP21 zeichnet sich durch zwei WW-Domänen aus, die über einen Linker bestehend aus 12 Aminosäuren miteinander verbunden sind und die typische WW-Domänenfaltung aufweisen. Die β -Faltblattstrukturen der WW1 und WW2 Domäne besitzen zwei Seiten. Dabei zeichnet sich eine der Seiten durch die hoch konservierten Tryptophan, Tyrosin und Prolin-Reste aus, die den hydrophoben Kern bilden. Auf der anderen Seite befinden sich die konservierte XP Tasche, die durch die Reste Tryptophan, Tyrosin und Serin gebildet wird, und die aus Valin, Glutamat, Glycin, und zwei Tyrosinen gebildete XP2 Tasche (Abbildung 9.1, grün: XP bildende Reste, rosa: XP2 bildende Reste). Beim Bindungsvorgang mit PRS-Liganden verhalten

¹Diese Abbildung wurde ursprünglich von Huang *et al.* im *J. Biol. Chem.* veröffentlicht.^[197]

© The American Society for Biochemistry and Molecular Biology

sich beide Taschen äquivalent und binden gleichzeitig zwei PRS-Motive, was in Experimenten mit Mutanten der Tandem-WW-Domänen (tWW) gezeigt werden konnte. Dafür ist der flexible Linker verantwortlich, der eine relativ freie Orientierung der beiden Domänen zueinander zulässt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die WW-Domänen des FBP21 die Erkennungsmotive der beiden Gruppen II (PPLP) und III (PPR) erkennen.^[197]

In Ergänzung zu den Arbeiten von Huang *et al.* haben Klippel *et al.* die Abhängigkeit der Bindungsaffinitäten von der Valenz der Liganden und der Länge des die beiden WW-Domänen verbrückenden Linkers untersucht. Diese Studien haben zum besseren Verständnis der dynamischen Assemblierung beim Splicingprozess und der innerhalb der Proteinkomplexe stattfindenden Erkennungsvorgänge beigetragen.^[198]

9.1. Zielsetzung

In den Studien zur Funktion, Struktur und Ligandspezifität des Proteins FBP21 wurden bisher synthetische prolinreiche Peptide eingesetzt.^[198] Dabei wurde gezeigt, dass die Affinität der tWW-Domänen mit zunehmender Anzahl an Bindungsmotiven signifikant ansteigt. Die besten Bindungskonstanten wurden mit einer tetravalenten PRS erreicht, die aus insgesamt 37 Aminosäuren aufgebaut war.

Allerdings hat das Konzept, multivalente Liganden in Form von langen Peptidsequenzen mit sich wiederholenden Erkennungsmotiven zu erzeugen, zwei entscheidende Nachteile. Zum einen ist das System nicht flexibel variierbar, so dass bei neuer Fragestellung das gesamte Peptid von Grund auf neu synthetisiert werden muss. Zum anderen sind lange Peptidsequenzen aufgrund ihrer geringen proteolytischen Stabilität und der Immunabwehr, die sie hervorrufen können, problematisch für weiterführende *in vitro* und insbesondere *in vivo* Studien.

Im Rahmen des Projektes sollten daher kurze Peptidmotive auf polymeren Trägersystemen immobilisiert werden, um so einen schnellen und effizienten Zugang zu flexibel variierbaren Interaktionspartnern zu ermöglichen. Im Gegensatz zu den bisher verwendeten PRS Liganden ergab sich die Multivalenz der Peptid-Polymerkonjugate aus der Präsentation vieler Kopien kurzer monovalenter PRS entlang einer Polymerkette (Abbildung 9.2). Abhängig von der biologischen Fragestellung können die Konjugate auf die spezifische Anwendung zugeschnitten werden.

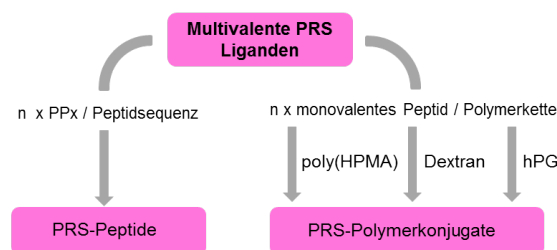


Abbildung 9.2.: Konzepte zur Darstellung multivalenter PRS-Liganden; links) multivalente Peptide und rechts) multivalente Ligand-Polymerkonjugate.

Allerdings hat die Architektur der Liganden, die sich aus der Struktur der eingesetzten Polymere ergibt, Auswirkungen auf den Bindungsmodus und demnach auch auf die Thermodynamik der Bindungsprozesse.^[199] Je nach Beschaffenheit der Polymere können die entsprechenden multivalenten Liganden einerseits aufgrund hoher Avidität als potente Inhibitoren an Proteine oder Rezeptoren binden. Andererseits können sie potente Effektoren darstellen, die Rezeptoren zu Clustern oligomerisieren und so biologische Prozesse wie z. B. die Signaltransduktion modulieren.

Um die Auswirkungen des polymeren Trägersystems auf die Ligand-Protein-Interaktion zu untersuchen, wurden für die Darstellung multivalenter PRS die konformativ unterschiedlichen Systeme i) Poly(HPMA) und ii) Dextran als Polymere mit einer Random Coil und iii) das hypervverzweigte Polyglycerin (hPG)^[200] als dendritisches Polymer mit einer Mizellenartigen Struktur^[201,202] eingesetzt.

Zusammengefasst ergaben sich für dieses Projekt folgende Ziele:

- Darstellung multivalenter Peptid-Polymerkonjugate basierend auf poly(HPMA), Dextran und hPG
- Untersuchung der Bindungsaffinitäten und des Bindungsmodus bei der Wechselwirkung mit den tWW-Domänen in Abhängigkeit von
 - der Beladungsdichte mit prolinreichen Motiven
 - den Eigenschaften des polymeren Trägersystems

9.2. Darstellung multivalenter Peptid-Polymerkonjugate

Die Darstellung polyvalenter Peptid-Polymerkonjugate erfolgte durch Anknüpfung vieler Kopien der kurzen prolinreichen Dekapeptidsequenz **P1**, die sich aus dem Splicingfaktor SIPP1 (Reste 481-490) ableitet (Tabelle 9.1). **P1** enthält das für WW-Domänen der Gruppe III bekannte Erkennungsmotiv PPR und wurde von Huang *et al.* mit einem K_D -Wert von 1 mM und einer Stöchiometrie von $N = 2$ als niedrig-affine, monovalente PRS beschrieben.

Tabelle 9.1.: Literaturdaten zum Liganden **P1**.

Ligand	Protein	Sequenz	K_D [mM] ^a	N^a
P1	SIPP1-(481-490)	GPPPRGPPPR	1.15 mM (± 0.03)	2

^a ITC-Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt

Retrosynthetisch betrachtet wurden multivalente Peptid-Polymerkonjugate durch die Anknüpfung mehrerer Kopien des Peptids **P1** an die Polymere poly(HPMA), Dextran und das dendritische Polymer hPG generiert (Abbildung 9.3). Die Nomenklatur der Konjugate ergab sich aus der Abkürzung für das verwendete Polymer (Dex, PG, PHN), der mittleren Molmasse (y) der eingesetzten Polymere und der Anzahl der gekuppelten Peptide (n).

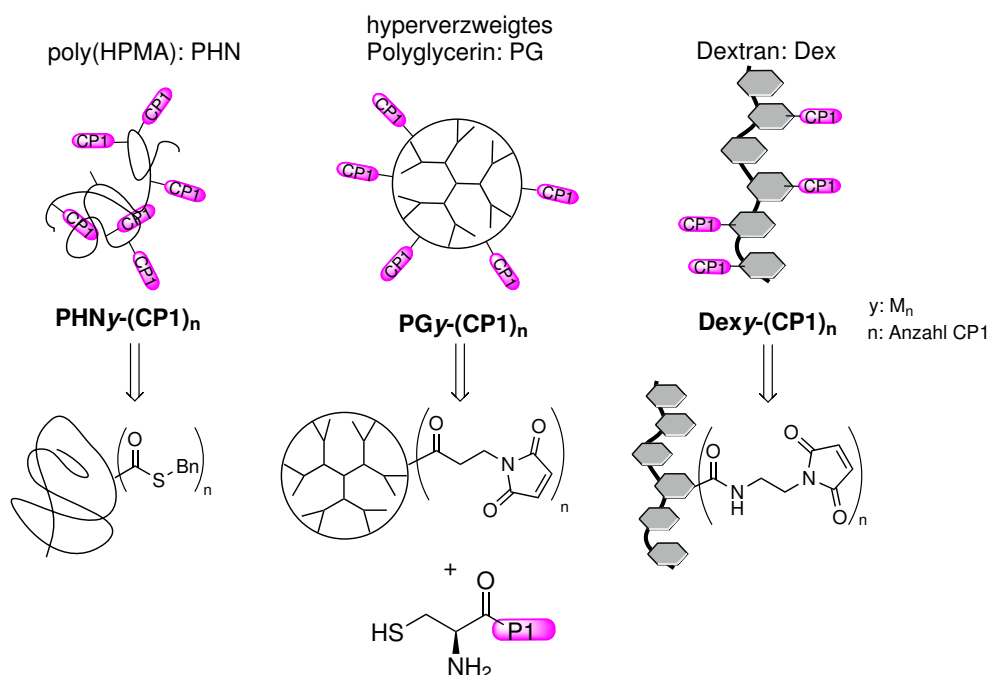


Abbildung 9.3.: Konzept zur Darstellung multivalenter Peptid-Polymerkonjugate.

Die Immobilisierung erfolgte für das thioesterfunktionalisierte poly(HPMA) über die NCL-Reaktion und für die maleimidfunktionalisierten Dextrane und Polyglycerine über eine Michael-Addition von Thiolen. Das Peptid **P1** wurde für diese Anwendung entsprechend *N*-terminal mit einem Cystein zum Peptid **CP1** funktionalisiert². Die benötigten maleimidfunktionalisierten Dextrane wurden dankend von Dr. M. Richter (Arbeitskreis Prof. R. Rademann, FMP) und die entsprechend funktionalisierten Dendrimere von Dr. S. Gupta (Arbeitskreis Prof. R. Haag, Freie Universität Berlin) erhalten.

9.2.1. Polyglycerinbasierte Peptid-Polymerkonjugate

Zur Darstellung polyglycerinbasierter Konjugate wurden die dendritischen Polymere PG7-(Mal)₆ (6 Maleimidgruppen) und PG7-(Mal)₁₀ (10 Maleimidgruppen) eingesetzt, die sich bei gleicher Molmasse (PG7: $M_n = 7.2$ kDa, PDI von 1.4) lediglich in der Anzahl der Maleimidgruppen unterschieden. In Anlehnung an die Protokolle von Dr. S. Gupta erfolgte die Anknüpfung des cysteinylierten Peptids **CP1** an die beiden hPGs PG7-(Mal)₆ und PG7-(Mal)₁₀ bei Raumtemperatur im entgasteten EDTA-haltigen Phosphatpuffer (Abbildung 9.4).

Die ¹H-NMR-spektroskopische Analyse beider Peptid-Polymerkonjugate wies keine Signale der Maleimidgruppe auf und deutete daher auf eine vollständige Peptidbela-

²Peptidsynthese: Dr. K. Holland-Nell (Arbeitskreis Prof. J. Rademann, Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP))

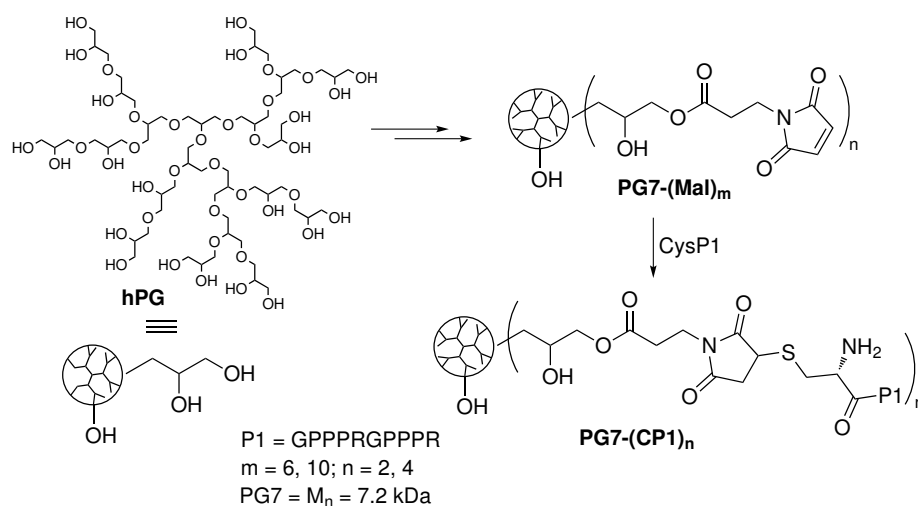


Abbildung 9.4.: Thiol-Maleimid Kupplung des CysP1 an hPG.

derung der hPGs. Die GC-Aminosäureanalyse zur Bestimmung der Peptidbeladung ergab allerdings relativ geringe Kupplungseffizienzen von $<40\%$ mit einer Peptidbeladung von lediglich 2 Peptiden pro Polyglycerin für das PG7-(Mal)₆ und 4 Peptiden pro Polyglycerin für das PG7-(Mal)₁₀ Polymer.

Zur Verbesserung der Kupplungseffizienz wurde die Michael-Addition in Gegenwart des Reduktionsmittels Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) durchgeführt, um die gegebenenfalls durch Luftsauerstoff teilweise oxidierten Peptide wieder zu freien Thiolen zu reduzieren. Da TCEP im pH-Bereich von 5 bis 7.3 selbst als Nukleophil mit Maleimidgruppen reagiert,^[203] wurde das Peptid in einem vorgelagerten Schritt mit TCEP reduziert und anschließend *in situ* mit PG7-(Mal)₁₀ umgesetzt. Der Einsatz des Reduktionsmittels führte allerdings zu keiner Steigerung der Kupplungseffizienz.

9.2.2. Dextranbasierte Peptid-Polymerkonjugate

Die Peptid-Dextran-Konjugate Dex10-(CP1)₆ und Dex40-(CP1)₈ basierten auf den Dextranen Dex10 und Dex40 mit den entsprechenden mittleren Molmassen 10 und 40 kDa und wurden von Dr. M. Richter dankend erhalten. Die Darstellung des Konjugats Dex10-(CP1)₃ erfolgte in einer Michael-Addition des **CP1** an das Dex10-(Mal)₅ (5 Maleimidgruppen) in einer entgasten Lösung aus Formamid und Phosphatpuffer (Puffer/Formamid 3:1) (Abbildung 9.5). Das Konjugat wurde in sehr guten Ausbeuten (99%) und in einer moderaten Kupplungseffizienz von 60% erhalten (3 Peptide pro Dextran).

9.2.3. poly(HPMA)-basierte Peptid-Polymerkonjugate

Zur Darstellung HPMA-basierter Peptid-Polymerkonjugate wurden die Thioester-HPMA Copolymere PHNS-6 ($M_n = 15.7 \text{ kDa}$, PDI = 1.3, Beladung: 0.93 mmol/g,

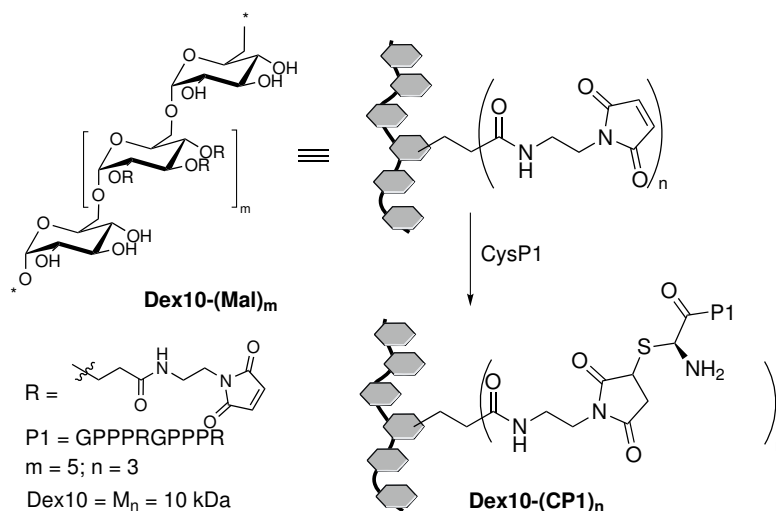


Abbildung 9.5.: Thiol-Maleimid Kupplung des cysteinylierten Peptids **CP1** an maleimid-funktionalisiertes Dextran; die Substituenten befinden sich hauptsächlich an Position 2.^[204,205]

16 Thioestergruppen) und PHNS-7 ($M_n = 13.3$ kDa, PDI = 1.1, Beladung: 0.87 mmol/g, 13 Thioester) verwendet. Die Umsetzung mit dem Peptid **CP1** erfolgte in einer NCL-Reaktion in Gegenwart von Thiophenol in einer Lösung aus Phosphatpuffer (pH 7.4) und Dioxan (Puffer/Dioxan 2:1). Die gewünschten Peptid-Polymerkonjugate PHN13-(CP1)₆ und PHN16-(CP1)₉ wurden in guten Ausbeuten (58 und 72 %) und moderaten Kupplungseffizienzen (56 und 46 %) erhalten (Abbildung 9.6).

9.3. Multivalenzeffekte in Abhängigkeit von der Polymerstruktur

Das Bindungsverhalten der in Abbildung 9.7 aufgelisteten Peptid-Polymerkonjugate mit den tWW-Domänen wurde experimentell in ITC-Messungen von Dr. O. Krylova (Arbeitskreis Dr. M. Dathe, FMP) untersucht und die K_D -Werte, Enthalpie- und Entropieänderungen sowie die Stöchiometrie N der Wechselwirkungspartner bei der Interaktion ermittelt.³ Die tWW-Domänen des Proteins FBP21 wurden dankend von M. Wiczorek (Arbeitskreis Prof. C. Freund, Freie Universität Berlin) erhalten. Darüber hinaus wurde das Bindungsverhalten für eine Systemkombination bestehend aus zwei Peptid-Polymerkonjugaten und drei tWW-Domänen in MD-Simulationen von A. Bujotzek (Arbeitskreis M. Weber, Freie Universität Berlin) modelliert.⁴

Aufgrund der unterschiedlichen verwendeten polymeren Trägersysteme differierten die multivalenten Konjugate in ihrer Struktur und Architektur. Dendritische Polymere

³siehe Methodenbeschreibung in Kapitel 11.5.3

⁴siehe Methodenbeschreibung in Kapitel 12.10.7

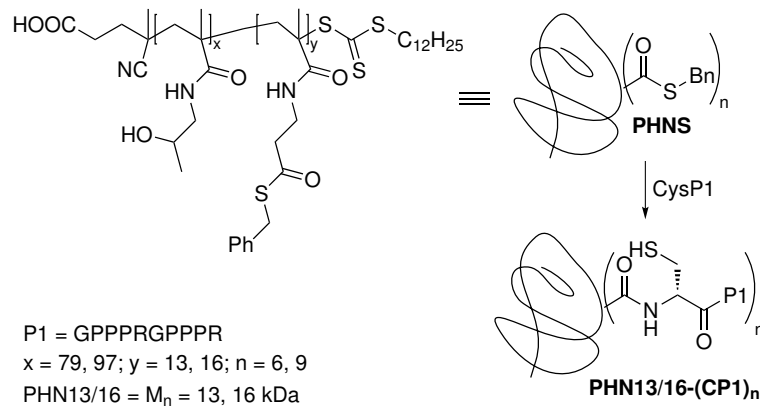


Abbildung 9.6.: NCL-Reaktion des CysP1 an PHNS.

wie das hPG zeichnen sich generell durch eine sphärische Struktur aus, die keine großen Entfernungen überspannen kann. Dextran- und HPMA-basierte Konjugate weisen dagegen mit einer Random Coil Konformation keine einheitliche Struktur auf (Abbildung 9.7).

Dementsprechend unterschieden sich die auf Dextran, hPG und poly(HPMA)-basierten polyvalenten Liganden grundsätzlich in

- ihrer Konformation abhängig vom verwendeten Polymer und
- der Beladungsdichte

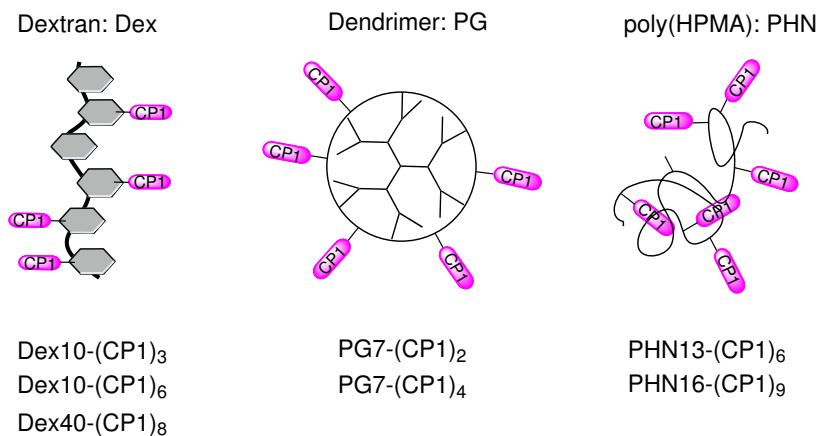


Abbildung 9.7.: Auflistung der untersuchten Peptid-Polymerkonjugate.

9.3.1. Bindungsaffinitäten der Ligand-Protein-Interaktionen

Monovalente Liganden. Im ersten Schritt wurden das literaturbekannte Peptid **P1** und die cysteinilyierte Form **CP1** kalorimetrisch untersucht. Im Vergleich zur Literatur unterschritt die Wärmeänderung bei der Wechselwirkung des Liganden **P1** mit den tWW-Domänen das Detektionslimit der ITC. Statt eines typischerweise sigmoiden Verlaufs wurde eine horizontal verlaufende Bindungskurve gemessen, die keine exakten Informationen über die thermodynamischen Parameter und die Stöchiometrie zuließ (Abbildung 9.8, A). Der K_D -Wert für das Literaturpeptid wurde daher mit >1 mM angegeben.

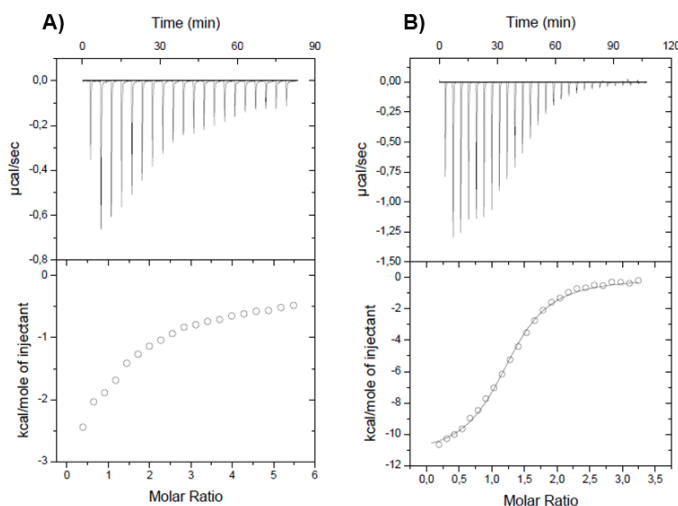


Abbildung 9.8.: ITC-Messung bei 8°C der Liganden A) **P1** ohne Kurvenanpassung aufgrund zu geringer Aktivität und B) Dex10-(CP1)₆, $N = 1.3$, $K_D = 7.4 \mu\text{M}$.

Die theoretischen Betrachtungen der Wechselwirkung des monovalenten Liganden mit den tWW-Domänen wurden mit Hilfe von MD-Simulationen angestellt. Eine Momentaufnahme der Simulation zeigte die Bindung des Liganden **P1** an eines der beiden Bindungszentren der tWW-Domänen und bestätigte damit den für diesen Liganden erwarteten monovalenten Bindungsmodus (Abbildung 9.9).

Im Gegensatz dazu zeigte das cysteinilyierte Peptid **CP1** eine unerwartet hohe Affinität mit einem K_D -Wert von $35 \mu\text{M}$ und eine, für einen monovalenten Liganden zu erwartende, Stöchiometrie von $N = 2$ (Tabelle 9.2, Eintrag 2). Die signifikante Affinitätssteigerung resultierte wahrscheinlich aus unspezifischen Wechselwirkungen des freien *N*-terminalen Cysteins mit dem Protein.⁵ Nach erfolgter Konjugation des cysteinilyierten **P1** an die entsprechenden Polymere lagen die Thiole entweder als Thioether maskiert vor oder waren stark abgeschirmt, so dass unspezifische Wechselwirkungen ausgeschlossen werden konnten.

⁵wurde in unveröffentlichten Experimenten aus der Arbeitsgruppe von Prof. C. Freund, FU Berlin bestätigt

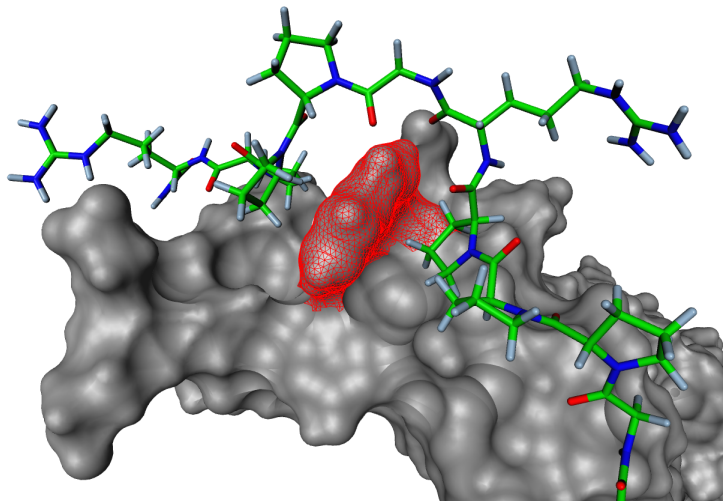


Abbildung 9.9.: Momentaufnahme aus einer MD-Simulation; **P1** ist an eine WW-Domäne des Proteins FBP21 gebunden (die zweite WW-Domäne ist im Hintergrund sichtbar); die Seitenketten Trp29/70 sind rot markiert; Wassermoleküle nicht angezeigt.

Affinitätssteigerung durch Multivalenz. Im Vergleich zum monovalenten Liganden **P1** wurden für die Interaktionen der polyvalenten Peptid-Polymerkonjugate mit den tWW-Domänen K_D -Werte bestimmt, die auf eine signifikante Zunahme der Bindungsaffinitäten schließen ließen. Unspezifische Interaktionen der polymeren Trägersysteme mit den tWW-Domänen konnten in ITC- Kontrollmessungen der unmodifizierten Polymere mit dem Protein FBP21 ausgeschlossen werden.

Die multivalente Präsentation des Liganden **P1** an die drei Polymere führte generell zu einer vielfachen Verstärkung der Ligand-Protein-Interaktion. Bezogen auf den für das Peptid **P1** literaturbekannten- K_D -Wert von 1 mM wurde für eines der niedriger affinen Konjugate PHN13-(CP1)₆ bereits eine 30-fach und für eines der höher affinen Konjugate Dex10-(CP1)₆ eine fast 140-fach höhere Affinität bestimmt.

Einfluss der polymeren Systeme auf die Affinität. Während für alle polyglycerin- und poly(HPMA)-basierten Konjugate (Tabelle 9.2, Einträge 6-10) und für zwei der dextranbasierten Konjugate (Tabelle 9.2, Einträge 3 und 5) K_D -Werte in der Größenordnung von 18 bis 34 μM bestimmt wurden, wurde für das Konjugat Dex10-(CP1)₆ mit einem K_D -Wert von 7.4 μM eine zusätzliche Steigerung der Bindungsaffinität beobachtet (Tabelle 9.2, Eintrag 4, Abbildung 9.8, B).

Ein Vergleich der drei dextranbasierten Konjugate zeigte, dass ein Zusammenhang zwischen der Bindungsaffinität und der Beladungsdichte besteht. Die hoch-affinen Interaktionen wurden ausschließlich für das Dextran-Konjugat mit einer Beladung von 10 % beobachtet (6 Peptide/62 WE \times 100 = 9.7%). Das gleich große aber mit lediglich 3 Peptiden ausgestattete Dextran-Konjugat Dex10-(CP1)₃ zeigte mit einer

Tabelle 9.2.: ITC-Messungen der Peptid-Polymerkonjugate.

Eintrag	Konjugate ^a	Anzahl Liganden (WE) ^c	Beladungs- dichte [%]	K_D ^d [μ M]	N^d
1	P1 ^b	–	–	>1000	–
2	CP1 ^b	–	–	35	1.8
3	Dex10-(CP1) ₃	3 (62)	5	25	1.7
4	Dex10-(CP1) ₆	6 (62)	10	7.4	1.3
5	Dex40-(CP1) ₈	8 (248)	3	17	1.3
6	PG7-(CP1) ₂	2 (97)	2	23	1.5
7	PG7-(CP1) ₃	3 (97)	3	18	2.3
8	PG7-(CP1) ₄	4 (97)	4	19	2.4
9	PHN13-(CP1) ₆	6 (92)	6.5	34	2.6
10	PHN16-(CP1) ₉	9 (108)	8	30	2.7

^a Zahl am Polymer gibt jeweilige Molmasse an

^b Literaturpeptid (Tabelle 9.1);^[197] CP1 = CysP1

^c Anzahl der Wiederholungseinheiten

^d ITC-Messungen bei 8 °C; K_D -Werte sind auf gleiche Peptidkonzentrationen bezogen; Messungen wurden als Duplikat mit zwei unterschiedlichen Proteinchargen durchgeführt

geringeren Beladungsdichte von 5 % eine signifikante Verschlechterung der Interaktion (K_D -Wert = 25 μ M). Eine vergleichbare Verschlechterung der K_D -Werte auf 17 μ M wurde für das größere Dextrankonjugat Dex40 (40 kDa) mit einer Beladungsdichte von 3 % beobachtet (Tabelle 9.2, Eintrag 3-5).

Die polyglycerinbasierten Konjugate waren mit zwei bis vier Peptiden pro hPG beladen und hatten damit eine zu den gering beladenen, niedrig-affinen Dextrankonjugaten Dex10-(CP1)₃ und Dex40-(CP1)₈ vergleichbare Beladungsdichte von 2 bis 4 %. Mit K_D -Werten von 18 bis 23 μ M zeigten sie außerdem vergleichbare Bindungsaffinitäten (Tabelle 9.2, Einträge 4, 6 bis 8).

Das poly(HPMA)-Konjugat PHN16-(CP1)₉ hatte mit 9 Peptiden eine im Vergleich zum hoch-affinen Dextrankonjugat vergleichbare Beladungsdichte von 8 %, zeigte aber mit einem K_D -Wert = 30 μ M eine deutlich geringere Bindungsaffinität. Mit abnehmender Peptidbeladungsdichte von 6.5 % verschlechterte sich der K_D -Wert auf K_D = 34 μ M (Tabelle 9.2, Einträge 4, 9 und 10). Im Vergleich zu den Polyglycerinkonjugaten wiesen die poly(HPMA)-Konjugate eine schlechtere Bindungsaffinität (\sim Faktor 2) trotz einer vergleichsweise hohen Peptidbeladungsdichte auf (poly(HPMA): 6.5 % bzw. PG: 4.1 %).

Im Hinblick auf die Steigerung der Bindungsaffinität hat sich ein Dextrankonjugat mit einer Ligandbeladung von etwa 10 % und einer Random Coil Struktur als am besten geeignetes Polymer zur Darstellung multivalenter Systeme erwiesen. Im Folgenden wurden die Auswirkungen der bei der Bindung an die tWW-Domänen auftretenden Konformationsänderungen auf die Entropieänderung bestimmt, um zu

untersuchen, worauf die erhöhte Affinitätssteigerung des Dextrankonjugats beruht.

Einfluss der Enthalpie- und Entropieänderungen. In Abbildung 9.10 sind die beim Bindungsprozess in ITC-Messungen ermittelten Enthalpie- und die daraus abgeleiteten Entropieänderungen gegenüber gestellt. Dabei wird ersichtlich, dass im Zuge der Interaktion aller Peptid-Polymerkonjugate mit den tWW-Domänen die Systeme in Summe Entropieverluste aufwiesen, die in positiven Werten für den Term $-T\Delta S$ resultierten. Der sich auf die Änderung der freien Energie negativ auswirkende

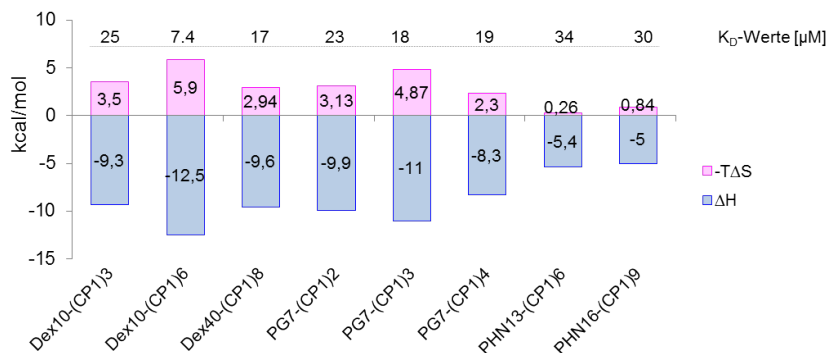


Abbildung 9.10.: Bei der Wechselwirkung polyvalenter Konjugate mit den tWW-Domänen mittels ITC-Messungen ermittelten Enthalpie- und Entropiebeiträge; $T = 8^\circ\text{C}$.

Entropieterm wurde allerdings durch den beim Bindungsprozess auftretenden Enthalpiegewinn aufgewogen. Die polymerbasierten Ligand-Protein-Interaktionen waren demnach enthalpiegetrieben, wobei der Entropieverlust umso größer war, je stärker die Bindungsaffinität und damit je größer die Enthalpieänderung war. Folglich ergab sich für das Dextrankonjugat mit dem besten K_D -Wert von $7.4\ \mu\text{M}$ der größte Entropieverlust von $5.9\ \text{kcal/mol}$, der durch eine entsprechend große Enthalpieänderung von $-12.5\ \text{kcal/mol}$ kompensiert wurde.

Die Komplexierungen der polymeren Liganden mit den tWW-Domänen wurden darüber hinaus in MD-Simulationen theoretisch betrachtet.⁶

Tabelle 9.3.: Abschätzungen zur konformativen Entropieänderung durch MD-Simulation.

	$-T\Delta S$ [kcal/mol]		
	Dextran	hPG	poly(HPMA)
tWW-Domänen	3.52	3.63	3.56
Polymer/Linker/P1	0.22	0.33	0.16
Σ	3.74	3.95	3.71

⁶siehe Methodenbeschreibung in Kapitel 12.10.7

Im Gegensatz zu den experimentell bestimmten Werten, konnten aus den Berechnungen der MD-Simulationen die einzelnen Beiträge der polymeren Trägersysteme und des Proteinlinkers zur Entropieänderung aufgeschlüsselt werden (Tabelle 9.3). Dabei zeigte der flexible Linker der tWW-Domänen einen für alle simulierten Polymerkonjugate vergleichbaren und größten Beitrag zur Entropieänderung. Einen deutlich geringeren Anteil am Entropieverlust hatten die polymeren Trägersysteme selbst inklusive Linker und angeknüpftem Peptid.

Fazit. Die Interaktionen von Peptid-Polymerkonjugaten mit tWW-Domänen führten im Vergleich zum monovalenten Liganden zu signifikanten Affinitätssteigerungen. Ein auffällig niedriger K_D -Wert von $7.4 \mu\text{M}$ wurde für ein Dextrankonjugat mit einer Peptidbeladungsdichte von 10 % bestimmt. Der Enthalpiegewinn kompensierte die mit zunehmender Bindungsaffinität steigende Entropieänderung, wobei das Protein den größten Anteil am Entropieverlust hatte.

9.3.2. Bindungsmodus der Ligand-Protein-Interaktionen

Im Folgenden wurde der Bindungsmodus der multivalenten Peptid-Polymerkonjugate an die tWW-Domänen durch Betrachtung der in ITC-Messungen bestimmten Stöchiometrien der beiden Interaktionspartner detaillierter untersucht.⁷

Bindungsmodus der Dextrane. Für die Dextrankonjugate Dex10-(CP1)₆ und Dex40-(CP1)₈ wurde eine Stöchiometrie von $N = 1.3$ bestimmt, die auf eine intramolekulare Wechselwirkung im Sinne von Multivalenz deutete (Tabelle 9.2, Eintrag 4, 5). Mit einer Stöchiometrie von $N = 1.7$ veränderte sich der Bindungsmodus des Konjugats Dex10-(CP1)₃ zunehmend zu einer intermolekularen Bindung hin. Die räumliche Orientierung der wenigen, pro Dextrankette gekoppelten, Peptide schien für eine intramolekulare Wechselwirkung ungünstig zu sein und führte daher zu einem Wechsel des Bindungsmodus für die Interaktion mit den tWW-Domänen.

Bindungsmodus der Polyglycerin- und HPMA-Konjugate. Mit einer sehr geringen Anzahl von Peptiden wurde für das Polyglycerinkonjugat PG-(CP1)₂ eine Stöchiometrie von $N = 1.5$ bestimmt, die auf anteilige intramolekulare Wechselwirkungen deutete. Eine Erhöhung der Beladungsdichte von zwei auf vier Prozent (PG7-(CP1)₄) führte zu einem vollständigen Wechsel des Bindungsmodus ($N = 2.4$) und zur Aggregation der Polymer-Protein-Komplexe mit fortschreitender Ligandzugabe. Die Abstände der Liganden auf der sphärischen Oberfläche der dendritischen Polymere konnten offensichtlich den Abstand zwischen den tWW-Domänen nicht überbrücken, so dass vorrangig intermolekulare Wechselwirkungen stattgefunden haben. Dieses Phänomen wurde für dreidimensionale Strukturen wie z. B. Dendrimere beschrieben, die abhängig von ihrer Größe intermolekulare Wechselwirkungen eingehen (Kapitel 2.1.2).^[29,30]

⁷ siehe Methodenbeschreibung in Kapitel 11.5.3

Poly(HPMA)-basierte Konjugate wiesen ebenfalls Stöchiometrien von $N > 2$ auf, die auf intermolekulare Wechselwirkungen deuteten. Die während der Titration auftretende Aggregation war allerdings im Vergleich zu den hPG-Konjugaten weniger stark ausgeprägt. Das vergleichbare Bindungsverhalten von poly(HPMA)- und polyglycerinbasierten Konjugaten deutet darauf hin, dass beide Konjugate ähnliche dreidimensionale Strukturen aufweisen.

Für das HPMA-basierte Konjugat ist in Abbildung 9.11 exemplarisch ein Polymer-Protein-Komplex dargestellt, welcher aus der MD-Simulation der Interaktion zweier Polymerketten mit drei tWW-Domänen resultierte. Die Simulation der Komplexbildung veranschaulicht die gleichzeitig stattfindenden inter- und intramolekularen Wechselwirkungen eines beispielhaften Peptid-HPMA Konjugats mit den tWW-Domänen.

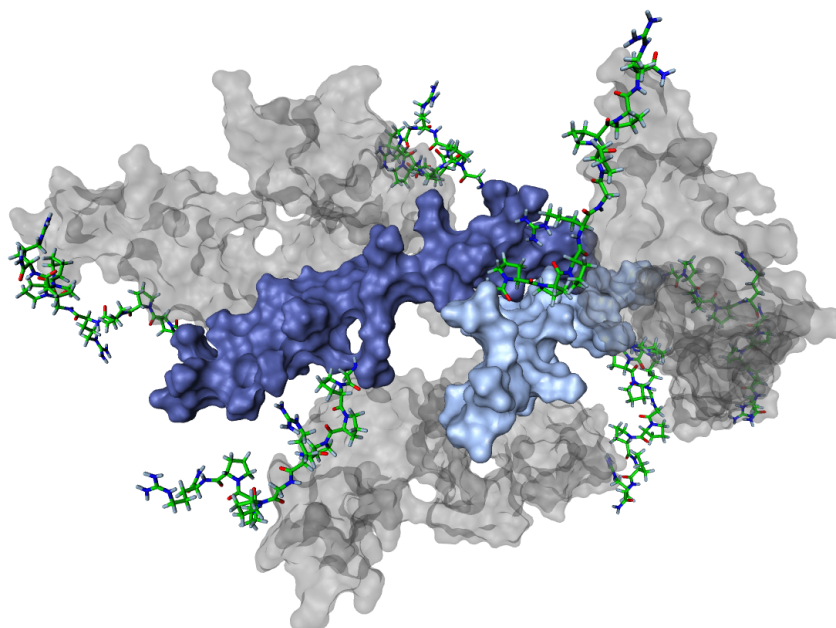


Abbildung 9.11.: Intra- und intermolekulare Wechselwirkungen poly(HPMA)-basierter Ligand-Polymerkonjugate im Komplex mit den tWW-Domänen.

Simulation des Aggregationsverhaltens. Das beobachtete Aggregationsverhalten der Polymer-Protein-Komplexe im Verlauf des fortschreitenden Bindungsprozesses wird zur Zeit in MD-Simulationen modelliert. Dazu werden die Abstände der Massezentren (centre of mass, COM) zweier modellierter Polymer-Protein-Komplexe im Verlauf einer MD-Simulationen berechnet und in Distanzplots grafisch dargestellt. In Anlehnung an die experimentellen Ergebnisse sollte sich die Distanz zwischen den COM der dextranbasierten Polymer-Protein-Komplexe im Verlauf der Simulation nicht verändern. Im Fall der poly(HPMA)- und polyglycerinbasierten Komplexe wird entsprechen des beobachteten Aggregationsverhaltens eine Annäherung der COM

erwartet.

Fazit. Beim Bindungsprozess der Peptid-Polymerkonjugate traten sowohl intra- als auch intermolekulare Interaktionen mit den tWW-Domänen auf. Das hoch-affine Dextranskonjugat zeigte dabei im Sinne eines Multivalenzeffektes ein vorrangig intramolekulares Bindungsverhalten, welches sich in Abhängigkeit von der Beladungsdichte zum intermolekularen Bindungsmodus hin verlagerte. Poly(HPMA)- und hPG-Konjugate wiesen hauptsächlich intermolekulare Wechselwirkungen auf, die in der Aggregation der Polymer-Protein-Komplexe resultierten. Trotz ähnlicher räumlicher Strukturen unterschieden sich die beiden Random Coil Systeme poly(HPMA) und Dextran in ihren Bindungsmodi in Bezug auf die Interaktion mit den tWW-Domänen.

9.4. Zusammenfassung

Die Konjugation kurzer monovalenter Peptide an die strukturell unterschiedlichen polymeren Trägersysteme poly(HPMA), hyperververzweigtes Polyglycerin und Dextran stellte einen flexiblen Zugang zu multivalenten PRS-Liganden dar. Interaktionen der mono- und multivalenten PRS-Liganden mit den tWW-Domänen des Proteins FBP21 wurden sowohl experimentell in ITC-Messungen als auch durch theoretische Betrachtungen in MD-Simulationen untersucht.

In ITC-Messungen ermittelte K_D -Werte haben gezeigt, dass die polyvalente Konjugation monovalenter PRS-Liganden an die drei Polymere zu einer signifikanten Steigerung der Bindungsaffinitäten bei der Interaktion mit tWW-Domänen führte. Die Bindungsprozesse aller polymerer Konjugate waren dabei enthalpiegetrieben. Multivalente Wechselwirkungen im Sinne einer intramolekularen Bindung wurden ausschließlich für das Dextranskonjugat Dex10-(CP1)₆ mit einer Peptidbeladungsdichte von 10% beobachtet. Der beim Bindungsvorgang des Dextranskonjugats an die tWW-Domäne eintretende große Entropieverlust wurde durch einen entsprechend hohen Enthalpiegewinn kompensiert und resultierte in K_D -Werten im niedrigen mikromolaren Bereich. Theoretische Betrachtungen haben gezeigt, dass ein Großteil der experimentell beobachteten Entropieänderungen während des Bindungsprozesses auf den Entropieverlust des die beiden Domänen verbindenden Linkers zurückzuführen sind.

Die unterschiedlichen thermodynamischen Eigenschaften der beiden Random Coil Systeme poly(HPMA) und Dextran deuteten darauf hin, dass sich die Konjugate trotz ähnlicher Strukturen in ihrem Bindungsverhalten signifikant unterscheiden müssen. Die experimentellen und theoretischen Betrachtungen ließen schlussfolgern, dass Polymere auf Basis von Dextran mit einer linearen Struktur und einem flexiblen Polymerrückgrat geeignete Systeme für die Interaktion mit tWW-Domänen darstellen.

10. Zusammenfassung

10.1. Entwicklung von Thioester-HPMA-Copolymeren

Im Fokus der vorliegenden Arbeit lag die Entwicklung von Thioester-HPMA-Copolymeren, die in NCL-Reaktionen mit entsprechend cysteinylierten Liganden beladen werden konnten und so einen schnellen und flexiblen Zugang zu diversen Peptid-Polymerkonjugaten lieferten.

Zur Darstellung thioesterfunktionalisierter HPMA-Copolymere wurde das thioesterfunktionalisierte Monomer NMA 4 in einer zweistufigen Reaktion ausgehend von der Thioveresterung des β -Alanins und einer sich anschließenden Methacrylierung mit Pentafluorphenylmethacrylat dargestellt. Nach erfolgter Optimierung der RAFT-vermittelten Copolymerisation der Monomere HPMA und NMA konnten in Gegenwart des RAFT-Reagenzes **12** und des Initiators ACPA diverse Copolymere mit unterschiedlichen Thioesteranteilen unter Kontrolle der Molmassen und Molmassenverteilung dargestellt werden (Abbildung 10.1). Die Möglichkeit, Parameter wie Größe und Thioesterbeladung zu variieren und die RAFT-bedingten Funktionalitäten an den Kettenenden *in situ* zu entfernen, machten diesen Syntheseweg zu einem eleganten Zugang zu maßgeschneiderten aktivierten Copolymeren auf Basis des biokompatiblen poly(HPMA).

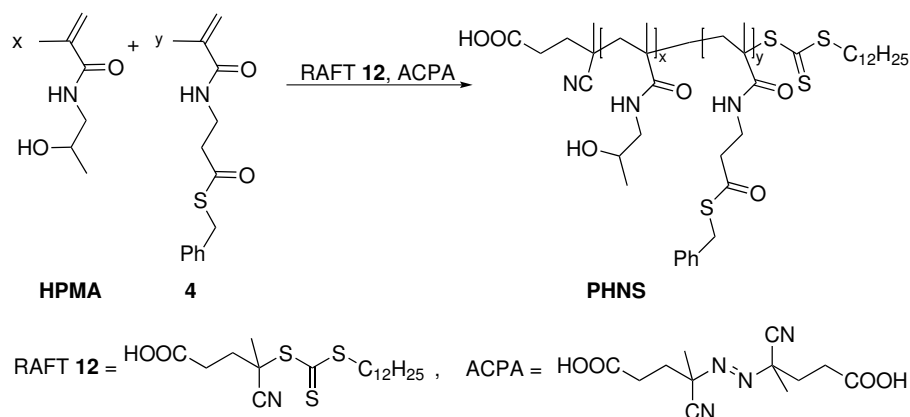


Abbildung 10.1.: RAFT-vermittelte Copolymerisation von HPMA und NMA 4.

Die Vielseitigkeit der HPMA-basierten Copolymere beispielsweise als Transportsystem für *in vitro* und *in vivo* Anwendungen oder als multivalente Liganden zur Modulation von Ligand-Protein-Interaktionen konnte im Rahmen der folgenden vier Projekte gezeigt werden.

10.2. Untersuchung der zellulären Aufnahme unterschiedlich geladener Peptid-HPMA-Konjugate

Zur Untersuchung der Aufnahmeeffizienz von Peptid-HPMA-Konjugaten in Abhängigkeit von ihrer Oberflächenladung wurden in NCL-Reaktionen *N*-cysteinylierter Dipeptide und *N*-cysteinylierten Fluoresceins mit den Thioester-HPMA-Copolymeren PHNS-1 und 2 multivalente Peptid-Polymerkonjugate dargestellt. Die Internalisierung der multivalenten Konjugate in HeLa-Zellen wurde in Bezug auf das Zetapotential mit HPMA-Konjugaten verglichen, die mit dem Zell-penetrierenden Peptid (CPP) Nonaarginin ausgestattet waren. Generell wurden ausschließlich positiv geladene Peptid-Polymerkonjugate in HeLa-Zellen internalisiert (Abbildung 10.2).

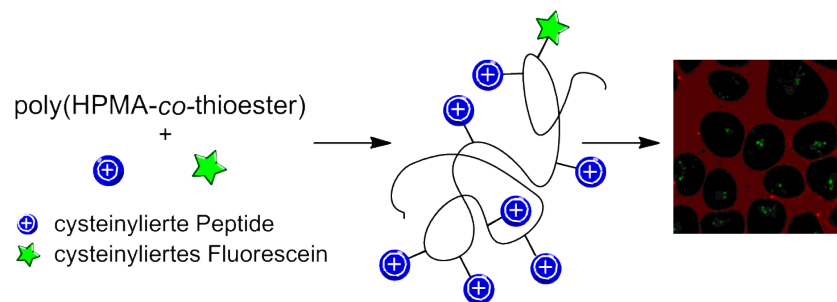


Abbildung 10.2.: Oberflächenladungsabhängige Internalisierungsstudien.

Das Zetapotential der positiv geladenen Peptid-Polymerkonjugate korrelierte allerdings nicht mit der Anzahl der potentiellen aufgrund der vorhandenen Guanidiniumgruppen generierten positiven Ladungen. Dieser Effekt war besonders ausgeprägt beim Vergleich des mit einzelnen Argininen ausgestatteten Konjugats PHN-CR-1 und des nonaargininbeladenen PHN-CR₉-1. Offensichtlich war nicht jede Guanidiniumgruppe protoniert und trug daher nicht zum Zetapotential bei.

Die Anwesenheit des CPPs Nonaarginin hat sich mit einem vergleichsweise geringen Zetapotential positiv auf die Internalisierung der Peptid-Polymerkonjugate ausgewirkt. Eine vergleichbar effiziente zelluläre Aufnahme zeigten Polymerkonjugate mit multivalent präsentierten Argininen, wenn sie sich durch ein großes positives Zetapotential auszeichneten wie z. B. das Konjugat PHN-CR-1.

Mit einer im Gegensatz zu Nonaargininkonjugaten exzellenten Biokompatibilität und effizienten zellulären Aufnahme, stellen argininbeladene HPMA-Konjugate eine Alternative zum toxischen Nonaarginin als CPP dar und könnten als effiziente Trägersysteme biologischer relevanter Substanzen für intrazelluläre Studien eingesetzt werden.

10.3. Projekt B: HPMA-gebundene MMP-11 Substrate zur Früherkennung von Pankreaskrebs

In einer Kooperation mit Dr. S. Meyer wurden fluoreszenzmarkierte Peptid-HPMA-Konjugate entwickelt, die in einem nichtinvasiven, bildgebenden Diagnoseverfahren zur Früherkennung von Pankreaskrebs verwendet wurden.

Für die Matrix-Metalloprotease MMP-11, die im Rahmen des EU-Projektes MolDiag-PaCa als Biomarker für Bauchspeicheldrüsenkrebs identifiziert wurde, wurden peptidische Substrate als FRET-Systeme konzipiert. Der Substratumsatz bei der Spaltung durch das Enzym MMP-11 lieferte ein Fluoreszenzsignal, welches bei Verwendung entsprechender NIR-Fluorophore für das nichtinvasive bildgebende Verfahren FRI genutzt werden konnte (Abbildung 10.3).

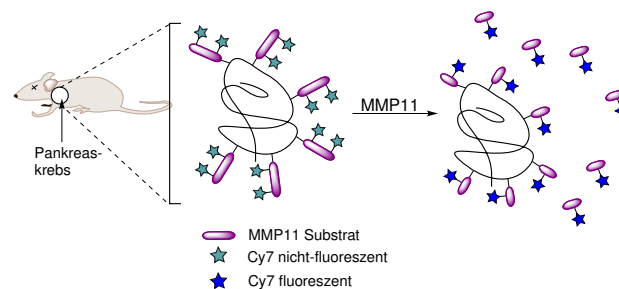


Abbildung 10.3.: Nichtinvasive molekulare Diagnostik.

Die Konjugation des biologisch aktivsten MMP-11 Substrates an thioesterfunktionalisiertes poly(HPMA) gewährleistete einerseits einen gezielten Transport der Konjugate zum Wirkort und andererseits den Schutz vor proteolytischem Abbau. Nach entsprechender Validierung in Enzymkinetik- und Zellassays wurden Experimente an MIA Paca-2 Xenograft Mäusen durchgeführt. Der EPR-Effekt führte zur Anreicherung der fluorophormarkierten Polymerkonjugate im Tumor der Mäuse, was in einem detektierbaren Fluoreszenzsignal resultierte (Abbildung 10.4).

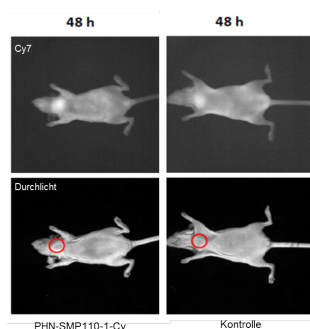


Abbildung 10.4.: Verteilung eines Peptid-HPMA-Konjugats in Xenograft Mäusen 48 h nach Injektion; roter Kreis: Tumor.

10.4. Projekt C: Photoinduzierte Freisetzung amyloidogener Peptide in Neuroblastomzellen

Im Rahmen einer gemeinsamen Kooperation mit Dr. E. Brandenburg wurden mit dem Ziel, amyloidbildende Modellpeptide intrazellulär zu studieren, die Peptid-HPMA-Konjugate mit einem photospaltbaren Linker ausgestattet. Das Polymer ermöglichte neben dem Transport und dem Schutz vor proteolytischem Abbau, eine photoinduzierte intrazelluläre Freisetzung des Peptids (Abbildung 10.5).

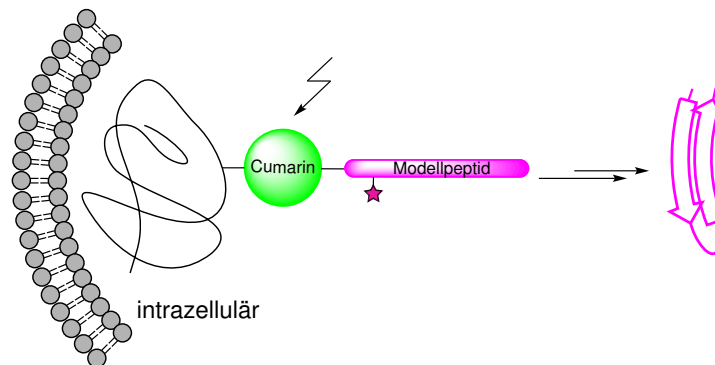


Abbildung 10.5.: UV-Licht-vermittelte Peptidfreisetzung aus einem *caged*-Peptid-HPMA-Konjugat.

Der photolysierbare Linker basierte auf einem Cumarinsystem, welches chemisch so modifiziert wurde, dass neben der Eigenschaft Moleküle zu schützen (*caging*) eine NCL-Reaktion zur Kupplung an ein Thioester-HPMA-Copolymer möglich war. In der geschützten (*caged*) Form wurde die Eigenschaft des VW18 Peptids, β -Faltblätter auszubilden und anschließend zu Amyloiden zu aggregieren, durch die kovalente Bindung an die photolabile Cumarin-Gruppe maskiert und nach photolytischer Spaltung wieder regeneriert.

Die an Neuroblastomzellen SH-SY5Y durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass ein *caged*-TAMRA-Modellpeptid und geringe Mengen des CPP Nonaarginin durch Konjugation an ein Thioester-HPMA-Copolymer effizient internalisiert wurden. Darüber hinaus resultierten die biokompatiblen Eigenschaften des polymeren Transportsystems in einer guten Verträglichkeit der Konjugate, die in unbestrahlter Form über mehrere Stunden intakt blieben. Die intrazelluläre Freisetzung des Modellpeptids wurde durch Bestrahlung mit UV-Licht ausgelöst und hatte apoptosetypische Veränderungen der Zellen zur Folge. In weiterführenden Studien muss festgestellt werden, inwieweit tatsächlich Amyloidbildung für die Cytotoxizität des Modellpeptids verantwortlich war.

In Kombination mit einem Cumarinderivat als photolabilen Linker zwischen Polymer und einem Modellpeptid hat sich poly(HPMA) als praktisches Transportsystem erwiesen, mit dem die Freisetzung eines biologisch relevanten Liganden kontrolliert werden kann.

10.5. Projekt D: Untersuchung der Wechselwirkung multivalent-präsentierter PRS-Liganden mit Tandem WW-Domänen in Abhängigkeit von der Struktur des polymeren Trägers

Interaktionen der mono- und multivalenten PRS-Liganden mit Tandem WW-Domänen (tWW-Domänen) des Proteins FBP21 wurden sowohl experimentell in ITC-Messungen (Dr. O. Krylova) als auch durch theoretische Betrachtungen in MD-Simulationen (A. Bujotzek) in Abhängigkeit von der Struktur des verwendeten polymeren Trägersystems untersucht (Abbildung 10.6). Dabei wurden die Polymere Dextran, hyperverzweigtes Polyglycerin und poly(HPMA) als biokompatible und auf dem Gebiet der Polymertherapeutika bekannte Trägersysteme verwendet.

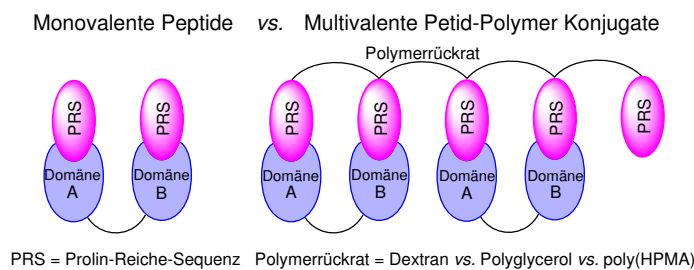


Abbildung 10.6.: Multivalente Interaktionen.

Die polyvalente Konjugation monovalenter prolinreicher Liganden an die Polymere führte zu einer signifikanten Steigerung der Bindungsaffinitäten bei der Interaktion mit tWW-Domänen, wobei die Bindungsprozesse aller polymerer Konjugate enthalpiegetrieben waren. Der beim Bindungsvorgang der Konjugate an die tWW-Domäne eintretende große Entropieverlust wurde durch einen entsprechend hohen Enthalpiegewinn kompensiert und resultierte in guten bis sehr guten K_D -Werten. Theoretische Betrachtungen haben gezeigt, dass ein Großteil der experimentell beobachteten Entropieänderungen während des Bindungsprozesses auf den Entropieverlust des die beiden Domänen verbindenden Linkers zurückzuführen sind. Die besten Bindungsaffinitäten bei der Interaktion mit tWW-Domänen wurden mit einem Dextrankonjugat erreicht, welches eine Peptidbeladung von 10 % aufwies.

Beim Bindungsprozess der Peptid-Polymerkonjugate traten sowohl intra- als auch intermolekulare Interaktionen mit den tWW-Domänen auf, wobei das hoch-affine Dextrankonjugat im Sinne eines Multivalenzeffektes ein vorrangig intramolekulares Bindungsverhalten zeigte. Poly(HPMA)- und hPG-Konjugate wiesen dagegen hauptsächlich intermolekulare Wechselwirkungen auf, die schließlich in der Aggregation der Polymer-Protein-Komplexe resultierten. Im Hinblick auf die Interaktion mit tWW-Domänen des Proteins FBP21 zeigten die dextranbasierten Konjugate signifikante Affinitätssteigerungen, ohne zu aggregieren und erwiesen sich daher als am besten geeignetes Trägersystem zur Darstellung multivalenter PRS-Liganden.

Teil III.

Experimenteller Teil

11. Allgemein

Alle aufgeführten wasserempfindlichen Reaktionen wurden in ausgeheizten Glasgeräten unter einem leichten Stickstoff-Überdruck und alle Polymerisationen in Schlenkrohren der Firma *Glasgerätebau Ochs Laborfachhandel e.K.* durchgeführt. Käuflich erhältliche Produkte wurden wenn nicht weiter angegeben ohne weitere Reinigung eingesetzt. 2,2'-Azobis(isobutyronitril) (AIBN) (97 % *Sigma-Aldrich*) wurde vor Gebrauch aus Methanol umkristallisiert. Alle verwendeten trockenen Lösungsmittel wurden von der Firma *Aldrich* bezogen (über Molekularsieb, $\text{H}_2\text{O} \leq 0,0005 \%$). Das für die chromatographischen Systeme verwendete Acetonitril wurde in HPLC Qualität von der Firma *Fluka* bezogen und das dafür benötigte Wasser wurde als Reinstwasser einem Milli-Q System der Firma *Merck Millipore* entnommen. Dioxan der Firma *Aldrich* und war von spektrophotometrischer Qualität. Vor jeder Polymerisation wurde mit einem Merckoquant[®] Peroxid-Test der Firma Merck sicher gestellt, dass der Peroxidgehalt kleiner 1 mg/L ist. Für die Dialyse wurden Spectra/Por Membranen (MWCO 3.500, 1.000, 100-500 Da) der Firma *Spectrum Laboratories, Inc.* verwendet.

11.1. Verwendete Methoden und Geräte

Schmelzpunkte

Die Bestimmung der Schmelzpunkte erfolgte mit Hilfe des Modells B-545 der Firma *Büchi*. Die angegebenen Werte sind nicht korrigiert.

Elementaranalyse

Elementaranalysen wurden mit einem varioEL der Elementar Analysensysteme GmbH von Frau Vasak an der FU Berlin durchgeführt.

Gefriertrockner

Das Gefriertrocknen aus Wasser und Wasser/Acetonitril Gemischen erfolgte an einem ALPHA 2-4 LD plus der Firma *Christ*.

GC-Aminosäureanalyse

Die Beladung der Polymere mit Peptiden wurde von der Firma *Genaxxon* durch Aminosäuresequenzierung und anschließender gaschromatographischer Analyse bestimmt.

11.2. Spektroskopische Methoden

Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)

Die Spektren wurden mit einem AVANCETM Gerät der Firma *Bruker* mit einer Feldstärke von 7,05 T aufgenommen (¹H-NMR 300 MHz; ¹³C-NMR 75 MHz). Die chemischen Verschiebungen sind in Einheiten der δ -Skala in ppm angegeben. In ¹H-Spektren diente Tetramethylsilan ($\delta = 0.00$) oder das Restresonanzsignal der deuterierten Lösungsmittel (DMSO-d₆: $\delta = 2.50$ ppm, CD₃OD: $\delta = 3.31$ ppm, D₂O: $\delta = 4.79$ ppm) als interner Standard. Die chemische Verschiebung in ¹³C-Spektren wurde intern auf die Restresonanzsignale der deuterierten Lösungsmittel kalibriert (CDCl₃: $\delta = 77.00$ ppm, DMSO-d₆: $\delta = 39.52$ ppm, CD₃OD: $\delta = 49.00$ ppm). Bei der Aufnahme von ³¹P-Spektren wurde 85 %-ige Phosphorsäure ($\delta = 0.00$ ppm) und im Fall von ¹⁹F-Spektren Trifluoressigsäure ($\delta = -76.55$ ppm) verwendet.

Zur Kennzeichnung der Multiplizität der Signale wurden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), brs (breites Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), qnt (Quintett), spt (Septett), m (Multipllett). Die Kopplungskonstanten sind in Hertz (Hz) angegeben.

Alle deuterierten Lösungsmittel wurden von *Deutero* oder *Euriso-top* bezogen. Die Prozessierung und Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm TopSpin der Firma *Bruker*.

UV-Vis-Spektroskopie

UV-Spektren wurden mit dem Modell V-550 der Firma *Jasco* aufgenommen.

Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden am Gerät FP-6500 der Firma *Jasco* in 4 × 4 mm Fluoreszenzküvetten aufgenommen.

11.3. Chromatographische Methoden

Analytische Flüssigchromatographie mit Massenspektrometer-Kopplung

- **LC-ToF:** Flüssigchromatographie-System der 1200 Serie der Firma *Agilent Technologies* ausgestattet mit einem DAD-UV-Detektor und den Säulen Zorbax Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT 50 (1.8 μ m, 4.6 × 50 mm) der Firma *Agilent Technologies* und Jupiter-C18 (3 μ m, 2 × 150 mm) der Firma *Phenomenex*[®] und gekoppelt mit einem Time of Flight Massenspektrometer zur Bestimmung hochauflösender Massen. Die Ionisation erfolgte durch Electron-Spray-Ionisation (ESI). Als Eluent dienten Wasser-Acetonitril (ACN) Mischungen mit 0.1 % Ameisensäure. Wenn nicht anders angegeben wurden alle Messungen bei Verwendung der XDB-C18 Säule mit einem Gradienten von 5-99 % ACN in 4.5 min bei positiver Elektrospray-Ionisation durchgeführt. Bezogen auf die Jupiter-Säule wurde eine Wasser-ACN Mischung mit 0.05 % Trifluoressigsäure verwendet und mit einem Gradienten von 20-60 % ACN in 22 min im positiven ESI-Modus

gemessen.

- **LC-ESI:** Flüssigchromatographie-System der 1200 Serie der Firma *Agilent Technologies* ausgestattet mit DAD-UV-Detektor und einer EC 30/2 Nucleodur 100-3 C18-ec Säule der Firma *Macherey-Nagel GmbH & Co. KG* und gekoppelt mit einem Single-Quadrupol-Massenspektrometer.
- **LC-Q:** Flüssigchromatographie-System der Firma *Thermo Finnigan* ausgestattet mit einem PDA-UV-Detektor und den Säulen EC 30/2 Nucleodur 100-3 C18-ec Säule (1.8 μm , 2 \times 30 mm) der Firma *Macherey-Nagel GmbH & Co. KG* und EC 50/2 Nucleodur Sphinx RP (3 μm , 4.6 \times 50 mm) gekoppelt an ein Ionenfalle-Massenspektrometer. Wenn nicht anders angegeben wurden alle Läufe mit einem Wasser-ACN Gemisch mit 0.1 % Ameisensäure und mit einem Gradienten von 5-99 % ACN in 8 min mit einer positiven Elektrospray-Ionisation durchgeführt.

Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Analyse der Molmassenverteilung und der sich daraus ergebenden mittleren Molmassen M_n , M_w und die Polydispersität PDI erfolgte am SECurity GPC-System der Firma *Polymer Standard Service (PSS)* aufgebaut aus Modulen der 1200 Serie der Firma *Agilent Technologies* (Pumpe, UV-Detektor, RI-Detektor).

Viskositätsdetektor:	ETA-2010 der Firma <i>WGE Dr. Bures GmbH & Co. KG</i>
Säule:	Suprema (10 μm , 1000 Å) der Firma <i>PSS</i>
Entgaser:	Firma <i>PSS</i>
Interface:	Universal Data Center UDC 810 der Firma <i>PSS</i>
Säulenofen:	Techlab K7 der Firma <i>PSS</i>
Software:	WinGPC Unity Build 5403 der Firma <i>PSS</i>

Dünnschichtchromatographie (DC)

Verwendet wurden DC-Folien der Firma *Merck* des Typs Kieselgel 60 F254. Es werden R_f - Werte (Verhältnis der Laufröhre zur Lauffront) angegeben. Für die verwendeten Lösungsmittel gelten folgende Abkürzungen: E (Diethylether), EE (Essigester), DCM (Dichlormethan), MeOH (Methanol). Neben der UV-Detektion dienten ein Cer-Molybdän-Reagenz (Mostain-Lösung) (100 g $\text{Ce(IV)(SO}_4)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 100 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$), 115 ml konz. H_2SO_4 , 1885 ml H_2O , eine Vanillin-Schwefelsäure-Lösung (0.5 g Vanillin, 5 ml konz. Schwefelsäure, 10 ml konz. Essigsäure, 90 ml Methanol) und eine 1%-ige wässrige Kaliumpermanganat-Lösung als Anfärbe-reagenzien.

Säulenchromatographie

Zur chromatographischen Reinigung bei erhöhtem Druck (Flashchromatographie) wurde Kieselgel der Firma *Merck* (Korngöße 0.032-0.063 mm) verwendet.

Präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Aufreinigungen wurden am HPLC System der Serie 1100 der Firma *Agilent Technologies* mit Hilfe der Umkehrphasen-Säulen VP 250/21 Nucleodur 100-7 (RP 18; 10 µm; 250 × 20 mm) und VP 250/10 Nucleodur Sphinx (RP 18; 5 µm;) der Firma *Macherey-Nagel GmbH & Co. KG* durchgeführt.

11.4. Reinigung von Polymeren

Gelfiltration

Aufreinigung durch Größenausschlusschromatographie wurde mit PD-10 Säulen der Firma *GE Healthcare Life Sciences* durchgeführt, die mit Sephadex™ G-25 Säulenmaterial gepackt sind.

Dialyse

Es wurden Dialysemembranen Spectra/Por® der Firma *Carl Roth* mit den jeweils angegebenen MWCO verwendet. Außerdem wurden Amicon-Ultra Systeme der Firma *Merck Millipore* zur Reinigung und zum Aufkonzentrieren verwendet. Dazu wurde die Probenlösung in ein Falcontube mit eingesetzter Membran mit einem MWCO von 3500 Da überführt und bei einer Umdrehungszahl von 4000 rpm zentrifugiert.

11.5. Biophysikalische Methoden

11.5.1. Zetapotential

Die elektrostatische Ladung von Partikeln, typischerweise als Oberflächenpotential bezeichnet, wird wie bei der Elektrophorese über die Geschwindigkeit bestimmt, mit der sich geladene Teilchen in einem elektrischen Feld zur entgegengesetzt geladenen Elektrode bewegen. Das sich daraus ergebende Zetapotential entspricht allerdings genau genommen nicht direkt dem Oberflächenpotential. An der Oberfläche der geladenen Teilchen lagern sich Gegenionen fest gebunden in der sogenannten Helmholtz-Doppelschicht an, was wiederum ein elektrokinetisches Potential zwischen der Teilchenoberfläche und einem beliebigen Punkt in der direkten Umgebung erzeugt. Diese locker angelagerten Ionen erzeugen eine diffuse Schicht, so dass das Partikel von außen betrachtet elektrisch neutral erscheint. Das Potential in direkter Nähe der Oberfläche des geladenen Teilchens fällt in der Helmholtz-Doppelschicht sehr schnell und linear ab, wobei die Abnahme in der diffusen Schicht immer kleiner wird. Wird ein elektrisches Feld angelegt, wird bei der Bewegung des Teilchens ein Teil der lockeren Schicht infolge von Reibung abgeschert und das Teilchen besitzt wieder ein Potential. Die Schergrenze ist der Punkt, an dem sich die Helmholtz- und die diffuse Schicht treffen. Das an dieser Schergrenze gemessene Potential ist ein Teil der absoluten Oberflächenladung des Partikels und wird als Zetapotential bezeichnet (Abbildung 11.1). Das Zetapotential spiegelt die realistische Situation geladener Teilchen

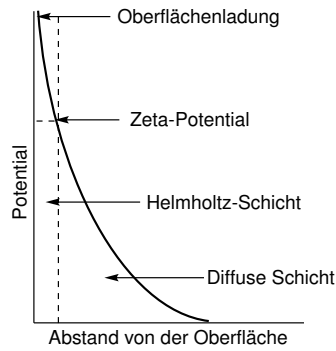


Abbildung 11.1.: Oberflächenpotential *vs.* Zetapotential.

in Lösung wider und ist bei gleichem Medium eine relative Messgröße für die Ladung eines Teilchens. Die Größe der Ladung bestimmt die Geschwindigkeit der Teilchen und ist ein Maß für das Zetapotential.^[142] Der mathematische Zusammenhang ergibt sich aus:

$$U_e = \frac{2\epsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (11.1)$$

wobei U_e die elektroporetische Mobilität, ϵ die Dielektrizitätskonstante, ζ das Zeta-Potential, $f(ka)$ die Henry-Funktion (Smulochowski-Näherung) und η die dynamische Viskosität der Flüssigkeit darstellt.

11.5.2. Cirkulardichroismus (CD)

Die CD-Spektroskopie ist eine Methode, die auf der unterschiedlich starken Absorption zirkular polarisierten Lichts der beiden Enantiomere optisch aktiver Moleküle beruht. Das CD-Spektrum ergibt sich aus der Absorptionsdifferenz, die für verschiedene Wellenlängen gemessen wurden. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie kann die Struktur optisch aktiver Substanzen aufgeklärt werden, so dass diese Methode in der Biochemie dazu benutzt wird, die Sekundärstruktur von Peptiden und Proteinen zu bestimmen.^[159] Dazu wird ein Spektrum im fernen UV-Bereich aufgenommen, in dem insbesondere die Peptidbedingungen absorbieren. Das CD-Spektrum einer α -Helix zeichnet sich durch zwei ausgeprägte negative CD-Banden bei 208 und 222 nm und eine positive bei 192 nm aus. Im Vergleich dazu weist eine zufällig gefaltete Proteinstruktur (random coils) eine negative CD-Bande mit einem Minimum bei 190 nm auf und eine β -Faltblattstruktur besitzt eine negative CD-Bande bei 218 nm.^[159]

Die Spektren geben die molare Elliptizität pro Aminosäurerest ($[\Theta]$) als Funktion der Wellenlänge wieder (Gleichung 11.2).

$$[\Theta] = \frac{\Theta_{\text{exp}}}{10000 \cdot l \cdot c \cdot n} \quad (11.2)$$

mit l = Länge der Küvette in cm, c = Konzentration in mol/l und n = Anzahl der Peptidbindungen.

11.5.3. Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

ITC-Messungen zur Bestimmung der thermodynamischen Parameter von Ligand-Protein-Interaktionen wurden am isothermen Titrationskalorimeter VP-ITC MicroCal der Firma *GE Healthcare* bei 8°C durchgeführt. Die ITC ist eine biophysikalische Methode zur Bestimmung thermodynamischer Parameter bei typischerweise biochemischen Wechselwirkungsprozessen.^[206,207] Bei einem Bindungsvorgang eines Liganden an ein Protein wird die dabei freigesetzte (exotherme Reaktion) oder aus der Umgebung aufgenommene Wärme (endotherme Reaktion) gemessen. Der Aufbau einer ITC ist in Abbildung 11.2 dargestellt. Ein isothermes Kalorimeter besteht aus zwei adiabatischen Zellen, einer mit Puffer oder Wasser gefüllten Referenz- und einer mit einer Lösung eines Interaktionspartners (Protein) gefüllten Probenzelle. Der zweite Interaktionspartner (Peptid-Polymerkonjugat) befindet sich in der Injektionspritze und wird schrittweise in definierten Volumina und Zeitpunkten injiziert. Die durch die Bindungsvorgänge hervorgerufenen Wärmeänderungen in der Probenzelle werden gemessen und so reguliert, dass die Temperatur der Probe identisch zur Referenzzelle ist. Gemessen wird die zeitabhängige Zufuhr der Energie, die notwendig ist um die Temperaturbalance aufrechtzuerhalten. Die bei jeder Injektion gemessene Energiere-

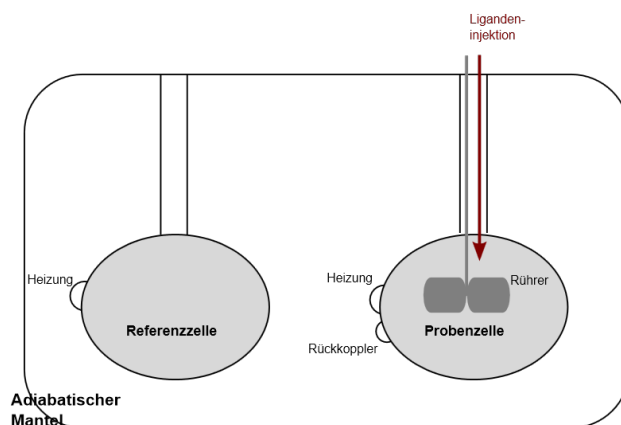


Abbildung 11.2.: Schematische Darstellung einer ITC-Anlage.¹

gulierungen werden als Peaks (Spitzen) gegen das Verhältnis der Konzentrationen der beiden Interaktionspartner aufgetragen. Die freiwerdende Energie pro Injektion wird durch Integration der Peaks bestimmt und als Meßpunkte dargestellt.

Die Kurvenanpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ergibt eine theoretische Kurve, deren Anstieg die Assoziationskonstante K_A und der Wendepunkt

¹Urheber der Grafik ist S. Lehe

der Kurve das Verhältnis des Interaktionspartners A zum Partner B, die Stöchiometrie N bestimmt. Der maximale Abstand zur x-Achse ergibt schließlich die Enthalpieänderung ΔH . Aus diesen Werten können die Entropie ΔS und die freie Energie ΔG berechnet werden (Gleichung 11.3).

$$-RT \cdot \ln K_A = \Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (11.3)$$

Die Dissoziationskonstante K_D ergibt sich aus der reziproken Assoziationskonstante K_A .

$$K_D = \frac{1}{K_A} \quad (11.4)$$

11.6. Zellbiologische Methoden

11.6.1. Allgemeine Verfahrensweisen zur Zellkultivierung

Die Zellen mit einer Zelldichte von ca. 1×10^6 wurden in fetalem Kälberserum mit 10 % DMSO durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Zur Weiterkultivierung wurden tiefgefrorene Zellen bei 37°C aufgetaut, im jeweiligen Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen überführt (25 bzw. 75 cm²). Das Medium wurde nach 24 Stunden ausgetauscht und die Kultivierung der Zelllinie entsprechend fortgesetzt. Die Zellen wurden bei 80 %-iger Konfluenz passagiert (Entfernung des Mediums, Waschen mit PBS, Trypsinierung mit Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min, Resuspension in Medium). Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in gewünschter Dichte ausgesät. Für zellbiologische Experimente wurden die Zellen nach dem Auftauen mindestens drei Mal passagiert und nicht länger als bis zur Passage 25 verwendet.

Beschichtung von Glasdeckgläschen

Die für mikroskopische Untersuchungen benötigten Glasdeckgläschen (Durchmesser 30 mm) wurden mit poly-L-Lysin beschichtet. Dazu wurden die Deckgläschen mit 1 ml der Beschichtungslösung für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die überschüssige Lösung abgenommen, die Deckgläschen wurden unter der Sterilbank getrocknet und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

11.6.2. Verwendete Zelllinien

HeLa

Zervixkarzinom Epithelzellen (HeLa-Zellen) wurden in Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA), welches 10 % fetales Kälberserum und 1 % Antibiotika (Penicillin/Streptomycin, 10.000 IE/10 mg/ml) enthält, bei 37°C in einem Inkubator mit 5 % CO₂ kultiviert.

SH-SY5Y

Humane neuroblastom Zellen wurden in DMEM, welches 20 % fetales Kälberserum, 1% L-Glutamin und 1 % Antibiotika (Penicillin/Streptomycin, 10.000 IE/10 mg/ml) enthält, bei 37°C in einem Inkubator mit 5 % CO₂ kultiviert.

11.6.3. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)

Mikroskopieaufnahmen wurden in der Mikroskopfacility am FMP (B. Wiesner und J. Eichhorst) am LSM 510 der Firma *Carl Zeiss* ausgestattet mit einem 100×1.3 Objektiv (Plan-Neofluar® *Carl Zeiss*) durchgeführt. Fluorescein und Trypanblau-Fluoreszenzen wurden mit einem 200 mW Ar-Laser (488 nm) und einem 15 mW He-Ne Laser für die Anregung und einem BP505-530 und LP560 Bandfilter für die Emission gemessen.

Rhodamin-markierte Proben wurden mit einem 15 mW Helium-Neon-Laser (543 nm) angeregt und die Fluoreszenz wurde mit einem LP560 Emissionsfilter detektiert. Die Integrität der Zellmembran wurde durch Zugabe eines Tropfens Trypanblau (0,5 % w/v) gezeigt. Trypanblau kann als anionischer Farbstoff nicht in das Zellinnere von lebenden Zellen gelangen, sondern es bindet stattdessen extrazellulär an die Membranproteine, wodurch sich seine Fluoreszenzaktivität erhöht. Darüber hinaus wurde an einem LSM 780 Mikroskop der Firma *Carl Zeiss* ausgestattet mit einem 40×1.3 Öl-Objektiv. Die Anregung erfolgte mit einem DPSS 561-10 (Diode pumped solid state laser) mit 1% Laserintensität. Die Emission wurde mit einem Bandpassfilter gemessen (BP 563 - 699).

11.6.4. Durchflusszytometrie (FACS)

Die geschützte Handelsmarke FACS² eines Geräteherstellers ist eine Methode, mit der die Eigenschaften von Zellen anhand ihrer Form, Struktur und/oder Fluoreszenzfärbung untersucht werden.^[208] Der schematische Aufbau eines Durchflusszytometers ist in Abbildung 11.3 dargestellt.³

Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass Zellen beim passieren eines Lichtstrahls das Licht streuen. Das erzeugte Streulicht wird detektiert, wobei das Maß des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts Aussagen über Granularität und die Größe der Zellen erlaubt. Gleichzeitig können Fluoreszenzsignale gemessen werden, so dass die Sortierung der Zellen zusätzlich anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften erfolgen kann. Typischerweise werden Fluoreszenzmessungen am FACS für Experimente genutzt, in denen DNA-Färbungen mit DAPI und fluoreszenzmarkierte Antikörper eingesetzt werden.

²fluorescence activated cell sorting

³<http://de.wikipedia.org/wiki/Durchflusszytometrie>; Urheber der Abbildung ist FabianK; Lizenzvertrag: <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/legalcode>

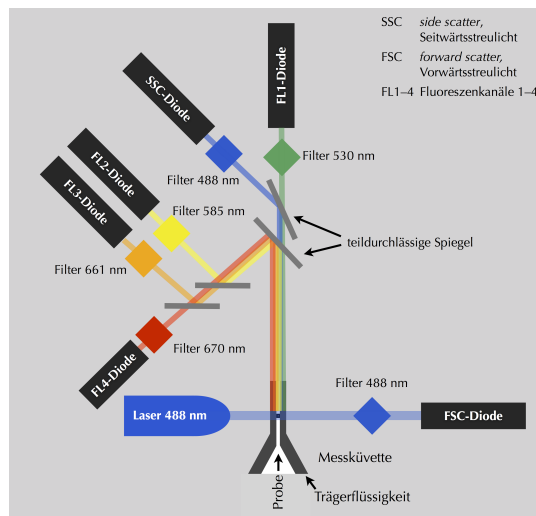


Abbildung 11.3.: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers.³

12. Synthesevorschriften

12.1. Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

12.1.1. AAV 1 - Copolymerisation

Alle Polymerisationen wurden in einem Schlenkrohr ausgestattet mit einem Rührfisch durchgeführt. Die Monomere, der Radikalstarter und gegebenenfalls ein Kettenübertragungsreagenz wurden in dem entsprechenden Lösungsmittel gelöst und in 3-5 Freeze-Pump-Thaw-Zyklen entgast. Die Polymerisation wurde durch Erwärmen in einem Ölbad (50 oder 70 °C) initiiert und nach der gewünschten Reaktionszeit durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt. Das Polymer wurde in Aceton gefällt, zentrifugiert und mehrmals mit Diethylether gewaschen. Der erhaltene Feststoff wurde für 24 h am Hochvakuum getrocknet.

Zur Bestimmung des Polymerisationsumsatzes wurden die Polymerisationen gegebenenfalls in Gegenwart des internen Standards Naphthalen durchgeführt. Vor der Fällung des Copolymers wurden Proben der Polymerisationslösung mittels LC-ToF analysiert, wobei zur Umsatzbestimmung die Peakflächen der detektierten UV-Peaks der Monomere und des Naphthalens zum Start- und Endzeitpunkt ins Verhältnis gesetzt wurden. Vor der Molmassenbestimmung mittels GPC-Analyse wurden Testmengen an zu untersuchendem Thioester-HPMA-Copolymer mit LiOH (10 Äq.) in Methanol (10 mg/ml) hydrolysiert. Die Lösung wurde anschließend über Gelfiltration (Pd 10, G 25) aufgereinigt, über einen H⁺-Ionenaustauscher Amberlite IR-120 filtriert und lyophilisiert.

12.1.2. AAV 2 - Peptidsynthese

Alle Peptide wurden mit Fmoc-Standardfestphasenpeptidsynthese in Polypropylen-spritzen dargestellt, die mit entsprechenden Polyethylenfritten und -kappen ausgestattet waren. Das Rinkamid-Harz (260 mg, 0.161 mmol, 1.0 Äq.) wurde in DCM gequollen und durch Zugabe einer Piperidin-Lösung (20 % Piperidin in DMF) Fmoc-entschützt (1 × 1 min, 2 × 10 min). Anschließend wurde die Piperidin-Lösung entfernt und das Harz mit DMF und DCM gewaschen. Für die Aminosäurekupplung wurde zu einer Lösung der Fmoc-geschützten Aminosäure (0.806 mmol, 5.0 Äq.) in DMF 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) (123 mg, 0.806 mmol, 5.0 Äq.) und Diisopropylcarbodiimid (DIC) (125 µl, 0.806 mmol, 5.0 Äq.) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf das Harz gegeben und die Mischung wurde für 3 h geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung entfernt und das Harz mit DMF und DCM gewaschen. Die Vollständigkeit der Kupplung wurde mit dem Kaiser-Test überprüft. Vor dem nächsten

Kupplungsschritt wurde mit einer Piperidin-Lösung (20 % Piperidin in DMF) die Fmoc-Schutzgruppe entfernt (1 × 1 min, 2 × 10 min). Nach dem Kupplungs- und Fmoc-Entschützungs-schritt der letzten Aminosäure wurde das Harz mit einer Abspaltungslösung (TFA/TIS/H₂O/EDT 94:1:2.5:2.5) versetzt, für 3 h geschüttelt und das abgespaltene Peptid anschließend in kalten Diethylether überführt. Das ausgefällte Peptid wurde mit Ether gewaschen und nach Bedarf mit präparativer HPLC aufgereinigt.

Kaiser-Test

Eine Testmenge an Harz wurde zu gleichen Teilen mit Kaliumcyanid in einer wässrigen Pyridin-Lösung und Ninhydrin in Ethanol versetzt und anschließend auf 100 °C erwärmt. Bei Anwesenheit von freien Aminogruppen aufgrund einer unvollständigen Peptidkupplung färbte sich die Lösung tief violett. In diesem Fall musste der Kupplungsschritt wiederholt werden. Eine vollständige Peptidkupplung wurde durch eine gelbe Färbung der Lösung angezeigt.

12.1.3. AAV 3 - Native Chemische Ligation

Poly(HPMA-*co*-NMAS) wurde in einer Mischung aus Natriumphosphatpuffer (100 mM, pH 7.4) und Dioxan (Puffer/Dioxan 2:1) gelöst (10 mg/ml). Die entsprechenden Mengen an *N*-L-cysteinylierten Liganden bzw. Peptide und Thiophenol (1 % v/v) wurden zugegeben und bei Raumtemperatur für die angegebene Zeit gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Dioxan unter vermindertem Druck entfernt und die wässrige Phase mit Diethylether gewaschen, anschließend über Dialyse und Gelfiltration (Pd-10; G-25) aufgereinigt und lyophilisiert. ¹H-NMR-Messungen wurden durchgeführt, um die Vollständigkeit und Reinheit der Konjugate festzustellen. Die exakte Beladung der Polymere mit Peptiden wurde von der Firma *Genaxxon Bioscience GmbH* gaschromatographisch bestimmt. Die Berechnung der Anzahl pro Polymerkette gekuppelter Peptide erfolgte nach AAV 5 12.1.5.

12.1.4. AAV 4 - Native Chemische Ligation im Puffer

Poly(HPMA-*co*-NMAS) wurde im Natriumphosphatpuffer (100 mM, pH 7.4) gelöst (10 mg/ml). Die entsprechenden Mengen an *N*-L-cysteinylierten Liganden bzw. Peptiden sowie Benzylmercaptan und Thiophenol (je 1 % v/v) wurden zugegeben und bei Raumtemperatur für die angegebene Zeit gerührt. Die Reaktionsmischung wurde über Gelfiltration (Pd-10; G-25) aufgereinigt und lyophilisiert. ¹H-NMR-Messungen wurden durchgeführt, um die Vollständigkeit und Reinheit der Konjugate zu überprüfen. Die exakte Beladung der Polymere mit Peptiden wurde von der Firma *Genaxxon Bioscience GmbH* gaschromatographisch bestimmt. Die Berechnung der Anzahl pro Polymerkette gekuppelter Peptide erfolgte nach AAV 5 12.1.5.

12.1.5. AAV 5 - Thiol-Maleimid-Kupplung

Das entsprechende Polymer wurde mit einer Konzentration von 10 mg/ml in Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 7.0), welches 5 mM EDTA enthält, gelöst und für 30 min mit einem Stickstoffstrom entgast. Anschließend wurde der entsprechende *N*-L-cysteinylierte Ligand (1.5 Äq.) zugegeben und die Reaktionsmischung unter einer Stickstoffatmosphäre über Nacht gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Reaktionslösung über Gelfiltration (Pd10; G25) und/oder unter Verwendung von Amicon Ultra Zentrifugenfiltern der Firma *Merck Millipore* über Größenausschlussfraktionierung aufgereinigt.

Berechnung der Anzahl der gekoppelten Peptide

Die Anzahl der gekoppelten Peptide pro Polymerkette wurde aus der nach gaschromatographischer Aminosäureanalyse erhaltenen Beladung wie folgt berechnet.

1. Berechnung der Massezunahme Δm :

$$\Delta m = \frac{\textit{Peptidbeladung} \cdot (M_{\textit{Peptid}} - M_{\textit{H}_2\textit{O}})}{1000} \quad (12.1)$$

wobei *Peptidbeladung* in mmol/g aus GC-Aminosäureanalyse und *M* in g/mol

2. Berechnung der Molmasse des Peptid-Polymerkonjugats:

$$M_{\textit{Peptid-Polymerkonjugat}} = \frac{1 + \Delta m}{\textit{Thioesterbeladung}} \cdot 1000 \quad (12.2)$$

wobei Δm aus Gleichung 12.1 und *Thioesterbeladung* des Copolymers in mmol/g aus $^1\text{H-NMR}$ -Auswertung

3. Berechnung der Anzahl der Peptide pro Polymerkette:

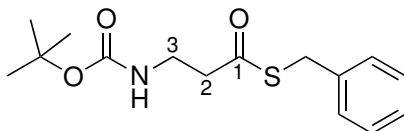
$$n_{\textit{Peptide}} = \frac{M_{\textit{Peptid-Polymerkonjugat}} \cdot \textit{Peptidbeladung}}{1000} \quad (12.3)$$

wobei $M_{\textit{Peptid-Polymerkonjugat}}$ in g/mol aus Gleichung 12.2 und *Peptidbeladung* in mmol/g aus GC-Aminosäureanalyse

12.2. Darstellung der Monomere

12.2.1. Darstellung der Thioester als Monomervorläufer

N-Boc- β -alanin-*S*-benzylthioester (7)



N-Boc- β -alanin (10.0 g, 52.9 mmol, 1.0 Äq.) wurde in DCM gelöst. Die Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt und anschließend mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (11.6 g, 56.0 mmol, 1.06 Äq.) und 4-(Dimethylamino)pyridine (DMAP) (645 mg, 5.29 mmol, 0.1 Äq.) versetzt. 5 min später wurde Benzylmercaptan (8.06 ml, 68.7 mmol, 1.3 Äq.) zugegeben und die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde über Celite[®] filtriert und der Rückstand mit CH₂Cl₂ gewaschen. Das Filtrat wurde mit einer ges. wässrigen NaHCO₃ Lösung, H₂O und einer ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das gewünschte Produkt konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung (EE/Hexan 1:4) als farbloser Feststoff erhalten werden (11.5 g, 84%).

R_f: 0.63 (EE/Hexan 1:2).

Smp.: 58.0 °C.

LC-Q: t_R = 4.29 min.

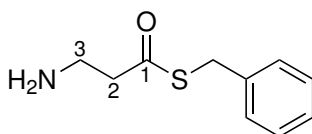
HRMS (LC/ToF-MS): t_R = 2.58 min, *m/z* ber. für C₁₅H₂₁NNaO₃S [M+Na]⁺: 318.1134, gef.: 318.1137, Δ 0.84 ppm.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.43 (s, 9H, H₉-Boc), 2.79 (t, 2H, ³*J* = 6.0 Hz, H₂-2), 3.42 (q, 2H, ³*J* = 6.0 Hz, H₂-3), 4.13 (s, 2H, H₂-Bn), 4.90 (s, 1H, NH), 7.24-7.33 (m, 5H, H₅-Ar).

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O): δ = 28.61 (C-Boc), 33.38 (C-Bn), 36.78 (C-3), 43.82 (C-2), 79.69 (C_q-Boc), 127.6 (C_{para}-Ar), 128.8 (C_{ortho}-Ar), 128.9 (C_{meta}-Ar), 137.4 (C_{ipso}-Ar), 155.8 (CO-Boc), 197.9 (C-1).

12.2.2. *N*-Methacryloyl- β -alanin-*S*-benzylthioester (NMAS) (4)

β -Alaninyl-*S*-benzylthioester (8)



Der Thioester **7** (5.7 g, 22 mmol) wurde in einer Mischung aus TFA und H₂O aufgenommen (95:5 v/v, 20 ml) und für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde TFA mittels eines Stickstoffstrom vertrieben, der Rückstand in H₂O aufgenommen und lyophilisiert. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung als farbloser Feststoff isoliert (3.9 g, 94 %).

Smp.: 70.6 °C.

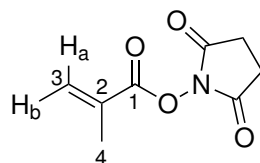
LC-Q (Sphinx-RP): $t_R = 2.77$ min.

HRMS (LC/ToF-MS): $t_R = 1.67$ min, m/z ber. für C₁₀H₁₄NOS [M+H]⁺: 196.0791, gef.: 196.0795, Δ 2.15 ppm.

¹H-NMR (300 MHz, D₂O): $\delta = 3.11$ (t, 2H, ³J = 6.5 Hz, H₂-2), 3.33 (t, 2H, ³J = 6.5 Hz, H₂-3), 4.25 (s, 2H, H₂-Bn), 7.37-7.44 (m, 5H, H₅-Ar).

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O): $\delta = 32.35$ (C-Bn), 34.65 (C-3), 39.14 (C-2), 127.3 (C_{para}-Ar), 128.3 (C_{ortho}-Ar), 128.4 (C_{meta}-Ar), 136.9 (C_{ipso}-Ar), 198.9 (C-1).

N-(Methacryloyloxy)succinimid (**9**)

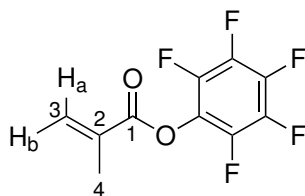


Zu einer stark gerührten Lösung von *N*-Hydroxysuccinimid (15 g, 0.13 mol, 1.0 Äq.) und Triethylamin (22 ml, 0.16 mol, 1.2 Äq.) in trockenem DCM (150 ml) wurde bei 0 °C Methacryloylchlorid (15 g, 0.14 mol, 1.1 Äq.) zuge tropft. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend durch Zugabe von DCM (100 ml) verdünnt. Die organische Phase wurde mit einer wässrigen Lösung einer 1%-igen NaHCO₃, zwei mal mit H₂O gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde auf ein 1/3 des Volumens unter vermindertem Druck reduziert und das Konzentrat über Nacht bei 4 °C gelagert. Der entstandene Niederschlag wurde filtriert, mit Hexan gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Das Produkt wurde als schwach gelber Feststoff erhalten (17.6 g, 74 %).

LC-ESI: $t_R = 1.68$ min, $m/z = 184.0$ [M+H]⁺.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 2.00$ (s, 3H, H₃-4), 2.84 (s, 4H, 2×H₂-Succinimid), 6.09 (s, 1H, H-3_b), 6.34 (s, 1H, H-3_a).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 17.71$ (C-4), 25.43 (C-Succinimid), 131.0 (C-3), 131.5 (C-2), 162.2 (C-1), 170.2 (CO-Succinimid).



Pentafluorophenylmethacrylat (10)

Pentafluorphenol (5.4 g, 29 mmol, 1.0 Äq.) wurde in DCM gelöst, auf 0 °C abgekühlt und mit 2,6-Lutidin (3.5 ml, 30 mmol, 1.0 Äq.) versetzt. Anschließend wurde Methacryloylchlorid (3.1 ml, 32 mmol, 1.1 Äq.) langsam zugetropft und die Reaktionsmischung für weitere 2 h bei 0 °C gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat zwei mal mit H₂O gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt anschließend unter vermindertem Druck destilliert (3.5×10⁻² bar, Wasserbadtemperatur 35-40 °C). Das Produkt wurde als farblose Flüssigkeit isoliert (2.4 g, 32%).

R_f: 0.76 (EE/Hexan 1:4).

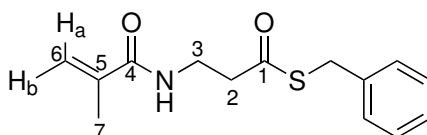
Sdp.: 27 °C (3.5×10⁻² bar).

LC-Q: t_R = 4.57 min.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.09 (s, 3H, H₃₋₄), 5.90 (s, 1H, H-3_a), 6.45 (s, 1H, H-3_b).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 18.78 (C-4), 130.0 (C-3), 133.8 (C-2), 139.6 (C_{ortho}-OPfp), 143.1 (C_{ipso}-OPfp), 153.8 (C_{meta}-OPfp), 163.2 (C-1).

N-Methacryloyl-β-alanin-S-benzylthioester (NMAS) (4)



Synthese ausgehend von Methacrylsäure

Eine Lösung aus Methacrylsäure (0.15 g, 1.8 mmol, 1.1 Äq.) in DCM (8 ml) wurde auf 0 °C abgekühlt und mit β-Alanin-S-benzylthioester (**8**) (0.5 g, 1.6 mmol, 1.0 Äq.), DCC (0.36 g, 1.8 mmol, 1.1 Äq.) und HOBT (0.24 g, 1.8 mmol, 1.1 Äq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Der entstandene Niederschlag wurde über Celite[®] abfiltriert. Das Filtrat wurde mit ges. NaHCO₃-Lösung, H₂O und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet.

Das Produkt **4** wurde nach säulenchromatographischer Aufreinigung (EE/Hexan 1:6, dann 1:3) als wachsartiger Feststoff isoliert (0.2 g, 49 %)

Synthese ausgehend von *N*-(Methacryloyloxy)succinimid (**9**)

Zu einer Lösung von β -Alanin-*S*-benzylthioester (**8**) (3.0 g, 9.8 mmol, 1.2 Äq.) in THF wurden bei 0 °C *N*-(Methacryloyloxy)succinimid (**9**) (1.5 g, 8.2 mmol, 1.0 Äq.) und DIPEA (1.7 ml, 9.8 mmol, 1.2 Äq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in DCM aufgenommen, mit H₂O, halbges. NH₄Cl und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (EE/Hexan 1:4) wurde der Thioester **4** als wachsartiger Feststoff erhalten (1.2 g, 56 %).

Synthese ausgehend von Pentafluorphenylmethacrylat (**10**)

Zu einer Lösung von β -Alanin-*S*-benzylthioester (**8**) (1.1 g, 3.5 mmol, 1.1 Äq.) in DCM wurden bei Raumtemperatur Pentafluorphenylmethacrylat (**10**) (800 mg, 3.17 mmol, 1.0 Äq.) und DIPEA (0.6 ml, 3.5 mmol, 1.1 Äq.) zugegeben. Nach 8 h Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM aufgenommen, mit H₂O, halbges. NH₄Cl und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (EE/Hexan 1:4) und das Produkt **4** als wachsartiger Feststoff in guten Ausbeuten isoliert (0.63 g, 76 %).

R_f: 0.38 (EE/Hexan 1:1).

Smp.: 70.7 °C.

LC-Q: t_R = 3.79 min.

HRMS (LC/ToF-MS): t_R = 2.32 min, *m/z* ber. für C₁₄H₁₇NNaO₂S [M+Na]⁺: 286.0872, gef.: 286.0873, Δ 0.31 ppm.

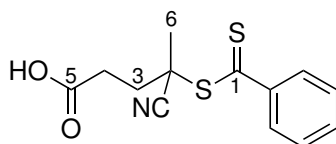
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.93 (s, 3H, H₃₋₇), 2.85 (t, 2H, ³*J* = 6.0 Hz, H₂₋₂), 3.61 (q, 2H, ³*J* = 6.0 Hz, H₂₋₃), 4.14 (s, 2H, H_{2-Bn}), 5.31 (s, 1H, H-6_{a/b}), 5.65 (s, 1H, H-6_{a/b}), 6.28 (s, 1H, NH), 7.24-7.33 (m, 5H, H_{5-Ar}).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 18.73 (C-7), 33.49 (C-Bn), 35.69 (C-3), 43.13 (C-2), 120.0 (C-6), 127.5 (C_{para-Ar}), 128.8 (C_{ortho-Ar}), 128.9 (C_{meta-Ar}), 137.4 (C_{ipso-Ar}), 139.9 (C-5), 168.5 (C-4), 198.5 (C-1).

12.3. RAFT-Reagenzien (CTAs)

12.3.1. 4-Cyano-4-((thiobenzoyl)sulfanyl)pentansäure (**3**)

Bis(thiobenzoyl)disulfid (1.5 g, 4.9 mmol, 1.0 Äq.) und 4,4'-Azo-bis(cyanopentansäure) (2.1 g, 7.4 mmol, 1.5 Äq.) wurden in EE (30 ml) suspendiert. Zum Entgasen wurde für 20 min ein Stickstoffstrom durch die Suspension geleitet, die anschließend über Nacht



unter Rückfluss erhitzt wurde. Dabei entstand eine klare, pinkfarbene Lösung. Nach dem Abkühlen wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde zunächst säulenchromatographisch (EE/Hexan 2:3, 0.1% AcOH) aufgereinigt und anschließend aus Benzol umkristallisiert. Das gewünschte Produkt wurde als kristalliner, pinkfarbener Feststoff isoliert (0.84 g, 64%).

R_f: 0.28 (EE/Hexan 1:1, 0.1% AcOH).

Smp.: 93-94 °C.

UV (MeOH): λ_{\max} (lg ϵ) = 305.5 nm (4.43).

LC-Q: t_R = 3.89 min, m/z = 279.95 [M+H]⁺.

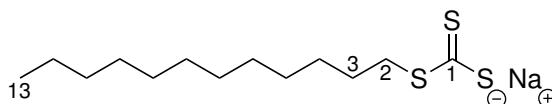
HRMS (LC/ToF-MS): t_R = 2.32 min, m/z ber. für C₁₃H₁₄NO₂S₂ [M+H]⁺: 280.046, gef.: 280.0448, Δ -4.33 ppm.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.94 (s, 3H, H₃₋₆), 2.40-2.78 (m, 4H, H₂₋₃, H₂₋₄), 7.36-7.42 (m, 2H, H_{meta-Ar}), 7.55-7.60 (m, 1H, H_{para-Ar}), 7.90-7.92 (m, 2H, H_{ortho-Ar}).

¹³C-NMR (75 MHz, MeOD): δ = 24.21 (C-6), 30.41 (C-4), 34.33 (C-3), 47.30 (C-2), 119.8 (C-CN), 127.7 (C_{ortho-Ar}), 129.8 (C_{meta-Ar}), 134.3 (C_{para-Ar}), 146.1 (C_{ipso-Ar}), 175.1 (C-5).

12.3.2. 4-Cyano-4-(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanylpentansäure (12)

Darstellung von Natrium-S-dodecyltrithiocarbonat

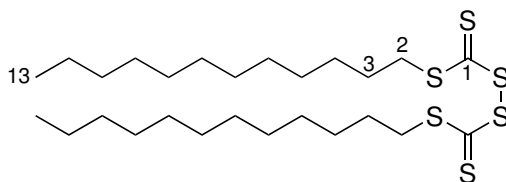


Natriumhydrid (3.4 g, 79 mmol, 1.04 Äq.) wurde in Diethylether (150 ml) suspendiert. Unter Eisbadkühlung wurde *n*-Dodecylthiol (15.4 g, 18.2 ml, 76.0 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde für 30 min bei 0 °C gerührt. Dabei bildete sich ein weißer Niederschlag. Anschließend wurde CS₂ (6.0 g, 4.8 ml, 79 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben. Die dabei entstandene gelbe Suspension wurde für weitere 1.5 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde die Suspension abfiltriert und mit Diethylether gewaschen. Der Feststoff wurde unter vermindertem Druck getrocknet. Das Produkt wurde als gelber Feststoff isoliert (16.85 g, 74%) und ohne weitere Aufreinigung für die nächste Stufe eingesetzt.

¹H-NMR (300 MHz, MeOD): δ = 0.81-0.92 (m, 3H, H₃₋₁₃), 1.29 (brs, 18H, CH₂),

1.64 (q, 2H, $^3J = 7.5$ Hz, H₂₋₃), 3.15 (t, 2H, $^3J = 7.5$ Hz, H₂₋₂).

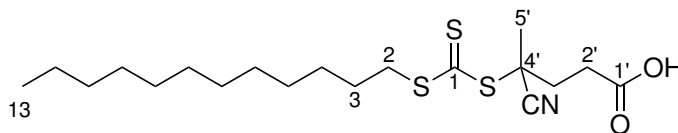
Bis-(dodecylsulfanylthiocarbonyl)disulfid



Iod (7.26 g, 28.6 mmol, 0.51 Äq.) wurde portionsweise zu einer Suspension aus Natrium-S-dodecyltrithiocarbonat (16.9 g, 56.1 mmol, 1.0 Äq.) in Diethylether (100 ml) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer Reaktionszeit von 2 h wurde das gebildete Natriumiodid abfiltriert und mit Diethylether gewaschen. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck auf ein Volumen von ca. 100 ml eingengt und anschließend mit einer Natriumthiosulfat-Lösung (6% in H₂O) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der isolierte gelbe Feststoff am Hochvakuum getrocknet (15.4 g, 99%).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.86-0.90$ (m, 3H, H₃₋₁₃), 1.26-1.40 (m, 18H, CH₂), 1.69 (q, 2H, $^3J = 7.5$ Hz, H₂₋₃), 3.30 (t, 2H, $^3J = 7.5$ Hz, H₂₋₂).

4-Cyano-4-(dodecylsulfanylthiocarbonyl)sulfanylpentansäure (12)



Bis-(dodecylsulfanylthiocarbonyl)disulfid (2.7 g, 5.0 mmol, 1.0 Äq.) und 4,4'-Azobis(cyanopentansäure) (2.1 g, 7.5 mmol, 1.5 Äq.) wurden in EE (50 ml) vorgelegt und unter Rückfluss für 21 h erhitzt. Nach beendeter Reaktion wurde die organische Phase mit H₂O gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck bis auf ca. 5 ml entfernt. Die Ethylacetat-Phase wurde mit Hexan überschichtet und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Der dabei entstandene gelbe Niederschlag wurde abfiltriert, mit kaltem Hexan gewaschen und am Hochvakuum getrocknet (2.6 g, 64%).

Smp.: 55-56 °C.

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 305.5 nm (3.97).

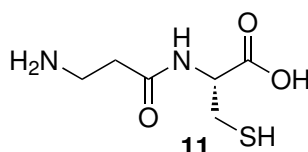
HRMS (LC/ToF-MS): $t_{\text{R}} = 3.484$ min, m/z ber. für C₁₉H₃₄NO₂S₃ [M+H]⁺: 404.1746, gef.: 404.1689, Δ -14.19 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.86-0.90$ (m, 3H, H₃₋₁₃), 1.26-1.42 (m, 18H, CH₂),

1.70 (q, 2H, $^3J = 7.5$ Hz, H₂₋₃), 1.89 (s, 3H, H_{3-5'}), 2.34-2.59 (m, 2H, H_{3-2'}), 2.67-2.72 (m, 2H, H_{2-3'}), 3.33 (t, 2H, $^3J = 7.5$ Hz, H₂₋₂).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 14.27 (C-13), 22.84 (C-12), 25.04 (C-5'), 27.82 (C-3), 29.08, 29.22, 29.44, 29.48, 29.56, 29.69, 29.77, 32.07 (C-4 bis C-11, C-3'), 33.70 (C-2'), 37.27 (C-2), 46.37 (C-4'), 119.0 (C-CN), 176.0 (C-1'), 217.0 (C-1).

12.4. Reaktivität des Thioesterfragments **8** in NCL-Reaktionen



Test-NCL in a) Phosphatpuffer, b) Dioxan/Phosphatpuffer, c) DMSO/Phosphatpuffer

Fragment **8** (13 mg, 40 μmol, 1.0 Äq.) wurde in 1 ml a) Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.4), b) Dioxan/Phosphatpuffer 2:1, c) DMSO/Phosphatpuffer 4:1 gelöst und mit einer Lösung von Cystein (19 mg, 0.16 mmol, 3.7 Äq.) im jeweiligen Lösungsmittel versetzt. Die Lösung wurde für 3 h bei Raumtemperatur gerührt bis der Umsatz vollständig war. In allen Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen hat die NCL-Reaktion ohne die Zugabe eines Katalysators stattgefunden.

LC-ESI (50-100 % ACN): $t_R = 0.17$ min, $m/z = 193.0$ [M+H]⁺.

HRMS (LC/ToF-MS): $t_R = 0.43$ min, m/z ber. für C₆H₁₂N₂O₃S [M+H]⁺: 193.0647, gef.: 193.0641, Δ 0.05 ppm.

12.5. Stabilität des Thioesterfragments **8** unter radikalischen Bedingungen

FRP-Bedingungen

Fragment **8** (4.0 mg, 14 μmol, 1.0 Äq.), AIBN (1.2 mg, 7.0 μmol, 0.5 Äq.) und Naphthalen (1.2 mg) als interner Standard wurden in einer Mischung aus Dioxan und Methanol (Dioxan/MeOH 3:1) gelöst. Nach Entnahme einer Probe zur Bestimmung des Startpunktes wurde das Reaktionsgemisch drei mal entgast. Der thermische Zerfall von AIBN wurde in einem 60 °C warmen Ölbad initiiert. Nach 1, 6, 8 und 22 h wurden unter Stickstoffatmosphäre Proben genommen und mittels LC-ToF-MS analysiert.

HRMS (LC/ToF-MS): t_R (Fragment **8**) = 2.53 min, t_R (Naphthalen) = 2.59 min.

Zeit	Fragment 8/Naphthalen^a
start	46.6 : 53.5
1 h	47.2 : 52.7
6 h	46.6 : 53.4
22 h	46.3 : 53.7

^a Verhältnisse der Peakflächen der UV-Signale bei $\lambda = 254$ nm

RAFT-Bedingungen

Fragment **8** (4.0 mg, 14 μ mol, 1 Äq.), RAFT-Reagenz **12** (8.5 mg, 2.1 μ mol, 1.5 Äq.), AIBN (0.7 mg, 4.2 μ mol, 0.2 Äq. bzgl. RAFT-Reagenz **12**) (RAFT/Initiator = 1:5) und Naphthalen (1.2 mg) als interner Standard wurden in einer Mischung aus Dioxan und Methanol (Dioxan/MeOH 3:1) gelöst. Nach Entnahme einer Probe zur Bestimmung des Startpunktes wurde das Reaktionsgemisch drei mal entgast. Der thermische Zerfall von AIBN wurde in einem 60 °C warmen Ölbad initiiert. Nach 1, 6, 8 und 22 h wurden unter Stickstoffatmosphäre Proben genommen und mittels LC-ToF-MS analysiert.

HRMS (LC/ToF-MS): t_R (Fragment **8**) = 2.53 min, t_R (Naphthalen) = 2.59 min, t_R (RAFT) = 3.41 min.

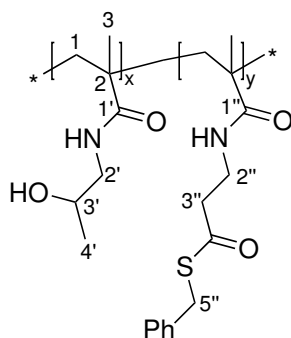
Zeit	Fragment 8/Naphthalen^a
start	48.4 : 51.6
16 h	48.1 : 51.9

^a Verhältnisse der Peakflächen der UV-Signale bei $\lambda = 254$ nm

12.6. Copolymerisationen

12.6.1. Freie radikalische Polymerisation

PHNS-1



Die freie radikalische Polymerisation von HPMA (2.19 g, 15.3 mmol) mit NMA (4) (0.80 g, 0.03 mol) (NMA/HPMA = 1:5) und AIBN (0.12 g, 0.73 mmol) ((HPMA + NMA)/AIBN 25:1) wurden gemäß AAV 1 in Aceton (30 ml) bei 50 °C durchgeführt. Die Reaktionszeit betrug 15 h. Das Copolymer wurde als farbloser Feststoff erhalten (2.1 g, 67%).

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ = 0.81-1.02 (m, 6H, H₃-3, H₃-4'), 1.60 (brs, 2H, H₂-1), 2.74 (brs, anteilig 2H, H₂-3''), 2.91 (s, 2H, H₂-2'), 3.22 (anteilig 2H, H₂-2''), 3.67 (s, 1H, H-3'), 4.14 (s, 2H, H₂-5''), 4.72 (s, 1H, OH), 7.20-7.31 (m, 1H, NH, anteilig 5H, H₅-Ar).

Umsatz: nicht bestimmt.

GPC: $M_n^{\text{exp}} = 41.0 \text{ kDa}$, PDI = 2.1.

Thioester-Anteil: 12 %, Beladung = 0.7 mmol/g.

12.6.2. RAFT-Polymerisationen

PHNS-2

Die Monomere HPMA (0.50 g, 3.5 mmol) und NMA (4) (92 mg, 0.35 mmol) ([Monomer]₀ = 0.7 M, NMA/HPMA = 1:10), RAFT-Reagenz **12** (12 mg, 30 μmol) (Monomer/CTA 130:1) und ACPA (1.7 mg, 6.0 μmol) (CTA/I = 5:1) wurden nach AAV 1 in Dioxan/H₂O 3:1 umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde in einem 70 °C warmen Ölbad für 16 h gerührt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff isoliert (206 mg, 34 %).

Umsatz: nicht bestimmt.

GPC: $M_n^{\text{exp}} = 15.1 \text{ kDa}$, PDI = 1.2.

Thioester-Anteil: 6.3 %, Beladung = 0.4 mmol/g.

PHNS-3

Die Monomere HPMA (50 mg, 0.35 mmol) und NMAS (**4**) (9.20 mg, 0.035 mmol) ($[\text{Monomer}]_0 = 0.7 \text{ M}$, NMAS/HPMA = 1:10), RAFT-Reagenz **12** (1.2 mg, 3.0 μmol) (Monomer/CTA 130:1), ACPA (0.17 mg, 0.59 μmol) (CTA/I = 5:1) und Naphthalen (3.2 mg) wurden nach AAV 1 in Dioxan/H₂O 3:1 umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde in einem 70 °C warmen Ölbad für 23 h gerührt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff isoliert (33.4 mg, 55 %).

Umsatz: 73.0 % HPMA (55.0 % NMAS).

GPC: $M_n^{\text{exp}} = 17.6 \text{ kDa}$, PDI = 1.2, $M_n^{\text{theor}} = 13.8 \text{ kDa}$.

Thioester-Anteil: 7.0 %.

PHNS-4

Die Monomere HPMA (48.1 mg, 0.034 mmol) und NMAS (**4**) (8.9 mg, 0.034 mmol) ($[\text{Monomer}]_0 = 0.7 \text{ M}$, NMAS/HPMA = 1:10), RAFT-Reagenz **12** (0.48 mg, 1.2 μmol) (Monomer/CTA 308:1), ACPA (0.07 mg, 0.24 μmol) (CTA/I = 5:1) und Naphthalen (3.3 mg) wurden nach AAV 1 in Dioxan/H₂O 3:1 umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde in einem 70 °C warmen Ölbad für 24 h gerührt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff isoliert (14.1 mg, 25 %).

Umsatz: 50.1 % HPMA (35.6 % NMAS).

GPC: $M_n^{\text{exp}} = 17.7 \text{ kDa}$, PDI = 1.4, $M_n^{\text{theor}} = 22.0 \text{ kDa}$.

Thioester-Anteil: 6.3 %.

PHNS-5

Die Monomere HPMA (48.0 mg, 0.034 mmol) und NMAS (**4**) (9.0 mg, 0.034 mmol) ($[\text{Monomer}]_0 = 0.7 \text{ M}$, NMAS/HPMA = 1:10), RAFT-Reagenz **12** (0.48 mg, 1.2 μmol) (Monomer/CTA 308:1), ACPA (0.11 mg, 0.4 μmol) (CTA/I = 3:1) und Naphthalen (3.2 mg) wurden nach AAV 1 in Dioxan/H₂O 3:1 umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde in einem 70 °C warmen Ölbad für 24 h gerührt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff isoliert (18.1 mg, 32 %).

Umsatz: 59.8 % HPMA (45 % NMAS).

GPC: $M_n^{\text{exp}} = 19.2 \text{ kDa}$, PDI = 1.3, $M_n^{\text{theor}} = 26.0 \text{ kDa}$.

Thioester-Anteil: 6.2 %.

PHNS-6

Die Monomere HPMA (0.1 g, 0.7 mmol) und NMAS (**4**) (36.8 mg, 14 μmol) ($[\text{Monomer}]_0 = 0.7 \text{ M}$, NMAS/HPMA = 1:5), RAFT **12** (2.6 mg, 6.4 μmol) (Monomer/CTA 130:1), ACPA (0.5 mg, 2.1 μmol) (CTA/I = 3/1) und Naphthalen (9.9 mg) wurden nach AAV 1 in Dioxan/H₂O 3:1 umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde in einem

70 °C warmen Ölbad für 24 h gerührt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff isoliert (53.5 mg, 38.2 %).

Umsatz: 65.0 % HPMA (52.0 % NMAS).

GPC: M_n^{exp} 15.7 kDa, PDI = 1.3, M_n^{theor} 12.4 kDa.

Thioester-Anteil: 15.0 %.

PHNS-7

Die Monomere HPMA (100 mg, 0.70 mmol) und NMAS (**4**) (37 mg, 0.014 mmol) ($[\text{Monomer}]_0 = 0.7 \text{ M}$, NMAS/HPMA = 1:5), RAFT-Reagenz **12** (5.85 mg, 14.5 μmol) (Monomer/CTA 58:1), ACPA (0.81 mg, 2.9 μmol) (CTA/I = 5:1) und Naphthalen (8.3 mg) wurden nach AAV 1 in Dioxan/H₂O 3:1 umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde in einem 70 °C warmen Ölbad für 16 h gerührt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff isoliert (70.0 mg, 49 %).

Umsatz: 81.0 % HPMA (69.0 % NMAS).

GPC: M_n^{exp} = 13.3 kDa, PDI = 1.1, M_n^{theor} = 7.0 kDa.

Thioester-Anteil: 14.0 %.

PHNS-8

Die Monomere HPMA (48 mg, 0.034 mmol) und NMAS (**4**) (8.9 mg, 0.034 mmol) ($[\text{Monomer}]_0 = 1.0 \text{ M}$, NMAS/HPMA = 1:10), RAFT-Reagenz **12** (0.48 mg, 1.2 μmol) (Monomer/CTA 308:1), ACPA (0.07 mg, 0.24 μmol) (CTA/I = 5:1) und Naphthalen (3 mg) wurden nach AAV 1 in MeOH/Dioxan 3:1 umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde in einem 70 °C warmen Ölbad für 24 h gerührt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff isoliert (8.1 mg, 14 %).

Umsatz: 30.0 % HPMA (28.0 % NMAS).

GPC: M_n^{exp} = 12.8 kDa, PDI = 1.4, M_n^{theor} = 14.8 kDa.

Thioester-Anteil: 8.0 %.

PHNS-9

Die Monomere HPMA (48.0 mg, 0.034 mmol) und NMAS (**4**) (9.0 mg, 0.034 mmol) ($[\text{Monomer}]_0 = 1.0 \text{ M}$, NMAS/HPMA = 1:10), RAFT-Reagenz **12** (0.48 mg, 1.2 μmol) (Monomer/CTA 308:1) und ACPA (0.11 mg, 0.40 μmol) (CTA/I = 3:1) wurden nach AAV in MeOH/Dioxan 3:1 umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde in einem 70 °C warmen Ölbad für 24 h gerührt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff isoliert (12.8 mg, 22 %).

Umsatz: 42.0 % HPMA (38.0 % NMAS).

GPC: M_n^{exp} = 12.4 kDa, PDI = 1.5, M_n^{theor} = 20.6 kDa.

Thioester-Anteil: 8.0 %.

PHNS-10

Die Monomere HPMA (60.1 mg, 0.042 mmol) und NMA (4) (11.0 mg, 0.042 mmol) ($[\text{Monomer}]_0 = 1.0 \text{ M}$, NMA/HPMA = 1:10), RAFT-Reagenz **12** (0.5 mg, 1.5 μmol) (Monomer/CTA 308:1), ACPA (0.085 mg, 0.30 μmol) (CTA/I = 5:1) und Naphthalen (5 mg) wurden nach AAV 1 in DMAc/MeOH 1:1 umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde in einem 70 °C warmen Ölbad für 24 h gerührt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff isoliert (39.7 mg, 55 %).

Umsatz: 51.0 % HPMA (44.0 % NMA).

GPC: $M_n^{\text{exp}} = 13.4 \text{ kDa}$, PDI = 1.7, $M_n^{\text{theor}} = 22.6 \text{ kDa}$.

Thioester-Anteil: 7.4 %.

PHNS-11

Die Monomere HPMA (60 mg, 0.042 mmol) und NMA (4) (11 mg, 0.042 mmol) ($[\text{Monomer}]_0 = 1.0 \text{ M}$, NMA/HPMA = 1:10), RAFT-Reagenz **12** (0.5 mg, 1.5 μmol) (Monomer/CTA 308:1), ACPA (0.085 mg, 0.30 μmol) (CTA/I = 5:1) und Naphthalen (5.0 mg) wurden nach AAV 1 in DMAc/MeOH 1:1 umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde in einem 70 °C warmen Ölbad für 24 h gerührt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff isoliert (32.6 mg, 46 %).

Umsatz: 28.4 % HPMA (25.8 % NMA).

GPC: $M_n^{\text{exp}} = 14.0 \text{ kDa}$, PDI = 1.5, $M_n^{\text{theor}} = 12.8 \text{ kDa}$.

Thioester-Anteil: 7.3 %.

PHNS-12

Die Monomere HPMA (50 mg, 0.35 mmol) und NMA (4) (9.2 mg, 0.035 mmol) ($[\text{Monomer}]_0 = 1.0 \text{ M}$, NMA/HPMA = 1:10), RAFT-Reagenz **12** (0.5 mg, 1.2 μmol) (Monomer/CTA 308:1), AIBN (0.04 mg, 0.25 μmol) (CTA/I = 5:1) und Naphthalen (3.6 mg) wurden nach AAV 1 in DMAc/MeOH 1:1 umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde in einem 65 °C warmen Ölbad für 24 h gerührt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff isoliert (21.8 mg, 37 %).

Umsatz: 62.0 % HPMA (56.6 % NMA).

GPC: $M_n^{\text{exp}} = 14.2 \text{ kDa}$, PDI = 1.6, $M_n^{\text{theor}} = 27.5 \text{ kDa}$.

Thioester-Anteil: 8.0 %.

PHNS-13

Die Monomere HPMA (50 mg, 0.35 mmol) und NMA (4) (9.2 mg, 0.035 mmol) ($[\text{Monomer}]_0 = 1.0 \text{ M}$, NMA/HPMA = 1:10), RAFT-Reagenz **12** (1.2 mg, 2.9 μmol) (Monomer/CTA 130:1), ACPA (0.165 mg, 0.59 μmol) (CTA/I = 5:1) und Naphthalen (3 mg) wurden nach AAV 1 in DMAc umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde in

einem 70 °C warmen Ölbad für 24 h gerührt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff isoliert (17.1 mg, 28 %).

Umsatz: 42.0 % HPMA (39.0 % NMAS).

GPC: $M_n^{\text{exp}} = 13.7 \text{ kDa}$, PDI = 1.3, $M_n^{\text{theor}} = 8.2 \text{ kDa}$.

Thioester-Anteil: 8.5 %.

PHNS-14

Die Monomere HPMA (40 mg, 0.28 mmol) und NMAS (**4**) (7.4 mg, 0.028 mmol) ($[\text{Monomer}]_0 = 1.0 \text{ M}$, NMAS/HPMA = 1:10), RAFT-Reagenz **12** (0.4 mg, 1.0 μmol) (Monomer/CTA 308:1), ACPA (0.05 mg, 0.2 μmol) (CTA/I = 5:1) und Naphthalen (2.9 mg) wurden nach AAV 1 in DMAc umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde in einem 70 °C warmen Ölbad für 24 h gerührt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff isoliert (24.6 mg, 53 %).

Umsatz: 87.7 % HPMA (87.5 % NMAS).

GPC: $M_n^{\text{exp}} = 8.7 \text{ kDa}$, PDI = 1.3, $M_n^{\text{theor}} = 39.1 \text{ kDa}$.

Thioester-Anteil: 9.0 %.

PHNS-15

Die Monomere HPMA (40 mg, 0.28 mmol) und NMAS (**4**) (7.4 mg, 0.028 mmol) ($[\text{Monomer}]_0 = 1.0 \text{ M}$, NMAS/HPMA = 1:10), RAFT-Reagenz **12** (0.4 mg, 1.0 μmol) (Monomer/CTA 308:1), AIBN (0.033 mg, 0.2 μmol) (CTA/I = 5:1) und Naphthalen (3 mg) wurden nach AAV 1 in DMAc umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde in einem 65 °C warmen Ölbad für 24 h gerührt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff isoliert (15.3 mg, 32 %).

Umsatz: 72.1 % HPMA (72 % NMAS).

GPC: $M_n^{\text{exp}} = 10.8 \text{ kDa}$, PDI = 1.3, $M_n^{\text{theor}} = 32.2 \text{ kDa}$.

Thioester-Anteil: 9.0 %.

PHNS-16

Die Monomere HPMA (48.1 mg, 0.34 mmol) und NMAS (**4**) (8.85 mg, 0.034 mmol) ($[\text{Monomer}]_0 = 0.7 \text{ M}$, NMAS/HPMA = 1:10), RAFT-Reagenz **3** (0.34 mg, 1.2 μmol) (Monomer/CTA 308:1), ACPA (0.11 mg, 0.4 μmol) (CTA/I = 3:1) und Naphthalen (4.5 mg) wurden nach AAV 1 Dioxan/H₂O 3:1 umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde in einem 70 °C warmen Ölbad für 24 h gerührt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff isoliert (5 mg, 3 %).

Umsatz: 33.7 % HPMA (27 % NMAS).

GPC: $M_n^{\text{exp}} = 18.7 \text{ kDa}$, PDI = 1.3, $M_n^{\text{theor}} = 15.1 \text{ kDa}$.

Thioester-Anteil: 6.0 %.

PHNS-17

Die Monomere HPMA (50 mg, 0.38 mmol) und NMAS (**4**) (9.5 mg, 0.036 mmol) ($[\text{Monomer}]_0 = 1.0 \text{ M}$, NMAS/HPMA = 1:10), RAFT-Reagenz **3** (0.35 mg, 1.3 μmol) (Monomer/CTA 308:1), ACPA (0.07 mg, 0.25 μmol) (CTA/I = 5:1) und Naphthalen (3.8 mg) wurden nach AAV 1 in DMAc umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde in einem 70 °C warmen Ölbad für 23.5 h gerührt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff isoliert (36.5 mg, 60 %).

Umsatz: 71.8 % HPMA (73 % NMAS).

GPC: $M_n^{\text{exp}} = 13.8 \text{ kDa}$, PDI = 1.4, $M_n^{\text{theor}} = 34.6 \text{ kDa}$.

Thioester-Anteil: 9.0 %.

PHNS-18

Die Monomere HPMA (100 mg, 0.698 mmol) und NMAS (**4**) (36.8 mg, 0.140 mmol) ($[\text{Monomer}]_0 = 0.7 \text{ M}$, NMAS/HPMA = 1:5), RAFT-Reagenz **12** (3.4 mg, 8.4 μmol) (Monomer/CTA 100:1), ACPA (0.47 mg, 1.7 μmol) (CTA/I = 5:1) und Naphthalen (9.4 mg) wurden nach AAV 1 in Dioxan/H₂O umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde in einem 70 °C warmen Ölbad für 17 h gerührt. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff isoliert (66.6 mg, 48 %).

Umsatz: 69.0 % HPMA (56.6 % NMAS).

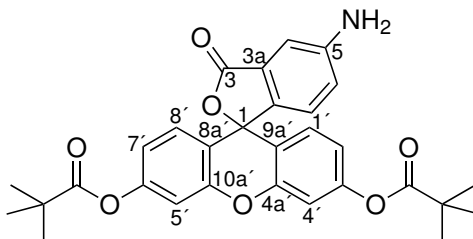
GPC: $M_n^{\text{exp}} = 18.5 \text{ kDa}$, PDI = 1.2, $M_n^{\text{theor}} = 10.1 \text{ kDa}$.

Thioester-Anteil: 13.8 %, Beladung = 0.86 mmol/g.

12.7. Projekt A: Untersuchung der zellulären Aufnahme unterschiedlich geladener Peptid-HPMA-Konjugate

12.7.1. Darstellung von *N*-L-Cysteinyl-5-aminofluorescein (**13**)

Synthese von Di-O-pivaloyl-5-aminofluorescein



Cs_2CO_3 (0.28 g, 0.87 mmol, 1.0 Äq.) und 5-Aminofluorescein (0.30 g, 0.87 mmol, 1.0 Äq.) wurden in DMF gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wurde Pivaloysäureanhydrid (0.41 g, 0.44 ml, 2.2 mmol, 2.5 Äq.) langsam zugetropft und die

Reaktionsmischung für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Cs_2CO_3 wurde abfiltriert, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in EE aufgenommen. Die organische Phase wurde mit H_2O und ges. NaCl gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt ohne weitere Aufreinigung als orangener Feststoff isoliert (0.40 g, 89 %).

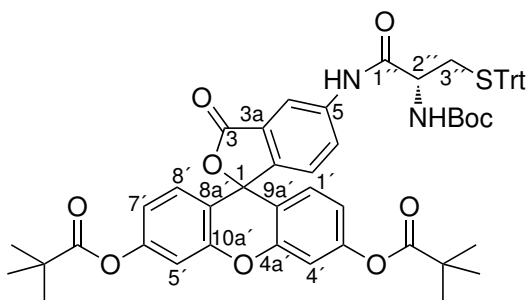
R_f: 0.23 (EE/Hexan 1:2); 3-fach acetyliertes Aminofluorescein: 0.13 (EE/Hexan 1:4).

LC-ESI (50-99 MeOH in 12 min): $t_R = 2.99$ min, $m/z = 516.3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.36$ (s, 18H, H_3 -Piv), 6.76 (dd, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, $^4J = 2$ Hz, H-2', H-7'), 6.88 (d, 2H, $^3J = 8.7$ Hz, H-1', H-8'), 6.89 (d, 1H, $^3J = 8.3$ Hz, H-7), 6.94 (dd, 1H, $^3J = 8.3$ Hz, $^4J = 2.0$ Hz, H-6), 7.02 (d, 2H, $^4J = 2.0$ Hz, H-4', H-5'), 7.2 (d, 1H, $^3J = 2.0$ Hz, H-4).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 27.06$ (C-Piv), 39.16 (C_q -Piv), 81.57 (C-1), 108.6 (C-4), 110.1 (C-4', C-5'), 116.8 (C-8a', C-9a'), 117.5 (C-2', C-7'), 122.4 (C-6), 124.7 (C-7), 127.7 (C-3a), 128.9 (C-1', C-8'), 142.8 (C-8), 148.3 (C-5), 151.7 (C-4a', C-10a'), 152.4 (C-3', C-6'), 169.5 (C-3), 176.5 (CO-Piv).

N-(N'-Boc-S-Trt-L-Cysteinyl)-di-O-pivaloyl-5-aminofluorescein



Zu einer Lösung von Boc-L-Cys(Trt)-OH (0.28 g, 0.54 mmol, 1.0 Äq.) in DCM wurden DCC (0.22 g, 1.1 mmol, 2.0 Äq.) und HOBT (0.17 g, 1.1 mmol, 2.0 Äq.) bei 0°C zugegeben. 5 min später wurde Di-O-pivaloyl-5-aminofluorescein zugegeben und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Harnstoff wurde abfiltriert und mit DCM gewaschen. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaHCO_3 , H_2O und gesättigter NaCl gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt nach säulenchromatographischer Aufreinigung (EE/Hex 1:3) als gelblicher Feststoff isoliert (0.33 g, 63 %).

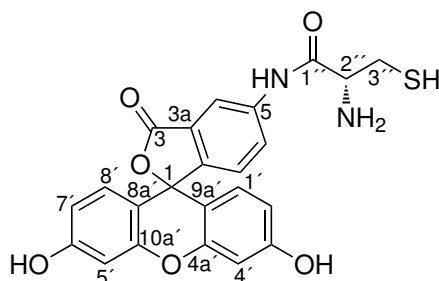
R_f: 0.63 (EE/Hexan 1:2).

LC-ESI (50-100 ACN in 12 min): $t_R = 12.21$ min, $m/z = 962.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.35$ (s, 18H, H_3 -Piv), 1.45 (s, 9H, H_3 -Boc), 2.68 (dd, 1H, $^2J = 13.0$ Hz, $^3J = 5.5$ Hz, H-3''_{a/b}), 2.86 (dd, 1H, $^2J = 13.0$ Hz, $^3J = 7.0$ Hz, H-3''_{a/b}), 3.90 (q, 1H, $^3J = 6.5$ Hz, NH), 4.78 (d, 1H, $^3J = 7.0$ Hz, H-2''), 6.74-6.83 (m, 4H, H-2', 4', 5', 7'), 7.03-7.47 (m, 19H, H_{15} -Trt, H-1', 8', H-7, NH), 7.77 (d, 1H,

$^3J = 8.5 \text{ Hz}$, H-6), 8.12 (s, 1H, H-4), 8.57 (brs, 1H, NH).

N-L-Cysteinyl-5-aminofluorescein (13)



N-(*N'*-Boc-S-Trt-L-Cysteinyl)-di-*O*-pivaloyl-5-aminofluorescein (1.0 g, 1.0 mmol, 1.0 Äq.) wurde mit zunächst mit K_2CO_3 (0.7 g, 3.4 mmol, 3.0 Äq.) in einer Lösungsmittelmischung aus DCM/MeOH/ H_2O 4:8:1 versetzt und für 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit MeOH verdünnt. Das ausgefallene Salz wurde abfiltriert, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in einer Mischung aus TFA/TIS/ H_2O 15:1:1 (17 ml) gelöst und für 30 min gerührt. TFA wurde mit einem N_2 -Strom entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 80:25:4) wurde das Produkt als orangener Feststoff isoliert (0.26 g, 58 %).

R_f: 0.67 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 65:25:4).

LC-ESI (50-99 MeOH): $t_{\text{R}} = 0.15 \text{ min}$, $m/z = 451.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

HRMS (LC/ToF-MS): $t_{\text{R}} = 2.29 \text{ min}$, $m/z = 451.0956$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, ($\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$)⁺, calc $m/z = 451.0958$ (diff. -0.6 ppm).

¹H-NMR (300 MHz, MeOD): $\delta = 3.10$ (dd, 1H, $^2J = 15 \text{ Hz}$, $^3J = 7 \text{ Hz}$, H-3''_{a/b}), 3.22 (dd, 1H, $^2J = 15 \text{ Hz}$, $^3J = 5 \text{ Hz}$, H-3''_{a/b}), 4.21 (td, 1H, $^3J = 5.0 \text{ Hz}$, H-2''), 6.52-6.62 (m, 4H, H-2', 4', 5', 7'), 6.69 (d, 2H, $^4J = 2 \text{ Hz}$, NH), 7.20 (d, 1H, $^3J = 8.5 \text{ Hz}$, H-7), 7.87 (dd, 1H, $^4J = 2 \text{ Hz}$, $^3J = 8.5 \text{ Hz}$, H-6), 8.40 (d, 1H, $^4J = 2 \text{ Hz}$, H-4).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 48.66$ (C-3''), 53.06 (C-2''), 83.32 (C-1), 102.29 (C-4', C-5'), 109.55 (C-2', C-7'), 112.66 (C-8a', C-9a'), 114.23 (C-4), 124.73 (C-6), 127.08 (C-7), 129.06 (C-1', C-8'), 139.82 (C-5), 151.94 (C-4a', C-10'), 159.63 (C-3', C-6'), 168.14 (C-3), 168.51 (C-1'').

12.7.2. Peptidsynthese

Alle folgenden Peptide wurden gemäß AAV 2 synthetisiert.

CysArg: LC-ESI: $t_{\text{R}} = 0.18 \text{ min}$, $m/z = 277$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

CysThr: LC-ESI: $t_R = 0.18$ min, $m/z = 222$ [M+H]⁺.

CysGlu: LC-ESI: $t_R = 0.19$ min, $m/z = 250$ [M+H]⁺.

CysArg₉: Cysteinyl-nonaarginin wurde von der Gruppe von M. Beyermann (FMP Berlin) synthetisiert.

12.7.3. Darstellung von Peptid-HPMA-Konjugaten

PHN-CR-1

Gemäß AAV 3 wurde PHNS-1 (20 mg, 0.014 mmol, 1.0 Äq., Beladung: 0.7 mmol/g) zunächst mit *N*-L-Cysteinyl-5-aminofluorescein (0.63 mg, 0.0014 mmol, 0.1 Äq.) in Anwesenheit von Thiophenol (0.02 ml, 1% v/v) in 2 ml des angegebenen Lösungsmittels umgesetzt und für 3 h gerührt. Anschließend wurde das Dipeptid CR (2×4.6 mg, 0.021 mmol, 1.5 Äq.; zweite Zugabe nach 24 h) zugegeben und die Reaktionslösung wurde für insgesamt 32 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach entsprechender Aufreinigung wurde das Produkt als gelbes Lyophilisat isoliert (PHN-CR-1: 20.6 mg, quantitativ, Beladung: 0.4886 mmol/g, 25 Peptide/Polymerkette; PHN-CR-1-b: 20.3 mg, 98 %, Beladung: 0.419 mmol/g, 23 Peptide/Polymer).

PHN-CT-1

Gemäß AAV 3 wurde PHNS-1 (20 mg, 0.014 mmol, 1.0 Äq., Beladung: 0.7 mmol/g) zunächst mit *N*-L-Cysteinyl-5-aminofluorescein (0.63 mg, 0.0014 mmol, 0.1 Äq.) in Anwesenheit von Thiophenol (0.02 ml, 1% v/v) in 2 ml des angegebenen Lösungsmittels umgesetzt und für 3 h gerührt. Anschließend wurde das Dipeptid CT (2×5.8 mg, 0.021 mmol, 1.5 Äq.; zweite Zugabe nach 24 h) zugegeben und die Reaktionslösung wurde für insgesamt 32 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach entsprechender Aufreinigung wurde das Produkt als gelbes Lyophilisat isoliert (PHN-CT-1: 20.6 mg, quantitativ, Beladung: 0.517 mmol/g, 26 Peptide/Polymerkette).

PHN-CE-1

Gemäß AAV 3 wurde PHNS-1 (20 mg, 0.014 mmol, 1.0 Äq., Beladung: 0.7 mmol/g) zunächst mit *N*-L-Cysteinyl-5-aminofluorescein (0.63 mg, 0.0014 mmol, 0.1 Äq.) in Anwesenheit von Thiophenol (0.02 ml, 1% v/v) in 2 ml des angegebenen Lösungsmittels umgesetzt und für 3 h gerührt. Anschließend wurde das Dipeptid CE (2×5.2 mg, 0.021 mmol, 1.5 Äq.; zweite Zugabe nach 24 h) zugegeben und die Reaktionslösung wurde für insgesamt 32 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach entsprechender Aufreinigung wurde das Produkt als gelbes Lyophilisat isoliert (PHN-CE-1: 19.4 mg, 93 %, Beladung: 0.502 mmol/g, 25 Peptide/Polymerkette).

PHN-CR₉-1

Gemäß AAV 3 wurde PHNS-1 (20 mg, 0.014 mmol, 1.0 Äq., Beladung: 0.7 mmol/g) zunächst mit *N*-L-Cysteinyl-5-aminofluorescein (0.63 mg, 0.0014 mmol, 0.1 Äq.) in Anwe-

senheit von Thiophenol (0.02 ml, 1% v/v) in 2 ml des angegebenen Lösungsmittels umgesetzt und für 3 h gerührt. Anschließend wurde das Peptid CR₉ (42.7 mg, 0.028 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung wurde für insgesamt 32 h gerührt. Nach entsprechender Aufreinigung wurde das Produkt als gelbes Lyophilisat isoliert (PHN-CR₉-1: 26.4 mg, quantitativ, Beladung: 0.258 mmol/g, 12 Peptide/Polymerkette).

PHN-CR₉-2

Gemäß AAV 1 wurde PHNS-2 (20 mg, 0.008 mmol, 1.0 Äq., Beladung: 0.4 mmol/g) zunächst mit *N*-L-Cysteinyl-5-aminofluorescein (0.36 mg, 0.0008 mmol, 0.1 Äq.) in Anwesenheit von Thiophenol (0.02 ml, 1% v/v) in 2 ml des angegebenen Lösungsmittels umgesetzt und für 3 h gerührt. Anschließend wurde das Peptid CR₉ (24.4 mg, 0.016 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung wurde für insgesamt 32 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach entsprechender Aufreinigung wurde das Produkt als gelbes Lyophilisat isoliert (PHN-CR₉-2: 23.6 mg, 98 %, Beladung: 0.169 mmol/g, 3 Peptide/Polymerkette).

PHN-CR-2

Gemäß AAV 3 wurde PHNS-2 (20 mg, 0.008 mmol, 1.0 Äq., Beladung: 0.4 mmol/g) zunächst mit *N*-L-Cysteinyl-5-aminofluorescein (0.36 mg, 0.0008 mmol, 0.1 Äq.) in Anwesenheit von Thiophenol (0.02 ml, 1% v/v) in 2 ml des angegebenen Lösungsmittels umgesetzt und für 3 h gerührt. Anschließend wurde das Peptid CR (4.4 mg, 0.016 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung wurde für insgesamt 32 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach entsprechender Aufreinigung wurde das Produkt als gelbes Lyophilisat isoliert (PHN-CR-2: 19.7 mg, 96 %, Beladung: 0.283 mmol/g, 5 Peptide/Polymerkette).

PHN-CT/CR₉-1

Gemäß AAV 3 wurde PHNS-1 (20 mg, 0.014 mmol, 1.0 Äq., Beladung: 0.7 mmol/g) zunächst mit *N*-L-Cysteinyl-5-aminofluorescein (0.63 mg, 0.0014 mmol, 0.1 Äq.) in Anwesenheit von Thiophenol (0.02 ml, 1% v/v) in 2 ml des angegebenen Lösungsmittels umgesetzt und für 3 h gerührt. Anschließend wurden die Peptide CR₉ (3.2 mg, 0.002 mmol, 0.15 Äq.) und CT (2 × 2.32 mg, 0.011 mmol, 0.75 Äq.; zweite Zugabe nach 24 h) zugegeben und die Reaktionslösung wurde für insgesamt 32 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach entsprechender Aufreinigung wurde das Produkt als gelbes Lyophilisat isoliert (PHN-CT/CR₉-1: 24.4 mg, quantitativ, Beladung (CR₉): 0.025 mmol/g, 4 Peptide/Polymerkette, Beladung (CT): 0.473 mmol/g, 25 Peptide/Polymerkette).

PHN-CT-2

Gemäß AAV 3 wurde PHNS-2 (20 mg, 0.008 mmol, 1.0 Äq., Beladung: 0.4 mmol/g) zunächst mit *N*-L-Cysteinyl-5-aminofluorescein (0.36 mg, 0.0008 mmol, 0.1 Äq.) in Anwesenheit von Thiophenol (0.02 ml, 1% v/v) in 2 ml des angegebenen Lösungs-

mittels umgesetzt und für 3 h gerührt. Anschließend wurde das Peptid CT (3.5 mg, 0.016 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung wurde für insgesamt 32 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach entsprechender Aufreinigung wurde das Produkt als gelbes Lyophilisat isoliert (PHN-CT-2: 22.9 mg, quantitativ, Beladung: 0.252 mmol/g, 5 Peptide/Polymerkette).

PHN-CE-2

Gemäß AAV 3 wurde PHNS-2 (20 mg, 0.008 mmol, 1.0 Äq., Beladung: 0.4 mmol/g) zunächst mit *N*-L-Cysteinyl-5-aminofluorescein (0.36 mg, 0.0008 mmol, 0.1 Äq.) in Anwesenheit von Thiophenol (0.02 ml, 1% v/v) in 2 ml des angegebenen Lösungsmittels umgesetzt und für 3 h gerührt. Anschließend wurde das Peptid CE (3.99 mg, 0.016 mmol, 2.0 Äq.) zugegeben und die Reaktionslösung wurde für insgesamt 32 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach entsprechender Aufreinigung wurde das Produkt als gelbes Lyophilisat isoliert (PHN-CE-2: 19.9 mg, 97 %, Beladung: 0.307 mmol/g, 5 Peptide/Polymerkette).

12.7.4. Bestimmung der Zetapotentiale

Die Peptid-Polymerkonjugate wurden in einer 1.5 mM NaCl-Lösung (0.14 mg/ml der PHNS-1 Konjugate und 0.25 mg/ml der PHNS-2 Konjugate) gelöst und am Zetasizer Nano ZS (*Malvern Instruments*, Malvern, UK) mit einem He-Ne-Laser ($\lambda = 633$ nm) in einer Kapillarzelle DTS 1060 bei 20 °C vermessen.

12.7.5. Bestimmung der Cytotoxizität - MTT-Test

Der MTT-Assay wurde nach Standardprotokoll durchgeführt. Die Zellen wurden in einer 96-well Platte kultiviert (Zelldichte: 1×10^4 Zellen/well, DMEM, 10 % FBS, 37 °C, 5 % CO₂). Nach 24 h wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden für 60 min (37 °C, 5 % CO₂) mit einer Verdünnungsreihe (Startkonzentration: 0.20 mg/ml bezogen auf PHN-1 und 0.35 mg/ml bezüglich der PHN-2 Konjugate) der entsprechenden Peptid-Polymerkonjugate inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Polymerlösung entfernt und die Zellen wurden mit 100 µl einer 0.5 mg/ml MTT-Lösung für 5 h (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die entstandenen violetten Formazankristalle durch die Zugabe von 100 µl gelöst. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei 37 °C wurde die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 545 nm gemessen. Die Ergebnisse wurden mit Zellexperimenten normalisiert, die in Abwesenheit der Polymerkonjugate gleich behandelt worden sind.

12.7.6. Zelluläre Aufnahme in HeLa-Zellen

Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM)

Inkubation bei 37 und 4 °C

Die zelluläre Aufnahme der fluoresceinmarkierten Peptid-HPMA-Konjugate wurde mit Hilfe von konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) untersucht. Dazu wurden HeLa-Zellen (2×10^5 Zellen/ml) in Petrischalen auf Glasobjektträgern mit einem Durchmesser von 35 mm ausplattiert und für 24 h in DMEM, welches 10 % FCS und 1 % Antibiotika (Pen/Strep) enthielt, kultiviert. Die Zellen wurden vor Versuchsbeginn mit DPBSG (Dubelco's Phosphat-Puffer mit D-Glucose) gewaschen und anschließend mit Lösungen der Peptid-HPMA-Konjugate in DPBSA (0.043 mg/ml im Fall der PHNS-1-basierten Konjugate und 0.075 mg/ml im Fall der PHNS-2-basierten Konjugate) bei 37 °C und 4 °C für 30 min inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Polymerlösungen entfernt und die Zellen mit kaltem DPBSG (0 °C) gewaschen und am Mikroskop untersucht. Die Integrität der Zellmembran wurde für jede Probe durch Zugabe eines Tropfens Trypanblau (0.5 % w/v) gezeigt.

Inkubation unter energiereduzierten Bedingungen

Zur Unterdrückung energieabhängiger Prozesse wurden HeLa-Zellen mit den Konjugaten PHN-CR-1 und PHN-CT/CR₉-1 (0.043 mg/ml) mit den zuvor eingesetzten Konzentrationen in einem energiereduzierten Medium inkubiert (30 min, 37 °C). Das energiereduzierte Medium (Energy Depletion, ED) bestand aus den beiden Komponenten 2-Desoxyglucose, einem kompetitiven Antagonisten der Glukose, und dem Cytochrom-Oxygenase Inhibitor Natriumazid. Bei Verwendung eines ED Mediums wird die ATP-Bildung der Zelle gehemmt, so dass der Zelle unmittelbar verfügbare Energie fehlt.

Mikroskopie-Aufnahmen wurden in der Mikroskop-Facility am FMP (B. Wiesner und J. Eichhorst) am LSM 510 ausgestattet mit einem 100 × 1.3 Objektiv (Plan-Neofluar®) durchgeführt (siehe Methoden Kapitel 11.6.3).

Durchflusszytometrie (FACS)

Die Zellen wurden in 6-well Zellkulturplatten ausplattiert (Zelldichte: 1.8×10^5 Zellen pro well) und für 24 h im Medium (DMEM, 10 % FBS, 37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Das Medium wurde entfernt und durch die entsprechenden Peptid-HPMA Konjugate in Phosphatpuffer (Dubelco's phosphate buffered saline mit D-Glucose (DPBSG)) ersetzt (0.14 mg/ml der PHNS-1 Konjugate und 0.25 mg/ml der PHNS-2 Konjugate). Die Zellen wurden für 1 h bei 37 oder 4 °C inkubiert, anschließend mit 0 °C kaltem Puffer gewaschen und mit Pronase E in DPBS trypsinisiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (1500 rpm, 4 min bei 4 °C), in 1%-iger BSA-Lösung in DPBS resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität von 1×10^4 Zellen wurde gemessen, wobei ein 530/30 nm Bandfilter (FL1) mit einer 500 V Detektorspannung verwendet wurde. Jedes Experiment wurde zweimal als Duplikat durchgeführt.

Inhibierung endozytischer Aufnahmewege

HeLa-Zellen wurden mit den entsprechenden selektiven Inhibitoren gelöst in DMEM für 30 min vorinkubiert. Nach Abnehmen der Inhibitorlösung wurden die Zellen mit einer Lösung inkubiert, die sowohl die jeweiligen Peptid-Polymerkonjugate PHN-CR-1 und PHN-CT/CR₉ (0.14 mg/ml) enthält als auch die entsprechenden Inhibitoren. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C wurden die Zellen mit konfokaler Mikroskopie und FACS-Analyse untersucht (Kapitel 12.7.6 und 12.7.6). Die verwendeten Inhibitoren und die eingesetzten Konzentrationen waren wie folgt: Chlorpromazin (CPZ; 10 µg/ml), Cytochalasin D (CytoD; 2 µg/ml), Nystatin (25 µg/ml), LY294002 (10 µM) and Wortmannin (1 µM).

12.8. Projekt B: HPMA-gebundene MMP-11-Substrate zur Früherkennung von Pankreaskrebs

12.8.1. Verwendete Peptidsequenzen - MMP-11-Substrate

MMP-11 Substrate von Dr. Sina Meyer

SM P 122: H-CGRRRK(DabcyI)GGAANC(MeOBn)RMGG-Fluo (KK258)

SM P 194: H-CGRRRK(DabcyI)GYAENG-Fluo (KK257)

SM P 110: H-CGGAANC(MeOBn)RMGGK(NH₂)-NH₂ (KK229II)

SM P 137: H-CGGK(NH₂)GGAANC(MeOBn)RMGGK(NH₂)-NH₂ (KK244)

SM P 192: H-CGRRRK(NH₂)GGAANC(MeOBn)RMGGK(NH₂)-NH₂ (KK252)

SM P 190: Ac-C(MeOBn)RMGGK(Cy7)-NH₂ (Fluorescence Standard)

KK216: poly(HPMA)-*co*-MMA-NH-CH₂-CH₂-NH₂ (Negativkontrolle)

12.8.2. Kupplung der Substrate an poly(HPMA)

PHN-SMP110-1 (KK299II)

Gemäß AAV 4 wurde PHNS-1 (30.0 mg, 0.021 mmol, 1.0 Äq., Beladung: 0.7 mmol/g) mit SM P 110 (39.0 mg, 0.032 mmol, 1.5 Äq.) für 20 h umgesetzt. Nach erfolgter Gelfiltration und Dialyse (3500 Da cut-off, 4 Tage, H₂O/MeOH 2:1) wurde das Produkt als farbloses Lyophilisat erhalten (31.2 mg, 95 %, Beladung: 0.141 mmol/g, 7 Peptide/Polymerkette).

PHN-SMP137-1 (KK244)

Gemäß AAV 4 wurde PHNS-1 (10.0 mg, 0.007 mmol, 1.0 Äq., Beladung: 0.7 mmol/g) mit SM P 137 (10.0 mg, 0.007 mmol, 1.0 Äq.) für 24 h umgesetzt. Nach erfolgter Gelfiltration und Dialyse (3500 Da cut-off, 36 h) wurde das Produkt als farbloses Lyophilisat erhalten (11.0 mg, 96 %, Beladung: 0.154 mmol/g, 8 Peptide/Polymerkette).

PHN-SMP192-1 (KK252)

Gemäß AAV 4 wurde PHNS-1 (20.0 mg, 0.014 mmol, 1.0 Äq., Beladung: 0.7 mmol/g) mit SM P 192 (34.5 mg, 0.0018 mmol, 1.3 Äq.) für 24 h umgesetzt. Nach erfolgter Gel-filtration und Dialyse (3500 Da cut-off, 4 Tage, H₂O/MeOH 2:1) wurde das Produkt als farbloses Lyophilisat erhalten (30.5 mg, quantitativ, Beladung: 0.210 mmol/g, 12 Peptide/Polymerkette).

Negativkontrolle für *in vivo*-Versuche

Copolymerisation von HPMA mit *N*-Methacryloylsuccinimid (MOSu) – poly(HPMA-*co*-MOSu)

Die radikalische Copolymerisation von HPMA (3.0 g, 21 mmol) und *N*-(Methacryloyl-oxy)succinimid (**9**) (0.77 mg, 4.2 mmol) in Gegenwart von AIBN (0.17 mg, 1.0 mmol) erfolgte in THF (40 ml) (**9**/HPMA = 1:5, AIBN/Gesamtmonomer = 1:25, [Monomer]₀ = 0.7 M in Aceton) und wurde als Fällungspolymerisation gemäß AAV 1 durchgeführt. Das entstandene Polymer wurde abzentrifugiert, in H₂O gelöst, aus THF gefällt und am Hochvakuum getrocknet (1.87 g, 48 %, T₁ = 3.5 s, Beladung: 0.9 mmol/g).

Die Copolymerzusammensetzung wurde anhand von ¹³C-NMR-Spektren bestimmt. Aufgrund des NOE-Effektes erforderte die quantitative Auswertung der ¹³C-Spektren eine vorherige Bestimmung der T₁-Zeit. Für dieses Copolymer beträgt die T₁-Zeit: 3.5 s. Die Beladung beträgt 0.9 mmol/g.

GPC-Analysen erfolgten nach Hydrolyse des Copolymers in 1 M NaOH.

GPC: M_n^{exp} 17.2 kDa, PDI = 3.3.

poly(HPMA-*co*-MA-NH-CH₂-CH₂-NH-Boc) (PHN-MA-*N*-Boc-Et-NH₂)

poly(HPMA-*co*-MOSu) (50.0 mg, 0.045 mmol, Beladung: 0.9 mmol/g) wurde in DMF (5 ml) gelöst und mit Boc-Ethylendiamin (36.9 mg, 0.23 mmol, 5 Äq.) und DIPEA (39.2 µl, 0.23 mmol, 5 Äq.) versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. DMF wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in wenig MeOH aufgenommen und in Aceton gefällt. Der entstandene Niederschlag wurde je zweimal mit Aceton und Diethylether gewaschen und am Hochvakuum getrocknet. Das Copolymer wurde als farbloser Feststoff gewonnen (27.7 mg).

Boc-Entschützung

Die Boc-Gruppe wurde durch Zugabe von TFA/H₂O 95:5 entfernt. Die Reaktionsmischung wurde für 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das TFA mit Hilfe eines Stickstoffstroms entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Das aminofunktionalisierte Copolymer wurde als farbloser Feststoff isoliert (20.8 mg).

NIR797-Labeling – PHN-SMP137-1-Cy₂, PHN-SMP192-1-Cy₂

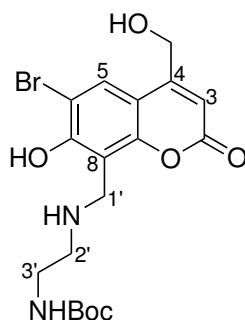
Die Umsetzung der Peptid-Polymerkonjugate PHN-SMP137-1 und PHN-SMP192-1 und der Negativkontrolle PHN-MA-EtAmin mit dem Cyanin-Fluorophor NIR797 (4 Äq.) in Anwesenheit von DIPEA (3 Äq.) erfolgte in DMF. Nach einer Reaktionszeit von 20 h wurde das DMF unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in einer Mischung aus Acetonitril und H₂O (ACN/H₂O 1:2) aufgenommen, dialysiert (3500 Da cut-off, 1 Woche) und zusätzlich über Gelfiltratin aufgereinigt (Pd25, G10). Die Beladungen der Konjugate mit dem Fluorophor wurden von Dr. S. Meyer über UV-vis Spektroskopie bestimmt.

12.9. Projekt C: Intrazelluläre Freisetzung amyloidogener Peptide

12.9.1. *N*-(*N*-Boc-*S*-Trt-*L*-cysteinyl)-*N'*-acetyl-*N'*-(6-Bromo-7-hydroxy-4-hydroxymethyl-coumarinyl-8-yl-methyl)ethylendi-amin

(*N*-(*N*-Boc-*S*-Trt-*L*-Cys)-*N'*-Ac-*N'*-(Bhcm)-ethylendi-amin) 15

N-Boc-*N'*-(Bhcm)-ethylendi-amin (16)



Paraformaldehyd (550 mg, 18.3 mmol, 3.3 Äq.) und KOH (30.8 mg, 0.549 mmol, 0.12 Äq.) wurden in Ethanol (3.6 ml) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Boc-Ethylendi-amin (2.93 g, 18.3 mmol, 3.3 Äq.) wurde zugegeben und die Reaktionsmischung wurde eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung tropfenweise zu einer Lösung von (6-Brom-7-hydroxycoumarin-4-yl)methyl (Bhc) (1.5 g, 5.5 mmol, 1.0 Äq., Reinheit 70 %) in Ethanol (15 ml) zugegeben und für 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der entstandene Niederschlag abfiltriert und mit kaltem Ethanol gewaschen. Das Umkristallisieren aus Ethanol ergab das Produkt als gelben Feststoff (0.88 g, 52 %).

R_f: 0.53 (DCM/MeOH 5/1).

Smp.Zersetzung >173 °C.

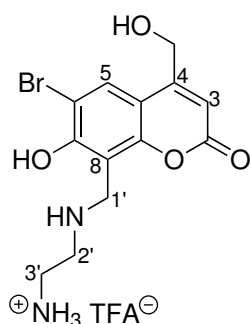
LC-Q: t_R = 2.86 min.

HRMS (LC/ToF-MS): $t_R = 1.68$ min, m/z ber. für $C_{18}H_{24}BrN_2O_6$ $[M+H]^+$: 443.0812, gef.: 443.0836, $\Delta = 5.37$ ppm.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 1.39$ (s, 9H, H_9 -Boc), 2.90 (t, 2H, H_2 -2'), 3.20 (m, 2H, H_2 -3'), 4.16 (s, 2H, H_2 -1'), 4.61 (s, 2H, H_2 -OH), 5.92 (s, 1H, H-3), 7.62 (1H, s, H-5).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 28.24$ (CH_3 -Boc), 37.19 (C-3'), 43.33 (C-1'), 46.39 (C-2'), 59.24 (C-OH), 78.23 (C_q-Boc), 101.5 (C-6), 103.7 (C-3), 105.2 (C-4a), 111.5 (C-8), 126.1 (C-5), 153.0 (C-4), 155.8 (C-8a), 156.8 (C-7), 160.9 (CO-Boc), 167.3 (C-2).

N-(Bhcm)-ethylendiamin (16-Boc)



16 (0.16 g, 0.36 mmol) wurde mit 20 ml einer Mischung aus TFA und DCM (TFA/DCM 1:1) versetzt und 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das überschüssige TFA mit einem Stickstoffstrom vertrieben, das Produkt als TFA-Salz in H_2O aufgenommen und lyophilisiert (0.16 g, 0.36 mmol).

LC-Q: $t_R = 0.28$ min.

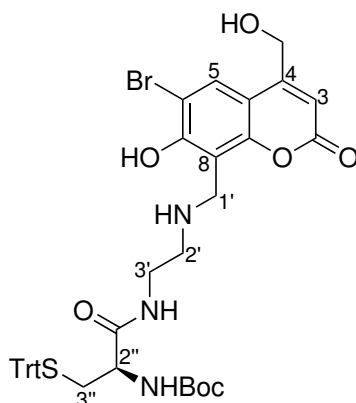
HRMS (LC/ToF-MS): $t_R = 0.66$ min, m/z ber. für $C_{13}H_{14}BrN_2O_4$ $[M-H]^-$: 341.0142, gef.: 341.0152, $\Delta = 2.91$ ppm.

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 2.07$ (s, 2H, NH_2), 3.16-3-3.23 (m, 4H, H_2 -2', H_2 -3'), 4.40 (s, 2H, H_2 -1'), 4.73 (s, 2H, H_2 -OH), 6.35 (s, 1H, H-3), 7.97 (s, 1H, H-5).

N-(*N*-Boc-*S*-Trt-*L*-Cys)-*N'*-(Bhcm)-ethylendiamin (18)

Synthese ausgehend von *N*-Boc-*S*-Trt-*L*-Cysteinyl-*N*-hydroxysuccinimdeste (19)

16-Boc (42 mg, 0.1 mmol, 1.1 Äq.) wurde in trockenem DMF (2 ml) gelöst und mit DIPEA (22 μ l, 0.13 mmol, 1.5 Äq.) versetzt. Eine Lösung aus **19** in DMF (2.5 ml) wurde zur Reaktionslösung zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in EE aufgenommen. Die organische Phase wurde mit



halbges. NH_4Cl - und ges. NaCl -Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach säulenchromatographischer Reinigung ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 15:1) konnte das Produkt als gelber Feststoff isoliert werden (11 mg, 16 %).

Synthese ausgehend von *N*-Boc-S-Trt-L-Cysteinylpentafluorphenylester (20)

20 wurde in trockenem DMF (6 ml) gelöst und bei Raumtemperatur sukzessive zu einer Lösung von **16-Boc** (0.23 g, 0.53 mmol, 1.3 Äq.) in trockenem DMF (6 ml) und DIPEA (122 μl , 0.719 mmol, 1.7 Äq.) zugetropft. Nach einer Reaktionszeit von 6 h wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 15:1). Das Produkt konnte als gelber Feststoff isoliert werden (0.21 g, 51 %).

R_f: 0.3 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8:1).

Smp.: Zersetzung $>160^\circ\text{C}$.

LC-Q: $t_R = 3.92$ min, $m/z = 812.16$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

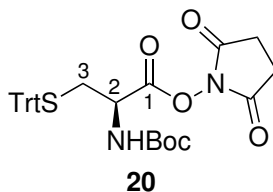
HRMS (LC/ToF-MS): $t_R = 2.187$ min, m/z ber. für $\text{C}_{40}\text{H}_{43}\text{BrN}_3\text{O}_7\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 788.2, gef.: 788.203, $\Delta = 3.83$ ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 1.36$ (s, 9H, $\text{H}_9\text{-Boc}$), 2.38-2.41 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-3''}$), 2.88 (t, 2H, $^3J = 6.5$ Hz, $\text{H}_2\text{-2'}$), 3.22-3.41 (m, 2H, $\text{H}_2\text{-3'}$), 3.92-3.96 (m, 1H, H-2''), 4.17 (s, 2H, $\text{H}_2\text{-1'}$), 4.63 (s, 2H, $\text{H}_2\text{-OH}$), 6.26 (s, 1 H, H-3), 6.99 (d, 1H, $^3J = 7.0$ Hz, NH-Boc), 7.67 (s, 1 H, H-5), 8.06 (t, 1 H, $^3J = 6.0$ Hz, NH-CO).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 28.10$ (C-Boc), 33.76 (C-3''), 35.43 (C-3'), 45.96 (C-1'), 53.61 (C-2'), 59.00 (C-OH), 65.81 (C-2'', Cq-Trt), 78.59 (Cq-Boc), 107.5 (C-3, C-6), 126.7 (C-Trt_{para}, C-5), 128.0 (C_{ortho}-Trt), 129.0 (C_{meta}-Trt), 144.3 (C_{ipso}-Trt, C-4), 152.5 (C-8a), 155.0 (C-7), 156.4 (CO-Boc), 159.8 (C-2), 170.7 (C-1'').

N-Boc-S-Trt-L-Cysteinyl-*N*-hydroxysuccinimdester (19)

N-Boc-S-Trt-L-Cystein (0.5 g, 1 mmol, 1.0 Äq.) wurde in DCM (5 ml) gelöst und bei Raumtemperatur mit einer Lösung aus *N*-Hydroxysuccinimd (0.15 g, 1.2 mmol,



1.2 Äq.) in THF (1 ml) versetzt. Nach Zugabe von EDC×HCl (0.23 g, 1.2 mmol, 1.2 Äq.) wurden die Reaktionsmischung für drei Stunden gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in EE aufgenommen. Die organische Phase wurde mit H₂O, verd. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE/Hexan 1:2) wurde das Produkt als farbloser Feststoff erhalten (0.23 g, 40%).

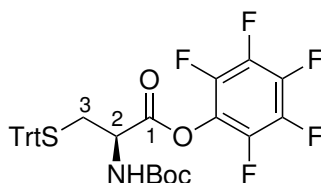
R_f: 0.45 (EE/Hex 1/1).

LC-Q: t_R = 4.9 min, m/z = 582.9 [M+Na]⁺.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.43 (s, 9H-H₉-Boc), 2.67-2.74 (m, 2H, H₂-3), 2.79 (s, 4H, 2×H₂-OSu), 4.33 (brs, 1H, H-2), 4.87 (brs, 1H, NH), 7.19-7.43 (m, 15H, H-Trt).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 25.52 (C-CH₂-OSu), 28.21 (C-Boc), 33.63 (C-3), 51.14 (C-2), 67.41 (C_q-Trt), 80.54 (C_q-Boc), 126.96 (C_{para}-Trt), 128.1 (C_{ortho}-Trt), 129.5 (C_{meta}-Trt), 144.1 (C_{ipso}-Trt), 154.4 (CO-Boc), 166.8 (CO-OSu), 168.3 (C-1).

N-Boc-S-Trt-L-Cysteinylpentafluorphenylester (20)



N-Boc-S-Trt-L-Cystein (0.5 g, 1 mmol, 1.0 Äq.), Pentafluorphenol (0.28 g, 1.5 mmol, 1.5 Äq.) und EDC×HCl (0.29 g, 1.5 mmol, 1.5 Äq.) wurden in DCM (5 ml) gelöst und bei Raumtemperatur für 14 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde DCM entfernt und der Rückstand in EE aufgenommen, mit H₂O, NaHCO₃ und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt nach säulenchromatographischer Reinigung (EE/Hex 1:8) als fester, farbloser Schaum erhalten (0.46 g, 73%).

R_f: 0.27 (EE/Hex 1/8).

Smp.: 48.3-49.5 °C.

LC-Q: t_R = 5.6 min.

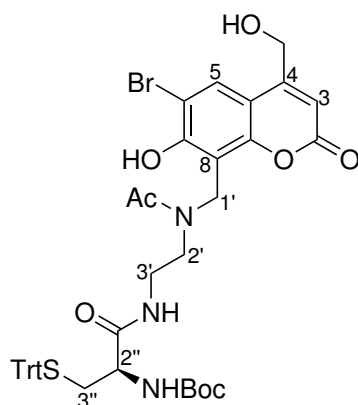
HRMS (LC/ToF-MS): t_R = 3.06 min, m/z ber. für C₃₃H₂₈F₅NN_aO₄S [M+Na]⁺:

652.1551, gef.: 652.1562, $\Delta = 1.61$ ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.44$ (s, 9H-H₉-Boc), 2.67 (dd, 1H, $^2J = 12.0$ Hz, $^3J = 6.0$ Hz, H_{a/b}-3), 2.83 (dd, 1H, $^2J = 12.0$ Hz, $^3J = 6.0$ Hz, H_{a/b}-3), 4.32 (d, 1H, $^3J = 6.0$ Hz, H-2), 4.99 (d, 1H, $^3J = 6.0$ Hz, NH), 7.20-7.45 (m, 15H, H-Trt).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 28.37$ (C-Boc), 33.53 (C-3), 52.75 (C-2), 67.54 (C_q-Trt), 80.81 (C_q-Boc), 127.2 (C_{para}-Trt), 128.3 (C_{ortho}-Trt), 129.6 (C_{meta}-Trt), 136.3 (C_{ortho}-OPfp), 139.5 (C_{para}-OPfp), 139.6 (C_{ipso}-OPfp), 142.8 (C_{meta}-OPfp), 144.2 (C_{ipso}-Trt), 154.9 (CO-Boc), 167.5 (C-1).

N-(*N*-Boc-S-Trt-L-Cys)-*N'*-Ac-*N'*-(Bhcm)-ethylendiamin (**15**)



Eine Lösung von Pentafluorphenolacetat (0.12 g, 0.52 mmol, 3.0 Äq.) in DMF (0.5 ml) wurde zu einer Lösung von **18** (0.14 g, 0.18 mmol, 1.0 Äq.) in DMF (4,5 ml) bei Raumtemperatur zugetropft und die Reaktionsmischung wurde für 14 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff isoliert (0.11 g, 75 %).

R_f: 0.47 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8:1).

LC-Q: $t_R = 4.86$ min, $m/z = 854.2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

HRMS (LC/ToF-MS): $t_R = 2.68$ min, m/z ber. für $\text{C}_{42}\text{H}_{44}\text{BrN}_3\text{NaO}_8\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 852.1925, gef.: 852.1908, $\Delta = -2$ ppm.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 1.36$ (s, 9H, H₉-Boc), 2.00 (s, 3H, H₃-Ac), 2.32-2.38 (m, 2H, H₂-3''), 3.45-3.51 (m, 4H, H₂-2', H₂-3'), 3.92-4.00 (m, 1H, H-2''), 4.54 (s, 2H, H₂-1'), 4.70 (s, 2H, H₂-OH), 6.32 (s, 1H, H-3), 7.00 (d, 1H, $^3J = 8.50$ Hz, NH-Boc), 7.20-7.34 (m, 15H, H₁₅-Trt), 7.87 (s, 1H, H-5), 8.13 (brs, 1H, NH-CO), 12.05 (Verunreinigung).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 20.75$ (C-Ac), 28.10 (C-Boc), 33.78 (C-3''), 36.55 (C-3'), 48.12 (C-1'), 53.60 (C-2'), 59.14 (C-2'', C-OH), 65.95 (C_q-Trt), 78.38 (C_q-Boc), 107.2 (C-6), 107.7 (C-7), 111.0 (C-3), 112.4 (C-4a, C-8), 126.7 (C_{para}-Trt), 127.8 (C_{ortho}-Trt), 128.0 (C_{meta}-Trt), 129.1 (C-5), 144.3 (C_{ipso}-Trt, C-4), 152.3 (C-8a,

C-7), 154.9 (CO-Boc), 159.5 (C-2), 170.8 (CO-Ac), 174.5 (C-1”).

12.9.2. Verwendete Peptidsequenzen

Die Peptidsequenzen wurden von Enrico Brandenburg synthetisiert VW18:

Fmoc-LKVELEKL(Mtt)-KSELVVLKSELEKCLKSEL-Wang Resin

TAMRA-VW18:

TAMRA-Ahx-LKVELEKL(Mtt)-KSELVVLKSELEKCLKSEL-Wang Resin

12.9.3. Optimierung der Aktivierungsbedingungen am Bhc

Testansatz mit Disuccinimidcarbonat (DSC) als Aktivierungsreagenz (21)

Bhc (10 mg, 0.04 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem THF (1 ml) gelöst und mit TEA (28 µl, 0.20 mmol, 5.5 Äq.) versetzt. Nach Zugabe des Disuccinimidcarbonats (14 mg, 0.06 mmol, 1.5 Äq.) wurde die Reaktionslösung 4 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei nach 2 und 4 h Reaktionszeit Proben für die Analyse mit der LC-Q entnommen wurden. Nach einer Reaktionszeit von 4 h waren 90 % des Bhc zum aktivierten Derivat **22** umgesetzt.

LC-Q: $t_R = 3.37$ min, $m/z = 411.88, 413.83$ [M+H]⁺ (siehe Anhang Abbildung A.21).

Testansatz mit 1-Chlorameisensäure-4-nitrophenol (CNP) als Aktivierungsreagenz (22)

Bhc (10 mg, 0.04 mmol, 1 Äq.) wurde in trockenem THF (1 ml) gelöst und mit DIPEA (12.6 µl, 0.08 mmol, 2.0 Äq.) versetzt. Nach Zugabe des 1-Chlorameisensäure-4-nitrophenol (8.9 mg, 0.04 mmol, 1.2 Äq.) wurde die Reaktionslösung 4 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei nach 2 und 4 h Reaktionszeit Proben für die Analyse mit der LC-Q entnommen wurden. Nach einer Reaktionszeit von 4 h waren 94 % des Bhc zu einer Produkt-Nebenproduktmischung umgesetzt. Der Hauptpeak konnte nicht eindeutig als das gewünschte Produkt **21** identifiziert werden.

LC-Q: $t_R = 3.97$ min (siehe Anhang Abbildung A.22).

Testansatz mit Dicarboxylimidazol (CDI) als Aktivierungsreagenz (23)

Bhc (10 mg, 0.04 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem DMF (1 ml) gelöst, mit Carbonyldiimidazol (8.9 mg, 0.06 mmol, 1.5 Äq.) versetzt und 4 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei nach 2 und 4 h Reaktionszeit Proben für die Analyse mit der LC-Q entnommen wurden. Nach einer Reaktionszeit von 4 h wurde das Bhc mit einem Umsatz von 64 % zum aktivierten Derivat **22** umgesetzt.

LC-Q: $t_R = 3.21$ min, $m/z = 364.87, 366.85$ [M+H]⁺ (siehe Anhang Abbildung A.23).

12.9.4. Testkupplungen am VW18-Wang-Harz mit aktiviertem Bhc

Das VW18-Wang-Harz (Beladung 0.16 mmol/g) wurde in DCM gewaschen und mit der Abspaltlösung (1 % TFA, 94 % DCM, 5 % TIS) versetzt (4×2 min). Die Vollständigkeit der Entschützung wurde an einer kleinen Menge Harz durch Zugabe von einer Mischung aus TFA/DCM 1:1 getestet. Das Ausbleiben einer Gelbfärbung zeigte eine vollständige Entschützung an. Das entschützte Harz wurde auf 3×5 mg große Portionen für Kupplungsversuche mit den drei unterschiedlich aktivierten Bhc (**21**, **22**, **23**) aufgeteilt. Exemplarisch wurde der Kupplungsversuch nach DSC-Aktivierung beschrieben.

Kupplungsversuch nach DSC-Aktivierung (**24**)

Nach der DSC-Aktivierung (Kapitel 12.9.3) wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit trockenem DCM (200 μ l) aufgenommen und mit DIPEA (4 μ l, 0.023 mmol) versetzt. 100 μ l der Lösung (0.018 mmol) wurden zum Harz gegeben und für 3 h geschüttelt. Nach der Kupplung wurde das Harz mit DMF und DCM gewaschen. Nach Fmoc-Abspaltung (1×1 min, 2×10 min, 20 % Piperidin in DMF) wurde das Peptid **24** vom Harz abgespalten (Abspaltlösung: 75 % TFA, 20 % DCM, 2.5 % H₂O, 2.5 % TIS) und in kaltem Diethylether gefällt. Der Niederschlag wurde mittels LC-ToF charakterisiert.

HRMS (LC/ToF-MS): $t_R = 3.74$ min, $m/z = 1662.42$ [M+2H]²⁺.

12.9.5. Kupplung der photolabilen Schutzgruppe an die Lysin-Seitenkette des TAMRA-VW18-Peptids

Mtt-Entschützung des Lysin 9 des TAMRA-VW18-Wang Harz

Das TAMRA-VW18-Wang Harz wurde in DCM gewaschen und mit der Abspaltlösung (1 % TFA, 94 % DCM, 5 % TIS) versetzt (4×2 min). Die Vollständigkeit der Entschützung wurde an einer kleinen Menge Harz durch Zugabe von einer Mischung aus TFA/DCM 1/1 getestet. Das Ausbleiben einer Gelbfärbung zeigte eine vollständige Entschützung an.

caged-TAMRA-VW18 (**14**)

15 (0.1 g, 0.12 mmol, 1.0 Äq., 2.5 Äq. bzgl. eingesetzter Harzmenge) wurde in abs. THF (3.5 ml) gelöst und anschließend mit Disuccinimidcarbonat (48 mg, 0.19 mmol, 1.5 Äq.) versetzt. Zuletzt wurde Triethylamin (TEA) (95 μ l, 0.69 mmol, 5.5 Äq.) zugegeben und die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur gerührt. Nach einer Reaktionszeit von 3.5 h und einem Umsatz von 77 % wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (2 ml) aufgenommen und mit DIPEA (42.5 μ l, 0.25 mmol, 5.0 Äq.) versetzt und anschließend auf das Mtt-entschützte Harz gegeben. Nach der entsprechenden Kupplungszeit wurde die Lösung abfiltriert und das Harz mit DMF und DCM gewaschen. Die Kupplungsprozedur wurde zwei mal für

3 h und ein mal über Nacht durchgeführt. Die Abspaltung des Peptids erfolgte für 3 h durch Zugabe der Abspalllösung (94 % TFA, 5 % H₂O, 1 % TIS). Anschließend wurde das Peptid in kaltem Diethylether gefällt, zentrifugiert und mit Ether gewaschen. Der Niederschlag wurde in H₂O aufgenommen und lyophilisiert. Das mit *caged*-TAMRA-VW18-Peptid (**14**) wurde als pinkfarbendes Lyophilisat isoliert (5.5 mg, 2.7 %).

HRMS (LC/ToF-MS): $t_R = 1.882$ min, m/z ber. für C₁₈H₂₉7BrN₃8Na₄O₅4S [M+4Na]⁺: 1039.2545, gef.: 1039.2572, $\Delta = 2.51$ ppm.

12.9.6. Kupplung amyloidogener Peptide an poly(HPMA)

PHN18-*caged*-TAMRA-VW18

Gemäß AAV 3 wurde PHNS-18 (2.6 mg, 0.22 μ mol, 1.0 Äq., Beladung: 0.86 mmol/g) mit **14** (4.5 mg, 1.1 μ mol, 0.5 Äq.) und CR₉ (0.67 mg, 0.44 μ mol, 0.2 Äq.) mit einer Reaktionszeit von 18 h umgesetzt. Das Produkt wurde als pinkfarbendes Lyophilisat erhalten (4.6 mg, Beladung (**14**): 0.095 mmol/g, 2-3 Peptide/Polymerkette; Beladung (CR₉):0.014 mmol/g, 0.4 Peptide/Polymerkette).

12.9.7. Zelluläre Aufnahme des *caged*-TAMRA-VW18-HPMA Konjugats

Die zelluläre Aufnahme des TAMRA-markierten Peptid-HPMA-Konjugats wurde mit Hilfe konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) untersucht. Dazu wurden SH-SY5Y-Zellen (2×10^5 Zellen/ml, 20 μ l/well) in wells eines Objektträgers (μ -slide Angiogenesis, cell-culture treated, Firma *ibidi GmbH*) ausplattiert und für 24 h in DMEM, welches 20 % FCS und 1 % Antibiotika (Pen/Strep) enthielt, kultiviert. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen wurden mit unterschiedlich konzentrierten Lösungen (50, 100, 300 μ M) des Peptid-HPMA-Konjugats (PHN18-*caged*-TAMRA-VW18) und mit den Peptiden TAMRA-VW18 und *caged*-TAMRA-VW18 (**14**) (jeweils 50 μ M) im Medium (DMEM + 2 % FCS ohne Phenolrot-Indikator) bei 37 °C für 60 min inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Polymerlösungen entfernt und die Zellen wurden mit DMEM o. P. mit 20 % FCS und 1 % Antibiotika gewaschen und mit 20 μ l des Mediums versetzt. Zusätzlich zur Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen wurden in Kontrollwells Zellen ohne Substanzen, aber nach Protokoll gleich behandelt. Darüber hinaus ist eine Hälfte der Kontrollen und ein Vergleichswell mit einer 100 μ M-Lösung des Peptid-Polymer-Konjugats unbestrahlt geblieben.

Mikroskopieaufnahmen wurden in der Mikroskop-Facility am FMP mit J. Eichhorst am LSM 780 ausgestattet mit einem 40 \times 1.3 Oil-Objektiv durchgeführt (siehe Methoden Kapitel 11.6.3). Es wurden von den entsprechenden wells Durchlicht- und Fluoreszenzbilder vor, direkt und 1 h nach der UV-Bestrahlung mit einer HBO 50 W Lampe (2 min, $\lambda = 360$ nm) aufgenommen und anschließend in 2-stündigen Abständen.

12.9.8. Bestimmung der Sekundärstruktur

Die CD-Spektren amyloidogener Peptide wurden am CD-Spektrometer J-720 der Firma *Jasco* in Quarz-Küvetten mit einem Durchmesser von 1 mm, bei den Wellenlängen $\lambda = 260$ bis 190 nm und mit 3 bis 25 Wiederholungen bis zu einer Spannung von 800 V aufgenommen. Die eingesetzten Peptidkonzentrationen im Phosphatpuffer pH 7.4 bei 20 °C betragen 50 oder 100 μM . Die Spektren wurden mit einem Pufferspektrum korrigiert.

Anzahl der Peptidbindungen für das PHN18-*caged*-TAMRA-VW18: 213 (WE PHNS-18-Polymer: 155, Summe aus Aminosäuren, TAMRA und Cumarinsystem: 58).

Anzahl der Peptidbindungen für das *caged*-TAMRA-VW18: 28 (26 Aminosäuren, 1 TAMRA, 1 Cumarinsystem).

12.10. Projekt D: Wechselwirkung multivalent-präsentierter PRS-Liganden mit tWW-Domänen in Abhängigkeit von der Struktur des polymeren Trägers

12.10.1. Verwendete Peptidsequenzen

Die Sequenz des Peptids CP1 wurde in der Gruppe von M. Beyermann (FMP Berlin) synthetisiert. Die Synthese des Peptids wurde von Dr. Kai Holland-Nell optimiert, so dass größere Mengen zugänglich waren. Zusätzlich wurde von Dr. Kai Holland-Nell das Literaturpeptid CP1 synthetisiert.

P1: GPPPRGPPPR-NH₂
CP1: CGPPPRGPPPR-NH₂

12.10.2. Kupplung prolinreicher Liganden an poly(HPMA)

PHN13-(P2)₆

Gemäß AAV 3 wurde PHNS-7 (11 mg, 9 μmol , 1.0 Äq., Beladung: 0.870 mmol/g) mit CP1 (17.8 mg, 12.0 μmol , 1.3 Äq.) umgesetzt. Nach erfolgter Gelfiltration und Dialyse (3500 Da cut-off, 36 h) wurde das Produkt als farbloses Lyophilisat erhalten (8.6 mg, 58 %, Beladung: 0.347 mmol/g, 6 Peptide/Polymerkette).

PHN16-(P2)₉

Gemäß AAV 3 wurde PHNS-6 (5.0 mg, 4.6 μmol , 1.0 Äq., Beladung: 0.930 mmol/g) mit CP1 (8.0 mg, 5.2 μmol , 1.2 Äq.) umgesetzt. Nach erfolgter Gelfiltration und Dialyse (3500 Da cut-off, 36 h) wurde das Produkt als farbloses Lyophilisat erhalten (4.7 mg,

72 %, Beladung: 0.417 mmol/g, 9 Peptide/Polymerkette).

12.10.3. Kupplung prolinreicher Liganden an hyperverzweigtes Polyglycerin (hPG)

PG7-(CP1)₂

Gemäß AAV 5 wurde PG-(Mal)₆ (10 mg, 15 µmol, 1.0 Äq., Beladung: 0.73 mmol/g) mit CP1 (11 mg, 9.7 µmol, 1.3 Äq.) umgesetzt. Das Produkt wurde als beigefarbenes Lyophylisat erhalten (13.1 mg, quantitativ, Beladung: 0.210 mmol/g, 2 Peptide/Polymerkette).

PG7-(CP1)₃

Abweichend von AAV 5 wurde PG-(Mal)₁₀ (6 mg, 8 µmol, 1.0 Äq., Beladung: 1.15 mmol/g) mit P2 (15.4 mg, 10,0 µmol, 1.3 Äq.) in einem Phosphatpuffer umgesetzt, welches zusätzlich 50 mM TCEP enthielt. Nach der eigentlichen Kupplungszeit wurde β-Mercaptoethanol (0.73 µl, 10 µmol, 1.3 Äq.) zugegeben und die Reaktionsmischung wurde für weitere 8 h gerührt. Nach erfolgter Gelfiltration und Dialyse mit einer Amicon Ultra Einheit (3500 Da cut-off) wurde das Produkt als beigefarbenes Lyophylisat erhalten (8.1 mg, quantitativ, Beladung: 0.260 mmol/g, 3 Peptide/Polymerkette).

PG7-(CP1)₄

Gemäß AAV3 wurde PG-(Mal)₁₀ (5.2 mg, 5.8 µmol, 1.0 Äq., Beladung: 1.15 mmol/g) mit CP1 (11 mg, 7.5 µmol, 1.2 Äq.) in Anwesenheit von TCEP (1.1 mg, 4.5 µmol, 0.6 Äq.) umgesetzt. Das Produkt wurde als beigefarbenes Lyophylisat isoliert (7.8 mg, quantitativ, Beladung: 0.346 mmol/g, 3-4 Peptide/Polymerkette).

PG7-(CP1)₄-ohne-TCEP

Gemäß AAV 5 wurde PG-(Mal)₁₀ (5 mg, 6 µmol, 1.0 Äq., Beladung: 1.15 mmol/g) mit CP1 (11 mg, 7.5 µmol, 1.2 Äq.) umgesetzt. Das Produkt wurde als beigefarbenes Lyophylisat isoliert (9.8 mg, quantitativ, Beladung: 0.368 mmol/g, 4 Peptide/Polymerkette).

12.10.4. Kupplung prolinreicher Liganden an Dextran

Dex10-(P2)₃

Abweichend von AAV 5 wurde maleimidmodifiziertes Dextran Dex-(Mal)₅ (10 mg, 0.861 µmol, 1.0 Äq., MR553, M_n = 11609 g/mol, 5 Maleimidgruppen) mit CP1 (6.3 mg, 4.3 µmol, 6.5 Äq.) in einer Mischung aus Phosphatpuffer und Formamid (Puffer/Formamid 3:1) umgesetzt. Nach Aufreinigung über Gelfiltration wurde das Produkt als farbloses Lyophylisat isoliert (13.3 mg, quantitativ, Beladung: 0.223 mmol/g, 3 Peptide/Polymerkette).

lymerkette).

12.10.5. Proteinexpression FBP21

Das Protein wurde von M. Wieczorek exprimiert. Für humane Konstrukte des Proteins FBP21 wurden die Reste 122-196, die ein tWW-Fragment kodieren von M. Wieczorek durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt und in pET-28a mit NdeI und XhoI Restriktionsschnittstellen kloniert.

12.10.6. ITC-Messungen

Alle ITC-Messungen wurden von Dr. O. Krylova durchgeführt. Generell wurden Proteinkonzentrationen von 50 bis 100 μM verwendet und typischerweise eine 20-fach höhere Ligandkonzentration (Peptid-Polymerkonjugate). Die Konjugate wurden in demselben Puffer gelöst, in dem das Protein zuletzt dialysiert worden ist, um die Verdünnungseffekte zu minimieren. Alle zu vermessenden Ligand- und Proteinlösungen wurden vor der Messung unter Vakuum entgast. Wenn nicht anders angegeben wurden die Experimente mit 8 μl Injektionen und einer Wartezeit zwischen den Injektionen von 240 s durchgeführt. Zur Kurvenanpassung der Bindungsisotherme und zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D wurden die Programme MicroCal (*Origin*) und Sedphat (*International Institutes of Health, Bethesda, USA*) verwendet.

12.10.7. Theoretische Betrachtungen der Ligand-Protein-Interaktion mit Hilfe von MD-Simulationen

Für die von A. Bujotzek durchgeführte Modellierung und Simulation der Wechselwirkungen zwischen mono- und multivalenten Liganden und dem Protein FBP21 wurden die Atomkoordinaten für die tWW-Domänen aus der von Huang *et al.* gelösten NMR-Struktur mit dem PDB ID Kode 2JXW verwendet.^[197] Die zu untersuchenden Polymere hPG, Dextran und poly(HPMA) wurden jeweils mit drei Peptiden der Sequenz **P1** und den für das jeweilige Polymer typischen Linkern (das zusätzliche Cystein inbegriffen) ausgestattet. Jeweils 10 Wiederholungseinheiten (WE) trennten die einzelnen Peptide voneinander, was der tatsächlichen Peptidbeladung von etwa 10 % entsprach. Für die Modellierung des Bindungsverhaltens wurden MD-Simulationen für eine Systemkombination bestehend aus zwei polymeren Konjugaten und drei tWW-Domänen bei 8 °C und unter Berücksichtigung der Anwesenheit von Lösungsmittelmolekülen durchgeführt. Zur Zeit wird im Verlauf der MD-Simulation der Abstand der Massezentren der betrachteten Polymer-Protein-Komplexe berechnet. Eine Veränderung der räumlichen Anordnung der Polymere zueinander sollte über mögliche Aggregationvorgänge Aufschluss geben.

Darüber hinaus wurden die beim Bindungsvorgang eintretenden konformativen Entropieänderungen für die unterschiedlichen Polymerkonjugate berechnet und miteinander verglichen. Dabei wurden in die Berechnungen der Konformationsänderung folgende Anteile mit einbezogen: i) flexibler Linker, der die tWW-Domänen verbrückt

und ii) Konjugate bestehend aus Polymerrückrat, Peptidrückrat und Linker zwischen Polymer und Ligand. Die ersten 5 ns der Gesamtsimulationsdauer von 20 ns wurden verworfen, um ausschließlich Wechselwirkungen eines equilibrierten Systems zu erfassen.

13. Literatur

1. L. Gros, H. Ringsdorf, H. Schupp, „Polymere Antitumormittel auf molekularer und zellulärer Basis“, *Angew. Chem.* **1981**, *93*, 311–332 (siehe S. 2).
2. R. Haag, F. Kratz, „Polymer Therapeutics: Concepts and Applications“, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1198–1215 (siehe S. 2, 4).
3. J. Jagur-Grodzinski, „Polymers for targeted and/or sustained drug delivery“, *Polym. Adv. Technol.* **2009**, *20*, 595–606 (siehe S. 2).
4. N. Seewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, WILEY-VCH Verlag GmbH, **2002**, 61 ff. (Siehe S. 2, 67).
5. R. Duncan, „The dawning era of polymer therapeutics“, eng, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2003**, *2*, 347–360 (siehe S. 4, 9).
6. H. Ringsdorf, „Structure and Properties of Pharmacologically Active Polymers“, *J. Polym. Sci.* **1975**, 135–153 (siehe S. 4).
7. G. Gregoriadis, „Targeting of drugs“, eng, *Nature* **1977**, *265*, 407–411 (siehe S. 5).
8. S. Manchun, C. R. Dass, P. Sriamornsak, „Targeted therapy for cancer using pH-responsive nanocarrier systems“, eng, *Life Sci.* **2012**, *90*, 381–387 (siehe S. 5 f.).
9. V. P. Torchilin, A. N. Lukyanov, „Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions“, *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 259–266 (siehe S. 5).
10. J. Khandare, T. Minko, „Polymer–drug conjugates: Progress in polymeric prodrugs“, *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 359–397 (siehe S. 5, 9).
11. H. Maeda, T. Matsumoto, T. Konno, K. Iwai, M. Ueda, „Tailor-Making of Protein Drugs by Polymer Conjugation for Tumor Targeting: A Brief Review on Smancs“, *J. Protein Chem.* **1984**, *3*, 181–193 (siehe S. 5).
12. Y. Matsumura, H. Maeda, „A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs“, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387–6392 (siehe S. 5).
13. L. W. Seymour, Y. Miyamoto, H. Maeda, M. Brereton, J. Strohalm, K. Ulbrich, R. Duncan, „Influence of Molecular Weight on Passive Tumour Accumulation of a Soluble Macromolecular Drug Carrier“, *Eur. J. Cancer* **1995**, *31A*, 766–770 (siehe S. 5).

14. G. J. Doherty, H. T. McMahon, „Mechanisms of Endocytosis“, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 857–902 (siehe S. 6).
15. S. C. Silverstein, R. M. Steinman, Z. A. Cohn, „Endocytosis“, eng, *Annu. Rev. Biochem.* **1977**, *46*, 669–722 (siehe S. 6).
16. V. Haucke, „Cargo Takes Control of Endocytosis“, *Cell* **2006**, *127*, 35–37 (siehe S. 6).
17. S. B. Conner, S. L. Schmid, „Regulated portals of entry into the cell“, *Nature* **2003**, *422*, 37–44 (siehe S. 6).
18. N. Jung, V. Haucke, „Clathrin-Mediated Endocytosis at Synapses“, *Traffic* **2007**, *8*, 1129–1136 (siehe S. 6).
19. C. Dyer, D. Cistola, G. C. Parry, L. K. Curtiss, „Structural features of synthetic peptides of apolipoprotein E that bind the LDL receptor“, eng, *J. Lipid Res.* **1995**, *36*, 80–88 (siehe S. 6).
20. A. Laatsch, M. Panteli, M. Sornsakrin, B. Hoffzimmer, T. Grewal, J. Heeren, „Low density lipoprotein receptor-related protein 1 dependent endosomal trapping and recycling of apolipoprotein E“, eng, *PLoS One* **2012**, *7*, e29385 (siehe S. 6).
21. J. A. Mindell, „Lysosomal acidification mechanisms“, eng, *Annu. Rev. Physiol.* **2012**, *74*, 69–86 (siehe S. 6).
22. C. D. Duve, T. D. Barsy, B. Poole, A. Trouet, P. Tulkens, F. V. Hoof, „Lysosomotropic agents“, *Biochem. Pharmacol.* **1974**, *23*, 2495–2510 (siehe S. 7).
23. P. H. Ehrlich, „The effect of multivalency on the specificity of protein and cell interactions“, *J. theor. Biol.* **1979**, *81*, 123–127 (siehe S. 7).
24. M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, „Effective Inhibitors of Hemagglutination by Influenza Virus Synthesized from Polymers Having Active Ester Groups. Insight into Mechanism of Inhibition“, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4179–4190 (siehe S. 7).
25. M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, „Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors“, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794 (siehe S. 7 f.).
26. A. Mulder, J. Huskens, D. N. Reinhoudt, „Multivalency in supramolecular chemistry and nanofabrication.“, *Org Biomol Chem* **2004**, *2*, 3409–3424 (siehe S. 7 ff.).
27. H. W. Gibson, N. Yamaguchi, W. Jones, „Supramolecular pseudorotaxane polymers from complementary pairs of homoditopic molecules“, eng, *J. Am. Chem. Soc* **2003**, *125*, 3522–3533 (siehe S. 7).
28. S. H. M. Söntjens, R. P. Sijbesma, M. H. P. van Genderen, E. W. Meijer, „Selective Formation of Cyclic Dimers in Solutions of Reversible Supramolecular Polymers“, *Macromolecules* **2001**, *34*, 3815–3818 (siehe S. 7).

-
29. D. Pagé, R. Roy, „Synthesis and biological properties of mannosylated starburst poly(amidoamine) dendrimers“, eng, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 714–723 (siehe S. 8, 104).
 30. E. K. Woller, E. D. Walter, J. R. Morgan, D. J. Singel, M. J. Cloninger, „Altering the strength of lectin binding interactions and controlling the amount of lectin clustering using mannose/hydroxyl-functionalized dendrimers“, eng, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8820–8826 (siehe S. 8, 104).
 31. R. H. Kramer, J. W. Karpen, „Spanning binding sites on allosteric proteins with polymer-linked ligand dimers“, *Nature* **1998**, *395*, 710–713 (siehe S. 9).
 32. A. Abuchowski, J. R. McCoy, N. C. Palczuk, T. van Es, F. F. Davis, „Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase“, eng, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3582–3586 (siehe S. 9).
 33. A. Abuchowski, T. van Es, N. C. Palczuk, F. F. Davis, „Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol.“, eng, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3578–3581 (siehe S. 9).
 34. C. Elvira, A. Gallardo, J. S. Roman, A. Cifuentes, „Covalent Polymer-Drug Conjugates“, *Molecules* **2005**, *10*, 114–125 (siehe S. 9).
 35. R. Duncan, „Polymer conjugates as anticancer nanomedicines“, *Nature Rev.* **2006**, *6*, 688–701 (siehe S. 9 f.).
 36. S. Danhauser-Riedl, E. Hausmann, H. D. Schick, R. Bender, H. Dietzfelbinger, J. Rastetter, A. R. Hanauske, „Phase I clinical and pharmacokinetic trial of dextran conjugated doxorubicin (AD-70, DOX-OXD)“, eng, *Invest. New Drugs* **1993**, *11*, 187–195 (siehe S. 10).
 37. R. Gaspar, R. Duncan, „Polymeric carriers: Preclinical safety and the regulatory implications for design and development of polymer therapeutics“, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, Polymer Therapeutics: Clinical Applications and Challenges for Development, 1220–1231 (siehe S. 10).
 38. J. C. Langer, „CT-2103: a novel macromolecular taxane with potential advantages compared with conventional taxanes“, eng, *Clin. Lung Cancer* **2004**, *6*, S85–S88 (siehe S. 10).
 39. P. A. Vasey, S. B. Kaye, R. Morrison, C. Twelves, P. Wilson, R. Duncan, A. H. Thomson, L. S. Murray, T. E. Hilditch, T. Murray, S. Burtles, D. Fraier, E. Frigerio, J. Cassidy, „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. Cancer Research Campaign Phase I/II Committee“, eng, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 83–94 (siehe S. 10).
 40. P. M. Loadman, M. C. Bibby, J. A. Double, „Pharmacokinetics of PK1 and Doxorubicin in Experimental Colon Tumor Models with Differing Responses to PK1“, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 3682–3688 (siehe S. 10).

41. J. Kopeček, H. Bazilova, „Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]. 1. Radical polymerization and copolymerization“, *Eur. Polym. J.* **1973**, *9*, 7–14 (siehe S. 11).
42. J. Kopeček, L. Šprincl, D. Lim, „New Types of Synthetic Infusion Solutions. I. Investigation of the Effect of Solutions of Some Hydrophilic Polymers on Blood“, *J. Biomed. Mater. Res.* **1973**, *7*, 179–191 (siehe S. 11 f.).
43. J. Strohalm, J. Kopeček, „Poly [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide]“, *Die Angewandte Makromolekulare Chemie* **1978**, *70*, 109–118 (siehe S. 11 f.).
44. L. Šprincl, J. Exner, O. Sterba, J. Kopeček, „New types of synthetic infusion solutions. III. Elimination and retention of poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] in a test organism“, *J. Biomed. Mater. Res.* **1976**, *10*, 953–963 (siehe S. 11).
45. D. P. Nowotnik, E. Cvitkovic, „ProLindac (AP5346): A review of the development of an HPMA DACH platinum Polymer Therapeutic.“, eng, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 1214–1219 (siehe S. 11).
46. J. Kopeček, P. Kopečková, T. Minko, Z.-R. Lu, „HPMA copolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action“, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 61–81 (siehe S. 11, 22).
47. R. Duncan, „Development of HPMA copolymer–anticancer conjugates: Clinical experience and lessons learnt“, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 1131–1148 (siehe S. 11).
48. R. Duncan, M. J. Vicent, „Do HPMA copolymer conjugates have a future as clinically useful nanomedicines? A critical overview of current status and future opportunities“, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 272–282 (siehe S. 11).
49. J. Kopeček, P. Kopečková, „HPMA copolymers: origins, early developments, present, and future“, eng, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 122–149 (siehe S. 11).
50. T. Lammers, K. Ulbrich, „HPMA copolymers: 30 years of advances“, eng, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 119–121 (siehe S. 11).
51. T. Lammers, R. Kühnlein, M. Kissel, V. Subr, T. Etrych, R. Pola, M. Pechar, K. Ulbrich, G. Storm, P. Huber, P. Peschke, „Effect of physicochemical modification on the biodistribution and tumor accumulation of HPMA copolymers“, *J. Controlled Release* **2005**, *110*, 103–118 (siehe S. 12).
52. J. Drobnik, J. Kopeček, J. Labsky, P. Rejmanová, J. Exner, V. Saudek, J. Kalal, „Enzymatic Cleavage of Side Chains of Synthetic Water-Soluble Polymers“, *Makromol. Chem.* **1976**, *177*, 2833–2848 (siehe S. 12, 29).
53. J. Kopeček, „Reactive Copolymers of N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide with N-Methacryloylated Derivatives of L-Leucine and L-Phenylalanine, 1“, *Makromol. Chem.* **1977**, *178*, 2169–2183 (siehe S. 12, 22).

-
54. H.-G. Elias, *Makromoleküle, Bd. 5*, Hüthig und Wepf Verlag Basel, **1990** (siehe S. 13, 15, 21).
 55. Z.-R. Lu, P. Kopečková, Z. Wu, J. Kopeček, „Synthesis of semitelechelic poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] by radical polymerization in the presence of alkyl mercaptans“, *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, *200*, 2022–2030 (siehe S. 13 f.).
 56. D. Wang, P. Kopečková, T. Minko, V. Nanayakkara, J. Kopeček, „Synthesis of Starlike N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymers: Potential Drug Carriers“, *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 313–319 (siehe S. 14).
 57. M. Szwarc, M. Levy, R. M. Milkovich, „Polymerization initiated by electron transfer to monomer: A new method of formation of block polymers“, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 2656–2657 (siehe S. 14).
 58. T. Otsu, M. Yoshida, „Role of Initiator-Transfer Agent-Terminator (Iniferter) in Radical Polymerizations: Polymer Design by Organic Disulfides as Iniferters“, *Macromol. Rapid Commun.* **1982**, *3*, 127–132 (siehe S. 15).
 59. M. Kato, M. Kamigaito, M. Sawamoto, T. Higashimura, „Polymerization of Methyl Methacrylate with the Carbon Tetrachloride/Dichlorotris-(triphenylphosphine)ruthenium(II)/ Methylaluminum Bis(2,6-di-tert-butylphenoxide) Initiating System: Possibility of Living Radical Polymerization“, *Macromolecules* **1995**, *28*, 1721–1723 (siehe S. 15).
 60. J.-S. Wang, K. Matyjaszewski, „Controlled "Living" Radical Polymerization. Atom Transfer Radical Polymerization in the Presence of Transition-Metal Complexes“, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5614–5615 (siehe S. 15 f.).
 61. M. Teodorescu, K. Matyjaszewski, „Atom Transfer Radical Polymerization of (Meth)acrylamides“, *Macromolecules* **1999**, *32*, 4826–4831 (siehe S. 16).
 62. M. Teodorescu, K. Matyjaszewski, „Controlled polymerization of (meth)acrylamides by atom transfer radical polymerization“, *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, *21*, 190–194 (siehe S. 16).
 63. J. Chiefari, Y. K. Chong, F. Ercole, J. Krstina, J. Jeffery, T. P. T. Le, R. T. A. Mayadunne, G. F. Meijs, C. L. Moad, G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, „Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process“, *Macromolecules* **1998**, *31*, 5559–5562 (siehe S. 16).
 64. Y. K. Chong, T. P. T. Le, G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, „A More Versatile Route to Block Copolymers and Other Polymers of Complex Architecture by Living Radical Polymerization: The RAFT Process“, *Macromolecules* **1999**, *32*, 2071–2074 (siehe S. 16).
 65. G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, „Toward Living Radical Polymerization“, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1133–1142 (siehe S. 17 ff.).

66. H. de Brouwer, *RAFT memorabilia: living radical polymerization in homogeneous and heterogeneous media*, Universiteitsdrukkerij, Technische Universiteit Eindhoven, **2001** (siehe S. 17).
67. C. W. Scales, Y. A. Vasilieva, A. J. Convertine, A. B. Lowe, C. L. McCormick, „Direct, Controlled Synthesis of the Nonimmunogenic, Hydrophilic Polymer, Poly(N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide) via RAFT in Aqueous Media“, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1846–1850 (siehe S. 18, 25).
68. C. W. Scales, F. Huang, N. Li, Y. A. Vasilieva, J. Ray, A. J. Convertine, C. L. McCormick, „Corona-Stabilized Interpolyelectrolyte Complexes of siRNA with Nonimmunogenic, Hydrophilic/Cationic Block Copolymers Prepared by Aqueous RAFT Polymerization“, *Macromolecules* **2006**, *39*, 6871–6881 (siehe S. 19).
69. A. W. York, C. W. Scales, F. Huang, C. L. McCormick, „Facile Synthetic Procedure for omega, Primary Amine Functionalization Directly in Water for Subsequent Fluorescent Labeling and Potential Bioconjugation of RAFT-Synthesized (Co)Polymers“, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 2337–2341 (siehe S. 19 f.).
70. A. W. York, F. Huang, C. L. McCormick, „Rational design of targeted cancer therapeutics through the multiconjugation of folate and cleavable siRNA to RAFT-synthesized (HPMA-s-APMA) copolymers“, eng, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 505–514 (siehe S. 19).
71. S. Kirkland-York, Y. Zhang, A. E. Smith, A. W. York, F. Huang, C. L. McCormick, „Tailored Design of Au Nanoparticle-siRNA Carriers Utilizing Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymers“, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1052–1059 (siehe S. 19).
72. Z. Jia, L. Wong, T. P. Davis, V. Bulmus, „One-pot conversion of RAFT-generated multifunctional block copolymers of HPMA to doxorubicin conjugated acid- and reductant-sensitive crosslinked micelles.“, eng, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 3106–3113 (siehe S. 19).
73. H. Pan, J. Yang, P. Kopečková, J. Kopeček, „Backbone Degradable Multiblock N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymer Conjugates via Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization and Thiol-ene Coupling Reaction“, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 247–252 (siehe S. 19).
74. L. Tao, J. Xu, D. Gell, T. P. Davis, „Synthesis, Characterization, and Bioactivity of Mid-Functional PolyHPMA-Lysozyme Bioconjugates“, *Macromolecules* **2010**, *43*, 3721–3727 (siehe S. 19).
75. X.-M. Liu, L.-D. Quan, J. Tian, Y. Alnouti, K. Fu, G. M. Thiele, D. Wang, „Synthesis and evaluation of a well-defined HPMA copolymer-dexamethasone conjugate for effective treatment of rheumatoid arthritis“, eng, *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 2910–2919 (siehe S. 19).

-
76. M. J. Yanjarappa, K. V. Gujraty, A. Joshi, A. Saraph, R. S. Kane, „Synthesis of copolymers containing an active ester of methacrylic acid by RAFT: Controlled molecular weight scaffolds for biofunctionalization“, eng, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 1665–1670 (siehe S. 19, 22).
 77. A. Postma, T. P. Davis, G. Moad, M. S. O’Shea, „Thermolysis of RAFT-Synthesized Polymers. A Convenient Method for Trithiocarbonate Group Elimination“, *Macromolecules* **2005**, *38*, 5371–5374 (siehe S. 20).
 78. G. Moad, Y. K. Chong, A. Postma, E. Rizzardo, S. H. Thang, „Advances in RAFT polymerization: the synthesis of polymers with defined end-groups“, *Polymer* **2005**, *46*, 8458–8468 (siehe S. 20, 37).
 79. M. G. Chen, P. Kenneth, S. H. Thang, J. White, G. J. Wilsonn, „Synthesis and fluorescence of a series of multichromophoric acenaphthenyl compounds“, eng, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1844–1852 (siehe S. 20).
 80. Y. K. Chong, G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, „Thiocarbonylthio End Group Removal from RAFT-Synthesized Polymers by Radical-Induced Reduction“, *Macromolecules* **2007**, *40*, 4446–4455 (siehe S. 20 f.).
 81. M. Deletre, G. Levesque, „Kinetics and Mechanism of Polythioamidation in Solution. 1. Reaction of Mono- and Bis(dithioester)s with Excess Amine“, *Macromolecules* **1990**, *23*, 4733–4741 (siehe S. 20).
 82. H. Willcock, R. K. O’Reilly, „End group removal and modification of RAFT polymers“, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 149–157 (siehe S. 20).
 83. J. Xu, J. He, D. Fan, X. Wang, Y. Yang, „Aminolysis of Polymers with Thiocarbonylthio Termini Prepared by RAFT Polymerization: The Difference between Polystyrene and Polymethacrylates“, *Macromolecules* **2006**, *39*, 8616–8624 (siehe S. 20).
 84. C. Schilli, M. G. Lanzendörfer, A. H. E. Müller, „Benzyl and Cumyl Dithiocarbamates as Chain Transfer Agents in the RAFT Polymerization of N-Isopropylacrylamide. In Situ FT-NIR and MALDI-TOF MS Investigation“, *Macromolecules* **2002**, *35*, 6819–6827 (siehe S. 20).
 85. M.-F. Llauro, J. Loiseau, F. Boisson, F. Delolme, C. Ladaviere, J. Claverie, „Unexpected End-Groups of Poly(acrylic Acid) Prepared by RAFT Polymerization“, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2004**, *42*, 5439–5462 (siehe S. 20).
 86. C. W. Scales, A. J. Convertine, C. L. McCormick, „Fluorescent Labeling of RAFT-Generated Poly(N-isopropylacrylamide) via a Facile Maleimide-Thiol Coupling Reaction†“, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 1389–1392 (siehe S. 20).
 87. C. Boyer, A. Granville, T. P. Davis, V. Bulmus, „Modification of RAFT-Polymers via Thiol-Ene Reactions: A General Route to Functional Polymers and New Architectures“, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2009**, *47*, 3773–3794 (siehe S. 20).

88. S. Perrier, P. Takolpuckdee, C. A. Mars, „Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization: End Group Modification for Functionalized Polymers and Chain Transfer Agent Recovery“, *Macromolecules* **2005**, *38*, 2033–2036 (siehe S. 20).
89. M. Chen, K. P. Ghiggino, T. A. Smith, S. H. Thang, G. J. Wilson, „Mechanism of Excimer Formation in Poly(acenphtylene)“, *Aust. J. Chem* **2004**, *57*, 1175–1177 (siehe S. 20).
90. B. Apostolovic, H.-A. Klok, „Copolymerization Behavior of N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide and a Methacrylated Coiled-Coil Peptide Derivative“, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1891–1895 (siehe S. 21).
91. A. Spaltenstein, G. M. Whitesides, „Polyacrylamides Bearing Pendant α -Sialoside Groups Strongly Inhibit Agglutination of Erythrocytes by Influenza Virus“, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 686–687 (siehe S. 21).
92. J. N. Johnson, R. S. Burke, A. J. Convertine, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, S. H. Pun, „Synthesis of Statistical Copolymers Containing Multiple Functional Peptides for Nucleic Acid Delivery“, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 3007–3013 (siehe S. 21).
93. K. Wu, J. Yang, C. Konak, P. Kopečková, J. Kopeček, „Novel Synthesis of HPMA Copolymers Containing Peptide Grafts and Their Self-Assembly Into Hybrid Hydrogels“, *Macromol. Chem. Phys.* **2008**, *209*, 467–475 (siehe S. 21).
94. B. Apostolovic, S. P. E. Deacon, R. Duncan, H.-A. Klok, „Hybrid Polymer Therapeutics Incorporating Bioresponsive, Coiled Coil Peptide Linkers“, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1187–1195 (siehe S. 21, 85).
95. J. Kopeček, P. R. á, V. Chytrý, „Polymers Containing Enzymatically Degradable Bonds, 1. Chymotrypsin Catalyzed Hydrolysis of p-Nitroanilides of Phenylalanine and Tyrosine Attached to Side-Chains of Copolymers of N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide“, *Makromol. Chem.* **1981**, *182*, 799–809 (siehe S. 22).
96. P. Rejmanová, J. Kopeček, „Polymers Containing Enzymatically Degradable Bonds: Degradation of Oligopeptide Sequences in N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide Copolymers by Bovine Spleen Cathepsin B“, *Makromol. Chem.* **1983**, *184*, 2009–2020 (siehe S. 22).
97. R. Duncan, H. C. Cable, J. B. Lloyd, P. Rejmanová, J. Kopeček, „Polymers Containing Enzymatically Degradable Bonds, 7. Design of Oligopeptide Side-chains in Poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] Copolymers to Promote Efficient Degradation by Lysosomal Enzymes“, *Makromol. Chem.* **1983**, *184*, 1997–2008 (siehe S. 22).

-
98. P. A. Flanagan, P. Kopečková, J. Kopeček, R. Duncan, „Evaluation of protein-N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer conjugates as targetable drug carriers. 1. Binding, pinocytic uptake and intracellular distribution of transferrin and anti-transferrin receptor antibody conjugates“, *Biochimica et Biophysica Acta* **1989**, *993*, 83–91 (siehe S. 22).
 99. P. A. Flanagan, R. Duncan, V. Šubr, K. Ulbrich, P. Kopečková, J. Kopeček, „Evaluation of protein-N(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer conjugates as targetable drug-carriers. 2. Body distribution of conjugates containing transferrin, anti-transferrin receptor antibody or anti-Thy 1.2 antibody and effectiveness of transferrin-containing daunomycin conjugates against mouse L1210 leukaemia in vivo“, *J. Control. Release* **1992**, *18*, 25–38 (siehe S. 22).
 100. V. Omelyanenko, C. Gentry, P. Kopečková, J. Kopeček, „HPMA copolymer-anticancer drug-OC-TL 16 antibody conjugates. II. Processing in epithelial ovarian carcinoma cells in vitro“, *Int. J. Cancer* **1998**, *75*, 600–608 (siehe S. 22).
 101. Y. Kasuya, Z.-R. Lu, P. Kopečková, T. Minko, S. E. Tabibi, J. Kopeček, „Synthesis and characterization of HPMA copolymer–aminopropylgeldanamycin conjugates“, *J. Control. Release* **2001**, *74*, 203–211 (siehe S. 22).
 102. A. Nori, K. D. Jensen, M. Tijerina, P. Kopečková, J. Kopeček, „Tat-conjugated synthetic macromolecules facilitate cytoplasmic drug delivery to human ovarian carcinoma cells“, eng, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 44–50 (siehe S. 22).
 103. M. Barz, M. Tarantola, K. Fischer, M. Schmidt, R. Luxenhofer, A. Janshoff, P. Theato, R. Zentel, „From Defined Reactive Diblock Copolymers to Functional HPMA-Based Self-Assembled Nanoaggregates“, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 3114–3118 (siehe S. 22, 31).
 104. M. Barz, F. Canal, K. Koynov, R. Zentel, M. J. Vicent, „Synthesis and In Vitro Evaluation of Defined HPMA Folate Conjugates: Influence of Aggregation on Folate Receptor (FR) Mediated Cellular Uptake“, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2274–2282 (siehe S. 22, 31).
 105. B. Parrish, R. B. Breitenkamp, T. Emrick, „PEG- and peptide-grafted aliphatic polyesters by click chemistry.“, eng, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7404–7410 (siehe S. 22 f.).
 106. C. D. Hein, X.-M. Liu, D. Wang, „Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences.“, eng, *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 2216–2230 (siehe S. 22).
 107. M. Calderón, R. Graeser, F. Kratz, R. Haag, „Development of enzymatically cleavable prodrugs derived from dendritic polyglycerol“, eng, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3725–3728 (siehe S. 23).
 108. R. J. Pounder, M. J. Stanford, P. Brooks, S. P. Richards, A. P. Dove, „Metal free thiol–maleimide Click reaction as a mild functionalisation strategy for degradable polymers“, *Chem. Commun.* **2008**, 5158–5160 (siehe S. 23).

109. C. D. Pieve, P. Williams, D. M. Haddleton, R. M. J. Palmer, S. Missailidis, „Modification of Thiol Functionalized Aptamers by Conjugation of Synthetic Polymers“, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 169–174 (siehe S. 23).
110. P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. H. Kent, „Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation“, *Science* **1994**, *266*, 776–779 (siehe S. 23).
111. L. E. Canne, S. J. Bark, S. B. H. Kent, „Extending the Applicability of Native Chemical Ligation“, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5891–5896 (siehe S. 24).
112. P. Dawson, S. B. H. Kent, „Synthesis of native proteins by chemical ligation“, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923–960 (siehe S. 24).
113. S. B. H. Kent, „Total chemical synthesis of proteins“, eng, *Chem Soc Rev* **2009**, *38*, 338–351 (siehe S. 24 f.).
114. I. van Baal, H. Malda, S. A. Synowsky, J. L. J. van Dongen, T. M. Hackeng, M. Merckx, E. W. Meijer, „Multivalent Peptide and Protein Dendrimers Using Native Chemical Ligation“, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5053–5057 (siehe S. 24).
115. A. Dirksen, E. W. Meijer, W. Adriaens, T. M. Hackeng, „Strategy for the synthesis of multivalent peptide-based nonsymmetric dendrimers by native chemical ligation“, eng, *Chem. Commun.* **2006**, 1667–1669 (siehe S. 24).
116. I. R. Ruttekolk, F. Duchardt, R. Fischer, K.-H. Wiesmüller, J. Rademann, R. Brock, „HPMA as a Scaffold for the Modular Assembly of Functional Peptide Polymers by Native Chemical Ligation“, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2081–2087 (siehe S. 25).
117. W. P. R. Verdurmen, M. Thanos, I. R. Ruttekolk, E. Gulbins, R. Brock, „Cationic cell-penetrating peptides induce ceramide formation via acid sphingomyelinase: implications for uptake“, eng, *J. Control. Release* **2010**, *147*, 171–179 (siehe S. 25, 44).
118. E. C. B. Johnson, S. B. H. Kent, „Insights into the Mechanism and Catalysis of the Native Chemical Ligation Reaction“, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6640–6646 (siehe S. 28).
119. C. P. R. Hackenberger, D. Schwarzer, „Chemoselective Ligation and Modification Strategies for Peptides and Proteins“, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030–10074 (siehe S. 28).
120. T. M. Hackeng, J. H. Griffin, P. E. Dawson, „Protein synthesis by native chemical ligation: expanded scope by using straightforward methodology“, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 10068–10073 (siehe S. 28).
121. B. M. Ruiz, K. Geurts, M. A. Fernandez-Ibanez, B. ter Horst, A. J. Minnaard, B. L. Feringa, „Highly Versatile Enantioselective Conjugate Addition of Grignard Reagents to α , β -Unsaturated Thioesters“, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5123–5126 (siehe S. 29).

-
122. S. R. Blanke, R. V. Blanke, „The Schotten-Baumann reaction as an aid to the analysis of polar compounds: application to the determination of tris(hydroxymethyl)aminomethane (THAM).“, eng, *J. Anal. Toxicol.* **1984**, *8*, 231–233 (siehe S. 29).
 123. J. M. Rathfon, G. N. Tew, „Synthesis of thermoresponsive poly(N-isopropylmethacrylamide) and poly(acrylic acid) block copolymers via post-functionalization of poly(N-methacryloxysuccinimide)“, *Polymer* **2008**, *49*, 1761–1769 (siehe S. 31).
 124. C. A. Lipinski, F. Lombardo, P. J. F. B. W. Dominy, „Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings“, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3–26 (siehe S. 43).
 125. E. Leupold, Diss., Freie Universität Berlin, **2009** (siehe S. 43).
 126. F. L. Guillot, K. L. Audus, T. J. Raub, „Fluid-phase endocytosis by primary cultures of bovine brain microvessel endothelial cell monolayers“, *Microvasc. Res.* **1990**, *39*, 1–14 (siehe S. 43).
 127. R. V. Iozzo, „Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function“, eng, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 609–652 (siehe S. 43).
 128. M. Bernfield, M. Götte, P. W. Park, O. Reizes, M. L. Fitzgerald, J. Lincecum, M. Zako, „Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans“, eng, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 729–777 (siehe S. 43).
 129. M. Zorko, Ü. Langel, „Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery“, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 529–545 (siehe S. 44 f.).
 130. D. Derossi, A. H. Joliot, G. Chassaing, A. Prochiantz, „The Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Translocates through Biological Membranes“, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10444–10450 (siehe S. 44).
 131. J. P. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M. J. Gait, L. V. Chernomordik, B. Lebleu, „Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake“, eng, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 585–590 (siehe S. 44).
 132. F. Duchardt, M. Fotin-Mleczek, H. Schwarz, R. Fischer, R. Brock, „A Comprehensive Model for the Cellular Uptake of Cationic Cell-penetrating Peptides“, *Traffic* **2007**, *8*, 848–866 (siehe S. 44).
 133. C.-Y. Jiao, D. Delaroche, F. Burlina, I. D. Alves, G. Chassaing, S. Sagan, „Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization“, eng, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 33957–33965 (siehe S. 44).
 134. P. Säälük, A. Niinep, J. Pae, M. Hansen, D. Lubenets, Ü. Langel, M. Pooga, „Penetration without cells: membrane translocation of cell-penetrating peptides in the model giant plasma membrane vesicles“, eng, *J. Control. Release* **2011**, *153*, 117–125 (siehe S. 44).

135. D. J. Mitchell, D. T. Kim, L. Steinman, C. G. Fathman, J. B. Rothbard, „Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers“, eng, *J. Pept. Res.* **2000**, *56*, 318–325 (siehe S. 44).
136. S. M. Fuchs, R. T. Raines, „Pathway for polyarginine entry into mammalian cells“, eng, *Biochemistry* **2004**, *43*, 2438–2444 (siehe S. 44).
137. P. A. Wender, D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman, J. B. Rothbard, „The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters“, eng, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2000**, *97*, 13003–13008 (siehe S. 44).
138. J. B. Rothbard, T. C. Jessop, P. A. Wender, „Adaptive translocation: the role of hydrogen bonding and membrane potential in the uptake of guanidinium-rich transporters into cells“, eng, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 495–504 (siehe S. 44).
139. B. Gupta, T. S. Levchenko, V. P. Torchilin, „Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-penetrating proteins and peptides“, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 637–651 (siehe S. 45).
140. E. Leupold, H. Nikolenko, M. Dathe, „Apolipoprotein E peptide-modified colloidal carriers: the design determines the mechanism of uptake in vascular endothelial cells“, *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 442–449 (siehe S. 45).
141. R. Ingenito, E. Bianchi, D. Fattori, A. Pessi, „Solid Phase Synthesis of Peptide C-Terminal Thioesters by Fmoc/t-Bu Chemistry“, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11369–11374 (siehe S. 46).
142. R. H. Müller, *Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, **1996** (siehe S. 46, 117).
143. A. C. Hunter, „Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity.“, eng, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 1523–1531 (siehe S. 47).
144. M. V. Berridge, A. S. Tan, „Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction“, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, *303*, 474–482 (siehe S. 48).
145. W. Liu, A. B. Greytak, J. L., C. R. Wong, J. Park, L. F. Marshall, W. Jiang, P. N. Curtin, A. Y. Ting, D. G. Nocera, D. Fukumura, R. K. Jain, M. G. Bawendi, „Compact biocompatible quantum dots via RAFT-mediated synthesis of imidazole-based random copolymer ligand“, eng, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 472–483 (siehe S. 50).
146. D. W. Goddette, C. Frieden, „The Kinetics of Cytochalasin D Binding to Monomeric Actin“, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 15970–1597 (siehe S. 52).

-
147. M. D. Flanagan, S. Lin, „Cytochalasins Block Actin Filament Elongation by Binding to High Affinity Sites Associated with F-actin“, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 835–838 (siehe S. 52).
 148. L. H. Wang, K. G. Rothberg, R. G. Anderson, „Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation.“, eng, *J. Cell. Biol.* **Dez. 1993**, *123*, 1107–1117 (siehe S. 52).
 149. K. G. Rothberg, J. E. Heuser, W. C. Donzell, Y. S. Ying, J. R. Glenney, R. G. Anderson, „Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats.“, eng, *Cell* **1992**, *68*, 673–682 (siehe S. 52).
 150. N. Araki, M. T. Johnson, J. A. Swanson, „A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages.“, eng, *J. Biol. Chem.* **1996**, *135*, 1249–1260 (siehe S. 53).
 151. V. Heinemann, *Bauchspeicheldrüsenkrebs*, (Hrsg.: G.-W. Roche Pharma AG), **2011** (siehe S. 55).
 152. R. T. Greenlee, M. B. Hill-Harmon, T. Murray, M. Thun, „Cancer statistics, 2001“, *CA Cancer J. Clin.* **2001**, *51*, 15–36 (siehe S. 55).
 153. B. S. Meyer, Diss., Freie Universität Berlin, **2011** (siehe S. 55 ff., 60, 62, 64).
 154. L. C. Patten, D. H. Berger, „Role of proteases in pancreatic carcinoma“, eng, *World J. Surg.* **2005**, *29*, 258–263 (siehe S. 55).
 155. A. Agrawal, D. Romero-Perez, J. A. Jacobsen, F. J. Villarreal, S. M. Cohen, „Zinc-binding groups modulate selective inhibition of MMPs“, eng, *ChemMed-Chem* **2008**, *3*, 812–820 (siehe S. 56).
 156. D. Pei, S. J. Weiss, „Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen.“, *Nature* **1995**, *375*, 244–247 (siehe S. 56).
 157. D. Luo, B. Mari, I. Stoll, P. Anglard, „Alternative splicing and promoter usage generates an intracellular stromelysin 3 isoform directly translated as an active matrix metalloproteinase“, eng, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25527–25536 (siehe S. 56).
 158. C. Bremer, C. H. Tung, R. Weissleder, „In vivo molecular target assessment of matrix metalloproteinase inhibition“, eng, *Nat. Med.* **2001**, *7*, 743–748 (siehe S. 58).
 159. L. Stryer, *Biochemie*, *4. Auflage*, Spektrum, Akademischer Verlag, **1996** (siehe S. 67, 92, 117).
 160. T. R. Jahn, S. E. Radford, „Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways“, eng, *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *469*, 100–117 (siehe S. 67 f.).
 161. C. Soto, „Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases“, eng, *Nat Rev Neurosci* **2003**, *4*, 49–60 (siehe S. 67).

162. P. T. Lansbury, H. A. Lashuel, „A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic“, eng, *Nature* **2006**, *443*, 774–779 (siehe S. 68).
163. T. Härd, C. Lendel, „Inhibition of Amyloid Formation“, eng, *J. Mol. Biol.* **2012** (siehe S. 68).
164. C. J. Barrow, A. Yasuda, P. T. M. Kenny, M. G. Zagorski, „Solution Conformations and Aggregational Properties of Synthetic Amyloid P-Peptides of Alzheimer’s Disease“, *J. Mol. Biol.* **1992**, *225*, 1075–1093 (siehe S. 68).
165. C. Li, J. He, Y. Zhou, Y. Gu, Y. Yang, „Radical-Induced Oxidation of RAFT Agents—A Kinetic Study“, *J. Polym. Sci. Part A* **2011**, 1–10 (siehe S. 68).
166. J. M. Mason, K. M. Arndt, „Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications“, eng, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 170–176 (siehe S. 69).
167. K. Pagel, S. C. Wagner, K. Samedov, H. von Berlepsch, C. Böttcher, B. Kokschi, „Random Coils, β -Sheet Ribbons, and α -Helical Fibers: One Peptide Adopting Three Different Secondary Structures at Will“, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2196–2197 (siehe S. 69).
168. E. Brandenburg, H. von Berlepsch, U. I. M. Gerling, C. Böttcher, B. Kokschi, „Inhibition of amyloid aggregation by formation of helical assemblies“, eng, *Chemistry* **2011**, *17*, 10651–10661 (siehe S. 69 f., 77, 80, 86).
169. S. A. Hudson, H. Ecroyd, T. W. Kee, J. A. Carver, „The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds“, eng, *FEBS J.* **2009**, *276*, 5960–5972 (siehe S. 70).
170. S. R. Adams, R. Y. Tsien, „Controlling cell chemistry with caged compounds“, *Annu. Rev. Physiol.* **1993**, *55*, 755–784 (siehe S. 71).
171. M. Adamczyk, M. Cornwell, J. Huff, S. Rege, T. V. S. Rao, „Novel 7-Hydroxycoumarin based fluorescent labels“, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1985–1988 (siehe S. 71).
172. T. Furuta, S. S. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, „Brominated 7-hydroxycoumarin-4-ylmethyls: photolabile protecting groups with biologically useful cross-sections for two photon photolysis.“, eng, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 1193–1200 (siehe S. 71).
173. V. Hagen, F. Kilic, J. Schaal, B. Dekowski, R. Schmidt, N. Kotzur, „[8-[Bis-(carboxymethyl)aminomethyl]-6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl]methyl Moieties as Photoremovable Protecting Groups for Compounds with COOH, NH₂, OH, and CO Functions“, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2790–2797 (siehe S. 71, 78).
174. Z. Zarafshani, T. Obata, J.-F. Lutz, „Smart PEGylation of trypsin“, eng, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2130–2135 (siehe S. 73).

-
175. L. Kisfaludy, T. Mohacsi, M. Low, F. Drexler, „Pentafluorophenyl acetate: a new, highly selective acetylating agent“, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 654–656 (siehe S. 75).
176. D. Li, D. L. Elbert, „The kinetics of the removal of the N-methyltrityl (Mtt) group during the synthesis of branched peptides“, eng, *J. Pept. Res.* **2002**, *60*, 300–303 (siehe S. 77).
177. R. Schmidt, D. Geissler, V. Hagen, J. Bendig, „Kinetics study of the photocleavage of (coumarin-4-yl)methyl esters“, eng, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 500–5004 (siehe S. 78).
178. B. Schade, V. Hagen, R. Schmidt, R. Herbrich, E. Krause, T. Eckardt, J. Bendig, „Deactivation Behavior and Excited-State Properties of (Coumarin-4-yl)methyl Derivatives. 1. Photocleavage of (7-Methoxycoumarin-4-yl)methyl-Caged Acids with Fluorescence Enhancement“, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9109–9117 (siehe S. 78).
179. D. P. E. Deacon, B. Apostolovic, R. J. Carbajo, A.-K. Schott, K. Beck, M. J. Vicent, A. Pineda-Lucena, H.-A. Klok, R. Duncan, „Polymer coiled-coil conjugates: potential for development as a new class of therapeutic "molecular switch"“, eng, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 19–27 (siehe S. 85).
180. T. Pawson, M. Raina, P. Nash, „Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior“, eng, *FEBS Lett.* **2002**, *513*, 2–10 (siehe S. 92).
181. L. A. N. Amaral, „A truer measure of our ignorance.“, eng, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2008**, *105*, 6795–6796 (siehe S. 92).
182. S. Jones, J. M. Thornton, „Principles of protein-protein interactions“, eng, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1996**, *93*, 13–20 (siehe S. 92).
183. K. Xia, Z. Fu, L. Hou, J.-D. J. Han, „Impacts of protein-protein interaction domains on organism and network complexity“, eng, *Genome Res.* **2008**, *18*, 1500–1508 (siehe S. 92).
184. M. M. Zhou, K. S. Ravichandran, E. F. Olejniczak, A. M. Petros, R. P. Meadows, M. Sattler, J. E. Harlan, W. S. Wade, S. J. Burakoff, S. W. Fesik, „Structure and ligand recognition of the phosphotyrosine binding domain of Shc“, eng, *Nature* **1995**, *378*, 584–592 (siehe S. 92).
185. M. A. Verdecia, M. E. Bowman, K. P. Lu, T. Hunter, J. P. Noel, „Structural basis for phosphoserine-proline recognition by group IV WW domains“, eng, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 639–643 (siehe S. 92).
186. J. T. Nguyen, C. W. Turck, F. E. Cohen, R. N. Zuckermann, W. A. Lim, „Exploiting the basis of proline recognition by SH3 and WW domains: design of N-substituted inhibitors“, eng, *Science* **1998**, *282*, 2088–2092 (siehe S. 92).
187. M. Sudol, K. Sliwa, T. Russo, „Functions of WW domains in the nucleus“, eng, *FEBS Lett.* **2001**, *490*, 190–195 (siehe S. 92).
-

188. A. A. Fedorov, E. Fedorov, F. Gertler, S. C. Almo, „Structure of EVH1, a novel proline-rich ligand-binding module involved in cytoskeletal dynamics and neural function“, eng, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 661–665 (siehe S. 92).
189. J. E. Brenman, D. S. Chao, S. H. Gee, A. W. McGee, S. E. Craven, D. R. Santillano, Z. Wu, F. Huang, H. Xia, M. F. Peters, S. C. Froehner, D. S. Brecht, „Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PDZ domains“, eng, *Cell* **1996**, *84*, 757–767 (siehe S. 92).
190. D. Stapleton, I. Balan, T. Pawson, F. Sicheri, „The crystal structure of an Eph receptor SAM domain reveals a mechanism for modular dimerization“, eng, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 44–49 (siehe S. 92).
191. S. Santagata, T. J. Boggon, C. L. Baird, C. A. Gomez, J. Zhao, W. S. Shan, D. G. Myszka, L. Shapiro, „G-protein signaling through tubby proteins“, eng, *Science* **2001**, *292*, 2041–2050 (siehe S. 92).
192. K. M. Ferguson, M. A. Lemmon, J. Schlessinger, P. B. Sigler, „Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain“, eng, *Cell* **1995**, *83*, 1037–1046 (siehe S. 92).
193. M. Sudol, „Structure and function of the WW domain.“, eng, *Prog Biophys Mol Biol* **1996**, *65*, 113–132 (siehe S. 92).
194. O. Staub, D. Rotin, „WW domains“, *Structure* **1996**, *4*, 495–499 (siehe S. 93).
195. M. Sudol, C. C. Recinos, J. Abraczinskas, J. Humbert, A. Farooq, „WW or WoW: the WW domains in a union of bliss“, eng, *IUBMB Life* **2005**, *57*, 773–778 (siehe S. 93).
196. H. I. Chen, M. Sudol, „The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules“, eng, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1995**, *92*, 7819–7823 (siehe S. 93).
197. X. Huang, M. Beullens, J. Zhang, Y. Zhou, E. Nicolaescu, B. Lesage, Q. Hu, J. Wu, M. Bollen, Y. Shi, „Structure and Function of the Two TandemWW Domains of the Pre-mRNA Splicing Factor FBP21 (Formin-binding Protein 21)“, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 25375–25387 (siehe S. 93 f., 102, 157).
198. S. Klippel, M. Wiczorek, M. Schümann, E. Krause, B. Marg, T. Seidel, T. Meyer, E.-W. Knapp, C. Freund, „Multivalent binding of formin-binding protein 21 (FBP21)-tandem-WW domains fosters protein recognition in the pre-spliceosome“, eng, *J. Biol. Chem.* **Nov. 2011**, *286*, 38478–38487 (siehe S. 94).
199. J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, „Influencing receptor-ligand binding mechanisms with multivalent ligand architecture“, eng, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922–14933 (siehe S. 95).

-
200. A. Sunder, R. Hanselmann, H. Frey, R. Müllhaupt, „Controlled Synthesis of Hyperbranched Polyglycerols by Ring-Opening Multibranching Polymerization“, *Macromolecules* **1999**, *32*, 4240–4246 (siehe S. 95).
201. R. Haag, „Supramolecular Drug-Delivery Systems Based on Polymeric Core–Shell Architectures“, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 278–282 (siehe S. 95).
202. R. K. Kainthan, E. B. Muliawan, S. G. Hatzikiriakos, D. E. Brooks, „Synthesis, Characterization, and Viscoelastic Properties of High Molecular Weight Hyperbranched Polyglycerols“, *Macromolecules* **2006**, *39*, 7708–7717 (siehe S. 95).
203. D. E. Shafer, J. K. Inman, A. Lees, „Reaction of Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) with maleimide and α -haloacyl groups: anomalous elution of TCEP by gel filtration“, eng, *Anal. Biochem.* **2000**, *282*, 161–164 (siehe S. 97).
204. M. Richter, Diss., Freie Universität Berlin, **2011** (siehe S. 98).
205. D. Letourneur, C. Parisel, S. Prigent-Richard, M. Cansell, „Interactions of functionalized dextran-coated liposomes with vascular smooth muscle cells“, *J. Controlled Release* **2000**, *65*, 83–91 (siehe S. 98).
206. S. Bjelić, I. Jelesarov, „A survey of the year 2007 literature on applications of isothermal titration calorimetry“, eng, *J. Mol. Recognit.* **2008**, *21*, 289–312 (siehe S. 118).
207. K. Bouchemal, F. Agnely, A. Koffi, M. Djabourov, G. Ponchel, „What can isothermal titration microcalorimetry experiments tell us about the self-organization of surfactants into micelles?“, eng, *J. Mol. Recognit.* **2010**, *23*, 335–342 (siehe S. 118).
208. H. M. Davey, M. K. Winson, „Using flow cytometry to quantify microbial heterogeneity“, eng, *Curr. Issues Mol. Biol.* **2003**, *5*, 9–15 (siehe S. 120).

A. Anhang

A.1. NMR-Spektren

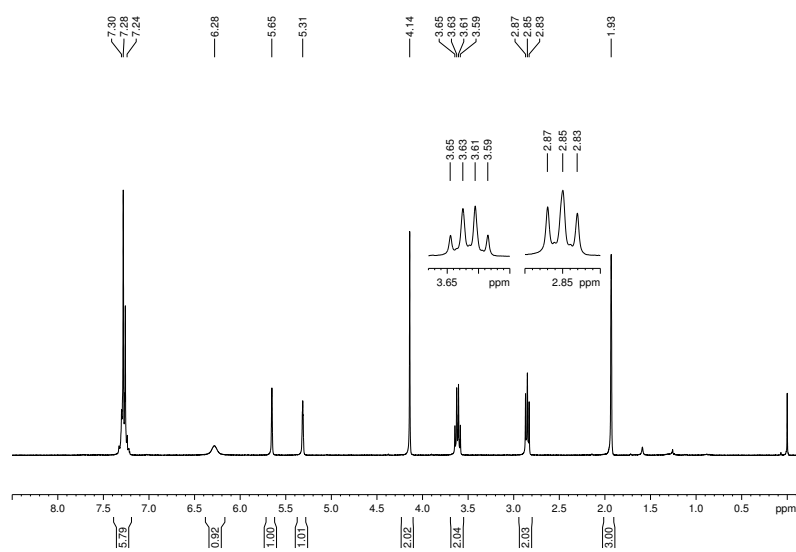


Abbildung A.1.: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), Monomer NMAS 4.

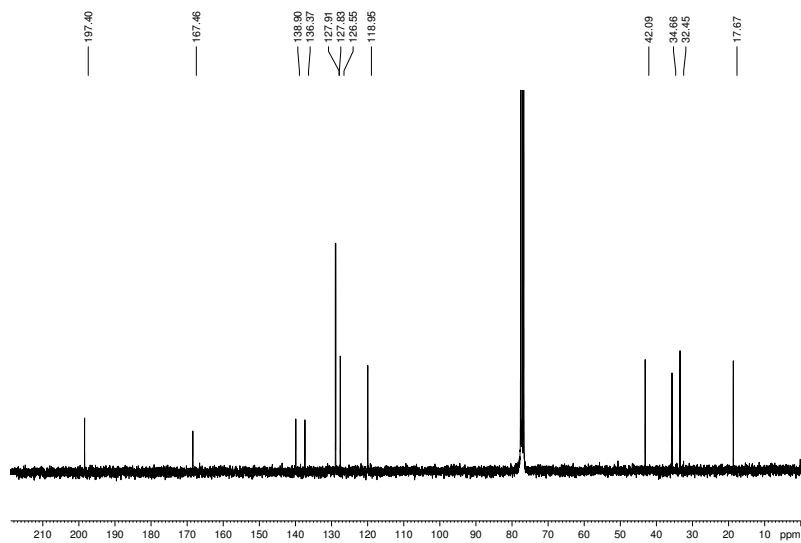


Abbildung A.2.: ^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO-d_6), Monomer NMA S 4.

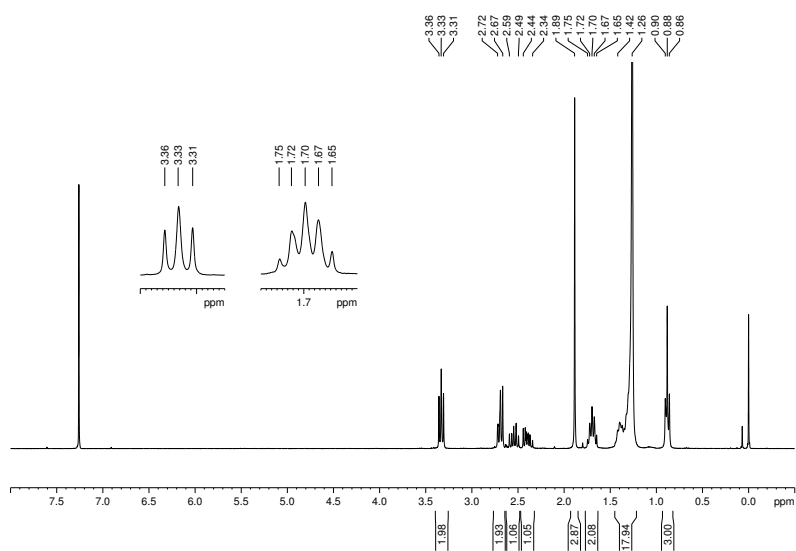


Abbildung A.3.: ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3), RAFT-Reagenz 12.

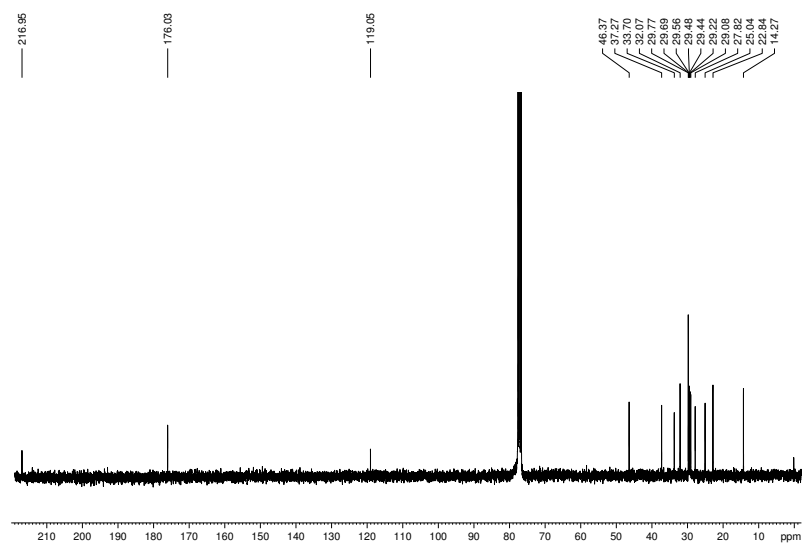


Abbildung A.4.: ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3), RAFT-Reagenz **12**.

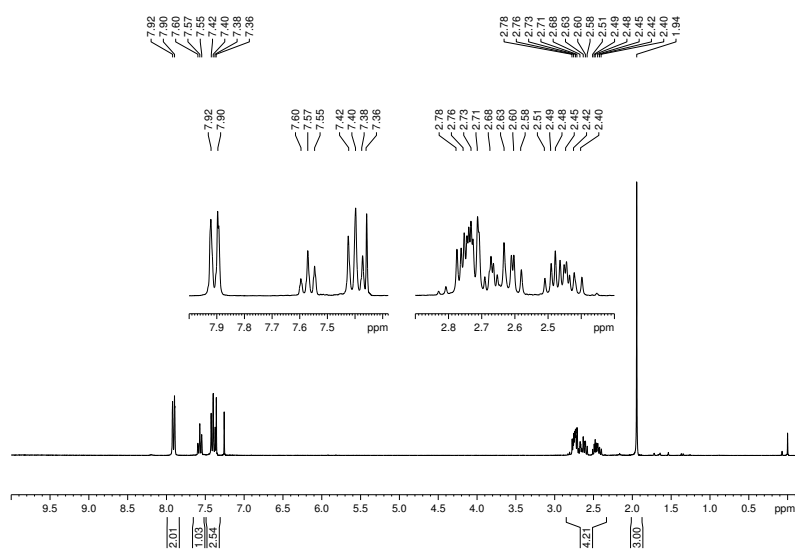


Abbildung A.5.: ^1H -NMR (300 MHz, MeOD), RAFT-Reagenz **3**.

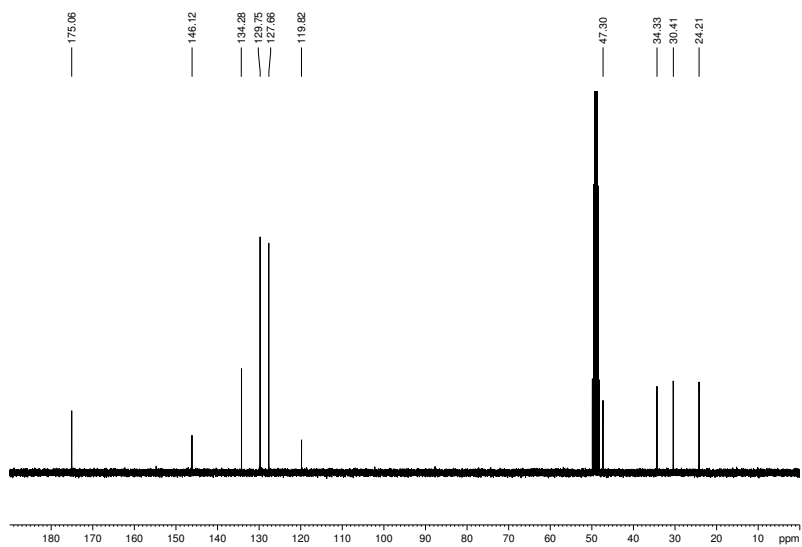


Abbildung A.6.: ^{13}C -NMR (75 MHz, MeOD), RAFT-Reagenz **3**.

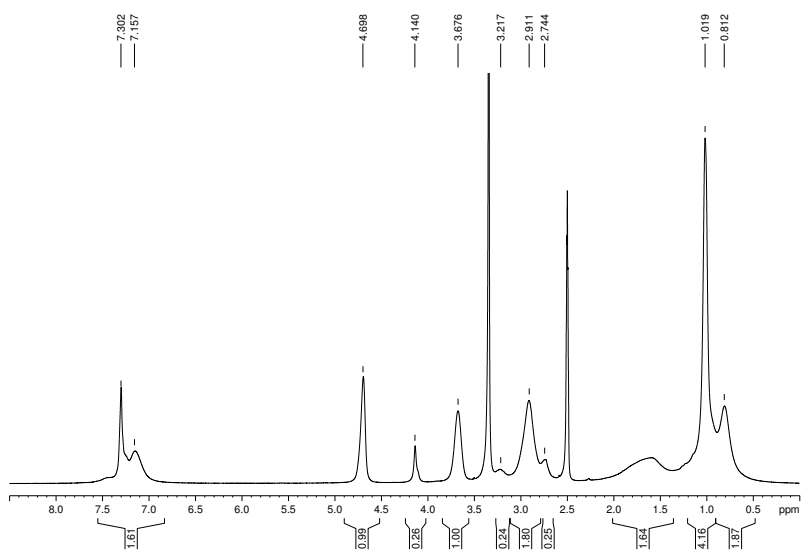


Abbildung A.7.: ^1H -NMR (300 MHz, DMSO-d_6), PHNS-1.

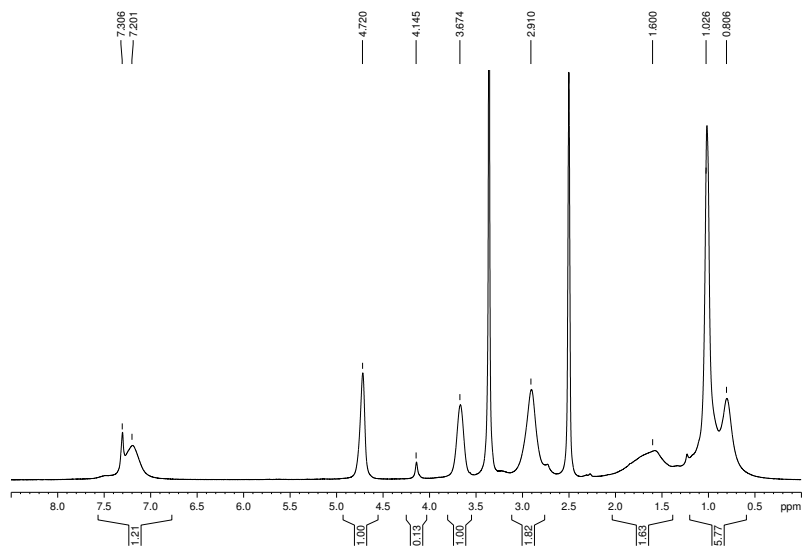


Abbildung A.8.: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6), PHNS-2.

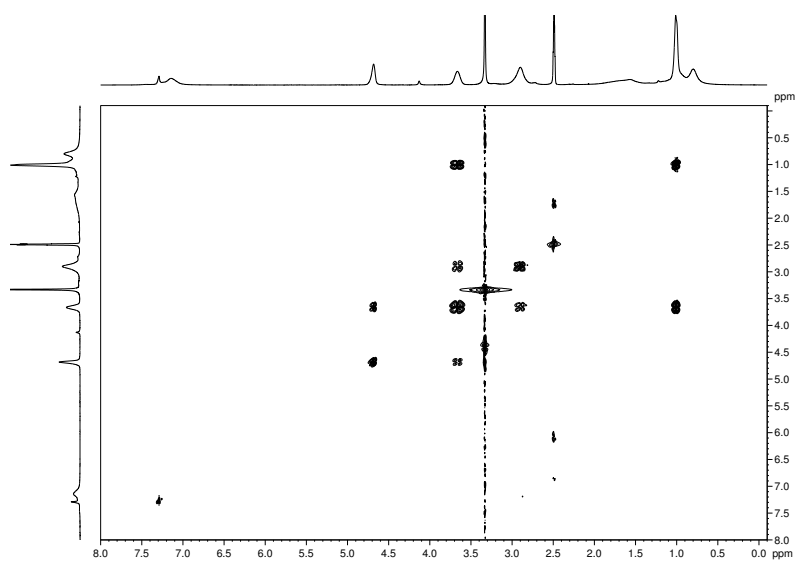


Abbildung A.9.: H, H-COSY-NMR (300 MHz, DMSO-d_6), PHNS-2.

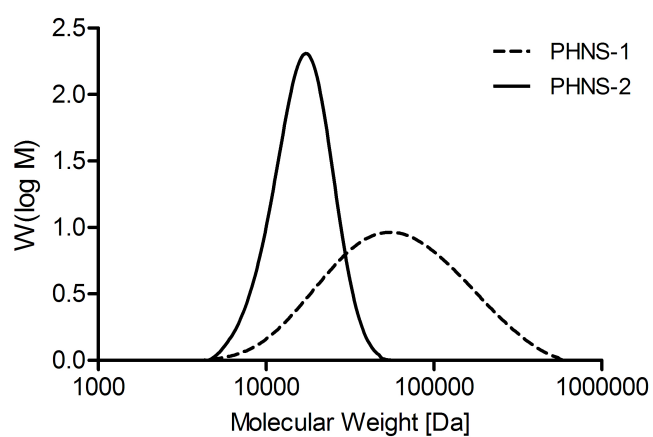


Abbildung A.10.: GPC (Suprema, 10 μ M, 1000 \AA ; Eluent: 0.05 M $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{ACN} = 4:1$); hydrolysierte Thioester-HPMA-Copolymere PHNS-1 und PHNS-2 beispielhaft dargestellt.

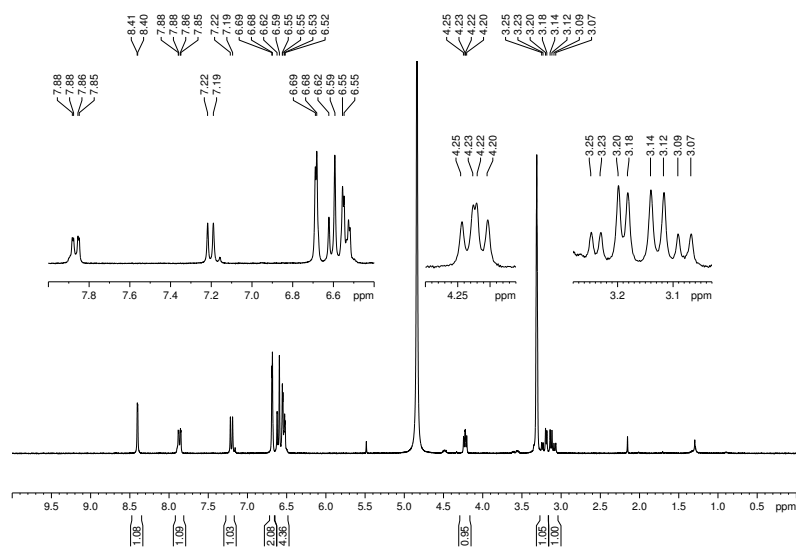


Abbildung A.11.: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, MeOD), *N-L*-Cysteinyl-5-aminofluorescein (**13**).

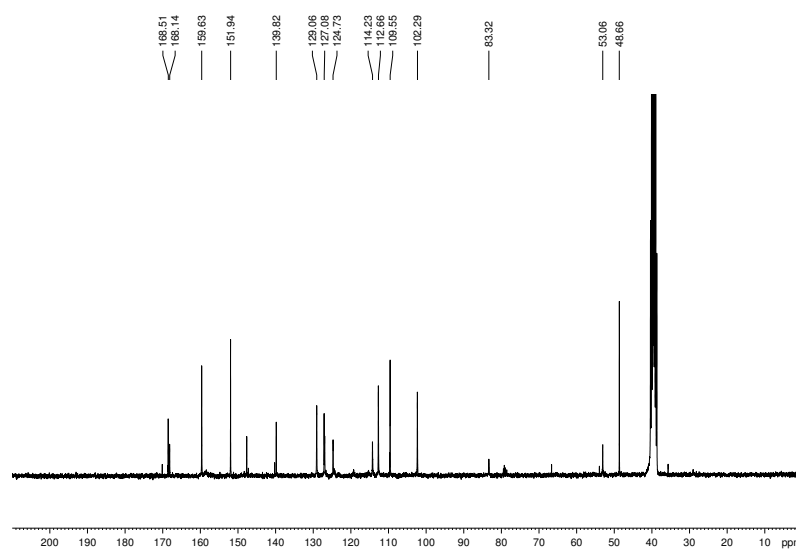
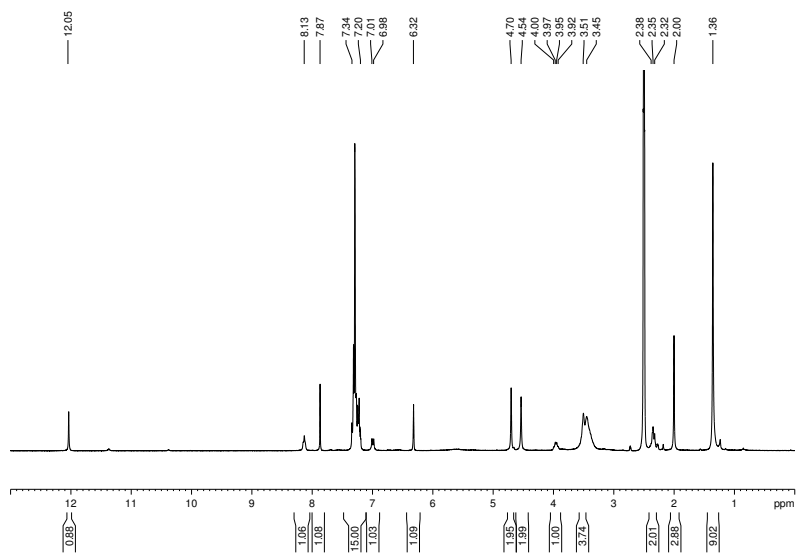
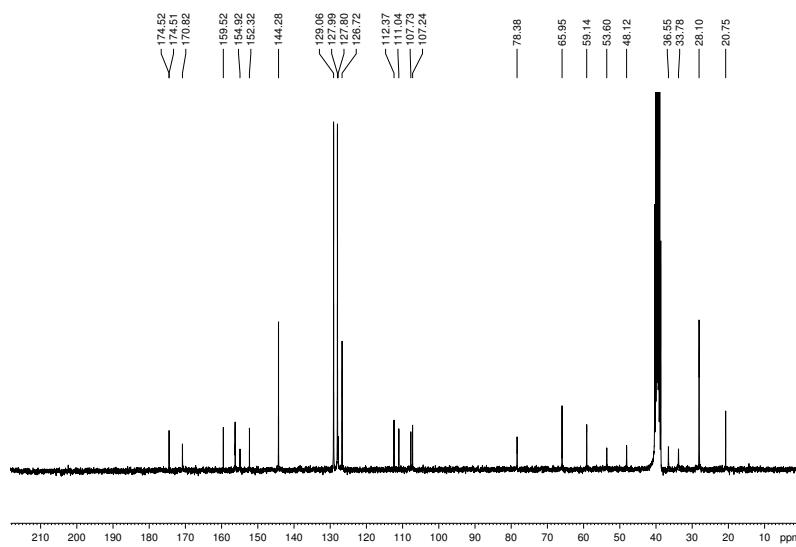


Abbildung A.12.: $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO-d_6), *N-L*-Cysteinyl-5-aminofluorescein (**13**).

Abbildung A.13.: ^1H -NMR (300 MHz, DMSO-d_6), (22).Abbildung A.14.: ^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO-d_6), (22).

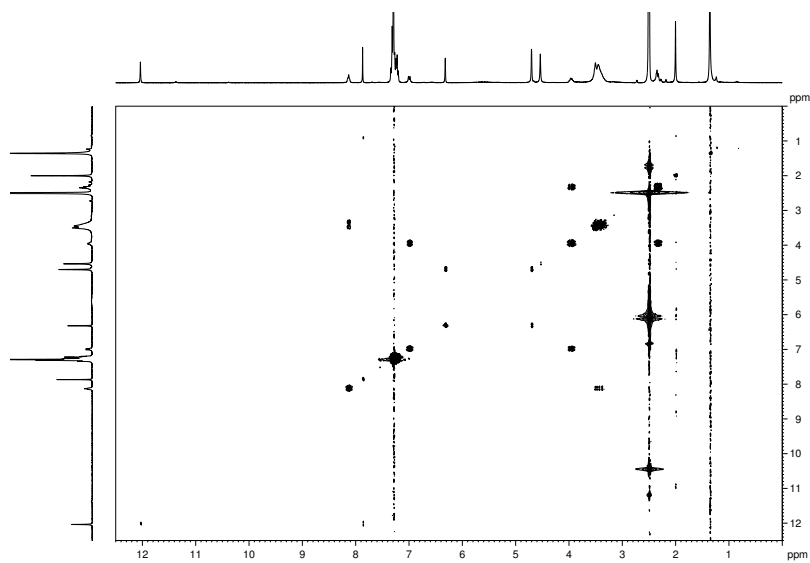


Abbildung A.15.: H, H-COSY-NMR (300 MHz, CDCl_3), (**22**).

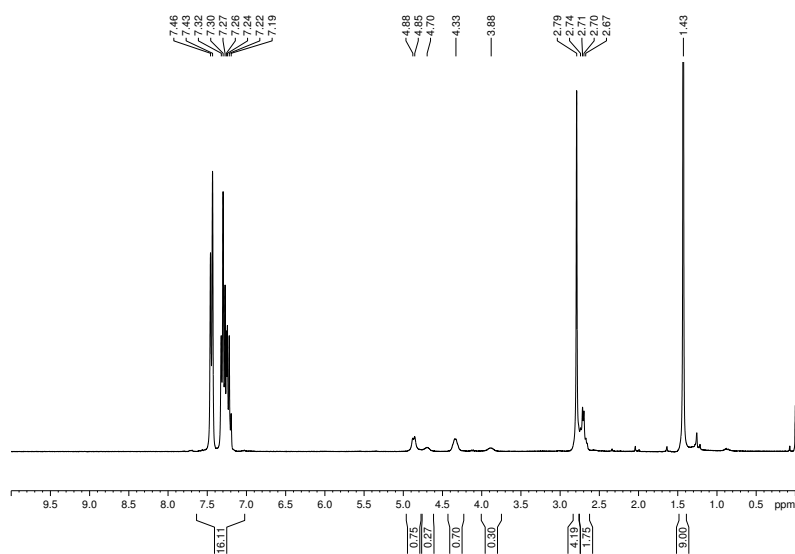


Abbildung A.16.: ^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3), (**20**).

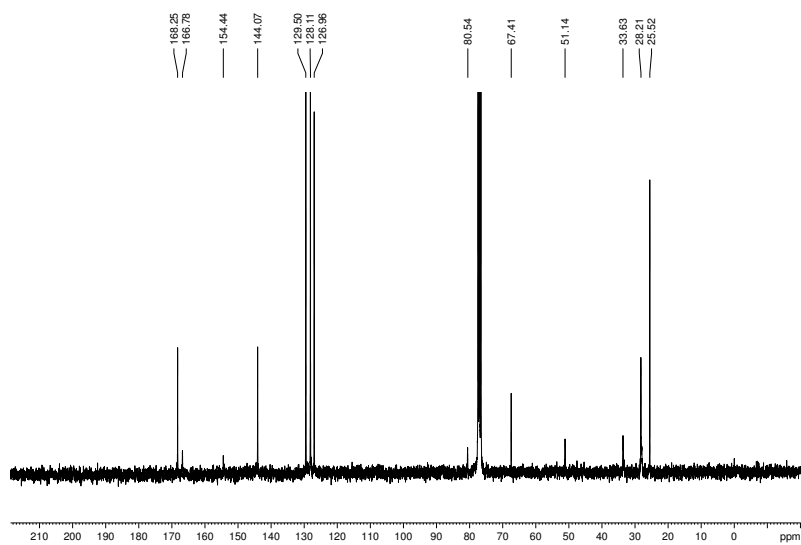


Abbildung A.17.: ^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3), (20).

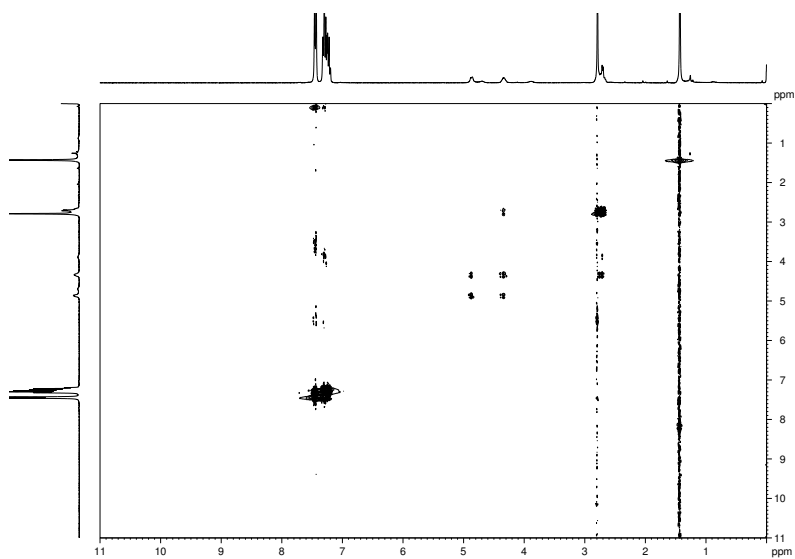


Abbildung A.18.: H, H-COSY-NMR (300 MHz, CDCl_3), (20).

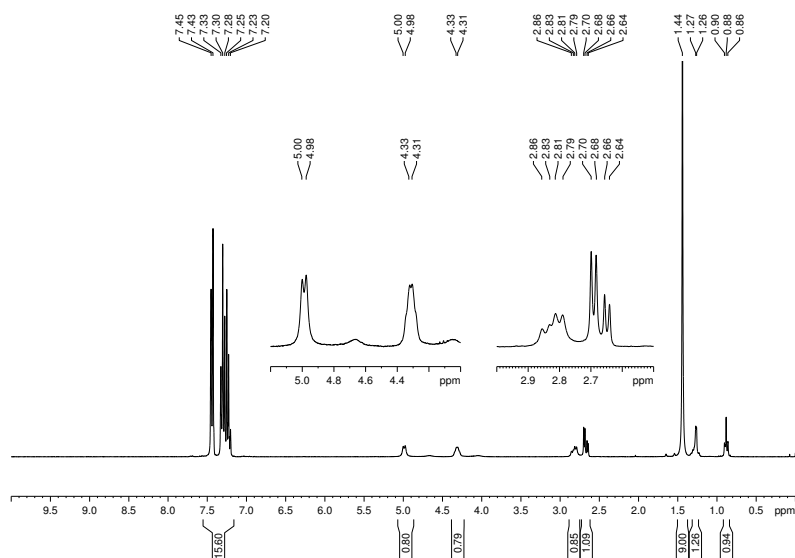


Abbildung A.19.: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), (21).

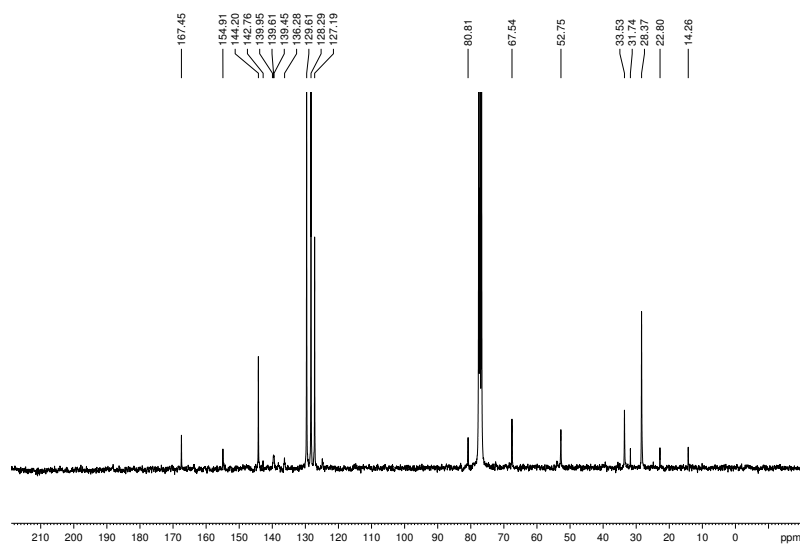


Abbildung A.20.: $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3), (21).

A.2. LC-MS-Daten

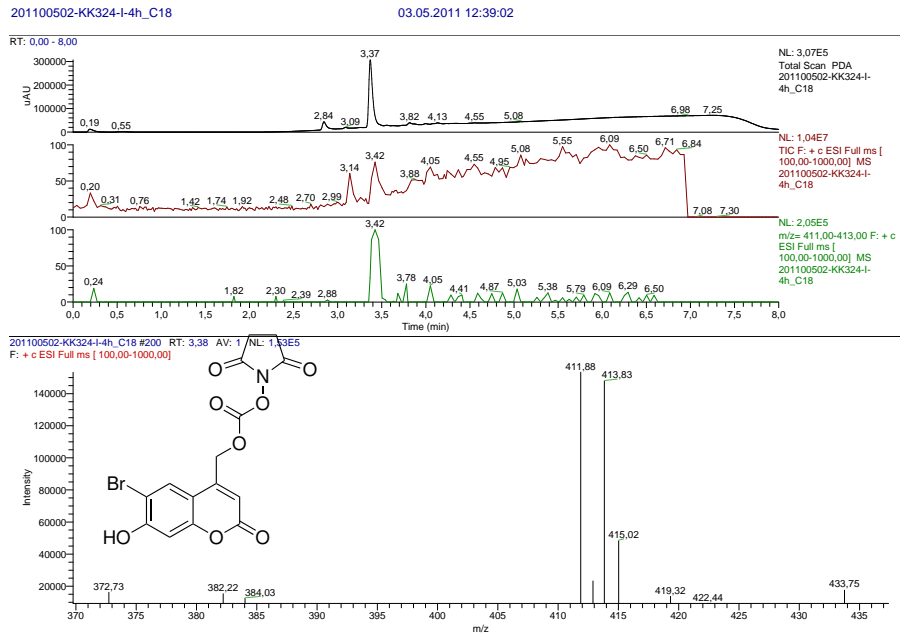


Abbildung A.21.: LC-Q: Aktivierungsversuch mit Disuccinimidcarbonat.

A. Anhang

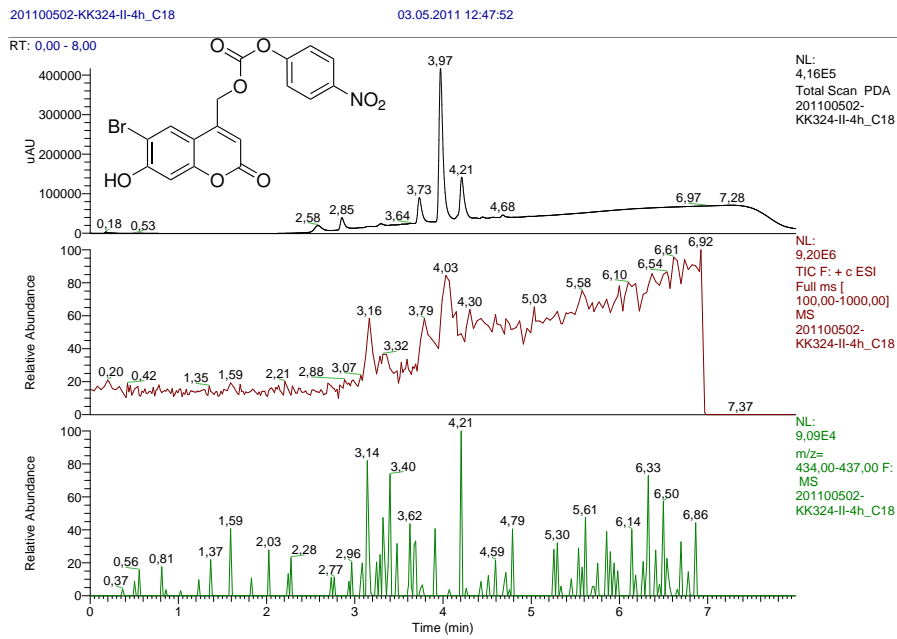


Abbildung A.22.: LC-Q: Aktivierungsversuch mit 1-Chlorameisensäure-4-nitrophenol.

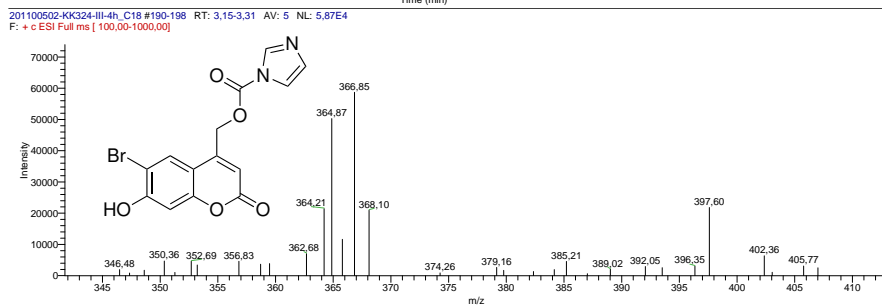
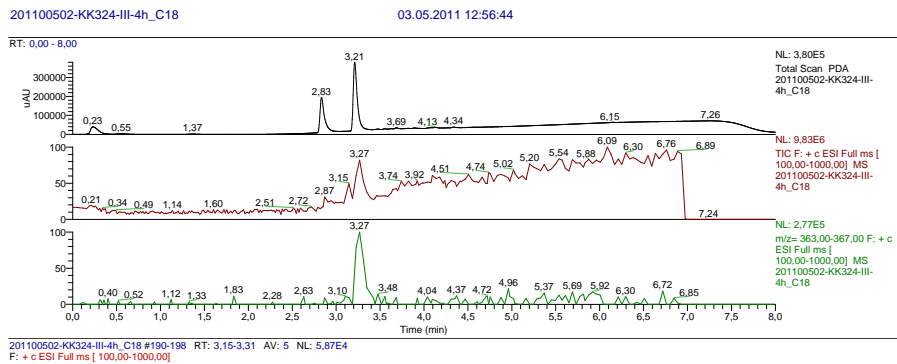


Abbildung A.23.: LC-Q: Aktivierungsversuch mit Carbonyldiimidazol.

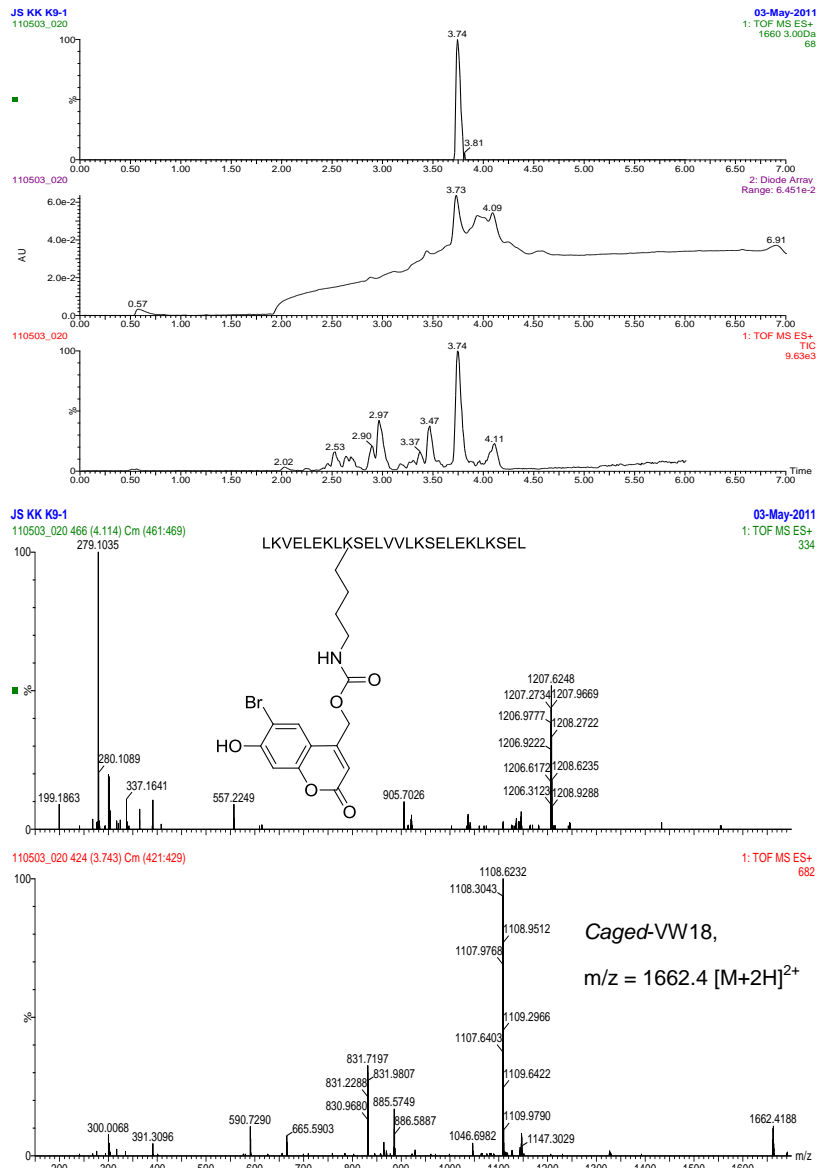


Abbildung A.24.: LC-TOF (Waters-Anlage der Gruppe M. Beyerman): Identifizierung des *Caged-VW18*.

Produkt: Caged-VW18; $m/z = 1513.8 [M+2H]^{2+}$

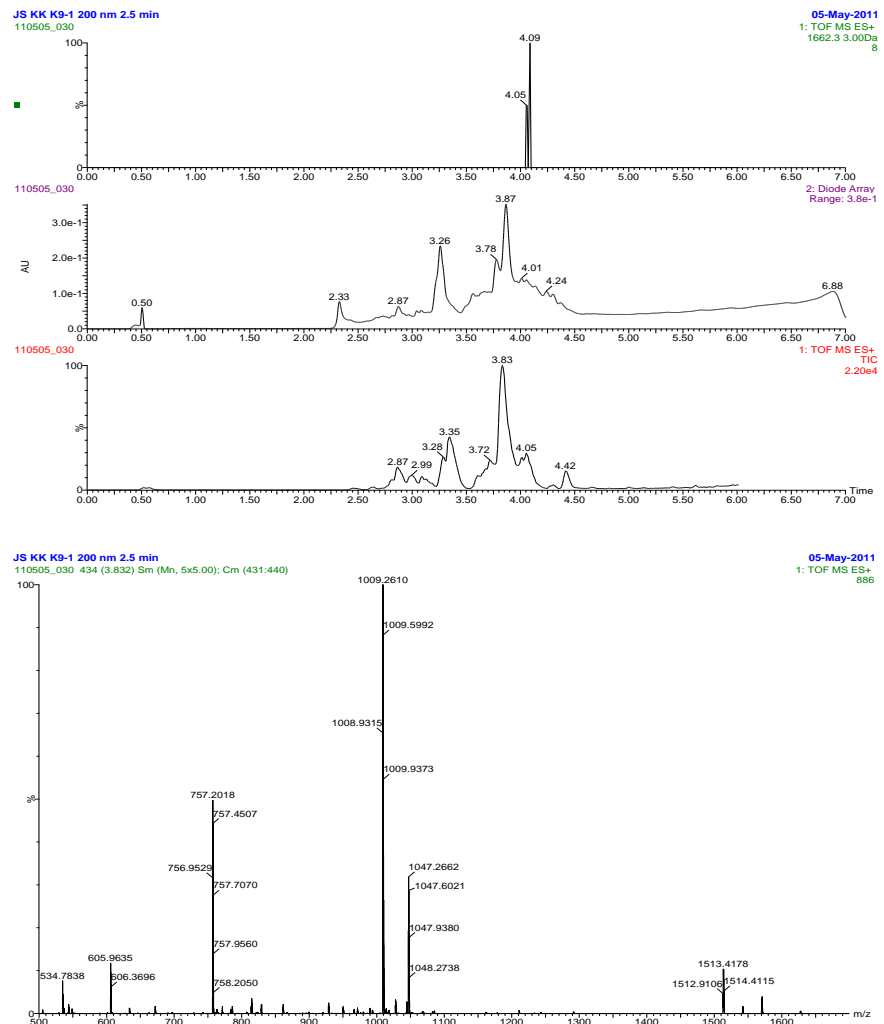


Abbildung A.25.: LC-TOF (*Waters*-Anlage der Gruppe M. Beyerman): Testbestrahlung: 360 nm, 2.5 min.

A.3. ITC-Daten

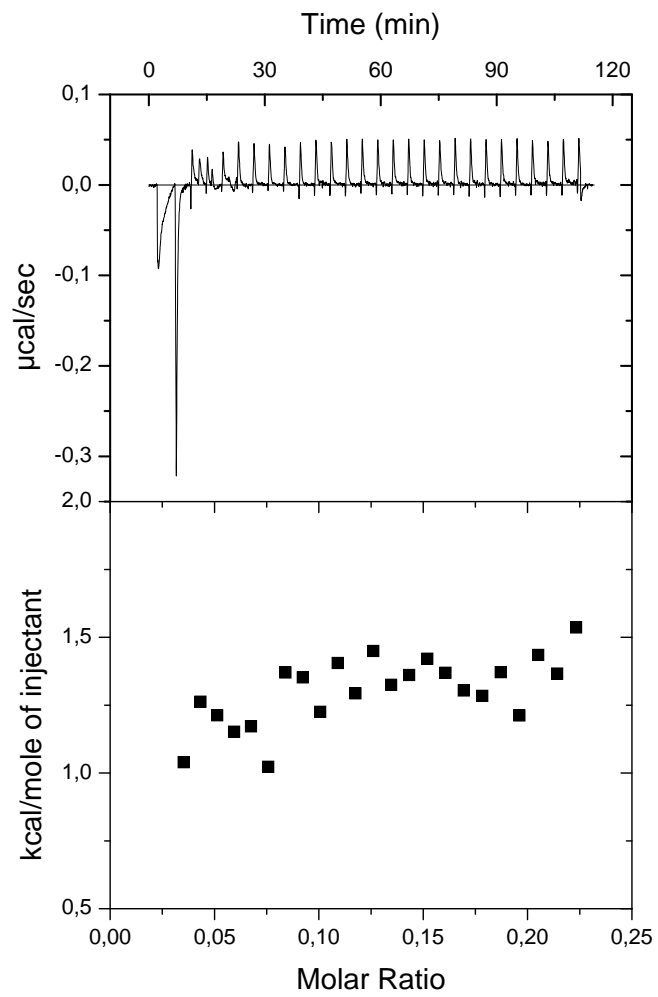


Abbildung A.26.: ITC-Kontrollmessung mit unmodifiziertem poly(HPMA), $M_n = 34$ kDa.

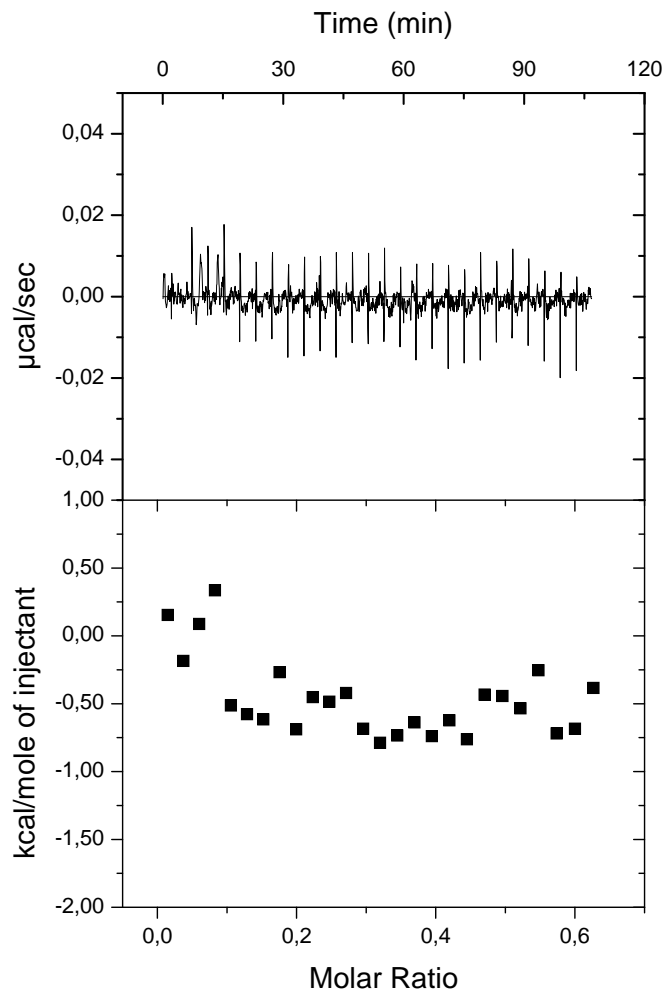


Abbildung A.27.: ITC-Kontrollmessung mit unmodifiziertem Dextran, $M_n = 10$ kDa.