



**Synthese von Kammpolymeren mit sequenzkontrollierten  
Seitenketten zur multivalenten Präsentation von  
Zuckerliganden und deren Einsatz als Glykomimetika**

Dissertation

Zur Erlangung des Dokortitels  
an der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften  
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Fadi Shamout**

Düsseldorf, November 2019

Ich versichere, dass ich diese Arbeit eigenständig verfasst und keine andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Düsseldorf, den 22.11.2019

---

Fadi Shamout

Referent : Frau Prof. Laura Hartmann

Korreferent : Herr PD Dr. Klaus Schaper

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die einen wesentlichen Beitrag zum Erfolg dieser Arbeit geleistet haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nie so umfassend und fachkundig gewesen.

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Betreuerin Prof. Dr. Laura Hartmann bedanken, da sie mich durch ihre Beratung und die gemeinsamen Gespräche motiviert hat. Sie erweiterte meinen Horizont nicht nur in der Naturwissenschaft, sondern hatte auch einen großen Einfluss auf meine Persönlichkeitsentwicklung.

Darüber hinaus bin ich auch PD Dr. Klaus Schaper für seine kostbare Zeit beim Lesen dieser Arbeit dankbar.

Besonderer Dank gilt Dr. Monir Tabatabai, da sie immer für Fragen offen und hilfsbereit war. Ihre hervorragende Erfahrung in der Polymerchemie half mir, meine Fähigkeiten im Labor zu verbessern. Außerdem trug sie immer zu einem angenehmen Arbeitsklima bei und sorgte für gute Laune in der Arbeitsgruppe.

Jedes in dieser Arbeit beschriebene Ergebnis wurde mit Hilfe und Unterstützung von Kollegen und Mitarbeitern erreicht. Josip Stipanovic, Özgür Capar und ich arbeiteten gemeinsam an mehreren Phasen der Promotion, und ohne ihre Bemühungen wäre meine Arbeit zweifellos schwieriger gewesen. Sie halfen mir durch das gesamte Studium, welches ohne sie kaum zu bewältigen wäre. Fawad Jacobi und Dana Itskalov hatten durch gemeinsame Gespräche einen großen Einfluss auf meine Persönlichkeitsentwicklung. Ich danke Sebastian Bauer für ein angenehmes Arbeitsklima und eine tolle Freundschaft.

Nicht zuletzt schulde ich meinen Familienmitgliedern, zu denen meine Eltern und meine Brüder gehören, mehr als Dank für ihre finanzielle, emotionale Unterstützung und Ermutigung während meines ganzen Lebens. Ihre Ratschläge sowohl in der Forschung als auch in meiner Karriere waren von unschätzbarem Wert. Sie wussten immer, wie man mich motiviert und halfen mir bei unzähligen Entscheidungen.

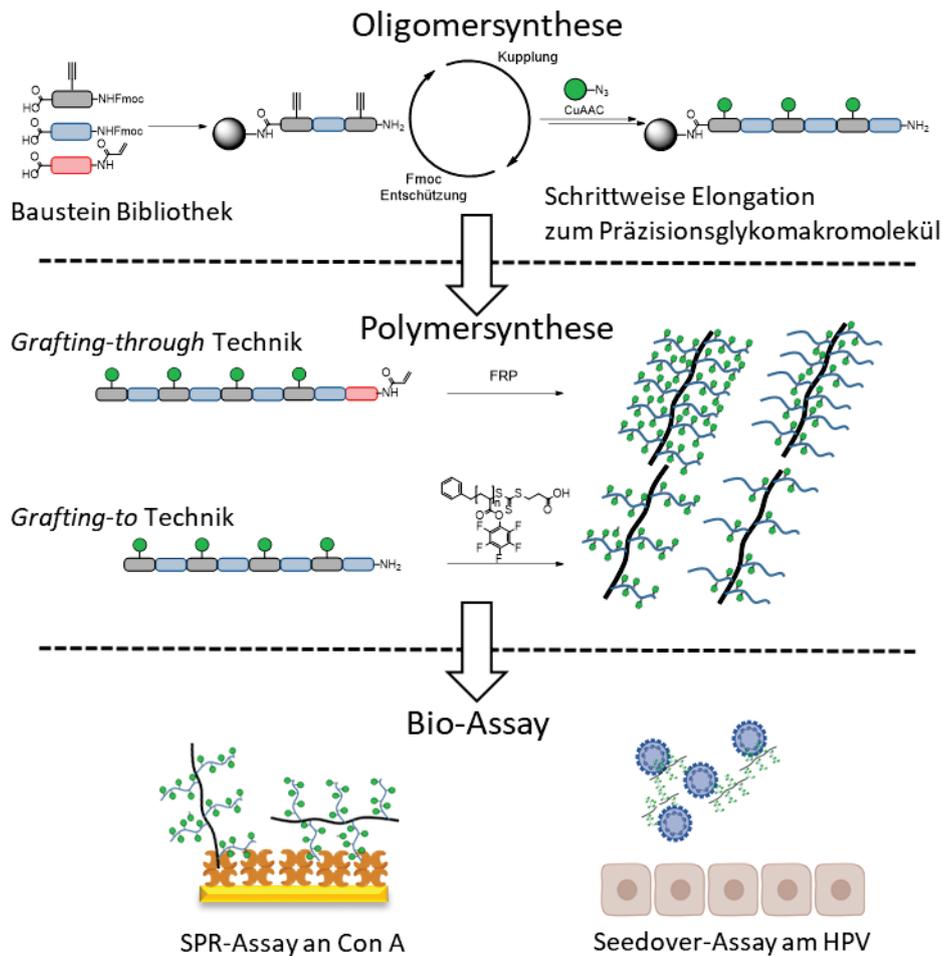
Danke, dass Ihr immer an mich geglaubt habt.

## Kurzzusammenfassung

Glykopolymere bilden eine Klasse der sogenannten polymeren Biomimetika - synthetischer Polymere, die die Struktur und Funktion biologischer Polymere und Makromoleküle nachempfinden. Sie bestehen aus einem synthetischen Polymergerüst, an dem Zucker konjugiert sind, und bilden Glykokonjugate nach, welche eine wichtige Rolle in zellulären Interaktionen, etwa bei viralen und bakteriellen Infekten, spielen.

Eine wichtige Klasse natürlich vorkommender Glykokonjugate sind die Proteoglykane. Hierbei handelt es sich um kammartige Glykokonjugate auf Proteinbasis, welche für eine Vielzahl biologischer Prozesse, wie etwa die Zellkommunikation, verantwortlich sind. Es wird vermutet, dass ihre bioaktive Eigenschaft direkt mit ihrer kammartigen Struktur und der dichten Packung an Zuckern in den Seitenketten zusammenhängt. Diese kammartige Struktur dient daher in dieser Arbeit als Vorlage für die Synthese von Glykokammpolymeren mit verschiedener Anzahl an zuckertragenden, sequenzdefinierten und monodispersen Seitenketten. Durch die Sequenzkontrolle in den Seitenketten können Zuckerliganden an spezifischen Stellen konjugiert und deren Abstände frei gewählt werden. Dies erlaubt einen kontrollierten Entwurf in der Molekülarchitektur, sodass Rückschlüsse auf den Zusammenhang von Struktur und resultierender biologischer Aktivität ermittelt werden können.

Zusammenfassende Abbildung 1 zeigt eine Übersicht der drei Teile dieser Arbeit.



Zusammenfassende Abbildung 1: Überblick der drei Projektabschnitte -Oligomersynthese, Polymersynthese und Bio-Assay- in dieser Arbeit.

Im ersten Teil der Arbeit wurden zunächst verschiedene monodisperse, sequenzdefinierte Glykooligomere mittels Festphasenpolymersynthese hergestellt. Als Bausteine wurde der sogenannte funktionelle Baustein TDS, welcher durch eine Dreifachbindung die Konjugation von Zuckerliganden ermöglicht, sowie der *Spacer* Baustein EDS, der die Abstände der Liganden und die Polarität des Gerüsts definiert, eingesetzt. Mittels literaturbekannter Protokolle zur Festphasenkupplung und Kupfer(I)-katalysierter Azid-Alkin Konjugationsreaktionen (im Englischen: *Cu-mediated azide-alkyne conjugation*, CuAAC) für die Anbringung der Zucker-Liganden, hier Mannose-Derivate, wurden Glykooligomere mit verschiedener Valenz, Kettenlänge und Sequenzen synthetisiert.

Im zweiten Schritt wurden diese Glykooligomere mittels *grafting-through* sowie *grafting-to* Technik zu Glykokampolymeren umgesetzt. Hierbei wurden die Oligomere für den *grafting-through* Ansatz mit verschiedenen Acrylat-Endgruppe versehen und mit Hydroxyethylacrylamid copolymerisiert. Es konnten erfolgreich Glykokampolymere mit verschiedener Seitenkettenanzahl synthetisiert werden. Es zeigte sich jedoch auch eine Limitierung bezüglich des Einbaus größerer Mengen der Seitenketten, vermutlich begründet durch den sterischen Anspruch der erhaltenen Makromonomere in der

Polymerisation. Daher wurde im Folgenden die *grafting-to* Technik verwendet. Hierzu wurden zunächst Polyaktivester verschiedener Kettenlänge aus Pentafluorophenylacrylat mittels RAFT-Polymerisation hergestellt. Anschließend wurde der Polyaktivester mit verschiedenen Anteilen der amin-terminierten Glykooligomere umgesetzt, sodass eine erste Bibliothek von Glykokamppolymeren erhalten wurde. Die resultierenden Glykokamppolymere unterschieden sich in der Valenz, Seitenkettenzahl sowie Kettenlänge des Rückgrads. In einer zweiten Reihe wurden Glykokamm-Copolymere mit zusätzlichen PEG und pNIPAM Seitenketten hergestellt. Die resultierenden Polymere zeigten ein thermo-responsives Verhalten bei 33 °C und können in der Zukunft auf eine thermoschaltbare Bindung an Proteinen untersucht werden.

Im dritten Teil der Arbeit wurden dann die Glykokamppolymere in verschiedenen Bindungsstudien eingesetzt. In einer ersten Studie wurde die Bindung der Polymere an ConA, einem häufig untersuchten Modelllektin, getestet und mit der Bindung an anderen, ebenfalls Mannose-erkennenden Lektinen, verglichen. Es zeigte sich, dass die Bindung mit der Seitenkettenzahl sowie Polymerkettenlänge korreliert, d.h. für die Maximierung der Avidität ist es wichtig, lange multivalente Seitenketten und einen hohen Einbau an Seitenketten zu kombinieren. Des Weiteren konnte durch das Einbringen eines nicht Zucker-tragenden Blocks außen an den zuckertragenden Seitenketten eine Wechselwirkung am Lektin geschwächt werden, vermutlich durch eine sterische Abschirmung der bindenden Einheiten. Dies liefert wichtige Erkenntnisse für das Verständnis der Bindung von Glykopolymeren und eröffnet in der Zukunft die Möglichkeit zunächst inaktive oder schwach bindende Glykopolymere zu erzeugen, die erst nach Abspaltung der sterischen Hinderung ihre Bindung am Lektin erhöhen. Im Vergleich der Lektine zeigte sich, dass ConA und DC-SIGN Glykokamppolymere bevorzugen, während MBL eine stärkere Bindung an lineare Strukturen aufweist.

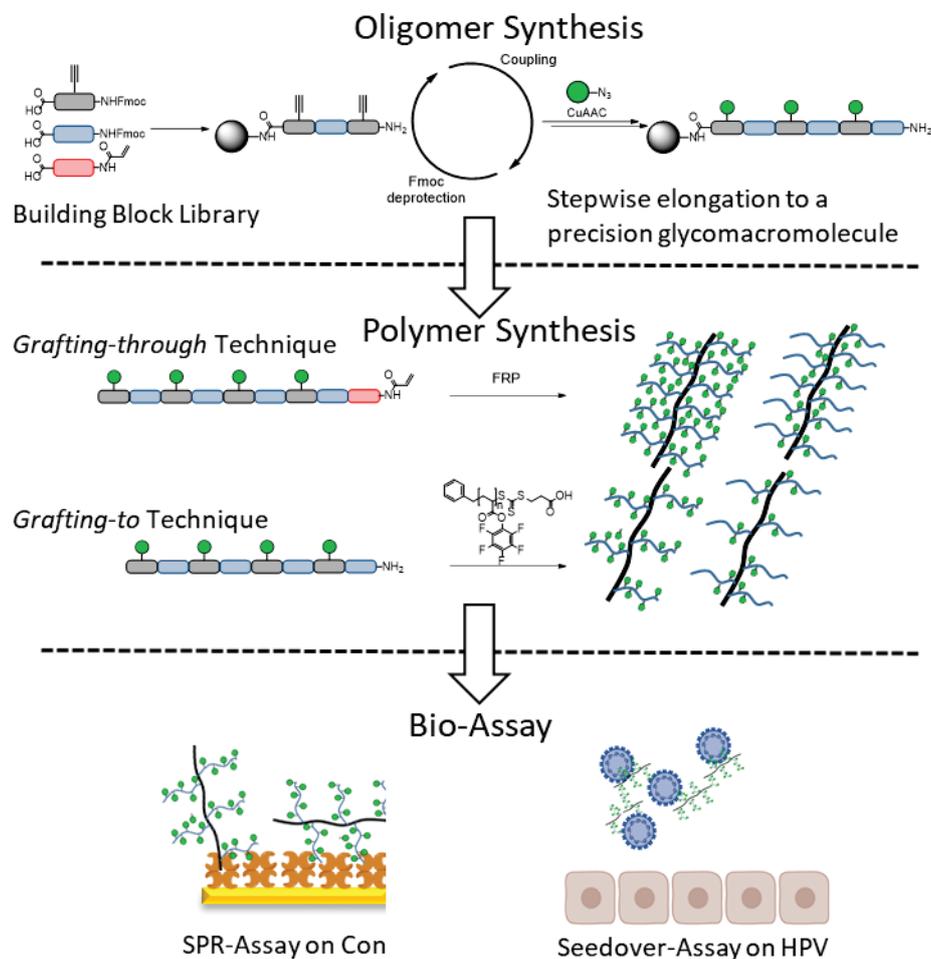
Neben den Lektinen des Immunsystems wie DC-SIGN und MBL bilden Virusproteine eine weitere wichtige Klasse der Zucker-erkennenden Rezeptoren. Sie wechselwirken insbesondere mit stark geladenen Polysacchariden wie dem Heparin. In Kooperation mit Sebastian Bauer wurden daher Glykokamppolymere sulfatisiert und deren Einfluss auf den sogenannten Human Papillomavirus (HPV) in ersten Studien am Lehrstuhl von Prof. Dr. Mario Schelhaas untersucht. Es zeigt sich, dass die sulfatisierten Polymerstrukturen am Virus binden können, jedoch die für die Infektion notwendige Konformationsänderung am Virus nicht verursachen können.

## Abstract

Glycopolymers constitute a class of polymeric biomimetics - synthetic polymers that mimic the structure and function of biological polymers and macromolecules. They consist of a synthetic polymer backbone with sugars as pendant side chains and mimic glycoconjugates, which play an important role in cellular interactions, for example in viral and bacterial infections.

An important class of naturally occurring glycoconjugates are the proteoglycans. These are brush-like protein-based glycoconjugates that are responsible involved in a variety of biological processes, such as the cell communication. It is believed that their bioactivity is directly related to their comb-like structure and the dense packing of sugars in the side chains. Therefore, this comb-like structure is used in this work as a template for the synthesis of brush-like glycopolymers with sugar-presenting, sequence-defined and monodisperse side chains. Through the installed sequence control in the side chains, sugar ligands can be conjugated at specific sites and their spacing can be easily varied. This allows a controlled design in the molecular architecture and allows for studying the relationship

between structure and resulting biological activity. An overview of the three parts of this work is shown in the Summarizing Figure 1.



Summarizing Figure 1: Overview of the three project sections - oligomer synthesis, polymer synthesis and bio-assay - in this thesis.

In the first part of the thesis, different monodisperse, sequence-defined glycooligomers were obtained by solid phase polymer synthesis. The building blocks used were the so-called *functional* building block TDS, which enables the conjugation of sugar ligands through a triple bond, and the *spacer* building block EDS, which defines the distances between the ligands and the polarity of the backbone. Using literature-known protocols for solid phase coupling and copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reactions (CuAAC) for the attachment of sugar ligands, here mannose-derivatives, glycooligomers with different valency, chain length and sequences were synthesized.

In the second step, using *grafting-through* and *grafting-to* techniques these glycooligomers were converted to brush-like glycopolymers. The oligomers for the *grafting-through* approach were provided with different acrylate end-groups and copolymerized with hydroxyethylacrylamide. Brush-like glycopolymers with different numbers of side chains have been successfully synthesized. However, there was a limitation regarding the number of side chains that could be incorporated, presumably

due to the steric effect of the obtained macromonomers in the polymerization. Therefore, the *grafting-to* technique was used in the following. For this purpose, polyactive esters of various contour lengths were first produced from pentafluorophenyl acrylate by using RAFT polymerization. Subsequently, the polyactive ester was reacted with different amounts of the amine-terminated glycooligomers, giving access to a first library of brush-like glycopolymers. The resulting polymers differed in valency, number of side chains and overall chain length of the backbone. In a second series, brush-like glycopolymers with additional PEG and pNIPAM side chains were synthesized. The resulting polymers showed thermo-responsive behavior at 33 °C and can be investigated in the future for thermo-switchable binding to proteins.

In the third part of the work, comb-like glycopolymers were used in various binding studies. In a first study, the binding of the polymers to ConA, a well-studied model lectin, was tested and compared with the binding to other lectins that also recognize mannose. It was gefunden that binding correlates with side chain number and polymer chain length, i.e. to maximize the avidity, it is important to combine long multivalent side chains with high number of sugars. Furthermore, the insertion of non-sugar containing blocks on the outside of the sugar-bearing side chains weakened the interaction at the lectin, probably by sterical shielding of the binding units. This provides important insights for understanding the binding of glycopolymers and opens up the possibility in the future of initially producing inactive or weakly binding glycopolymers that only increase their binding to lectin after cleavage of the steric hindrance. A comparison of lectins showed that ConA and DC-SIGN prefer brush-like polymers, while MBL showed stronger binding to a linear glycopolymer.

Besides the lectins of the immune system such as DC-SIGN and MBL, viral proteins form another important class of sugar recognizing receptors. They interact in particular with highly charged polysaccharides such as heparin. In cooperation with Sebastian Bauer, brush-like glycopolymers were therefore sulphated and their influence on human papillomavirus (HPV) was investigated in initial studies at the department of Prof. Dr. Mario Schelhaas. It was shown that the sulphated polymer structures are able to bind to the virus, but are unable to cause a conformational change in the virus that is necessary for infection.

## Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

1. Synthesis of Brush-Like Glycopolymers with Monodisperse, Sequence-Defined Side Chains and Their Interactions with Plant and Animal Lectins, Shamout, F., Monaco, A., Yilmaz, G., Becer, C. R., Hartmann, L, *Macromol. Rapid Commun.* **2019**, 1900459.

Eigenanteil: Gemeinschaftliche Entwicklung des Projekts, Synthese von Dimer-Bausteinen, Synthese von azidfunktionalisierter Mannose, Synthese von Glykomakromolekülen, Synthese von Pentafluorophenylacrylat und RAFT-Agent, Entwicklung des Polymerisationsverfahren und Polymersynthese, Charakterisierung aller Verbindungen mittels HPLC-MS, NMR, Wasser-GPC und HR-ESI-MS, vollständige Charakterisierung der Polymere, gemeinschaftliche Entwicklung eines Aufbaus für Oberflächenplasmonen-Resonanzmessungen an ConA, Durchführung und Auswertung aller SPR-Experimente, gemeinschaftliche Auswertung der erhaltenen Ergebnisse, gemeinschaftliches Schreiben des Manuskripts.

2. Recovery, Purification, and Reusability of Building Blocks for Solid Phase Synthesis, Shamout, F., Fischer, L., Snyder L. N., Hartmann, L, *Macromol. Rapid Commun.* **2019**, 1900473.

Eigenanteil: Gemeinschaftliche Entwicklung des Projekts, Synthese von Dimer-Bausteinen, Synthese von azidfunktionalisierter Mannose, Synthese von Glykomakromolekülen am Synthesizer, gemeinschaftliche Charakterisierung aller Verbindungen mittels HPLC-MS, NMR, IR, und HR-ESI-MS, gemeinschaftliche Entwicklung und Planung der Experimente zur Rückgewinnung der Bausteine in der Festphasensynthese, gemeinschaftliches Schreiben des Manuskripts.

## Präsentation der Ergebnisse der Arbeit auf Konferenzen:

Glycomimetic Polymers with brush-like structures, F. Shamout, M. Giesler, L. Hartmann, Faraday Discussions (2019), Royal Society of Chemistry, London.

# Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	IV
Kurzzusammenfassung .....	V
Abstract .....	VIII
Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht:.....	XI
Präsentation der Ergebnisse der Arbeit auf Konferenzen: .....	XI
<b>1 Allgemeine Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Glykobiologie: Die Rolle von Kohlenhydraten in der Natur .....	1
1.1.1 Zuckerliganden und Glykopolymere und ihre Rolle in Biologischen Prozessen.....	2
1.1.2 Lektine und deren Wechselwirkung.....	3
1.1.3 Methoden zur Messung der Kohlenhydrat – Lektin Wechselwirkung.....	7
1.2 Festphasensynthese Linearer Präzisionsmakromolekülen .....	9
1.2.1 Fmoc-basierte Festphasen Peptid Synthese .....	9
1.2.2 Synthetische Bausteine .....	13
1.2.3 Zuckerkonjugation.....	15
1.3 Glykopolymere durch Radikalische Polymerisationsmethoden.....	16
1.3.1 Synthese von Glykostrukturen und dessen Polymerisation mittels RAFT-Technik.....	17
1.3.2 Grafting Methoden zur Synthese von Kammpolymeren .....	20
<b>2 Motivation und Aufgabenstellung .....</b>	<b>23</b>
<b>3 Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>25</b>
3.1 Recycling von Bausteinen und funktionalisierten Zuckern in der Festphasensynthese .....	26
3.1.1 Zurückgewinnung von Fmoc geschützten Bausteinen und Aminosäuren .....	27
3.1.2 Zurückgewinnung von Azid tragenden Zucker .....	30
3.2 Synthese von Kammpolymeren mittels <i>grafting-through</i> Technik.....	31
3.2.1 Synthese von Glykomakromonomeren mit polymerisierbaren Gruppen.....	32
3.2.2 Freie radikalische Polymerisation von Glykomakromonomeren .....	36
3.3 Synthese von zuckerfunktionalisierten Kammpolymeren mittels <i>grafting-to</i> Technik .....	41

3.3.1	Synthese von Glykomakromoleküle mit terminalen Aminogruppen.....	42
3.3.2	Synthese von Poly(pentafluorophenylacrylat) als Polyaktivester .....	43
3.3.3	Funktionalisierung des Polyaktivesters mit Glykomakromolekülen zum Glykokammpolymer .....	45
3.3.1	Synthese von Glykokammpolymeren mit sterisch anspruchsvollen Seitenketten .....	53
3.3.2	Synthese sulfatisierter Glykokammpolymeren .....	56
3.4	Bindungsstudien der Glykokammpolymeren .....	58
3.4.1	Bindungsstudien am Modellektin ConA .....	58
3.4.2	Bindungsstudien am humanen Papillomavirus .....	65
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>70</b>
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>74</b>
5.1	Materialien .....	74
5.2	Instrumente.....	74
5.3	Synthesen von Monomeren und Oligomeren.....	76
5.3.1	Bausteine .....	76
5.3.2	Oligomersynthese.....	78
5.3.3	Zurückgewinnung von Fmoc geschützten Bausteinen und Aminosäuren .....	84
5.3.4	Zurückgewinnung von Azid tragenden Zuckern .....	85
5.3.5	Pentafluorophenyl acrylate und RAFT-Agent.....	86
5.4	Polymersynthese mittels <i>grafting-to</i> .....	86
5.5	Sulfatisierte Polymere .....	96
5.6	Polymersynthese mittels <i>grafting-through</i> .....	97
<b>6</b>	<b>Verzeichnis .....</b>	<b>100</b>
6.1	NMR.....	100
6.2	HPLC.....	121
6.3	ESI-MS.....	125
6.4	GPC .....	129
6.5	SPR.....	134

6.6	Abkürzungsverzeichnis .....	138
6.7	Literaturverzeichnis .....	140

# 1 Allgemeine Einleitung

Kohlenhydrate und Glykomoleküle gewinnen seit vielen Jahren an Interesse. Mit zunehmendem Wissen über ihre biologischen Wechselwirkungen, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Befruchtungsprozesse<sup>1</sup>, Entzündungsreaktionen<sup>2</sup>, Adhäsion und Virulenz von Krankheitserregern<sup>3,4</sup> wird ihre Bedeutung für die Pharmakologie, Biologie und Chemie zunehmend wichtiger.<sup>5,6</sup> Dank ihrer großen strukturellen Vielfalt, ist es ihnen möglich, in verschiedenen biologischen Systemen zu interagieren und eine Reihe an Prozessen zu katalysieren sowie an Proteinen zu binden.<sup>2</sup> Eine wichtige Klasse der kohlenhydraterkennenden Proteinrezeptoren sind die sogenannten Lektine, die z.B. für die Zuckererkennung an der Zelloberfläche von Bakterien, Tieren und Pflanzen verantwortlich sind.<sup>7</sup> Da die Bindung zwischen einem einzelnen Kohlenhydratliganden und dem Lektinrezeptor meist sehr schwach ist, erhöht die Natur die Bindungsaffinität durch sogenannte Multivalenzeffekte, bei denen mehrere Kohlenhydratliganden auf einem Proteingerüst präsentiert werden.<sup>8,9</sup> Folglich ist die Erforschung monovalenter und multivalenter Strukturen von großer Bedeutung.<sup>10,11</sup> Synthetische Glykomimetika sowie Glykopolymere mit sequenzkontrolliertem Aufbau können daher genutzt werden um neue Erkenntnisse über die Korrelation zwischen Struktur und Kohlenhydrat-Rezeptor Wechselwirkung zu gewinnen und deren Einsatz in der Biomedizin bewerten. Um den Zusammenhang zwischen der Struktur und der resultierenden Funktion eines Glykopolymers zu verstehen, wäre ein sequenzgesteuertes und monodisperses Gerüst erforderlich. Kürzlich hat der Arbeitskreis von Prof. Dr. Laura Hartmann die Festphasensynthese von sogenannten Präzisionsglykomakromolekülen vorgestellt, die nun die kontrollierte Einführung von Zuckerliganden auf einem monodispersen, sequenzkontrollierten Glykooligomergerüst ermöglicht.<sup>12</sup> Die folgenden Kapitel geben einen kurzen Überblick über die wichtigsten Grundlagen zur Interaktionen zwischen Kohlenhydraten und Lektinen, der Synthese von Glykokampolymeren, Kampolymeren sowie den Einsatz der Festphasensynthese und ausgewählter Analysemethoden.

## 1.1 Glykobiologie: Die Rolle von Kohlenhydraten in der Natur

Unzählige Organismen produzieren extrazelluläre sowie intrazelluläre Polysaccharide mit hohem Molekulargewicht. Diese Strukturen liegen entweder neutral oder geladen vor und können nahezu jede denkbare Konstruktion annehmen. Darüber hinaus können sie durch verschiedene Arten von Bindungen miteinander verbunden sein.<sup>13</sup> Einerseits können sie gelöst vorliegen und geordnete

Konformationen bilden, andererseits können sie stabile Gele oder lyotrope Flüssigkristalle formen.<sup>14</sup> Dennoch sind diese Glykokonjugate, die meist polydispers sind, nicht leicht zu analysieren oder synthetisch nachzuahmen. Ihre strukturelle Varianz erlaubt es ihnen, endlose Informationen für spezifische molekulare Wechselwirkungen zu enthalten. So sind sie beispielsweise in der Lage, sich über spezifische Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydraten und Proteinrezeptoren, den so genannten Lektinen, an Zelloberflächen zu binden. In Abbildung 1 sind beispielhaft Interaktionen von Hormonen, Antikörper, Viren und Bakterien an die Glykokalyx schematisch dargestellt.

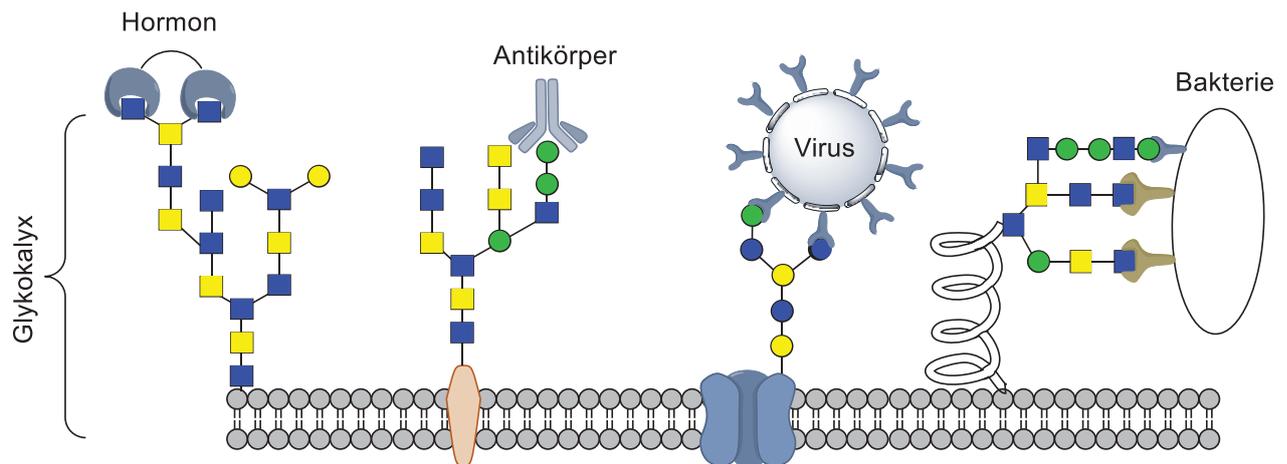


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Glykokalyx und die Wechselwirkungen zu Rezeptoren von Hormonen, Antikörper, Viren und Bakterien, in Anlehnung an<sup>15,16</sup>.

Die Informationen innerhalb des Kohlenhydrats, mit denen es interagieren soll, werden oft als "Glykocode" bezeichnet.<sup>17-20</sup>

### 1.1.1 Zuckerliganden und Glykopolymere und ihre Rolle in Biologischen Prozessen

Unter den komplexen Strukturen in der Natur sind die Proteoglykane von besonderer Bedeutung. Diese bürstenartigen Makromoleküle aus Polyelektrolyten enthalten ein Proteingerüst mit Kohlenhydraten die als Seitenketten gebunden sind. Jedes Molekül besitzt etwa 100 Chondroitinsulfatketten und 50 Keratansulfate und ebenso viele O- und N-verknüpfte Zucker, die an den Proteinkernen gebunden sind, sodass Kohlenhydrate mehr als 90% des Molekulargewichts ausmachen.<sup>21,22</sup> Da sie für eine Vielzahl von biologischen Prozessen verantwortlich sind und fast überall im menschlichen Körper vorkommen, werden sie oft „Organisatoren der interzellulären Matrix“<sup>21</sup> genannt. Beispielsweise sind sie verantwortlich für Zellkommunikation, Zellschutz und Befeuchtung der Zelloberflächen und Schleimhäuten (z.B. in der Lunge).<sup>23-27</sup> Sie agieren als Wasserabsorber in Knorpelgewebe und sorgen so für die nötige Gleitfähigkeit und Dämpfungseigenschaft.<sup>21,28-30</sup> Forscher

vermuten, dass ihre Funktion unmittelbar mit ihrer kammartigen Struktur zusammenhängt, welches für eine hohe Dichte an funktioneller Gruppen sorgt (siehe Abbildung 2).<sup>31,32</sup>

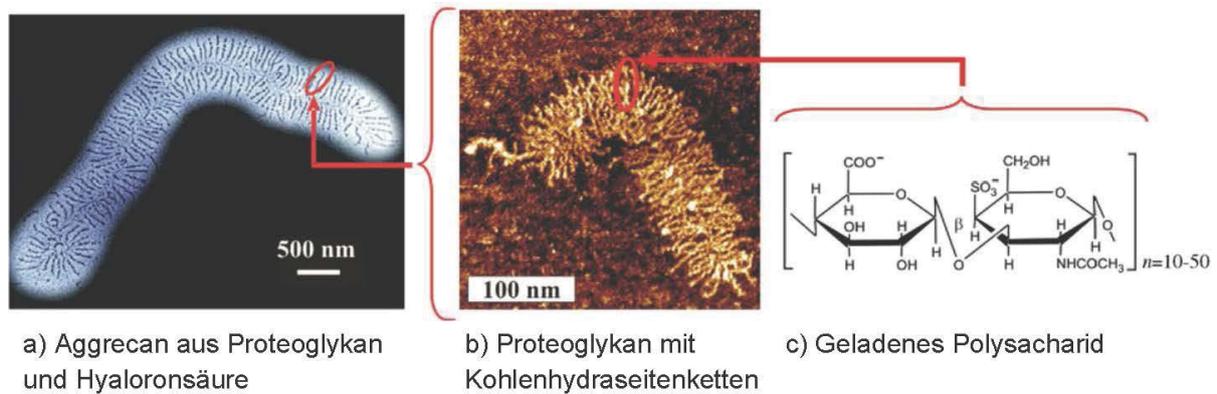


Abbildung 2: Strukturelle Hierarchie eines Proteoglykan-Aggregates an Hyaluronsäure in Knorpelgewebe: a) Aggrecan aufgenommen im Elektronenmikroskop b) Proteinrückgrat mit Glukosaminglykan als Seitenkette und Bindungsprotein am Kopf c) chemische Struktur der Disaccharid-Wiederholungseinheit, adaptiert von Seog et al.<sup>22</sup>, Buckwalter et al.<sup>33</sup> und Sheiko et al.<sup>34</sup>

Aus diesem Grund können synthetische Oligosaccharide und Glykopolymere als Modellsysteme genutzt werden um genau diese biologische Wechselwirkungen der Kohlenhydrat-Rezeptorbindung an der Zelloberfläche genauer zu beobachten und zu verstehen.<sup>30</sup> Darüber hinaus können diese Erkenntnisse zu synthetischen Strukturen führen, die biosynthetische Pfade abfangen und die genannten Prozesse unterbinden oder pathologische kohlenhydratabhängige Prozesse stören und dadurch als Wirkstoffe bei Entzündungen oder Virusinfektionen dienen.<sup>35</sup> Um jedoch den Zusammenhang zwischen Struktur und der resultierenden Funktion eines Glykopolymers zu verstehen, ist ein sequenzgesteuertes und monodisperses Gerüst entscheidend. Die Synthese solcher Strukturen wird im Kapitel 1.2 und im Kapitel 1.3 genauer beschrieben.

### 1.1.2 Lektine und deren Wechselwirkung

Eine wichtige Klasse der kohlenhydratbindenden Rezeptoren sind die sogenannten Lektine. Boyd et al. definierte Lektine als Proteine, die eine spezifische Bindung an glykosilierten Strukturen aufweisen.<sup>36-38</sup> Hierbei binden die Lektine nicht nur an Glykopolymeren oder Oligosaccharide auf Zellen, sondern auch auf gelöste Glykane einschließlich Monosaccharide.<sup>39</sup> Diese Lektine sind sehr spezifisch und können kleinste Veränderungen am Substrat erkennen. Beispielsweise bindet das Lektin Concanavalin A (ConA) spezifisch die  $\alpha$ -Anomere der Mannose und Glucose, während es keine Affinität zum jeweiligen  $\beta$ -Anomer aufweist.<sup>40</sup> ConA wurde zu einem Modellektin, um die Wechselwirkung mit

Kohlenhydraten auf molekularer Basis zu untersuchen, da es das erste Lektin mit einer bekannten primären sowie quartären Struktur war.<sup>41,42</sup> Unter neutralen Bedingungen besitzt ConA überwiegend eine tetramere Konformation aus vier gleich großen Proteinuntereinheiten mit jeweils einer kohlenhydraterkennenden Domäne, die sogenannten CRDs (*carbohydrate recognition domain*) (siehe Abbildung 3).<sup>43,44</sup>

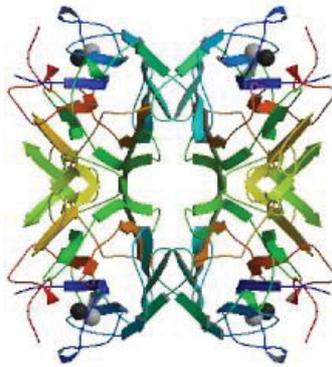


Abbildung 3: Struktur von ConA adaptiert aus der Protein Data Base RCSB mit der Kennnummer 1JBC.

ConA gehört zu der Familie der C-Typ Lektine (CTL), welche die häufigste aller tierischen Lektine sind. Die Klasse der C-Typ Lektine beinhalten CRDs, welche Kohlenhydrate in Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden. Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind sowohl in der Ligandbindung als auch in der Aufrechterhaltung der Struktur des Proteins beteiligt.<sup>45</sup> C-Typ Lektine werden entweder als Transmembranproteine oder als lösliche Proteine ausgeschieden.<sup>46</sup> Im Immunsystem haben CTLs sich als Adhäsions- sowie als Erkennungsrezeptoren für Krankheitserreger erwiesen.<sup>47</sup> So sind beispielsweise DC-SIGN und DC-SIGNR Zell-Adhäsionsrezeptoren sowie Pathogen erkennende Rezeptoren. DC-SIGN und DC-SIGNR befinden sich auf der Oberfläche von dendrischen Zellen, welche hochspezialisierte Zellen sind, die das Immunsystem Steuern. Ähnlich wie ConA sind auch DC-SIGN und DC-SIGNR Tetramere und besitzen vier Bindungstaschen.<sup>48,49</sup> Beide binden einerseits an N-verknüpfte Oligosaccharide mit hohem Mannosegehalt sowie an verzweigte fucosylierte Oligosaccharide.<sup>48</sup> Hoch mannosehaltige Glykane sind reichlich an Virenoberflächen (z.B. HI-Virus), während fucosylierte Glykane häufig bei Parasiten zu finden sind.<sup>50</sup> Aus diesen Gründen sind DC-SIGN und DC-SIGNR Gegenstand der Forschung und werden genutzt um die Aktivität von Biomimetika zu analysieren um Bindungsprozesse des HI-Virus zu verstehen und somit potentiell Therapiemöglichkeiten zu finden. Ein weiteres Protein welches in dieser Arbeit verwendet wurde ist MBL. In Gegenwart von Calcium kann MBL über mehrere CRDs an eine Vielzahl von Sacchariden und Oligosaccharide binden.<sup>51</sup> MBL ist ein häufig untersuchtes Lektin, da es zum angeborenen Immunsystem vieler Säugetiere gehört und bindet beispielsweise an Mannose, N-Acetyl-Glucosamin während es aus sterischen Gründen nicht an Galactose bindet. Somit bindet es

an eine Reihe von Mikroorganismen, wie beispielsweise HIV<sup>52</sup>, Hefe<sup>53</sup> und Influenza A,<sup>51,54,55</sup> während es nicht infektiöse Organismen vermeidet.<sup>56</sup>

Die genannten Lektine sind jeweils Tetramere und besitzen dementsprechend vier CRDs, wodurch sie in der Lage sind mehrere Kohlenhydrate gleichzeitig zu binden. Während Antikörper – Protein Wechselwirkungen eine Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) im nanomolaren Bereich besitzen, sind Kohlenhydrat – Lektin Wechselwirkungen mit einem  $K_D$  im millimolaren Bereich für Monosaccharide wesentlich schwächer.<sup>57-59</sup> Um diese geringe Wechselwirkung zu kompensieren nutzt die Natur multivalente Glykostrukturen, wodurch die Bindungsaffinität zum Lektin effektiv erhöht wird. Dieser Effekt ist als Glykosideffekt bekannt<sup>60-62</sup> Dieses Konzept der Multivalenz ist bereits erfolgreich von in der Natur vorkommenden Glykopolymeren auf synthetische Glykopolymere übertragen worden.<sup>63,64</sup> Somit sind multivalente Bindungen ein wesentliches Prinzip in der Natur, das angewendet wird, um einzelne, im Allgemeinen schwache Ligand – Rezeptor Wechselwirkungen, additiv zu kombinieren, was zu einer Erhöhung der Avidität und Spezifität führt. Für die enorme Zunahme der Avidität, bei multivalenten Wechselwirkungen, sind vier Hauptmechanismen verantwortlich die im Folgenden genauer beleuchtet werden und in Abbildung 4 schematisch dargestellt sind.

Durch die multivalente Präsentation der Kohlenhydrate an einem Glykopolymer, kann ein Polymer mehrere CRDs erreichen und so einen Chelatkomplex bilden. Dieser sogenannte *Chelat-Effekt* ist in der Literatur vielfach diskutiert und beschränkt sich nicht nur auf Kohlenhydrat – Lektin Wechselwirkungen.<sup>65</sup> Die erhöhte Stabilität von Chelatkomplexen im Vergleich zu Komplexen mit jeweils einem unabhängigen Liganden, beruht auf die Freisetzung von maximalen Komponenten die sich frei in Lösung bewegen können und ist daher entropisch begünstigt.<sup>65-67</sup> Darüber hinaus, wird davon ausgegangen, dass jede eingegangene Bindung mit dem Verlust an Entropie durch Rotations-, Transformations- sowie Konformationsfreiheitsgraden des Bindungsliganden einhergeht. Dieser Verlust bezieht sich jedoch bei multivalenten Systemen ausschließlich auf das erste Bindungsereignis, wohingegen bei einzelnen Liganden die Entropie separat gezahlt werden muss. Aus den genannten entropischen Effekten kann eine Chelatbindung um ein vielfaches begünstigt werden.<sup>68-70</sup>

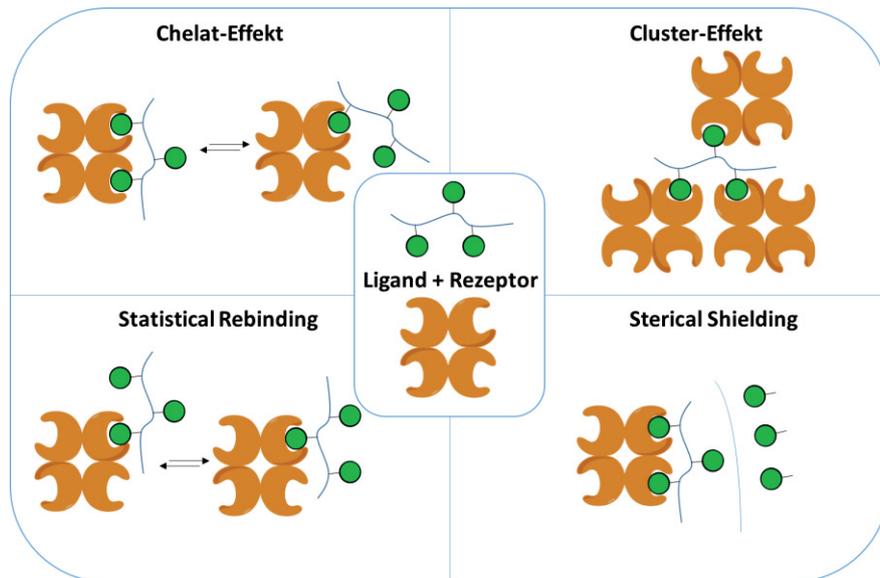


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Multivalenzeffekte zwischen Rezeptor und Ligand.<sup>71</sup>

Aufgrund der Tatsache, dass Lektine meist über mehrere CRDs verfügen, können sie mehrere multivalente Glykopolymerketten binden und somit als Vernetzer dienen.<sup>38</sup> Durch das Formen eines Clusters mit mehreren Lektinen und multivalenten Liganden wird dieser Effekt als *Cluster-Effekt* bezeichnet (siehe Abbildung 4).<sup>72,73</sup>

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist das sogenannte „*Statistical Rebinding*“.<sup>63,74</sup> Wie bereits erwähnt ist die Bindungsaffinität einzelner Zuckerliganden mit dem Lektin sehr schwach, welches mit einer starken Dissoziationsraten einhergeht. Liegt jedoch durch multivalente Liganden eine hohe Konzentration an Zucker in unmittelbarer Nähe der Bindungsstelle des Lektins vor, so kann nach Dissoziation des gebundenen Zuckers eine schnelle Reassoziationsrate des benachbarten Zuckers erfolgen. Dieser Effekt sorgt insgesamt für eine stärkere Gesamtbindung des multivalenten Liganden.<sup>75</sup>

Das *Sterical Shielding* thematisiert die Eigenschaft des bindenden Liganden andere Bindungspartner, die mit dem bindenden Liganden um die CRD konkurrieren, abzuschirmen. Geht beispielsweise ein Glykopolymer eine Bindung mit einem Lektin ein, so kann es über das Rückgrat und mit dem Teil, der nicht an der Bindung beteiligt ist, andere Substanzen abschirmen. Hierbei kann es sich um andere Zucker, Glykopolymere, Lektine oder aber auch Lipide handeln. Obwohl diese nicht direkt an der Bindung beteiligt sind, haben sie einen signifikanten Einfluss auf die Stabilität des Kohlenhydrat-Lektinkomplexes, der als sterischer Schutzschild dient. Diese sterische Abschirmung erhöht die gesamte Bindungsaffinität durch Stabilisierung und hängt stark von der Größe der nichtbindenden Komponenten des Liganden ab.<sup>76</sup> Dieser Effekt der Abschirmung erscheint vielversprechend in der Abschirmung von Viren oder Bakterien um diese somit unschädlich zu machen. Beispielsweise könnte ein

geeignetes Glykopolymer sich an die Rezeptoren des Pathogens setzten und dessen Angriff an eine Zelle unterbinden.<sup>77,78</sup>

Ungleich wie oben dargestellt treten, in einer tatsächlichen Rezeptor – Ligand Wechselwirkung, diese vier Multivalenzeffekte nicht separat auf. Auch wenn Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion bereits in der Literatur diskutiert werden, ist es alles andere als trivial diese Effekte analytisch zu differenzieren und nachzuweisen. Im Folgenden wird genauer auf die Analyse dieser Wechselwirkung eingegangen.

### 1.1.3 Methoden zur Messung der Kohlenhydrat – Lektin Wechselwirkung

Eine große Bandbreite an Assays, zur Analyse der Bindungsaffinität eines Kohlenhydratligandens gegenüber einem Lektinrezeptor, haben sich in den letzten Jahren etabliert. Alle unterscheiden sich stark in ihrem Aufbau, die Darstellung des Ligandens oder des Rezeptors. Da einige Assays in einer statischen oder in einer dynamischen Umgebung des Substrates durchgeführt werden, unterscheiden sie sich stark in ihren Bindungsereignissen, welches in der Auswertung der Daten berücksichtigt werden muss. Klassische Methoden wie die Trübungsmessung<sup>79</sup>, durch das formen unlöslichen Niederschlags, sowie moderne Assays wie das „soft colloidal probe – reflection interference contrast microscopy“ (SCP-RICM)<sup>80,81</sup> sind hoch interessant und beleuchten die zu untersuchenden Wechselwirkung aus verschiedenen Winkeln.

Eine der leistungsfähigsten Methoden zur Bestimmung von Kohlenhydrat – Lektin Wechselwirkungen ist die Oberflächenplasmonresonanz (SPR), die es ermöglicht, sowohl kinetische als auch Sättigungsexperimente durchzuführen. Bei SPR-Assays ist ein Bindungspartner an eine Oberfläche gebunden, während der andere in einer mobilen Phase ist, die mit einer konstanten Strömung durch die Oberfläche verläuft. Zur Veranschaulichung wird ein Assay gewählt bei dem das Lektin immobilisiert auf der Oberfläche vorliegt (siehe Abbildung 5).

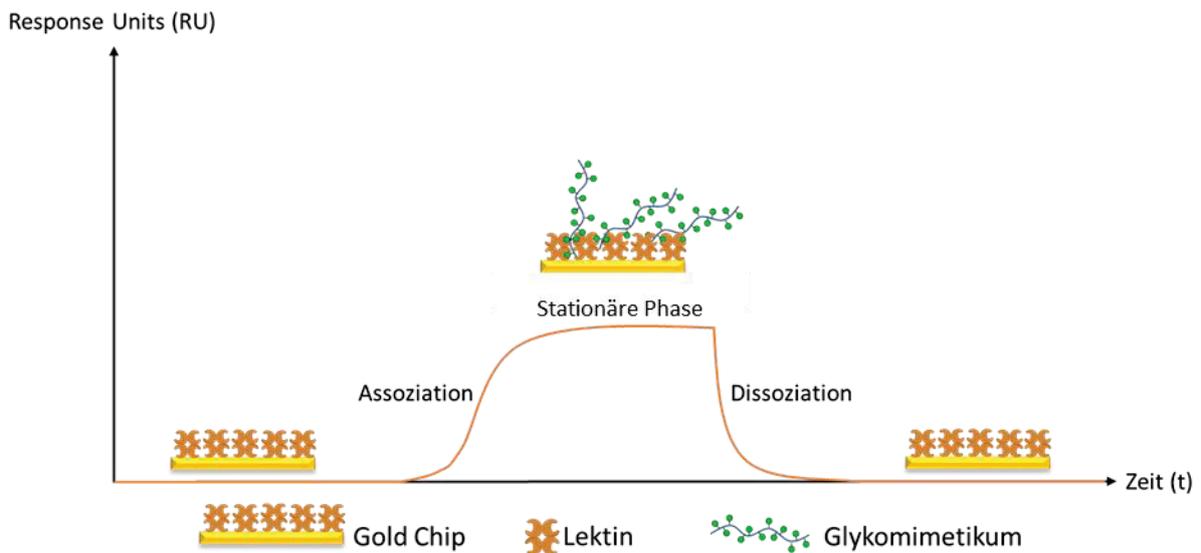


Abbildung 5: Überblick über ein SPR-Sensogramm aus einem direkt bindenden SPR-Assay mit oberflächenimmobilisierten Lektinrezeptoren. Das Glykomimetikum befindet sich in der flüssigen Phase, welche über die funktionalisierte Fläche läuft.

Wenn der Ligand von den Rezeptoren an der Oberfläche erfasst wird, wird eine Massenzunahme an der Oberfläche erhalten, die in eine Änderung des Brechungsindex resultiert.<sup>82,83</sup> Der Brechungsindex der Oberfläche wird ständig überwacht, sodass jede Änderung aufgezeichnet wird, welches ein in sogenannten Response Units (RU) ein SPR-Sensorprogramm ergibt. Das Sensogramm zeigt in der ersten Phase eine Zunahme der Response Units (RU) durch die Kohlenhydratliganden-Interaktion mit den Lektinen an der Oberfläche (Assoziationsphase), gefolgt von einer stationären Phase, in dem sich ein Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation ergibt. Nach der stationären Phase wird ligandfreier Puffer über die Oberfläche gegeben, wodurch eine Abnahme der RU folgt. Folglich wird der Ligand von der Oberfläche abgewaschen (Dissoziationsphase), sodass wieder das Anfangsstadium erreicht wird. Da der Massenanstieg auch vom Molekulargewicht und der Größe des Glykomimetikums abhängt, wird der Ligand in einem direkt bindenden SPR-Assay in verschiedenen Konzentrationen bis zum Erreichen einer Sättigung der Oberfläche injiziert (maximale RU ( $R_{max}$ )). Die Ligandenkonzentration, bei der die halbe maximale Sättigung der Rezeptoroberfläche ( $R_{max}/2$ ) erreicht wird, ist die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ). Dieser erhaltene Wert ist molekulargewichts- oder größenunabhängig und somit Aussagekräftig und spezifisch für das Molekül. Außerdem ist der  $K_D$  Wert geeignet zum direkten Vergleich verschiedener Kohlenhydratliganden, verschiedener Größe und Struktur.

Durch die Kombination vom SPR und monodispersen und sequenzkontrollierten Strukturen können die Bindungsereignisse gedeutet werden und über Korrelationen zwischen Struktur und Funktion

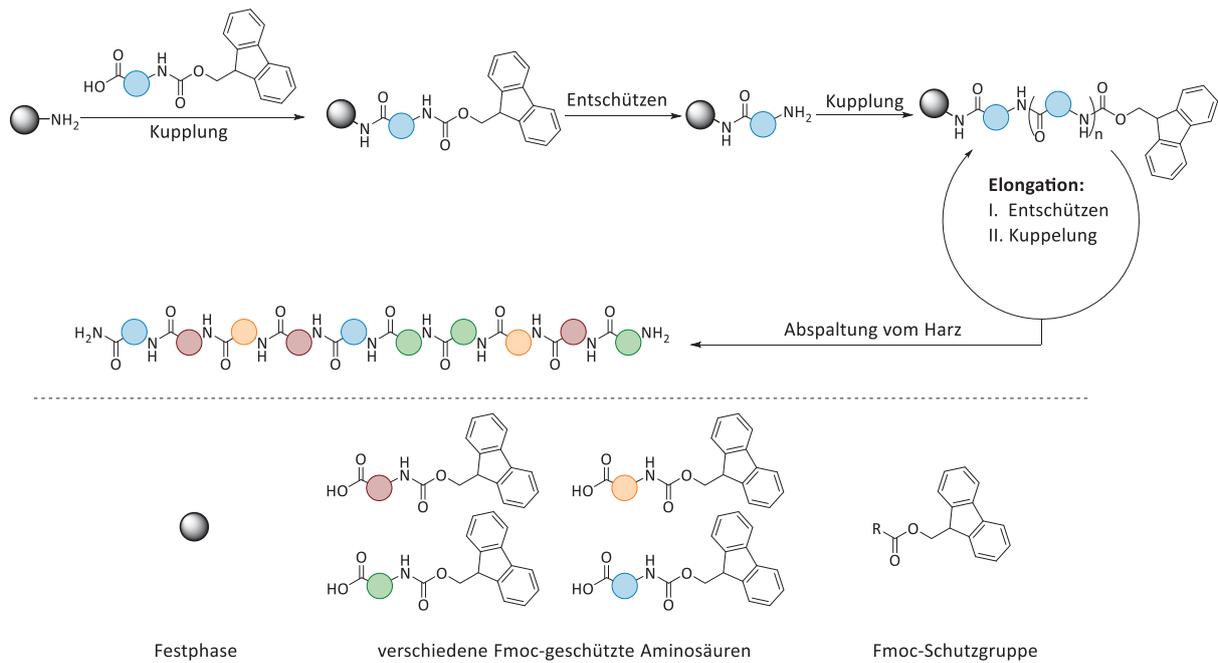
Aufschluss geben. Im folgenden Kapitel wird auf die Synthese solcher monodispersen und sequenzdefinierten Strukturen genauer eingegangen wird.

## 1.2 Festphasensynthese Linearer Präzisionsmakromolekülen

Die Ursprünge der Festphasensynthese begannen mit der Idee von R.B. Merrifield, Peptide mittels eines Harzes als Festphase zu synthetisieren, da sich Peptide in Flüssigphase nur unter hohem Zeitaufwand synthetisieren lassen.<sup>84</sup> Hierbei wird die erste Aminosäure in der gewünschten Sequenz an der unlöslichen Festphase gekuppelt woran die Verkettung der restlichen Aminosäuren des Peptids erfolgen. Der Vorteil dieser Route ist es, dass alle Überschüsse, Katalysatoren sowie Nebenprodukte die nicht an der Festphase kuppeln abgewaschen werden können, wodurch zeitaufwändige Reinigungsschritte umgangen werden.<sup>85</sup>

### 1.2.1 Fmoc-basierte Festphasen Peptid Synthese

Wie bereits beschrieben, wurde die Festphasensynthese (SPS) für eine einfache und unkomplizierte Peptidsynthese entwickelt. Hierbei werden die Peptide aus natürlichen oder synthetischen Aminosäuren aufgebaut, indem sie Schritt für Schritt aneinander verkettet werden. Diese Aminosäuren verfügen in der Regel über eine freie Carbonsäure über die die Kupplungsreaktion erfolgt und ein geschütztes Amin. Die häufigste temporäre Schutzgruppe in der SPS ist Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc).<sup>86</sup> In Schema 1 wird das Verfahren der Fmoc-basierten Festphasen Peptid Synthese schematisch dargestellt.



Schema 1: Schematische Darstellung der Fmoc-basierten Festphasen Peptid Synthese.

Der Schlüssel zu dieser Synthese ist der temporäre Schutz der Aminogruppe der Aminosäure, da dieser Schutz eine sequenzgesteuerte Synthese des gewünschten Peptids ermöglicht. Nach der Kupplung der ersten geschützten Aminosäure an das Harz werden Überschüsse und verbleibende Reaktanten beseitigt, sodass nach Entfernung der Schutzgruppe die nächste geschützte Aminosäure gekuppelt werden kann. Anschließend kann diese wiederum entschützt werden, um sie für den nächsten Kupplungsvorgang vorzubereiten. Um eine vollständige Umwandlung der Aminogruppen zu gewährleisten, werden die Reaktanten in einem großen Überschuss zugegeben, da sie nach der Reaktion leicht weggespült werden können. Dies kann beliebig wiederholt werden, bis das gewünschte Peptid mit der gewünschten Sequenz synthetisiert wurde. Nachdem das gewünschte Produkt synthetisiert wurde, wird das Peptid unter für das Harz spezifische Bedingungen abgespalten.

Auch wenn diese Methode der Peptidsynthese überlegen zu sein scheint, ist zu erwähnen, dass das Verfahren für sehr lange Polypeptide nicht geeignet ist, da die technische Löslichkeit und Reinigung mit zunehmender Länge der Kette sich stark herabsetzen.<sup>85,87</sup> Dennoch ist diese Technik bis heute eine der meist genutzten Methoden zur Synthese von monodispersen und sequenzkontrollierten Strukturen mit hoher Reinheit. Darüber hinaus wurde diese Methode bereits auf automatisierten Synthesizern übertragen, wodurch große Mengen an Peptiden entworfen werden können.

Für die SPS sind verschiedene Harze kommerziell erhältlich. Merrifield verwendete beispielsweise eine vernetztes Copolymer aus Styrol und Divinylbenzol (DVB) mit Chlormethylgruppe als Linker. Linker werden sorgfältig ausgewählt, da sie die resultierende Endgruppe des Peptids, die Abspaltbedingungen, die Stabilität bei der Kupplung und die Schutzbedingungen bestimmen. Im

Allgemein ist die Festphase ein Polymer, an der Polyethylenglykol (PEG) auf das PS-DVB-Harz gepropft ist, wodurch die Reaktionsstelle für die Elongation besser zugänglich ist. Das in dieser Arbeit verwendete TentaGel Rink Amid modifizierte Harz (TentaGel S RAM<sup>®</sup>) ist kommerziell erhältlich und ist in Abbildung 6 dargestellt.

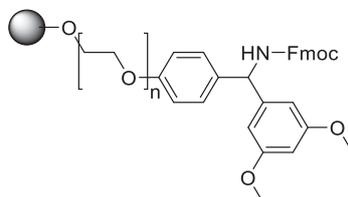


Abbildung 6: Struktur vom TentaGel S RAM<sup>®</sup> Harz.

Auch wenn in dieser Arbeit der Fokus auf die Schutzgruppe Fmoc gelegt ist, sollte berücksichtigt werden, dass es in der synthetischen Chemie viele andere Schutzgruppen wie beispielsweise tert-Butyloxycarbonyl (Boc) und Allyloxycarbonyl (Alloc) (siehe Abbildung 7). Diese werden ebenfalls in der Fmoc basierten Peptid Synthese verwendet um Seitenketten oder andere Funktionelle gruppen orthogonal zu schützen, da Alloc und Boc unter unterschiedlichen Bedingungen abgespalten werden. Während Boc unter stark sauren Bedingungen abgespalten wird, wird Alloc anhand eines Palladium(0) Katalysators, wie beispielsweise tetrakis-(triphenylphosphine)palladium(0), entfernt.<sup>88,89</sup>

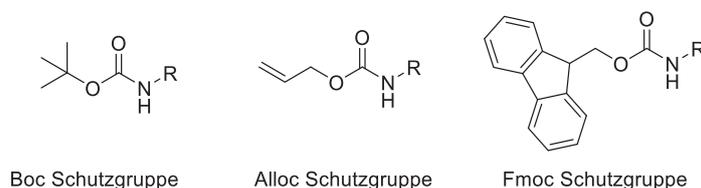
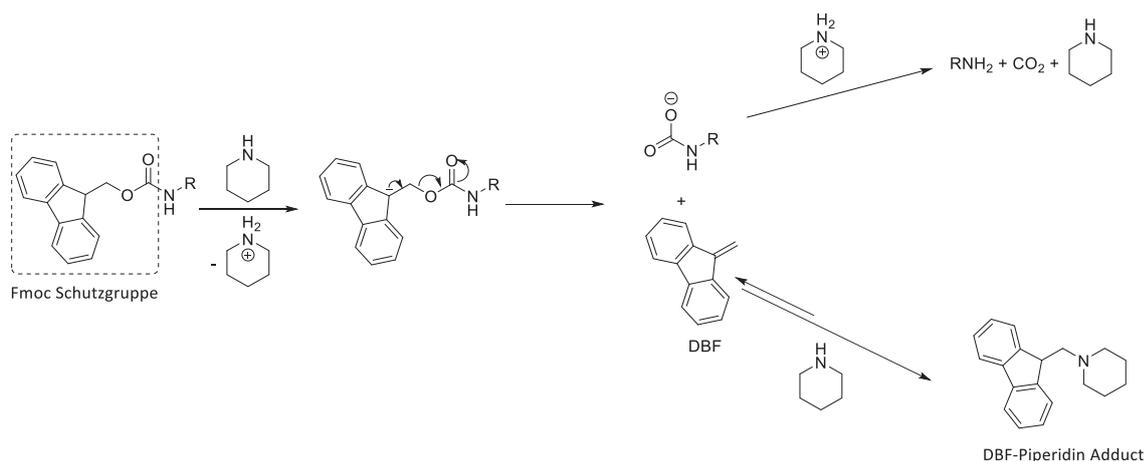


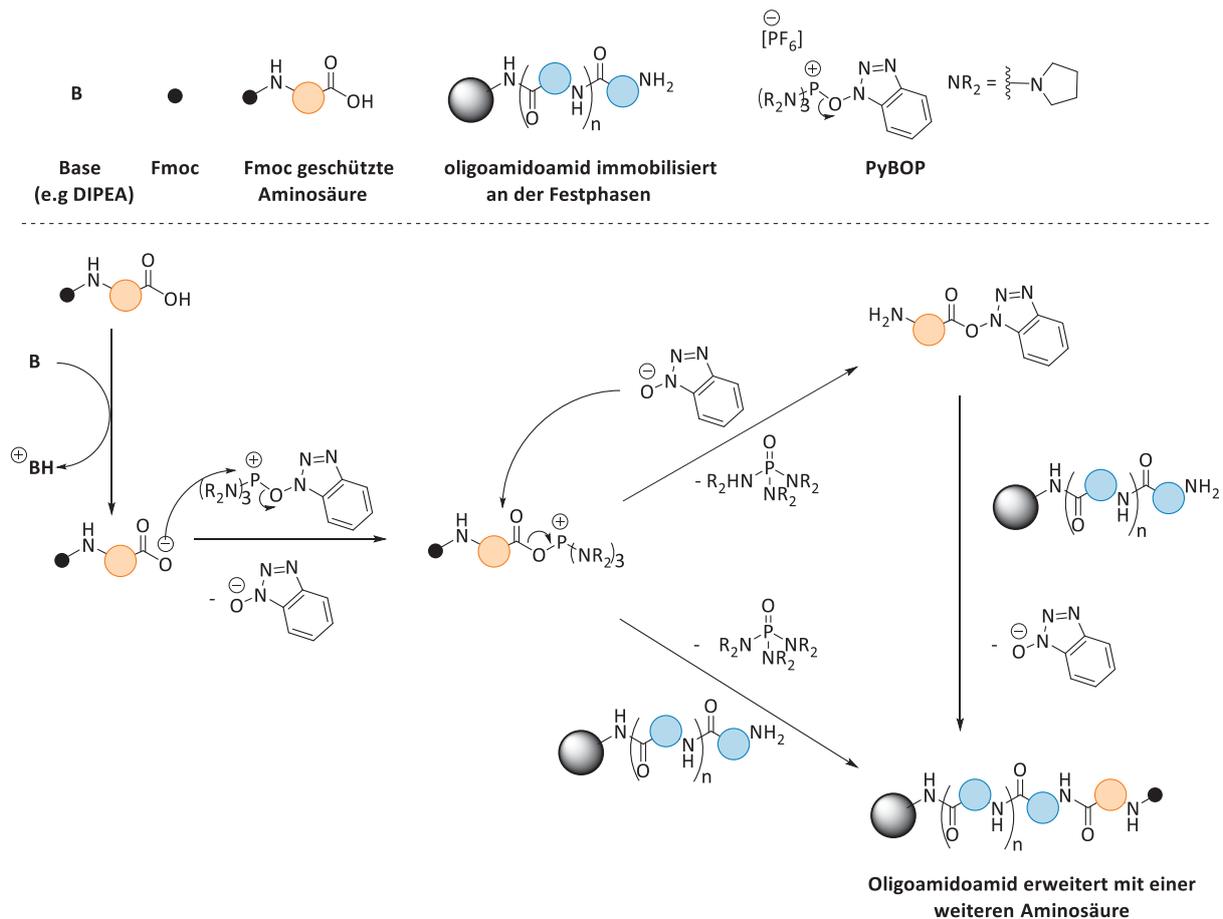
Abbildung 7: Struktur von Boc (links), Alloc (Mitte) und Fmoc (rechts).

Der Schwerpunkt liegt jedoch auf der Fmoc-Schutzgruppe, da sie die am häufigsten verwendete Schutzgruppe in sogenannten Standard-Fmoc-Kupplungsprotokollen ist.<sup>90</sup> Ein Vorteil der Verwendung von Fmoc ist seine UV- und Fluoreszenzaktivität, die es ermöglicht, den Entschützungsprozess zu überwachen. Darüber hinaus kann es leicht mit einer 20-25%igen Piperidinlösung in DMF vollständig entfernt werden.<sup>91</sup> Hierbei fungiert Piperidin nicht nur als Entschützungsmedium, sondern fängt das entstandene Dibenzofulven (DBF) ein und verhindert dessen Polymerisation. Der Entschützungsmechanismus ist im Folgenden schematisch dargestellt (siehe Schema 2).



Schema 2: Schematische Darstellung der Fmoc-Entschützung mittels Piperidin.<sup>90-93</sup>

Eine weitere wichtige Klasse der eingesetzten Reaktanten sind die Kupplungsreagenzien. Diese sind essentiell in der Amidbildung und erlauben die Reaktionsführung unter Normalbedingungen. Da bei einer Reaktion zwischen Amin und Carbonsäure formal Wasser abgespalten werden muss, sorgen alle Aktivierungsreagenzien für eine Aktivierung der Carbonsäure durch das Anbringen einer besseren Abgangsgruppe. Damit es nicht zur Protonierung der Aminogruppe durch die Carbonsäure kommt, wird bei der Kupplungsreaktion eine nicht nukleophile Base, meist Diisopropylethylamin (DIPEA), hinzugefügt. Eine berühmte Gruppe von Kupplungsreagenzien ist die Gruppe der Carbodiimide. 1955 wurde Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) als Kupplungsreagent für die Peptidsynthese von Sheehan und Hess erstmals erfolgreich eingesetzt.<sup>94</sup> Allerdings kann das Zwischenprodukt durch Umlagerungsreaktionen zu ungewünschte Nebenprodukte führen.<sup>95</sup> Aus diesem Grund wurde 1-Hydroxy-1H-benzotriazol (HOBt) als Additiv eingeführt, da es selbst nukleophil ist unterdrückt es die Umlagerungsreaktion und formt ein Zwischenprodukt, welches aktiv bleibt und zur Amidbildung beiträgt.<sup>96</sup> Durch weitere Optimierungen und Einbezug von gesundheitlichen Risiken ist das meist genutzte Aktivierungsreagenz benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP). Der Mechanismus der Säureaktivierung von PyBOP mit nachfolgender Kupplung einer Aminosäure an einem Oligo(amidoamin)gerüst ist in Schema 3 dargestellt.



Schema 3: Mechanismus der Kupplungsreaktion mittels PyBOP als Reagenz und einer Aminosäure.

Um diese Reaktion durchzuführen, wird eine nicht-nukleophile Base wie Diisopropylethylamin (DIPEA) benötigt, die im ersten Schritt die Carbonsäure der geschützten Aminosäure deprotoniert. Im zweiten Schritt greift die deprotonierte Carbonsäure das Phosphoratom von PyBOP an, wodurch ein äquivalentes OBt-anion freigesetzt wird. Da das Phosphoniumoxid eine gute Abgangsgruppe ist, kann das Zwischenprodukt auf zwei verschiedene Arten reagieren, um zum gewünschten Produkt zu gelangen. Eine Möglichkeit ist der direkte Angriff der Aminogruppe des wachsenden Peptids. Der zweite Weg ist der Angriff des OB-Anions, gefolgt von der Bindung an das Peptid.

### 1.2.2 Synthetische Bausteine

Mittlerweile ist die SPS nicht mehr auf Peptide limitiert und kann für die Synthese von verschiedenen (Bio-)Molekülen wie beispielsweise Nukleotiden<sup>97,98</sup> und Sacchariden<sup>99,100</sup> genutzt werden. Ein Aktuelles Beispiel für den Einsatz der Festphasensynthese ist die von Hartmann et al. vorgestellte Arbeit zur Synthese monodisperser und sequenzdefinierter Oligo(amidoamine) auf Basis von speziell

entwickelten Bausteinen.<sup>101-107</sup> Diese Bausteine sind maßgeschneiderte und definierte Moleküle die, wie die oben beschriebenen Aminosäuren, eine Fmoc geschützte Aminogruppe und eine Carbonsäure tragen. Daher können sie nach dem oben genannten Standard Fmoc-Kupplungsprotokoll an der Festphase verknüpft werden. Oligo(amidoamine) sind für ihre hohe Biokompatibilität und stark reduzierte Immunogenizität bekannt.<sup>108</sup> Darüber hinaus können die resultierenden Oligo(amidoamine) funktionelle Gruppen tragen, die es ermöglichen Liganden, wie beispielsweise funktionalisierte Zucker, zu konjugieren. Dies ermöglicht somit Zugang zu hochdefinierten Glykomimetika auf Basis der Oligo(amidoamine). Die eingesetzten Bausteine werden in funktionelle sowie *Spacer* Bausteine unterteilt. Funktionelle Bausteine sind in der Lage funktionelle Gruppen für weitere Reaktionen an das resultierende Oligo(amidoamin) hinzuzufügen, während *Spacer* Bausteine Einfluss auf die Abstände dieser funktionellen Gruppen sowie die Polarität des Oligo(amidoamine)s nehmen können. Somit ermöglicht diese Synthesestrategie Zugang zu einer Vielzahl von Glykomimetika, wobei aktiv die Struktur durch Position der Liganden sowie dessen Abstände beliebig verändert werden kann. Eine wichtige Voraussetzung bei der Synthese der genannten Oligo(amidoamine) ist, neben dessen monodispersen und sequenzdefinierten Charakter, eine hohe Reinheit. Hierfür müssen die synthetisierten Bausteine selbst eine hohe Reinheit aufweisen.

Im Folgenden werden ausgewählte funktionelle sowie *Spacer* Bausteine präsentiert. Die meisten funktionellen Bausteine basieren auf das Diethylentriamin mit einer funktionellen Seitenkette. Die primären Aminogruppen sind jeweils Fmoc geschützt und succinyliert. Jeder Baustein wird jeweils mit drei Buchstaben benannt, wobei der erste Buchstabe ein Kürzel für die funktionelle Gruppe der Seitenkette, der mittlere Buchstabe definiert das Ausgangsamin aus dem der Baustein synthetisiert wurde, wohingegen der letzte Buchstabe die Säuregruppe definiert. Somit ist beispielsweise der in dieser Arbeit verwendete Baustein TDS, ein Baustein mit einer Dreifachbindung (**Triple bond**), synthetisiert aus **Diethylentriamin** welches mit **Succinylsäure** funktionalisiert ist. Die Dreifachbindung in TDS ermöglicht die Konjugation Azid-funktionalisierter Liganden durch eine kupferkatalysierte Alkine-Azid-Cycloadditionsreaktionen (CuAAC) (siehe Kapitel 1.2.3).<sup>12</sup> Weitere funktionelle Bausteine mit einer Doppelbindung (DDS)<sup>101</sup>, einer Benzylazid Gruppe (BADs)<sup>109</sup> und einem Methylester (MDS)<sup>110</sup> an der Seitenketten sind bereits beschrieben worden. In Abbildung 8 sind TDS als funktioneller Baustein und EDS als hydrophiler *Spacer* Baustein dargestellt.

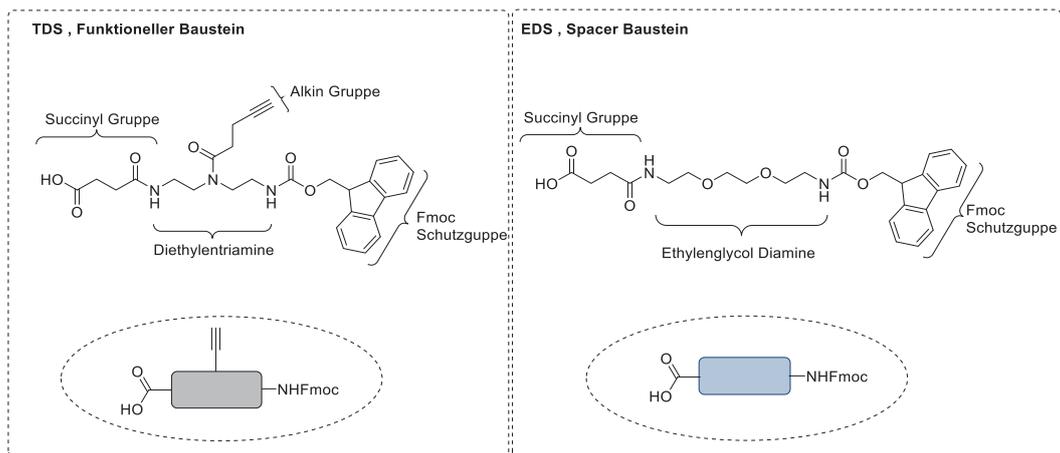
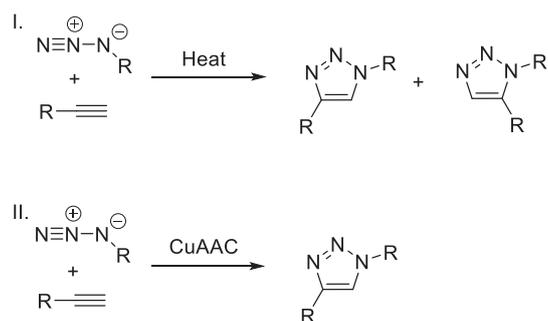


Abbildung 8: TDS als funktioneller Baustein und EDS als hydrophiler Spacer Baustein.

Die *Spacer* Bausteine basieren meist auf Diamine, die ähnlich wie die funktionellen Bausteine jeweils Fmoc geschützt sind während das andere Amin succinyliert ist. Durch die Wahl des Diamins kann die Länge des Bausteins sowie die Polarität beliebig geändert werden. Der oben gezeigte EDS<sup>12</sup> Baustein ist ein hydrophiler Baustein basierend auf Ethyleneglycol. Weitere Bausteine basierend auf Ethylendiamin (SDS)<sup>111</sup> und 1.8-Diaminooctan (ODS)<sup>112</sup> sind in der Literatur bekannt.

### 1.2.3 Zuckerkonjugation

Für die Synthese von Glykomimetika, ist die Zuckerkonjugation essentiell, da sie wichtig für die Bindung an Lektinen sind. Um genaue Rückschlüsse auf die Korrelation zwischen Funktion des Glykomimetikums und dessen Struktur zu erhalten, muss die Konjugation der Zucker in hoher Ausbeute sowie mit hoher Reinheit verlaufen. Hierfür sind sogenannte Click-Reaktionen überlegene Synthesestrategien, da sie mit hoher Ausbeute und unter einfachen Reaktionsbedingungen ablaufen sowie in stereospezifische Produkte resultieren.<sup>113,114</sup> Ein wichtiger Vertreter solcher Click-Reaktionen ist die Thiol-en Reaktion oder die kupferkatalysierte Alkine-Azid-Cycloadditionsreaktionen (CuAAC).<sup>115-118</sup> Je nach Wahl des funktionellen Bausteins kann man zwischen verschiedenen Click-Reaktionen wählen. Wie der Name schon sagt, ist für eine CuAAC ein Reaktant mit einer Alkin-Gruppe, sowie einer mit einer Azid Gruppe erforderlich und können wie in Schema 4 dargestellt zur Reaktion gebracht werden.



Schema 4: Schematische Darstellung der Reaktion zwischen Alkin und Azid mittels Hitze (I) und mittels Kupfer-Click-Chemie (II).

Die Reaktionsbedingungen und die Wahl des Katalysators haben Einfluss auf das resultierende Produkt. So wird mittels Hitze keine große Ausbeute generiert sowie eine Mischung aus dem trans- und cis-Produkt erhalten, während mittels Cu(I)-Katalyse hochselektiv das trans-Produkt in hoher Ausbeute entsteht. Als Cu(I)-Quelle kann ein Cu(I)-haltiges Salz wie beispielsweise Kupfer(I)-iodid (CuI) der Reaktion zugegeben werden oder *in situ* durch Zugabe von Kupfersulfat (CuSO<sub>4</sub>) und einem Reduktionsmittel wie Natriumascorbat erzeugt werden. Obwohl beide Verfahren keine Nebenreaktionen zeigen und keinen weiteren Einfluss auf Reinheit, Ausbeute und Selektivität haben, wird letzteres bevorzugt, da CuSO<sub>4</sub> im Vergleich zu Cu(I)-Salze besser in Wasser löslich ist.<sup>119</sup>

### 1.3 Glykopolymere durch Radikalische Polymerisationsmethoden

Wie bereits im Kapitel 1.1 erwähnt sind natürliche Glykopolymere in der Lage, über hochempfindliche spezifische Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydraten und Proteinrezeptoren, selektiv an Zelloberflächen zu binden. Um diese Wechselwirkung genauer zu verstehen ist es entscheidend monodisperse und sequenziell definierte Glykostrukturen zu synthetisieren. Ebenso wichtig ist die Art der verkettenden Bindungen, die die Monomere verbinden, sowie die Konformation der Zucker ( $\alpha$  und  $\beta$ ), da sie einen großen Unterschied zum Bindungsprotein machen können. Außerdem kann das Vorhandensein verschiedener Hydroxylgruppen in Zuckern, welche identischen Reaktivitäten aufweisen, die Synthese oder Polymerisation beeinträchtigen und zum Verlust der Stereo-Regularitäten führen. Daher sind die Eigenschaften von Glykopolymeren eng mit ihren Glykomonomeren und ihrem Polymerisationsverfahren verbunden.

### 1.3.1 Synthese von Glykostrukturen und dessen Polymerisation mittels RAFT-Technik

Die erwähnten Fakten inspirierten Chemiker, monodisperse und sequenziell definierte Makromoleküle zu entwerfen, um nicht nur den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion von Glykopolymeren zu verstehen, sondern auch um die Komplexität der Untersuchungen der Kohlenhydrat-Lektin Wechselwirkung zu vereinfachen.<sup>120</sup> Strukturen wie lineare und verzweigte Glykopolymere<sup>121,122</sup>, Glykblockpolymere<sup>123</sup> und Glykodendrimere<sup>61,124</sup> wurden bereits synthetisiert und konnten erfolgreich ihre natürlichen Gegenstücke nachahmen (siehe Abbildung 9).

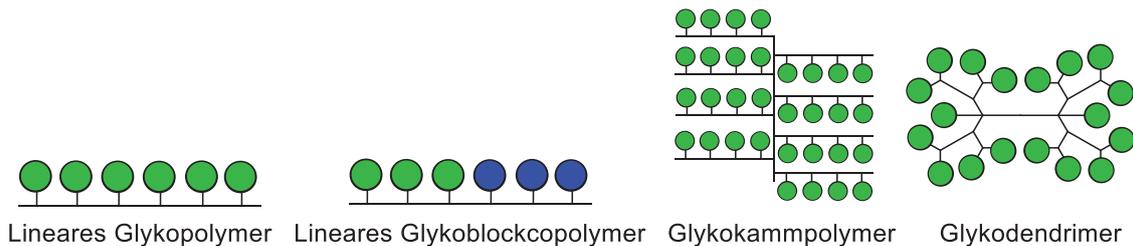


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Linearen Glykopolymers, Glykblockcopolymers, Glykokammpolymers und Glykodendrimers.

Lineare Glykopolymere werden zum Beispiel unter Verwendung von polymerisierbaren Zuckern synthetisiert, was zu einem Glykopolymer mit hängenden Saccharideinheiten führt. Glykblockcopolymere können beispielsweise mittels RAFT-Technik synthetisiert werden.<sup>125-127</sup> Glykokammpolymere sind Polymere mit einer hohen Dichte an zuckerhaltigen Seitenketten. Diese können mittels drei Pfropftechniken synthetisiert werden, welche in Kapitel 1.3.2 ausführlich beschrieben werden.

Solche Strukturen können nicht nur als Modellverbindungen in mechanistische Studien dienen, sondern auch neue pharmazeutische Wirkstoffe darstellen.<sup>128</sup> In den meisten Fällen kann davon ausgegangen werden, dass nur die endständigen, aushängenden Zuckeranteile auf einem Oligosaccharidgerüst interagierende Liganden gegenüber dem Lektin sind. Die Bedeutung des verbleibenden Kohlenhydratgerüsts steht noch zur Diskussion. Da eine Vielzahl der Saccharide im Oligosaccharidkern keine Bindung an Lektine zeigen, wird allgemein angenommen, dass sie als Traggerüst dienen. Einige Forscher postulieren jedoch, dass sie auch während des Lektinbindungsereignisses relevant sind, z.B. bei der Erhöhung der Spezifität oder Erhöhung der sterischen Abschirmung.<sup>129</sup> Eine Vereinfachung zur Synthese von komplexen Glykostrukturen, ist der Verzicht auf alle nichtbindenden Anteile, während die bindenden Anteile wie die Zucker, auf ein künstliches Gerüst angehängt werden. Hierdurch wird die synthetisierte Struktur im Vergleich zum natürlichen Oligosaccharid weniger komplex und daher synthetisch leichter zugänglich.

Wie bereits oben beschrieben können Glykopolymere durch Polymerisation von zuckerhaltigen Monomeren erreicht werden. Monomere für diese Polymerisationstechnik enthalten typischerweise eine polymerisierbare Einheit, die das Polymerisationsverfahren und das Rückgrat bestimmt, eine Bindungseinheit, die den Linker mit dem Rückgrat verbindet, und einen Linker, der direkt mit dem Zucker verbunden ist und den Abstand zum Rückgrat definiert (siehe Abbildung 10).

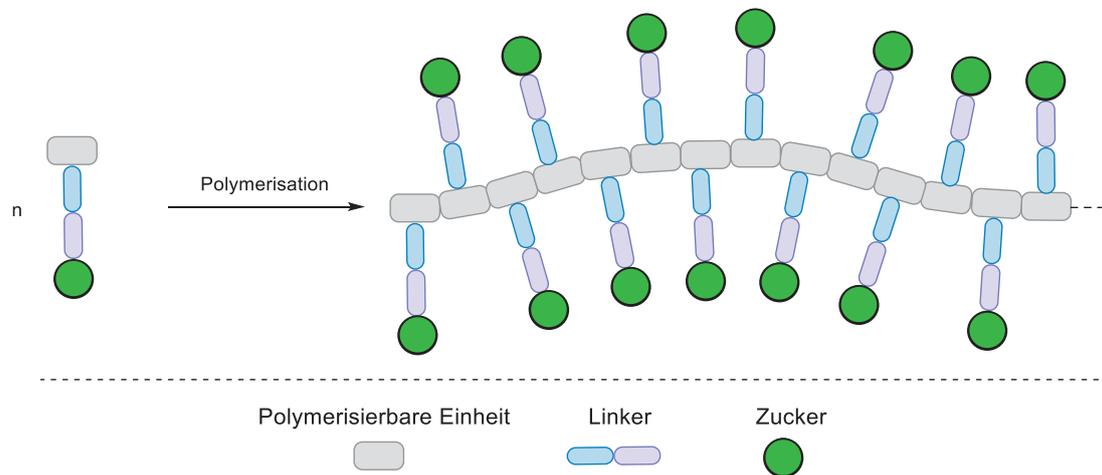


Abbildung 10: Polymerisation eines funktionalisierten Zuckers.

Die Zuckereinheit kann aus Mono-, Di- oder Oligosacchariden bestehen, die eventuell Schutzgruppen während der Synthese tragen. Diese Schutzgruppen können jederzeit entfernt werden, jedoch vorzugsweise im Monomerstadium, da sie nicht immer vollständig aus dem Endpolymer entfernt werden können.<sup>130</sup> Ein Beispiel für solche Monomere sind vinylfunktionalisierte Zucker, wie sie Pearson et al.<sup>131</sup> und Wulff et al.<sup>130</sup> vorgestellt haben.

Der eingesetzte Linker kann einen großen Einfluss auf die Eigenschaften des resultierenden Polymers haben. Seine Polarität und Länge kann leicht geändert werden und führt zu einem völlig anderen Polymer. Die Länge hat direkten Einfluss auf die Kinetik der Polymerisation, die Menge der Einarbeitung (sterischer Effekt) und die Flexibilität der resultierenden Seitenketten.<sup>132</sup> Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass Heteroatome in der Linker-Einheit den Lektin-Erkennungsprozess signifikant beeinflussen können.<sup>133</sup>

Die Bindungseinheit bestimmt die Stabilität des Polymers hinsichtlich des biologischen Abbaus durch Enzyme.<sup>134</sup> Amidbindungen können bei der Synthese des Monomers hilfreich sein, da sie stabiler gegen Hydrolyse sind als Ester, glykosidische Bindungen und Ether. Sollte das Polymer jedoch abbaubar sein, können sie unerwünschte Eigenschaften verursachen. Durch die Wahl der Bindungseinheit kann somit die biologische Abbaubarkeit oder die Freisetzung von Wirkstoffen, die am Polymer gebunden sind, beeinflusst werden.

Die polymerisierbare Einheit ist von enormer Bedeutung, da sie das Polymerisationsverfahren und die Polymerisationsbedingungen bestimmt. Es gibt viele Ansätze zur Synthese von Glykopolymeren mit konventioneller und kontrollierter Radikalpolymerisation, lebender Ionenpolymerisation, Polykondensation, Ringöffnungspolymerisation und Postpolymerisation.<sup>135-140</sup> In diesem Zusammenhang wurden eine Reihe von kontrolliert radikalischen Polymerisationen beschrieben, die als nitroxidvermittelte Polymerisation (NMP)<sup>141</sup>, Atomtransferradikalpolymerisation (ATRP)<sup>142</sup>, reversible Additionsfragmentierungskettentransfer-(RAFT)-Polymerisation<sup>143</sup> bekannt sind. Bei den genannten Polymerisationstechniken werden hocheffiziente Kettenradikalüberträger sogenannte *chain transfer agents* (CTAs) verwendet, die sich je nach Technik voneinander unterscheiden und charakteristisch für jede Methode sind. In diesem Kapitel wird jedoch der Fokus auf die RAFT Polymerisation gelegt, da sie Teil der in dieser Arbeit beschriebenen Methoden ist.

Im Vergleich zu der konventionellen freien radikalischen Polymerisation (FRP) ermöglicht die kontrolliert radikalische Polymerisation eine Kombination der Vorteile der lebenden Polymerisation sowie der FRP. Ähnlich wie die FRP ist die RAFT-Polymerisation stabil gegenüber vielen Lösemitteln und Verschmutzung und ermöglicht die Polymerisation einer Vielzahl von Monomeren. Analog zur lebenden Polymerisation ist die Synthese von Homopolymeren sowie Blockcopolymeren mittels RAFT-Technik mit geringer Dispersität möglich. Das eingesetzte CTA besteht meist aus einem Dithiocarbamat, Dithioester oder einem Trithiocarbonat mit einer radikalstabilisierenden Abgangsgruppe (R) (siehe Abbildung 11).

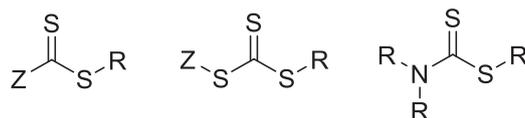
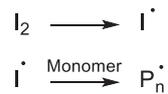


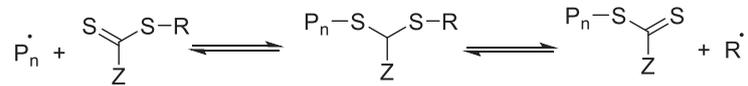
Abbildung 11: Struktur typischer CTAs in der RAFT-Polymerisation (Dithioester links, Trithiocarbonat mittig, Dithiocarbamat rechts).<sup>144,145</sup>

Analog zur FRP wird im ersten Schritt ein Initiator genutzt, welcher thermolytisch, photochemisch oder durch eine Redoxreaktion ein Radikal bildet, welches mit einem Monomer die Polymerisation startet. Die propagierende Kette ( $P_n$ ) reagiert im zweiten Schritt mit dem CTA und formt eine sogenannte „schlafende Spezies“ die durch die stabilisierende Wirkung auf das Radikal nicht weiter propagiert. Diese schlafende Spezies kann zurück reagieren und das aktive propagierende Polymer ( $P_n$ ) freigeben, welches mit weiteren Monomeren propagieren kann oder die Abgangsgruppe R freigeben, welche eine erneute Kette ( $P_m$ ) starten kann (siehe Schema 5). Dieses Gleichgewicht wird „Pre-Gleichgewicht“ genannt.

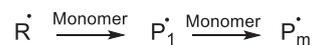
Schritt 1: Zerfall des Initiators und Bildung einer propagierenden Polymerkette



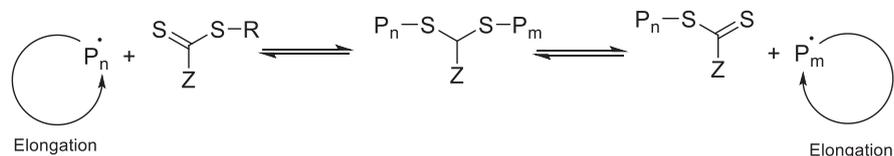
Schritt 2: Pre-Gleichgewicht



Schritt 3: Initiation einer zweiten aktiven Polymerkette



Schritt 4: Hauptkettengleichgewicht



Schema 5: Vorgeschlagener RAFT Mechanismus bis zur Einstellung des Gleichgewichts zwischen schlafender Spezies und aktiven propagierenden Polymerketten nach<sup>144</sup>.

Die neu entstandene Polymerkette ( $P_m$ ) konkurriert mit der bestehenden Polymerkette ( $P_n$ ) um das CTA, wodurch beide im Mittel eine gleichlange Propagationszeit haben. Diese Phase wird „Hauptkettengleichgewicht“ bezeichnet und ist durch ihre schnelle Übertragung zwischen aktiver und schlafender Kette der Grund für die enge Molmassenverteilung dieser Technik. Hierbei liegt stets das Gleichgewicht auf Seiten der schlafenden Spezies. Abbruchreaktionen verlaufen analog der freien radikalischen Polymerisation unter Disproportionierung und Rekombination. Die resultierende enge Molmassenverteilung, die Stabilität gegenüber funktionellen Gruppen, im Vergleich zur anionischen Polymerisation, sowie die milden Reaktionsbedingungen sind optimale Voraussetzungen für die Synthese polymerer Glykomimetika und wurde zahlreich für die Synthese komplexer Glykopolymer eingesetzt.<sup>126,146,147</sup>

### 1.3.2 Grafting Methoden zur Synthese von Kammpolymeren

Der Begriff Kammpolymer wird für verschiedene Arten von Polymeren verwendet und bezeichnet Polymere einer hohen Dichte an Seitenketten. In der Regel bilden gepfropfte Kammpolymere zylindrische oder stäbchenförmige Strukturen, da die sterische Abschirmung der Seitenketten das

Rückgrat versteift.<sup>31,148-151</sup> Eine große Anzahl von Kamm polymeren mit selbstorganisierenden Eigenschaften<sup>152</sup> und Kamm polymer-Medikamenten-Konjugaten<sup>153</sup> wurden synthetisiert und sind vielversprechende Substanzen für verschiedene Anwendungen wie *Drug-Delivery-Systeme*.<sup>154,155</sup> Für die Synthese von Kamm polymeren sind drei Hauptsynthesestrategien beschrieben, die sich in *grafting-to*, *grafting-from* und *grafting-through* unterteilen lassen.

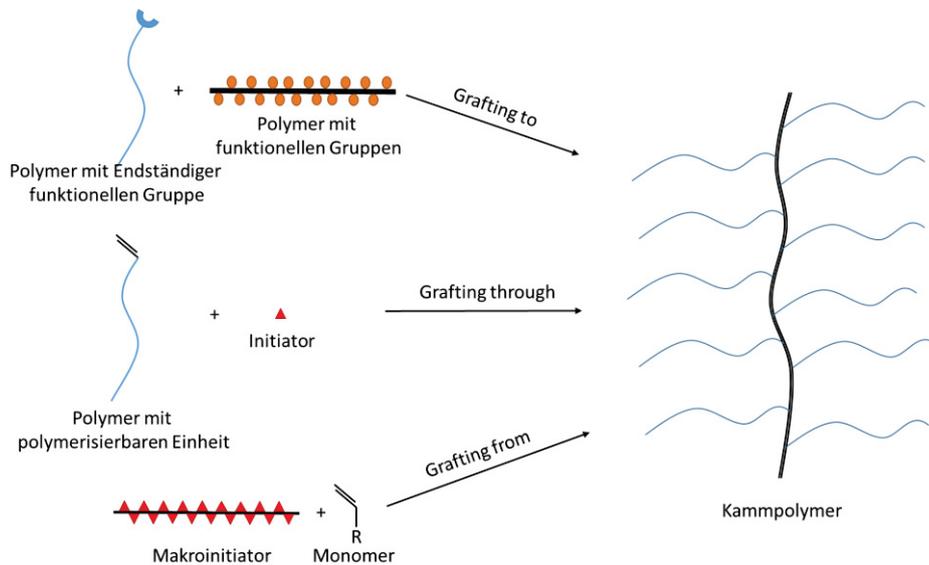


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Pflopf-Methoden in Anlehnung an <sup>156</sup>.

Durch die *grafting-to* Technik kann ein gut definiertes Kamm polymer erreicht werden, da die verschiedenen Teile des Polymers (Rückgrat und Seitenketten) unabhängig voneinander synthetisiert werden. Sie werden erst im letzten Schritt durch Kupplungsreaktionen zwischen den hängenden funktionellen Gruppen des Backbones und den Endgruppen der Seitenkette gebunden. Aufgrund der sterischen Hinderung kann jedoch nicht jede komplementäre funktionelle Gruppe erreicht werden, so dass nicht immer eine vollständige Umwandlung erreicht wird. Darüber hinaus muss das Polymergrundgerüst bei der Anbringung von Seitenketten von einem Knäuel in eine gestreckte Konformation übergehen, was die Reaktion entropisch ungünstig macht.<sup>157</sup> Daher ist die Pflopfdichte der Polymerbürsten oft begrenzt.

Kamm polymere, die durch *grafting-through* synthetisiert werden, sind hoch verzweigt, da jedes Monomer des Rückgrats eine Seitenkette enthält. Obwohl gut definierte Makromonomere mit kontrollierten Polymerisationsverfahren leicht synthetisiert werden können, ist das synthetisierte Kamm polymer oft in der Länge begrenzt und weist eine breite Molekulargewichtsverteilung auf. Um dies zu umgehen, kann das Makromonomer leicht mit einem anderen sterisch unanspruchsvollen Comonomer copolymerisiert werden, wodurch der Verzweigungsgrad und die Dispersität sinkt, während größere Kettenlängen erreicht werden können.

Das *Grafting-from* basiert auf einer Postpolymerisation eines bereits synthetisierten Polymers. Das synthetisierte Polymer wirkt wie ein Makroinitiator, da es aktive Gruppen enthält, die in der Lage sind, eine Polymerisation eines zweiten Monomers einzuleiten. Die Anzahl der Seitenketten kann durch die Anzahl der aktiven Standorte gesteuert werden. Meist ist eine Charakterisierung des gepfropften Copolymers und genaue Aussagen über die Seitenketten unmöglich, da sich die Seitenketten in der Länge unterscheiden.

## 2 Motivation und Aufgabenstellung

Unzählige Organismen produzieren extrazelluläre Polysaccharide mit diverser Architektur und hohem Molekulargewicht, welche an einer Reihe von biologischen Prozessen beteiligt sind. Solche natürlichen Polysaccharide können durch synthetische Glykopolymere nachempfunden werden.<sup>125</sup> Diese bieten somit Zugang zu neuen biologisch aktiven Materialien. Daher gewinnt das Forschungsgebiet der synthetischen Glykopolymere immer mehr an Bedeutung, um etwa neue verbesserte *Drug-Delivery*-Systeme und Oberflächenmodifikationen zu ermöglichen.<sup>158</sup> Ferner können Glykopolymere als Modellsubstanzen für biologische Prozesse genutzt werden, um diese Vorgänge genauer zu studieren.<sup>159</sup> Es ist jedoch eine große Herausforderung, Glykopolymere zu entwickeln und zu synthetisieren, deren Struktur die hohe Definition der natürlichen Liganden nachbildet. Solche Materialien würden es ermöglichen, vertiefte Einblicke in die Struktur-Eigenschaftsbeziehung von Glykopolymeren zu erhalten und neue bioaktive Polymere für Anwendungen in der Biomedizin und Biotechnologie zu entwickeln.

Inspiziert von Proteoglykanen wird daher in dieser Arbeit die Synthese von Glykokamppolymeren mit monodispersen, sequenzdefinierten Seitenketten vorgestellt. Hierzu sollen monodisperse und sequenzdefinierte zuckerfunktionalisierte Seitenketten separat vom Polymergerüst synthetisiert und im zweiten Schritt zum Glykokamppolymer kombiniert werden. Der Aufbau der definierten Seitenketten soll mittels schrittweise an einer festen Phase erfolgen, wie von der Arbeitsgruppe Hartmann bereits für die Synthese sogenannter Präzisionsmakromoleküle beschrieben.<sup>12</sup> Hierbei werden etablierte Amidkupplungsverfahren in Kombination mit maßgeschneiderten Bausteinen genutzt, um Glykooligo(amidoamin)-Ketten unterschiedlicher Zusammensetzung und Valenz zu erzeugen.

Um Kamppolymere mit sequenzkontrollierten und monodispersen Seitenketten zu synthetisieren, ist das *Grafting* von Präzisionsmakromolekülen der vielversprechendste Weg. Hierbei gibt es verschiedene Optionen: In einem ersten Ansatz sollen die Oligomere für den *Grafting-through* Ansatz mit polymerisierbaren Gruppen zu Telechelen endfunktionalisiert werden. Durch Polymerisation des Makromonomers wird die Sequenzkontrolle direkt in das resultierende Polymer übertragen. Hierbei muss die Polymerisationsmethode unanfällig gegenüber funktionelle Gruppen des Liganden sein. Eine geeignete Polymerisationsmethode ist die Freie Radikalische Polymerisation (FRP).<sup>160</sup>

Ein zweiter Ansatz beinhaltet, in Anlehnung an die *Grafting-to* Methode, die Synthese eines Polyaktivesters, welcher dann mit dem synthetisierten Glykooligomer kombiniert werden kann. Hierfür sollen Polyaktivester verschiedener Kettenlänge synthetisiert werden, um Kamppolymere mit verschiedener Konturlänge zu erhalten. Eine Grundvoraussetzung des Polyaktivesters ist die Resistenz

gegenüber konkurrierenden funktionellen Gruppen, wie beispielsweise die Hydroxygruppen des Kohlenhydratligands, in Kombination mit einer schnellen Umsetzung mit dem Glykomakromonomer. Aus diesem Grund wird Poly(pentafluorophenol) gewählt, da es bei einer Reaktionsführung unter 60°C bevorzugt mit Aminen und nicht mit Hydroxygruppen reagiert.<sup>161</sup>

Nach erfolgreicher Etablierung der Synthese von Glykokammpolymeren in Kombination der Festphasensynthese und klassischer Grafting-Methoden, soll eine erste Reihe von Kammpolymeren mit gezielten Variationen der Seitenketten hergestellt und untersucht werden. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf dem Einfluss der Valenz der Seitenketten, also der Anzahl der Zuckerliganden pro Seitenkette, der Dichte der Seitenkette sowie der Einbringung von sogenannten ‚shielding‘ Blöcken, hydrophilen, nicht zucker-funktionalisierten Blöcken. Ziel ist es zu untersuchen, wie diese Strukturvariationen die Bindungseigenschaften der Glykopolymeren etwa in Bezug auf die Bindungsstärke variieren.

Dazu werden die synthetisierten Glykokammpolymeren auf ihr Lektin-Bindungsverhalten untersucht. Die wichtigste Methode in dieser Arbeit ist ein SPR-Assay mit immobilisiertem ConA als Modelllektin. Zusätzlich kann im Arbeitskreis von Remzi Becer in einem SPR-Assay die Bindung an MBL und DC-SIGN analysiert werden. Diese Messungen liefern somit Informationen sowohl über die Beeinflussung der Avidität als auch der Selektivität bei Bindung an unterschiedlichen Lektinen. Abschließend werden ausgewählte Glykopolymeren als Inhibitoren der bakteriellen Adhäsion und somit für den potenziellen Einsatz als antibakterielle Wirkstoffe getestet.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Synthese eines biomimetischen Analogons zu den Proteoglykanen auf Basis von Glykokamppolymeren. Genauer sollten die Seitenketten auf Präzisionsglykooligomeren basieren, die eine kontrollierte Variation der Anzahl und Dichte der Zuckerliganden in den Seitenketten ermöglichen. Um dies zu erreichen, wurde die Synthese in drei Schritten durchgeführt (siehe Abbildung 13).

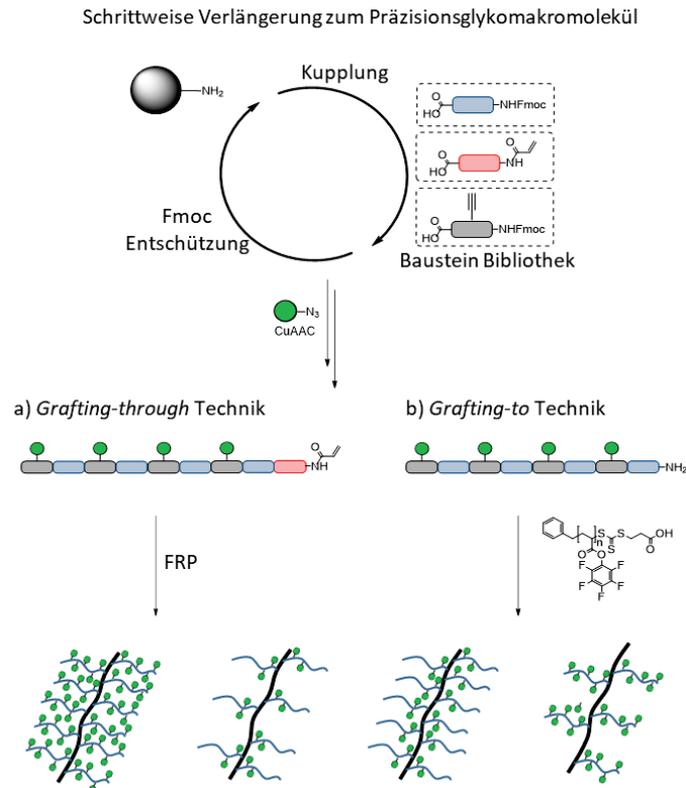


Abbildung 13: Schematische Darstellung der synthetischen Strategie zum Erhalt von Glykokamppolymeren mit sequenzdefinierten Seitenketten.

Zunächst wurden nach etablierten Protokollen die maßgeschneiderten Bausteine TDS und EDS synthetisiert, auf der Festphase in alternierender Weise verknüpft und anschließend mit Mannoseliganden funktionalisiert, um so monodisperse, sequenzdefinierte Glykooligomere zu erzeugen. Im zweiten Schritt wurde dann a) eine polymerisierbare Einheit am N-terminalen Ende eingeführt bzw. b) der N-Terminus als freie Aminogruppe isoliert. Im dritten Schritt wurden die so erhaltenen Oligomere dann für die Erzeugung von Kamppolymeren mittels a) *grafting-through* bzw. b) *grafting-to* Methoden eingesetzt.

### 3.1 Recycling von Bausteinen und funktionalisierten Zuckern in der Festphasensynthese

Die im Rahmen dieser Arbeit gewählte Syntheseroute zur Herstellung von Kammpolymeren mit definierten Seitenketten beruht maßgeblich auf dem Einsatz der Festphasensynthese. Wie in Kapitel 1.2 beschrieben ist die Festphasensynthese eine wichtige Methode zur Synthese von sequenzdefinierten und monodispersen Makromolekülen durch Kupplung geeigneter Aminosäuren oder Bausteine. Allerdings hat der Einsatz der Festphasensynthese auch Nachteile. Um einen vollständigen Umsatz und somit letztendlich Monodispersität zu gewährleisten, werden die Bausteine und Liganden in den Kupplungs- bzw. Konjugationsschritten im Überschuss eingesetzt. Die nicht verbrauchten, überschüssigen Bausteine werden jedoch nicht zurückgewonnen, sondern landen im Lösungsmittelabfall. Somit verursacht die Notwendigkeit des Materialüberschusses eine erhebliche Menge an „verschwendetem“ Ausgangsmaterial, welches in nicht seltenen Fällen aufwendig und kostenintensiv hergestellt wurde. So wird beispielsweise der in dieser Arbeit verwendete Baustein TDS in einer Sechsstufen-Synthese mit einer Gesamtausbeute von 23% synthetisiert.<sup>12</sup> Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit zwei Methoden entwickelt, die eingesetzten Bausteine sowie Zuckerderivate zurückzugewinnen. Die für diese Studie ausgewählten Verbindungen enthalten repräsentative funktionelle Gruppen, die häufig bei der Festphasensynthese von Präzisionsglykomakromolekülen und anderen Glykokonjugaten verwendet werden. Für die hier vorgestellten Studien der allgemeinen Anwendbarkeit der Methode wurden insgesamt drei verschiedene Bausteine der Oligomer-Synthese, zwei kommerzielle Aminosäuren und drei verschiedene Glykosylazide eingesetzt.

Für die Synthese der Glykooligomere wurden die Bausteine TDS (1) und EDS (2) nach einem bereits etablierten Protokoll mit einer Ausbeute von 23% synthetisiert.<sup>12</sup> Mit einer Ethylenglykol-Einheit in der Mitte dient EDS als hydrophiler *Spacer*, während TDS mit Hilfe eines Linkers der eine Dreifachbindung trägt Zuckerkonjugation durch CuAAC ermöglicht. Da in der Festphasensynthese verschiedene Liganden orthogonal konjugiert werden können, wurde der Azid-tragende Baustein ADS als weiterer Modelbaustein für die Rückgewinnung verwendet. Zur besseren Übersicht sind die Bausteine in den Graphiken als farbige Kästen dargestellt (siehe z.B. Abbildung 8). Die Reinheit (über 95%) der Ausgangsbausteine wurden mit LC-MS und <sup>1</sup>H-NMR bestätigt.

Als beispielhafte Struktur für die Zucker-Liganden wurde (2-Azidoethyl)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid gewählt, da es häufig in der Synthese von Glykomimetika zum Einsatz kommt. Als zwei weitere Strukturen kamen X und Y zum Einsatz.

Eine dritte wichtige Klasse der Bausteine für die Festphasensynthese sind modifizierte Aminosäuren. Um die Zurückgewinnung an Aminosäuren zu veranschaulichen, wurden Fmoc geschütztes Phenylalanin und Leucin verwendet.

Die für die Rückgewinnungsmethoden verwendeten Strukturen sind zusammenfassend in Abbildung 14 dargestellt.

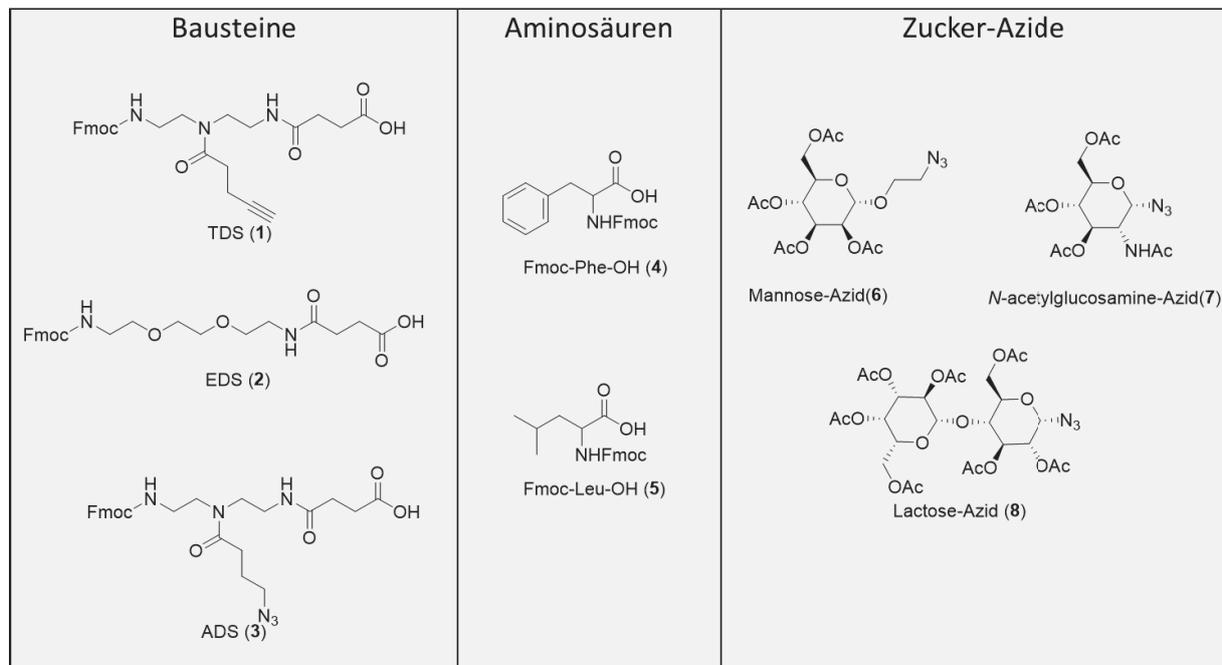


Abbildung 14: Bausteine verwendet für die Zurückgewinnung im Überschuss eingesetzter Bausteine in der Festphasensynthese.

### 3.1.1 Zurückgewinnung von Fmoc geschützten Bausteinen und Aminosäuren

Zu den wichtigsten Aspekten der entwickelten Methode der Baustein -Rückgewinnung gehören: (i) Standardanwendung für den Großteil der verwendeten Bausteine, Zuckerliganden und Aminosäuren (ii) schnelle Wiederherstellung in einem angemessenen Zeitrahmen, (iii) hohe Ausbeuten sowie Reinheit nach der Zurückgewinnung und (iv) Lagerstabilität der zurückzugewonnenen Substanzen, um eine geeignete Menge für die Zurückgewinnung, während der Festphasensynthese, zu sammeln.

Es wurden Glykooligomere nach Standardprotokollen hergestellt, d.h. unter Verwendung eines TentaGel S RAM®-Harzes mit einer Beladung von 0.250 mmol/g wurde jeweils 5 eq. des Bausteins mit 10 eq. DIPEA und 10 eq. PyBOP aktiviert, auf das Harz gegeben und 1 h geschüttelt. Nach der Kupplung des gewünschten Bausteins oder der Aminosäure wurde die Kupplungslösung dann direkt aus der Spritze in eine 10%ige wässrige Zitronensäurelösung eingeleitet, wobei sich jeweils ein fester

Niederschlag des Bausteins bildete. Jeder Baustein bzw. jede Aminosäure wurde in einem eigenen Behälter mit frischer Fällungslösung gesammelt. Nach Abschluss der gewünschten Oligomersequenz wurde der Niederschlag gefiltert, in Ethylacetat (100 mg/100 ml) gelöst und gegen destilliertes Wasser (2x100 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Rekrystallisation aus Ethylacetat:n-Hexan (2 ml/1 mg) wurde ein farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 76%-80% gewonnenen.

Ferner wurde diese Rückgewinnungsmethode an einen vollautomatisierten Peptid-Synthesizer getestet. Der Synthesizer wurde so programmiert, dass er die Kupplungslösung aus dem Reaktionsgefäß in ein Becherglas mit 400 ml 10%iger Zitronensäurelösung ausstößt. Für das automatisierte Verfahren konnte nur ein Baustein pro Sequenz gewonnen werden, da der Synthesizer nur ein Auffanggefäß aufweist, das getrennt von Piperidin für die Bausteinfällung verwendet werden kann. In Abbildung 15 ist das manuelle und automatische Rückgewinnungsverfahren schematisch dargestellt.

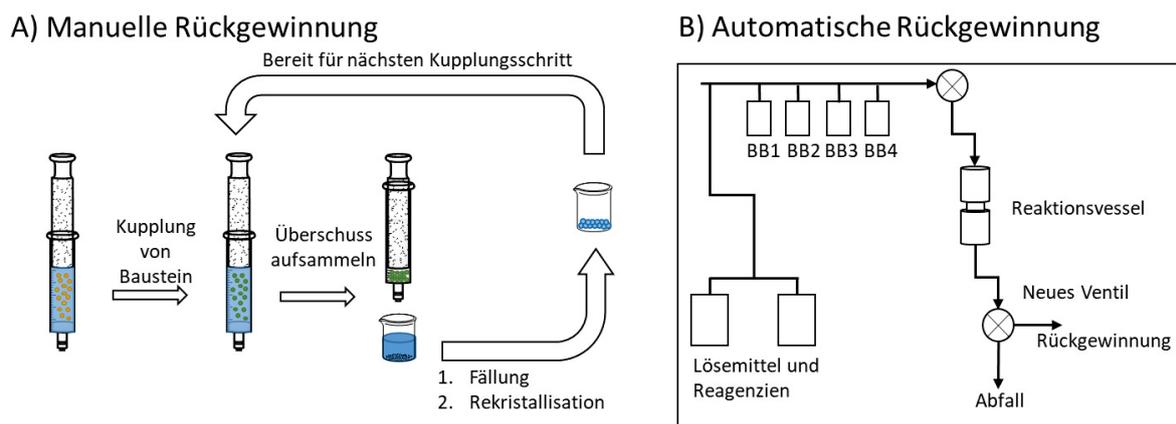


Abbildung 15: Schematische Darstellung der manuellen und automatischen Rückgewinnung.

Abbildung 16 zeigt exemplarisch den Verlauf der RP-HPLC von TDS als Ausgangsmaterial und dem automatisch und manuell zurückgewonnenen TDS mit einer relativen Reinheit von über 95%.

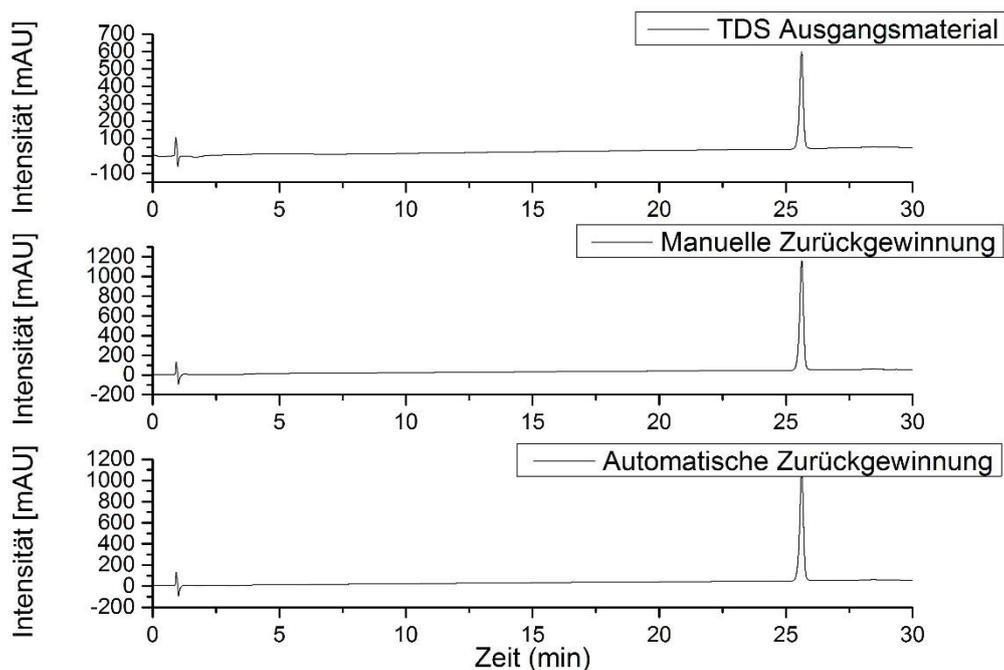


Abbildung 16: RP-HPLC von dem TDS Ausgangsmaterial, dem manuell zurückgewonnenen TDS und automatisch zurückgewonnenen TDS.

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der Zurückgewinnung für alle verwendeten Strukturen. Hierbei wurden EDS und TDS erfolgreich manuell sowie automatisiert zurückgewonnen.

Alle Bausteine weisen nach Rückgewinnung eine relative Reinheit von über 95% (RP-HPLC) auf (siehe Anhang). Generell kann gesagt werden, dass die Ausbeute bei der automatisierten durchschnittlich kleiner ist als bei der manuellen Zurückgewinnung. Dies kann durch die größere verwendete Lösemittelmenge für die Kupplung erklärt werden, da dies ein Ausfällen in Zitronensäure negativ beeinflusst.

Tabelle 1: Ergebnisse der Baustein und Aminosäuren Zurückgewinnung.

Baustein/Aminosäure	manuell/automatisiert	Relative Reinheit <sup>a</sup> [%]	Ausbeute <sup>b</sup> [%]
TDS	M/A	>95%	85% / 72%
EDS	M/A	>95%	76% / 65%
4-ADS	M	>95%	85%
Fmoc-Phe-OH	M	>95%	82%
Fmoc-Leu-OH	M	>95%	80%

<sup>a</sup> bestimmt mittels RP-HPLC (linearer Gradient von 0 – 50% Eluent B bei 25°C in 30 min)

<sup>b</sup> bestimmt nach Rekristallisation

Angesichts der oft erforderlichen Zeitskalen für einige Schritte in der Festphasensynthese wurde die Langzeitstabilität von den Bausteinen in der 10%tiger Zitronensäurelösung bestimmt. Hierzu wurde

ein Stabilitätstest durchgeführt, bei dem TDS sechs Wochen in wässriger Zitronensäurelösung gelagert wurde. Nach sechs Wochen wurde der Baustein wie oben beschrieben gereinigt. Die RP-HPLC-Analyse ergab, dass ein Dimer-Nebenprodukt, in kleinen Mengen von weniger als 1.3%, beobachtet wurde (siehe Anhang). Die Reinheit ist somit noch ausreichend, um weitere Kupplungsreaktionen an der Festphase durchzuführen, allerdings kann davon ausgegangen werden, dass bei längerer Verweilzeit der Anteil an Nebenprodukten zunimmt.

### 3.1.2 Zurückgewinnung von Azid tragenden Zucker

Aufgrund der leichten Zugänglichkeit von ConA als Modelllektin ist Mannose-Azid ein vielfach verwendeter Zucker zur Synthese von Glykomimetika und wurde aus diesem Grund für die Rückgewinnung verwendet. Als Vertreter für N-acetylierte Zucker wurde ein N-Acetylglucosamine-azid-Derivat gewählt, während Lactose repräsentativ für ein Disaccharid ist. Unter Verwendung eines TentaGel S RAM®-Harzes mit einer Beladung von 0.250 mmol/g wurde jeweils 5 eq. des Zuckers mit 10 mg Natriumascorbat und 10 mg Kupfersulfat aktiviert, auf das Harz gegeben und 18 h geschüttelt. Anschließend wurde die Reaktionslösung, bestehend aus Glykosylazid, Natriumascorbat, Kupfersulfat, Wasser und DMF direkt nach der Konjugation an der Festphase aus der Spritze gesammelt und unter reduziertem Druck konzentriert. Die resultierende Mischung wurde in Ethylacetat (50 mL/100 mg gewonnenes Glykosid je nach Löslichkeit) gelöst und, um Kupfer- und Ascorbinsäure-Salze zu entfernen, mit Wasser (3 x 50 mL) gewaschen. Die Ethylacetatphase, die das zurückgewonnene Glykosid enthält, wurde mit Natriumsulfat getrocknet, gefiltert, unter reduziertem Druck konzentriert. Der erhaltene Zucker kann für weitere kupferkatalysierte CuAAC-Reaktionen ohne weitere Reinigung verwendet werden. Die Reinheit wurde durch <sup>1</sup>H-NMR bestätigt. Die zurückgewonnenen Substanzen sind mit ihrer Reinheit in Tabelle 2 angegeben.

*Tabelle 2: Ergebnisse der Zucker Zurückgewinnung.*

<b>Zucker</b>	<b>Reinheit [%]<sup>a</sup></b>	<b>zurückgewonnenes Material [%]<sup>b</sup></b>
<b>6</b>	>95%	>80%
<b>7</b>	>95%	>80%
<b>8</b>	>95%	>80%

<sup>a</sup> bestimmt mittels <sup>1</sup>H-NMR

<sup>b</sup> bestimmt nach Lösemittel Entfernung

Um zu zeigen, dass das gewonnene Material für SPS wiederverwendet werden kann, wurde ein Oligomer aus den zurückgewonnenen Bausteinen synthetisiert. Die installierte Sequenz bestand aus

zurückgewonnenem TDS, Fmoc-Phe-OH, EDS, Fmoc-Leu-OH und ADS, auf das die zurückgewonnene Mannose mit Hilfe der CuAAC geklickt wurde. Das resultierende Oligomer (TPELA) wurde in hoher relativer Reinheit (> 95%) nach Abspaltung vom Harz isoliert (siehe Abbildung 17).

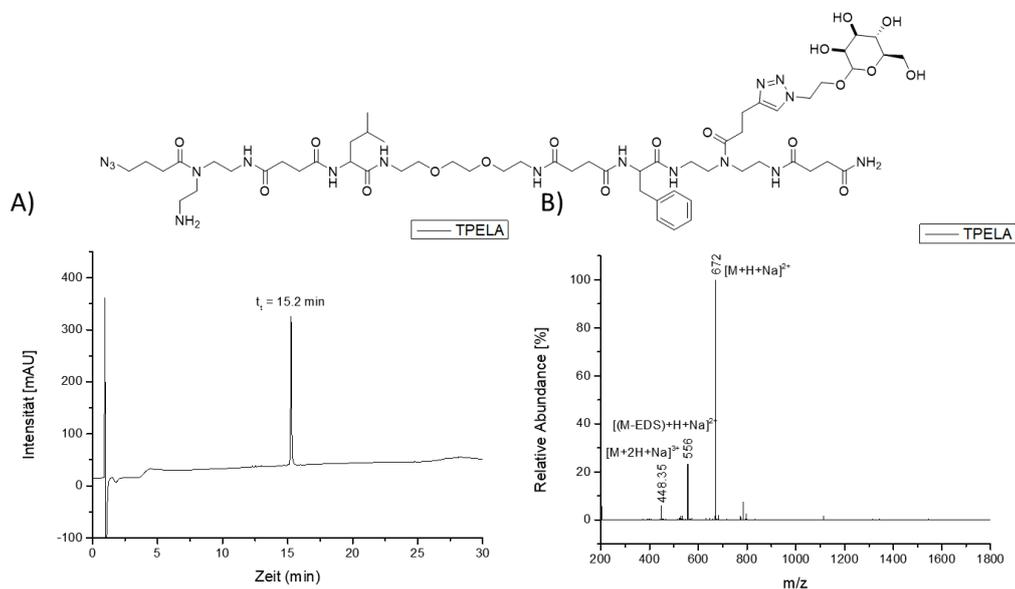


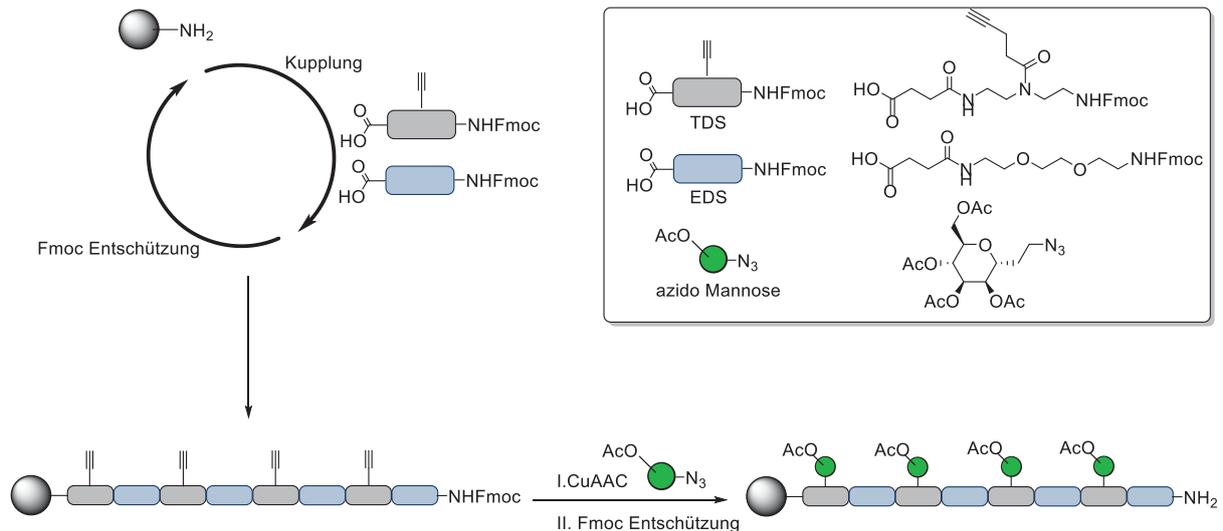
Abbildung 17: RP-HPLC (linearer Gradient von 0 – 50% Eluent B bei 25°C in 30 min) (A) und ESI-Massenspektrum (B) von TPELA synthetisiert aus zurückgewonnenem Material.

### 3.2 Synthese von Kammpolymeren mittels *grafting-through* Technik

Ziel dieser Arbeit ist der Aufbau von Glykokammpolymeren mit sequenzdefinierten multivalenten Seitenketten mittels SPS. Im ersten Schritt wurde daher mit Hilfe der SPS verschiedene divalente und tetravalente Oligomere synthetisiert. Hierbei wurde das Grundgerüst des Oligomers in alternierender Weise beginnend mit TDS aufgebaut. Als Festphase wurde das handelsübliche TentaGel S RAM®-Harz verwendet, da es nach der Spaltung eine unreaktive Amidbindung bildet. Nach dem Standard-Kupplungsprotokoll diente DIPEA als Base zur Deprotonierung der Carbonsäure und Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP) als Kupplungsreagenz.<sup>101,103,109-111,162-165</sup> Nach der Synthese des Oligomers mit der erwünschten Sequenz wurde Mannose-Azid mittels CuAAC an das Oligomer konjugiert, sodass das resultierende Glykooligomer von der Festphase abgespalten werden kann. Die Herausforderung lag dabei in der Synthese von einem stabilen Glykomakromonomeren mit geeigneter polymerisierbarer Einheit.

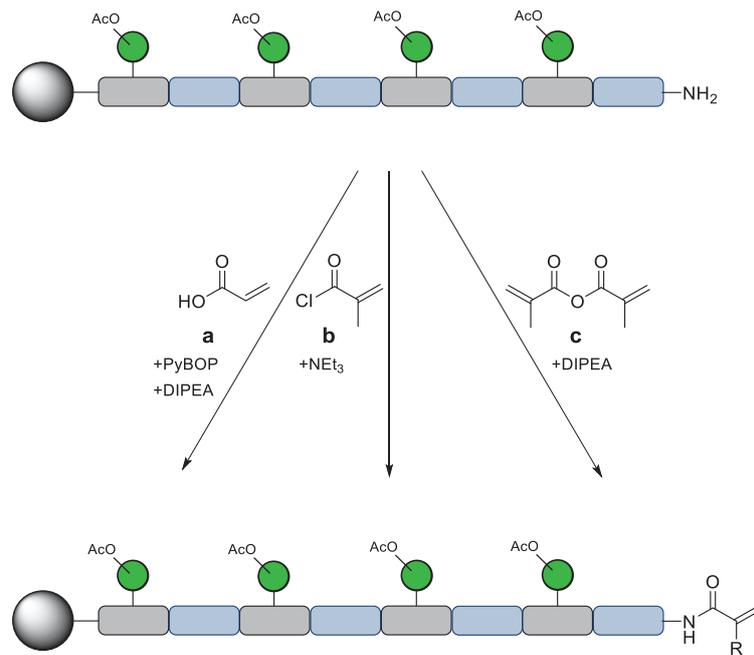
### 3.2.1 Synthese von Glykomakromonomeren mit polymerisierbaren Gruppen

Als Grundstrukturen für die multivalenten Seitenketten dienen zwei verschiedene Glykooligomere, eine divalente Struktur aus vier Bausteinen (O1) und eine tetravalente Struktur aus acht Bausteinen mit jeweils alternierenden TDS und EDS Bausteinen (O2). Als N-terminaler Baustein wurde jeweils, zur Verbesserung der Funktionalisierung, EDS gewählt. Die Synthese ist schematisch in Schema 6 dargestellt.



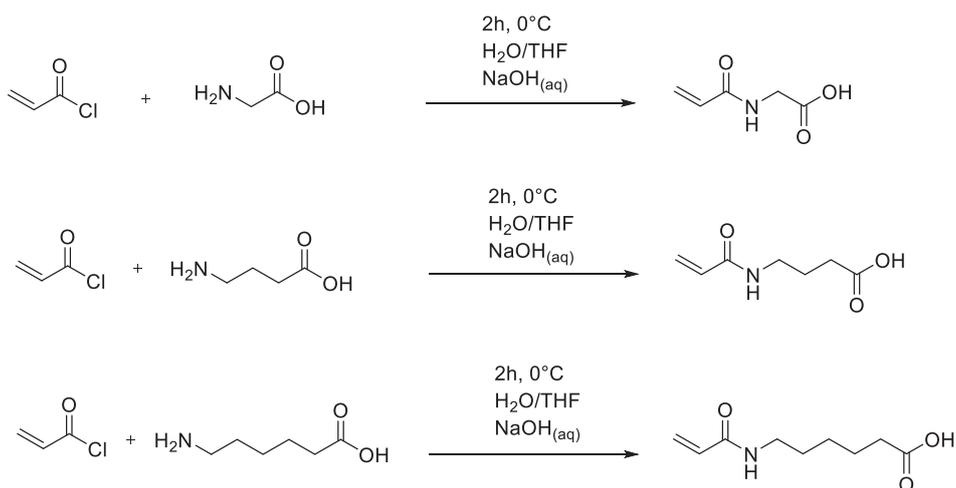
Schema 6: Schematische Darstellung der Synthese von einem tetravalenten Oktamer synthetisiert aus TDS und EDS durch alternierender Elongation mittels Festphasensynthese.

Aus der alternierenden Verknüpfung der gewählten Bausteine entsteht ein Oligomer, welches in definierten abständen Alkinfunktionalitäten trägt, die in einem weiteren Schritt mittels CuAAC mit Mannose-Azid umgesetzt wurden. Hier durch resultiert ein Oktamer, welches in definierten Abständen Mannose präsentiert. Das endständige Amin kann nun genutzt werden, um eine polymerisierbare Einheit hinzuzufügen. Hierbei ist die Herausforderung die Synthese von einem stabilen Glykomakromonomer mit geeigneter polymerisierbaren Einheit. Im Rahmen der Masterarbeit durchgeführte Versuche zur Funktionalisierung ergaben, dass die Endfunktionalisierung mittels Acryloylchlorid sowie mit Acrylsäure, PyBOP und DIPEA durch Dimerbildung keine ausreichend hohe Reinheiten liefern (siehe Schema 7).<sup>166</sup> Ebenfalls die methylierten Derivate, die für ihre geringe Polymerisationsreaktivität bekannt sind, lieferten keine zufriedenstellenden Ergebnisse.<sup>87,167</sup>



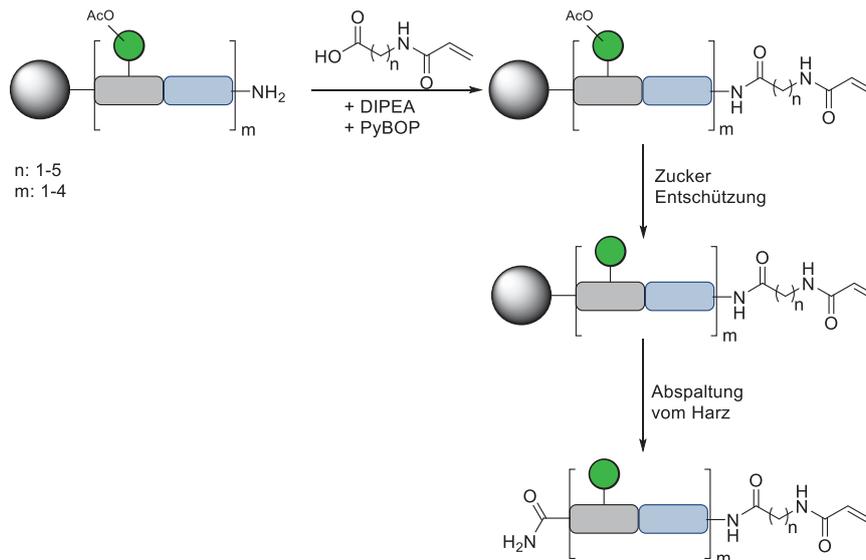
Schema 7: Verschiedene Reaktionsrouten für die Synthese eines acrylierten Glykooligomer.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde hier nun ein dritter Ansatz unter Einsatz von Methacrylsäureanhydrid und DIPEA evaluiert. Letzteres wurde zur Vermeidung von geringen pH-Werten im 5-fachen Überschuss hinzugegeben und folglich der Protonierung der Amine durch die entstehende Abgangsgruppe entgegenzuwirken. Diese Methode galt als vielversprechend, da das sogenannte Capping am N-Terminus in der Regel mit Essigsäureanhydrid erfolgt und auch ohne DIPEA quantitativ erfolgt. Auch wenn diese Methode zu Glykomakromonomeren in hoher Ausbeute und Reinheit führte, erwies sich die Endfunktionalisierung mit Methacrylsäureanhydrid als Temperatur labil. Somit darf die Reaktionstemperatur im Laufe der Reaktion 20°C nicht überschreiten, um Reinheiten über 95% zu erzielen. Dies ist praktisch schwer umzusetzen, da die Festphasen-Spritze in ein Eisbad gelegt werden muss, welche dort nach einer Stunde Reaktionszeit schnell mit kaltem DMF gewaschen werden muss. Diese Umstände sowie geringe Ausbeuten in der Polymerisation (siehe Kapitel 3.2.2), führten zur Synthese acrylierter Bausteine und deren Kupplung an der Festphase. Diese Bausteine basierten auf aliphatischen Carbonsäuren wie 2-Aminoessigsäure, 4-Aminobuttersäure und 6-Aminohexansäure (siehe Schema 8).



Schema 8: Synthese verschiedener acrylierter Bausteine.

Die Bausteine wurden nach bekannter Literatursynthese hergestellt, jedoch wurde das Säurechlorid zusätzlich vor dem Zutropfen in gleicher Menge in THF gelöst.<sup>168</sup> Durch die Deprotonierung der Carbonsäuregruppe anhand des Natriumhydroxids befindet sich die Aminosäure in der wässrigen Phase. Das hinzugetropfte Säurechlorid reagiert in einer Suspension mit dem freien Amin der Carbonsäure. Durch das im Laufe der Reaktion entstehende HCl-Gas wird fortlaufend NaOH verbraucht, welches tropfenweise nachträglich hinzugegeben wird. Der pH-Wert darf hierbei den Wert 10 nicht überschreiten, da sonst das eingesetzte Säurechlorid zu Acrylsäure hydrolysiert. Alle acrylierten Aminosäuren wurden mit einer relativen Reinheit von über 95% gemäß Analyse mittels RP-HPLC erhalten (siehe Anhang). Die synthetisierten Bausteine wurden jeweils in 5 eq. Überschuss mit 5 eq. PyBOP und 10 eq. DIPEA an die Festphase gekuppelt. Das resultierende Glykooligomer wurde mittels Natriummethanolat-Lösung in Methanol entschützt und anschließend von der Festphase abgespalten. Die einzelnen Schritte sind in Schema 9 dargestellt.



Schema 9: Schematische Darstellung der Makromonomersynthese ausgehend von einem aminterminierten Glykooligomer an der Festphase.

Das resultierende Makromonomer wurde mit einer Reinheit von über 95% (RP-HPLC) und einer Ausbeute von 88% erhalten. Im Folgenden wird exemplarisch das  $^1\text{H-NMR}$  (Abbildung 18) und der HPLC-Lauf (Abbildung 19) einer monovalenten Modellspezies, welches den acrylierten 6-Aminohexansäure Baustein trägt, gezeigt.

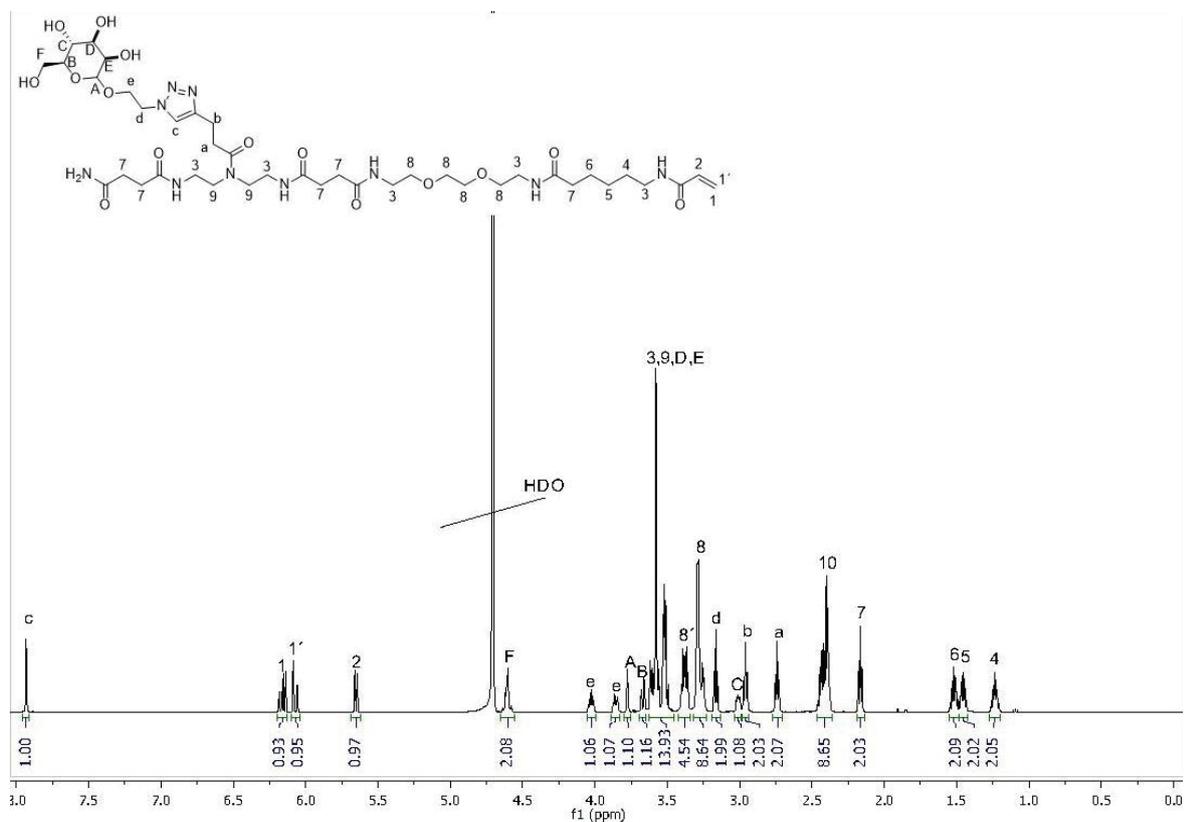


Abbildung 18:  $^1\text{H-NMR}$  von einem monovalenten Glykomakromonomer.

Das  $^1\text{H-NMR}$  des Glykomakromonomers zeigt deutlich die Triazol-Gruppe des Zuckers bei 8.01 ppm (Signal **c**). Darüber hinaus zeigen die Signale der Vinylprotonen, der  $\text{CH}_2$  Gruppe bei 6.24 und 6.17 ppm (Signal **1** und **1'**) und der CH-Gruppe bei 5.74 ppm (Signal **2**) mit einer integralen Intensität von jeweils 1, deutlich die Konjugation der polymerisierbaren Gruppe. Die  $\text{CH}_2$ -Gruppen der Succinylgruppen erscheinen bei 2.50 ppm (Signal **10**). Die Signale des Ethyllinkers erscheinen bei 4.10 ppm (**e**), 3.94 ppm (**e**) und bei 4,67 ppm (**d**). Die Mannoseprotonen A-F und die Peaks aus dem Rückgrat **F** und **A-E** erscheinen bei 4.68 ppm und 3.85 – 3.10 ppm mit jeweils einer Intensität von eins. Außerdem sind die ersten Signale bei 1.32, 1.54, 1.60 und 2.25 mit jeweils einer Intensität von 2 den  $\text{CH}_2$ -Gruppen der Hexansäure **4-7** zuzuordnen. Die restlichen Signale sind auf das Gerüst des Oligomers zurückzuführen, welches aus TDS und EDS besteht.

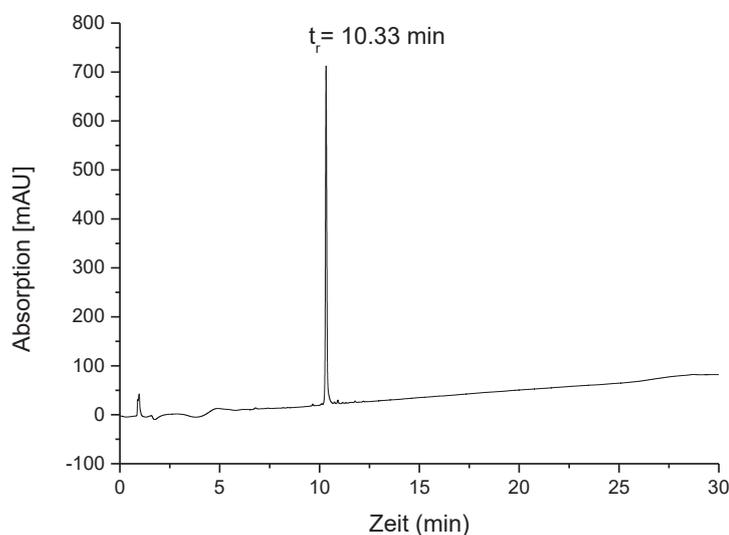


Abbildung 19: RP-HPLC Spektrum (linearer Gradient von 0 – 50% Eluent B bei 25°C in 30 min) eines monovalenten Glykomakromonomer mit einer Retentionszeit von  $t_r = 10.33$  min und einer Reinheit von über 95%.

### 3.2.2 Freie radikalische Polymerisation von Glykomakromonomeren

Im Rahmen dieser Arbeit ist der Fokus auf der Synthese von Glykokammpolymere. Die *grafting-through* Methode basiert auf die Polymerisation eines Makromonomers. Der Vorteil dieser Syntheseroute ist, dass durch jeden Einbau des Makromonomers eine Seitenkette eingebaut wird, sodass im Falle eines Homopolymers jede Wiederholungseinheit (DP) eine Seitenkette trägt. Meist sind jedoch die resultierenden Kammpolymere in ihrer Länge limitiert, da die Makromonomere sterisch anspruchsvoll sind und im Laufe des Kettenwachstums Abbruchreaktionen zunehmen.<sup>169,170</sup> Aus diesem Grund wurde neben der Homopolymerisation des Glykomakromonomers auch eine Copolymerisation mit einem geeigneten Acrylamid durchgeführt (Abbildung 20).

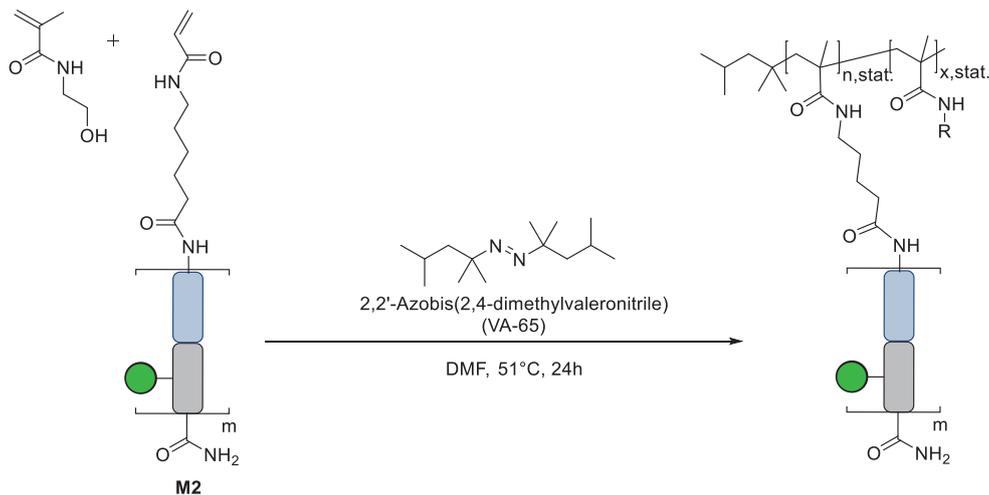
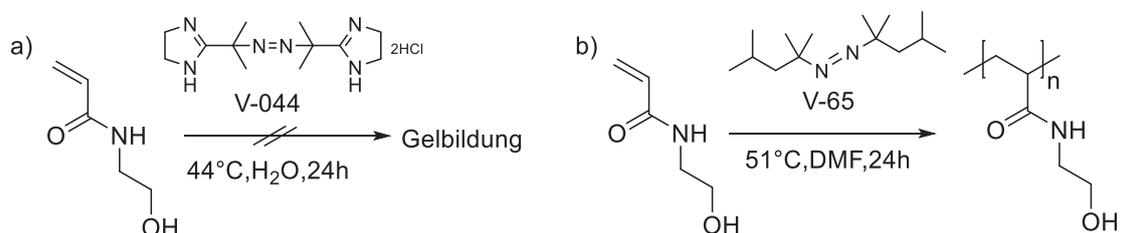


Abbildung 20: Radikalische Copolymerisation eines Glykomakromonomers mit *N*-2-hydroxyethylacrylamid in DMF.

Hierbei ist die Wahl eines geeigneten Acrylamids als Comonomer entscheidend, da dies sich auf die Reaktionskinetik, den Einbau des Makromonomers und die resultierenden Eigenschaften des Kammpolymers auswirkt. Als geeignetes Acrylamid wurde *N*-2-hydroxyethylacrylamid (HEAm) gewählt, da das resultierende Polymer bekannt dafür ist, geringe unspezifische Wechselwirkungen mit Proteinen zu haben.<sup>171</sup> Dies ist von enormer Bedeutung, um in späteren Bio-Assays das resultierende Bindungsverhalten auf die Seitenketten des Polymers die aus dem Makromonomer resultieren zurückzuführen.

Um die optimalen Reaktionsbedingungen zu finden, wurden Tests mit HEAm durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene Reaktionsbedingungen in a) Wasser und in b) DMF getestet (siehe Schema 10). Da die Polymerisation bei allen Reaktionsführungen in Wasser zur Gelbildung führte, werden diese Ansätze im Folgenden vernachlässigt. Die Gelbildung kann auf starke Wasserstoffbrückenbindungen, die sich durch die Amid- und die Hydroxy-Gruppen der Polymerkette im wässrigen Medium ausbilden, zurückgeführt werden.<sup>172,173</sup>



Schema 10: Polymerisation von HEAm in Wasser und DMF.

Für die Polymerisation in DMF wurde 2,2'-Azobis(2,4-dimethylvaleronitril) (V-65®) als Initiator verwendet, da dieser bei 51°C Zersetzungstemperatur eine Halbwertszeit von 10 Stunden hat. Dies ist vorteilhaft, da bei diesen Temperaturen sichergestellt werden kann, dass die Seitenkette des Makromonomers keinen Schaden nehmen kann.

Tabelle 3: Resultate der Homopolymerisation von HEAm in DMF ermittelt durch Wasser-GPC.

Polymerisation	$M_w/M_n$	$M_n$ (g/mol)
<b>In<sub>5mol%</sub> 20gew%</b>	2.945	33.030
<b>In<sub>5mol%</sub> 15gew%</b>	2.446	21.940
<b>In<sub>5mol%</sub> 10gew%</b>	2.085	16.550
<b>In<sub>2mol%</sub> 20gew%</b>	2.654	30.670
<b>In<sub>2mol%</sub> 15gew%</b>	2.762	26.910
<b>In<sub>2mol%</sub> 10gew%</b>	1.916	22.180

Zunächst wurden für zwei Initiator Mengen (5 mol% und 2mol%) und konstanter Monomermenge, die Gesamtkonzentration durch die Menge an DMF kontrolliert. Hierbei wurden Monomer Konzentrationen von 20, 15 und 10 gew% gewählt. Tabelle 3 zeigt, dass wie erwartet mit höherer Konzentration des Monomers ein längeres Polymer resultiert. Gleichzeitig steigt jedoch auch die Dispersität der erhaltenen Ketten. Dies kann durch eine größere Zahl an Übertragungs- und Abbruchsreaktionen bei höherer Monomerkonzentration erklärt werden.<sup>174</sup> Da die Ansätze mit 10 gew% Monomerkonzentration Polymere mit der geringsten Dispersität ergaben, wurden weitere Studien bei 10 gew% aber variierender Initiatormenge durchgeführt (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Resultate der Homopolymerisation von 10 gew% HEAm in DMF bei verschiedener Initiator Konzentration ermittelt durch Wasser-GPC.

Polymerisation	$M_w/M_n$	$M_n$ (g/mol)
<b>In<sub>2mol%</sub> 10gew%</b>	2.1	20.980
<b>In<sub>1mol%</sub> 10gew%</b>	1.9	26.570
<b>In<sub>0.5mol%</sub> 10gew%</b>	1.9	32.060

Die Polymerisationsansätze mit 10 gew% Monomeranteil wurden mit 2, 1 und 0.5 mol% Initiatormenge durchgeführt. Das Ziel war es, größere Molekulargewichte bei gleichbleibender Dispersität zu erlangen. Tabelle 4 zeigt erwartungsgemäß, dass bei geringerer Initiatormenge das Molekulargewicht des resultierenden Polymers steigt. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Gesamtkonzentration an freien Radikalen bei geringerer Initiatormenge sinkt, wodurch weniger Abbruchreaktionen stattfinden.<sup>175</sup> Da ebenfalls der Ansatz mit der geringsten Initiatormenge (0.5 mol%) auch das Polymer mit dem größten Molekulargewicht ergab, wurden diese Bedingungen für die *grafting-through* Methode gewählt.

Für die *grafting-through* Copolymerisation wurde ein Makromonomeranteil in Relation zum Comonomer HEAm von 5, 15, 25, 35 und 100% gewählt. Hierfür wurde ein Glykooligomer synthetisiert, welches jeweils einmal mit 2-Aminoessigsäureacrylamid und mit 6-Aminohexansäureacrylamid funktionalisiert wurde (siehe Abbildung 21).

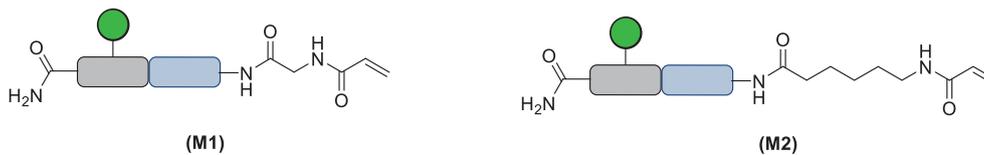


Abbildung 21: Schematische Darstellung der synthetisierten Glykomakromonomere für die grafting-through Copolymerisation.

Tabelle 5: Wasser-GPC Resultate der grafting-through Copolymerisation zweier monovalenter Glykomakromonomeren mit HEAm ermittelt durch Wasser-GPC.

th. Einbau	Makromonomer M1			Makromonomer M2		
	$M_n$	$M_w/M_n$	Ausbeute	$M_n$	$M_w/M_n$	Ausbeute
5%	-	-	0%	24.430	1.89	53%
15%	24.760	1.73	20%	23.570	1.70	27%
25%	15.210	2.50	12%	20.930	2.10	10%
35%	-	-	0%	24.310	3.20	6%
100%	6.071	2.0	5%	-	-	0%

Aus Tabelle 5 wird ersichtlich, dass die Copolymerisation vom Glykomakromonomer **2** erfolgreicher verlief, als die Copolymerisation von **1**. Dies kann durch den hydrophoben Charakter des Hexyl-Linkers erklärt werden, sodass sich das Makromonomer amphiphil verhält und sich die reaktiven Acrylamid-Endgruppen in räumlicher Nähe befinden. Ein weiterer Aspekt ist, dass bei immer höher werdendem Makromonomeranteil die Ausbeute sinkt, während die Dispersität des Polymers steigt. Dies lässt auf die Zunahme von Abbruchreaktionen bei höherem Makromonomeranteil schließen, welche durch sterische Hinderung des Makromonomers erklärt werden kann. Ein Homopolymer ist mittels Makromonomer **M2** nicht gelungen, während **M1** zu einem Oligomer mit einem Molekulargewicht von 6.071 g/mol führte. Auffällig ist, dass bei steigendem Makromonomeranteil das resultierende Molekulargewicht des Polymers nahezu unverändert bleibt. Dadurch, dass das Makromonomer ein größeres Molekulargewicht besitzt als das HEAm, würde man bei gleicher Kettenlänge des Polymers eine Steigerung des resultierenden Molekulargewichts erwarten. Dies lässt vermuten, dass insgesamt die Kettenlänge des Polymers sinkt, je höher der Makromonomeranteil ist.

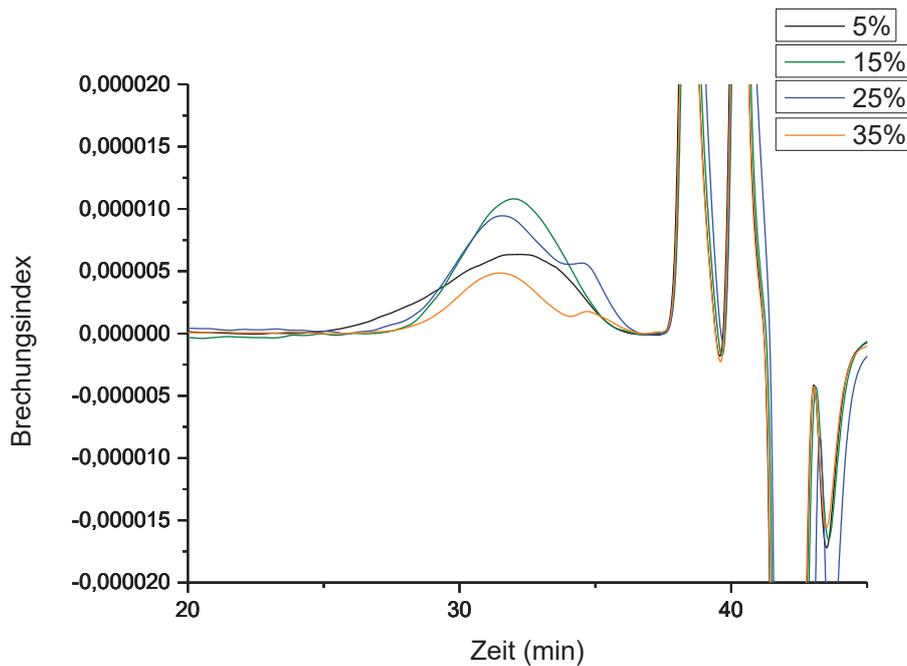


Abbildung 22: Wasser-GPC Spektrum (mit einer Flussrate von 0.5 mL/min) von Copolymeren von HEAm und verschiedenen Verhältnissen von Makromonomer 2.

Abbildung 22 zeigt das GPC-Spektrum der Polymere synthetisiert aus Glykomakromonomer **2**. Hierbei fällt auf, dass ab einem Makromonomeranteil über 15% die Polymere einen bimodalen Verlauf aufweisen. Dies lässt darauf schließen, dass bei einem Ansatz von über 15% Makromonomeranteil ein Polymergemisch entsteht. Eine mögliche Erklärung ist, dass bei hoher Makromonomerkonzentration diese oligomerisieren und die Polymerisation durch Abbruchreaktionen nicht weiter stattfindet, während HEAm weiterhin polymerisiert. Dies macht Schlussfolgerungen in Bezug auf die Korrelation zwischen Struktur und Funktion in den darauffolgenden Bio-Assays unmöglich. Mögliche Ansätze die genannten Nebenreaktionen zu umgehen oder Ausbeuten zu erhöhen, liegen darin, Reaktionsbedingungen wie beispielsweise Initiatormenge, Monomerkonzentration und Lösemitteln zu variieren. Außerdem ist eine Reduzierung der Reaktionsgeschwindigkeit durch kontrolliert-radikalische Methoden wie beispielsweise RAFT-Polymerisation möglich, um die Anzahl der Abbruchreaktionen zu verringern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein mit Mannose-konjugiertes Oligo(amidoamin)-Gerüst aus TDS und EDS erfolgreich an der Festphase synthetisiert wurde. Mehrere Techniken wurden getestet, um das synthetisierte Glykomakromolekül mit einer polymerisierbaren Gruppe zu funktionalisieren. Hierbei war der vielversprechendste Ansatz die Konjugation eines Acrylamid-tragenden Bausteins. Dazu wurden 2-Aminoessigsäure, 4-Aminobuttersäure und 6-Aminohexansäure mit Acrylsäurechlorid funktionalisiert. Nach Anbringung der Bausteine an das Glykooligomer wurden somit verschiedene

Glykomakromonomere synthetisiert und erfolgreich mit HEAm copolymerisiert. Hierbei hat das Makromonomer mit Hexyl-Linker einen höheren Umsatz generiert als das Makromonomer mit dem acylierten Essigsäurederivat. Alle Polymere variierten in ihrem Einbau an Makromonomer und erwiesen für die FRP charakteristische Molekulargewichte und Molmassenverteilungen. GPC-Resultate zeigten jedoch, dass ab einem Einbau von über 15% ein Polymergemisch entsteht. Da für die mit den Polymeren im Folgenden geplanten Versuche zur Bindung an Lektinen ein solches Gemisch ungeeignet ist, wurde der Ansatz der *grafting-through* Methode verworfen. Nichtsdestotrotz zeigen diese Ergebnisse die prinzipielle Machbarkeit des Ansatzes und geben wichtige Hinweise auf die Bedeutung der Wahl der polymerisierbaren Endgruppe bzw. des Linkers zwischen Glycooligomer und polymerisierbarer Endgruppe auf den Einbau ins Polymer.

### 3.3 Synthese von zuckerfunktionalisierten Kammpolymeren mittels *grafting-to* Technik

Bei der *grafting-to* Technik wird ein Polymer, mit funktionellen Seitenketten hergestellt, die in einem zweiten Schritt die Konjugation der Glykooligomere über deren N- oder C-terminale Einheit ermöglichen. Hierzu werden beide Komponenten, Polymer-Rückgrad und Oligomer-Seitenketten, zunächst separat voneinander synthetisiert und anschließend kombiniert. Der Vorteil dieser Synthesestrategie im Vergleich zur *grafting-through* Methode ist, dass das Polymer mittels kontrollierter Polymerisation synthetisiert werden kann und das selbe Polymer als Grundsubstanz genutzt werden kann, sodass die resultierenden Polymere stets das gleiche Polymergerüst aufweisen. Allerdings ist der Einbau der Seitenketten sowohl kinetisch als auch thermodynamisch limitiert. Durch zunehmenden Einbau an Seitenketten verlangsamt sich, aufgrund sterischer Effekte, die Diffusion von noch freien Seitenketten zur reaktiven Gruppe des Polymerrückgrats.<sup>176</sup> Außerdem wird die Anbringung von Seitenketten an das Polymer mit zunehmender Dichte entropisch ungünstiger, da das Polymerrückgrat von einem zufälligen Knäuel zu einer stärker gestreckten Konformation wechseln muss.

In dieser Arbeit wurde nach bekannten Vorschriften ein Polymer aus Pentafluorophenylacrylat (PFPA) in verschiedenen Längen synthetisiert.<sup>177,178</sup> Dieser Polyaktivester wurde dann mit den an der Festphase erhaltenen Glykooligomeren zu Glykokammpolymeren verschiedener Kettenlänge und mit verschiedener Anzahl an Seitenketten umgesetzt. Im Folgenden wird die Synthese der beiden Komponenten sowie die Zusammenführung im *grafting-to* Prozess erläutert.

### 3.3.1 Synthese von Glykomakromoleküle mit terminalen Aminogruppen

Die Synthese von Glykooligomeren mit terminaler Aminogruppe erfolgte gemäß der beschriebenen Festphasensynthese linearer Präzisionsmakromoleküle. Hierbei wurden TDS und EDS in alternierender Reihenfolge gekuppelt. Nach der Synthese des Oligomers mit der gewünschten Sequenz wurde Azid-funktionalisierte Mannose mittels CuAAC an das Oligomer konjugiert und das resultierende Glykooligomer von der Festphase abgespalten. Hierbei wurden jeweils zwei divalente und zwei tetravalente Oligomere synthetisiert (siehe Abbildung 23).

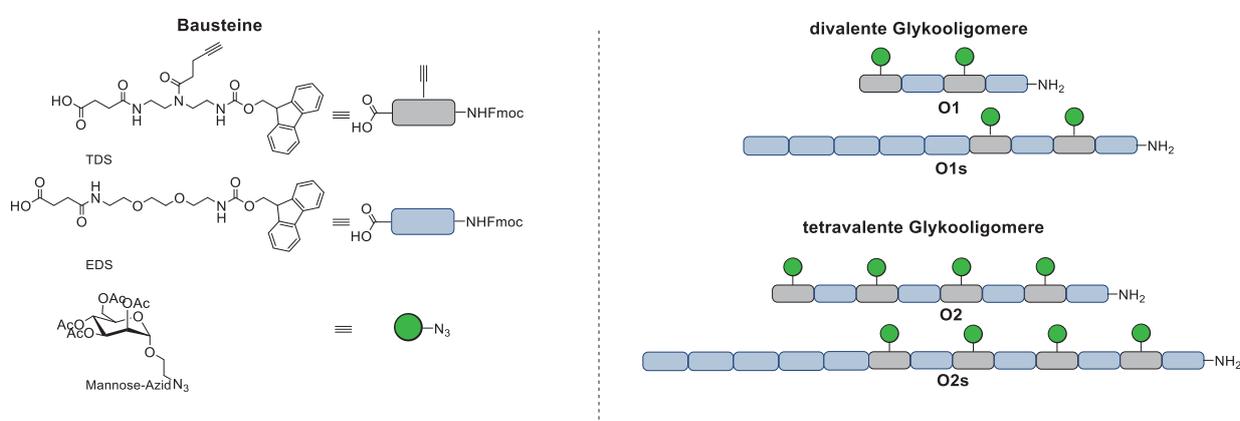


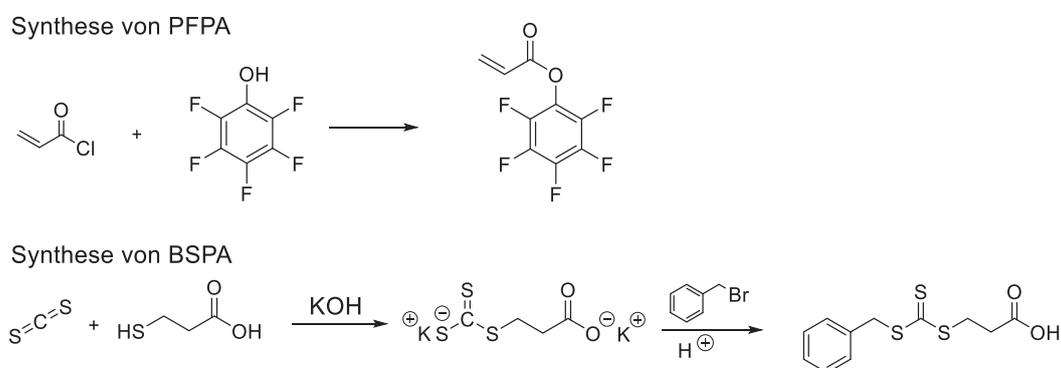
Abbildung 23: Struktur der Bausteine und schematische Darstellung der synthetisierten divalenten und tetravalenten Glykooligomere zur späteren Nutzung als Seitenketten im Kammglykopolymer.

Als divalentes System wurde ein Tetramer anfangend mit TDS in alternierender Weise mit EDS synthetisiert (O1). Als zweite Struktur wurde das gleiche Oligomer mit einer Sequenz von 5 EDS (EDS<sub>5</sub>) am C-Terminus versehen, um einen potenziell sterisch abschirmenden Block zu erzeugen (O1s). Dies sollte im Bio-Assay tiefere Einblicke in die Ligand-Rezeptor Wechselwirkung geben. Analog zum divalenten System wurde für das tetravalente System ein Oktamer in alternierender Weise und jeweils mit und ohne EDS<sub>5</sub>-Block synthetisiert (O2 und O2s). Alle synthetisierten Oligomere tragen die noch acetylierten Mannose-Gruppen und jeweils ein primäres Amin am N-Terminus, welches im Folgenden zur Reaktion am Polyaktivester genutzt wurde.

### 3.3.2 Synthese von Poly(pentafluorophenylacrylat) als Polyaktivester

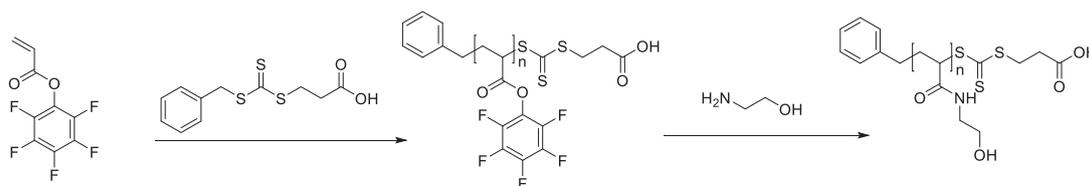
Für die Synthese von Kammpolymeren mit Glykooligomer-Seitenketten muss das zu verwendende Polymerrückgrat die selektive Umsetzung mit den zuvor eingeführten N-terminalen Amingruppen ermöglichen. Hierfür wurde daher Poly(pentafluorophenylacrylat) (p(PFPA)) als Polyaktivester gewählt. Dieses Polymer wurde von Theato und Mitarbeitern eingeführt und bereits zahlreich beschrieben zur effizienten Anbindung von aminhaltigen Spezies unter Ausbildung einer Amidbindung am Polymer.<sup>177,179-181</sup> Hierbei besitzt p(PFPA) gegenüber andere Polyaktivestern wie etwa Polymeren auf Basis von N-(Methacryloyloxy)succinimid wichtige Vorteile wie gute Löslichkeit in organischen Lösemitteln und Hydrolysestabilität.<sup>161,182-184</sup> Das p(PFPA) dient hierbei als Vorläuferpolymer und somit als Plattform für die Synthese der Glykokammpolymere. Um genaue Aussagen über die Korrelation zwischen Struktur und Funktion der resultieren Glykokammpolymere zu ermöglichen, wurde das Polymer mit verschiedenen Kettenlängen und geriner Dispersität mittels RAFT-Polymerisation hergestellt.

Die Synthese des Monomers wurde nach literaturbekannter Vorschrift aus Pentafluorophenol und Acrylsäurechlorid durchgeführt.<sup>183</sup> Für die Polymerisation wurde 3-Benzylsulfanylthiocarbonylsulfanylpropionsäure (BSPA) als RAFT-Reagenz genutzt und ebenfalls nach Literaturvorschriften synthetisiert (siehe Schema 11).<sup>185</sup>



Schema 11: Synthese von PFPA und BSPA nach Literaturvorschriften.<sup>183,185</sup>

Um optimalen Reaktionsbedingungen zu finden, wurden verschiedene Test mit PFPA durchgeführt. Hierzu wurden Polymerisationen in DMF, Dioxan, Ethylacetat und Benzol getestet (siehe Tabelle 6). Die erhaltenen Polymere wurden mit Ethanolamin umgesetzt, um das resultierende wasserlösliche p(HEAm) mittels Wasser-GPC zu analysieren (siehe Schema 12). Dies wird damit begründet, da die resultierenden Glykokammpolymere ebenfalls wasserlöslich sind und mit derselben Methode analysiert werden. Des Weiteren ist die in dieser Arbeit verwendete Wasser GPC mit einem LS-Detektor verbunden, wodurch die Ermittlung des Molekulargewichts nicht an interne Standards gebunden ist.



Schema 12: Schematische Darstellung der RAFT-Polymerisation von PFPFA mit anschließender Umsetzung mit Ethanolamin.

Das resultierende p(HEAm) kann ebenfalls als Negativkontrolle für die Bio-Assays dienen, da es wie bereits beschrieben keine unspezifischen Wechselwirkungen mit Proteinen aufweist.<sup>171</sup>

Tabelle 6: Wasser-GPC Resultate der RAFT-Polymerisation von PFPFA in verschiedenen Lösemitteln.

Lösemittel	M <sub>n</sub> p(HEAm) <sup>a</sup>	Mw/Mn p(HEAm) <sup>a</sup>	Ausbeute [%]	M <sub>n</sub> p(PFPA) <sup>b</sup>
DMF	9.885	1.3	62	20.457
Dioxan	8.756	1.2	33	18.121
Ethylacetat	10.730	1.2	40	22.195
Benzol	11.550	1.07	78	23.904

<sup>a</sup> Bestimmt mittels Wasser-GPC

<sup>b</sup> Berechnet aus den Werten von p(HEAm)

Die Polymerisation in DMF weist mit einer Molmassenverteilung von 1.3 die höchste Dispersität auf, während die Polymerisation in Dioxan beziehungsweise Ethylacetat in Dispersitäten von 1.2 resultieren. Da bei Benzol durch die sp<sup>2</sup>-Hybridisierung keine Radikalübertragungen in der Flüssigphase bekannt sind, führte die Polymerisation erwartungsgemäß zu den geringsten Dispersitäten (1.07). Aufgrund der Dispersität und der Ausbeute wurden die Vorläufer Polymere in Benzol erzeugt. Hierbei wurde ein Polymer mit einer theoretischen Kettenlänge von 50, sowie ein Polymer mit einer Kettenlänge von 100 Wiederholungseinheiten (DP) synthetisiert (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: RAFT-Polymerisation von PFPFA in Benzol.

Polymer [Th.]	P <sub>n</sub> <sup>a</sup> [NMR]	P <sub>n</sub> <sup>b</sup> [GPC]	Mw/Mn <sup>b</sup>	M <sub>n</sub> p(HEAm) <sup>b</sup>	M <sub>n</sub> p(PFPA) <sup>c</sup>
P1Neg <sub>50mer</sub>	40	45	1.01	6.409	13.264
P2Neg <sub>100mer</sub>	92	84	1.08	9.663	20.230

<sup>a</sup> Bestimmt mittels <sup>1</sup>H-NMR

<sup>b</sup> Bestimmt mittels Wasser-GPC (mit einer Flussrate von 0.5 mL/min)

<sup>c</sup> Berechnet aus den Werten von p(HEAm)

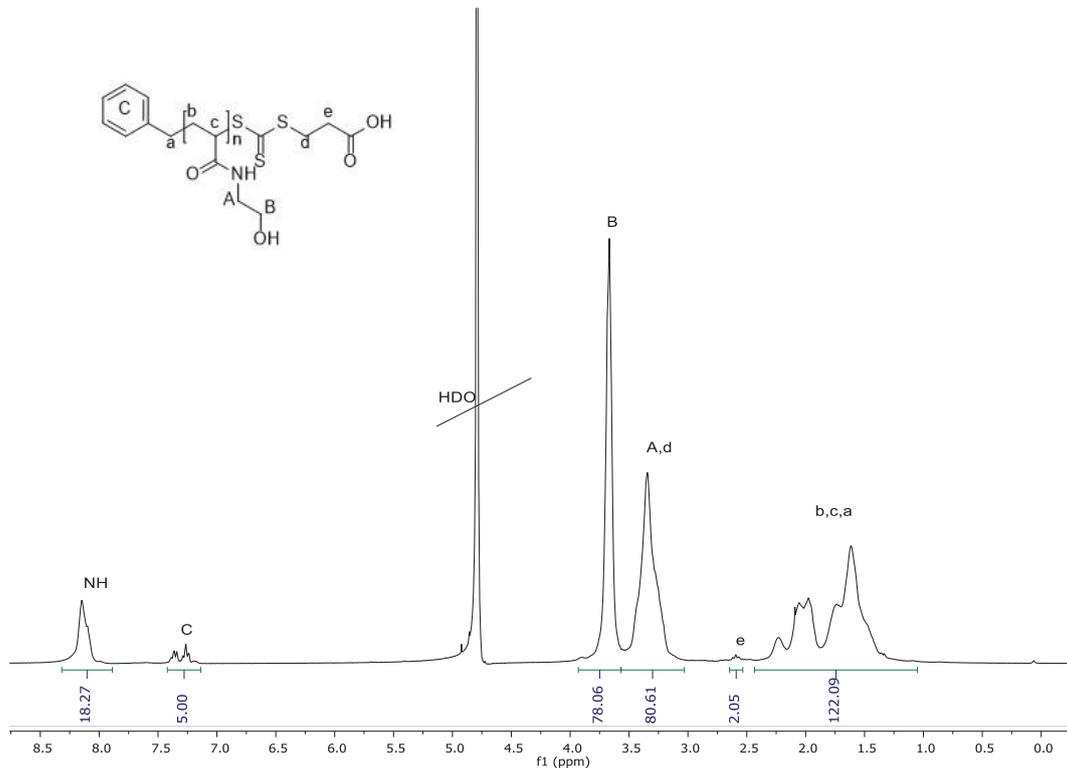


Abbildung 24:  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) von  $p(\text{HEAm})$  mit einer theoretischen Polymerisationsgrad von 50.

Die Berechnung des Polymerisationsgrades wird exemplarisch am anhand Abbildung 24 gezeigt.

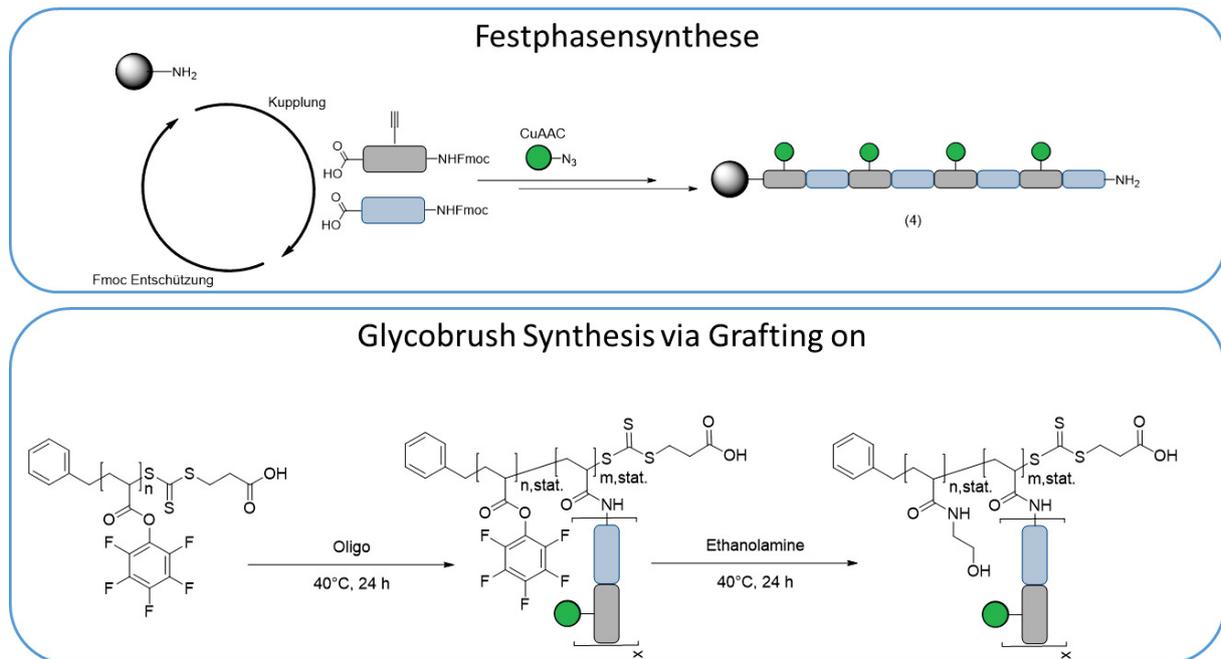
$$Pn = \left[ \frac{B}{2} + \frac{A}{2} + \frac{(b+c)}{3} \right] : 3 = \left[ \frac{78.06}{2} + \frac{80.61 - 2}{2} + \frac{122.09 - 2}{3} \right] : 3 = 40$$

Hierbei würde es ausreichen ein spezielles Signal, wie z.B. Signal **B**, durch die Anzahl der Protonen zu dividieren um die Wiederholungseinheit zu berechnen. Dennoch wird dies mit allen Signalen der Wiederholungseinheit (**A**, **B**, **b** und **c**) gemacht, welche dann miteinander summiert werden und ein Mittelwert gebildet, um eine geringere Abweichung zu erhalten. Anhand der erhaltenen Masse kann die Masse des vorläufigen Polyaktivesters berechnet werden. Die zwei synthetisierten  $p(\text{PFPA})$  Polymere dienen als Vorläufer für die in dieser Arbeit synthetisierten Glykokammpolymere. Anhand des  $^{19}\text{F-NMR}$ s wurde nachgewiesen, dass eine vollständige Umsetzung aller Seitenketten erhalten wurde (siehe Anhang).

### 3.3.3 Funktionalisierung des Polyaktivesters mit Glykomakromolekülen zum Glykokammpolymer

Durch die separate Synthese des Polyaktivester-Gerüsts (siehe Kapitel 3.3.2) und der amin-terminierten Glykooligomere, beschrieben in Kapitel 3.3.1, sind nun Glykokammpolymere mit

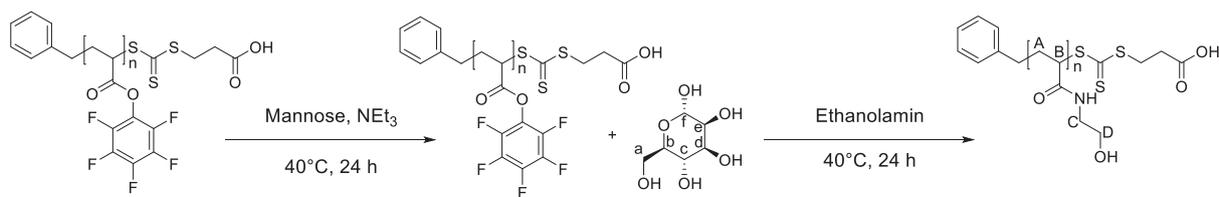
sequenzdefinierten, monodispersen Seitenketten zugänglich. Ein wichtiger Vorteil der *grafting-to* Methode ist, dass die resultierenden Strukturen sich immer aus denselben Vorläufermolekülen ableiten lassen, sodass die Kettenlänge und das Polymerrückgrat immer gleich sind. Die Synthese Glykokampolymer mittels *grafting-to* Methode ist in Schema 13 als Übersicht dargestellt.



Schema 13: Schematische Darstellung der Synthese eines Glykooligomers mittels Festphasensynthese sowie die Umsetzung der Glykooligomere zum Glykokampolymer in einer Zwei-Schritt-Synthese mittels Polyaktivester *grafting-to* Strategie.

Die Glykooligomere wurden in einer Zwei-Schritt-Synthese mit dem hergestellten Polyaktivester umgesetzt. Im ersten Schritt wurde das entschützte Oligomer mit Triethylamin ( $\text{NEt}_3$ ) versetzt, um die terminale Aminogruppe zu deprotonieren, sodass der nukleophile Angriff am Carbonyl des Aktivesters erfolgen kann. Nach Zugabe des Polyaktivesters wurde das Gemisch bei  $40^\circ\text{C}$  24h gerührt. Die Temperatur überschreitet hierbei  $40^\circ\text{C}$  nicht, damit ein nukleophiler Angriff durch die Hydroxygruppen des Zuckers unterbunden wird. Im zweiten Schritt werden verbleibende Pentafluorophenyl-Gruppen, welche sich noch am Polymer befinden, mit einem Überschuss an Ethanolamin unter weiterem Rühren bei  $40^\circ\text{C}$  für 24h zur Reaktion gebracht.

Auch wenn die Hydrolysestabilität des Pentafluorophenylester in der Literatur vielfach beschrieben wurde,<sup>161,183,184,186-188</sup> wurde in dieser Arbeit ein Hydrolyse-Test in Anwesenheit von Mannose durchgeführt, damit sichergestellt werden kann, dass jedes am Polymer gebundene Oligomer über Amidbindung an das Polymerrückgrat verbunden ist. Dies ist in der potentiellen Anwendung essentiell, da Amidbindungen wesentlich hydrolysestabiler sind als Estergruppen. Der Hydrolyse-Test wurde, ähnlich der Oligomer-Funktionalisierung, in zwei Schritten durchgeführt (siehe Schema 14 und Abbildung 25).



Schema 14: Hydrolyse-Test mit reiner Mannose und anschließender Umsetzung mit Ethanolamin.

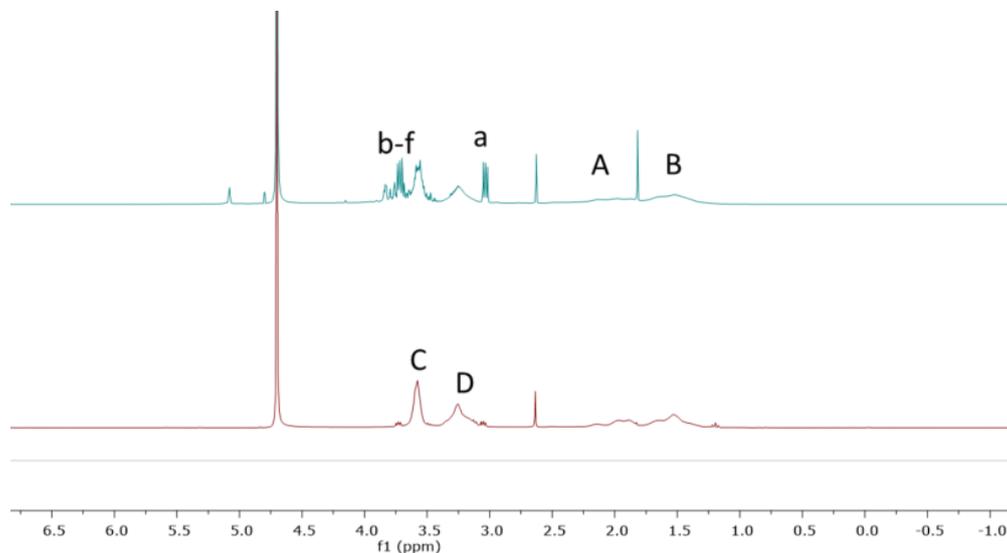


Abbildung 25:  $^1\text{H-NMR}$  Spektren ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz) des Polyaktivester funktionalisiert mit Ethanolamin in Anwesenheit von Mannose: Die grüne Linie zeigt das Produktgemisch, (Mannose und p(HEAm)), während die Rote Linie nach der Dialyse aufgenommen wurde.

Abbildung 25 zeigt das ungereinigte Rohprodukt (grün), bestehend aus Mannose und p(HEAm), sowie das aufgereinigte p(HEAm) (rot). Hierbei sind die Zuckersignale eindeutig im oberen Bereich der Abbildung zu erkennen, welche nach der Aufreinigung mittels Dialyse in Wasser (MWCO: 500 Da) im unteren Bereich verschwinden. Somit kann angenommen werden, dass bei Funktionalisierung des Polyaktivesters mit einem multivalenten Glykooligomer das Oligomer ausschließlich über das freie Amin gekuppelt wird.

Für die Einstellung der optimalen Reaktionsbedingungen wurde ein monovalentes Glykooligomer (siehe Anhang, Oligomer O) als Teststruktur bestehend aus TDS und EDS verwendet. Hierbei wurden die Polyaktivester mit einem Polymerisationsgrad (DP) von 40 und 92 jeweils mit 0.3 Äquivalenten Glykooligomer, bezogen auf die funktionellen Gruppen des Polymers, in DMF bei 40°C für 24 Stunden bzw. für 92 Stunden gerührt und anschließend mit 10-fachem Überschuss Ethanolamin versetzt und weitere 24 Stunden gerührt. Die resultierenden Polymere wurden in Aceton gefällt und mittels Dialyse in Wasser unter Nutzung sogenannter Vivaspin<sup>®</sup> aufgereinigt (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Wasser-GPC-Daten der zeitbasierten Studien mit Polyaktivestern verschiedener Kettenlänge und einem monovalenten Glykooligomer mit einem theoretischen Einbau von 30%.

Polymer	$M_n^b$ [g/mol]	$M_n$ [Th.] [g/mol]	$D^b$	Einbau <sup>b</sup>	Einbau <sup>a</sup>
24h/40mer	13.690	16.488	1.03	18%	14%
96h/40mer	13.480	16.488	1.05	17.5%	15.7%
24h/92mer	18.960	24.653	1.06	15.5%	14.2%
96h/92mer	19.340	24.653	1.08	16%	15%

<sup>a</sup> Bestimmt mittels <sup>1</sup>H-NMR

<sup>b</sup> Bestimmt mittels Wasser-GPC (mit einer Flussrate von 0.5 mL/min)

Tabelle 8 zeigt die Resultate der zeitbasierten Studien. Hierbei konnte gezeigt werden, dass durch längere Reaktionszeiten kein signifikant höherer Einbau an Seitenketten erzielt werden kann. Der theoretisch maximale Einbau liegt bei 30%, wohingegen alle resultierenden Polymere einen Einbau von ungefähr 15% aufweisen.

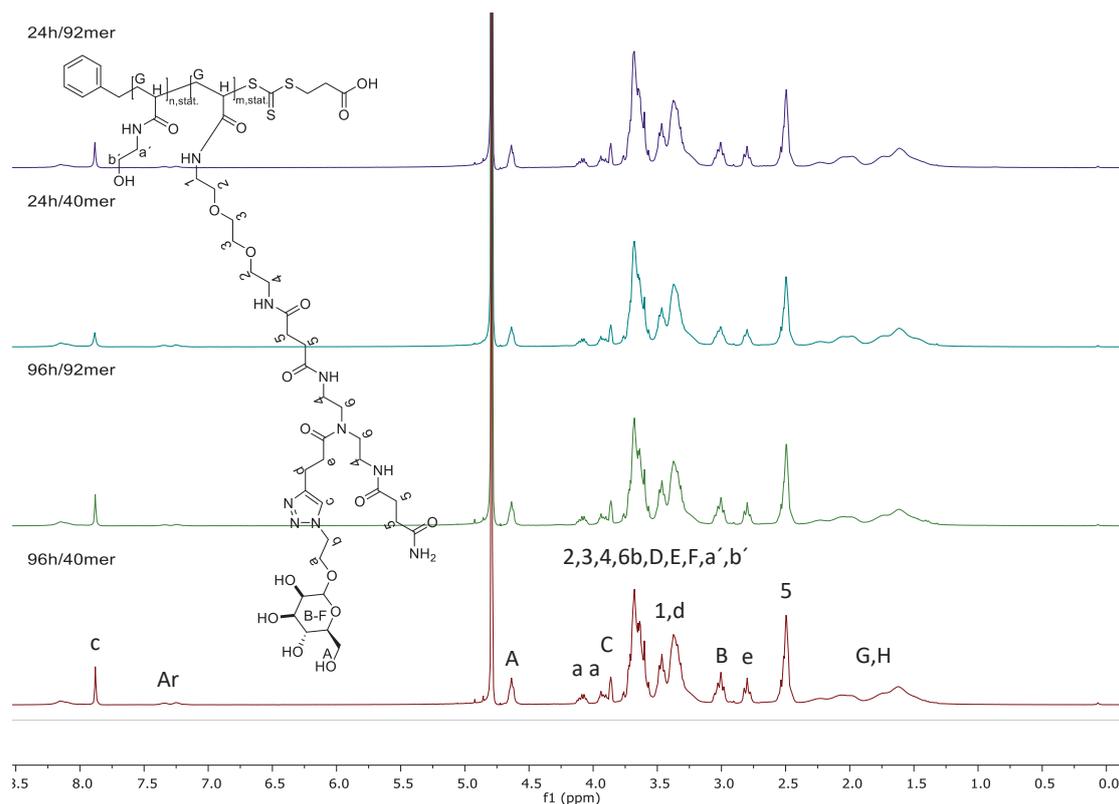


Abbildung 26: <sup>1</sup>H-NMR ( $D_2O$ , 300 MHz) der zeitbasierten Studie mit Polyaktivestern verschiedener Kettenlänge und einem monovalenten Glykooligomer mit einem theoretischen Einbau von 30%.

Anhand des <sup>1</sup>H-NMRs können ebenfalls keine signifikanten Unterschiede durch verschiedene Reaktionszeiten bei der Funktionalisierung der Polyaktivester mit einem monovalenten Glykooligomer festgestellt werden (siehe Abbildung 26). Im <sup>1</sup>H-NMR sind die Signale des Polymerrückgrats bei 2.4 -

1.3 ppm deutlich zu erkennen. Das Signal der Triazolgruppe des konjugierten Zuckers erscheint bei 7.88 ppm. Eine detaillierte Zuordnung der Spektren findet sich im Anhang dieser Arbeit.

Als nächstes wurde der theoretische Einbau an monovalenten Seitenketten, anhand des Polyaktivester mit einer Polymerisationsgrad (DP) von 92, getestet. Hierbei wurden Ansätze mit 0.05, 0.1, 0.25, 0.35 und 1.2 Äquivalenten an Glykooligomer (bezogen auf Aktivester-Gruppen) untersucht. Alle erhaltenen Polymere besitzen eine Dispersität von ungefähr 1.1 (siehe Tabelle 9).

*Tabelle 9: Polymere mit verschiedener Anzahl an monovalenten Seitenketten.*

<b>Th. Einbau</b>	<b>D<sup>a</sup></b>	<b>Mn<sup>a</sup> [g/mol]</b>	<b>Einbau<sup>a</sup> [%]</b>
<b>5 %</b>	1.1	12.500	1.5
<b>10 %</b>	1.08	14.810	5
<b>25 %</b>	1.1	19.510	12.5
<b>35 %</b>	1.1	23.380	17
<b>100 %</b>	1.1	57.070	65

<sup>a</sup> Bestimmt mittels Wasser-GPC (mit einer Flussrate von 0.5 mL/min)

Hierbei fällt auf, dass immer ungefähr die Hälfte des maximal theoretischen Einbaus erreicht wird. Dies kann auf sterische Effekte zurückgeführt werden. Ein osmotischer Effekt wird aufgrund gleichbleibenden Einbaus bei höherer Zeit ausgeschlossen. Außerdem steigt, bei höherem Einbau, das Molekulargewicht linear an.

Auf Basis dieser Studien wurden nun die zuvor synthetisierten divalenten (O1, O1s) und tetravalenten Glykooligomere (O2, O2s) mit Polyaktivestern zweier Kettenlängen (DP = 42 und 92) mit unterschiedlichen Anteilen umgesetzt, um so eine Bibliothek von Glykokammpolymeren zu erzeugen (siehe Abbildung 27).

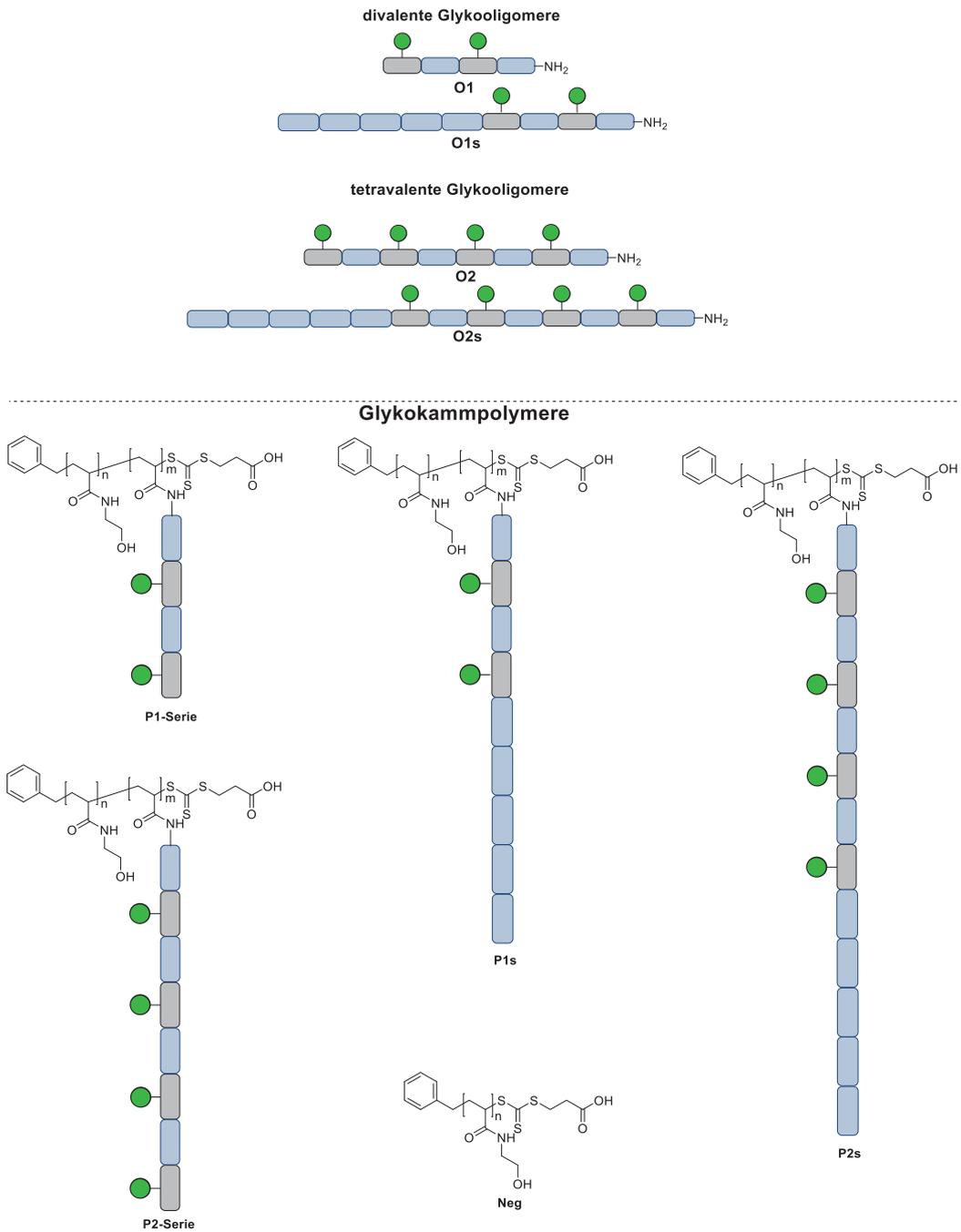


Abbildung 27: Schematische Darstellung der erzeugten Glykokammopolymere.

Zusätzlich wurden beide Polyaktivester-Vorläufer einmal vollständig mit Ethanolamin umgesetzt, um so zwei Poly(HEAm) als Negativkontrolle für spätere Bindungsstudien zu erhalten.

Die P1-Serie wird aus dem Oligomer O1 synthetisiert und beinhaltet Polymere mit unterschiedlichen Anteilen an Seitenketten. Hierbei wird für einen theoretischen Seitenketteneinbau von 10% (P1-10), 40% (P1-40), 80% (P1-80), der Polyaktivester mit einem DP von 40 benutzt. Zusätzlich wurde ein Glykokammolymer (P1-100), durch Kombination des Polyaktivesters mit einem DP von 92 und des monovalenten Oligomers, synthetisiert. P1s ist ein Polymer, das am Ende der Seitenketten einen

Schild, bestehend aus fünf EDS (EDS<sub>5</sub>) Einheiten, besitzt und wurde aus dem Oligomer O1s synthetisiert. Tabelle 10 zeigt die Polymere synthetisiert aus O1 und O1s mit verschiedener Anzahl an Seitenketten.

Tabelle 10: Polymere synthetisiert aus dem divalenten Oligomeren O1 und O1s.

DiV-Oligo	D <sup>b</sup>	Mn <sup>b</sup> [g/mol]	N Seitenketten <sup>a</sup>	N Zucker <sup>b</sup>	N Zucker <sup>a</sup>
<b>P1-10</b>	1.05	8.375	2	4	3
<b>P1-40</b>	1.03	20.780	15	21	15
<b>P1-80</b>	1.07	34.100	35	40	35
<b>P1-100mer</b>	1.06	15.000	15	14	15
<b>P1s</b>	1.08	52.240	25	37	26

<sup>a</sup> Bestimmt mittels <sup>1</sup>H-NMR

<sup>b</sup> Bestimmt mittels Wasser-GPC (mit einer Flussrate von 0.5 mL/min)

Hierbei besitzen alle Polymere eine Dispersität von unter 1.1 und weisen erwartungsgemäß bei größerer Seitenkettenanzahl ein höheres Molekulargewicht auf.

Analog zur P1-Serie wurden bei der P2-Serie die Polymere P2-10, P2-40, und P2-80 durch Einsatz des Oligomers O2 und des Polyaktivesters mit einem DP von 40, sowie das Polymer P2-100 unter Einsatz des Polyaktivesters mit einem DP von 92 hergestellt. P2s ist ein Polymer, das am Ende der Seitenketten einen Schild, bestehend aus fünf EDS (EDS<sub>5</sub>) Einheiten, besitzen und wurde aus dem Oligomer O2s synthetisiert (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Polymere synthetisiert aus dem tetravalenten Oligomeren O2 und O2s.

TetrV-Oligo	D <sup>b</sup>	Mn <sup>b</sup> [g/mol]	N Seitenketten <sup>a</sup>	N Zucker <sup>b</sup>	N Zucker <sup>a</sup>
<b>P2-10</b>	1.05	8.678	1	5	4
<b>P2-40</b>	1.10	38.500	12-13	46	50
<b>P2-80</b>	1.05	57.980	16-17	72	65
<b>P2-100mer</b>	1.01	22.450	3	16	12
<b>P2s</b>	1.04	29.500	6	25	25

<sup>a</sup> Bestimmt mittels <sup>1</sup>H-NMR

<sup>b</sup> Bestimmt mittels Wasser-GPC (mit einer Flussrate von 0.5 mL/min)

Ähnlich zur P1-Serie besitzen alle Polymere eine geringe Dispersität und weisen bei höheren Seitenketteneinbau ein größeres Molekulargewicht auf. Auch wenn beispielsweise P1-40 und P2-40 ungefähr die gleiche Anzahl an Seitenketten aufweisen, ist das Molekulargewicht von P2-40 mit 38.500 g/mol beinahe doppelt so groß wie das von P1-40. Dies lässt sich durch die doppelt so großen Seitenketten erklären.

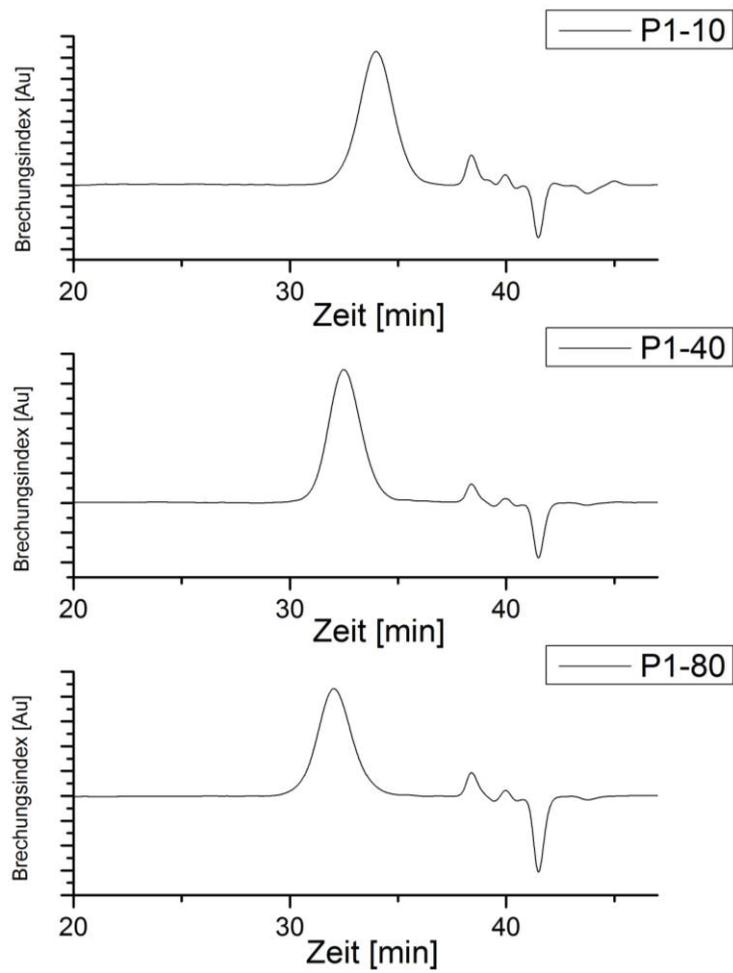


Abbildung 28: Wasser GPC-Verlauf (mit einer Flussrate von 0.5 mL/min) von P1-10, P1-40 und P1-80.

In Abbildung 28 sind beispielhaft drei Polymere und ihre Analytik mittels Wasser-GPC dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass wie zu erwarten Proben mit größerem Molekulargewicht bei früheren Retentionszeiten eluieren.

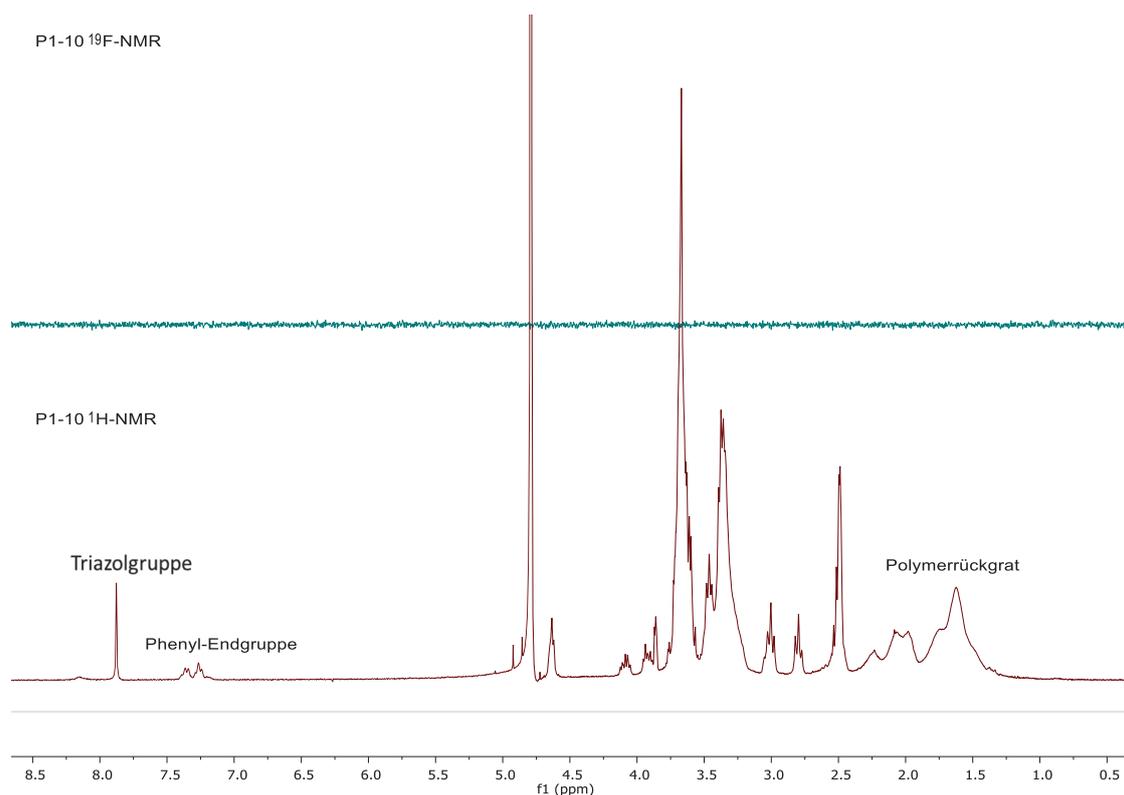


Abbildung 29:  $^{19}\text{F}$ -NMR (MHz, LM) (grün) und  $^1\text{H}$ -NMR (MHz, LM) von P1-10.

Abbildung 29 zeigt in grün das  $^{19}\text{F}$ -NMR und in rot das  $^1\text{H}$ -NMR. Aufgrund der Tatsache, dass im  $^{19}\text{F}$ -NMR keine Signale zu erkennen sind, kann davon ausgegangen werden, dass keine Pentafluorophenylgruppen am Polymer mehr vorhanden sind. Somit ist jede Aktivestereinheit umgesetzt worden. Im  $^1\text{H}$ -NMR sind die Signale des Polymerrückgrats im Bereich  $\delta = 1.24\text{--}2.30$  ppm zu erkennen. Neben den Signalen des Oligomer Rückgrats und der  $\text{CH}_2$ -Gruppen des Ethanolamins sind bei  $7.21\text{--}7.39$  ppm die Phenyl-Endgruppe und bei  $7.87$  ppm die Triazolgruppen deutlich zu erkennen. Durch Normierung des Phenylsignals auf 5 kann somit anhand der Intensität des Triazolsignals die Zuckerzahl des Polymers berechnet werden (siehe Tabelle 10 und 11).

### 3.3.1 Synthese von Glykokammpolymere mit sterisch anspruchsvollen Seitenketten

Die Verwendung eines Polyaktivesters ermöglicht es anstelle des Ethanolamins jede erdenkliche amintragende Struktur als Seitenkette zu nutzen. Beispielsweise könnte man durch nichtbindende Seitenketten die Bindungsaffinität gegenüber Rezeptoren durch sterische Abschirmung verringern..<sup>71,189-191</sup> Wenn diese sterisch-abschirmenden Ketten dann gezielt abgespalten oder in ihrer Größe reduziert werden können, kann dieser Effekt genutzt werden, um die biologische Wirkung einer Substanz erst am gewünschten Zielort zu entfalten. Denkbar ist hier z.B. die Abspaltung einer über eine

Disulfid-Gruppe am Glykopolymer verknüpften sterische abschirmenden Kette, wie den in dieser Arbeit eingebrachten EDS<sub>5</sub>-Blöcken. Gelangt das Glykomimetikum an den gewünschten Zielort, der beispielsweise eine reduktives Medium enthält,<sup>192,193</sup> verliert es folglich die sterische Hinderung und setzt die biologische Aktivität frei.<sup>194</sup> Beispielsweise ist das Redoxpotential zwischen dem oxidierendem extrazellulären Raum und dem reduzierenden intrazellulären Raum hoch genug um Disulfide zu spalten und so eine Abspaltung zu ermöglichen.<sup>195</sup> Eine andere Möglichkeit besteht in der Nutzung thermisch schaltbarere Polymere wie dem Poly(*N*-isopropylacrylamid) (pNIPAM), dass seine sterische Abschirmung bei Erhöhung der Temperatur reduziert.<sup>196</sup>

Um diese Effekte genauer zu erforschen wurden verschiedene Glykokamppolymere mit sterischer Hinderung synthetisiert. Analog zur P2-Serie wurde in der P3-Serie ein tetravalentes Glykooligomer an p(PFPA) konjugiert. Diese Reaktionsmischung wurde nach 24h in drei Behälter aufgeteilt. Im ersten Behälter wurde ein Überschuss an Ethanolamin hinzugefügt und weitere 24h gerührt (P3). Hierbei dient das P3-Polymer als Referenz um Unterschiede zwischen den abgeschirmten und den von der Abschirmung befreiten Polymeren zu untersuchen. Im zweiten Behälter wurden amin-terminiertes pNIPAM hinzugefügt und für weitere 24h gerührt. Anschließend wurde in einem zweiten Schritt ein Überschuss an Ethanolamin hinzugefügt. Das erhaltene Polymer wurde nach weiteren 24h gegen Wasser dialysiert (P3-NIPAM). Im dritten Behälter wurde Cysteamin-endfunktionalisiertes PEG hinzugefügt und analog wie P3-NIPAM mit Ethanolamin versetzt und nach 24h gefällt (P3-PEG). Durch den Dithiol linker kann die PEG-Seitenkette mittels Reduktionsmitteln, wie z.B. Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) abgespalten werden. Dies wurde allerdings aus Zeitmangel und geringer Probenmenge nicht durchgeführt. Das von den PEG-Seitenketten befreite Polymer (PEG-OFF) besitzt, dann genau die gleich Anzahl an Liganden wie vorher (siehe Abbildung 30).

Die synthetisierten Polymere der P3-Serie wurden mittels Wasser-GPC analysiert und charakterisiert

*Tabelle 12: Wasser GPC-Daten der P3-Serie mit verschiedenen sterisch anspruchsvollen Seitenketten.*

<b>P3-Serie</b>	<b>D<sup>b</sup></b>	<b>Mn [g/mol]<sup>b</sup></b>	<b>N Seitenketten Polymer<sup>a</sup></b>	<b>N Zucker<sup>a</sup></b>
<b>P3-Oligo</b>	1.07	21.850	4-5	18
<b>P3-NIPAM</b>	1.6	17.614	4-5	18
<b>P3-PEG</b>	1.2	16.000	4-5	18
<b>P3-PEG-OFF</b>	-	-	4-5	18

<sup>a</sup> Bestimmt mittels <sup>1</sup>H-NMR

<sup>b</sup> Bestimmt mittels Wasser-GPC (mit einer Flussrate von 0.5 mL/min)

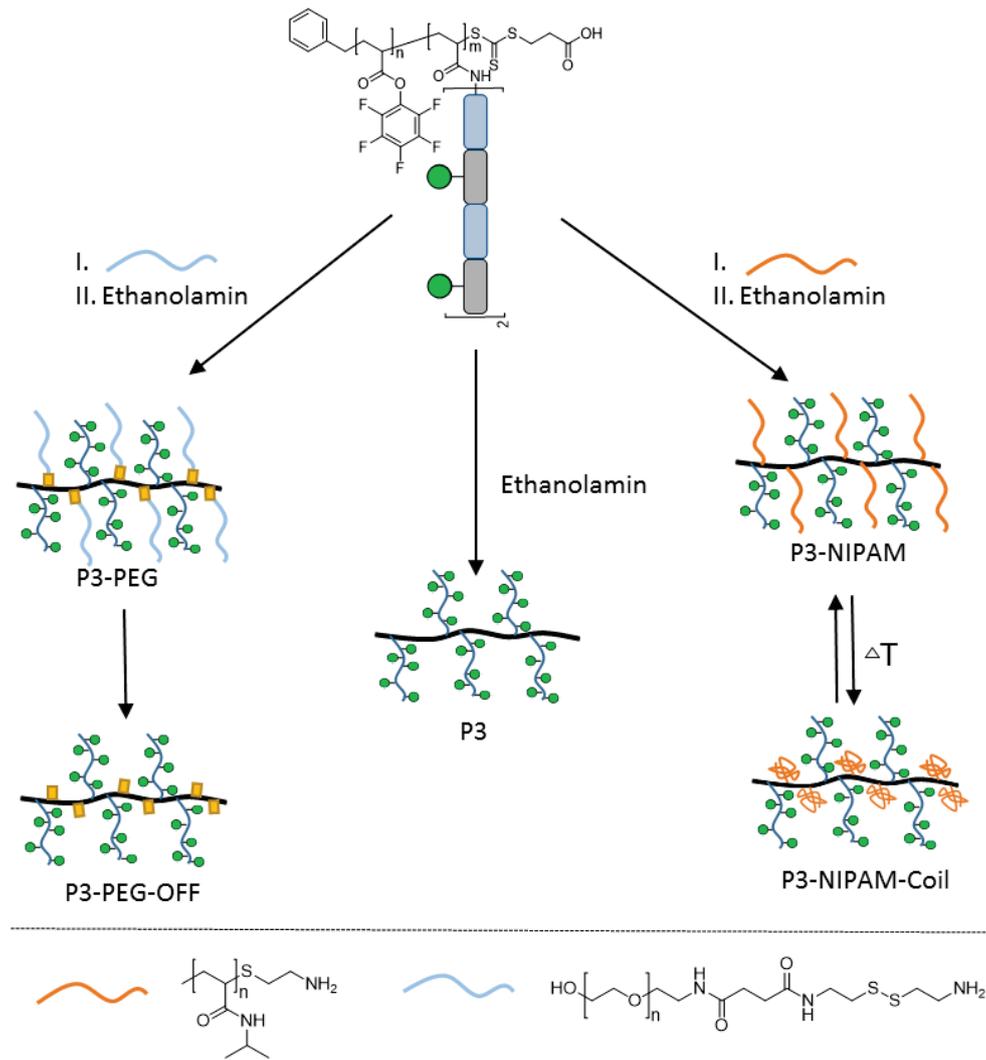


Abbildung 30: Synthese von sterisch abgeschirmten und schaltbaren Glykokammpolymeren.

P3-NIPAM trägt pNIPAM als Seitenkette und ist daher thermo-responsiv. pNIPAM besitzt, in Abhängigkeit von der Temperatur, eine reversible Löslichkeit, welches als „low-critical solution temperature“ (LCST) Verhalten bezeichnet wird.<sup>197-199</sup> Hierbei löst sich pNIPAM bei geringen Temperaturen und wird bei steigender Temperatur unlöslich. Folglich besitzt das synthetisierte Polymer (P3-NIPAM) ab einer bestimmten Temperatur eine Mischungslücke und bildet oberhalb dieser bestimmten Temperatur zwei Phasen. Dies wurde an einem Trübungsphotometer untersucht (siehe Abbildung 31).

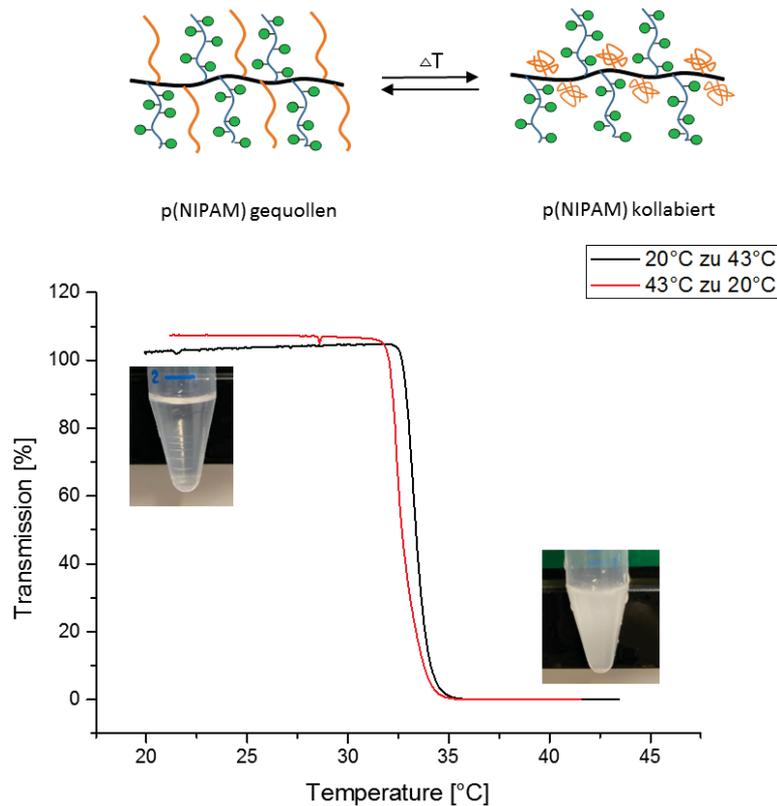


Abbildung 31: Untersuchung des LCST Verhalten von P3-NIPAM mittels Trübungsmessungen.

Bei der Trübungsmessung wurde ein Temperaturbereich von 20°C bis 43°C gewählt. Hierbei wurden zwei Messungen durchgeführt, bei der im genannten Temperaturbereich das Verhalten bei Temperaturanstieg sowie bei Temperaturabfall untersucht wurde. Die Messungen ergaben, dass das synthetisierte P3-NIPAM eine Übergangstemperatur von 33°C aufzeigt. Die LCST von freiem unfunktionalisiertem pNIPAM von 32°C variiert kaum vom funktionalisierten Glykopolymer.<sup>200-202</sup>

Aus Zeitgründen wurde kein LCST-Versuch mit dem funktionalisierten PEG Derivat durchgeführt. Bei Raumtemperatur war jedoch das Polymer wasserlöslich. Um eine LCST oder ein UCST festzustellen, wäre eine Temperaturspanne von 5 °C bis 40°C zu empfehlen.

### 3.3.2 Synthese sulfatisierter Glykokammpolymere

Eine wichtige Klasse der Glykomimetika sind die sogenannten GAG-Mimetika, Glykopolymere die Glycosaminoglycane wie das Heparin, stark sulfatisierte Polysaccharide, imitieren. Polymere GAG-Mimetika sind etwa im Bereich der Entwicklung antiviraler Wirkstoffe von Interesse. Beispielsweise ist bekannt, dass der Haupterreger für Gebärmutterhalskrebs, der sogenannte Human Papillomavirus (HPV)<sup>203,204</sup> an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) bindet.<sup>205</sup> Diese Bindung des HPVs an HSPGs gefolgt von einer strukturellen Änderung des Virusproteins ist der erste Schritt der Infektion.<sup>206-209</sup>

Wenn man also die Bindung des Virus an das natürliche Polysaccharid durch die Inhibition mit geeigneten Glykopolymeren unterbindet, kann eine Infektion verhindert werden.

Um die Eignung der in dieser Arbeit erhaltenen Glykokampolymere als Inhibitoren der viralen Adhäsion von HPV zu testen, wurden Polymere aus der P1- und P2-Serie von Sebastian Bauer sulfatisiert. Hierfür wurden die Polymere P1Neg<sub>50mer</sub> als Negativkontrolle, P1-40 und P2-40 gewählt (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Glykokampolymere, die sulfatisiert wurden.

Name	D <sup>b</sup>	Mn [g/mol] <sup>b</sup>	N Seitenketten <sup>a</sup>	N Zucker <sup>b</sup>	N Zucker <sup>a</sup>
P1Neg <sub>50mer</sub>	1.01	6.409	-	-	-
P1-40	1.03	20.780	15	21	15
P2-40	1.10	38.500	12-13	46	50

<sup>a</sup> Bestimmt mittels <sup>1</sup>H-NMR

<sup>b</sup> Bestimmt mittels Wasser-GPC (mit einer Flussrate von 0.5 mL/min)

Die sulfatiserten Polymere werden zur Unterscheidung mit einem Präfix „S“, nach folgendem Schema, benannt: P1-40 → SP1-40. Die erfolgreiche Sulfatisierung wurde mittels <sup>1</sup>H-NMR bestätigt (siehe Abbildung 32).

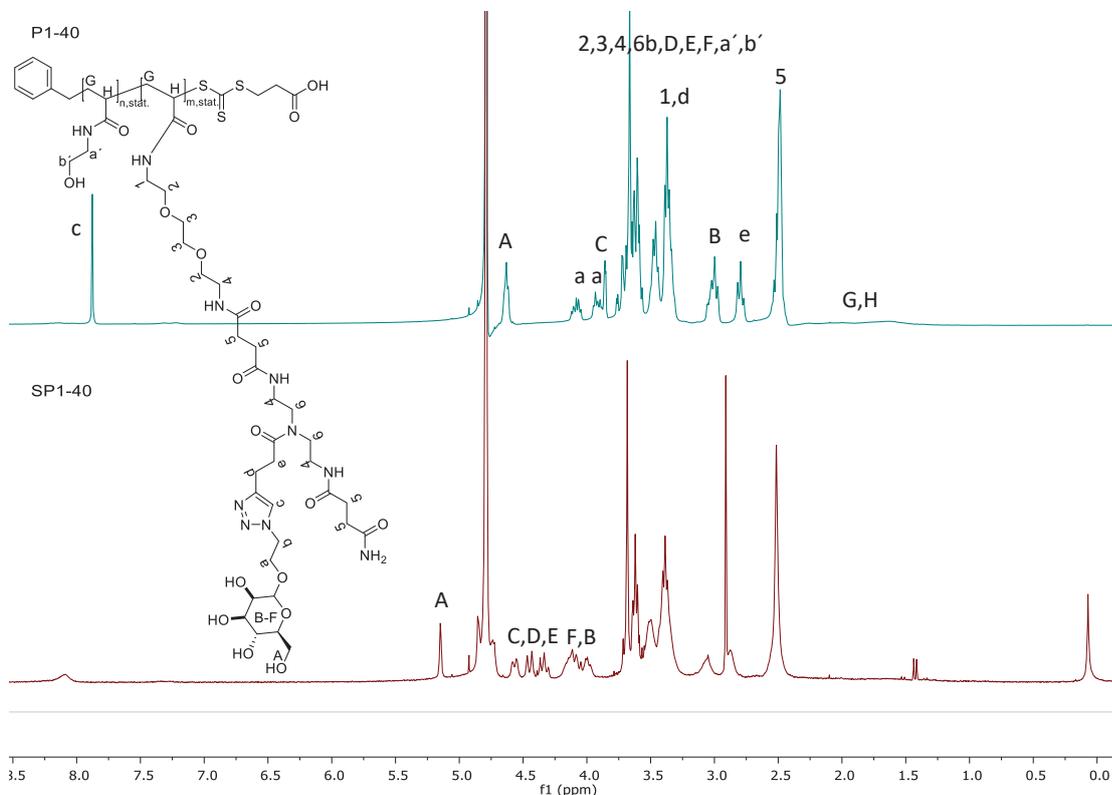


Abbildung 32: <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, LM) von P1-40 (grün) und SP1-40 (rot).

In Abbildung 32 ist zu erkennen, dass nach der Sulfatisierung mehr Signale in den Bereich 3.66 – 4.69 ppm erscheinen. Hierbei handelt es sich um die Zucker-Signale die durch den elektronenziehenden Effekt der Sulfat-Gruppen in höhere ppm-Bereiche verschoben werden. Die drei synthetisierten Polymere wurden an das Institut für Zelluläre Virologie in Münster von Prof. Dr. Mario Schelhaas geschickt und wurden von Julia Racho in geeigneten Bio-Assays weiter analysiert.

### 3.4 Bindungsstudien der Glykokamppolymere

Nach der erfolgreichen Synthese und Charakterisierung der Glykokamppolymere wurden verschiedene Bio-Assays durchgeführt, um Korrelationen zwischen den synthetisierten Strukturen und deren Funktion zu untersuchen.

#### 3.4.1 Bindungsstudien am Modellektin ConA

Die Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (*surface plasmon resonance spectroscopy*, SPR) ist eine wichtige Methode zur Studie von Glykopolymer-Lektin-Wechselwirkungen.<sup>210</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher in einem sogenannten Direkt-Bindungs-Assay ConA als Modellektin auf einen Goldchip immobilisiert. ConA besteht in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung aus zwei oder vier Untereinheiten, die aus einzelnen Polypeptidketten aufgebaut sind. Unter neutralen Bedingungen verfügt es über vier Kohlenhydratbindetaschen, während es in saurer Umgebung nur zwei besitzt.<sup>211</sup> Jede Untereinheit enthält ein fest gebundenes  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion und ein  $\text{Mn}^{2+}$ -Ion.<sup>212,213</sup> Darüber hinaus ist ConA bekannt für seine hohe Affinität zu  $\alpha$ -D-Mannosylresten und ist somit als Rezeptor für die in dieser Arbeit erzeugten Mannose-tragenden Oligo- und Polymere geeignet.<sup>214</sup>

Für den hier verwendeten Direkt-Bindungs-Assay wurden sieben verschiedene Konzentrationen von Glykokamppolymer in Lektin-Bindungs-Puffer (LB-Puffer) verwendet (1mg/ml – 0.001 mg/ml) und gegen das immobilisierte ConA auf der Chipoberfläche vermessen. Der sich in der mobilen Phase befindliche Ligand bindet an das ConA. Dadurch ändert sich die Umgebung an der Chipoberfläche und am Gerät wird eine Änderung des Brechungsindex quantifiziert. Die Änderung des Resonanzwinkels in Abhängigkeit der Brechungsindexänderung wird hier als *response units* (RU) wiedergegeben. Da der Massenanstieg auch vom Molekulargewicht und der Größe des Glykomimetikums abhängt, wird der Ligand in einem direkt bindenden SPR-Assay in verschiedenen Konzentrationen bis zum Erreichen einer

Sättigung der Oberfläche injiziert (maximale RU ( $R_{max}$ )). Die Ligandenkonzentration, bei der die halbe maximale Sättigung der Rezeptoroberfläche ( $R_{max}/2$ ) erreicht wird, ist die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ). Es wurde eine Flussrate von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$ , eine Kontaktzeit von 180s und eine Dissoziationszeit von 270s gewählt. Hierbei wird der Fokus speziell auf die  $K_A$ -Werte gelegt, welche Reziprok zu den ermittelten  $K_D$ -Werten sind. Folglich bedeutet ein hoher  $K_A$ -Wert eine starke Bindung. Die ermittelten  $K_A$ -Werte für die synthetisierten Oligomere sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14:  $K_A$ -Werte für die Oligomere O1, O2, O1s und O2s ermittelt durch SPR Direkt-Bindungs-Assay an ConA.

Oligomer	N(Zucker) <sup>a</sup>	$K_A$ [ $\text{M}^{-1}$ ] x $10^4$	$K_A/\text{Man}$ [ $\text{M}^{-1}$ ] x $10^2$
<b>O1</b>	2	$1,6 \pm 0,4$	$80 \pm 20$
<b>O2</b>	4	$2,7 \pm 0,3$	$68 \pm 8$
<b>O1s</b>	2	$1,6 \pm 0,3$	$80 \pm 20$
<b>O2s</b>	4	$2,45 \pm 0,04$	$61 \pm 1$

<sup>a</sup> Bestimmt mittels  $^1\text{H-NMR}$

Hierbei wird deutlich, dass die divalenten Oligomere eine geringere Bindung ( $K_A$ :  $16.000 \text{ M}^{-1}$ ) im Vergleich zu den tetravalenten Oligomeren ( $K_A$ :  $24.500\text{-}27.000 \text{ M}^{-1}$ ) aufweisen. Ein Bindungsanstieg durch Erhöhung der Valenz entspricht dabei den Erwartungen und kann durch eine statistische Erhöhung der Bindungswahrscheinlichkeit erklärt werden. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in der Literatur und Vorarbeiten am Lehrstuhl von Prof. Dr. Laura Hartmann beschrieben.<sup>12,103,109</sup> Außerdem wird deutlich, dass der EDS<sub>5</sub>-Schild bei dem divalenten Oligomer keinen signifikanten Effekt auf die Bindungsstärke hat, während bei dem tetravalenten Oligomer eine Abnahme bei Anbringung eines abschirmenden Blocks verzeichnet werden kann.

Tabelle 15:  $K_A$ -Werte für die Glykokammpolymere ermittelt durch SPR Direkt-Bindungs-Assay an ConA.

Polymer	N Seitenketten <sup>a</sup>	N Zucker <sup>a</sup>	$K_A$ [ $\text{M}^{-1}$ ] x $10^4$	$K_A/\text{Man}$ [ $\text{M}^{-1}$ ] x $10^2$
<b>P1-10</b>	2	4	$10,8 \pm 0,2$	$269 \pm 5$
<b>P1-40</b>	7-8	15	$37 \pm 1$	$248 \pm 7$
<b>P1-80</b>	17-18	35	$70 \pm 2$	$199 \pm 6$
<b>P1-100mer</b>	7-8	15	$8,4 \pm 0,1$	$56 \pm 0,9$
<b>P1s</b>	12	25	$2,7 \pm 0,2$	$10,7 \pm 0,9$
<b>P2-10</b>	1	4	$6,8 \pm 0,8$	$170 \pm 20$
<b>P2-40</b>	12-13	50	$49 \pm 1$	$102 \pm 2$
<b>P2-80</b>	16-17	65	$82 \pm 20$	$130 \pm 30$
<b>P2-100mer</b>	3	12	$23 \pm 1$	$180 \pm 10$
<b>P2s</b>	6	25	$26 \pm 2$	$105,4 \pm 0,8$

<sup>a</sup> Bestimmt mittels  $^1\text{H-NMR}$

Tabelle 15 stellt die  $K_A$ -Werte der P1- und P2-Serien zusammen. Hierbei wird deutlich, dass im Allgemeinen alle Polymere, mit Ausnahme von P1s, einen signifikant höheren  $K_A$ -Wert im Vergleich zu

den Oligomeren besitzen. Dies ist für hoch-valente Glykopolymere wie die hier vorliegenden Strukturen zu erwarten. Anhand der vorliegenden Daten können keine näheren Schlüsse über die Art der multivalenten Wechselwirkung gezogen werden, aber es ist anzunehmen, dass verschiedene Arten der Bindungsverstärkung wie der *Chelat-Effekt*, das *Statistical Rebinding*, *Sterical Shielding* oder der *Cluster-Effekt* simultan auftreten.

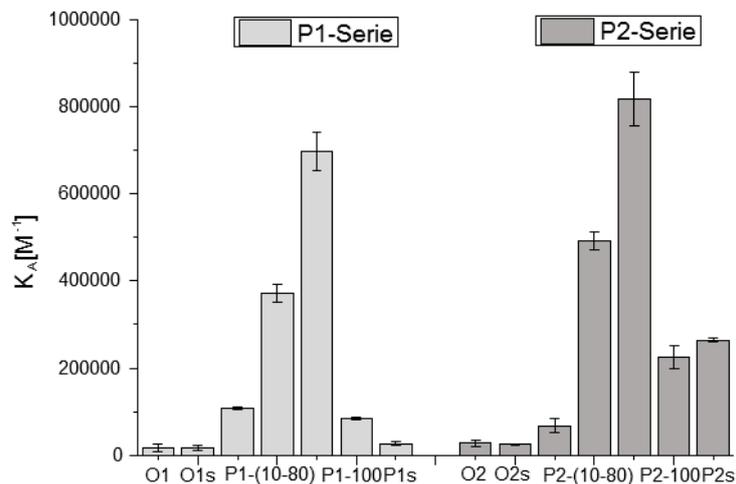


Abbildung 33:  $K_A$ -Werte der P1- und P2-Serie.

Abbildung 33 zeigt die  $K_A$ -Werte aller Glykooligomere (O-Serie) und Glykopolymere (P-Serie). Hier wird erneut deutlich, dass die Glykopolymere im Allgemeinen eine höhere Bindung aufweisen als die Glykooligomere. Es ist anzunehmen, dass das Glykopolymer gleichzeitig mehr als eine Bindungstasche des Rezeptors binden kann, desselben oder unterschiedlicher Rezeptoren, und somit zu einer Bindungsverstärkung führt.<sup>10</sup> Die Abbildung zeigt, dass O1, O1s, O2 und O2s ähnliche Bindungswerte aufweisen ( $K_A$  kleiner als  $27000 M^{-1}$ ), während die P1- und P2-Serie höhere Bindungswerte aufweisen. Innerhalb der P1-Serie nimmt die Bindungsaffinität zu ConA von P1-10 bis P1-80 mit zunehmender Seitenkettenzahl zu (von  $K_A = 108.000 M^{-1}$  bis  $697.000 M^{-1}$ ). Mit zunehmender Seitenkettenzahl steigt die Anzahl der Zucker pro Polymerkette. Der gleiche Effekt ist bei der P2-Serie zu beobachten. Das Hinzufügen eines sterischen Schildes an das Ende der Glykoseitenketten unter Verwendung eines EDS-Pentamerblocks (EDS<sub>5</sub>-Schild) führt jedoch erwartungsgemäß zu einer Abnahme der Bindungsaffinität. Der EDS<sub>5</sub>-Schild sorgt für eine sterische Abschirmung und erschwert so die Bindung des Lektins am Glykopolymer. Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass die Zucker die näher am Backbone liegen schlechter das Lektin erreichen können.

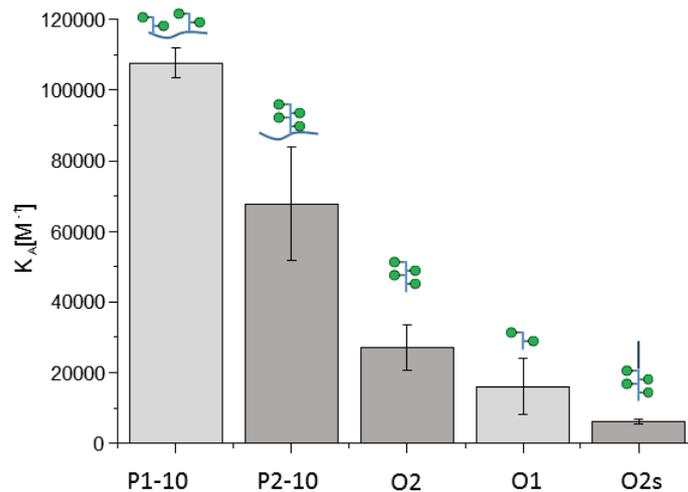


Abbildung 34: Vergleich der  $K_A$ -Werte von Strukturen die vier Zucker tragen (mit Ausnahme von O1).

Abbildung 34 vergleicht alle Strukturen, die vier Zuckereinheiten tragen (mit Ausnahme von O1). Obwohl O1 halb so viele Zucker trägt wie O2s, besitzt das mit EDS<sub>5</sub> abgeschirmte tetravalente Oligomer O2s die niedrigste Bindungsaffinität. Dies lässt sich mit der Annahme erklären, dass der EDS-Schild die Zucker weniger zugänglich macht.<sup>215-217</sup> Unter den Oligomeren besitzt das tetravalente Oligomer O2 den höchsten  $K_A$ -Wert, da es die höchste Menge an ungeschirmten Zucker aufweist. Im Vergleich zu O2 besitzt das P1-10, mit zwei divalenten Seitenketten, eine 4-mal höhere Bindungsaffinität, während P2-10, mit einer tetravalenten Seitenkette 2.5-mal stärker an ConA bindet. Dies lässt sich dadurch erklären, dass P1-10 mit zwei Seitenketten die Fähigkeit haben könnte, zwei Bindungstaschen des Lektins (*Statistical Rebinding*) oder zwei Rezeptoren (*Clustering*) zu erreichen. O2 scheint zu klein sein, um gleichzeitig zwei verschiedene ConA-Bindungstaschen oder zwei Rezeptoren zu erreichen, und profitiert daher nur vom *Statistical Rebinding* Effekt. In ähnlicher Weise scheint P2-10 nur einem statistischen Effekt und nicht von möglichen Chelat- oder Cluster-Effekten zu profitieren. Interessanterweise zeigt es dennoch eine höhere Affinität als das tetravalente Oligomer. Es ist denkbar, dass hier die zusätzliche Einbringung des Polymergerüsts die Bindung am Lektin positiv beeinflusst, etwa durch die Stabilisierung der Ligand-Rezeptor-Komplexe gegenüber konkurrierenden Liganden.

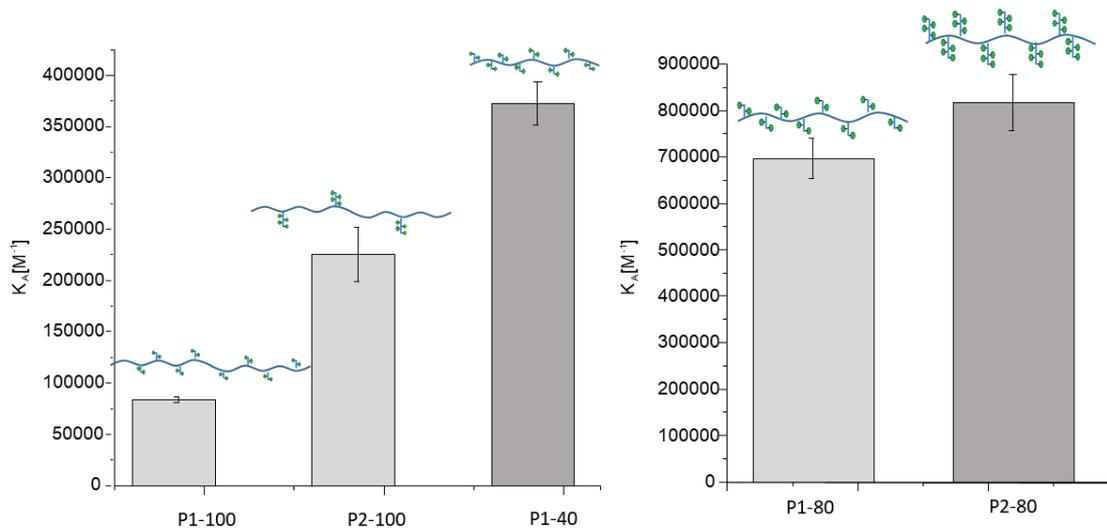


Abbildung 35: Vergleich von Polymeren mit einem Zuckergehalt von 12-15 (links) und Vergleich von P1-80 mit P2-80 (rechts).

Abbildung 35 zeigt die  $K_A$ -Werte von P1-80 und P2-100, Polymere mit gleicher Seitenkettenzahl (rechts), sowie von P1-40, P1-100mer und P2-100mer, Polymere mit ähnlicher Anzahl an Mannoseeinheiten (links). P1-40 und P1-100mer tragen beide 15 Zucker und die gleiche Anzahl von Seitenketten, besitzen jedoch eine unterschiedliche Kettenlänge. Das kürzere Polymer P1-40 weist eine 4.4-mal höhere Bindung auf, was auf die höhere Zuckerdichte zurückgeführt werden kann, die hier vorteilhaft für die Bindung am Lektin ist. Es wird davon ausgegangen, dass beide Polymere vom *Chelat-Effekt* profitieren, jedoch wird vermutet, dass das kürzere P1-40 Polymer durch eine höhere Dichte an Seitenketten zusätzlich einen stärkeren *Statistical Rebinding* Effekt aufweist.

Um die Frage zu beantworten, ob längere multivalente Seitenketten oder eine größere Anzahl an Seitenketten am Polymer die Bindung an Lektinen stärker begünstigt, werden P1-100 und P2-100 verglichen. P2-100 besitzt tetravalente Seitenketten, während P1-100 divalente Seitenketten trägt. P1-100 und P2-100 tragen die gleiche Gesamtzahl an Zuckerliganden, aber verteilt auf eine unterschiedliche Anzahl an Seitenketten. P1-100 trägt kürzere Seitenketten, aber in einer größeren Anzahl. P2-100mer besitzt ein  $K_A$  von  $225.000 M^{-1}$ , während P1-100mer ein  $K_A$  von  $84.000 M^{-1}$  aufweist. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung am Rezeptor stärker durch die Valenz der Seitenkette beeinflusst wird und es günstiger ist weniger Seitenketten aber mit höherer Anzahl an Zuckern einzuführen. Im Vergleich hierzu zeigt jedoch P1-40 einen noch höheren  $K_A$ -Wert (Abbildung 35). Dies führt zu der Annahme, dass bei Systemen mit niedriger Zuckerdichte, wie bei P1-100 und P2-100, lange Seitenketten für die Lektinbindung von Vorteil sind. Steigt die Zuckerdichte und rücken die Seitenketten in einem Molekül mit geringerer Kettenlänge enger zusammen, verliert die Seitenkettenlänge an Bedeutung.

Eine andere Möglichkeit des Vergleichs bieten die Polymere P1-80 und P2-80: sie besitzen die gleiche Anzahl an Seitenketten so wie die gleiche Kettenlänge. Allerdings unterscheiden sich die Seitenketten in ihrer Valenz. Folglich besitzt P2-80 doppelt so viele Zucker wie P1-80. Die Abbildung zeigt, dass P2-80 mit längeren Seitenketten und höherer Gesamtvalenz nicht signifikant stärker bindet. Es wird davon ausgegangen, dass Zuckerliganden, die näher am Polymerrückgrat positioniert sind, einen geringeren Beitrag zur Bindung leisten, da sie für Wechselwirkungen mit dem Protein schlechter zugänglich sind. Dies wird ebenfalls durch P1s und P2s bestätigt. Hier sorgt die Einführung des EDS<sub>5</sub>-Blocks zu einer Abschirmung der näher am Rückgrat positionierten Liganden und verursacht eine geringere Bindung.

Es konnten somit verschiedene Effekte der Struktur der Glykokamppolymere auf ihre Bindungsaffinität an ConA festgestellt werden. Neben der Beeinflussung der Affinität ist auch die Frage nach der Selektivität, also die Bindung an unterschiedlichen Mannose erkennende Rezeptoren von Interesse. Um diese Effekte genauer zu untersuchen und potentielle Unterschiede zwischen Lektinen zu analysieren, wurden ausgewählte Strukturen an die Arbeitsgruppe von Dr. Remzi Becer an der Queen Mary University of London (School of Engineering and Materials Science) geschickt. Dort wurden von Alessandra Monaco und Dr. Gokhan Yilmaz SPR-Studien an verschiedenen Lektinen durchgeführt. Ein in dieser Studie verwendetes Lektin ist DC-SIGN. Ähnlich wie ConA ist auch DC-SIGN ein Tetramer und besitzt vier Bindungstaschen.<sup>48,49</sup> Es bindet einerseits an N-verknüpfte Oligosaccharide mit hohem Mannosegehalt sowie andererseits an verzweigte fucosylierte Oligosaccharide<sup>48</sup>. Ein weiteres Protein, welches im Rahmen dieser Studie verwendet wurde, ist MBL. Als typisches C-Typ Lektin kann MBL in Gegenwart von Calcium über mehrere CRDs an Oligosaccharide binden.<sup>51</sup> Da MBL zum angeborenen Immunsystem vieler Säugetiere gehört, ist es ein häufig untersuchtes Lektin. Es bindet an Mannose, N-Acetyl-Glucosamin während es aus sterischen Gründen nicht an Galactose bindet.

In Abbildung 36 werden die SPR-Resultate der ausgewählten Strukturen mit den Lektinen ConA, MBL und DC-SIGN verglichen. Um insbesondere den Effekt der Architektur auf die Selektivität der Bindung zu studieren, wurde zusätzlich ein lineares Polymer mit Mannose-Seitenketten hergestellt. Hierfür wurde das p(PFPA) mit einem Polymerisationsgrad von 40 Einheiten, mit einem aminfunktionalisierten Mannose-Derivat (hergestellt von Fawad Jacobi) umgesetzt. Die für die SPR-Messungen verwendeten Strukturen sind in Tabelle 16 aufgelistet.

Tabelle 16: Strukturen verwendet für die SPR-Studien an verschiedenen Lektinen und die erhaltenen Bindungsstärken ermittelt aus den Direkt-Bindungs-Assays mit ConA, MBL und DC-SIGN.

Oligomer	N(Man)		Con A $K_a [M^{-1}] \times 10^4$	MBL $K_a [M^{-1}] \times 10^4$	DC-SIGN $K_a [M^{-1}] \times 10^4$
O1	2		$1,6 \pm 0,4$	8,5	1,5
O2	4		$2,7 \pm 0,3$	12,6	2,2
Polymer	N(sidechains) <sup>a</sup>	N(Man) <sup>a</sup>	Con A $K_a [M^{-1}] \times 10^4$	MBL $K_a [M^{-1}] \times 10^4$	DC-SIGN $K_a [M^{-1}] \times 10^4$
1-P1	-	40	$14 \pm 0,1$	156,7	32,6
P1-10	2	4	$10,8 \pm 0,2$	21,8	3,8
P1-40	7-8	15	$37 \pm 1$	58,3	17,6
P1-100mer	7-8	15	$8,4 \pm 0,1$	29,5	8,8
P2-10	1	4	$6,8 \pm 0,8$	18,7	5,0
P2-40	12-13	50	$49 \pm 1$	105,9	36,3
P2-100mer	3	12	$23 \pm 1$	23,3	5,4

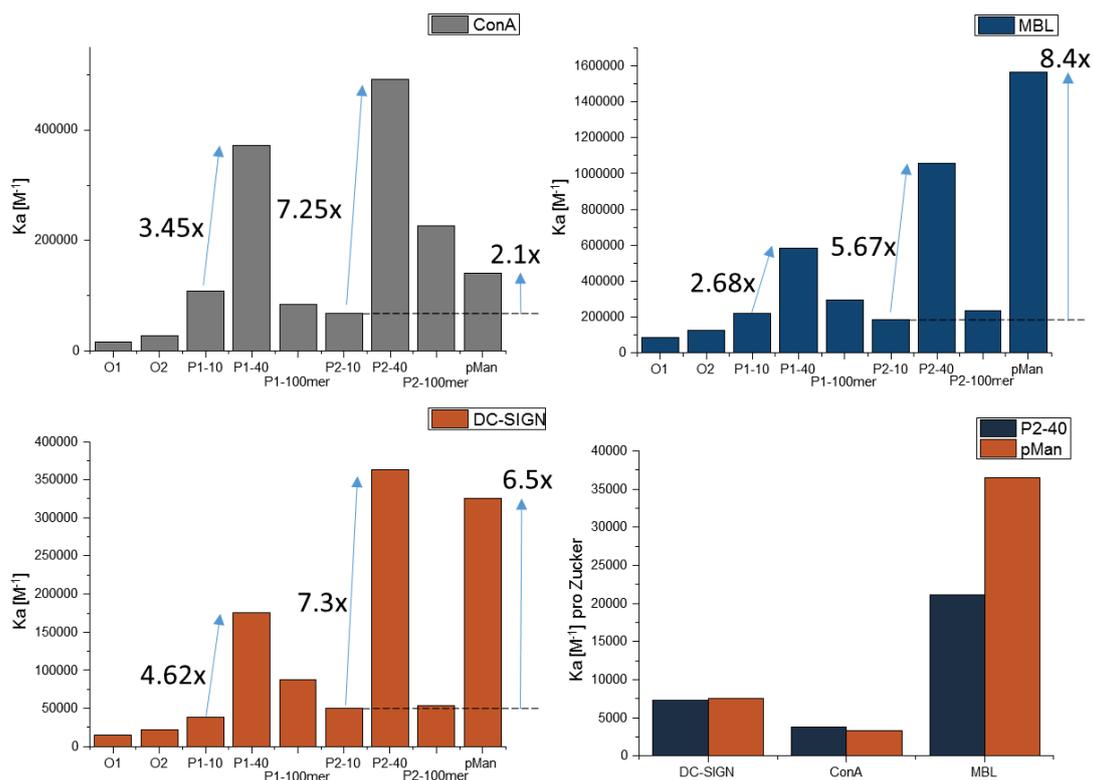


Abbildung 36: SPR-Resultate von ausgewählten Strukturen an ConA, MBL und DC-SIGN.

Allgemein kann festgehalten werden, dass für alle Glykooligo- und polymere sowie die drei untersuchten Rezeptoren bei steigender Valenz eine erhöhte Bindung beobachtet wurde. Diese Zunahme der Bindungsstärke korreliert jedoch nicht linear mit der Zunahme der Valenz. Vergleicht man P1-10 und P1-40, so steigen die  $K_A$ -Werte mit steigender Valenz von P1-10 (4 Zucker) zu P1-40 (15

Zucker) von DC-SIGN um 4,6, ConA bindet 3.5-mal besser und MBL lediglich 2.3-mal besser an das höher valente P1-40. Dies deutet bereits daraufhin, dass die unterschiedlichen Lektine unterschiedliche stark von den strukturellen Variationen der Kammpolymere profitieren. Dieser Effekt wird durch den Vergleich der Zunahme der Bindungsaffinität von P2-10, P2-40 und pMan noch deutlicher. P2-10 und pMan tragen bis zu 12-mal mehr Zuckerliganden als P2-10. Während P2-10 diese Zucker auf Seitenketten präsentiert, verteilt pMan die Zucker entlang des Polymerrückgrats. Die Erhöhung der Bindung von P2-10 auf P2-40 ist für ConA etwa 7.3, während die Bindung für das lineare pMan nur 2-mal höher ist. Ähnlich wie bei ConA beträgt die Erhöhung der Bindung für DC-SIGN von P2-10 auf P2-40 den Faktor 7.3, während sich für das lineare Polymer die Bindung etwas weniger um den Faktor 6.5h erhöht. Nur MBL hat einen höheren Bindungsanstieg in Bezug auf die lineare Struktur pMan.

Tabelle 17:  $K_a$ -Werte normiert auf die Zuckerzahl für die Glykopolymere ermittelt durch SPR Direkt-Bindungs-Assay an ConA, MBL und DC-SIGN.

Polymer	N(sidechains) <sup>a</sup>	N(Man) <sup>a</sup>	Con A	MBL	DC-SIGN
			$K_a/\text{Man} [\text{M}^{-1}] \times 10^3$	$K_a/\text{Man} [\text{M}^{-1}] \times 10^4$	$K_a/\text{Man} [\text{M}^{-1}] \times 10^3$
<b>1-P1</b>	-	40	3,5	3,9	8,2
<b>P1-10</b>	2	4	27	5,4	9,5
<b>P1-40</b>	7-8	15	24,7	3,9	11,7
<b>P1-100mer</b>	7-8	15	56	2,0	5,9
<b>P2-10</b>	1	4	17	4,7	12,5
<b>P2-40</b>	12-13	50	9,8	2,1	7,3
<b>P2-100mer</b>	3	12	19,2	1,9	4,5

Wird die Affinität auf die Anzahl der Zucker normiert (siehe Tabelle 17), fällt auf, dass bei P2-40 und pMan die Affinität pro Zucker für die Bindung an DC-SIGN und an ConA ähnlich ist. Bei der Bindung an MBL hingegen zeigt sich eine deutlich erhöhte Bindung pro Mannose für das lineare Polymer. Dies deutet daraufhin, dass DC-SIGN und insbesondere ConA kammartige Glykopolymere für die Bindung bevorzugen, während MBL besser an lineare Strukturen bindet.

### 3.4.2 Bindungsstudien am humanen Papillomavirus

Die zuvor beschriebenen sulfatisierten Glykokammpolymere wurden am Institut für Zelluläre Virologie in Münster in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mario Schelhaas in einem geeigneten HP-Viren Assay von Julia Racho untersucht. Hierbei wurden zunächst Addon-Experimente durchgeführt,<sup>218</sup> um die

Bindung von HPVs an verschiedene GAGs durch ihre relative Infektion zu beurteilen. Abbildung 37 zeigt schematisch den durchgeführten Addon-Assay. Dieser kann in drei Teile unterteilt werden: Zunächst wird der zu untersuchende Virus mit dem bindenden Polymer gemischt. Durch die Bindung des Polymers an den Virus kann dieser nicht mehr an die Ziel-Zelle binden. Im zweiten Schritt wird nun die Inkubationsmischung über die zu untersuchenden Zellen gegeben, sodass durch die inhibitorische Wirkung des Polymers weniger Virus an die Ziel-Zellen binden sollte. Die infizierten Zellen exprimieren GFP und können so von den nicht infizierten unterschieden werden. Dadurch kann eine inhibitorische Wirkung des Polymers quantifiziert werden.

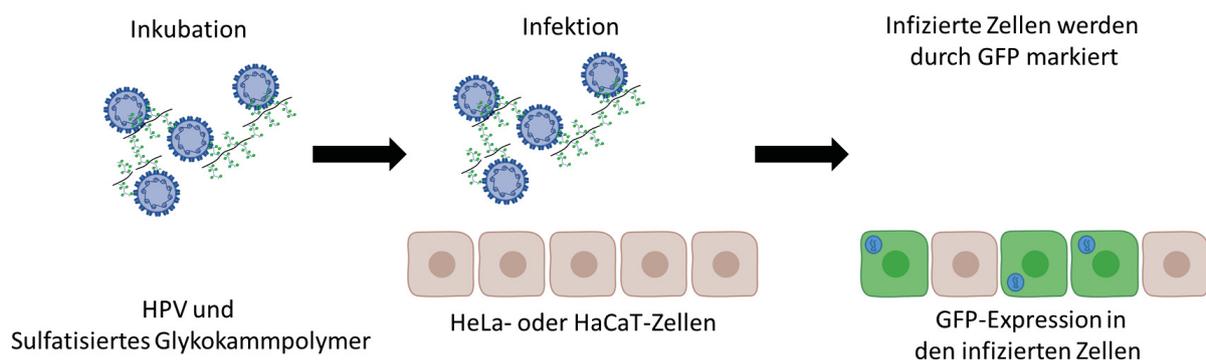


Abbildung 37: Schematische Darstellung des Addon-Assays am HPV und HeLa oder HaCaT-Zellen.

Abbildung 38 vergleicht die inhibitorische Wirkung der drei verwendeten Polymere. Hierbei dient Heparin als Kontrolle, die den Virus effektiv inhibieren und strukturell aktivieren kann. Tabelle 18 zeigt die sulfatisierten Polymere, die am HPV getestet wurde. Eine genaue Bestimmung des Sulfatisierungsgrades konnte nicht durchgeführt werden.

Tabelle 18: Sulfatisierte Glykokamppolymere als Inhibitoren von HPV.

Name	D <sup>b</sup>	Mn [g/mol] <sup>b</sup>	N Seitenketten <sup>a</sup>	N Zucker <sup>b</sup>	N Zucker <sup>a</sup>
P1Neg <sub>50mer</sub>	1.01	6.409	-	-	-
P1-40	1.03	20.780	15	21	15
P2-40	1.10	38.500	12-13	46	50

<sup>a</sup> Bestimmt mittels <sup>1</sup>H-NMR

<sup>b</sup> Bestimmt mittels Wasser-GPC (mit einer Flussrate von 0.5 mL/min)

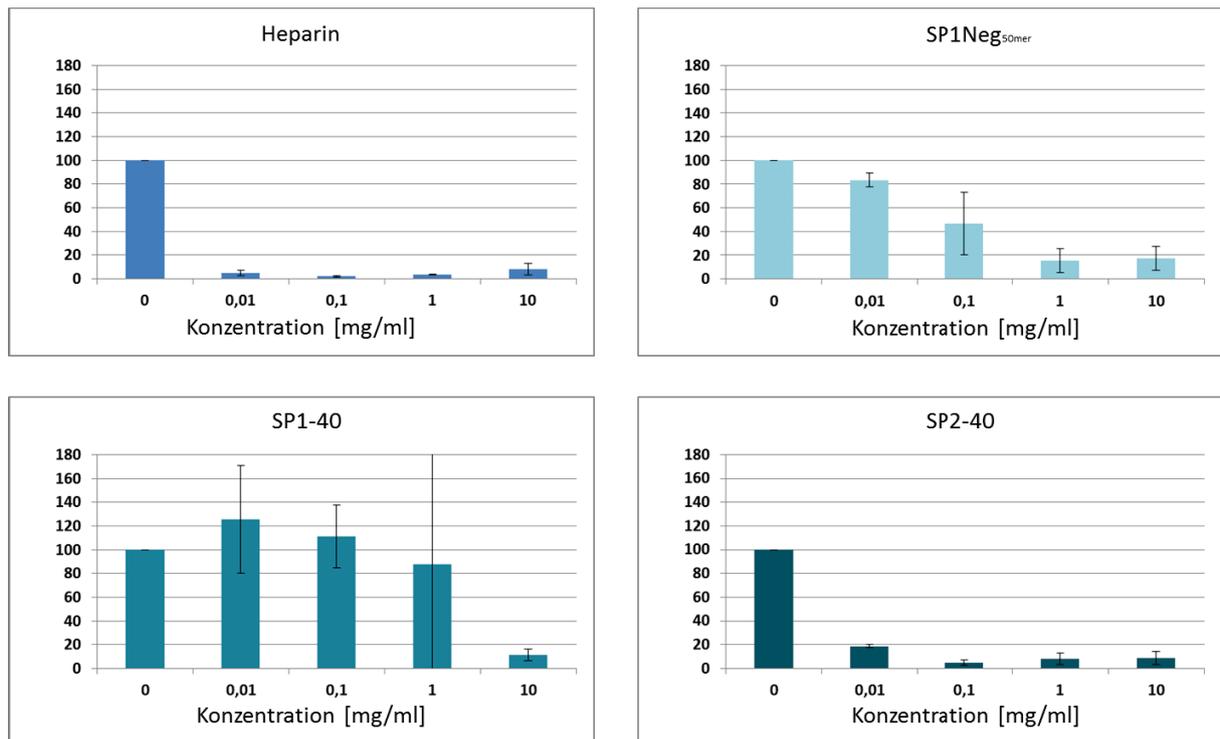


Abbildung 38: Addon Experimente von HPV auf HaCaT-Zellen mit Heparin, P1Neg<sub>50mer</sub>, SP1-40 und SP2-40.

Das Addon-Experiment zeigt erwartungsgemäß eine effektive Inhibierung des Virus durch Heparin. Als Negativkontrolle wurde Poly(hydroxyethylacrylamid) sulfatisiert (P1Neg<sub>50mer</sub>). Die Negativkontrolle P1Neg<sub>50mer</sub> scheint ebenfalls den Virus inhibieren zu können. Es wird vermutet, dass die negative Ladung ausreicht, um an den Virus zu binden und es keines Zuckermotivs bedarf. Allerdings ist die inhibitorische Wirkung schwächer als bei Heparin. Das Polymer mit den divalenten Seitenketten SP1-40 scheint schwächer an das Virus zu binden als die Negativkontrolle P1Neg<sub>50mer</sub>, während das Polymer mit den tetravalenten SP2-40 am stärksten an den Virus bindet. SP1-40 und P1Neg<sub>50mer</sub> binden demnach schlechter an den Virus.

Um nun zu untersuchen ob die sulfatisierten Polymere zusätzlich zur Bindung am Virus ebenfalls eine Strukturänderung verursachen können, wurden von Julia Racho sogenannte Seedover-Experimente durchgeführt. Diese Strukturänderung am HPV ist essentiell für das Fortschreiten der Infektion.<sup>206-209</sup> So bindet beispielsweise Chondroitinsulfat am HPV-16, verursacht jedoch nicht die für die Infektion notwendige Strukturveränderung, während Heparin diese verursacht.<sup>219,220</sup> Der Verlauf des durchgeführten Seedover-Experiments ist in Abbildung 39 schematisch dargestellt.

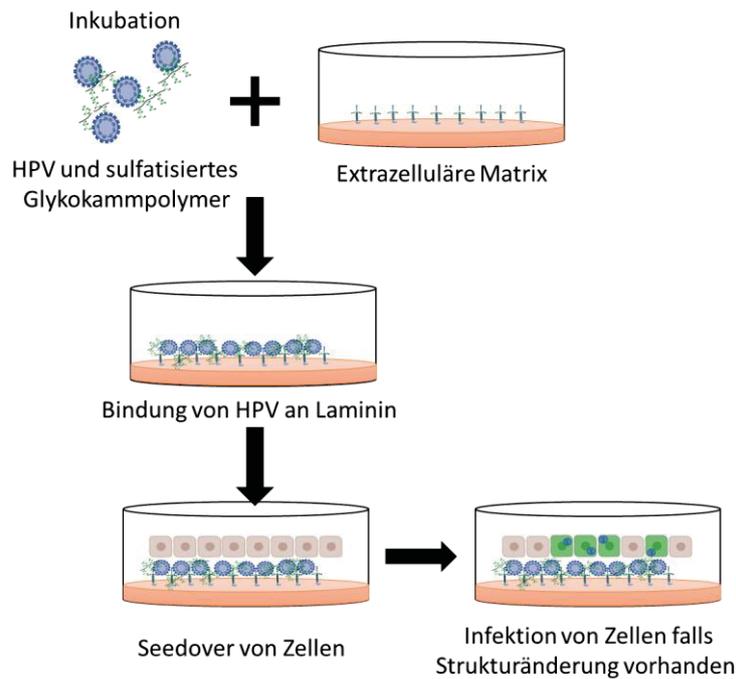


Abbildung 39: Schematische Darstellung des Ablaufes eines Seedover-Experiments.<sup>221</sup>

Im ersten Schritt wurde der Virus mit dem zu untersuchenden Polymer für 1h inkubiert. Diese Mischung wurde über ein Platte mit extrazellulärer Matrix geführt, sodass der Virus an das Protein (Laminin 332) bindet. Im zweiten Schritt wurden nun HaCaT-Zellen auf das Medium mit dem Virus gegeben. Hierbei wurde eine Messreihe, mit  $\text{NaClO}_3$  behandelten Zellen und eine Messreihe mit unbehandelten Zellen verwendet. Folglich tragen die präparierten Zellen keine Sulfate mehr, sodass diese nur infiziert werden können, wenn eine Strukturänderung durch das hinzugegebene Polymer stattgefunden hat. Im letzten Schritt werden die infizierten Zellen durch das gebildete GFP-Protein identifiziert und quantifiziert. Abbildung 40 zeigt die Ergebnisse des Seedover-Experiments.

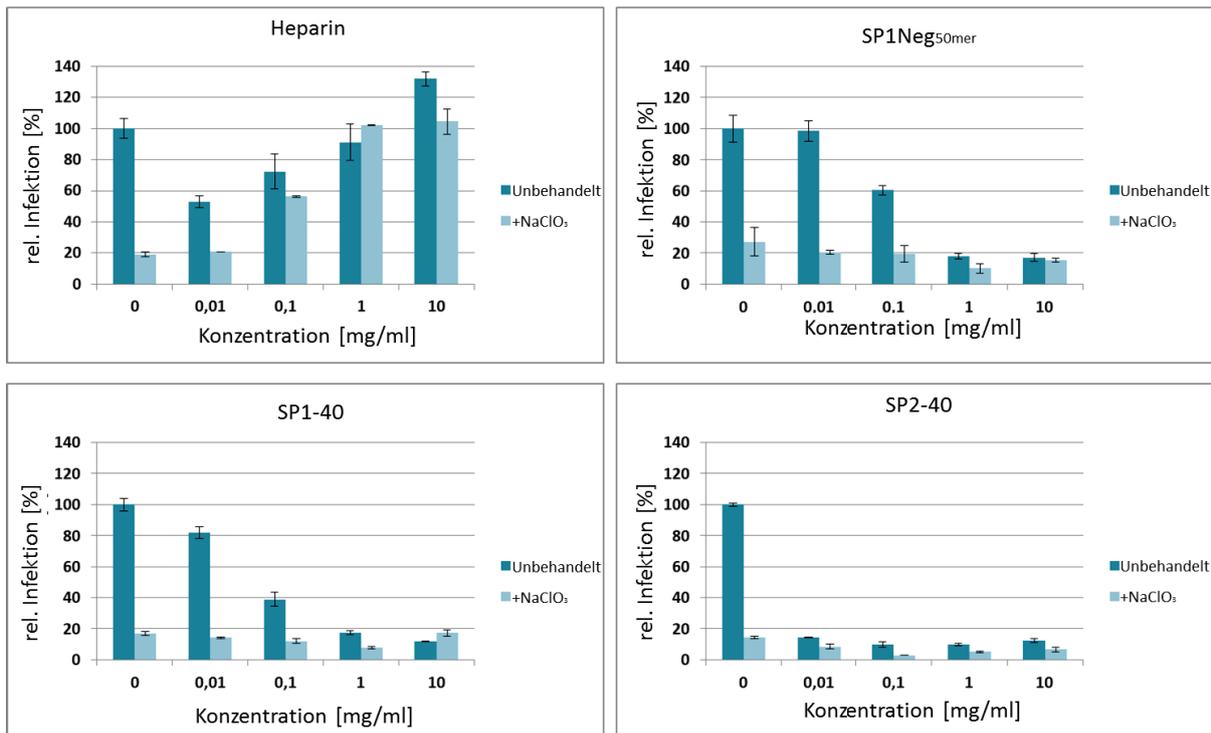


Abbildung 40: Ergebnisse des Seedover-Experiments für Heparin, P1Neg<sub>50mer</sub>, P1-40 und P2-40.

Heparin dient, ähnlich wie beim Addon-Experiment, als Kontrolle. Bei den unbehandelten Zellen wurde die Infektionsrate ohne Heparin auf 100% normiert. Inkubiert man den Virus mit Heparin so fällt auf, dass bei den unbehandelten Zellen zunächst die Infektionsrate sinkt und mit steigender Konzentration an Heparin steigt. Hierbei kann die notwendige Strukturänderung einerseits durch das hinzugefügte Heparin oder durch das Heparin auf der Zelloberfläche andererseits stattfinden. Bei den mit NaClO<sub>3</sub> behandelten Zellen kann die für die Infektion notwendige Strukturänderung nur durch das hinzugefügte Heparin stattfinden. Somit steigt erwartungsgemäß bei den behandelten Zellen die Infektionsrate stetig mit der hinzugegebenen Heparin Konzentration.

Die Infektionsrate bei den unbehandelten Zellen sinkt nach der Zugabe der synthetisierten Polymere. Dies wird durch die Bindung an die Rezeptoren erklärt und somit auf eine inhibitorische Wirkung der Polymere zurückgeführt, da diese keine Strukturänderung hervorrufen. Erwartungsgemäß sinkt bei den unbehandelten Zellen die Infektionsrate bei SP2-40 am stärksten, da im Addon-Experiment bereits festgestellt wurde, dass dieses Polymer am stärksten an den Virus bindet. Bei den mit NaClO<sub>3</sub> behandelten Zellen wird bei keinem Polymer eine Steigerung der Infektionsrate erkannt, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Polymere keine Strukturänderung hervorrufen.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Synthese von Glykokamppolymeren mit sequenzdefinierten, monodispersen und multivalenten Seitenketten und ihr Einsatz als Glykomimetika zur Bindung an zuckererkennenden Proteinen. Durch Variation und hohe Kontrolle der Struktur der erhaltenen Polymere sollten erste Aussagen über die Struktur-Funktion-Korrelation von kammartigen im Vergleich zu linearen Glykopolymeren getroffen werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurden daher verschiedene divalente und tetravalente sequenzdefinierte Glykooligomere mittels Festphasensynthese hergestellt. Hierfür wurden zwei zuvor etablierte Bausteine verwendet. Als funktioneller Baustein diente TDS, welcher durch seine Dreifachbindung eine Konjugation von Azid-tragenden Liganden ermöglicht, während EDS als hydrophiler *spacer* Baustein diente, welcher die Möglichkeit gibt die Distanz der Liganden am Polymerrückgrat zu variieren. Die resultierenden Oligomere wurden mit Azid funktionalisierter Mannose in einer Kupfer(I) katalysierten Azid-Alkin-Konjugation (CuAAC) zum Glykooligomer umgesetzt und vom Harz gespalten. Somit wurden vier verschiedene Glykooligomere verschiedener Kettenlänge und Valenzen synthetisiert (siehe Abbildung 41).

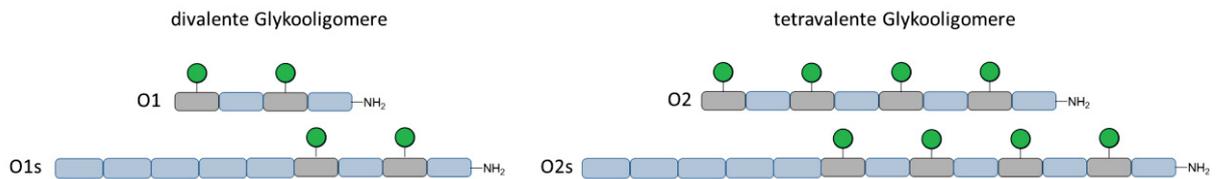


Abbildung 41: Divalente und tetravalente Glykooligomere synthetisiert mittels Festphasensynthese, bestehend aus TDS und EDS.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden diese Glykooligomere dann mittels *grafting-through* und mittels *grafting-to* Copolymerisation Glykokamppolymeren umgesetzt. Für die *grafting-through* Polymerisation wurde zu diesem Zweck *N*-Acryloyl-6-Aminohepcansäure synthetisiert und an der Festphase am endständigen EDS Baustein mittels 5 eq. PyBOP und 10 eq. DIPEA angebracht. Das resultierende Makromonomer wurde in verschiedenen Verhältnissen mit 2-Hydroxyethylacrylamid (HEAm) copolymerisiert. Hierbei wurden Glykokamppolymeren mit einem maximalen Einbau von 15% an Glykooligomer erhalten. Bei Ansätzen mit einem theoretischen Einbau von mehr als 15% wurden stets Polymergemische, erkenntlich durch ein bimodales System in der Wasser-GPC (siehe Abbildung 22), erhalten. Um größere Einbauten an Seitenketten zu erhalten, wurde daher im Folgenden ein alternativer *grafting-to* Ansatz gewählt. In diesem Zusammenhang wurden zunächst nach Literaturvorschrift mittels RAFT-Polymerisation von Pentafluorphenylacrylat in Benzol, in Anwesenheit von Azobis(isobutyronitril) und Benzylsulfanylthiocarbonylsulfanylpropionsäure (BSPA),

zwei Polyaktivester mit einer Kettenlänge von 40 bzw. 92 Wiederholungseinheiten synthetisiert. Anschließend wurden die Polyaktivester in verschiedenen Anteilen mit den Amin-terminierten Glykooligomeren umgesetzt um eine erste Bibliothek von Glykokamppolymeren zu erhalten. Zusätzlich wurde ein von Fawad Jacobi synthetisiertes Mannose-Amin Derivat genutzt um durch Konjugation an den Polyaktivester ein lineares Glykopolymer herzustellen (siehe Abbildung 42). Mittels der Umsetzung von Ethanolamin wurde Poly(2-Hydroxyethylacrylamid) als Negativkontrolle für spätere Bindungsassays erhalten.

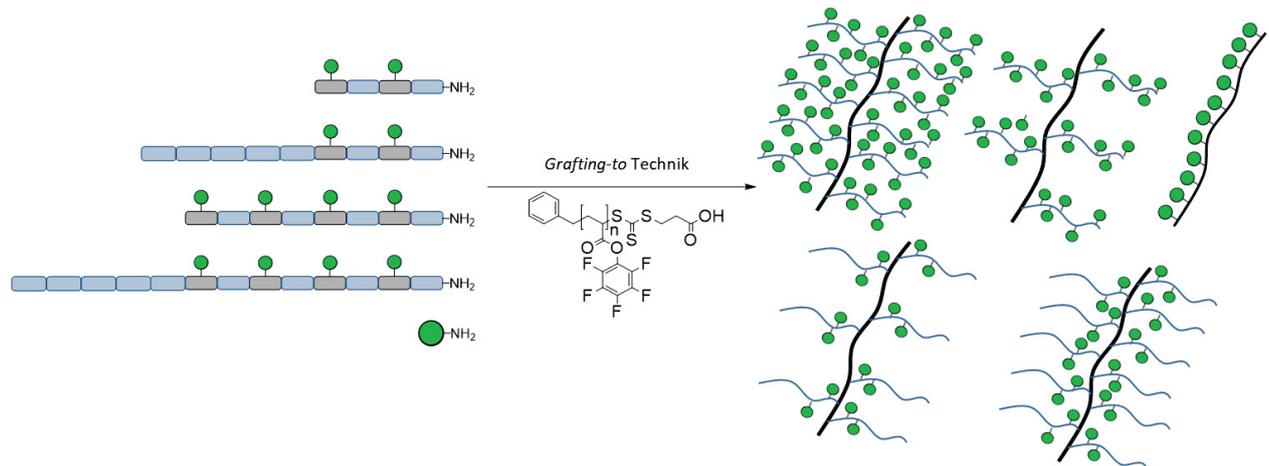


Abbildung 42; Synthese von verschiedenen Glykokamppolymeren mittels grafting-to Polymerisation.

Die erhaltenen Polymere unterscheiden sich somit in der Kettenlänge des Polymerbackbones, dem Anteil der Glykooligomer Seitenkette sowie der Valenz der Seitenketten. Für Untersuchungen zur Rolle von sterischer Abschirmung der bindenen Zuckerliganden wurden zudem Glykooligomere mit einem zusätzlichen Block aus 5 EDS Bausteinen synthetisiert und zu Glykokamppolymeren umgesetzt.

Mit den erhaltenen Glykopolymeren wurden dann verschiedene Studien zur biologischen Aktivität durchgeführt. In eigenen Studien und gemeinsam mit der Arbeitsgruppe von C. R. Becer wurden mittels SPR Bindungsstudien an den Lektinen ConA, DC-SIGN und MBL durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen einen Einfluss verschiedener strukturelle Parameter und insbesondere die Architektur der Glykopolymeren auf deren Affinität und Selektivität. Erwartungsgemäß zeigten alle Strukturen eine Steigerung der Bindungsstärke mit steigender Valenz für die drei untersuchten Lektine. Eine größere Kettenlänge bei gleicher Valenz zeigte ebenfalls einen Anstieg der Affinität. Bei Glykopolymeren mit ähnlicher Anzahl an Seitenketten, aber unterschiedlicher Valenz in den Seitenketten wurde eine ähnliche Affinität beobachtet. Dies deutet daraufhin, dass die Zugänglichkeit der Liganden für eine Bindung am Protein von ihrer Position im Polymer abhängt. Tatsächlich wird das durch die deutlich reduzierte Bindungsstärke der mit sterische-abschirmenden Blöcken versehenen Strukturen bestätigt. Eines der wichtigsten Ergebnisse der Arbeit ist der Einfluss der Polymerarchitektur auf die Selektivität

der Bindung: Während das lineare Glykopolymer stärker an MBL bindet, scheinen ConA und DC-SIGN die kammartigen Strukturen zu bevorzugen.

Um den Effekt der sterischen Hinderung genauer zu untersuchen und zu nutzen, um etwa schaltbare Systeme zu synthetisieren, die ihre biologische Aktivität erst am Zielort aktivieren können, wurden Glykokamppolymere mit Glykooligomer Seitenketten und zusätzlichen PEG bzw. pNIPAM Seitenketten synthetisiert. Die Struktur mit pNIPAM Seitenketten wies ein thermo-responsives Verhalten bei 33°C auf. Diese Strukturen werden zurzeit von Tanja Paul und Dimitri Wilms auf ihre biologischen Eigenschaften in einem geeigneten Bakterien-Assay untersucht.

Um den Einfluss von geladenen Glykokamppolymeren genauer zu untersuchen, wurden zwei ausgewählte Strukturen, ein Kamppolymer mit divalenten und eines mit tetravalenten Seitenketten, von Sebastian Bauer mittels einer von ihm etablierten Methode sulfatisiert. Als Vergleichsprobe wurde zudem Poly(2-Hydroxyethylacrylamid) unter gleichen Bedingungen sulfatisiert. Die so erhaltenen sulfatisierten Glykokamppolymere bzw. linearen Polymere wurden im Anschluss von Julia Racho am Lehrstuhl von Prof. Dr. Mario Schelhaas in geeigneten Bio-Assays am Human Papillom Virus (HPV) getestet. Hierbei ergab sich, dass sowohl das lineare sulfatisierte Polymer als auch das Glykokamppolymer mit tetravalenten Seitenketten HPV inhibieren können. Dabei erwies sich das sulfatisierte Glykokamppolymer als wesentlich effektiverer Inhibitor als das lineare, nicht-zuckerfunktionalisierte Derivat. Dies könnte am höheren Sulfatisierungsgrad liegen. Interessanterweise erwies sich das sulfatisierte Glykokamppolymer mit divalenten Seitenketten, trotz höherem Sulfatisierungsgrad als ein schlechterer Inhibitor im Vergleich zum linearen Derivat. In einem sogenannten Seedover-Assay wurden die synthetisierten Strukturen getestet, ob sie eine Konformationsänderung am Virus zu verursachen. Es wurde jedoch kein Effekt der getesteten Strukturen beobachtet.

Die mittels Festphasensynthese (SPS) synthetisierten sequenzdefinierten Glykooligomere bilden die Grundlage der Glykokamppolymere. Sie wurden aus Bausteinen synthetisiert, die in mehrstufigen Syntheserouten hergestellt werden. Um die Sequenzkontrolle während des SPS zu gewährleisten werden diese Bausteine in einem großen Überschuss eingesetzt. Dieser Überschuss wird in der Regel im Lösungsmittelabfall entsorgt. Um Ressourcen und Kosten zu sparen, wurden gemeinsam mit Prof. Dr. Nicole Snyder zwei Methoden entwickelt, die eingesetzten Bausteine sowie Zuckerderivate zurückzugewinnen. In der ersten Methode wurden die Bausteine EDS, TDS, ADS sowie die Fmoc-geschützten Aminosäuren Lysin und Phenylalanin erfolgreich in hoher Reinheit und Ausbeute zurückgewonnen. In der zweiten Methode wurden für die Festphase geeignete Azid-Derivate von Lactose, Glucosamin und Mannose direkt nach dem Kuppeln an der Festphase aufgesammelt und ebenfalls in hoher Reinheit und Ausbeute zurückgewonnen. Es konnte gezeigt werden, dass aus den

recyclten Bausteinen neue Makromoleküle an der Festphase in hoher Reinheit und Ausbeute synthetisiert werden können. Die Rückgewinnung der Bausteine hilft somit, die Festphasensynthese ökonomischer zu machen und könnte in Zukunft auch auf andere Bausteine, etwa in der Synthese sequenzkontrollierter Polymere oder Glykopeptide, erweitert werden.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit, anhand einer Kombination aus Festphasensynthese und *grafting* Polymerisation, eine effiziente Synthesestrategie zur Herstellung von Glykokamppolymeren mit sequenzdefinierten und monodispersen Seitenketten entwickelt werden. Erste Schlüsse auf die Korrelation zwischen Struktur und Bindungsverhalten der synthetisierten Makromoleküle wurden anhand geeigneter SPR-Assays an ConA, DC-SIGN und MBL bestätigt. Es zeigt sich, dass kammartige Glykopolymere eine wichtige Klasse der Glykomimetika darstellen, die mit den hier entwickelten Methoden der Bausteinrückgewinnung und Kombination aus Festphasen- und Polymersynthese nun erstmalig mit höherer Präzision zugänglich sind.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Materialien

Dimethylsulfoxid (DMSO) ( $\geq 99.9\%$ ), 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (DMPA) (99%), Diethylether (mit BHT,  $\geq 99.8\%$ ), triisopropylsilan (TIPS) (98%), (+)-Natrium-L-ascorbat ( $\geq 99.0\%$ ), Magnesium(II)chlorid Tetrahydrate ( $\geq 99\%$ ), Tetrahydrofuran (p.a.) und Natriumsulfat (p.a.) wurden von *Sigma-Aldrich* gekauft. N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA) ( $\geq 99\%$ ), Glycin ( $\geq 99\%$ ) und tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP) ( $\geq 98\%$ ) wurden von *Carl Roth* gekauft. Methanol (100%), Hexan (89%), Ethylacetat (100%) und Acetanhydrid (99.7%) wurden von *VWR BDH Prolabo Chemicals* gekauft. Dimethylformamid (DMF) (99.8%, for peptide synthesis), Piperidin (99%) und Kupfer(II)sulfat (98%) wurden von *Acros Organics* gekauft. Dichloromethan (DCM) (99.99%), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES) (99%), Natriumhydrogencarbonat (p.a.) und Kaliumcarbonat (99.6%) wurden von *Fisher Scientific* gekauft. Concanavalin A wurde von LKT Laboratories gekauft. Calciumchlorid ( $\geq 97\%$ ), Triethylamin (99.5%) und Natriumazid (rein) wurden von AppliChem gekauft. Trifluoroessigsäure (TFA) (99%) wurde von Fluorochem gekauft. N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-phenylalanin (98%) und N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-leucin (98%), Cysteamin dihydrochlorid und Amin terminiertes Poly(N-isopropylacrylamid) (Mn: 2500 g/mol) wurden von *Sigma-Aldrich* gekauft. Tentagel S RAM (Rink Amide) und TentaGel PAP wurden (Beladung von 0.23 mmol/g) von *Rapp Polymere* gekauft. Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (>99%), Oxalylchlorid (98%) wurden von *Alfa Aesar* gekauft. Ethanolamin, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC), N-Hydroxysuccinimid, Natriumhydroxidlösung (5 Molare Lösung) und SPR Sensorchips C1 wurden von GE Healthcare Bio-Sciences gekauft

### 5.2 Instrumente

Alle Chemikalien wurden von kommerziellen Lieferanten bezogen oder existierten bereits in der Arbeitsgruppe. Sie wurden für die Synthese ohne Reinigung verwendet, sofern nicht anders angegeben.

Alle Reaktionen in Lösungsphase wurden mittels Dünnschichtchromatographie (TLC) mit *E. Merck* Kieselgel 60 F254 (0.25 mm Dicke) überwacht. Die TLC-Platten wurden mit UV-Licht und durch Ninhydrin- oder Zuckerfärbung visualisiert und anschließend erwärmt.

Alle Festphasenreaktionen im Bereich von 0.05 – 0.2 mmol in Bezug auf die Harzbeladung wurden in Polypropylen-Chromabond-Säulen von 10 mL mit einer Polypropylenfritte durchgeführt, die am Boden mit einem B7-Septum von *Aldrich* verschlossen wurde. Die Synthese im Maßstab von mehr als 0.2

mmol in Bezug auf die Harzfracht wurde in den gleichen Säulen, aber mit einem Volumen von 24 mL durchgeführt. Das feste Trägerharz TentaGel S RAM® wurde *Rapp Polymers* gekauft.

Die <sup>1</sup>H-NMR-, <sup>19</sup>F-NMR-, und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie wurde auf einer *Bruker Avance III 300* (300 MHz) und 600 (600 MHz) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Datencharakterisierung wird wie folgt beschrieben: (Frequenz in MHz, deuteriertes Lösungsmittel) chemische Verschiebungen in Einheiten von part per million (ppm) (Multiplizität, Kopplungskonstante in Hertz, Integral, Zuordnung zum jeweiligen Proton). Chemische Verschiebungen werden relativ zu den restlichen <sup>1</sup>H- oder <sup>13</sup>C-Peaks des verwendeten Lösungsmittels als interne Standards referenziert (CDCl<sub>3</sub>: <sup>1</sup>H 7.26, DMSO-d<sub>6</sub>: <sup>1</sup>H 2.05, <sup>13</sup>C 39.52; D<sub>2</sub>O: <sup>1</sup>H 4.79). Multiplikatoren werden wie folgt abgekürzt: s = Singlet, d = Doublet, t = Triplet, q = Quartett und m = Multiplet.

Matrixunterstützte Laserdesorptions-Ionisations-Laufzeitspektren (Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight) (MALDI-TOF) werden mit einem MALDI-TOF *Ultraflex I* (Bruker Daltonics) aufgenommen.

Die Massenspektren der Elektrospray-Ionisation (ESI) werden mit einem Ion-Trap-API *Finningan LCQ Deca* Spektrometer gemessen.

Die HPLC- und LC-MS-Analyse wurde an der *Agilent Technologies 6120-Serie* mit Absorptions-(214 nm)-Detektor in Kombination mit einem Agilent Quadrupol-Massenspektrometer durchgeführt. Als Kolonne wurde ein *Agilent SB-C18* 1,8 µm (2,1x50 mm) mit einer Flussrate von 0.4 mL/min bei 25 °C mit den folgenden Lösungsmittelsystemen verwendet. System A: 95/5 H<sub>2</sub>O/MeCN, 0.1 % Ameisensäure und System B: 5/95 H<sub>2</sub>O/MeCN, 0.1 % Ameisensäure (B).

Trübungsmessungen und UV-VIS-Spektroskopie wurden mit dem Zwei-Spur-Spektrometer *Specord® 210 Plus* der Analytik Jena AG durchgeführt. Die Lösungen wurden in eine Quarzküvette (d = 1 cm) gegeben und die Messungen bei einer Raumtemperatur zwischen 270 und 390 nm durchgeführt. Die Fmoc-Entaschungseffizienz wurde bei 301 nm untersucht, wobei das Dibenzofulven-Piperidin-Addukt UV-aktiv ist. Die turbidimetrischen Messungen wurden bei einer Wellenlänge von 450 nm durchgeführt, wobei keine spezifischen Absorptionen auftreten sollten.

GPC wurde mit einem *Agilent HPLC-System der Serie 1200* durchgeführt, das mit einer wässrigen GPC-Säule von GE Healthcare (Superdex 75 10/300) ausgestattet ist. MilliQ-Wasser mit 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 250 ppm NaN<sub>3</sub> und pH7, gefiltert durch einen Inline-Membranfilter von 0.1 µm, wurde als SEC-Eluent mit einer Flussrate von 0.5 mL/min verwendet. UV-Spektren wurden auf einem *Waters 486 Tunable Absorbance Detector* aufgezeichnet. Mehrwinkel-Lichtstreuungs- und Differentialbrechungsindex-Spektren wurden mit einem *mini DAWN TREOS* bzw. *Optilab rEX* aufgenommen, die beide von Wyatt Technologies EU stammen. Die Datenanalyse wurde mit der

Software Astra 6 unter Verwendung eines gemessenen dn/dc-Wertes von 0.156 mL/g für die Polymerkonstrukte durchgeführt.

Für die SPR-Messungen wurde ein *Biacore X100*-Gerät von *GE Healthcare Life Sciences* verwendet. ConA wurde in Acetatpuffer mit pH 4.5 auf einem CM5 Carboxymethyldextranmatrix-Sensorchip unter Verwendung von 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) immobilisiert. Die Sensorprogramme wurden mit der *Biacore X100 Control* Software aufgezeichnet und mit der *Biacore X100* Evaluation Software ausgewertet.

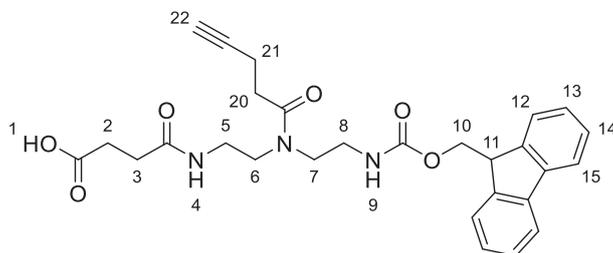
Bindungsstudien am HPV virus wurden am Lehrstuhl von Prof. Dr. Mario Schelhaas von Julia Racho durchgeführt. Dazu wurden HaCaT- oder HeLa-ATCC-Zellen auf 96-Well-Platten mit 4x10<sup>4</sup> Zellen/ml und 100 µl Zellsuspension pro Well am Abend gesät. Am nächsten Tag wurden Impfungen hergestellt und für 1 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden Inokulums bis zu 125 µl Gesamtvolumen mit 87,5 µl DMEM (+ 10 % FCS) gefüllt. Das alte Medium wurde aus den Zellen entfernt und mit 50 µl Inokulum pro Well für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Impfungen entfernt, die Zellen mit 100 µl PBS gewaschen und 46 h in frischem Medium wachsen gelassen. 48 h nach der Infektion wurden die Zellen mit 4 % PFA für 15 Minuten bei RT im Dunkeln fixiert, fünfmal mit PBS gewaschen und mit Red Dot dye 1:500 in 0,1 % Triton X-100 in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln gefärbt. Vor der mikroskopischen Analyse wurden die Zellen erneut gewaschen.

## 5.3 Synthesen von Monomeren und Oligomeren

### 5.3.1 Bausteine

#### 1-(Fluorenyl)-3,11-dioxo-7-(pent-4-ynoyl)-2-oxa-4,7,10-triazatetradecan-14-säure, TDS (1)

TDS wurde nach literaturbekannter Vorschrift synthetisiert.<sup>12</sup>

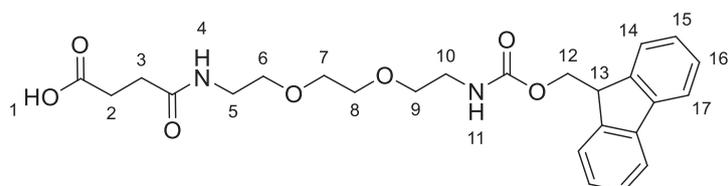


**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = 12.04 (broad peak s, O-H,) 7.98 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.38 Hz, N-H), 7.84 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.36 Hz, 2H, H15), 7.62 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.37 Hz, 2H, H12), 7.36 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.39 Hz 2H, H14), 7.32 – 7.22 (m, , 2H, H13), 4.26 (m, H10), 4.15 (m, , 1H, H11), 3.44 – 3.17 (m, overlapped by DMSO-*d*<sub>5</sub>, 2H, H6, H7), 3.08 (m, 4H, H5, H8), 2.68 (m, 1H, H22), 2.45 (m, 4H, overlapped by H<sub>2</sub>O, H21), 2.36– 2.18 (2xm, 4H, H2, H3).

**ESI-MS** m/z kalk. für C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 506.2; gefunden 506,1, [M+Na]<sup>+</sup> 528.2; gefunden 528.64.

1-(9H-Fluoren-9-yl)-3,14-dioxo-2,7,10-trioxa-4,13-diazaheptadecan-17-säure, EDS (2)

EDS wurde nach literaturbekannter Vorschrift synthetisiert.<sup>12</sup>

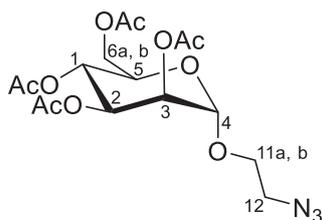


**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>) δ [ppm] = 7.72 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.44 Hz, 2H, H17), 7.58 (d, <sup>3</sup>J<sub>HHz</sub> = 7.32 Hz, 2H, H14), 7.33 (m, 2H, H16), 7.25 (m, 2H, H15), 4.30 (m, 2H, H12), 4.12 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.71 Hz, 1H, H13), 3.52 (s, 4H, H7, H8), 3.46 (m, 4H, H6, H9), 3.33 – 3.20 (m, 4H, H10, H5), 2.54 (m, 2H, H2), 2.46 – 2.37 (m, 2H, H3).

**ESI-MS** m/z kalk. für C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> 471.2; gefunden 471.2, [M+Na]<sup>+</sup> 493.2, gefunden 493.2.

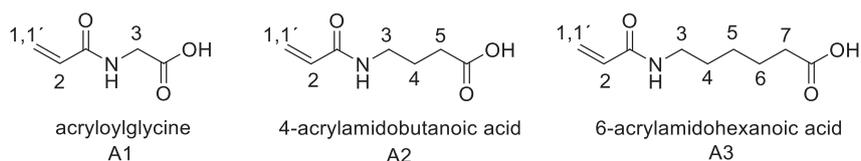
Synthese von 2-Azidoethyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid (3)

Mannose-Azid wurde nach literaturbekannter Vorschrift synthetisiert.<sup>12</sup>



**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ [ppm] = 5.40 – 5.24 (m, 3H, H3, H2, H1), 4.87 (s, 1H, H4), 4.29 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.34 Hz, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.26 Hz, 1H, H6a), 4.17 – 4.01 (m, 1H, H6b), 4.05 (m, 1H, H5), 3.87 (m, 1H, 11a), 3.67 (m, 1H, 11b), 3.47 (m, 2H, H12), 2.16 (s, 3H, OAc), 2.11 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 1.99 (s, 3H, OAc).

Synthese von Acrylat-Bausteine



Die Bausteine wurden nach literaturbekannter Vorschrift synthetisiert.<sup>222</sup>

### A1

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  [ppm] = 6.41 – 6.15 (m, 2H, H1, H1'), 5.70 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H2-H1'</sub> = 9.2 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H2-H1</sub> = 2.8 Hz, 1H, H2), 3.99 (m, 2H, H3).

### A2

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  [ppm] = 6.26 – 6.12 (m, 2H, H1, H1'), 5.64 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H2-H1'</sub> = 7.4 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H2-H1</sub> = 4.6 Hz, 1H, H2), 3.35 – 3.23 (m, 2H, H3 und Wasser), 2.34 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H5), 1.91 – 1.62 (m, 2H, H4).

### A3

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, Methanol-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  [ppm] = 6.46 – 6.13 (m, 2H, H1, H1'), 5.82 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>H2-H1'</sub> = 9.7 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>H2-H1</sub> = 1.9 Hz, 1H, H2), 3.35 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H3), 2.47 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H7), 1.81 – 1.53 (m, 4H, H4, H6), 1.45 (m, 2H, H5).

## 5.3.2 Oligomersynthese

Alle Oligomere wurden nach bekannten Literaturvorschriften synthetisiert.<sup>12,111</sup>

Die Bausteine **1** und **2** werden schrittweise alternierend, anfangend mit **1**, aneinandergereiht, sodass ein Tetramer zwei Dreifachbindungen trägt. Anschließend wird das resultierende Oligomer mit CuAAC konjugiert. Danach wird das Glykomakromolekül mit einer polymerisierbaren Gruppe funktionalisiert und die OH-Gruppen des Glykans werden mit 0.1 M Natriummethanolat Lösung entschützt, was zu einem wasserlöslichen Glykomakromonomer führt. Für den *grafting-to* Ansatz wurde das terminale Amin nicht weiter funktionalisiert.

### Allgemeines Kopplungs- und Fmoc-Entschützungsprotokoll:

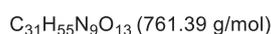
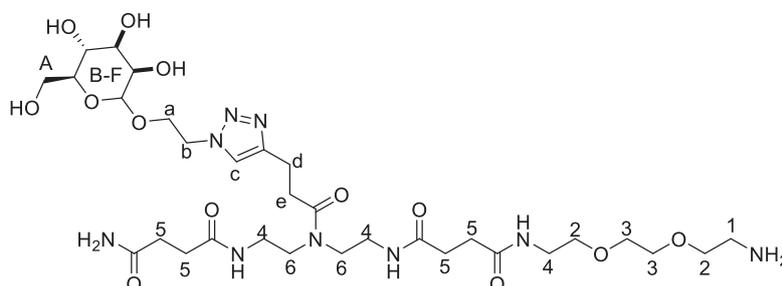
Als Festphase für die SPS wurde TentaGel S RAM® mit einem modifizierten Rink Amide Linker und einer Beladung von 0.250 mmol/g verwendet. Zunächst wurde das 0.2 mmol Harz im DCM für 30 min gequollen, um alle Funktionsgruppen zugänglich zu machen. Die Fmoc-Schutzgruppe des Harzes wurde durch Zugabe von 25 Vol-% Piperidin in DMF zweimal für 15 Minuten gespalten. Nach dem letzten Entschützungs-schritt wurde das Harz 15 mal mit 3 mL DMF gewaschen. Dem entschützten Harz wurde

eine Lösung aus Baustein (5 Äq. = 1 mmol), DIPEA (10 Äq. = 2 mmol) und PyBOP (5 Äq. = 1 mmol) in 3 mL DMF zugesetzt. Vor der Zugabe des Gemisches ist sicherzustellen, dass alle Reaktanten vollständig gelöst vorliegen. Die Spritze wird eine Stunde lang geschüttelt und 10-15 mal mit DMF und drei mal mit DCM gewaschen. Die Entschlüsselung erfolgt wie oben beschrieben. Diese Schritte werden wiederholt, bis der gewünschte Tetramer oder Oktamer synthetisiert ist. Die Reaktion kann mit negativen Kaiser-Tests mit einer Ninhydrinlösung und LC-MS-Analyse einer Mikrosplattung überprüft werden.

#### Spaltung des Oligomers von der Festphase:

15 mL einer Spalltlösung, die Vol-95% TFA, 2,5 Vol-% DMC und 2,5 Vol-% TIPS enthält, wird dem Harz zugegeben und für 1 Stunde geschüttelt. Das Filtrat wird in 150 mL Diethylether gefällt. Der dabei entstehende Niederschlag wurde zentrifugiert und der Ether dekantiert. Das Produkt wurde zweimal mit Diethylether gewaschen und dekantiert. Das Rohprodukt wurde im N<sub>2</sub>-Strom getrocknet und anschließend in Wasser gelöst und gefriergetrocknet.

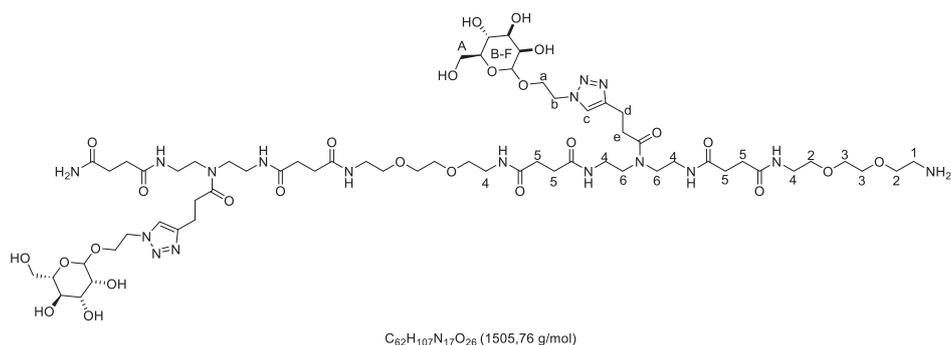
#### O



Das divalente Oligomer O1 wurde mit einer Ausbeute von 85% und einer Reinheit von über 95% (RP-HPLC). Das Oligomer wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet. Im <sup>1</sup>H-NMR kann das primäre Amin, mit einer Intensität von 2, eindeutig identifiziert werden.

**<sup>1</sup>H-NMR**      <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Deuteriumoxid) δ [ppm] = 7.82 (s, 1H, H-c), 4.56 (m, 2H, H-A), 4.00 (m, 2H, H-a), 3.91 – 3.75 (m, 3H, H-a, H-C), 3.73 – 3.45 (m, 14H, H-2, H-3, H-b, H-D, H-E, H-F), 3.44 – 3.21 (m, 11H, H-4), 3.13 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H, H-1), 2.93 (m, 3H, H-d, H-B), 2.71 (m, 2H, H-e), 2.52 – 2.30 (m, 8H, H-5).

## O1

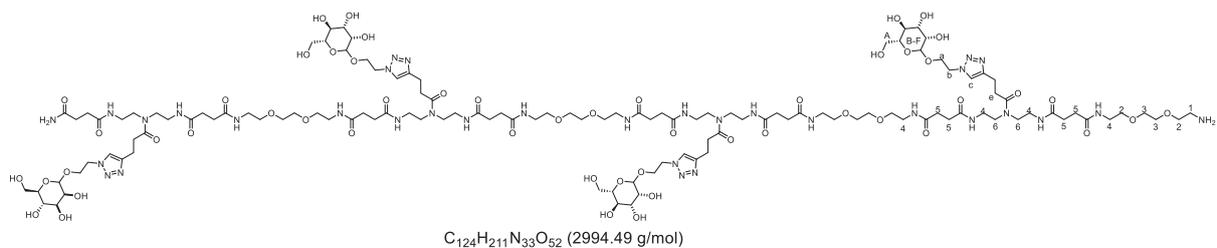


Das divalente Oligomer O1 wurde mit einer Ausbeute von 85% und einer Reinheit von über 95% (RP-HPLC). Das Oligomer wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet. Im  $^1\text{H-NMR}$  kann das primäre Amin, mit einer Intensität von 2, eindeutig identifiziert werden.

**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz, Deuteriumoxid)  $\delta$  [ppm] = 7.79 (s, 2H, H-c), 4.58 – 4.47 (m, 4H, H-A), 4.03 – 3.97 (m, 2H, H-a), 3.86 – 3.81 (m, 2H, H-a), 3.78 (dd,  $J = 3.3, 1.8$  Hz, 2H, H-C), 3.70 – 3.49 (m, 24H, H-2, H-3, H-b, H-D, H-E, H-F), 3.39 (dt,  $J = 12.3, 6.2$  Hz, 8H, H-6), 3.32 – 3.23 (m, 14H, H-4), 3.14 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2H, H-1), 2.97 – 2.87 (m, 6H, H-d, H-B), 2.71 (t,  $J = 7.3$  Hz, 4H, H-e), 2.48 – 2.33 (m, 16H, H-5).

**ESI-MS**  $m/z$  berechnet für  $C_{82}H_{107}N_{17}O_{26}$  (1505.76 g/mol):  $[M+H]^+$  kalk.: 1506.76; gefunden: 1506.65,  $[M+2H]^{2+}$  kalk.: 753.8; gefunden: 754,  $[M+3H]^{3+}$  kalk.: 502.9; gefunden: 503

## O2

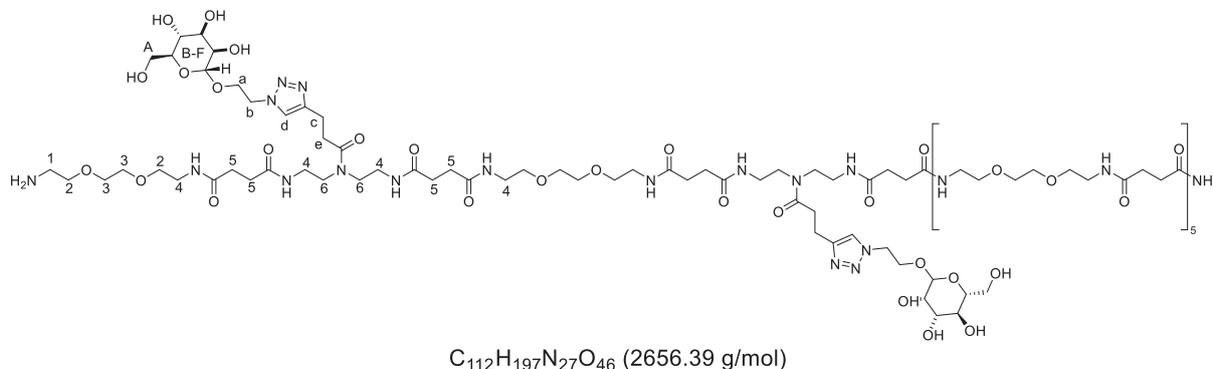


Das tetravalenten Oligomer O2 wurde mit einer Ausbeute von 85% und einer Reinheit von über 95% (RP-HPLC) erhalten. Das Oligomer wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet. Im  $^1\text{H-NMR}$  kann das primäre Amin, mit einer Intensität von 2, eindeutig identifiziert werden.

**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz, Deuteriumoxid)  $\delta$  [ppm] = 7.98 (t,  $J = 10.3, 7.6$  Hz, 4H, H-c), 4.66 – 4.55 (m, 8H, H-A), 4.10 – 3.97 (m, 4H, H-a), 3.90 – 3.81 (m, 4H, H-a), 3.80 – 3.74 (m, 4H, H-C), 3.70 – 3.47 (m, 55H, H-2, H-3, H-b, H-D, H-E, H-F), 3.42 – 3.33 (m, 17H, H-6), 3.31 – 3.21 (m, 30H, H-4), 3.12 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2H, H-1), 3.08 – 2.92 (m, 12H, H-d, H-B), 2.79 – 2.70 (m, 7H, H-e), 2.47 – 2.34 (m, 32H, H-5).

**ESI-MS** m/z berechnet für  $C_{124}H_{211}N_{33}O_{52}$  (2994.49 g/mol):  $[M+3H]^{3+}$  kalk.: 999.16; gefunden: 999.45,  $[M+4H]^{4+}$  kalk.: 749.62; gefunden: 749.9,  $[M+5H]^{5+}$  kalk.: 599.89; gefunden: 600.2

### O1s

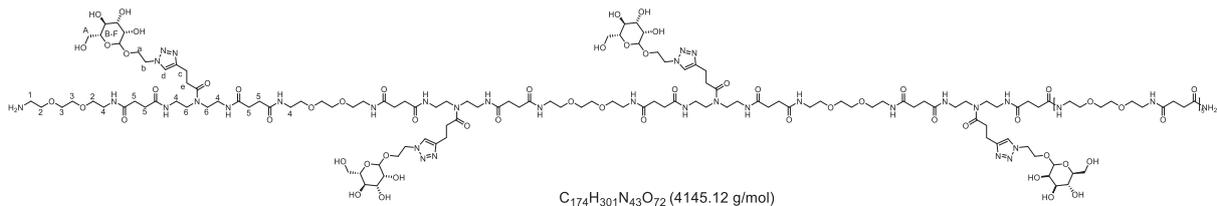


Das divalente abgeschirmte Oligomer O1s wurde mit einer Ausbeute von 85% und einer Reinheit von über 90% erhalten. Im  $^1H$ -NMR kann das primäre Amin, mit einer Intensität von 2, eindeutig identifiziert werden.

**$^1H$  NMR** (600 MHz, Deuteriumoxid):  $\delta$  [ppm] = 7.93 – 7.89 (m, 2H, H-c), 4.62 – 4.56 (m, 2H, H-A), 4.05 – 3.98 (m, 2H, H-a), 3.8 – 3.82 (m, 2H, H-a), 3.79 – 3.75 (m, 2H, H-C), 3.70 – 3.45 (m, 77 H, H-2, H-3, H-b, H-D, H-E, H-F), 3.43– 3.21 (m, 50H, H-6, H-4), 3.13 (m, 2H, H-1), 3.07 (m, 1H, -NH-) 3.02 – 2.91 (m, 7H, H-d, H-B), 2.73 (m, 4H, H-e), 2.51 – 2.33 (m, 42H, H-5).

**ESI-MS** m/z berechnet für  $C_{127}H_{197}N_{27}O_{46}$  (2656.39 g/mol):  $[M+2H]^{2+}$  kalk.: 1329.2; gefunden: 1329.8,  $[M+3H]^{3+}$  kalk.: 886.47; gefunden: 886.6,  $[M+4H]^{4+}$  kalk.: 665.1; gefunden: 665.4,  $[M+5H]^{5+}$  kalk.: 532.28; gefunden: 532.6,  $[M+6H]^{6+}$  kalk.: 443.73; gefunden: 443.8

### O2s

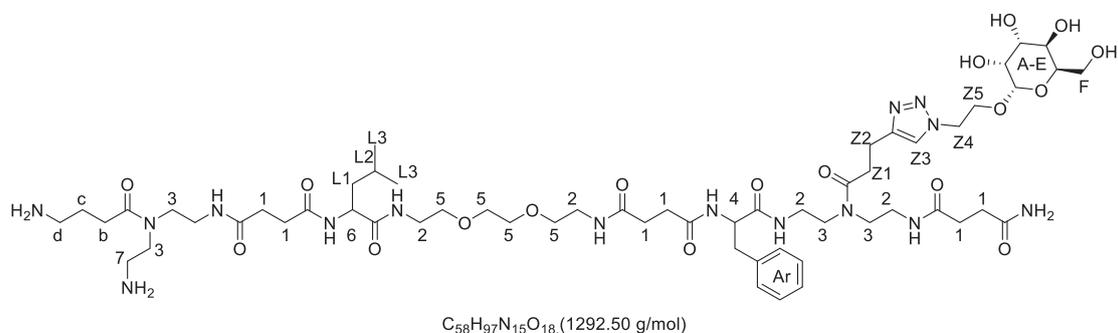


Das tetravalente abgeschirmte Oligomer O2s wurde mit einer Ausbeute von 85% und einer Reinheit von über 90% erhalten. Im  $^1H$ -NMR kann das primäre Amin, mit einer Intensität von 2, eindeutig identifiziert werden.

**$^1H$  NMR** (600 MHz, Deuteriumoxid):  $\delta$  [ppm] = 8.01 – 7.92 (m, 4H, H-c), 4.72 – 4.61 (m, 8H, H-A), 4.13 – 4.06 (m, 4H, H-a), 3.96 – 3.90 (m, 4H, H-a), 3.87 – 3.83 (m, 4H, H-C), 3.78 – 3.57 (m, 104H, H-2, H-3, H-b, H-D, H-E, H-F), 3.50 – 3.30 (m, 78H, H-6, H-4), 3.21 (m, 2 H, H-1), 3.15 (m, 1H, -NH-) 3.10 – 2.97 (m, 13 H, H-d, H-B), 2.85 – 2.76 (m, 8H, H-e), 2.60 – 2.42 (m, 60H, H-5).

**ESI-MS** m/z berechnet für  $C_{174}H_{301}N_{43}O_{72}$  (4145.12 g/mol):  $[M+4H]^{4+}$  kalk.: 1037.28; gefunden: 1037.8,  $[M+5H]^{5+}$  kalk.: 830.02; gefunden: 830.4,  $[M+6H]^{6+}$  kalk.: 692.21; gefunden: 692.2,  $[M+7H]^{7+}$  kalk.: 593.4; gefunden: 593.4,  $[M+8H]^{8+}$  kalk.: 519.14; gefunden: 519.4

### TPELA



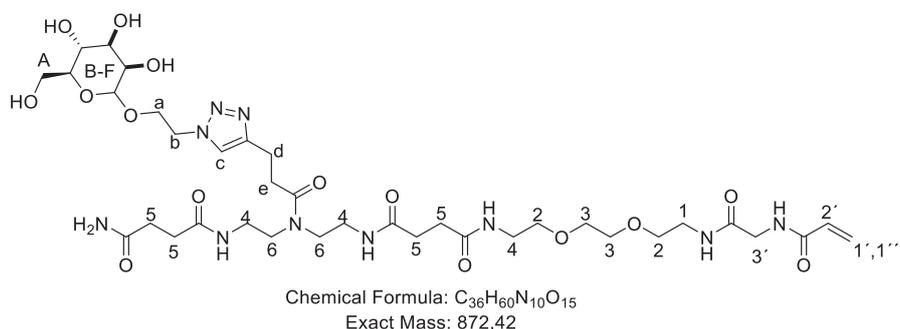
**$^1H$ -NMR** (300 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta$  (ppm) = 7.91 (s, 1H, H-Z3), 7.33 – 7.07 (m, 5H, H-Ar), 5.69 (d,  $^3J = 9.7$  Hz, 1H, H-A), 4.42 (t,  $^3J = 7.6$  Hz, 1H, H-B), 4.21 – 4.06 (m, 2H, H-4, H-C), 3.89 – 2.74 (m, 48H, H-2, H-3, H-5, H-L2, H-a, H-b, H-c, H-D, H-E, H-F, H-Z2, H-Z4, H-Z5), 2.64 (t,  $^3J = 7.2$  Hz, 2H, H-7), 2.53 – 2.26 (m, 16H, H-1, H-Z1), 1.82 – 1.70 (m, 4H, H-d), 1.60 – 1.37 (m, 2H, H-6, H-L1), 0.90 – 0.65 (m, 6H, H-L3).

**ESI-MS** m/z berechnet für  $C_{58}H_{95}N_{17}O_{18}$  (1317.7 g/mol):  $[M+H+Na]^{2+}$  kalk.: 670.9; gefunden: 672.0; gefunden: 448.4,  $[M+2H+Na]^{3+}$  kalk.: 447.6, gefunden 448.35

## Glykomakromonomersynthese

Das Oligo(amidoamin) Rückgrat wurde anhand der oben beschriebenen Festphasensynthese hergestellt. Hierbei wurden ebenfalls die Bausteine **1** und **2** in alternierender Weise synthetisiert. Das resultierende Oligomer wurde mit Mannose-Azid mittels CuAAC funktionalisiert und anschließend mit A3 anhand des oben beschriebenen Kupplungsprotokolls funktionalisiert. Das Makromonomer wurde mit 0.1 M Natriummethanolat Lösung entschützt und von der Festphase abgespalten.

### M1

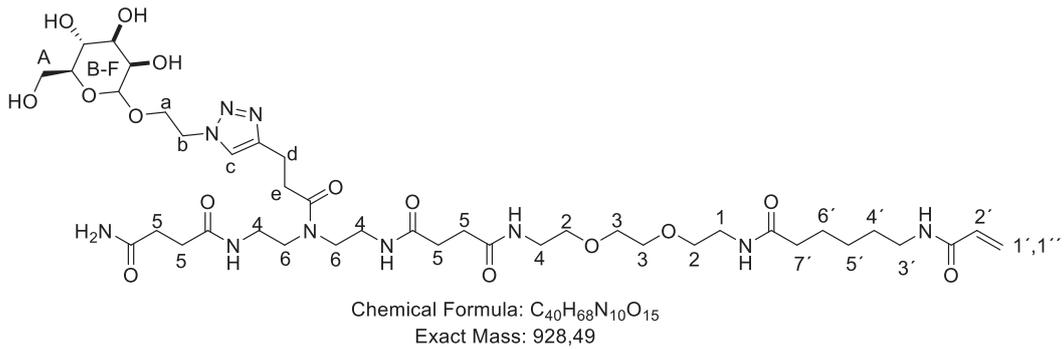


Das divalente Oligomer M1 wurde mit einer Ausbeute von 85% und einer Reinheit von über 93% (RP-HPLC). Im <sup>1</sup>H-NMR können die Acrylat-Protonen, mit einer Intensität von 2 und 1, eindeutig identifiziert werden.

Die folgende ESI-Messung wurde im positiv Modus gemessen:

**ESI-MS**      m/z berechnet für C<sub>36</sub>H<sub>60</sub>N<sub>10</sub>O<sub>15</sub> (Molekulargewicht: 872.42): [M+H+Na]<sup>+</sup> kalk.: 895.41; gefunden: 895.3, [M+H]<sup>+</sup> kalk.: 873.43; gefunden: 873.4, [M+2H]<sup>2+</sup> kalk.: 437.21; gefunden: 437.25,

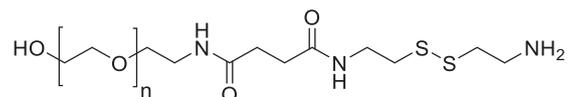
### M2



Das divalente Oligomer M2 wurde mit einer Ausbeute von 85% und einer Reinheit von über 95% (RP-HPLC). Im  $^1H$ -NMR können die Acrylat-Protonen, mit einer Intensität von 2 und 1, eindeutig identifiziert werden.

**ESI-MS**  $m/z$  berechnet für  $C_{40}H_{68}N_{10}O_{15}$  (Molekulargewicht: 928.49):  $[M+H]^+$  kalk.: 929.5; gefunden: 929.4,  $[M+2H]^{2+}$  kalk.: 465.25; gefunden: 465.4

#### Amin terminiertes PEG mit Cysteamin-Linker



Die Vorbehandlung des Harzes wurde analog zur oben genannten Methode für die Festphasensynthese durchgeführt. Anschließend wurden 30 eq. Bernsteinsäureanhydrid und 30 eq. DIPEA in 3 mL DMF gelöst und eine Stunde in der Spritze geschüttelt. Die Aufreinigung, das Kuppeln von Cysteamin und die Abspaltung vom Harz wurden anhand der oben beschriebenen Methode durchgeführt. Das Produkt wurde in einer Ausbeute von 73% als farbloses Pulver erhalten.

#### 5.3.3 Zurückgewinnung von Fmoc geschützten Bausteinen und Aminosäuren

Um überschüssige Bausteine oder Aminosäuren zurückzugewinnen, wurde die Kupplungslösung direkt in eine 10%ige wässrige Zitronensäurelösung (Sammellösung) gegossen wodurch ein Niederschlag entstand. Für die Kupplung mit verschiedenen Bausteinen wurden separate Behälter für die einzelnen Bausteine vorbereitet, wobei mehrere Kupplungslösungen desselben Bausteins in einem Behälter kombiniert wurden. Nach der vollständigen Elongation des Gerüsts wurde der Niederschlag gefiltert, in Ethylacetat gelöst und gegen destilliertes Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit  $MgSO_4$  getrocknet, gefiltert und unter reduziertem Druck konzentriert. Die Rekristallisation aus Ethylacetat:n-Hexan (1:1, v/v) ergibt rückgewonnene Bausteine. Hierbei wurden Ausbeuten von < 76%

des theoretischen Überschussmaterials mit einer Reinheiten von <95% (RP-HPLC) gewonnen. Die jeweiligen NMR-Spektren, RP-HPLC und IR-Spektren der zurückgewonnenen Substanzen können dem Anhang entnommen werden. Tabelle 19 zeigt die jeweiligen Ausbeuten und Reinheiten der isolierten Produkten TDS, EDS, 4-ADS, Fmoc-Phe-OH und Fmoc-Leu-OH.

Tabelle 19: Ergebnisse der Baustein und Aminosäuren Zurückgewinnung.

Baustein/Aminosäure	manuell/automatisiert	Relative Reinheit <sup>a</sup> [%]	Ausbeute <sup>b</sup> [%]
<b>TDS</b>	M/A	>95	85-72
<b>EDS</b>	M/A	>95	76-65
<b>4-ADS</b>	M	>95	85
<b>Fmoc-Phe-OH</b>	M	>95	82
<b>Fmoc-Leu-OH</b>	M	>95	80

<sup>a</sup> Bestimmt mittels RP-HPLC (linearer Gradient von 0 – 50% Eluent B bei 25°C in 30 min)

<sup>b</sup> Bestimmt nach Rekristallisation

#### 5.3.4 Zurückgewinnung von Azid tragenden Zuckern

Für die Zurückgewinnung von funktionalisiertem Zucker wurden die CuAAC-Klick-Lösungen nach der Filtration aus dem Harz gesammelt und unter reduziertem Druck konzentriert. Das konzentrierte Reaktionsgemisch wurde dann in Ethylacetat gelöst und mehrfach mit Wasser gewaschen, getrocknet und konzentriert. In den meisten Fällen wurden Glykosylazide bereits in hoher Reinheit gewonnen. Wenn jedoch weiterhin Spurenverunreinigungen vorhanden waren, wurde die Reinheit durch Rekristallisation mit heißem Ethanol erhöht. Prozentuale Rückgewinnungsraten für Glykosylazide wurden im Allgemeinen < 80% erreicht, wobei die Reinheiten < 95%, wie sie mit MS- und <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie bewertet wurden. Die jeweiligen NMR-Spektren und IR-Spektren können dem Anhang entnommen werden. Die folgende Tabelle zeigt, die jeweiligen Reinheiten bestimmt mittels <sup>1</sup>H-NMR sowie die erhaltenen Ausbeuten.

Tabelle 20: Ergebnisse der Zucker Zurückgewinnung.

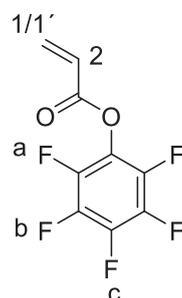
Zucker	Reinheit [%] <sup>a</sup>	zurückgewonnenes Material [%] <sup>b</sup>
<b>6</b>	>95	>80
<b>7</b>	>95	>80
<b>8</b>	>95	>80

<sup>a</sup> Bestimmt mittels <sup>1</sup>H-NMR

<sup>b</sup> Bestimmt nach Lösemittel Entfernung

### 5.3.5 Pentafluorophenyl acrylate und RAFT-Agent

#### Pentafluorophenylacrylat (PFPA)

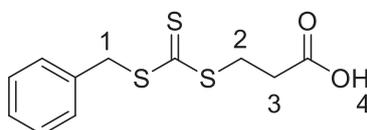


Pentafluorophenylacrylat (PFPA) wurde nach literaturbekannter Vorschrift synthetisiert.<sup>183</sup> Allerdings wurde anstatt eine Destillation eine Sublimation mit einem Druck von  $1 \cdot 10^{-3}$  mBar durchgeführt.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  6.72 (dd,  $J = 17.2, 1.0$  Hz, 1H, H-1), 6.37 (dd,  $J = 17.2, 10.5$  Hz, 1H, H-2), 6.18 (dd,  $J = 10.5, 1.0$  Hz, 1H, H-1').

**<sup>19</sup>F-NMR** (282 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  -152.66 – -152.93 (m, 2F, H-b), -158.21 (t,  $J = 21.6$  Hz, 1F, H-a), -162.42 – -162.79 (m, 2F, H-c).

#### 3-(((Benzylsulfanyl)carbonothioyl)sulfanyl)propansäure (BSPA).

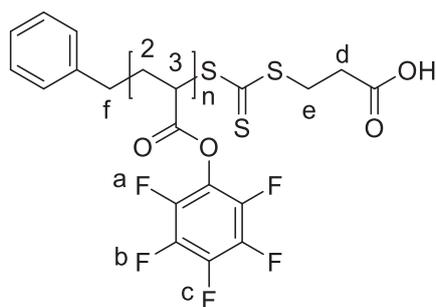


BSPA wurde nach literaturbekannter Vorschrift synthetisiert.<sup>185</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12.66 – 12.31 (m, 1H, H-4), 7.42 – 7.23 (m, 5H, H-Phenyl), 4.67 (s, 2H, H-1), 3.54 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H, H-2), 2.68 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H, H-3).

## 5.4 Polymersynthese mittels *grafting-to*

#### Poly(pentafluorophenyl acrylat)



Polymer mit einer Wiederholungseinheit von 50:

PFPFA 17 g (71.43 mmol), BSPA 388.55 mg (1.429 mmol) und AIBN 46.92 mg (0.286 mmol) wurden in 67 mL Benzol gelöst. Das Gemisch wurde 30 Minuten lang in einem Eisbad mit Stickstoff gespült und in einem Ölbad auf 70°C erhitzt. Anschließend wurde die Reaktion durch Exposition an der Luft und einfrieren mit flüssigem Stickstoff unterbrochen. Das Polymer wurde in Hexan ausgefällt, zentrifugiert und im Hochvakuum getrocknet. Ein gelbliches Pulver mit einer Ausbeute von 15 g (88 %) wurde erhalten.

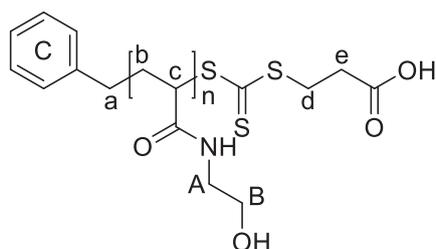
Polymer mit einer Wiederholungseinheit von 100:

PFPFA 17 g (71.43 mmol), BSPA 204.47 mg (0.752 mmol) und AIBN 24.7 mg (0.15 mmol) wurden in 67 mL Benzol gelöst. Die Mischung wurde wie oben beschrieben polymerisiert und aufgereinigt. Ein gelbliches Pulver mit einer Ausbeute von 13 g (76.5 %) wurde erhalten.

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, Chloroform-*d*):  $\delta$  (ppm) = 7.85 – 7.07 (m, ArH, Überlappung mit CHCl<sub>3</sub>), 3.73 – 3.56 (bs, 2H, H-e), 3.31 – 2.60 (m, 43H, H-3, H-f, H-d), 2.56 – 2.33 (m, 15H, H-2), 2.33 – 1.83 (m, 61H, H-2).

**<sup>19</sup>F-NMR** (282 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) = -153.30 (bm, 2F, F-b), -156.82 (bs, 1F, F1), -160.99 – -165.31 (bs, 2F, F2).

Poly(hydroxyethyl acrylamid)



200 mg (0.84 mmol, 1 Äquivalent) p(PFPA) wurden in 0.5 mL DMF gelöst und 53  $\mu$ l (8,4 mmol, 10 Äquivalent) Ethanolamin hinzugefügt. Nach Zugabe von 14  $\mu$ l (1 mmol, 1.2 äq.) Triethylamin wurde die Mischung über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wird in Aceton ausgefällt und im Hochvakuum getrocknet. Nach dem Auflösen in Wasser wird das Rohprodukt in Viva-Spinningtubes mit einem MWCO von 5000 Dalton gereinigt. Das Produkt (p(HEAm)) wird gefriergetrocknet und 84 mg (87%, 0.73 mmol) eines farblosen Pulvers erhalten.

Table E 1: Wasser GPC Resultate für p(HEAm) bei einer Flussrate von 0.8 ml/min.

Polymer	Pn [GPC]	Pn [NMR]	D	Mn
50mer	54	40	1.00	6.409
100mer	92	92	1.04	10.550

50mer:

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, Deuteriumoxid)  $\delta$  [ppm] = 8.12 (s, 18H, NH), 7.46 – 7.10 (m, 5H, Ar-H), 3.78 – 3.56 (m, 78H, H-B), 3.52 – 3.15 (m, 78H, H-A), 2.59 (t, 2H, H-e), 2.40 – 1.08 (m, 122H, H-a, H-b, H-c, H-d).

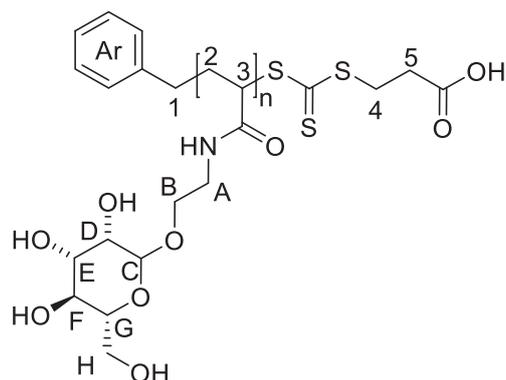
<sup>19</sup>F-NMR (282 MHz, Chloroform-*d*) keine Signale.

100mer:

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, Deuteriumoxid)  $\delta$  [ppm] = 8.27 – 8.01 (m, NH), 7.45 – 7.09 (m, Ar-H), 3.81 – 3.57 (m, H-B), 3.51 – 3.15 (m, H-A, H-e), 2.42 – 1.18 (m, 3H, H-a, H-b, H-c, H-d).

<sup>19</sup>F-NMR (282 MHz, Chloroform-*d*) keine Signale.

Poly(hydroxyethyl mannosyl acrylamid)



Ein acetyl geschütztes mit Mannose-Derivat, welches ein freies Amin trägt wurde von Fawad Jacobi synthetisiert. 200 mg (0.84 mmol, 1 Äquivalent) p(PFPA) wurden in 0.5 mL DMF gelöst und 985.7 mg (2.5 mmol, 3 Äquivalente) des Mannose-Derivats zugegeben. Nach Zugabe von 14  $\mu$ L (1 mmol, 1,2 äq.) Triethylamin wurde die Mischung über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde in Wasser ausgefällt und im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurde das Polymer in DMF gelöst und zu 0.2 mM Natriummethoxid in Methanollösung gegeben. Die Mischung wurde 1 Stunde gerührt und in Aceton ausgefällt. Das Rohprodukt wird mit Hilfe von Viva-Spinngtubes mit einem MWCO von 5000 Dalton und pH 3 saurem Wasser gereinigt. Das Produkt (pMan) wurde gefriergetrocknet und 110 mg (Ausbeute: 87%, 0,73 mmol) eines farblosen Pulvers erhalten.

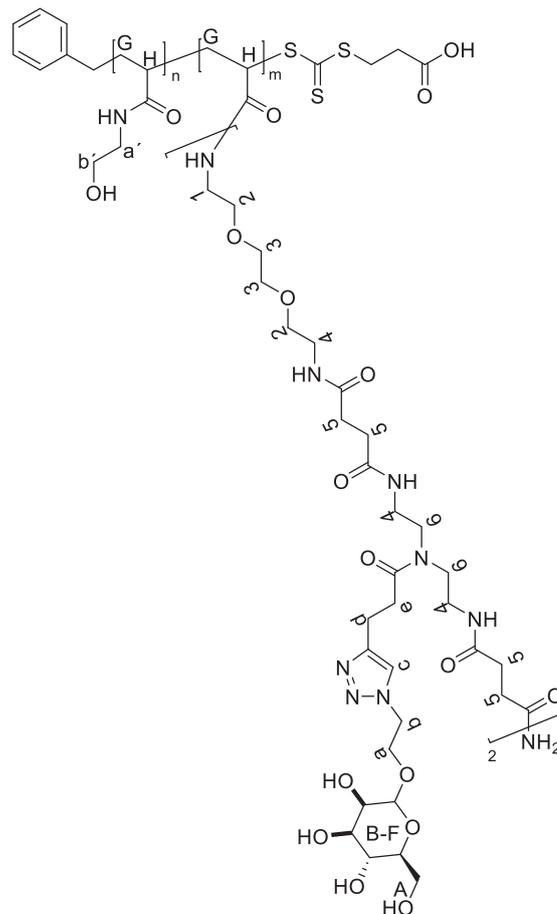
Tabelle E 2: Wasser-GPC Resultate für pMan.

Polymer	Pn [GPC]	Pn [NMR]	D	Mn
pMan	35	43	1.07	12000

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, Deuteriumoxid)  $\delta$  [ppm] = 7.41 – 7.09 (m, H-Ar), 4.79 (bs, 1H, H-G), 3.96 – 3.07 (m, 8H, H-A, H-B, H-C, H-D, H-F, H-H), 1.78 (m, 3H, H-2, H-3, H-4, H-5).

<sup>19</sup>F-NMR (282 MHz, Chloroform-*d*) keine Signale.

## Polymere mit divalenten Seitenketten



Alle Polymere wurden nach dem folgendem Verfahren synthetisiert. Alle Ansatzgrößen sind in Tabelle E 3 aufgelistet:

Es wird eine Stammlösung aus p(PFPA) (292.47 mg in 4.6 ml DMF) und dem Glykooligomer (334.87 mg in 110.8  $\mu$ L DMF) hergestellt.

40 mg (0.168 mmol, 1eq.) p(PFPA) wurden mit 0.1 eq, 0.4 eq oder 0.8 eq des Glykooligomers vermischt. Nach Zugabe von 20  $\mu$ l (1 mmol, 1.2 eq.) Triethylamin wurde die Mischung über Nacht gerührt. Am nächsten Tag werden 10 Äquivalente Ethanolamin zugegeben und das Reaktionsgemisch für weitere 24 h gerührt. Das Polymer wird in Aceton ausgefällt, abgesaugt und im Hochvakuum getrocknet. Anschließend wird das Polymer in Wasser gelöst und mittels Viva-Spinningtubes mit einem MWCO von 5000 Dalton und pH 3 saurem Wasser gereinigt. Das Produkt wurde gefriergetrocknet und ein farbloses Pulver wurde erhalten (Ausbeute: 50-65%).

Analog dazu wurden die restlichen Polymere synthetisiert.

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz, Deuteriumoxid)  $\delta$  7.79 (s, 3H, H-c), 7.21 (dd,  $J = 29.9, 7.5$  Hz, 5H, aromatic protons), 4.54 (d,  $J = 4.7$  Hz, 5H, H-A), 4.00 (dt,  $J = 11.1, 5.4$  Hz, 4H, H-

a), 3.88 – 3.72 (m, 4H, H-a), 3.71 – 3.03 (m, 172H, H-2, H-3, H-4, H-6b, H-D, H-E, H-F, H-a', H-b'), 2.93 (q,  $J = 7.3$  Hz, 10H, H-1, H-d, H-B), 2.71 (t,  $J = 7.2$  Hz, 7H, H-e), 2.53 – 2.29 (m, 26H, H-5), 2.28 – 1.19 (m, 93H, H-G, H-H).

<sup>19</sup>F-NMR (282 MHz, Chloroform-*d*) keine Signale.

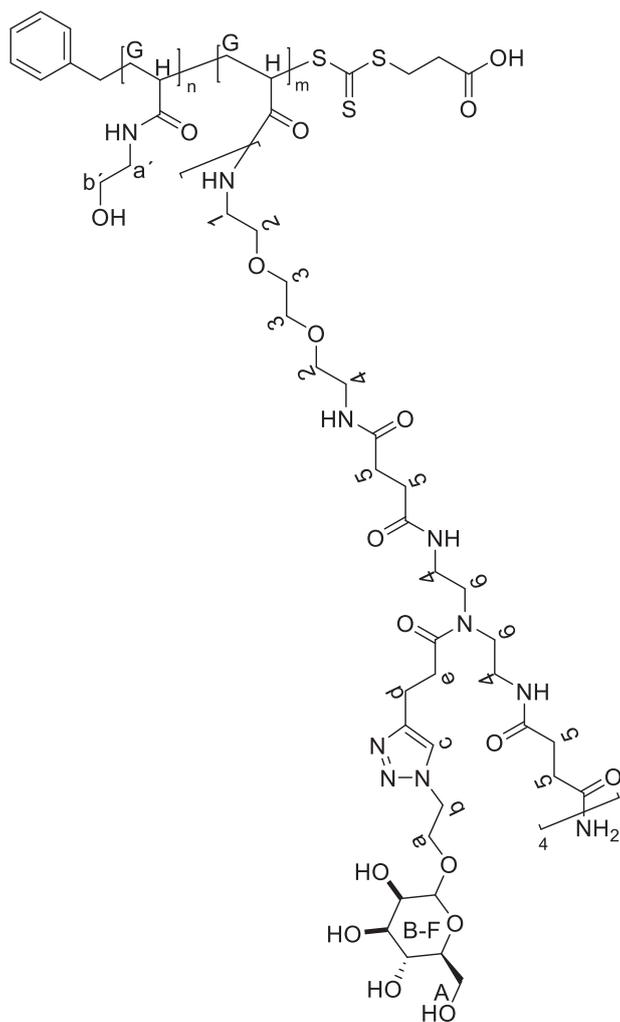
Tabelle E 3: Ansatzgrößen für das grafting to von O1 an p(PFPA).

<b>P1-10</b>	<b>p(PFPA)</b>	<b>O1</b>
M [g/mol]	238.01	1619.75
m [mg]	65	44.23501
n [mmol]	0.273098	0.02731
<b>P1-40</b>	<b>p(PFPA)</b>	<b>O1</b>
M [g/mol]	238.01	1619.75
m [mg]	40	108.8862
n [mmol]	0.16806	0.067224
<b>P1-80</b>	<b>p(PFPA)</b>	<b>O1</b>
M [g/mol]	238.01	1619.75
m [mg]	20	108.8862
n [mmol]	0.08403	0.067224
<b>P1-100mer</b>	<b>p(PFPA)</b>	<b>O1</b>
M [g/mol]	238.01	1619.75
m [mg]	65	53.08201
n [mmol]	0.273098	0.032772
<b>P1s</b>	<b>p(PFPA)</b>	<b>O1</b>
M [g/mol]	238.01	2710.34
m [mg]	22	100.21
n [mmol]	0.09243	0.03697

Tabelle E 4: Resultate der P1-Serie erhalten durch Wasser-GPC und NMR.

<b>Polymer</b>	<b>D</b>	<b>Mn</b>	<b>Einbau (GPC)</b>	<b>N<sub>Zucker</sub> (GPC)</b>	<b>N<sub>Zucker</sub> (NMR)</b>
<b>P1-10</b>	1.05	8.375	5%	4	3
<b>P1-40</b>	1.03	20.780	24%	21	15
<b>P1-80</b>	1.07	34.100	45%	40	35
<b>P1-100mer</b>	1.06	15.000	2%	4	15
<b>P1s</b>	1.08	52.240	41%	37	26

Polymere mit divalenten Seitenketten



**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, Deuteriumoxid)  $\delta$  8.14 (s, 1H, NH), 7.88 (s, 4H, H-c), 7.45 – 7.09 (m, 5H, phenyl protons), 4.63 (d,  $J = 4.8$  Hz, 8H, H-A), 4.09 (dt,  $J = 10.9, 5.4$  Hz, 5H, H-a), 3.98 – 3.81 (m, 10H, H-a, H-C), 3.81 – 3.14 (m, 200H, H-2, H-3, H-4, H-6b, H-D, H-E, H-F, H-a', H-b'), 3.01 (q,  $J = 7.5$  Hz, 12H, H-1, H-d, H-B), 2.80 (t,  $J = 7.2$  Hz, 9H, H-e), 2.56 – 2.41 (m, 30H, H-5), 2.35 – 1.29 (m, 96H, H-G, H-H).

**<sup>19</sup>F-NMR** (282 MHz, Chloroform-*d*) keine Signale.

Die Synthese der P2-Serie erfolgte analog zu der P1-Serie. Die Ansatzgrößen sind in Tabelle E 5 aufgelistet.

Tabelle E 5: Ansatzgrößen für das grafting-to von O2 an p(PFPA).

<b>P2-10</b>	<b>p(PFPA)</b>	<b>O2</b>
M [g/mol]	238.01	3108.48
m [mg]	65	84.8919
n [mmol]	0.273098	0.02731
<b>P2-40</b>	<b>p(PFPA)</b>	<b>O2</b>

M [g/mol]	238.01	3108.48
m [mg]	40	208.9647
n [mmol]	0.16806	0.067224
<b>P2-80</b>	<b>p(PFPA)</b>	<b>O2</b>
M [g/mol]	238.01	3108.48
m [mg]	20	208.9647
n [mmol]	0.08403	0.067224
<b>P2-100mer</b>	p(PFPA)	O2
M [g/mol]	238.01	3108.48
m [mg]	77	120.6771
n [mmol]	0.323516	0.038822
<b>P2s</b>	<b>p(PFPA)</b>	<b>O2s</b>
M [g/mol]	238.01	4145.12
m [mg]	14	73.15
n [mmol]	0.0588	0.01765

Tabelle E 6: Resultate der P2-Serie erhalten durch Wasser-GPC und <sup>1</sup>H-NMR.

Polymer	D	Mn	Einbau (GPC)	N <sub>Zucker</sub> (GPC)	N <sub>Zucker</sub> (NMR)
<b>P2-10</b>	1.05	8.678	3%	5	4
<b>P2-40</b>	1.15	38.500	25%	46	50
<b>P2-80</b>	1.05	57.980	40%	72	65
<b>P2-100mer</b>	1.01	22.450	4%	16	12
<b>P2s</b>	1.04	29.500	14%	25	25

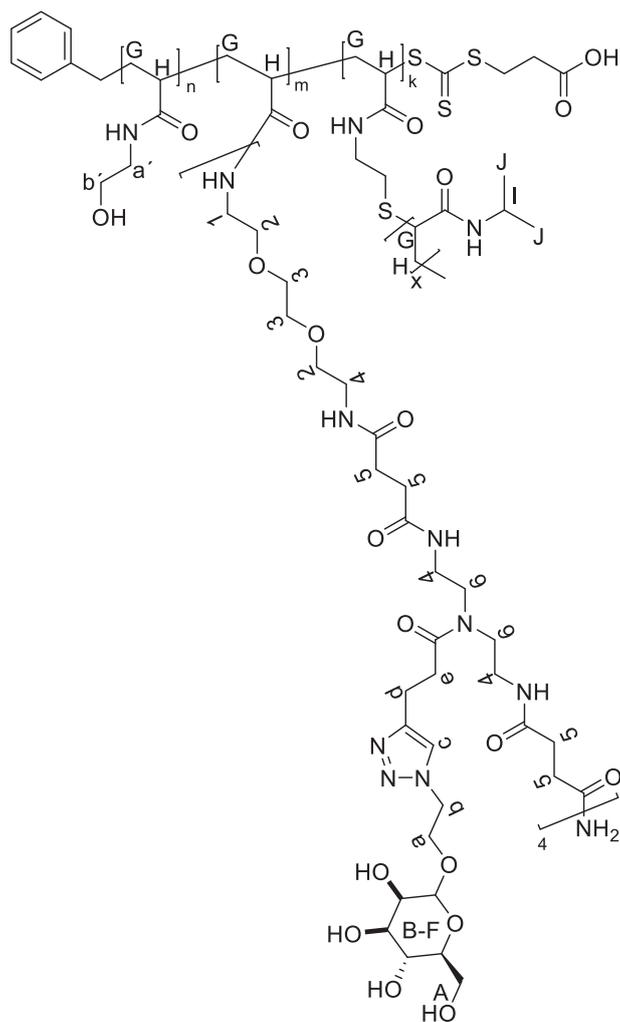
#### Polymere mit tetravalenten Seitenketten und PEG sowie p(NIPAm) Seitenketten

Analog zur oben beschriebenen Methode wurde ein Polymer mit theoretischem Einbau an tetravalenten Seitenketten synthetisiert (Ansatz von P2-10). Nach der Funktionalisierung des Polymers mit dem Glykooligomer wurde die Reaktionslösung in auf drei weitere Behälter mit 3 eq. pro funktionelle Gruppen PEG (P3-PEG), p(NIPAM) (P3-NIPAM) und Ethanolamin (P3-Oligo) verteilt. Die restliche Aufarbeitung erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll.

Tabelle 21: Resultate der P3-Serie erhalten durch Wasser-GPC (a) und DMF-GPC (b) sowie <sup>1</sup>H-NMR.

P3-Serie	D	Mn	N <sub>Seitenketten Polymer</sub>	N <sub>Zucker</sub> (NMR)
<b>P3-Oligo<sup>a</sup></b>	1.07	21.850	4-5	18
<b>P3-NIPAM<sup>b</sup></b>	1.6	17.614	4-5	18
<b>P3-PEG<sup>a</sup></b>	1.2	16.000	4-5	18

P3-NIPAM



**<sup>1</sup>H-NMR**

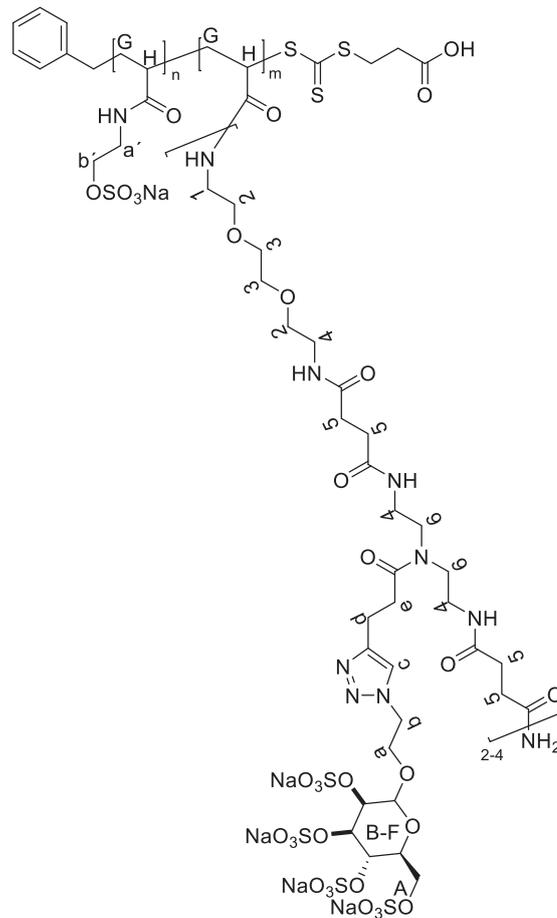
(600 MHz, Deuteriumoxid)  $\delta$  [ppm] = 7.88 (s, 4H, H-c), 4.67 – 4.61 (m, 4H, HA), 3.91 (s, 343, H-l), 3.78 – 3.21 (m, 119H, H-2, H-3, H-4, H-6b, H-D, H-E, H-F, H-a, H-a', H-b'), 3.06 – 2.94 (m, 3H, H-1, H-, d, H-B), 2.79 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H, H-e), 2.56 – 2.41 (m, 10H, H-5), 2.08 (d,  $J = 68.9$  Hz, 70H, H-G), 1.67 (d,  $J = 84.6$  Hz, 94H, H-H), 1.16 (dd,  $J = 10.6, 5.0$  Hz, 465H, H-J).

**<sup>19</sup>F-NMR**

(282 MHz, Chloroform-*d*) keine Signale.



## 5.5 Sulfatisierte Polymere



Für die Sulfatisierung wurden die Polymere P1Neg<sub>50mer</sub> als Negativkontrolle, P1-40 und P2-40 gewählt. Die Sulfatisierung wurde von Sebastian Bauer durchgeführt. Die Polymere zur Sulfatisierung sind in Tabelle E 7 angegeben.

Tabelle E 7: Polymere zur Sulfatisierung.

Name	D	Mn	N Seitenketten	N Zucker (GPC)	N Zucker (NMR)
P1Neg <sub>50mer</sub>	1.01	6.409	-	-	-
P1-40	1.03	20.780	15	21	15
P2-40	1.10	38.500	12-13	46	50

Die sulfatisierten Polymere werden zur Unterscheidung mit einem Präfix „S“, nach folgendem Schema, benannt: P1-40 → SP1-40. Die erfolgreiche Sulfatisierung wurde mittels <sup>1</sup>H-NMR bestätigt (siehe Anhang).

### SPNeg<sub>50mer</sub>

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Deuteriumoxid) δ [ppm] = 7.31 (dt, *J* = 17.8, 8.2 Hz, 0.1H, NH), 4.13 (s, 2H, H-b'), 3.80 – 3.21 (m, 2H, H-a'), 2.39 – 1.30 (m, 3H, H-G, H-H).

## SP1-40

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Deuteriumoxid)  $\delta$  [ppm] = 8.04 (s, 1H, H-c), 5.07 (s, 1H, H-A), 4.50 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H, H-B), 4.42 – 4.19 (m, 2H, H-C, H-D), 4.16 – 3.83 (m, 4H, H-E, H-F, H-a), 3.72 – 3.11 (m, 12H, H-, H-2, H-3, H-4, H-6b), 2.95 (d,  $J = 18.1$  Hz, 2H, H-1), 2.84 (s, 1H, H-d, H-e), 2.45 (s, 9H, H-5), 2.12 – 0.82 (m, 7H, H-G, H-H).

## SP2-40

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Deuteriumoxid)  $\delta$  [ppm] = 8.03 (s, 1H, H-c), 5.08 (s, 2H, H-A), 4.50 (d,  $J = 9.4$  Hz, 1H, H-B), 4.42 – 4.17 (m, 2H, H-C, H-D), 4.13 – 3.84 (m, 5H H-E, H-F, H-a), 3.74 – 3.17 (m, 22H H-, H-2, H-3, H-4, H-6b), 2.99 (s, 2H), 2.80 (s, 2H, H-1), 2.44 (s, 8H, H-5), 1.89 – 0.60 (m, 7H, H-G, H-H).

## 5.6 Polymersynthese mittels *grafting-through*

### Poly(hydroxyethyl acrylamid)

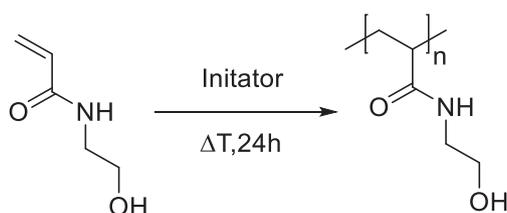


Abbildung E 1: Radikalische Polymerisation von HEAm.

Um die besten Bedingungen für die Copolymerisation mit dem Makromonomeren festzustellen, wurden verschiedene Homopolymerisationen von HEAm durchgeführt. Die Ansätze wurden analog zur folgenden Tabellen durchgeführt. Hierbei wurde jede Reaktion 30 mit Stickstoff durchgespült und anschließend für 24h bei 51 °C gerührt. Die Reaktion wurde mittels einfrieren in flüssigen Stickstoff und fluten mit Luft abgebrochen. Es wurden verschiedene Ansätze mit verschiedenen Initiator- und Lösemittelmengen durchgeführt.

Tabelle E 8: Polymerisation von Hydroxyethyl acrylamid mit 5 mol% Initiatormenge und 20, 15 und 10 gew% DMF.

Homopolymer	N-Hydroxyethyl-Acrylamide	VA-65 (5mol%)
M [g/mol]	115,06	248,37
m [g]	0,46	0,05
n [mol]	0,004	0,0002

Tabelle E 9: Ergebnisse der Wasser GPC für die Homopolymerisation von Hydroxyethyl acrylamid bei verschiedenen Konzentrationen und Initiatormengen.

Initiator / DMF	D	Mn [g/mol]
In <sub>5mol%</sub> 20gew%	2.945	33000

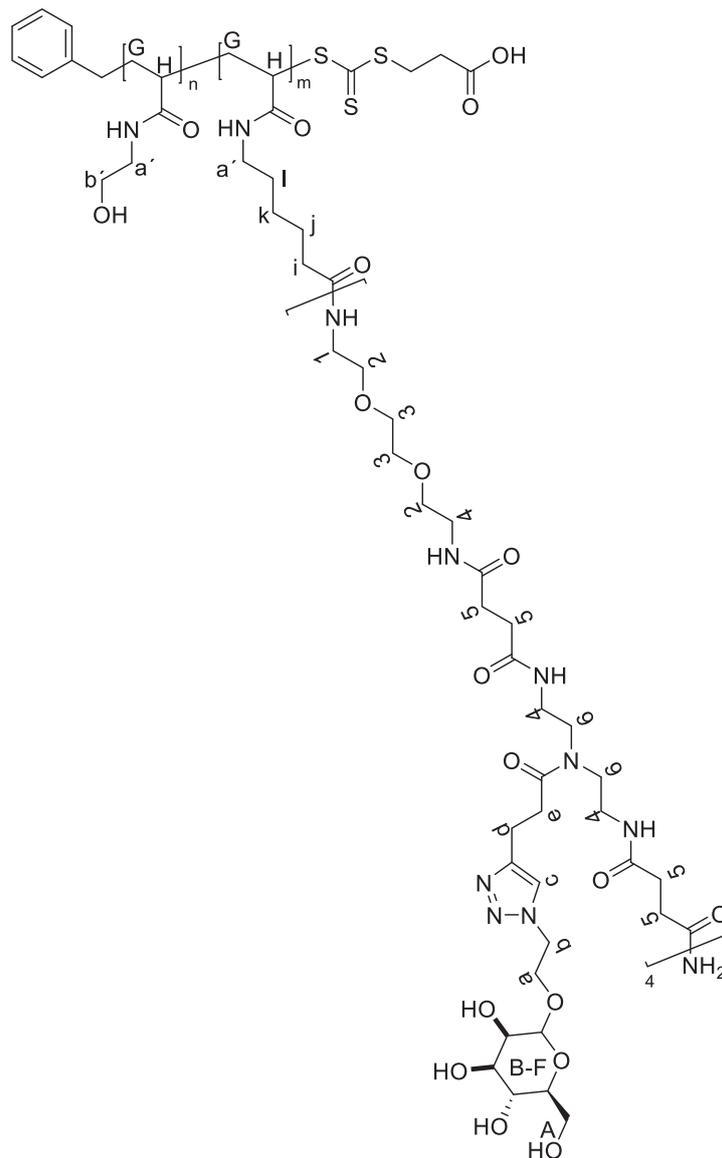
<b>In<sub>5mol%</sub> 15gew%</b>	2.446	22000
<b>In<sub>5mol%</sub> 10gew%</b>	2.085	17000
<b>In<sub>2mol%</sub> 20gew%</b>	2.654	31000
<b>In<sub>2mol%</sub> 15gew%</b>	2.762	27000
<b>In<sub>2mol%</sub> 10gew%</b>	1.916	22000

*Tabella E 10: : Resultate der Wasser GPC für die Homopolymerisation von Hydroxyethyl acrylamid bei verschiedener Initiatormenge.*

<b>Polymerisation</b>	<b>D</b>	<b>Mn (g/mol)</b>
<b>In<sub>2mol%</sub> 10gew%</b>	2.103	20.980
<b>In<sub>1mol%</sub> 10gew%</b>	1.926	26.570
<b>In<sub>0.5mol%</sub> 10gew%</b>	1.884	32.060

Alle weiteren Polymerisationen wurden mit 0.5 mol% Initiatormenge mit einer Konzentration von 10 gew% in DMF durchgeführt.

Copolymerisation von HEAm mit M1 und M2



Die Polymerisationen wurden analog zur Polymerisation von HEAm in DMF einer 10 gew% Lösung durchgeführt. Ein beispielhafter Ansatz ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle E 11: Ansatz der Copolymerisation von HEAm und M2 mit einem theoretischen Einbau von 15%.

Copo 15%	N-Hydroxyethyl-Acrylamide	M2	VA-65 (0.5mol%)
M [g/mol]	115,06	928,49	248,37
m [mg]	18,41	26,32	0,23
n [mmol]	0,16	0,028	0,0009

Die Polymere wurden drei Tage gegen Wasser Dialysiert [MWCO: 1500] und anschließend gefriergetrocknet und mittels Wasser GPC und NMR analysiert. Bei größeren Makromonomer-Anteil sank die Ausbeute von 35% bis auf 0%. Ein exemplares NMR ist im Anhang aufgelistet.

## <sup>1</sup>H NMR

(300 MHz, Deuteriumoxid)  $\delta$  [ppm] = 7.79 (s, 4H, H-c), 4.55 (s, 13H, H-A), 4.01 (dd,  $J = 10.4, 4.4$  Hz, 7H, H-a), 3.88 – 3.72 (m, 15H, H-a, H-C), 3.72 – 3.00 (m, 337H H-2, H-3, H-4, H-6b, H-D, H-E, H-F, H-a', H-b'), 2.92 (t,  $J = 7.1$  Hz, 18H, H-1, H-d, H-B), 2.71 (t,  $J = 7.5$  Hz, 12H, H-e), 2.42 (dd,  $J = 9.7, 4.5$  Hz, 36H, H-5, H-i), 2.17 (d,  $J = 7.7$  Hz, 24H, H-l, H-j), 1.76 – 1.06 (m, 191H, H-G, H-H).

Ab einem Einbau von über 15 % ergab sich in der Wasser GPC ein bimodales System, welches auf ein Polymergemisch, vermutlich aus pHEAm und Glykokammpolymer, schließen lässt (siehe Anhang).

## 6 Verzeichnis

### 6.1 NMR

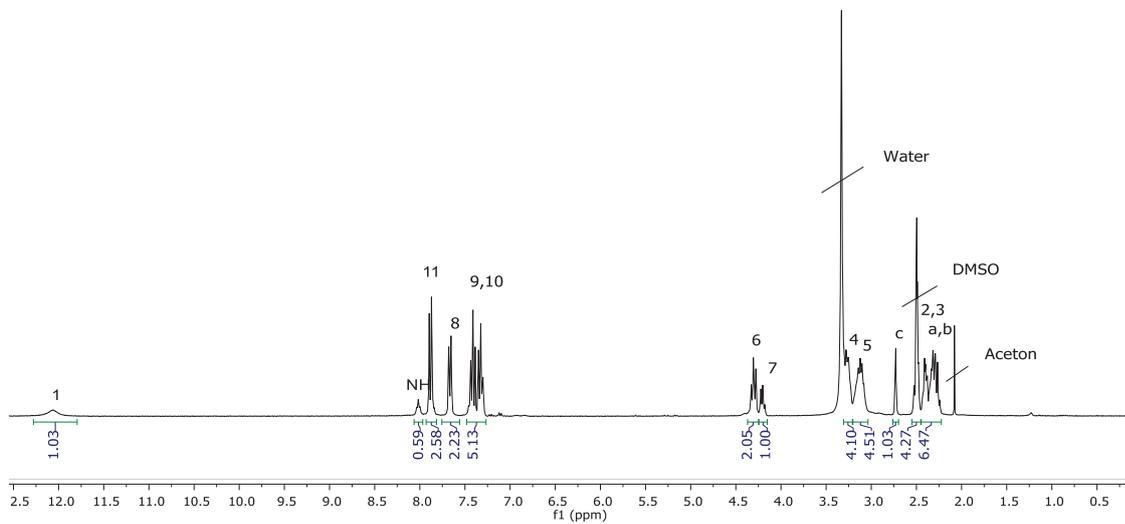


Abbildung E 2: <sup>1</sup>H-NMR von 1.

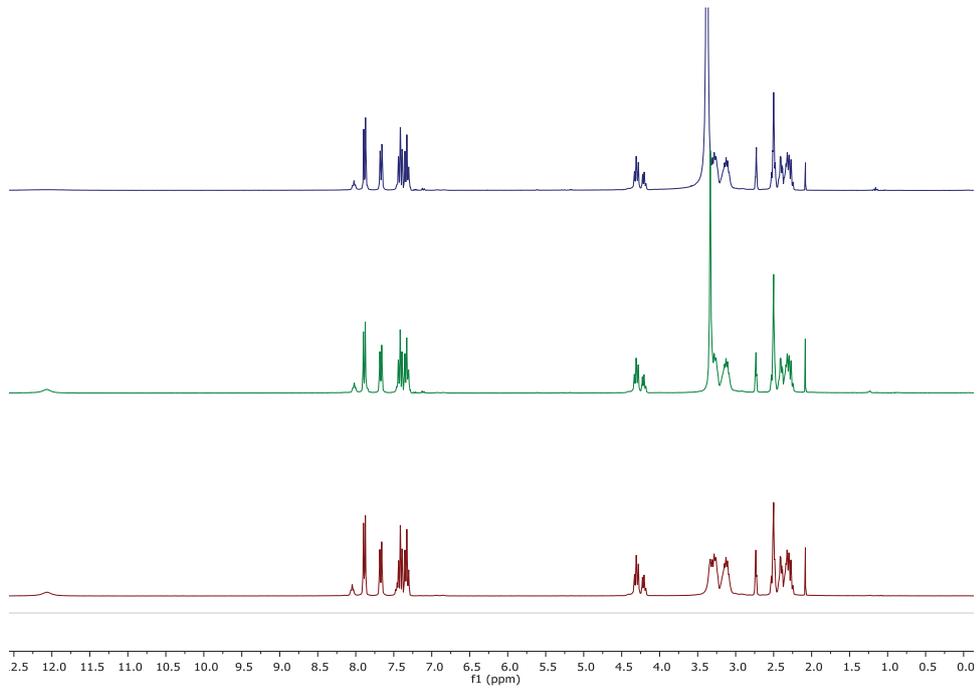


Abbildung E 3:  $^1\text{H-NMR}$  von 1 vor der Zurückgewinnung (blau), nach der manuellen Zurückgewinnung (grün) und nach der automatisierten Zurückgewinnung (rot).

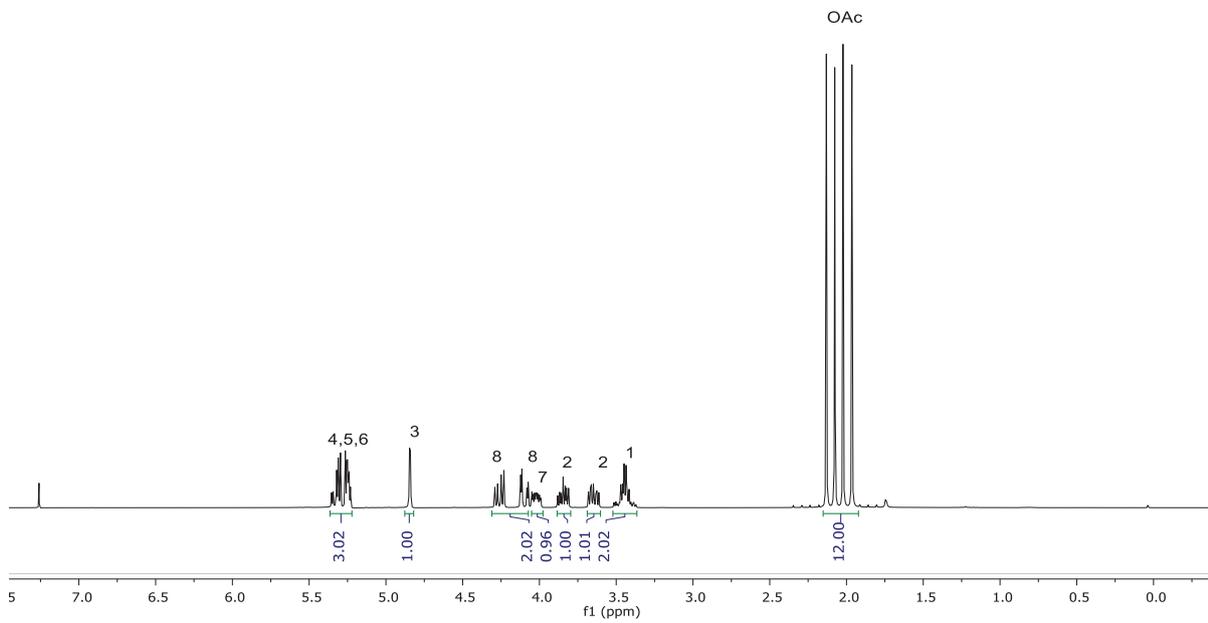


Abbildung E 4:  $^1\text{H-NMR}$  von 3.

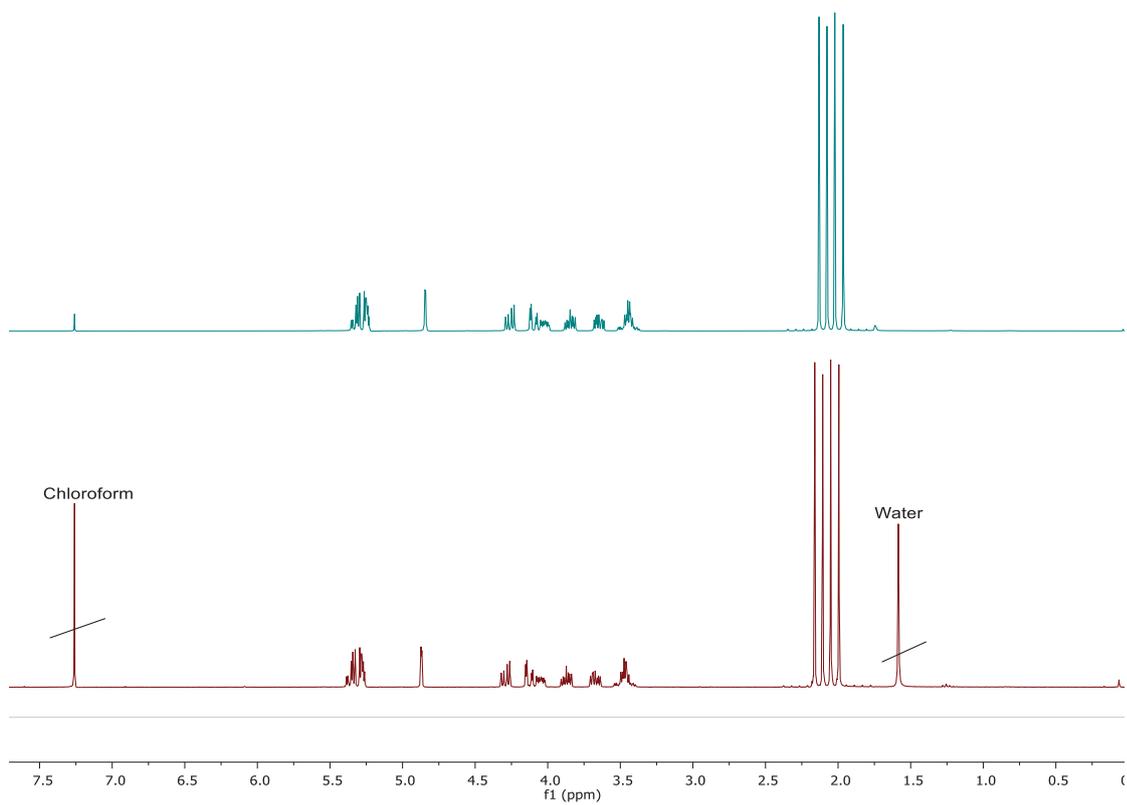


Abbildung E 5:  $^1\text{H-NMR}$  von 3 als Ausgangsmaterial (grün) und nach der Zurückgewinnung (rot).

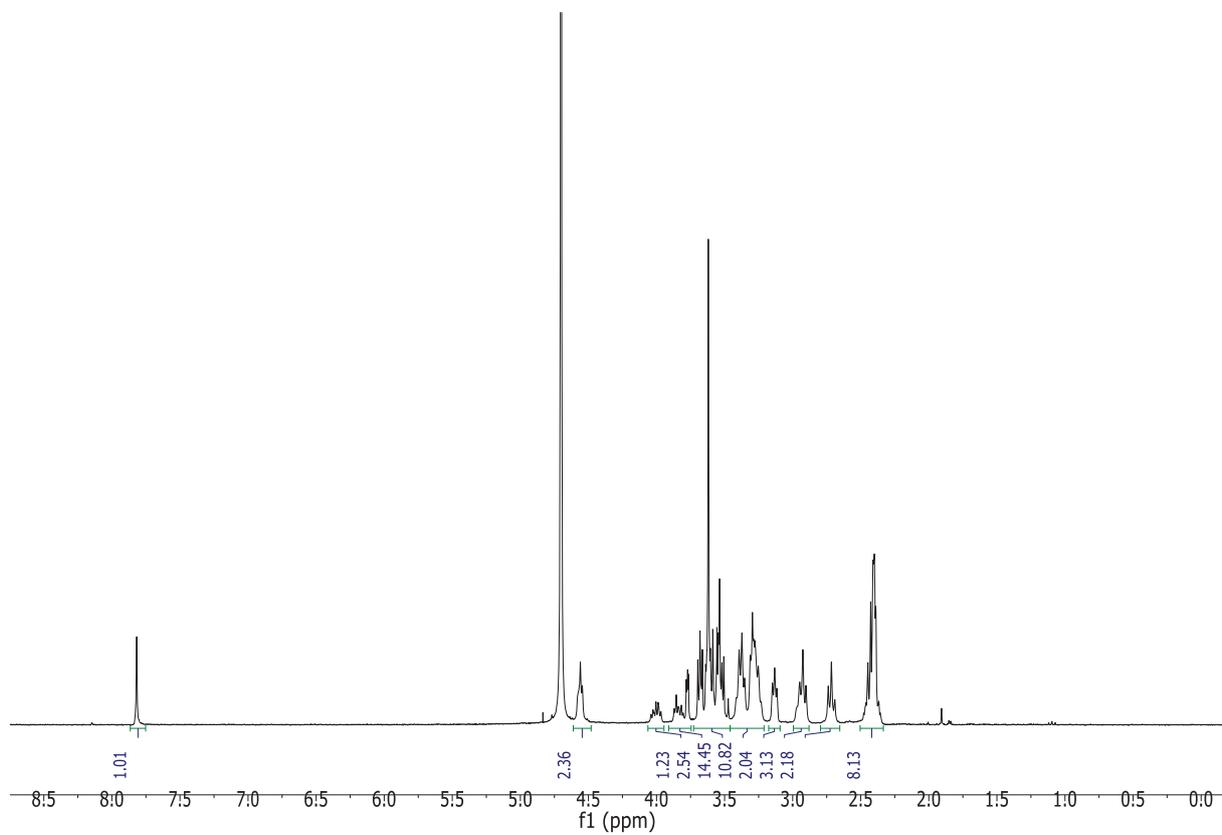


Abbildung E 6:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, Deuterium Oxid) von O.

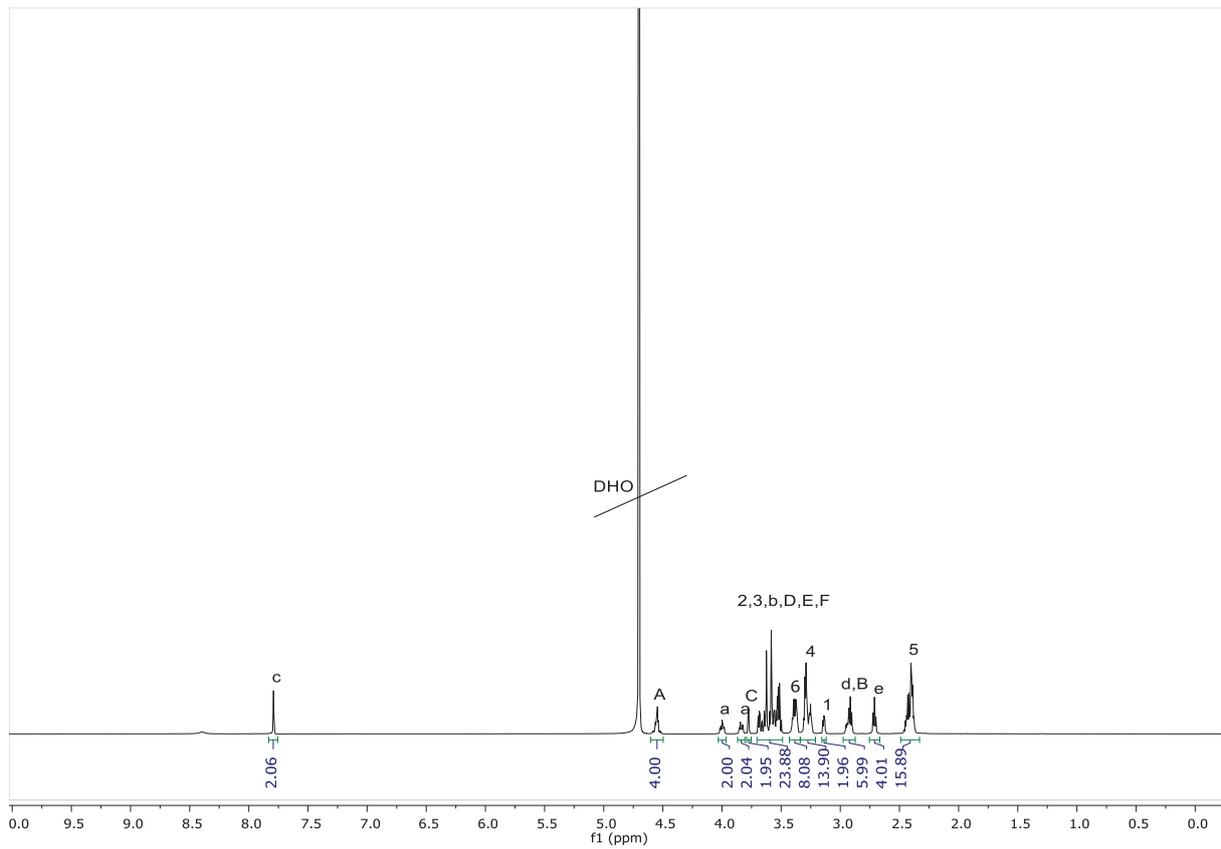


Abbildung E 7:  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, Deuterium Oxid) von O1.

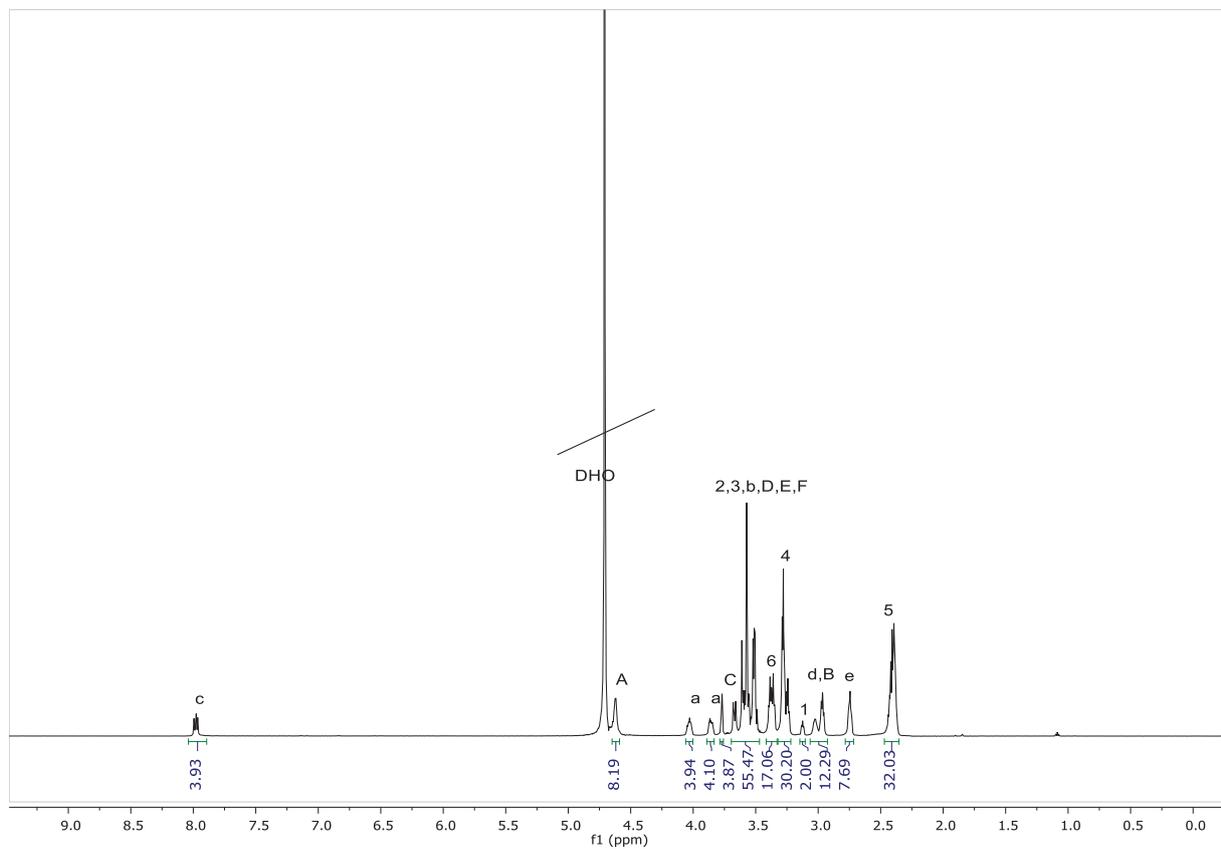


Abbildung E 8:  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, Deuteriumoxid) von O2.

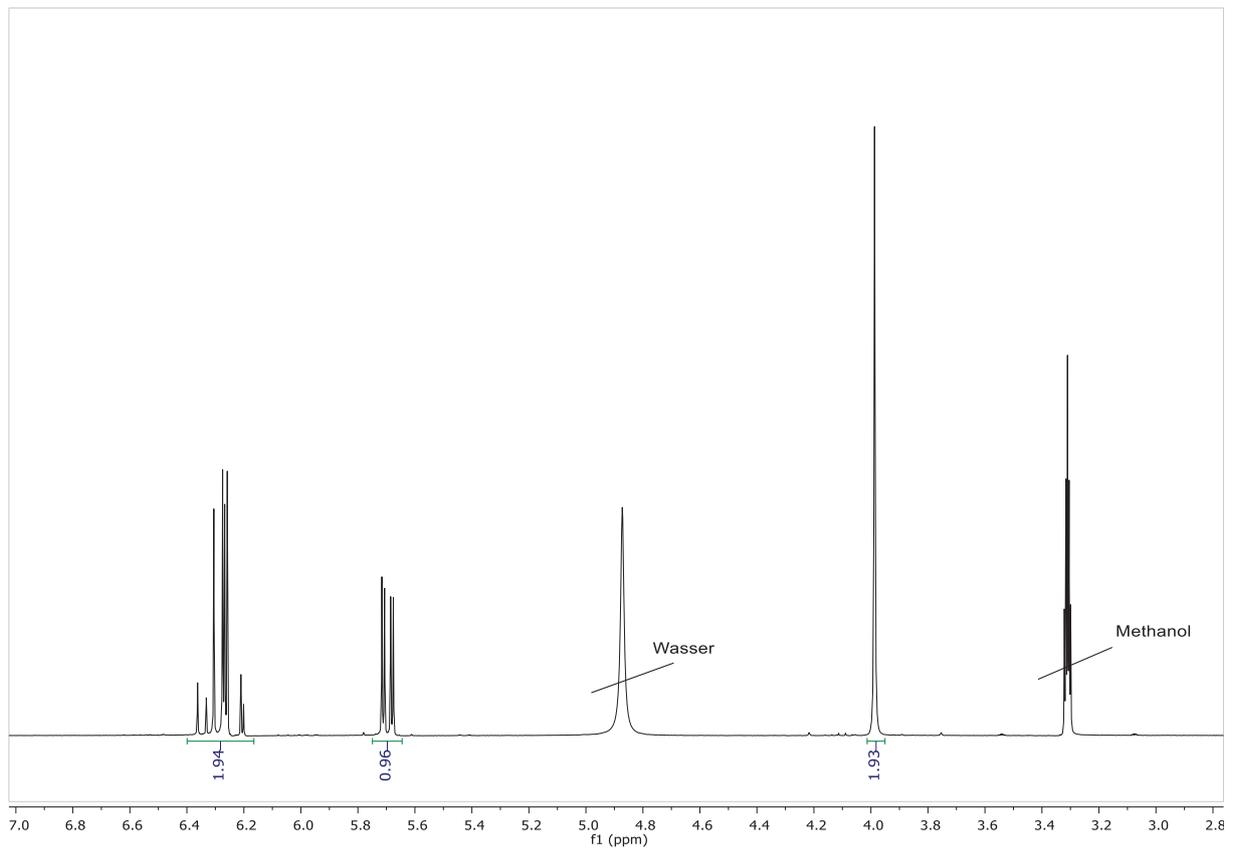


Abbildung E 9:  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, Deuteriumoxid) von A1.

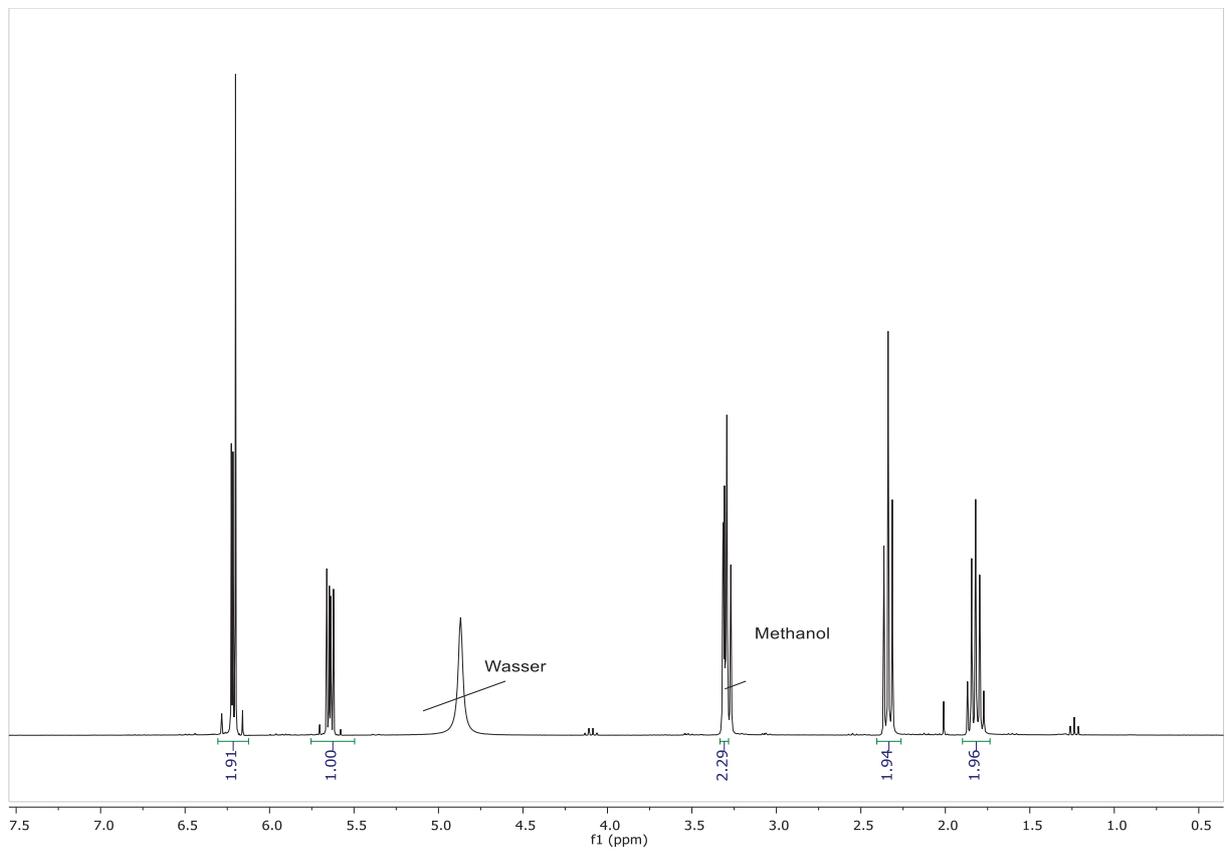


Abbildung E 10:  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, Deuteriumoxid) von A2.

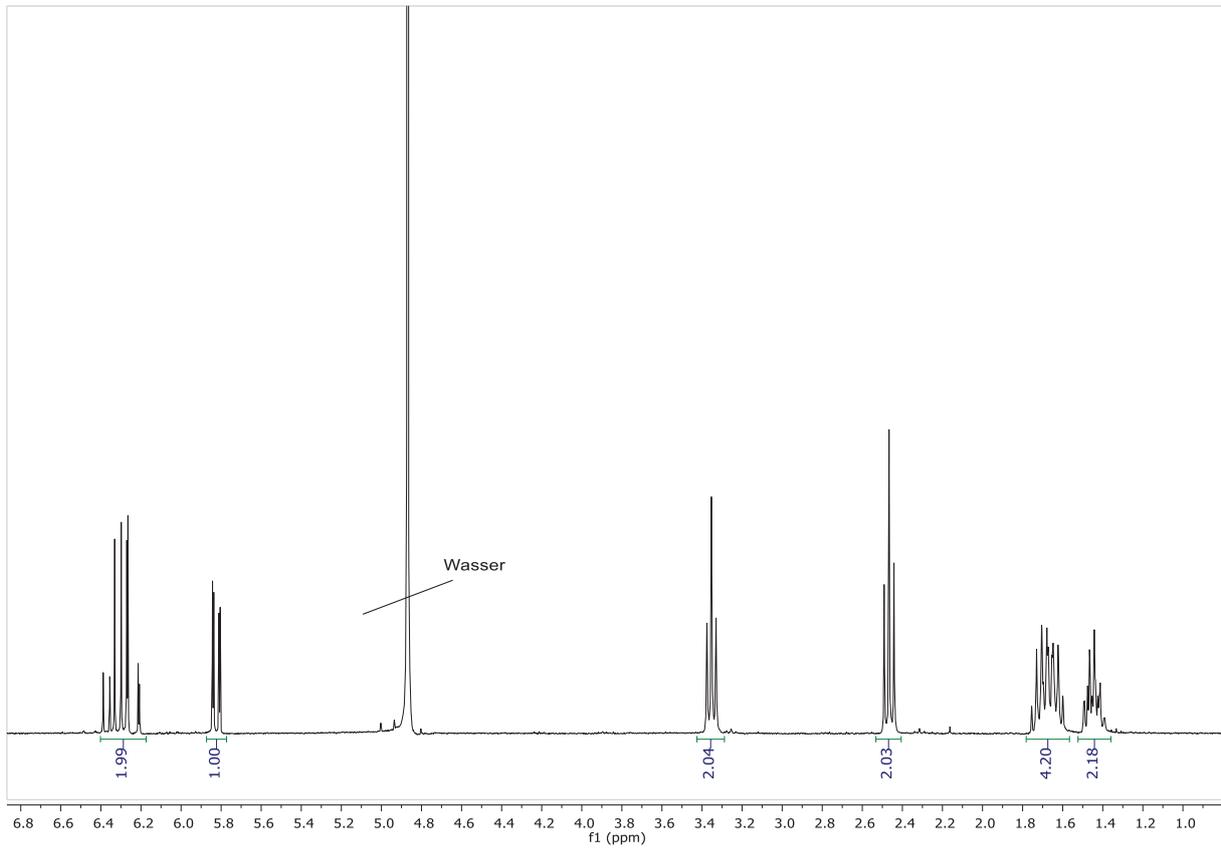


Abbildung E 11:  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, Deuteriumoxid) von A3.

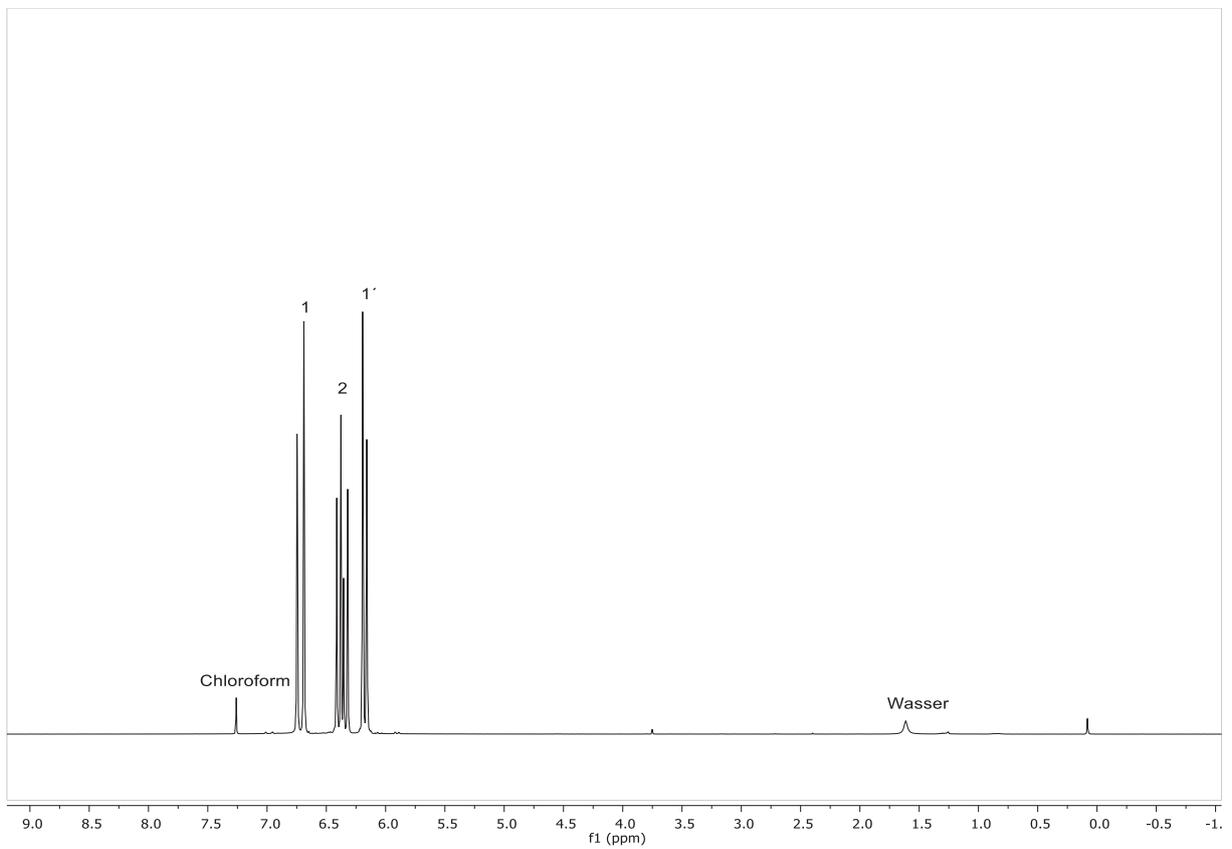


Abbildung E 12:  $^1\text{H-NMR}$  von PPFPA.

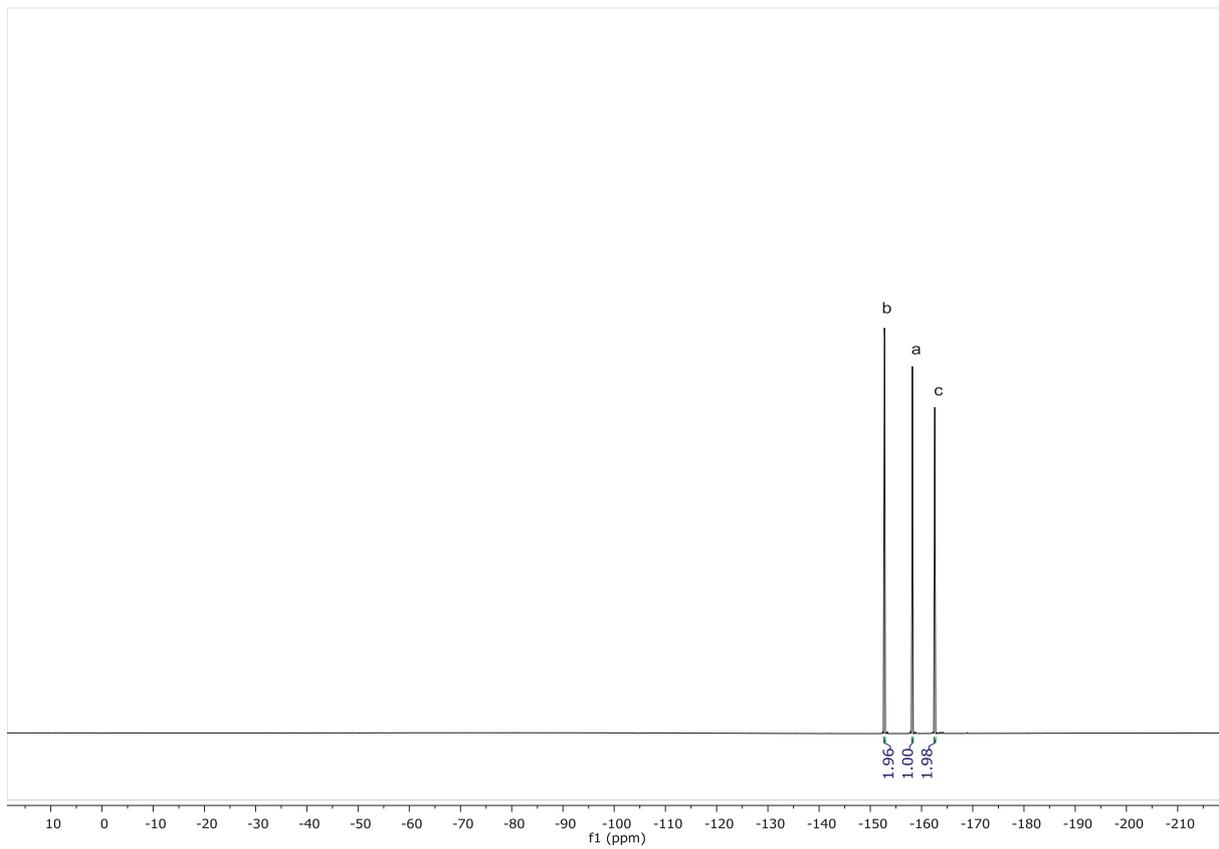


Abbildung E 13: <sup>19</sup>F-NME von PFPA.

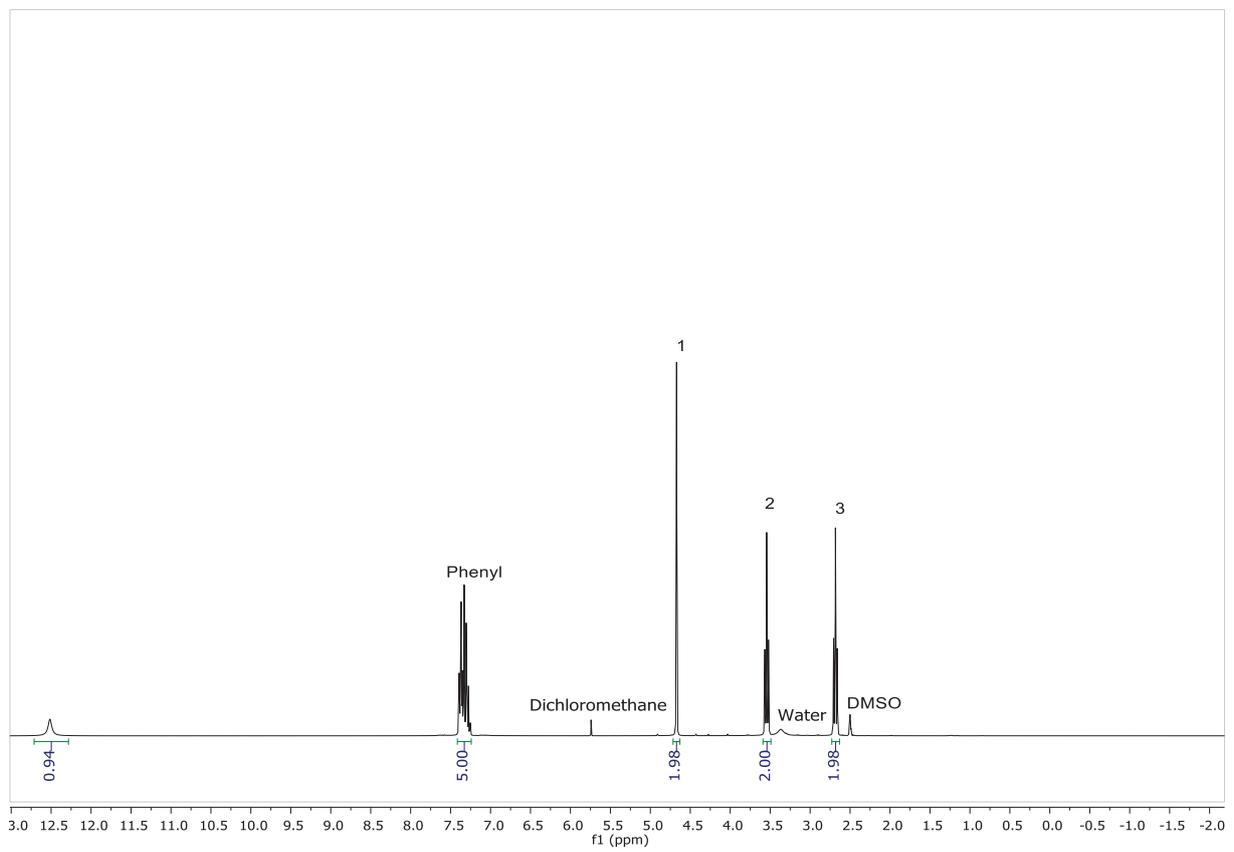


Abbildung E 14: <sup>1</sup>H-NME von BSPA.

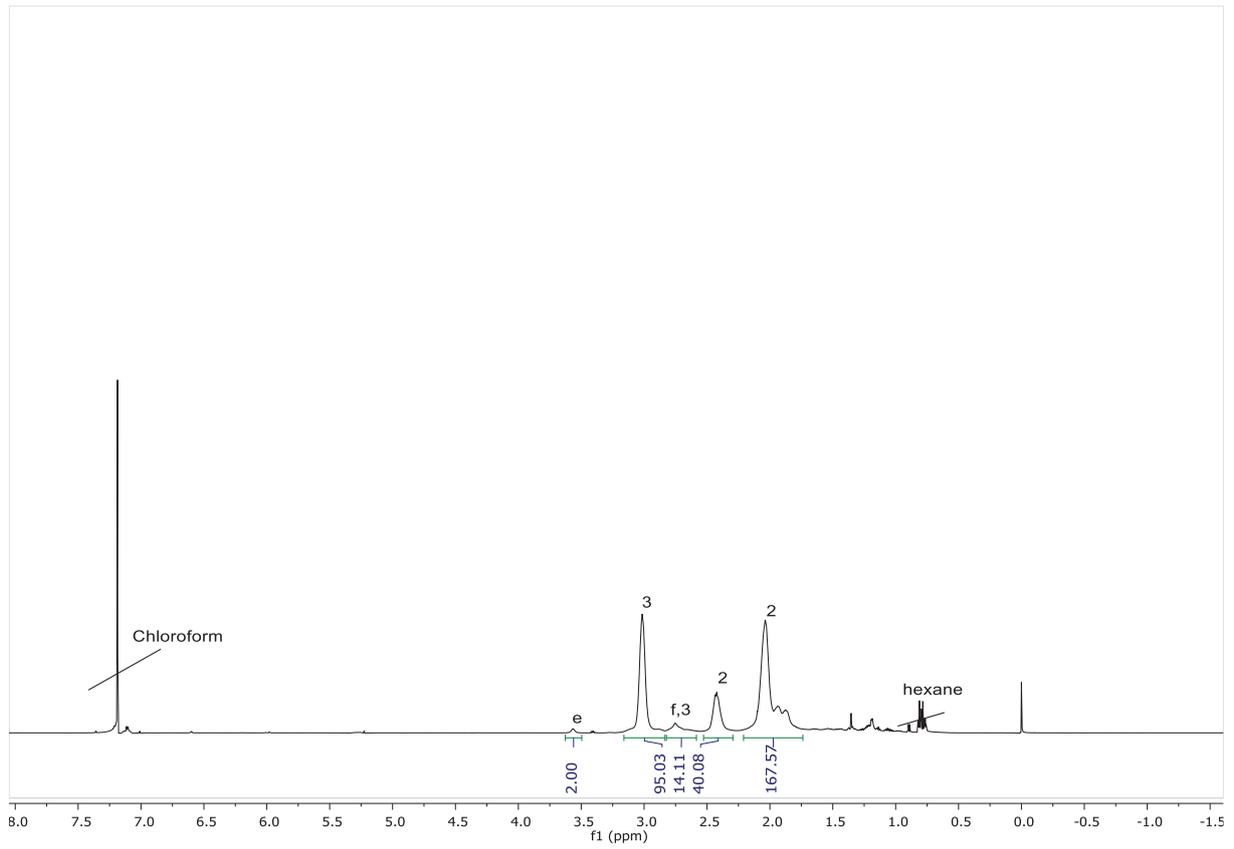


Abbildung E 15:  $^1\text{H}$ -NMR von  $p(\text{PFPA})$  mein einem  $\text{Pn}$  von 92 bestimmt durchH-NMR.

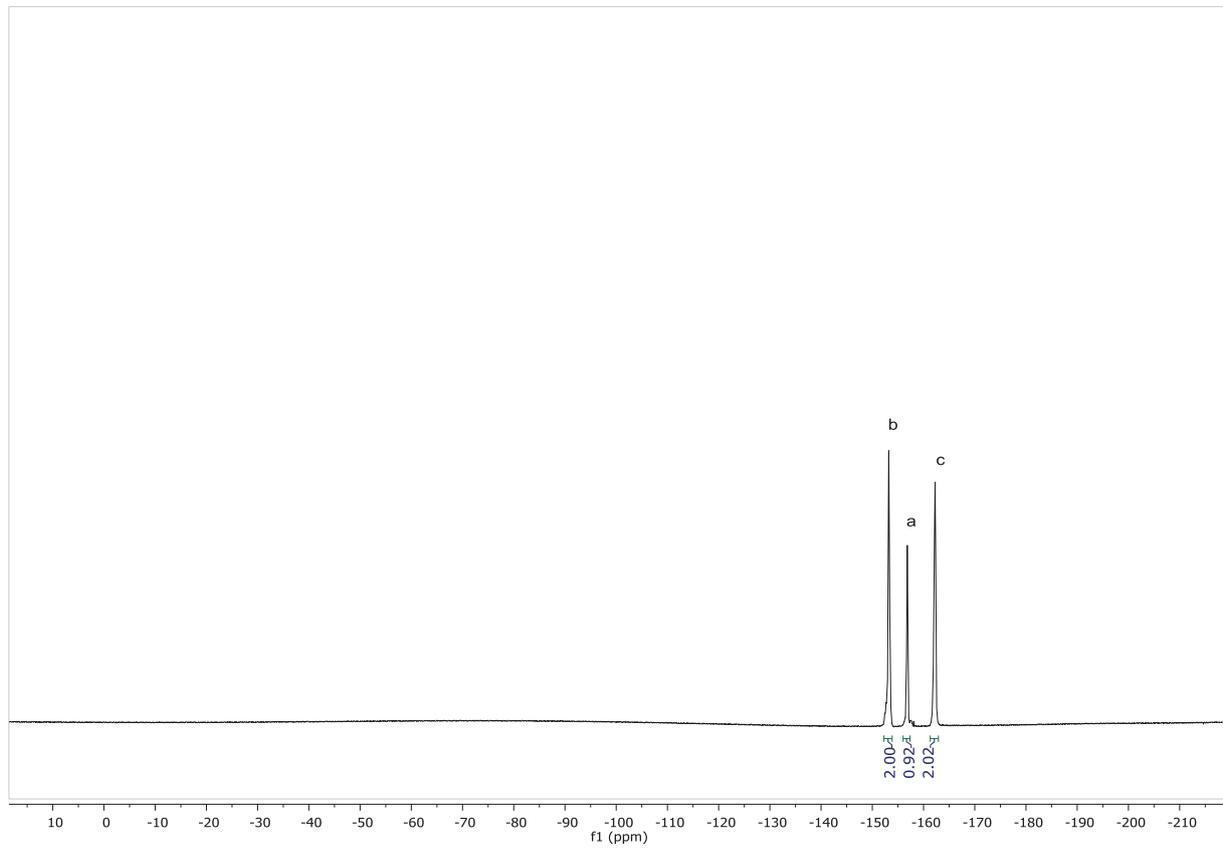


Abbildung E 16:  $^{19}\text{F}$ -NMR von  $p(\text{PFPA})$  mein einem  $\text{Pn}$  von 92 bestimmt durchH-NMR.

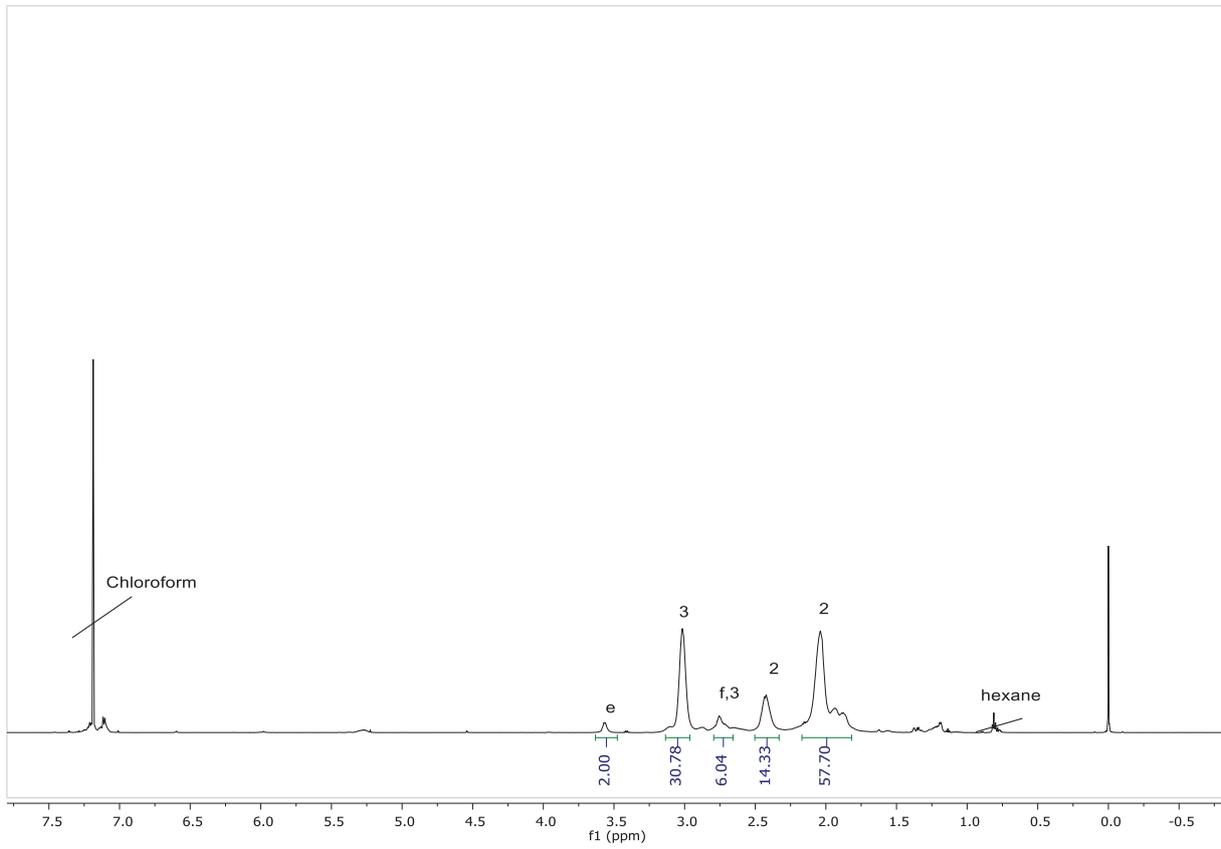


Abbildung E 17:  $^1\text{H-NMR}$  von  $p(\text{PFPA})$  in einem  $\text{Pn}$  von 40 bestimmt durch  $\text{NMR}$ .

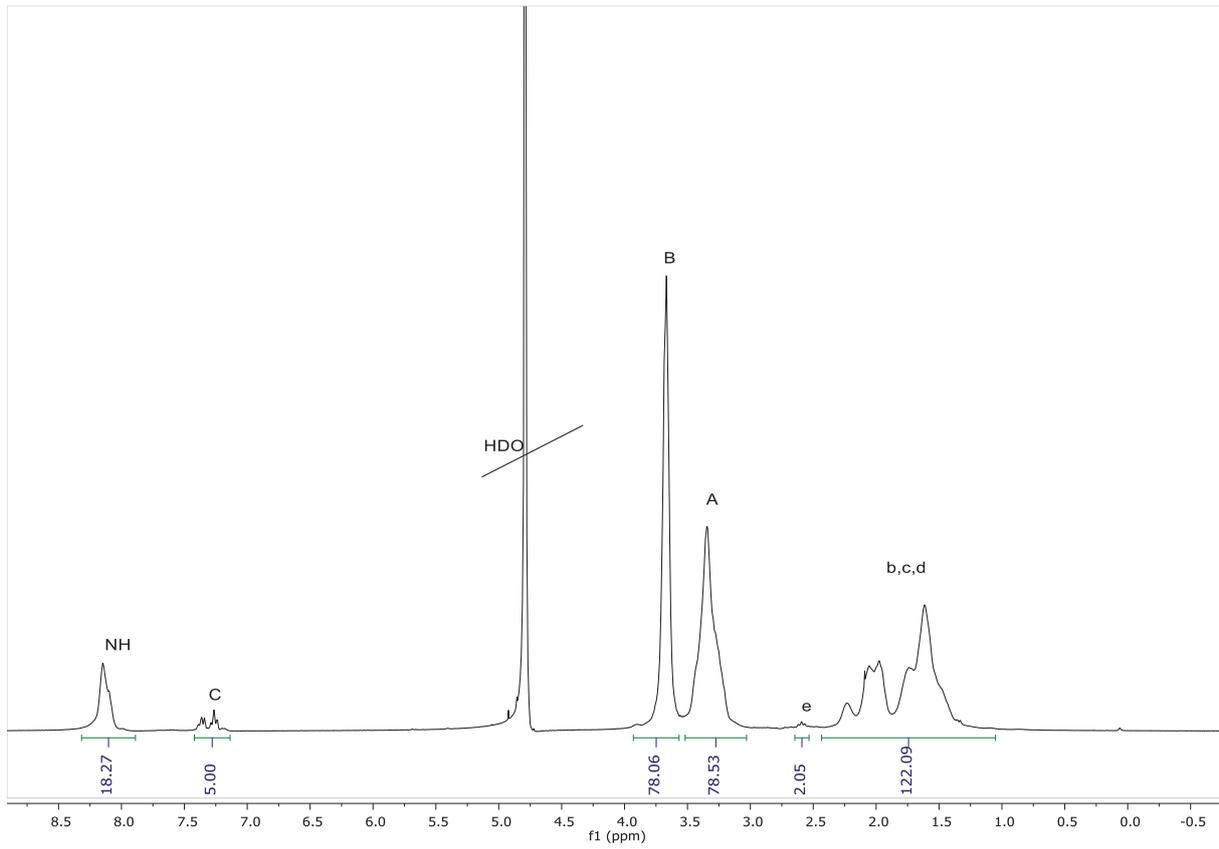


Abbildung E 18:  $^1\text{H}$ -NMR von der negative Kontrolle mit einem Pn von 40 bestimmt durch NMR.

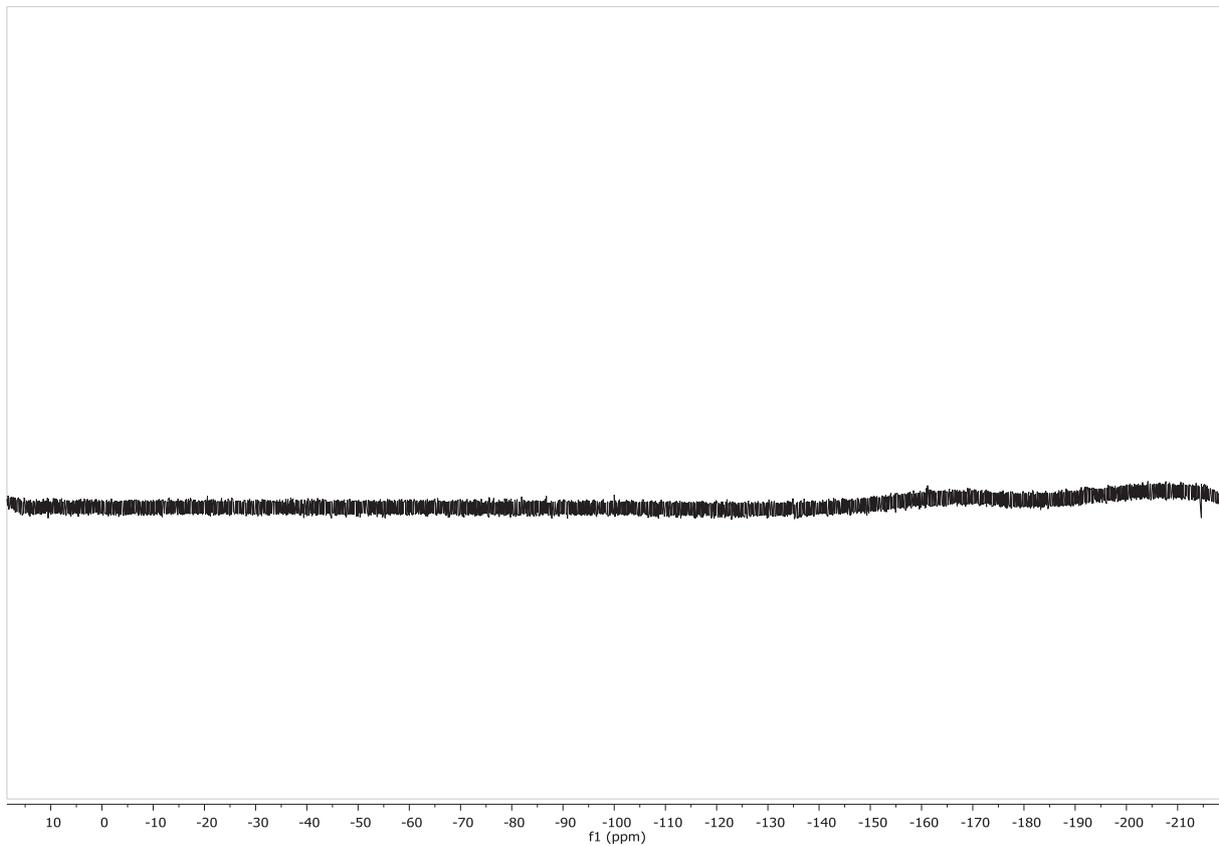


Abbildung E 19:  $^{19}\text{F}$ -NMR von der negative Kontrolle mit einem Pn von 40 bestimmt durch NMR.

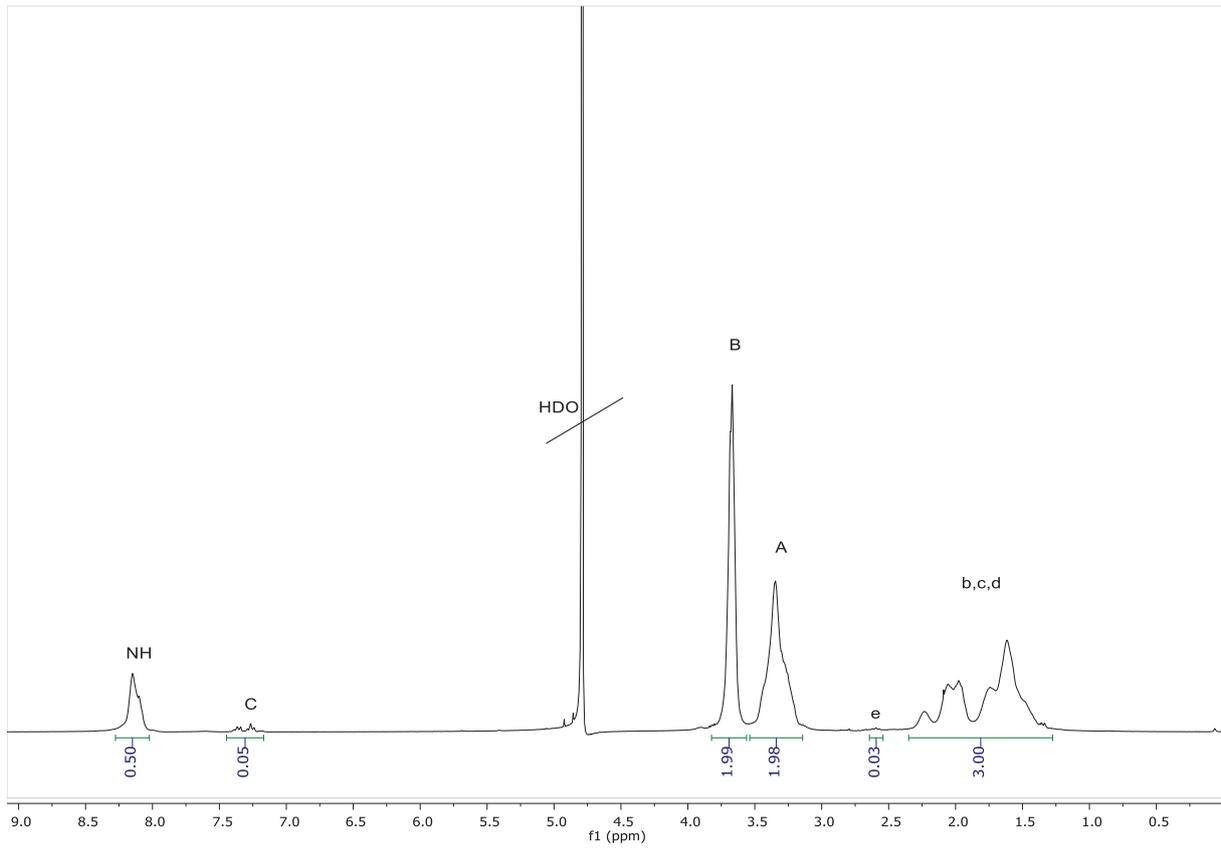


Abbildung E 20:  $^1\text{H}$ -NMR von der negative Kontrolle mit einem Pn von 92 bestimmt durchH-NMR.

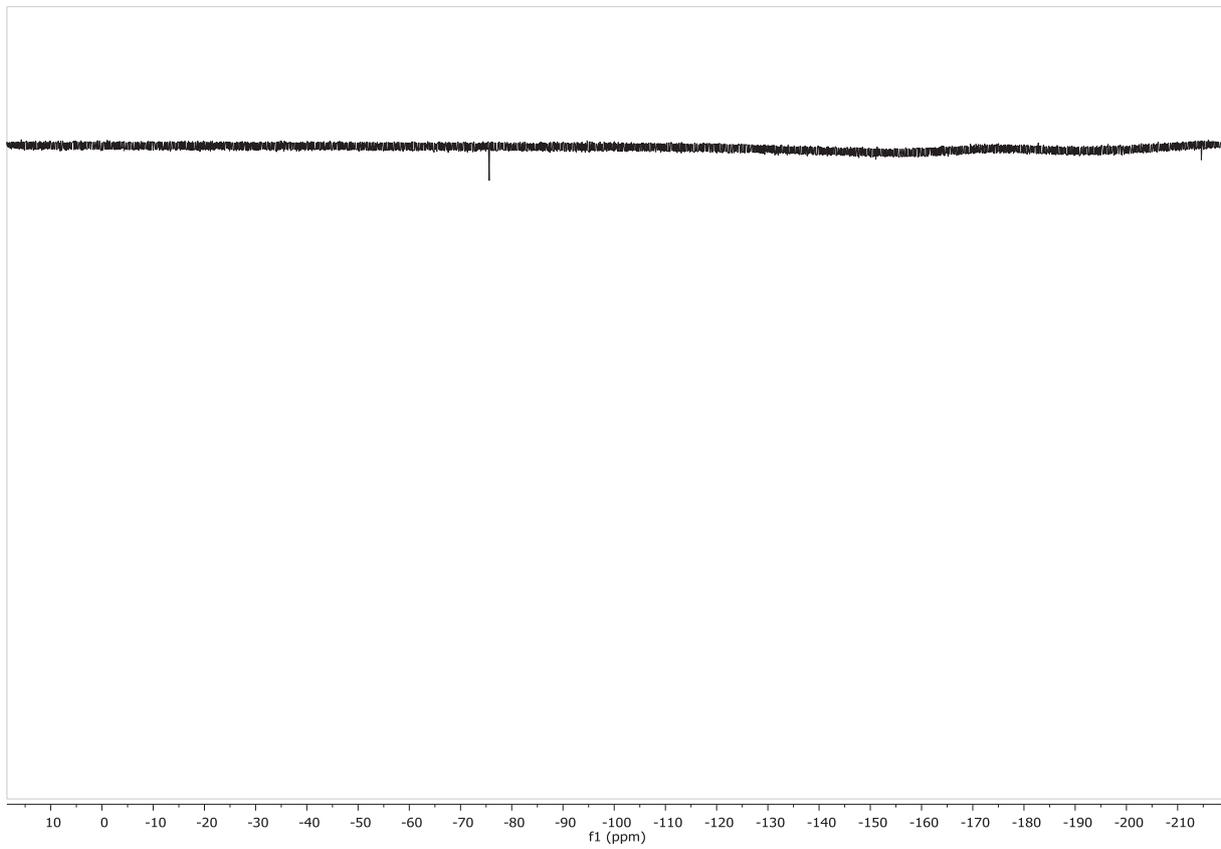


Abbildung E 21:  $^{19}\text{F}$ -NMR von der negative Kontrolle mit einem Pn von 40 bestimmt durchH-NMR.

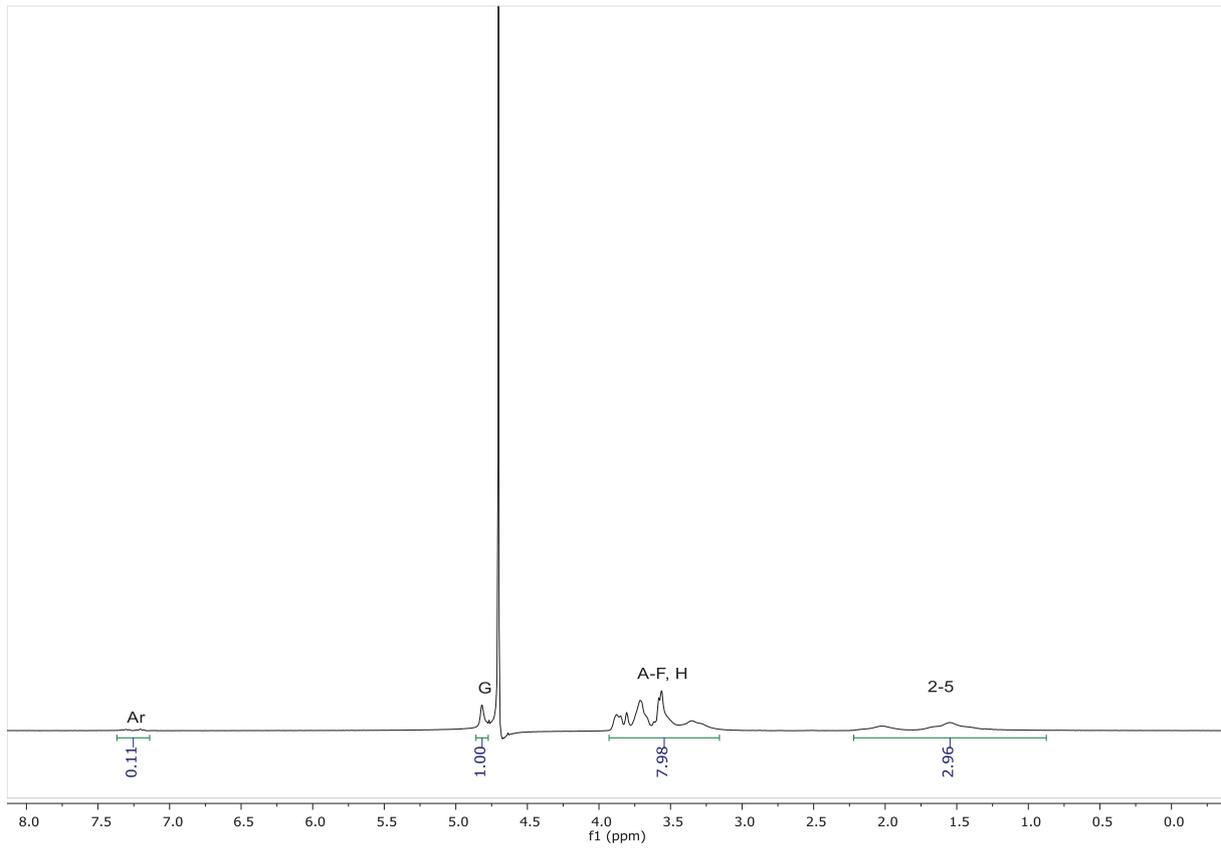


Abbildung E 22:  $^1\text{H-NMR}$  von pMan mit einem Pn von 43 bestimmt durch  $^1\text{H-NMR}$ .

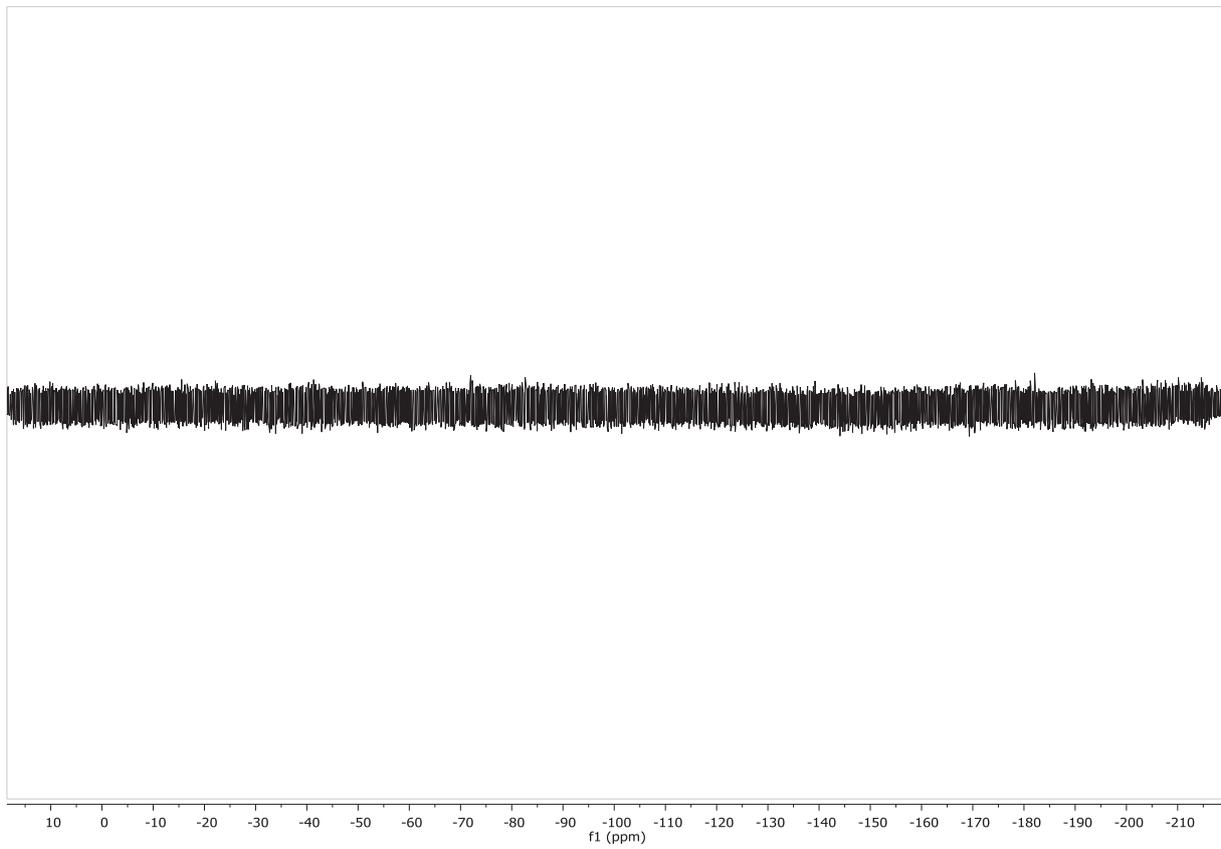


Abbildung E 23:  $^{19}\text{F-NMR}$  von pMan.

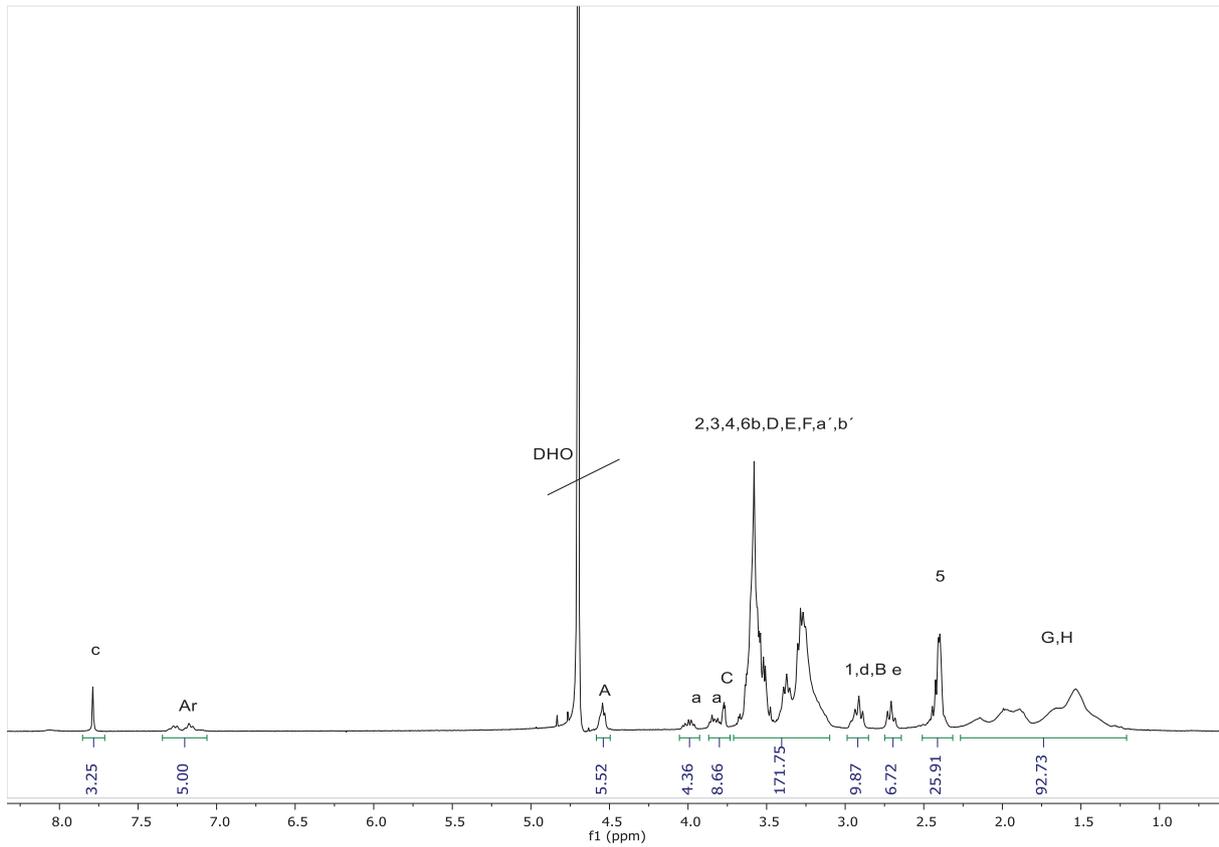


Abbildung E 24:  $^1\text{H}$ -NMR vom Polymer mit 10% [Th.] Einbau an divalenten Seitenketten.

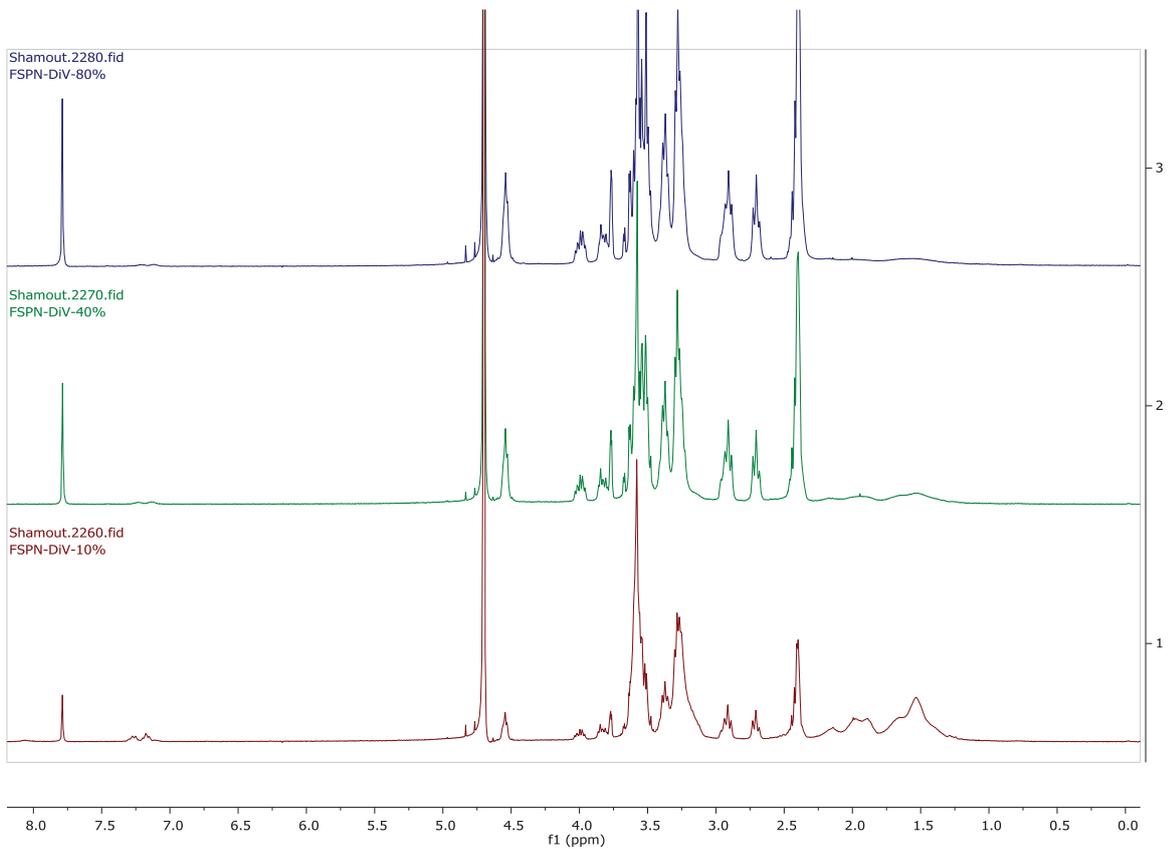


Abbildung E 25:  $^1\text{H}$ -NMR vom Polymer mit 10%, 40% und 80% [Th.] Einbau an divalenten Seitenketten.

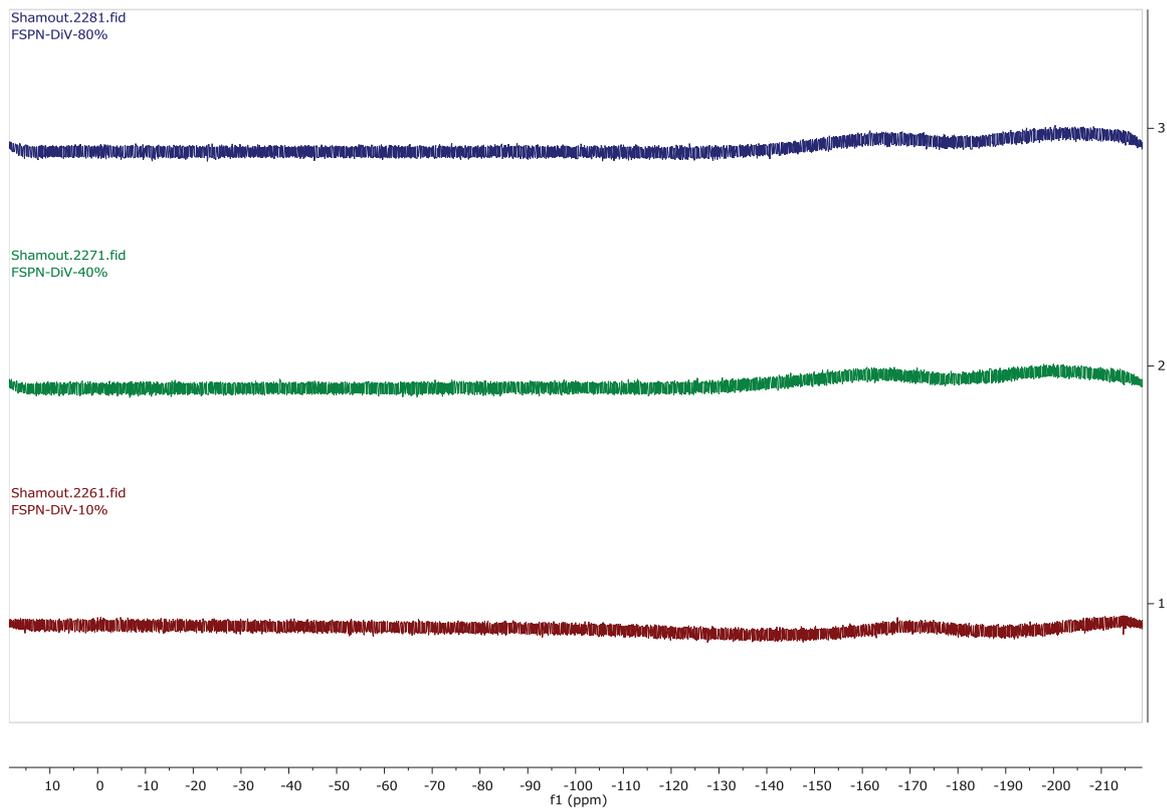


Abbildung E 26:  $^{19}\text{F}$ -NMR vom Polymer mit 10%, 40% und 80% [Th.] Einbau an divalenten Seitenketten.

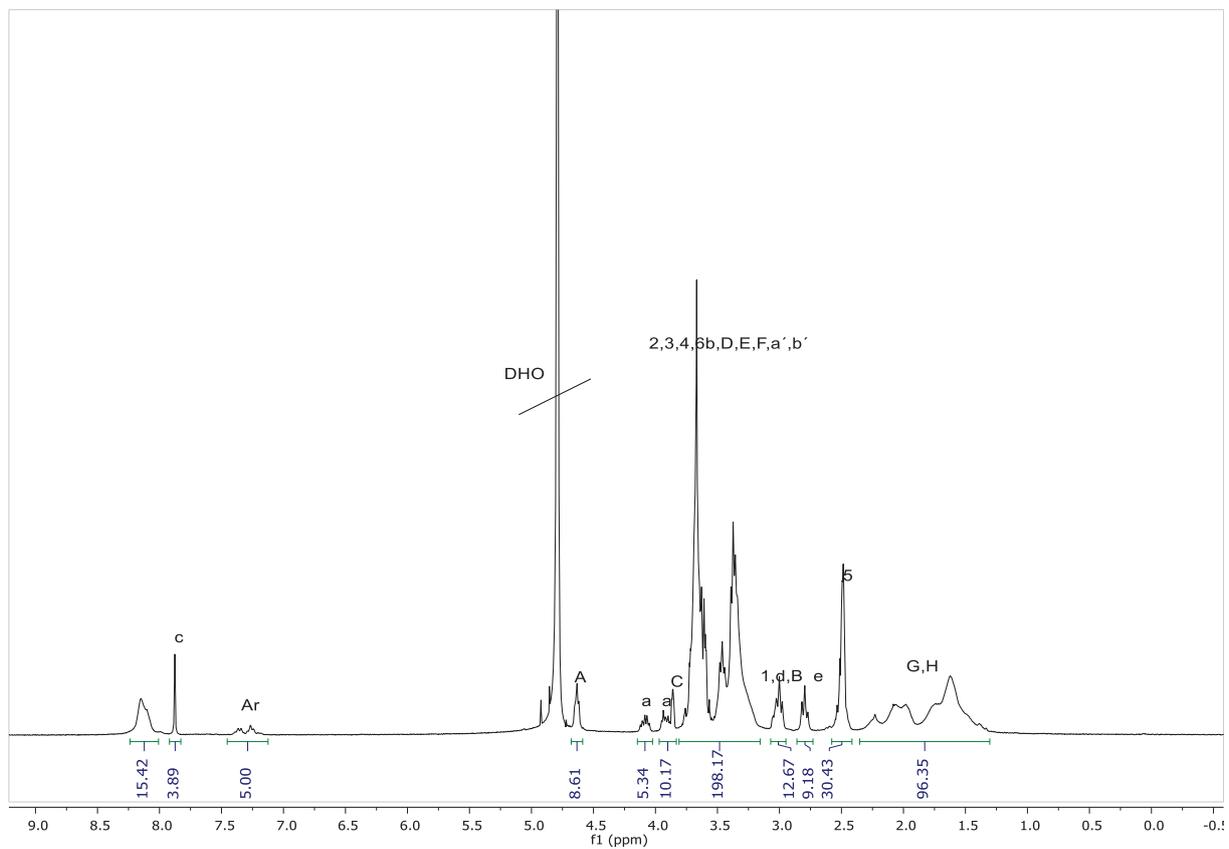


Abbildung E 27:  $^1\text{H}$ -NMR vom Polymer mit 10% [Th.] Einbau an tetravalenten Seitenketten.

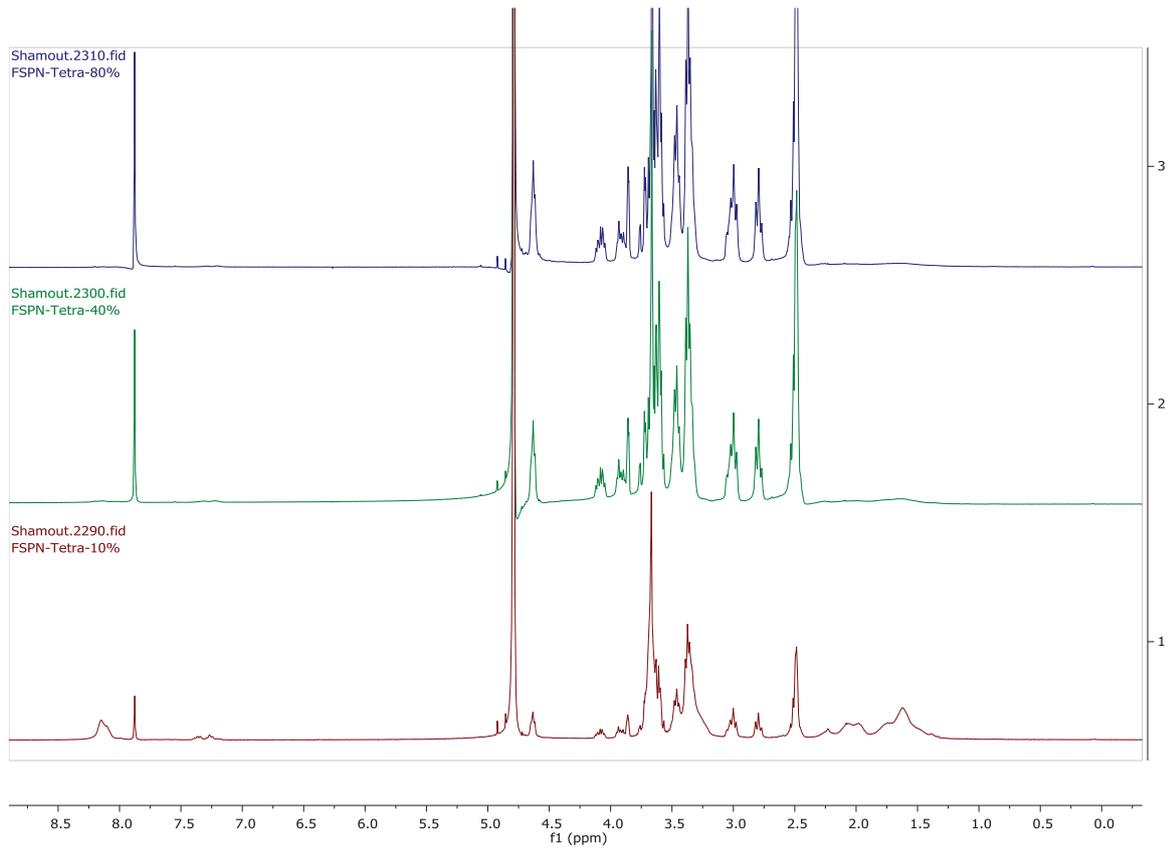


Abbildung E 28:  $^1\text{H-NMR}$  vom Polymer mit 10%, 40% und 80% [Th.] Einbau an tetravalenten Seitenketten.

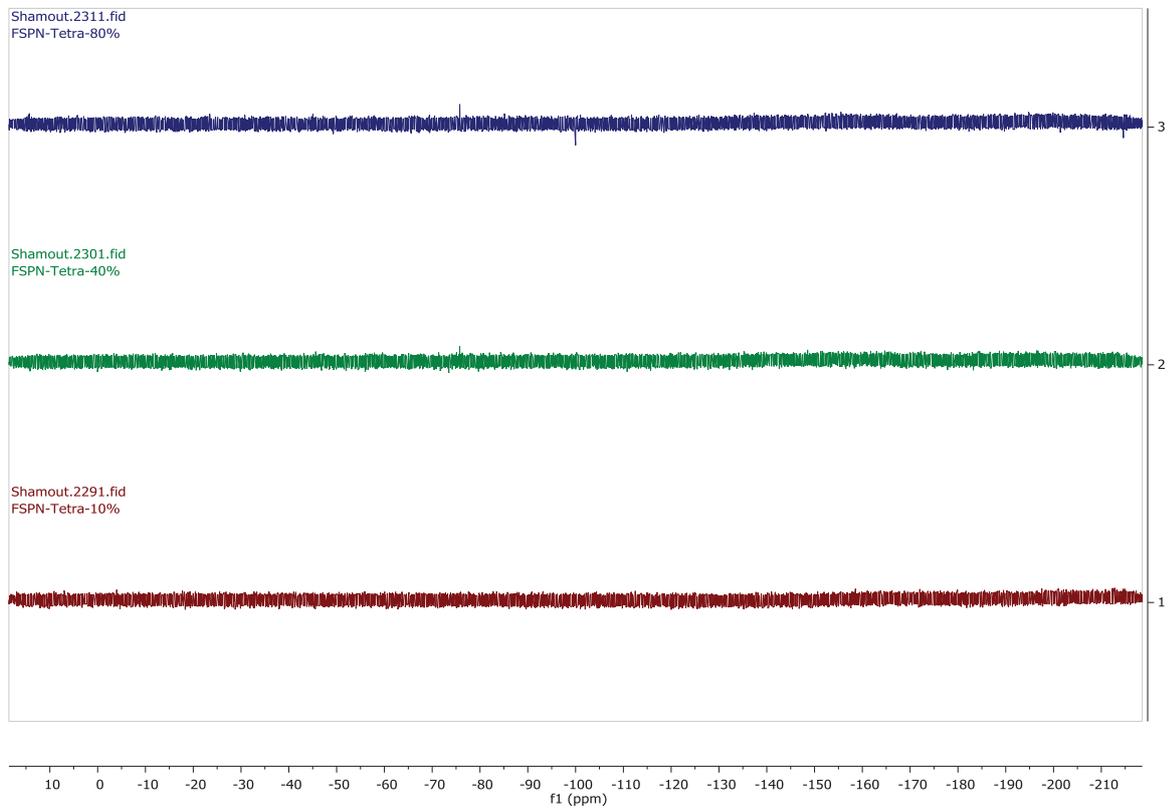


Abbildung E 29:  $^{19}\text{F-NMR}$  vom Polymer mit 10%, 40% und 80% [Th.] Einbau an tetravalenten Seitenketten.

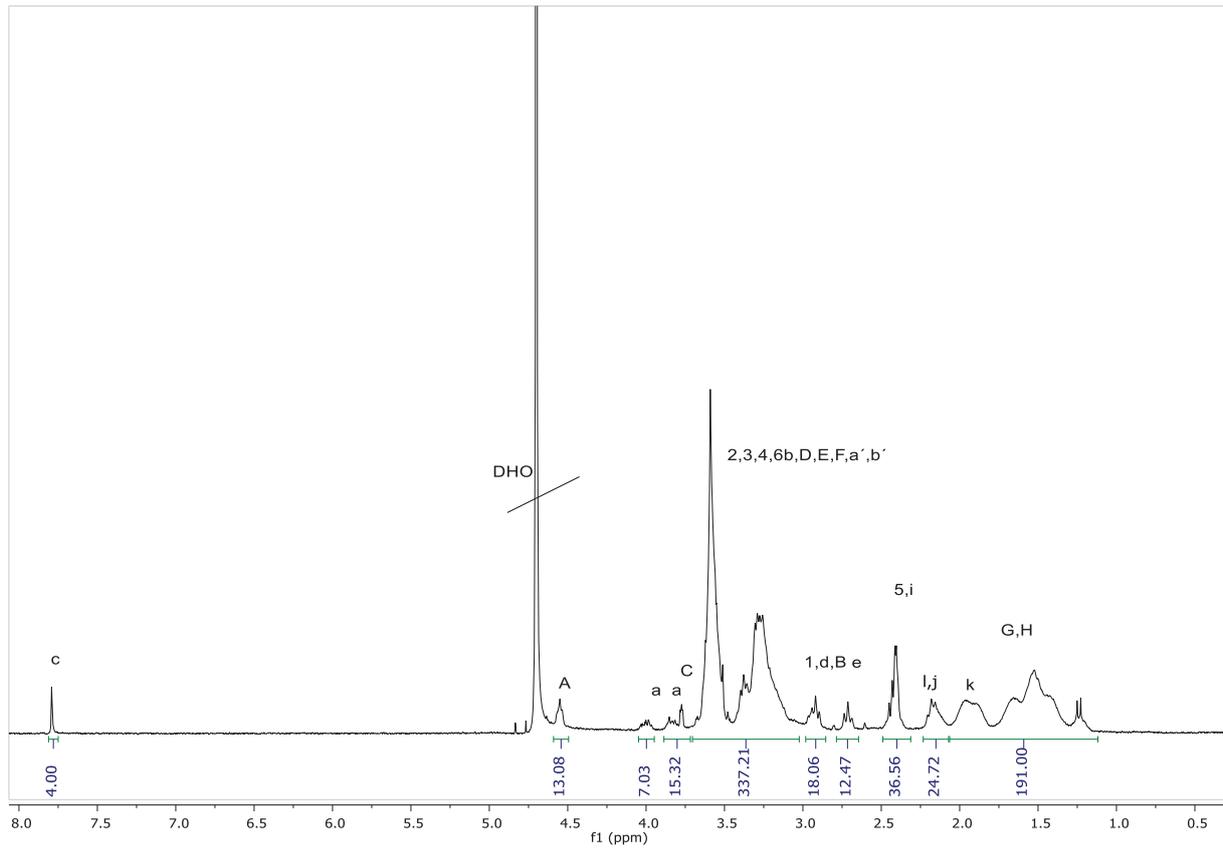


Abbildung E 30: Exemplares  $^1\text{H-NMR}$  vom Polymer synthetisiert mittels grafting-through Technik mit einem theoretischen M2-Einbau von 10%.

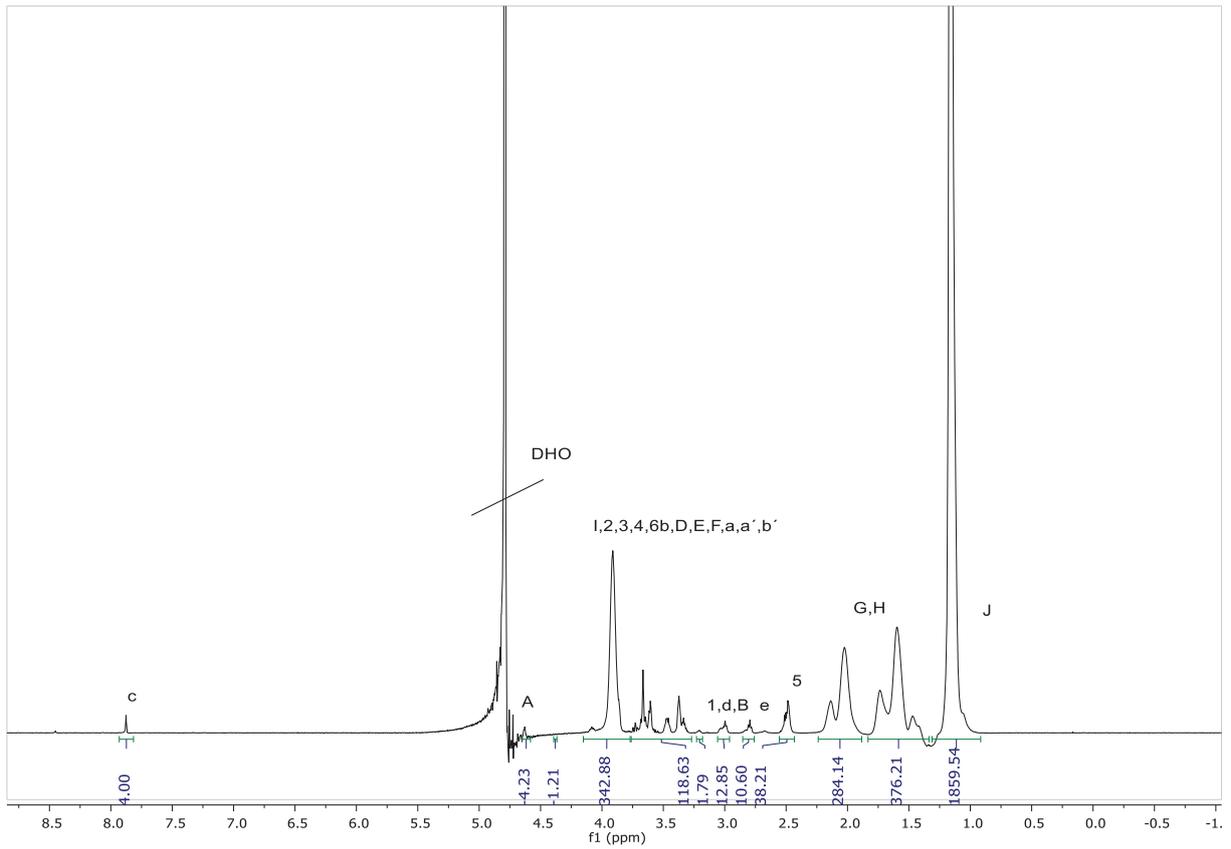


Abbildung E 31:  $^1\text{H}$ -NMR von P3-NIPAM mit tetraivalenten Glycololigomer- und NIPAM-Seitenketten.

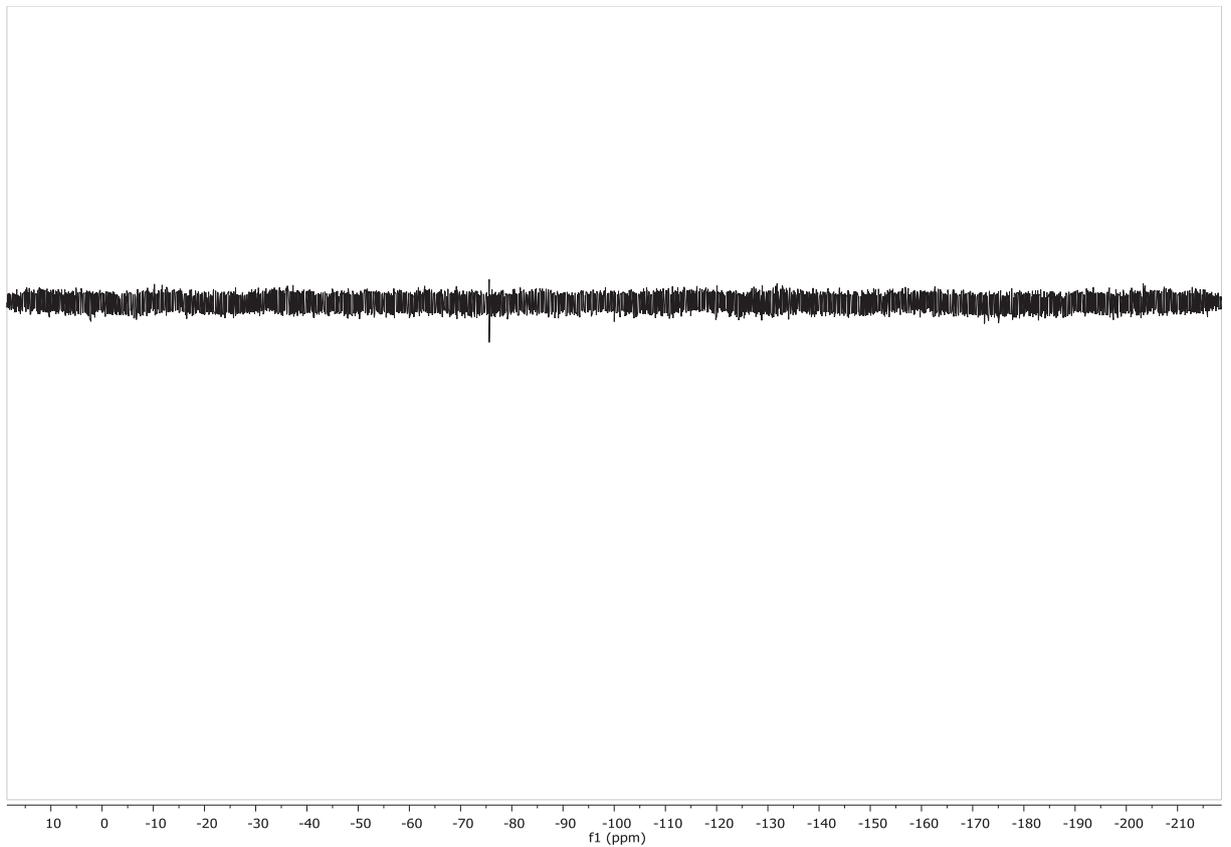


Abbildung E 32:  $^{19}\text{F}$ -NMR von P3-NIPAM mit tetraivalenten Glycololigomer- und NIPAM-Seitenketten.

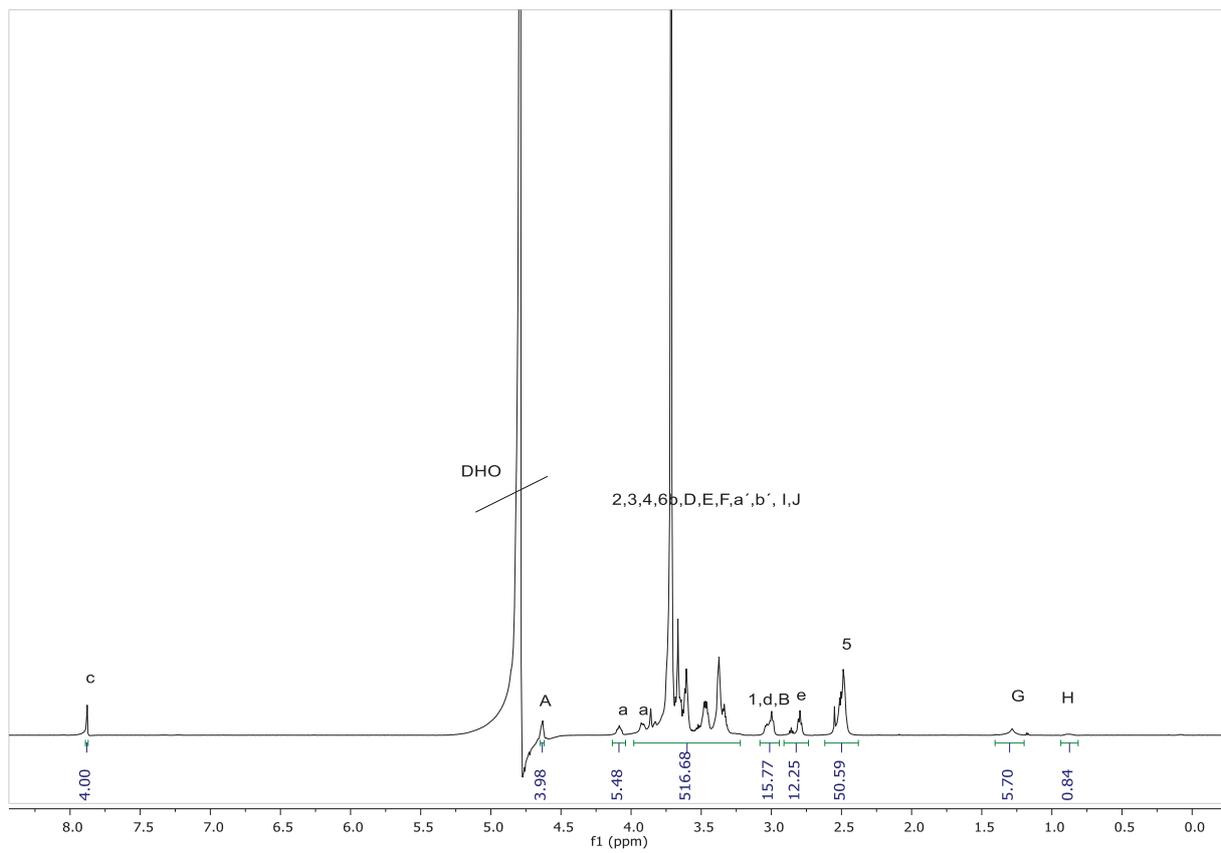


Abbildung E 33: <sup>1</sup>H-NMR von P3-PEG mit tetraivalenten Glyco-oligomer- und PEG-Seitenketten.

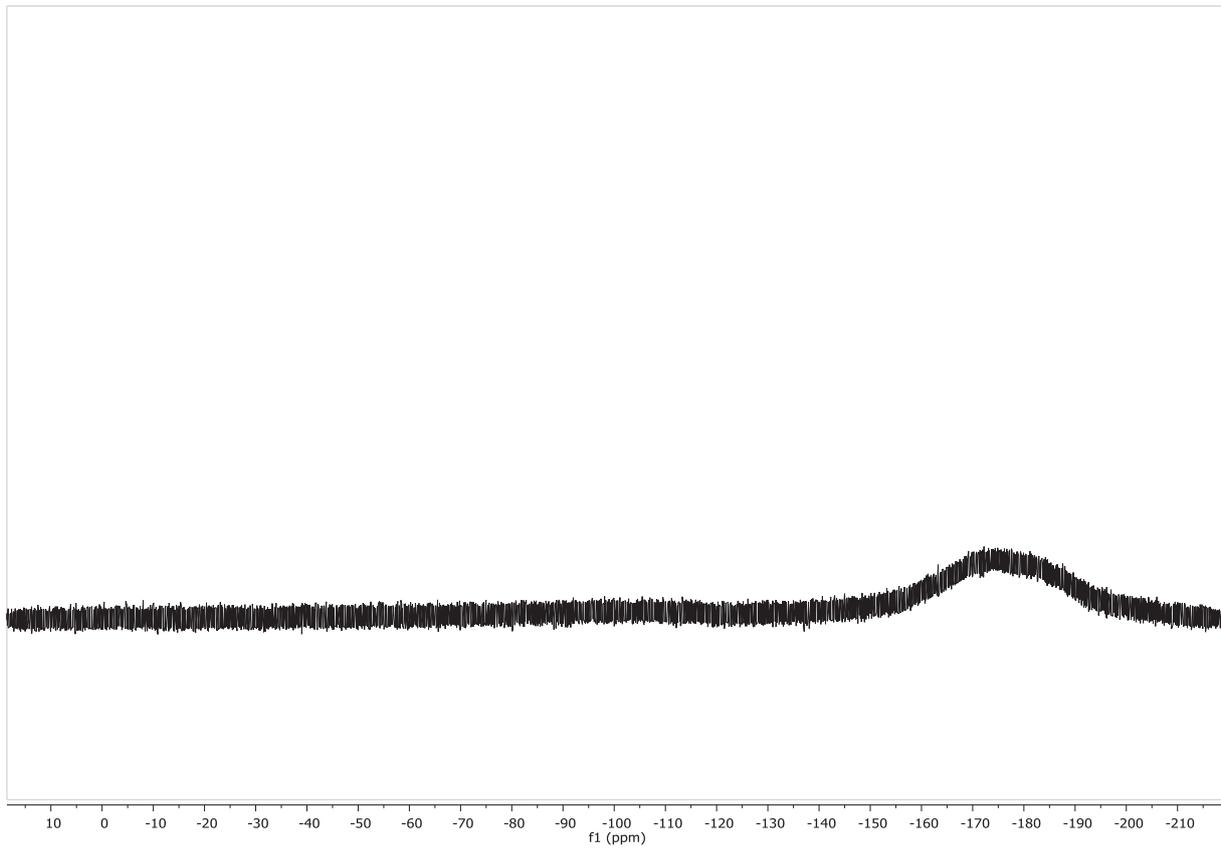


Abbildung E 34:  $^{19}\text{F}$ -NMR von P3-PEG mit tetraivalenten Glycololigomer- und PEG-Seitenketten.

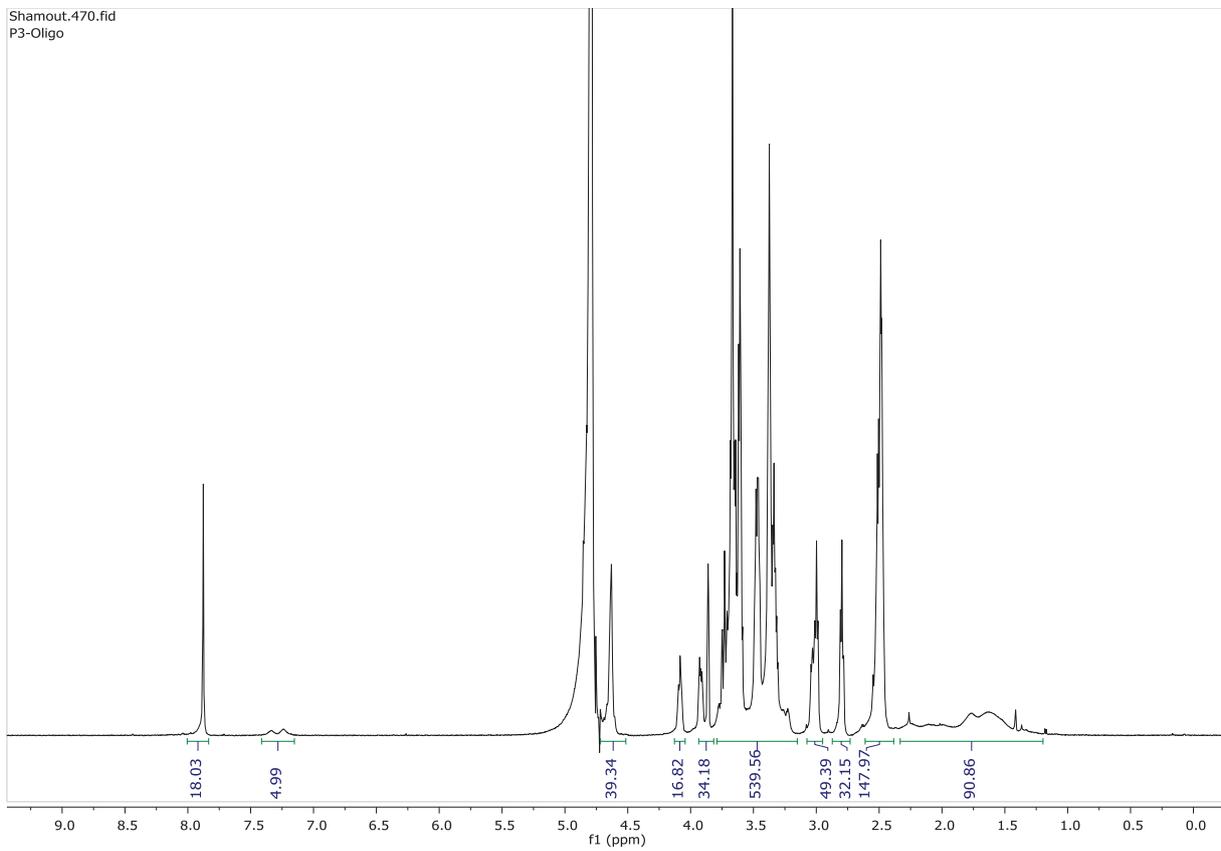


Abbildung E 35:  $^1\text{H}$ -NMR von P3-Oligo mit tetraivalenten Glycololigomer.

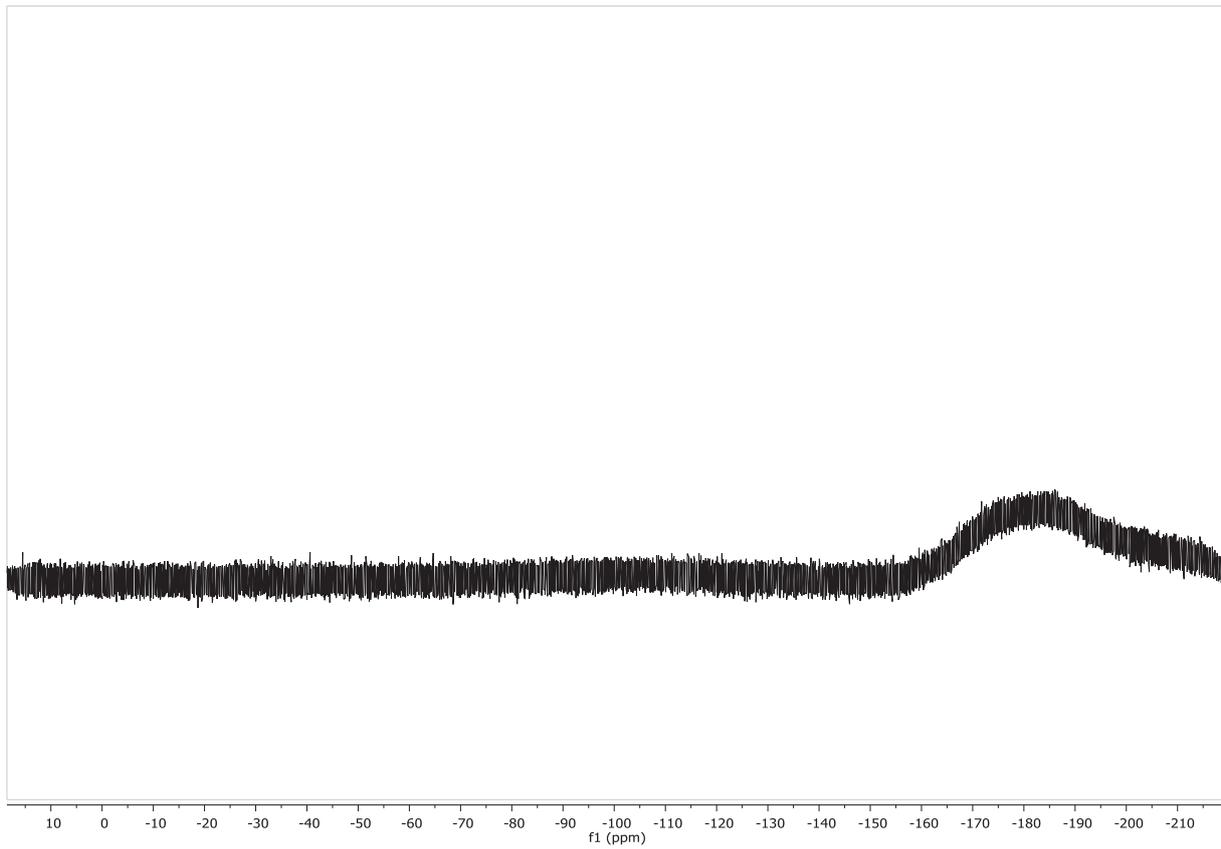


Abbildung E 36:  $^1\text{H-NMR}$  von P3-Oligo mit tetravalenten Glycololigomer.

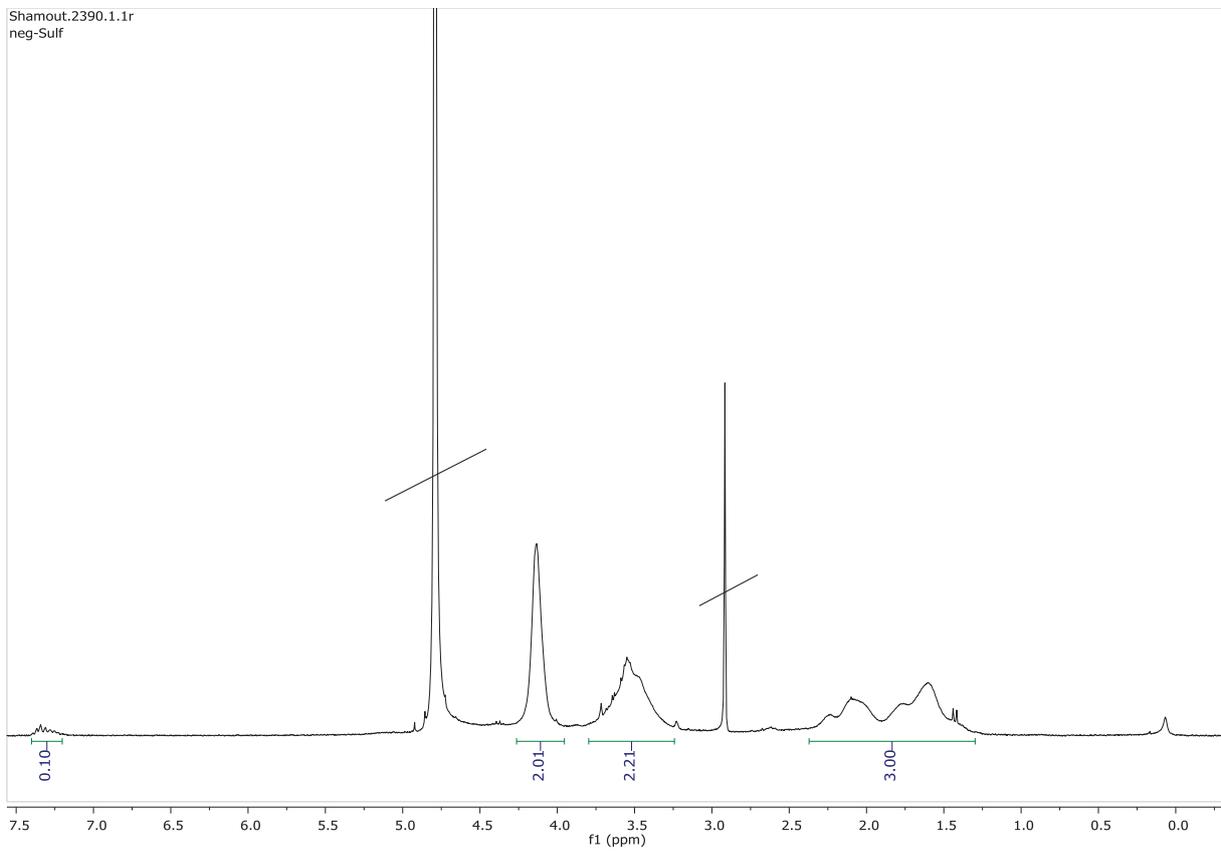


Abbildung E 37: Sulfatisiertes Polymer SP1Neg<sub>50</sub>

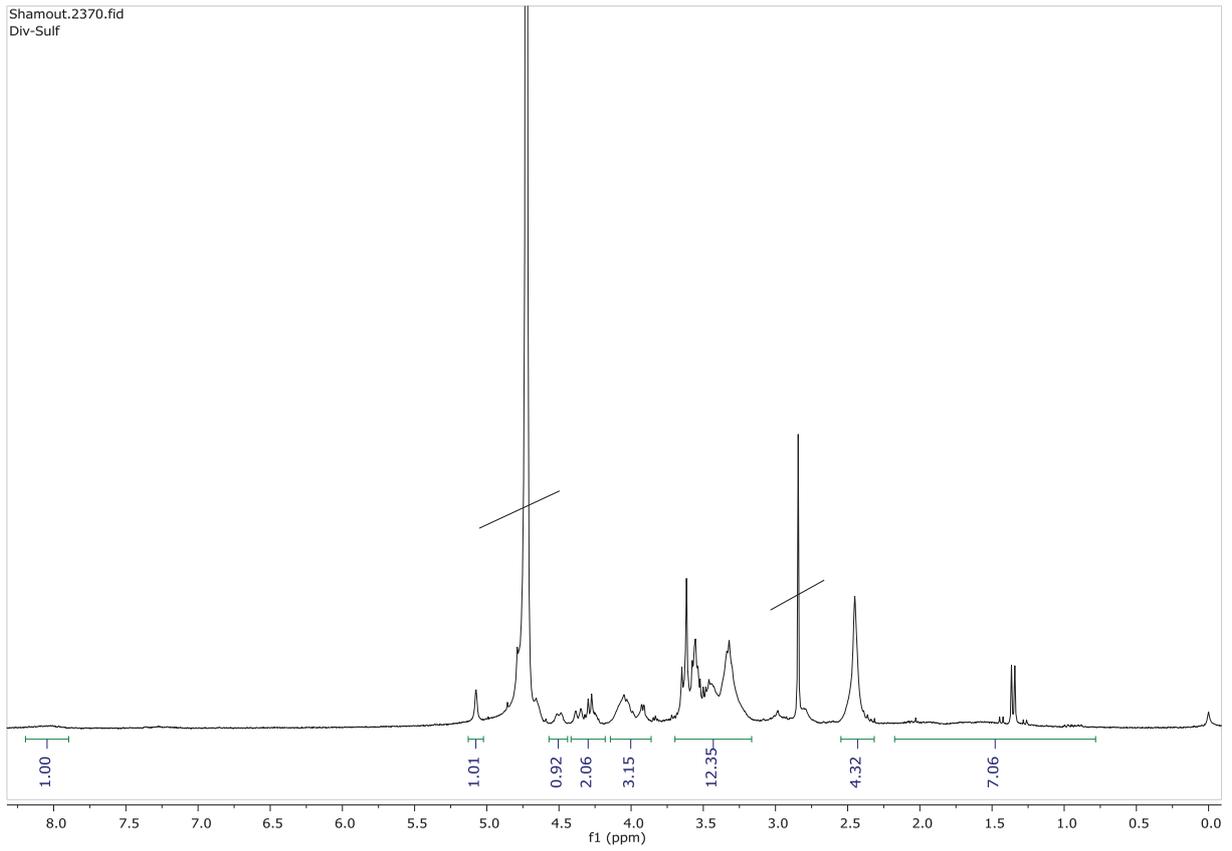


Abbildung E 38: Sulfatisiertes Polymer SP1-40.

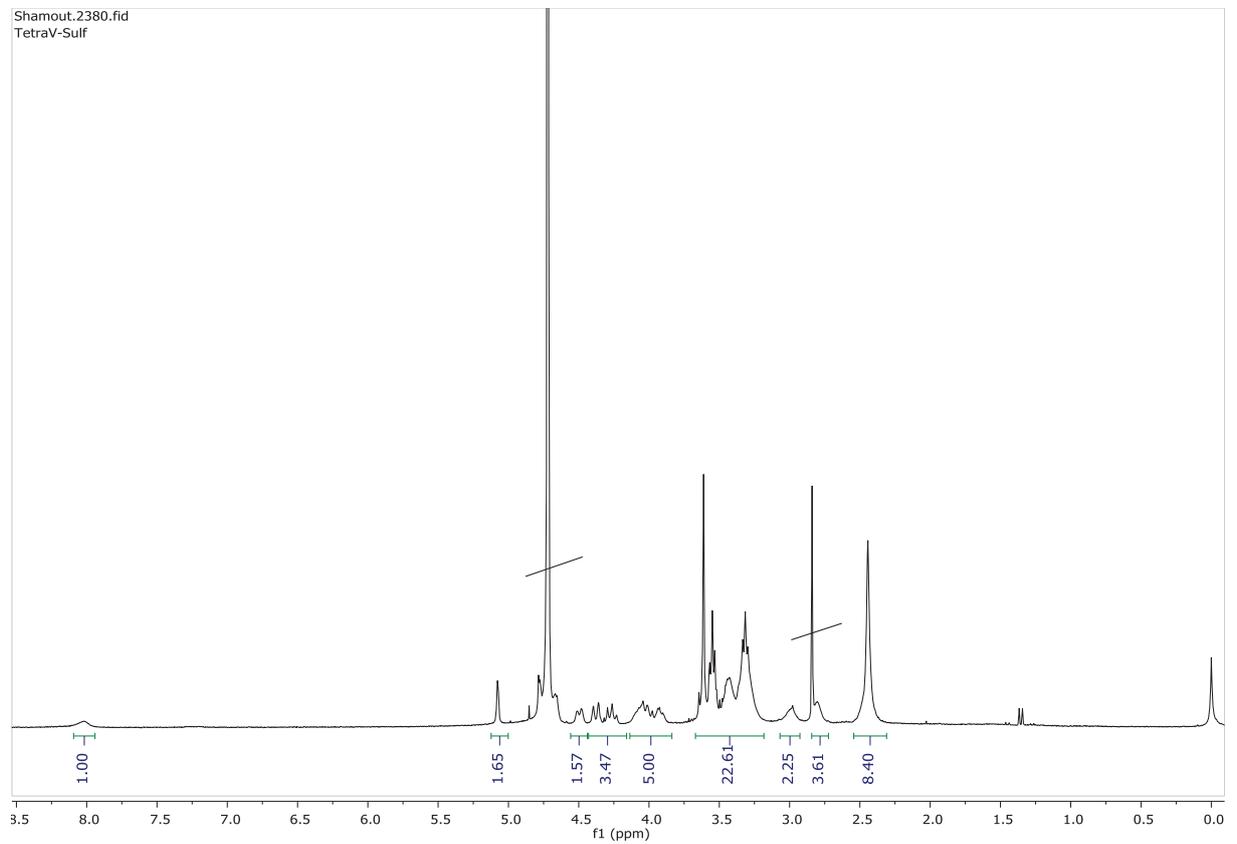


Abbildung E 39: Sulfatisiertes Polymer SP2-40.

## 6.2 HPLC

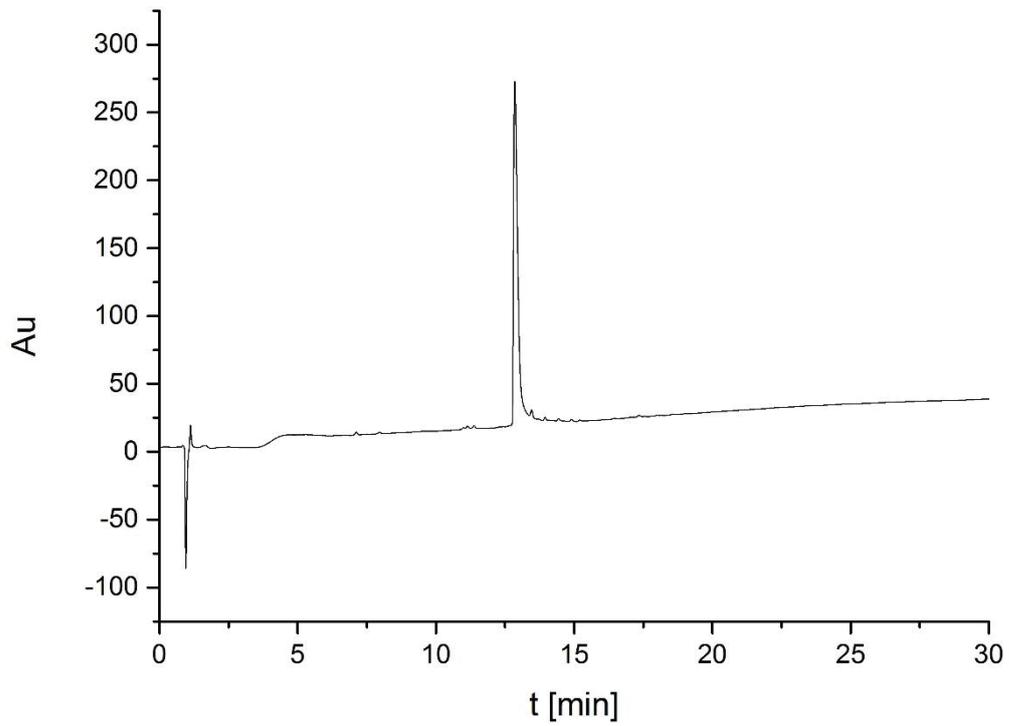


Abbildung E 40: RP-HPLC Analytik (linearer Gradient von 0 - 50% Eluent B in 30 bei 25 °C) von O1 mit einer Rotationszeit von 13 min.

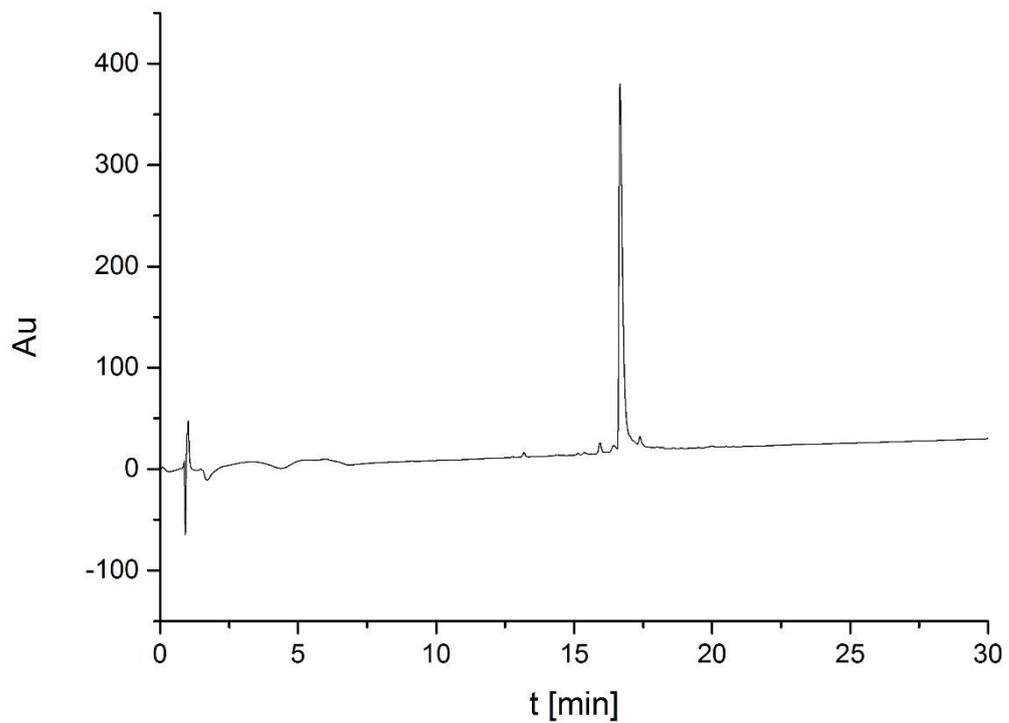


Abbildung E 41: RP-HPLC Analytik (linearer Gradient von 0 - 50% Eluent B in 30 bei 25 °C) von O2 mit einer Rotationszeit von 17 min.

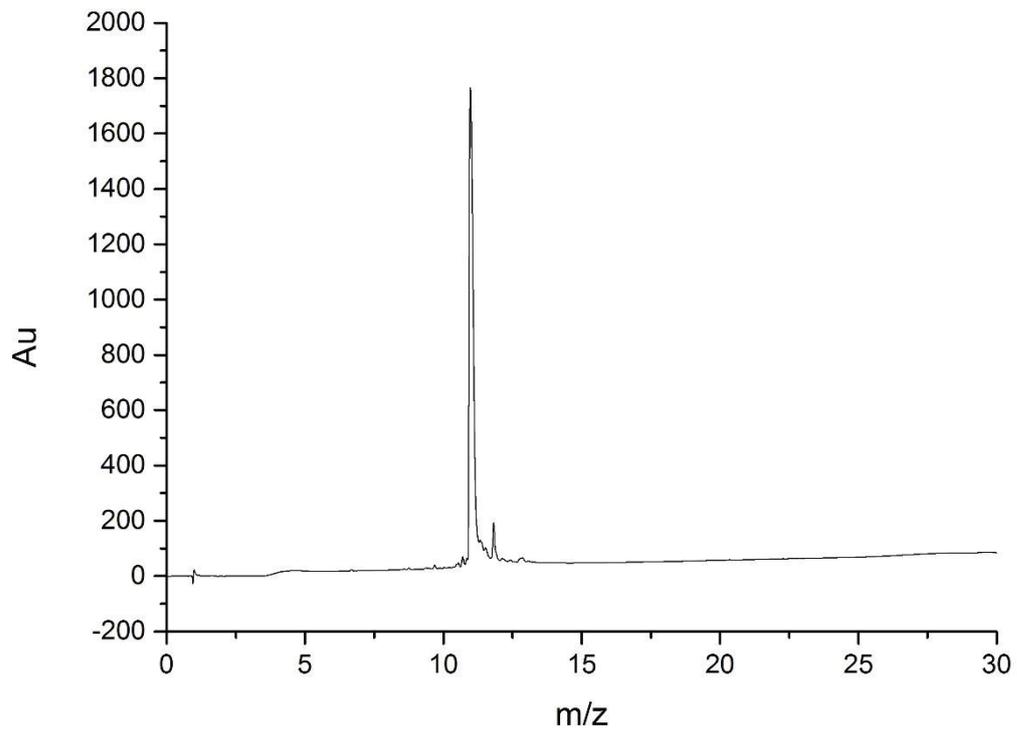


Abbildung E 42: RP-HPLC Analytik (linearer Gradient von 0 - 50% Eluent B in 30 bei 25 °C) von O1s mit einer Rotationszeit von 10.98 min.

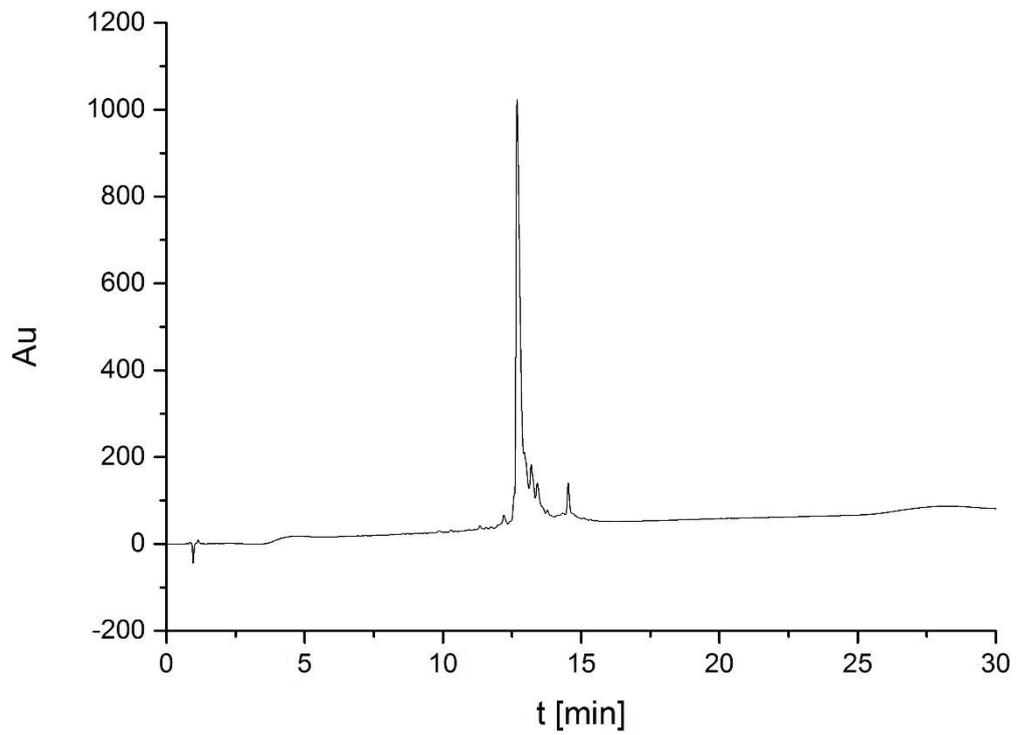


Abbildung E 43: RP-HPLC Analytik (linearer Gradient von 0 - 50% Eluent B in 30 bei 25 °C) von O2s mit einer Retentionszeit von 12.68 min.

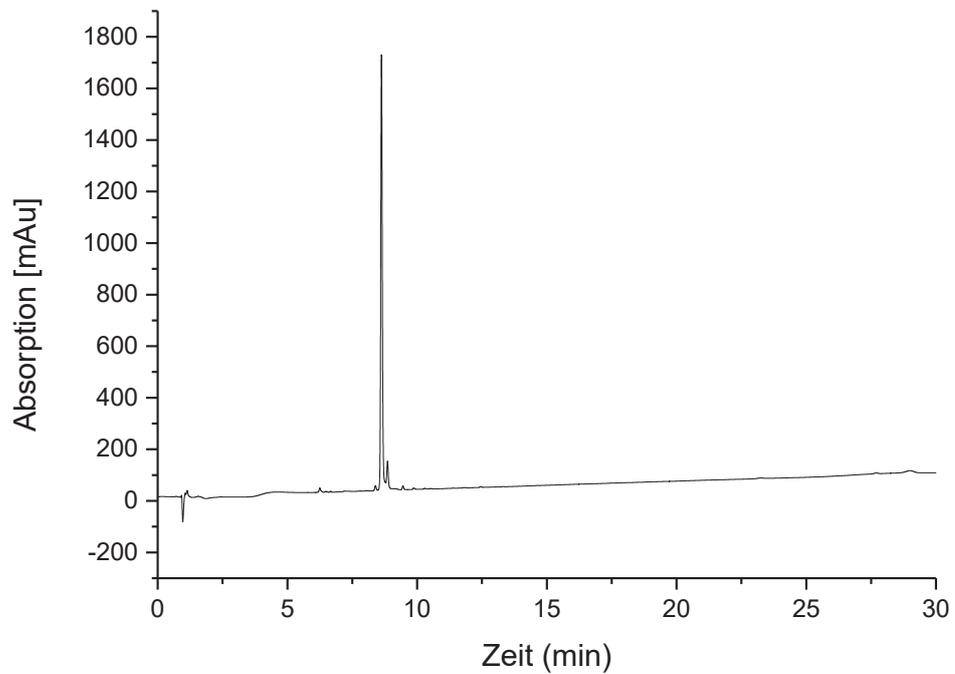


Abbildung E 44: RP-HPLC (linearer Gradient von 0 - 50% Eluent B in 30 min bei 25°C) M1 mit einer Retentionszeit von 8.62 min.

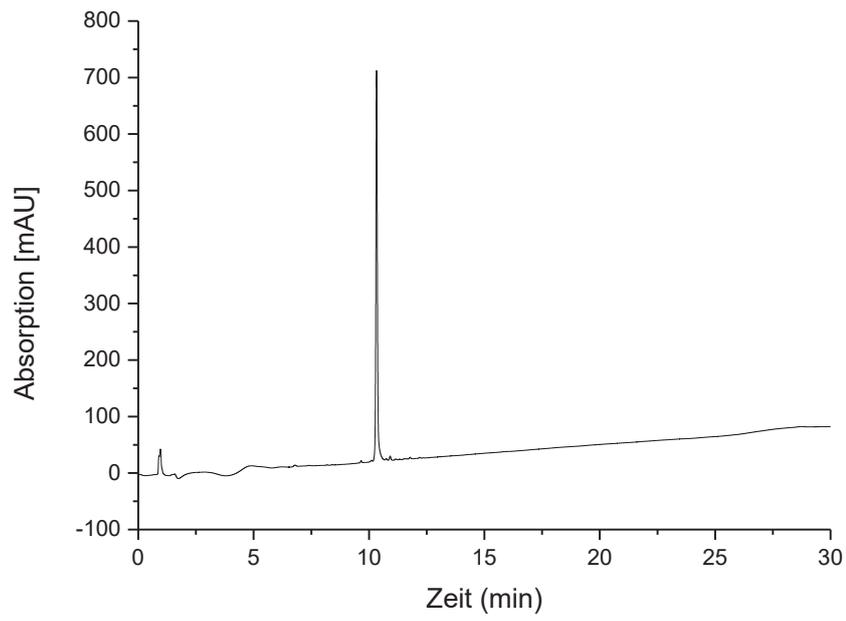


Abbildung E 45: RP-HPLC (linearer Gradient von 0 - 50% Eluent B in 30 min bei 25°C) Chromatogram von M1 mit einer Retentionszeit von 10.33 min.

### 6.3 ESI-MS

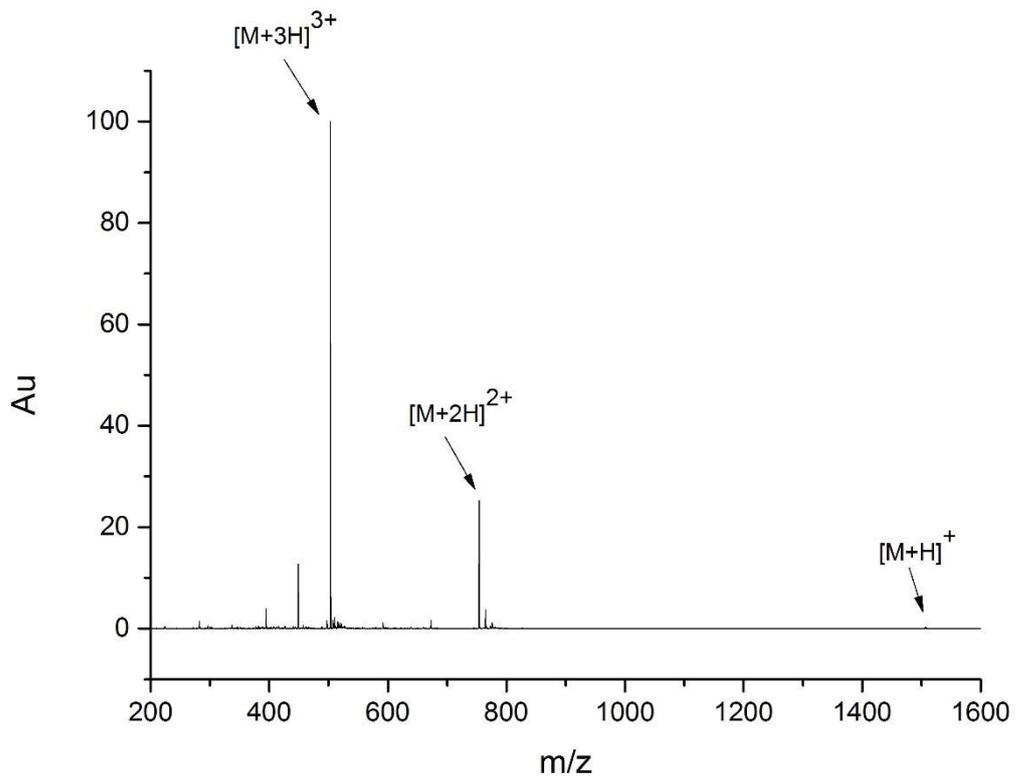


Abbildung E 46: ESI-MS-Spektrum von O1

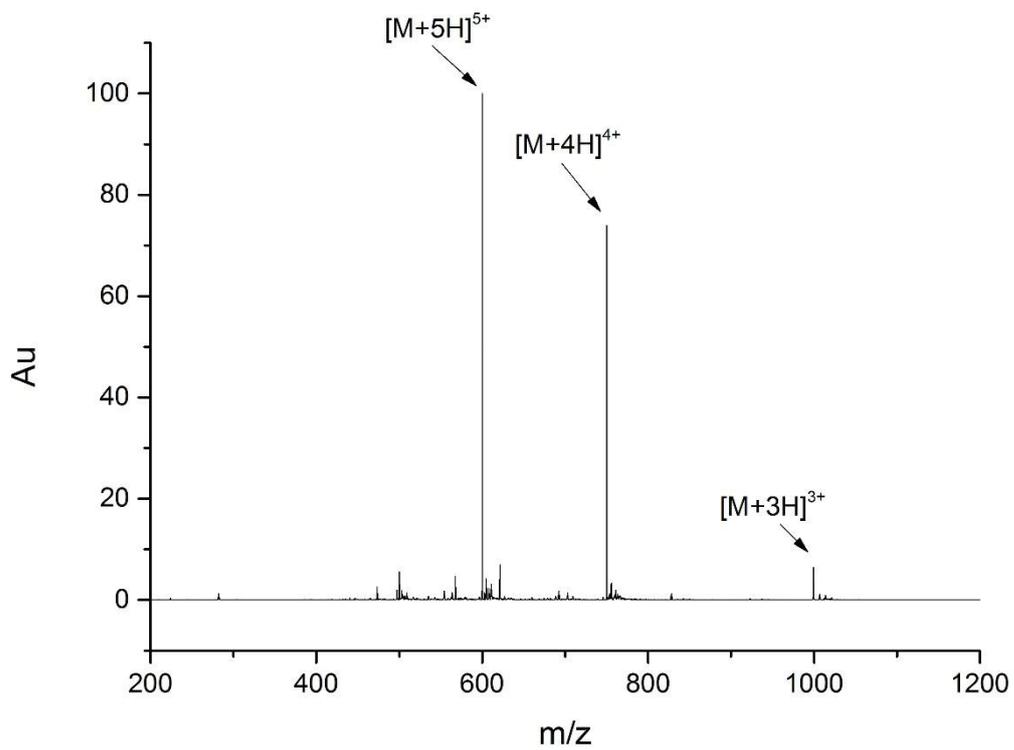


Abbildung E 47: ESI-MS-Spektrum von O<sub>2</sub>.

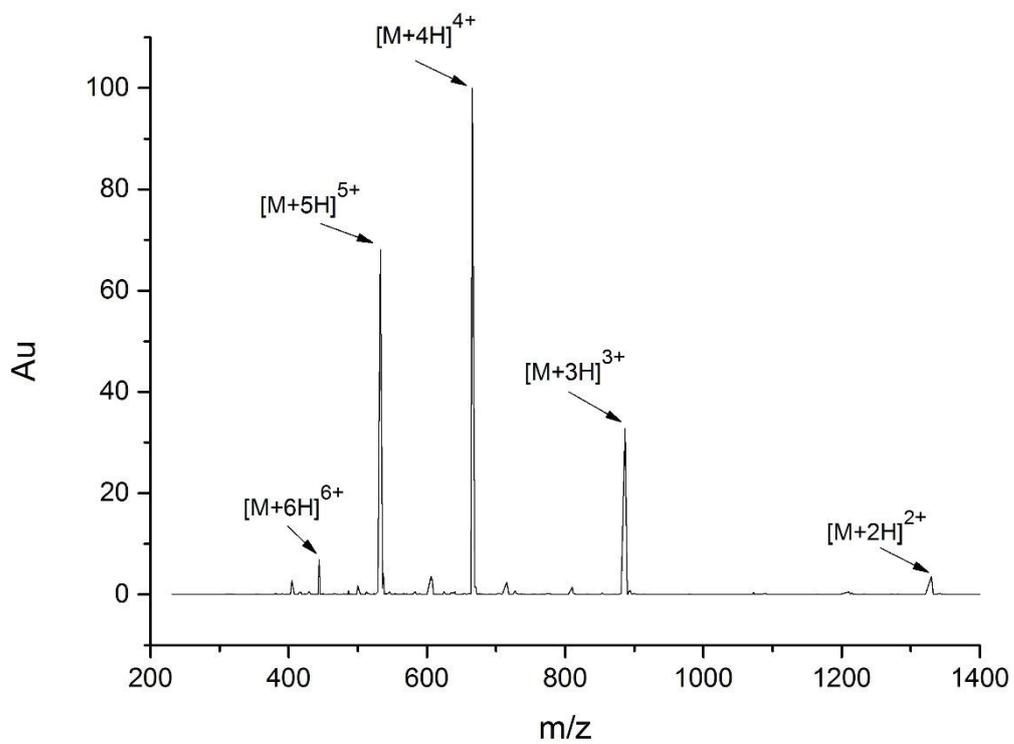


Abbildung E 48: ESI-MS-Spektrum von O<sub>1s</sub>.

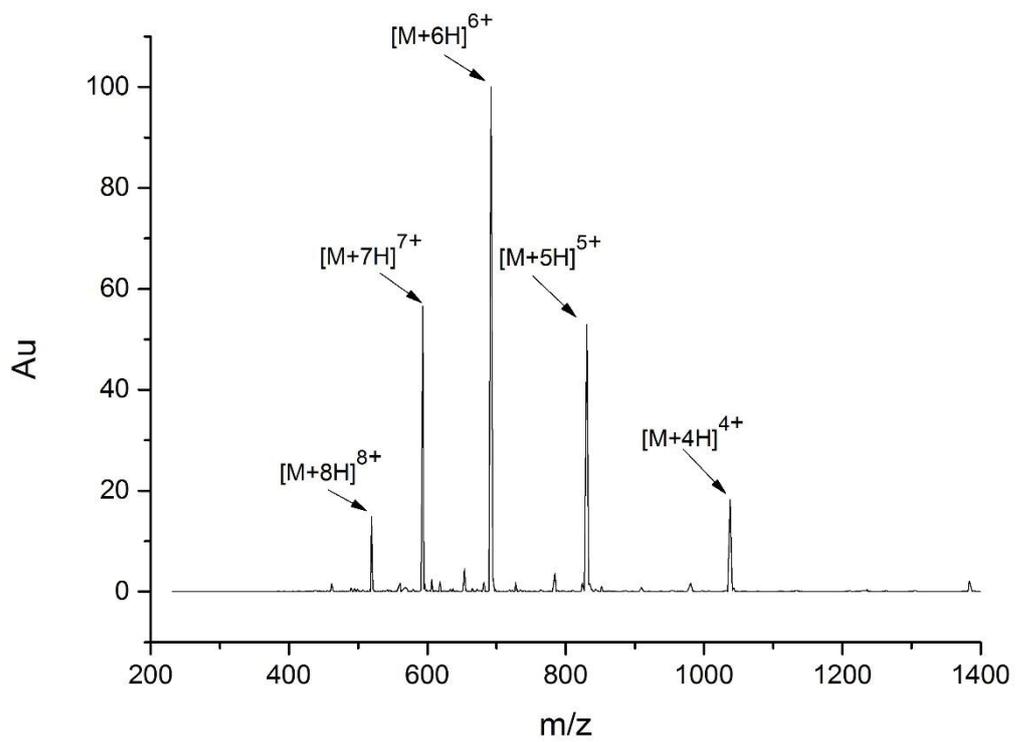


Abbildung E 49: ESI-MS-Spektrum von O<sub>2</sub>s.

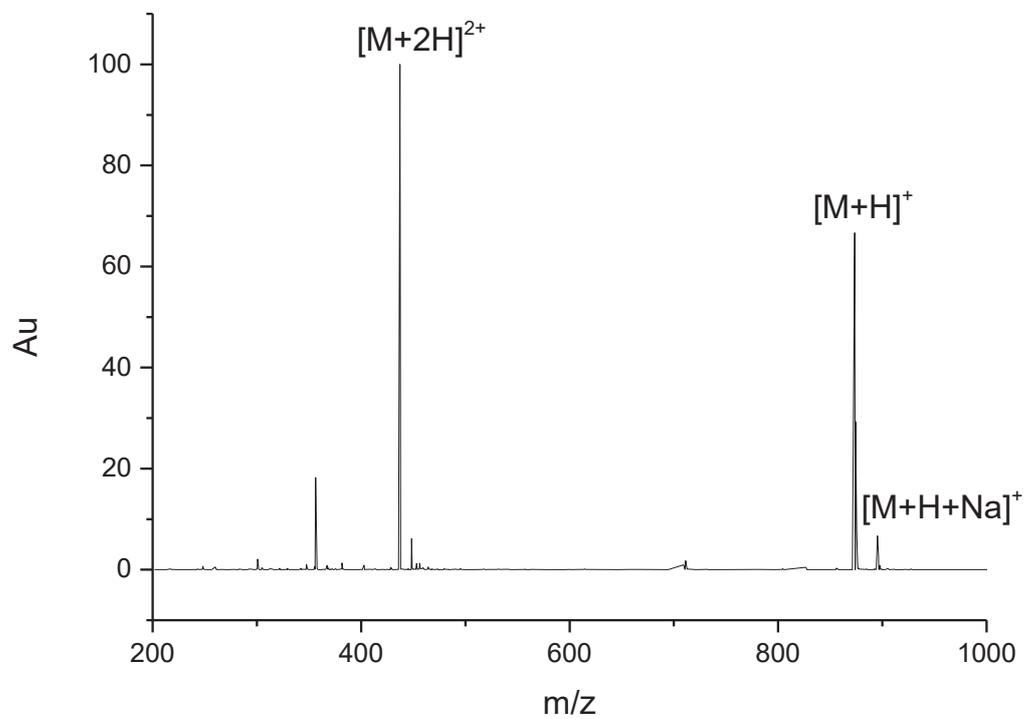


Abbildung E 50: ESI-MS-Spektrum von M1.

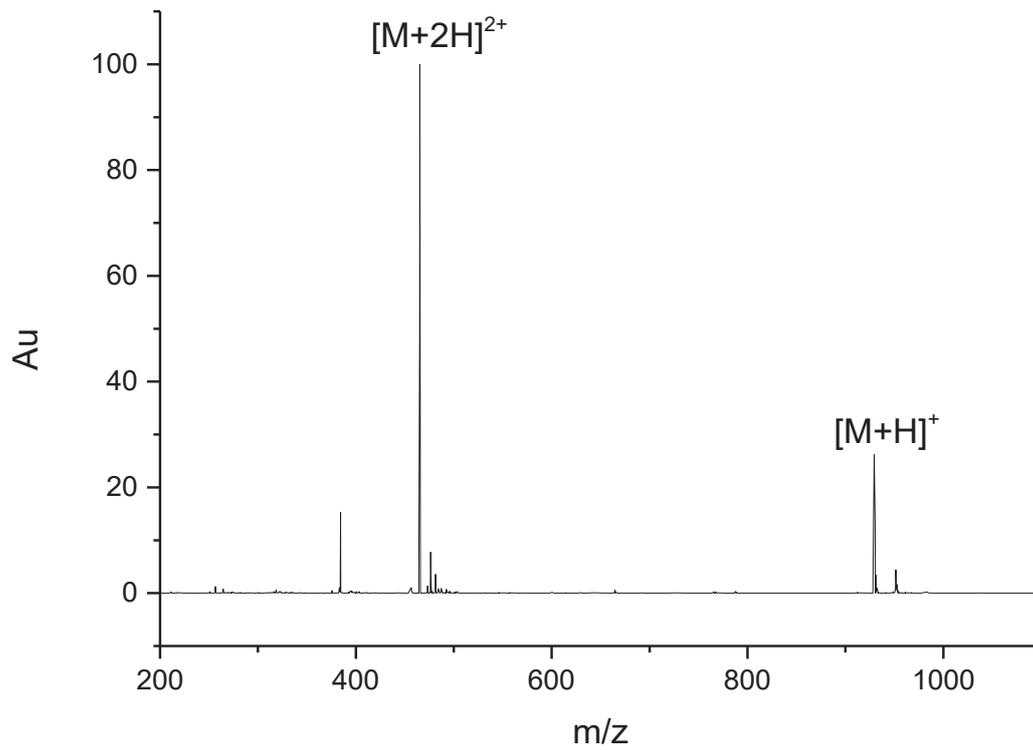


Abbildung E 51: ESI-MS-Spektrum von M2.

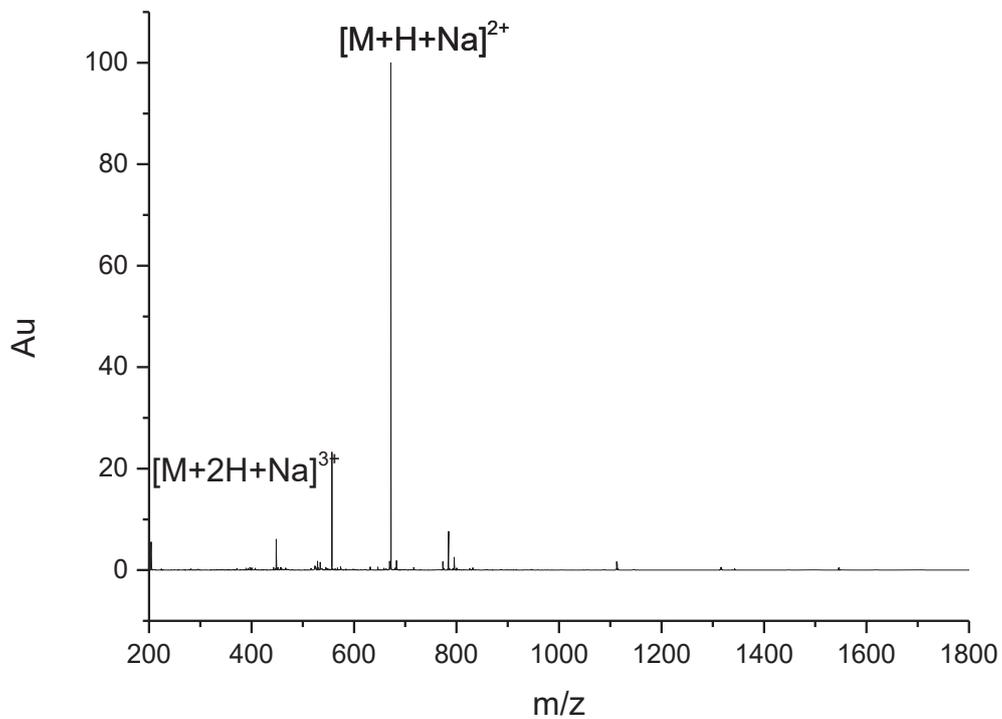


Abbildung E 52: ESI-MS-Spektrum von TPELA.

## 6.4 GPC

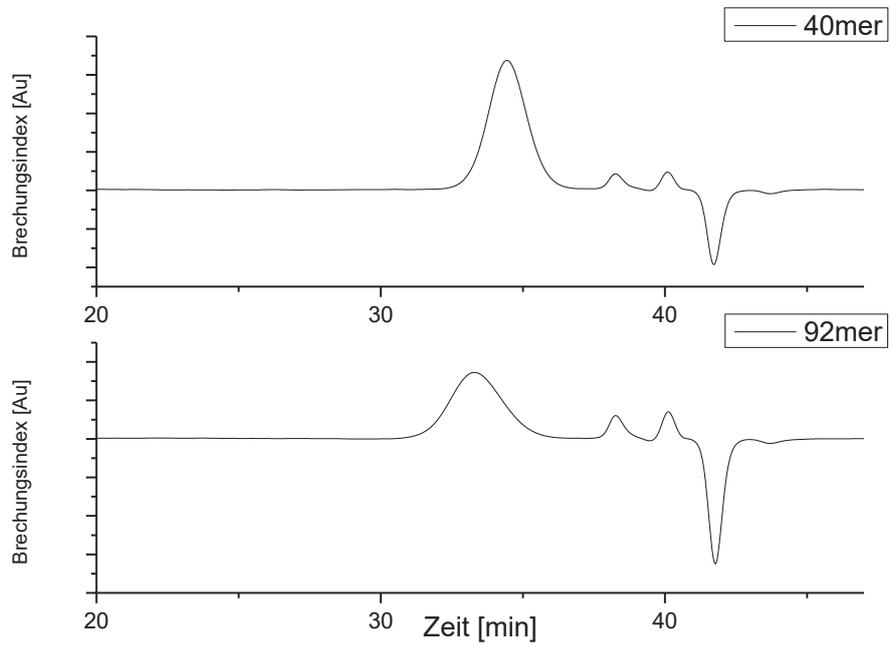


Abbildung E 53: Wasser GPC von p(HEAm) mit verschiedenem Polymerisationsgrad.

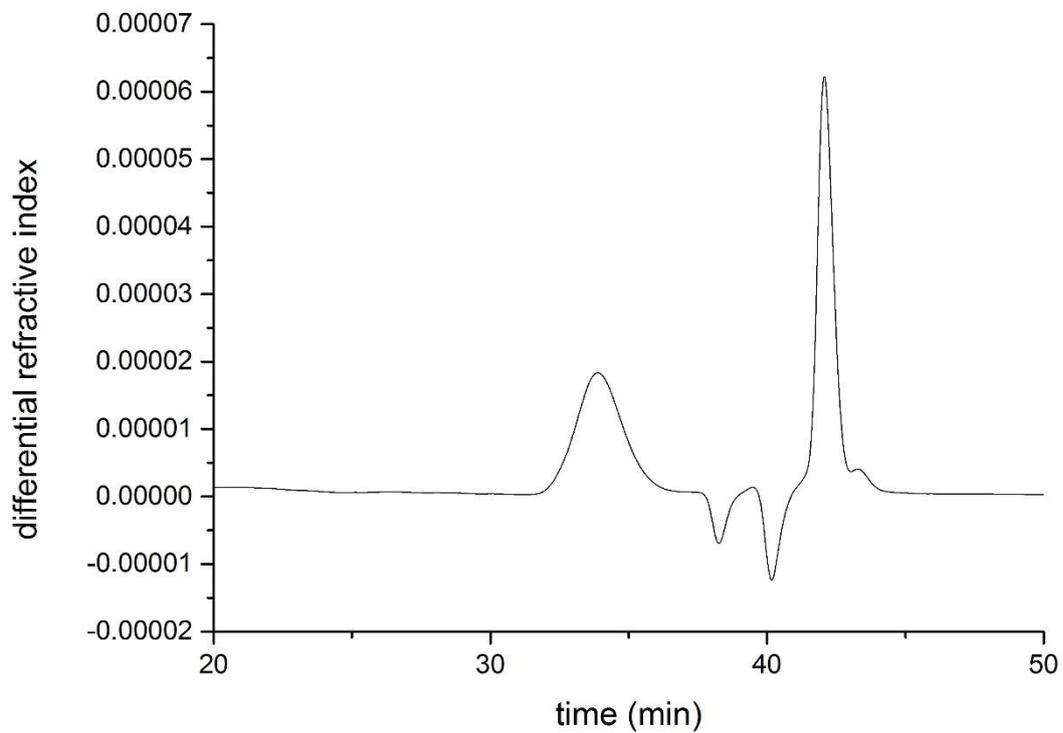


Abbildung E 54: Wasser GPC pMan.

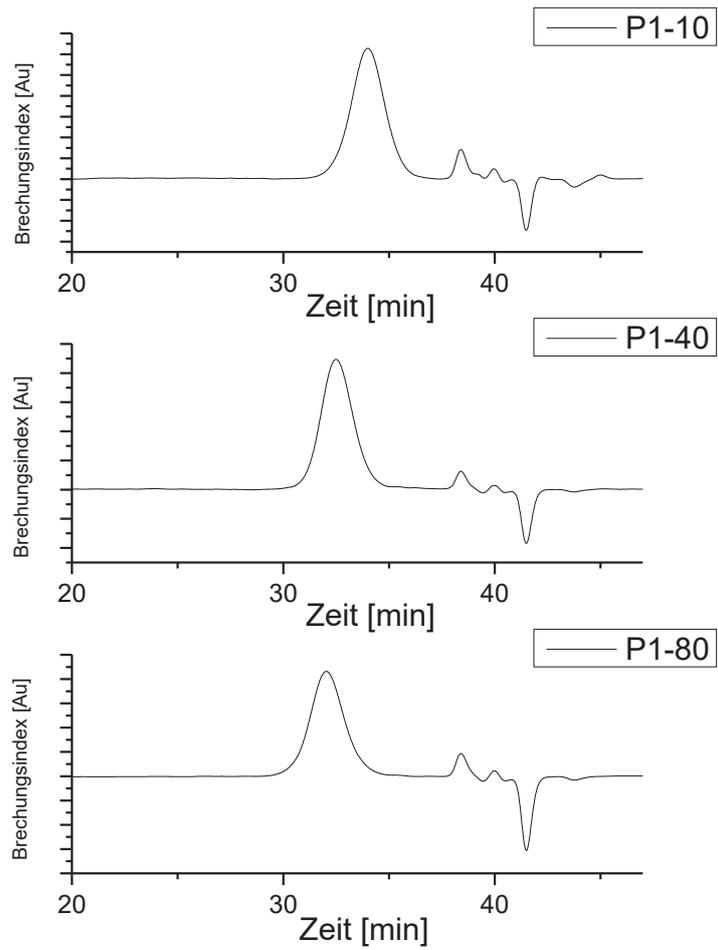


Abbildung E 55: Wasser GPC von Kammpolymeren mit verschiedenem Einbau an divalenten Seitenketten und einem Pn von 40.

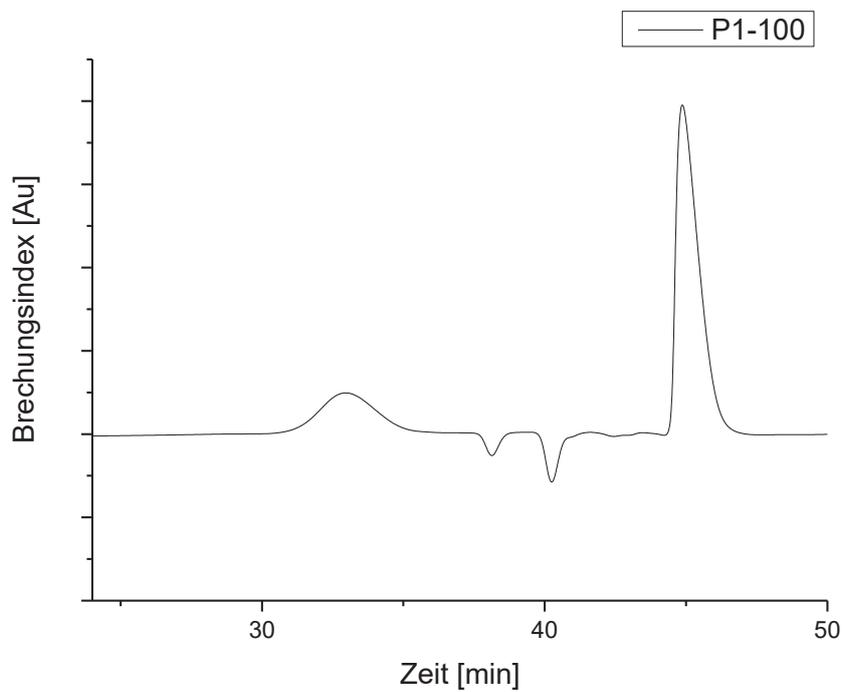


Abbildung E 56: Wasser GPC von Kammpolymeren mit divalenten Seitenketten und einem Pn von 92.

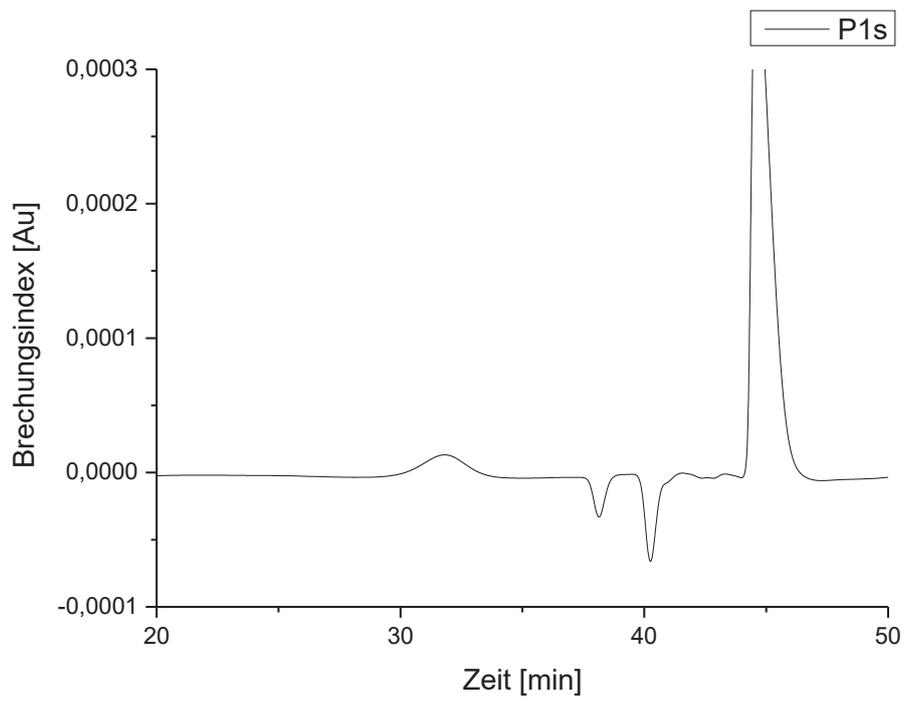


Abbildung E 57: Wasser GPC von Kammpolymeren mit an divalenten Seitenketten und einem EDS5-Schild und einem Pn von 40.

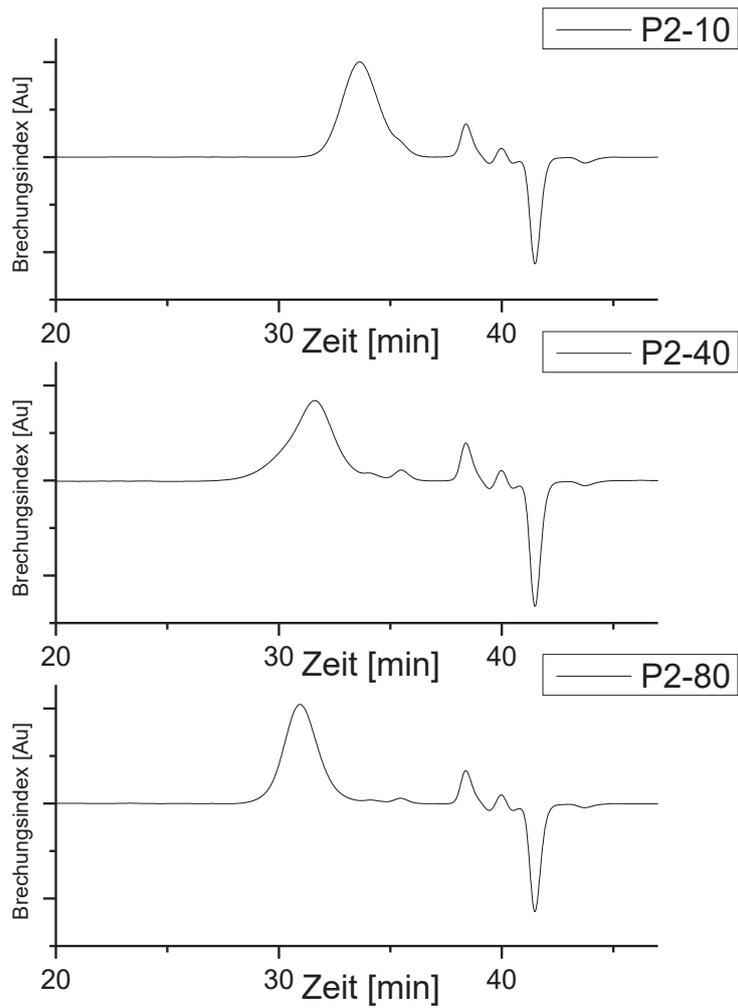


Abbildung E 58: Wasser GPC von Kammpolymeren mit verschiedenem Einbau an tetravalenten Seitenketten und einem Pn von 40.

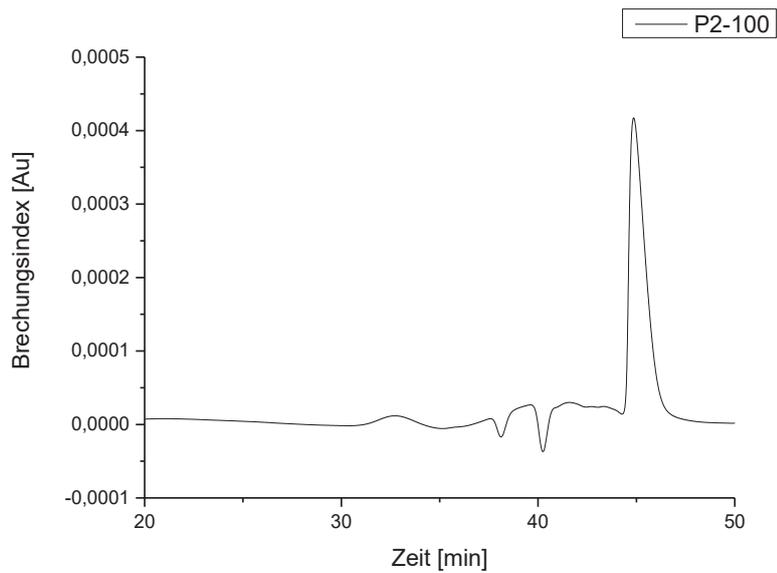


Abbildung E 59: Wasser GPC von Kammpolymeren mit tetravalenten Seitenketten und einem Pn von 92.

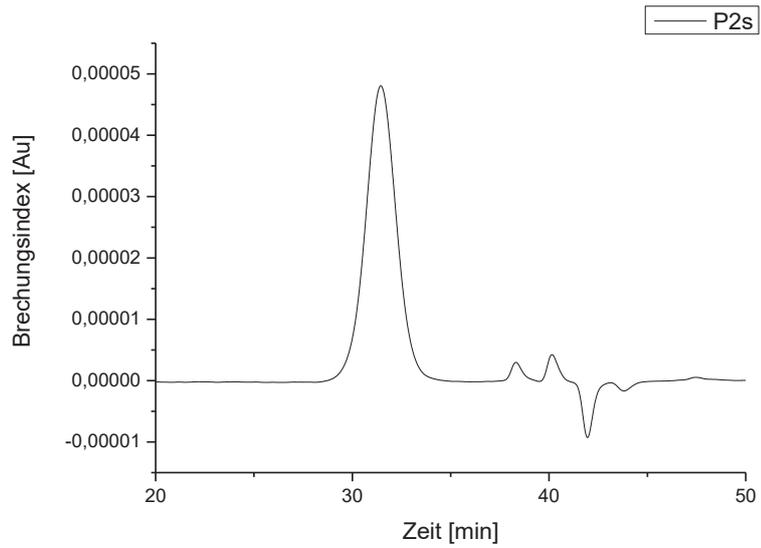


Abbildung E 60: Wasser GPC von Kammpolymeren mit an tetravalenten Seitenketten und einem EDS5-Schild und einem Pn von 40.

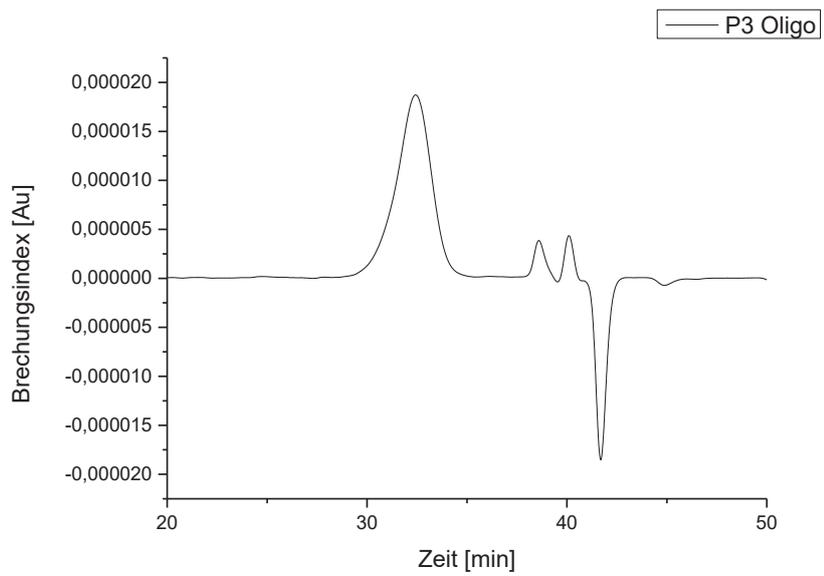


Abbildung E 61: Wasser GPC von Kammpolymeren (P3-Oligo) mit tetravalenten Seitenketten.

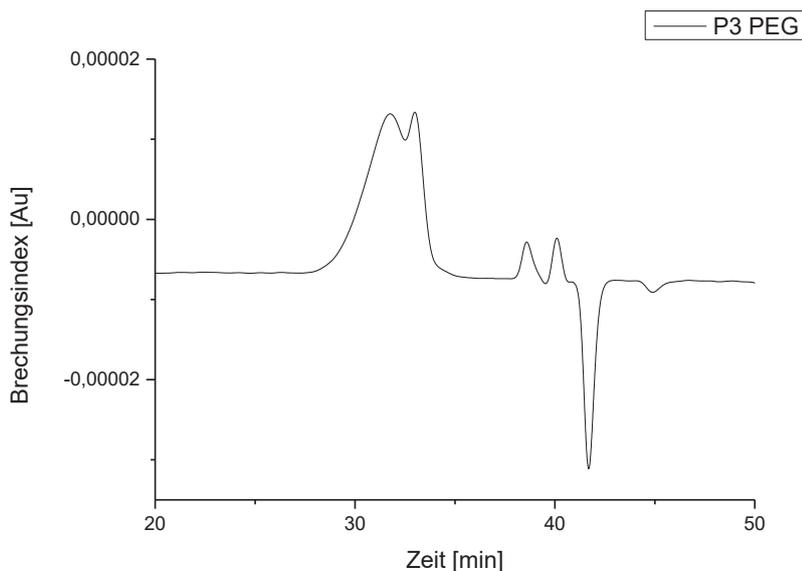


Abbildung E 62: Wasser GPC von Kammpolymeren (P3-PEG) mit PEG- und tetravalenten Seitenketten.

## 6.5 SPR

Tabelle E 12:  $K_A$ -Werte für die Oligomere O1, O2, O1s und O2s ermittelt durch Direkt-Bindungs-Assay an ConA.

Oligomer	Zucker	$K_D$	$K_A$	$K_A$ pro Zucker
O1	2	6.20E-05	16124	8062
O2	4	3.68E-05	27174	6793
O1s	2	6.16E-05	16223	8112
O2s	4	4.07E-05	24552	6138

Tabelle E 13:  $K_D$ -Werte für die Glykokammpolymere ermittelt durch Direkt-Bindungs-Assay an ConA.

Polymer	N Seitenketten	N Zucker	$K_D$ [M]	$K_A$ [ $M^{-1}$ ]	$K_A$ pro Zucker
P1-10	2	4	9.28E-06	107759	26940
P1-40	7-8	15	2.69E-06	372439	24824
P1-80	17-18	35	1.44E-06	696864	19910
P1-100mer	7-8	15	1.19E-05	84034	5602
P1s	12	25	3.74E-05	26774	1071
P2-10	1	4	1.48E-05	67705	16926
P2-40	12-13	50	2.04E-06	490918	10227
P2-80	16-17	65	1.22E-06	817361	12575
P2-100mer	3	12	4.44E-06	225479	18790
P2s	6	25	3.79E-06	263678	10547

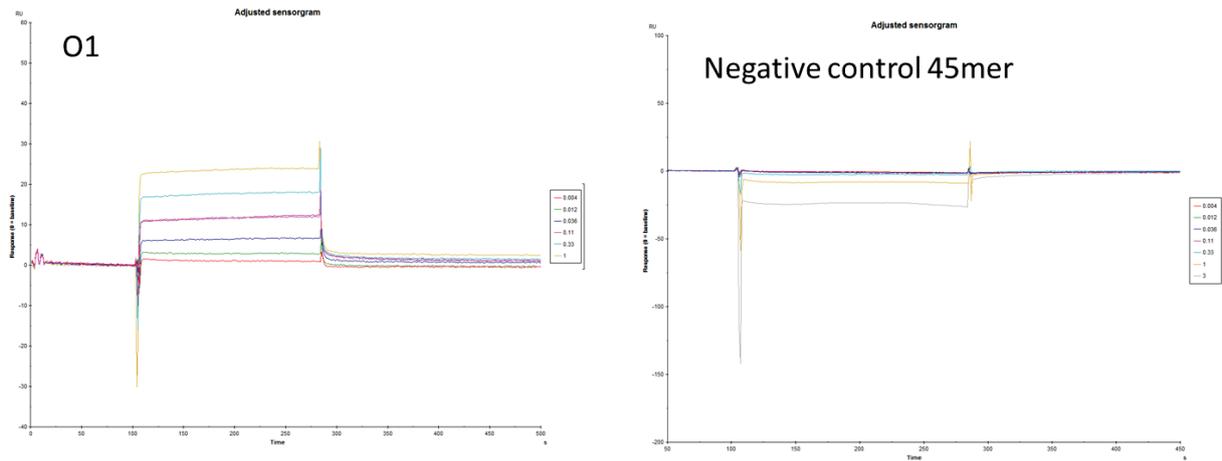


Figure 1: Sensorgrams and the equilibrium response as a function of concentration from glycomonomer O1 and p(HEAm) 45mer. The glycomonomer was injected at concentrations of 1, 0.33, 0.11, 0.037, 0.012 and 0.004 mg/ml. The negative control was injected at concentrations of 3, 1, 0.33, 0.11, 0.037, 0.012 and 0.004 mg/ml.

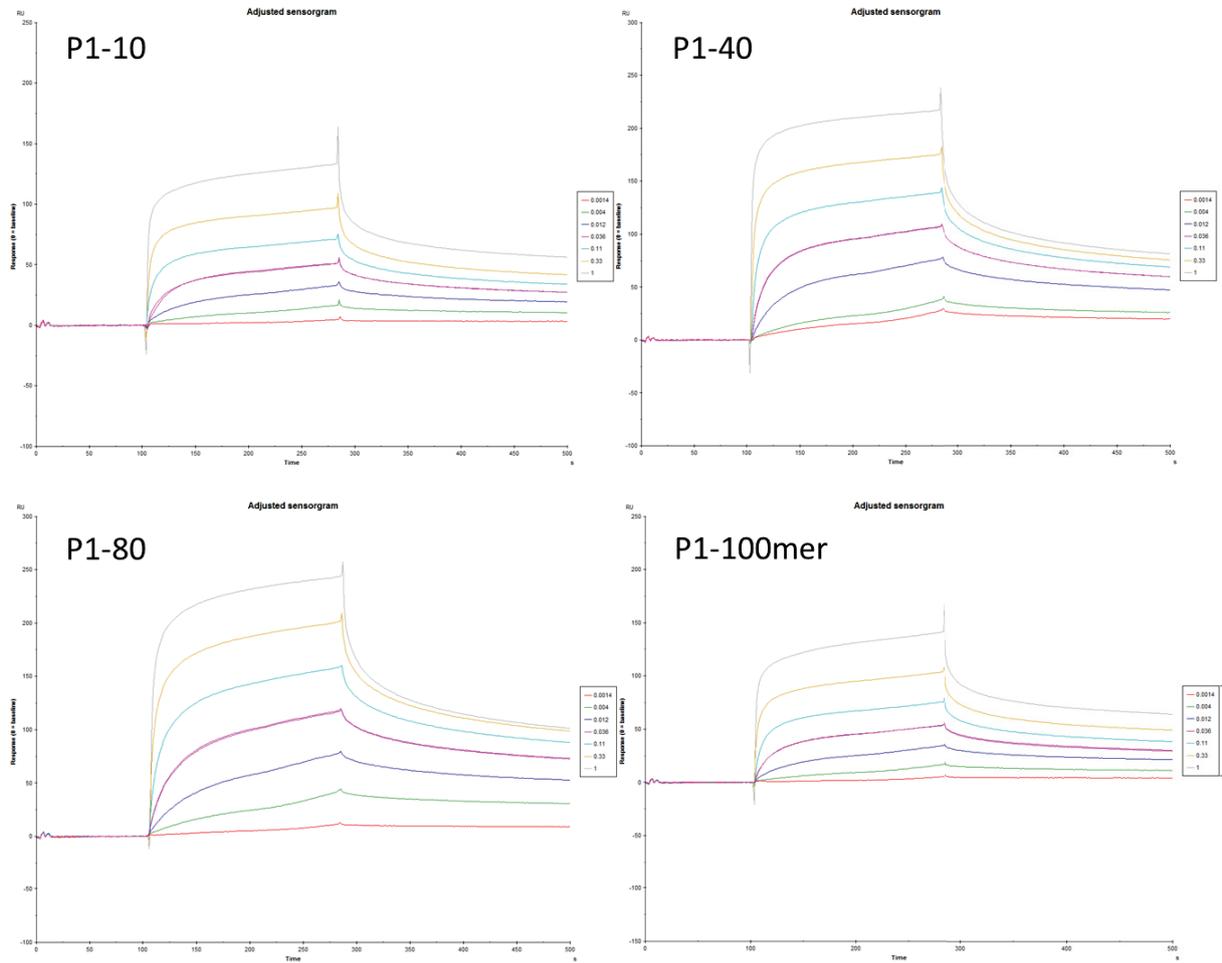


Figure 2: Sensorgrams and the equilibrium response as a function of concentration from the P1-series. All glycopolymers were injected at concentrations of 1, 0.33, 0.11, 0.037, 0.012, 0.004 and 0.0014 mg/ml.

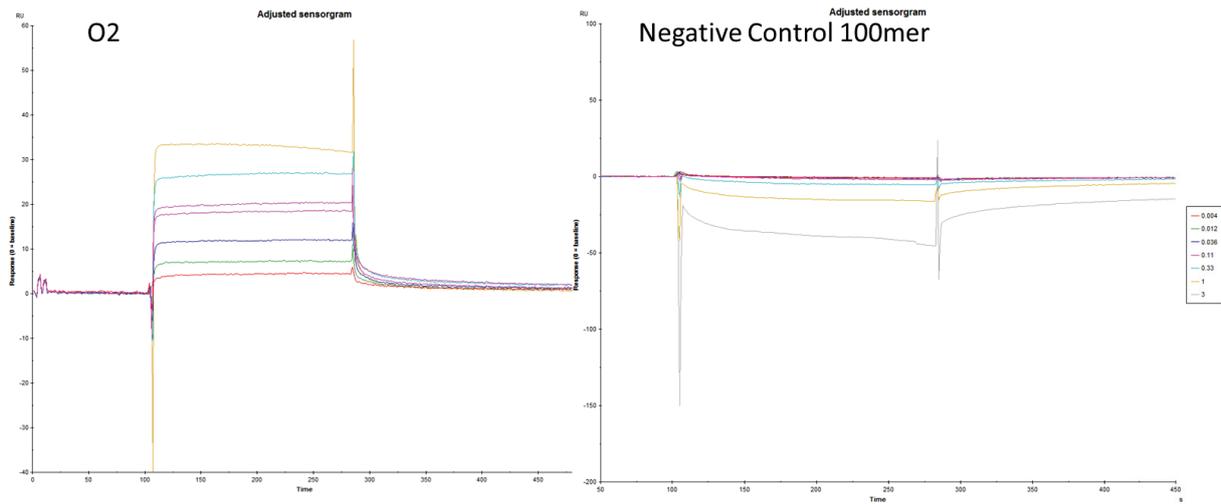


Figure 3: Sensorgrams and the equilibrium response as a function of concentration from glycomacromonomer O2 and p(HEAm) 100mer. The glycomacromonomer was injected at concentrations of 1, 0.33, 0.11, 0.037, 0.012, 0.004 and 0.0014 mg/ml. The negative control was injected at concentrations of 3, 1, 0.33, 0.11, 0.037, 0.012 and 0.004 mg/ml.

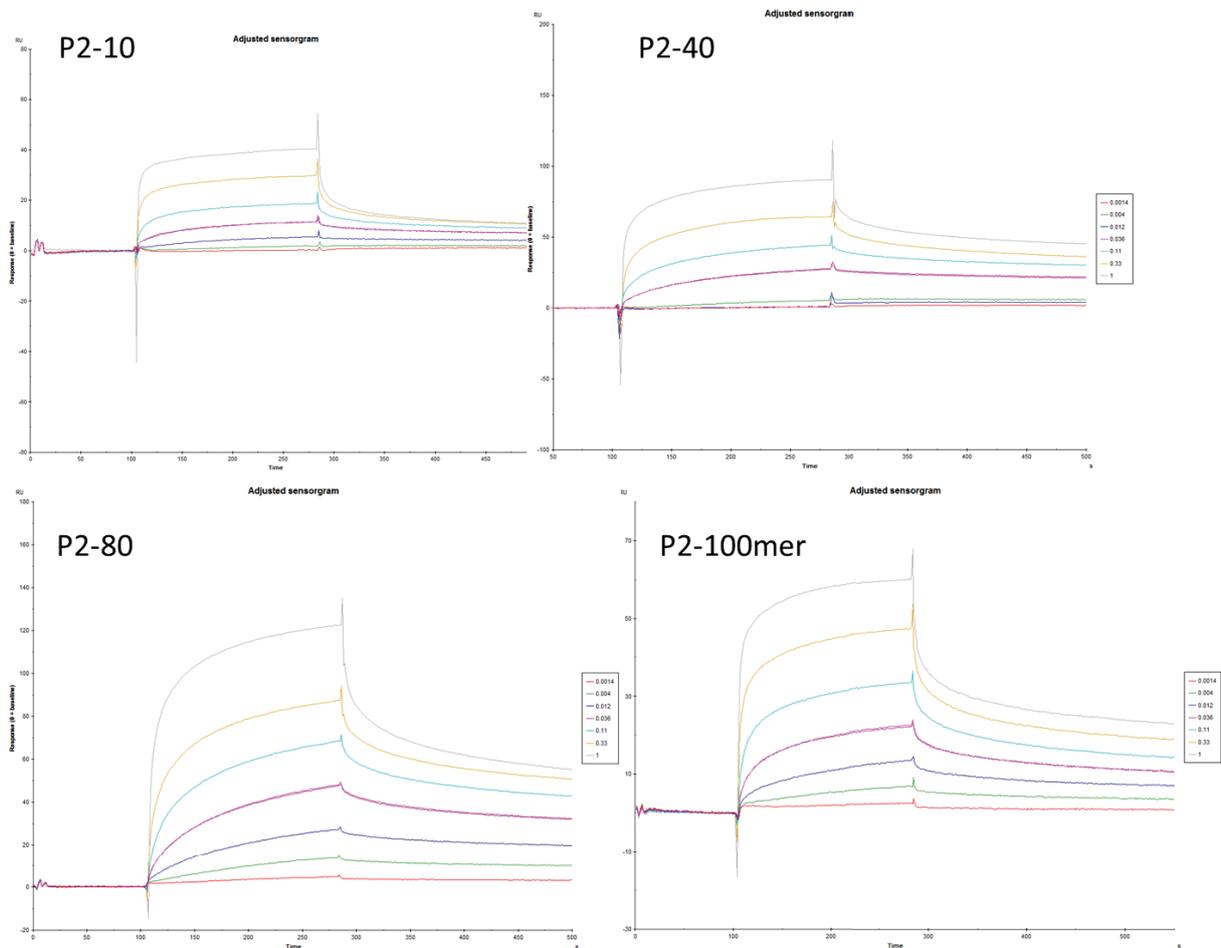


Figure 4: Sensorgrams and the equilibrium response as a function of concentration from the P2-series. All glycopolymers were injected at concentrations of 1, 0.33, 0.11, 0.037, 0.012, 0.004 and 0.0014 mg/ml.

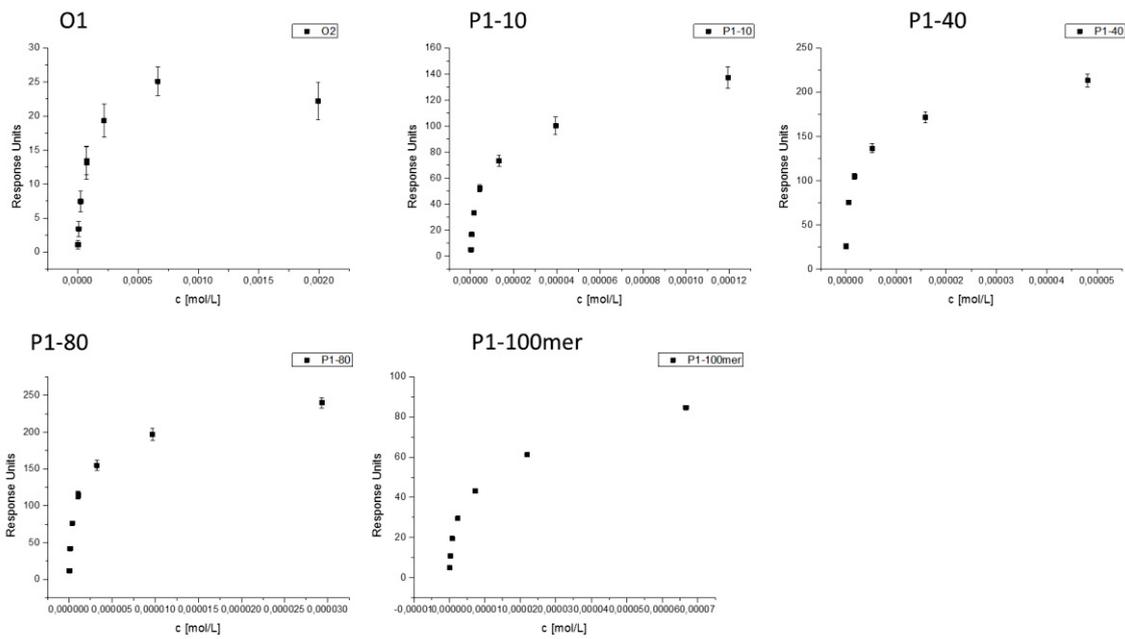


Figure 5: Experimental data for O1 and P1-series from two consecutive measurements is plotted. The standard deviation is shown as error bar for each data point.

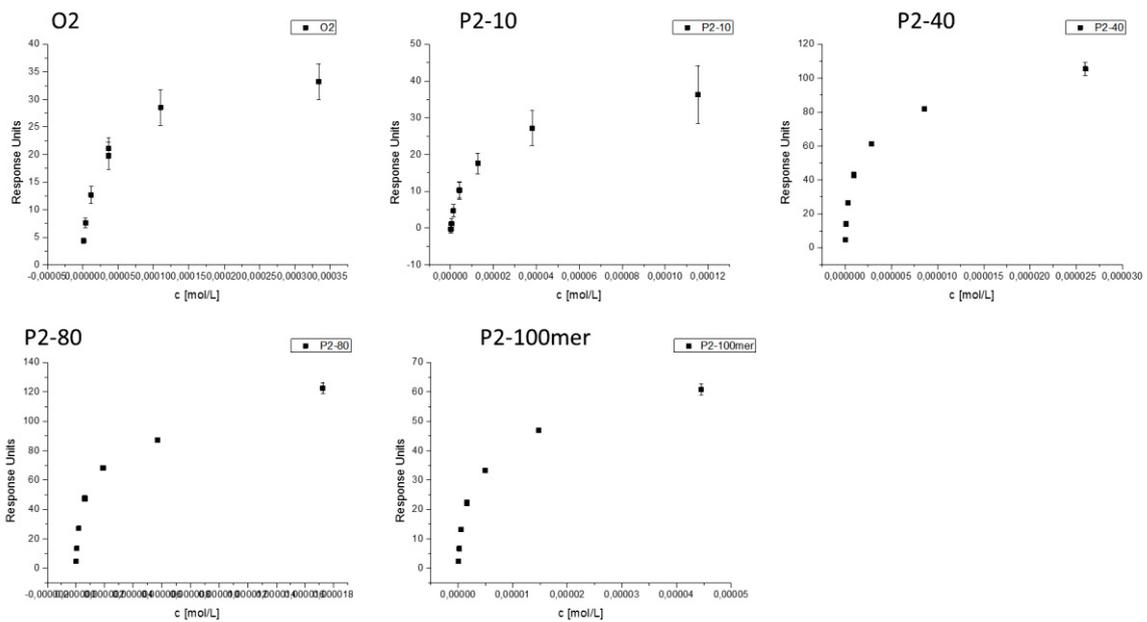


Figure 6: Experimental data for O2 and P2-series from two consecutive measurements is plotted. The standard deviation is shown as error bar for each data point.

## 6.6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
°C	Grad Celsius
Gew.-%	Gewichtsprozent
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
Std.	Stunden
Min	Minuten
H <sub>2</sub> O	Wasser
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
g	Gramm
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
ml	Milliliter
mmol	Millimol
DCM	Dichlormethan
D	Dispersität
nm	nanometer
ppm	parts per million
M <sub>n</sub>	Zahlenmittel
RT	Raumtemperatur
δ	chemische Verschiebung
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
R	Rest
sog.	sogenannt(es)
MWCO	molecular-weight cutoff
et al.	et alii

ca.	circa
stat.	statistisches copolymer
th.	theoretisch
eq.	Äquivalente
LBB	Lectin-Binding Buffer (Lektin-Bindungs-Puffer)
Alloc	allyloxycarbonyl
Boc	tert-butyloxycarbonyl
ConA	Concanavalin A
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
EDS	spacer Baustein
TDS	functioneller Baustein
PFFA	Pentafluorophenylacrylat
NIPAM	N-Isopropylacrylamid
HEAm	2-Hydroxyethylacrylamid
m/z	Maße zu Ladung Verhältnis
t <sub>r</sub>	Retentionszeit
SPS	Festphasensynthese
HPLC	high-performance liquid chromatography
RP	reversephase
ESI-MS	Elektronenspray-Ionisations-Massenspektroskopie
CuAAC	Kupfer(I) katalysierte Azid-Alkin Zykoaddition
TFA	Trifluoroessigsäure
PyBOP	benzotriazole-1-yl-oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Man	Mannose
RAFT	reversible addition–fragmentation chain transfer
HOBT	1-Hydroxybenzotriazo

GalNAc	N-Acetylgalactoseamin
EDS	ethylene glycol-diamine succinamid
TDS	tripple-bond diethylenetriamine succinamide
EDA	Ethylendiamin
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz
TIPS	Triisopropylsilan
Lac	Lactose

## 6.7 Literaturverzeichnis

- 1 Pang, P.-C. *et al.* Human Sperm Binding Is Mediated by the Sialyl-Lewisx Oligosaccharide on the Zona Pellucida. *Science* **333**, 1761-1764, doi:10.1126/science.1207438 (2011).
- 2 Dwek, R. A. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chemical Reviews* **96**, 683-720, doi:10.1021/cr940283b (1996).
- 3 Imberty, A. & Varrot, A. Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. *Current Opinion in Structural Biology* **18**, 567-576, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2008.08.001> (2008).

- 4 Cecioni, S., Imberty, A. & Vidal, S. Glycomimetics versus Multivalent Glycoconjugates for the Design of High Affinity Lectin Ligands. *Chemical Reviews* **115**, 525-561, doi:10.1021/cr500303t (2015).
- 5 Ofek, I. & Sharon, N. Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. *Infection and Immunity* **56**, 539-547 (1988).
- 6 Sharon, N. & Lis, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* **14**, 53R-62R, doi:10.1093/glycob/cwh122 (2004).
- 7 Weis, W. I. & Drickamer, K. Structural Basis of Lectin-Carbohydrate Recognition. *Annu. Rev. Biochem* **65**, 441-473, doi:doi:10.1146/annurev.bi.65.070196.002301 (1996).
- 8 Kitov, P. I. & Bundle, D. R. On the nature of the multivalency effect: a thermodynamic model. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 16271-16284 (2003).
- 9 Dam, T. K., Roy, R., Das, S. K., Oscarson, S. & Brewer, C. F. Binding of Multivalent Carbohydrates to Concanavalin A and Dioclea grandiflora Lectin THERMODYNAMIC ANALYSIS OF THE "MULTIVALENCY EFFECT". *J. Biol. Chem.* **275**, 14223-14230 (2000).
- 10 Kiessling, L. L., Gestwicki, J. E. & Strong, L. E. Synthetic multivalent ligands in the exploration of cell-surface interactions. *Current opinion in chemical biology* **4**, 696-703 (2000).
- 11 Jayaraman, N. Multivalent ligand presentation as a central concept to study intricate carbohydrate-protein interactions. *Chemical society reviews* **38**, 3463-3483 (2009).
- 12 Ponader, D., Wojcik, F., Beceren-Braun, F., Dervede, J. & Hartmann, L. Sequence-Defined Glycopolymer Segments Presenting Mannose: Synthesis and Lectin Binding Affinity. *Biomacromolecules* **13**, 1845-1852, doi:10.1021/bm300331z (2012).
- 13 Laine, R. A. Invited Commentary: A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields  $1.05 \times 10^{12}$  structures for a reducing hexasaccharide: the Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. *Glycobiology* **4**, 759-767, doi:10.1093/glycob/4.6.759 (1994).
- 14 Brandenburg, K., Andrä, J., Müller, M., Koch, M. H. J. & Garidel, P. Physicochemical properties of bacterial glycopolymers in relation to bioactivity. *Carbohydr. Res.* **338**, 2477-2489, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2003.08.008> (2003).
- 15 Dam, T. K., Roy, R., Das, S. K., Oscarson, S. & Brewer, C. F. Binding of Multivalent Carbohydrates to Concanavalin A and Dioclea grandiflora Lectin: THERMODYNAMIC ANALYSIS OF THE "MULTIVALENCY EFFECT". *Journal of Biological Chemistry* **275**, 14223-14230, doi:10.1074/jbc.275.19.14223 (2000).
- 16 Laura L. Kiessling, J. E. G., Laura E Strong,. Synthetic multivalent ligands in the exploration of cell-surface interactions,
- Current Opinion in Chemical Biology,.  
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367593100001538>) Volume 4,, Pages 696-703,, doi:https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00153-8.
- 17 Bordegé, V. *et al.* Statistical Glycopolymers Based on 2-Hydroxyethyl Methacrylate: Copolymerization, Thermal Properties, and Lectin Interaction Studies. *Macromol. Chem. Phys.* **212**, 1294-1304, doi:10.1002/macp.201100014 (2011).
- 18 Kasai, K.-i. & Hirabayashi, J. Galectins: A Family of Animal Lectins That Decipher Glycocodes. *J. Biochem.* **119**, 1-8 (1996).

- 19 Pilobello, K. T. & Mahal, L. K. Deciphering the glycode: the complexity and analytical challenge of glycomics. *Current Opinion in Chemical Biology* **11**, 300-305, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.05.002> (2007).
- 20 Feizi, T. & Chai, W. Oligosaccharide microarrays to decipher the glyco code. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 582-588 (2004).
- 21 MUIR, H. Proteoglycans as organizers of the intercellular matrix. *Biochem. Soc. Trans.* **11**, 613-622, doi:10.1042/bst0110613 (1983).
- 22 Seog, J. *et al.* Direct Measurement of Glycosaminoglycan Intermolecular Interactions via High-Resolution Force Spectroscopy. *Macromolecules* **35**, 5601-5615, doi:10.1021/ma0121621 (2002).
- 23 Kaneider, N. C., Dunzendorfer, S. & Wiedermann, C. J. Heparan Sulfate Proteoglycans Are Involved in Opiate Receptor-Mediated Cell Migration. *Biochemistry* **43**, 237-244, doi:10.1021/bi035295i (2004).
- 24 Scott, J. E. Proteodermatan and Proteokeratan Sulfate (Decorin, Lumican/Fibromodulin) Proteins Are Horseshoe Shaped. Implications for Their Interactions with Collagen. *Biochemistry* **35**, 8795-8799, doi:10.1021/bi960773t (1996).
- 25 Flannery, C. R. *et al.* Articular Cartilage Superficial Zone Protein (SZP) Is Homologous to Megakaryocyte Stimulating Factor Precursor and Is a Multifunctional Proteoglycan with Potential Growth-Promoting, Cytoprotective, and Lubricating Properties in Cartilage Metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254**, 535-541, doi:<http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1998.0104> (1999).
- 26 Seror, J. *et al.* Articular Cartilage Proteoglycans As Boundary Lubricants: Structure and Frictional Interaction of Surface-Attached Hyaluronan and Hyaluronan–Aggrecan Complexes. *Biomacromolecules* **12**, 3432-3443, doi:10.1021/bm2004912 (2011).
- 27 Bansil, R., Stanley, E. & LaMont, J. T. Mucin biophysics. *Annual Review of Physiology* **57**, 635-657 (1995).
- 28 Khalsa, P. S. & Eisenberg, S. R. Compressive behavior of articular cartilage is not completely explained by proteoglycan osmotic pressure. *Journal of Biomechanics* **30**, 589-594, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9290\(97\)84508-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9290(97)84508-3) (1997).
- 29 Li, Z., Hou, W.-S. & Brömme, D. Collagenolytic Activity of Cathepsin K Is Specifically Modulated by Cartilage-Resident Chondroitin Sulfates. *Biochemistry* **39**, 529-536, doi:10.1021/bi992251u (2000).
- 30 Celli, J. P. *et al.* Rheology of Gastric Mucin Exhibits a pH-Dependent Sol–Gel Transition. *Biomacromolecules* **8**, 1580-1586, doi:10.1021/bm0609691 (2007).
- 31 Sheiko, S. S., Sumerlin, B. S. & Matyjaszewski, K. Cylindrical molecular brushes: Synthesis, characterization, and properties. *Prog. Polym. Sci.* **33**, 759-785, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.05.001> (2008).
- 32 Iozzo, R. V. *Proteoglycans: structure, biology and molecular interactions*. (CRC Press, 2000).
- 33 Buckwalter, J. A. & Rosenberg, L. C. Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. Direct evidence for the variable length of the chondroitin sulfate-rich region of proteoglycan subunit core protein. *J. Biol. Chem.* **257**, 9830-9839 (1982).
- 34 Sheiko, S. S. *et al.* Single Molecule Rod–Globule Phase Transition for Brush Molecules at a Flat Interface. *Macromolecules* **34**, 8354-8360, doi:10.1021/ma010746x (2001).

- 35 Bertozzi, C. R., Kiessling & L., L. Chemical Glycobiology. *Science* **291**, 2357-2364, doi:10.1126/science.1059820 (2001).
- 36 BOYD, W. C. & SHAPLEIGH, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science* **119**, 419-419, doi:10.1126/science.119.3091.419 (1954).
- 37 Rini, J. M. Lectin structure. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **24**, 551-577 (1995).
- 38 Fasting, C. *et al.* Multivalenz als chemisches Organisations-und Wirkprinzip. *Angewandte Chemie* **124**, 10622-10650 (2012).
- 39 Ghazarian, H., Idoni, B. & Oppenheimer, S. B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta histochemica* **113**, 236-247, doi:10.1016/j.acthis.2010.02.004 (2011).
- 40 Mody, R., Joshi, S. H. a. & Chaney, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **33**, 1-10, doi:https://doi.org/10.1016/1056-8719(94)00052-6 (1995).
- 41 Sumner, J. B. THE GLOBULINS OF THE JACK BEAN, CANAVALIA ENSIFORMIS Preliminary Paper. *Journal of Biological Chemistry* **37**, 137-142 (1919).
- 42 Edelman, G. M. *et al.* The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. *Proceedings of the national academy of sciences* **69**, 2580-2584 (1972).
- 43 Naismith, J. H. *et al.* Refined structure of concanavalin A complexed with methyl  $\alpha$ -d-mannopyranoside at 2.0 Å resolution and comparison with the saccharide-free structure. *Acta Crystallographica Section D* **50**, 847-858 (1994).
- 44 Rose, A. S. *et al.* in *Proceedings of the 21st international conference on Web3D technology*. 185-186 (ACM).
- 45 Drickamer, K. C-type lectin-like domains. *Current Opinion in Structural Biology* **9**, 585-590, doi:https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)00009-3 (1999).
- 46 Cambi, A., Koopman, M. & Figdor, C. G. How C-type lectins detect pathogens. *Cellular Microbiology* **7**, 481-488, doi:doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00506.x (2005).
- 47 Cambi, A. & Figdor, C. G. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Current Opinion in Cell Biology* **15**, 539-546, doi:https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.08.004 (2003).
- 48 Menon, S. *et al.* Binding-site geometry and flexibility in DC-SIGN demonstrated with surface force measurements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 11524-11529, doi:10.1073/pnas.0901783106 (2009).
- 49 Ren, S. & Zuo, Y. DC-SIGN, DC-SIGNR and LSEctin: C-Type Lectins for Infection AU - Zhang, Feng. *International Reviews of Immunology* **33**, 54-66, doi:10.3109/08830185.2013.834897 (2014).
- 50 Appelmek, B. J. *et al.* Cutting Edge: Carbohydrate Profiling Identifies New Pathogens That Interact with Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Nonintegrin on Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* **170**, 1635, doi:10.4049/jimmunol.170.4.1635 (2003).
- 51 Turner, M. W. Mannose-Binding Lectin (MBL) in Health and Disease. *Immunobiology* **199**, 327-339, doi:https://doi.org/10.1016/S0171-2985(98)80037-5 (1998).
- 52 Haurum, J. S. *et al.* Complement activation upon binding of mannan-binding protein to HIV envelope glycoproteins. *AIDS (London, England)* **7**, 1307-1313 (1993).

- 53 Tabona, P., Mellor, A. & Summerfield, J. A. Mannose binding protein is involved in first-line host defence: evidence from transgenic mice. *Immunology* **85**, 153-159 (1995).
- 54 Hartshorn, K. L. *et al.* Human mannose-binding protein functions as an opsonin for influenza A viruses. *The Journal of clinical investigation* **91**, 1414-1420 (1993).
- 55 Ji, X., Gewurz, H. & Spear, G. T. Mannose binding lectin (MBL) and HIV. *Molecular Immunology* **42**, 145-152, doi:<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.06.015> (2005).
- 56 Vorup-Jensen, T. *et al.* Distinct pathways of mannan-binding lectin (MBL)-and C1-complex autoactivation revealed by reconstitution of MBL with recombinant MBL-associated serine protease-2. *The Journal of Immunology* **165**, 2093-2100 (2000).
- 57 Rispens, T. *et al.* Nanomolar to sub-picomolar affinity measurements of antibody–antigen interactions and protein multimerizations: Fluorescence-assisted high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry* **437**, 118-122 (2013).
- 58 Tu, T. *et al.* Protein-peptide affinity determination using an H/D exchange dilution strategy: Application to antigen-antibody interactions. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **21**, 1660-1667 (2010).
- 59 Schwarz, F. P., Puri, K. D., Bhat, R. & Surolia, A. Thermodynamics of monosaccharide binding to concanavalin A, pea (*Pisum sativum*) lectin, and lentil (*Lens culinaris*) lectin. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 7668-7677 (1993).
- 60 Lee, Y. C. & Lee, R. T. Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Accounts of Chemical Research* **28**, 321-327, doi:10.1021/ar00056a001 (1995).
- 61 Miura, Y. Synthesis and biological application of glycopolymers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **45**, 5031-5036, doi:10.1002/pola.22369 (2007).
- 62 Muñoz-Bonilla, A. *et al.* Influence of glycopolymers structure on the copolymerization reaction and on their binding behavior with lectins. *Eur. Polym. J.* **48**, 963-973, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.02.005> (2012).
- 63 Kiessling, L. L., Gestwicki, J. E. & Strong, L. E. Synthetic Multivalent Ligands as Probes of Signal Transduction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 2348-2368, doi:10.1002/anie.200502794 (2006).
- 64 Becer, C. R. The Glycopolymer Code: Synthesis of Glycopolymers and Multivalent Carbohydrate–Lectin Interactions. *Macromol. Rapid Commun.* **33**, 742-752, doi:10.1002/marc.201200055 (2012).
- 65 Schwarzenbach, v. G. Der chelateffekt. *Helvetica Chimica Acta* **35**, 2344-2359 (1952).
- 66 Mammen, M., Choi, S. K. & Whitesides, G. M. Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition* **37**, 2754-2794 (1998).
- 67 Pfeiffer, P., Breith, E., Lübke, E. & Tsumaki, T. Tricyclische orthokondensierte nebervalenzringe. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **503**, 84-130 (1933).
- 68 Page, M. I. & Jencks, W. P. Entropic contributions to rate accelerations in enzymic and intramolecular reactions and the chelate effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **68**, 1678-1683 (1971).
- 69 Gargano, J. M., Ngo, T., Kim, J. Y., Acheson, D. W. & Lees, W. J. Multivalent inhibition of AB5 toxins. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 12909-12910 (2001).
- 70 Pfeiffer, P. Einfache Metallkomplexsalze mit höheren Diaminen. *Naturwissenschaften* **35**, 190-191 (1948).

- 71 Gestwicki, J. E., Cairo, C. W., Strong, L. E., Oetjen, K. A. & Kiessling, L. L. Influencing receptor–ligand binding mechanisms with multivalent ligand architecture. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 14922-14933 (2002).
- 72 Lundquist, J. J. & Toone, E. J. The cluster glycoside effect. *Chemical reviews* **102**, 555-578 (2002).
- 73 Kiessling, L. L. & Grim, J. C. Glycopolymer probes of signal transduction. *Chemical Society Reviews* **42**, 4476-4491 (2013).
- 74 Weber, M., Bujotzek, A. & Haag, R. Quantifying the rebinding effect in multivalent chemical ligand-receptor systems. *The Journal of chemical physics* **137**, 054111 (2012).
- 75 Dam, T. K. & Brewer, C. F. Effects of clustered epitopes in multivalent ligand– receptor interactions. *Biochemistry* **47**, 8470-8476 (2008).
- 76 Lees, W. J., Spaltenstein, A., Kingery-Wood, J. E. & Whitesides, G. M. Polyacrylamides bearing pendant. alpha.-sialoside groups strongly inhibit agglutination of erythrocytes by influenza A virus: multivalency and steric stabilization of particulate biological systems. *Journal of medicinal chemistry* **37**, 3419-3433 (1994).
- 77 Bhatia, S., Camacho, L. C. & Haag, R. Pathogen inhibition by multivalent ligand architectures. *Journal of the American Chemical Society* **138**, 8654-8666 (2016).
- 78 Vonnemann, J. *et al.* Virus inhibition induced by polyvalent nanoparticles of different sizes. *Nanoscale* **6**, 2353-2360 (2014).
- 79 Ting, S. S., Chen, G. & Stenzel, M. H. Synthesis of glycopolymers and their multivalent recognitions with lectins. *Polymer Chemistry* **1**, 1392-1412 (2010).
- 80 Pussak, D. *et al.* Mechanical carbohydrate sensors based on soft hydrogel particles. *Angewandte Chemie International Edition* **52**, 6084-6087 (2013).
- 81 Schmidt, S., Wang, H., Pussak, D., Mosca, S. & Hartmann, L. Probing multivalency in ligand–receptor-mediated adhesion of soft, biomimetic interfaces. *Beilstein journal of organic chemistry* **11**, 720-729 (2015).
- 82 Roh, S., Chung, T. & Lee, B. Overview of the characteristics of micro-and nano-structured surface plasmon resonance sensors. *Sensors* **11**, 1565-1588 (2011).
- 83 Homola, J. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chemical reviews* **108**, 462-493 (2008).
- 84 Merrifield, B. Solid phase synthesis. *Science* **232**, 341-347, doi:10.1126/science.3961484 (1986).
- 85 Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **85**, 2149-2154, doi:10.1021/ja00897a025 (1963).
- 86 Chan, W. & White, P. *Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach*. Vol. 222 (OUP Oxford, 1999).
- 87 Behrendt, R., White, P. & Offer, J. Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *J. Pept. Sci.* **22**, 4-27, doi:10.1002/psc.2836 (2016).
- 88 Fernández-Forner, D., Casals, G., Navarro, E. s., Ryder, H. & Albericio, F. Solid-phase synthesis of 4-aminopiperidine analogues using the Alloc protecting group: an investigation of Alloc removal from secondary amines. *Tetrahedron Lett.* **42**, 4471-4474, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)00755-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039(01)00755-9) (2001).

- 89 Guibé, F. Allylic protecting groups and their use in a complex environment part II: Allylic protecting groups and their removal through catalytic palladium  $\pi$ -allyl methodology. *Tetrahedron* **54**, 2967-3042, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020\(97\)10383-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4020(97)10383-0) (1998).
- 90 Carpino, L. A. The 9-fluorenylmethyloxycarbonyl family of base-sensitive amino-protecting groups. *Accounts of Chemical Research* **20**, 401-407, doi:10.1021/ar00143a003 (1987).
- 91 Eichholtz, T., De Bont, D., De Widt, J., Liskamp, R. & Ploegh, H. A myristoylated pseudosubstrate peptide, a novel protein kinase C inhibitor. *J. Biol. Chem.* **268**, 1982-1986 (1993).
- 92 Atherton, E. *et al.* A mild procedure for solid phase peptide synthesis: use of fluorenylmethoxycarbonylamino-acids. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 537-539, doi:10.1039/C39780000537 (1978).
- 93 Shepbeck li, J. E., Kar, H. & Hong, H. A convenient and scaleable procedure for removing the Fmoc group in solution. *Tetrahedron Lett.* **41**, 5329-5333, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)00853-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039(00)00853-4) (2000).
- 94 Sheehan, J. C. & Hess, G. P. A New Method of Forming Peptide Bonds. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1067-1068, doi:10.1021/ja01609a099 (1955).
- 95 Klausner, Y. S. & BODANSKY, M. Coupling reagents in peptide synthesis. *Synthesis* **1972**, 453-463 (1972).
- 96 Koenig, W. & Geiger, R. A new method for synthesis of peptides: activation of the carboxyl group with dicyclohexylcarbodiimide using 1-hydroxybenzotriazoles as additives. *Chem. Ber.* **103**, 788 (1970).
- 97 Letsinger, R. L. & Mahadevan, V. Oligonucleotide synthesis on a polymer support<sup>1, 2</sup>. *Journal of the American Chemical Society* **87**, 3526-3527 (1965).
- 98 Bannwarth, W. Solid-Phase Synthesis of Oligodeoxynucleotides containing phosphoramidate internucleotide linkages and their specific chemical cleavage. *Helv. Chim. Acta* **71**, 1517-1527 (1988).
- 99 Schuerch, C. & Frechet, J. M. Solid-phase synthesis of oligosaccharides. I. Preparation of the solid support. Poly[p-(1-propen-3-ol-1-yl)styrene]. *Journal of the American Chemical Society* **93**, 492-496, doi:10.1021/ja00731a031 (1971).
- 100 Seeberger, P. H. & Haase, W.-C. Solid-Phase Oligosaccharide Synthesis and Combinatorial Carbohydrate Libraries. *Chemical Reviews* **100**, 4349-4394, doi:10.1021/cr9903104 (2000).
- 101 Wojcik, F., O'Brien, A. G., Götze, S., Seeberger, P. H. & Hartmann, L. Synthesis of Carbohydrate-Functionalised Sequence-Defined Oligo(amidoamine)s by Photochemical Thiol-Ene Coupling in a Continuous Flow Reactor. *Chemistry – A European Journal* **19**, 3090-3098, doi:10.1002/chem.201203927 (2013).
- 102 Wojcik, F., Lel, S., O'Brien, A. G., Seeberger, P. H. & Hartmann, L. Synthesis of homo- and heteromultivalent carbohydrate-functionalized oligo(amidoamines) using novel glyco-building blocks. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **9**, 2395-2403, doi:10.3762/bjoc.9.276 (2013).
- 103 Ponader, D. *et al.* Carbohydrate-Lectin Recognition of Sequence-Defined Heteromultivalent Glycooligomers. *Journal of the American Chemical Society* **136**, 2008-2016, doi:10.1021/ja411582t (2014).
- 104 Hartmann, L., Krause, E., Antonietti, M. & Börner, H. G. Solid-phase supported polymer synthesis of sequence-defined, multifunctional poly (amidoamines). *Biomacromolecules* **7**, 1239-1244 (2006).

- 105 Hartmann, L. Polymers for Control Freaks: Sequence-Defined Poly (amidoamine) s and Their Biomedical Applications. *Macromolecular Chemistry and Physics* **212**, 8-13 (2011).
- 106 Mosca, S., Wojcik, F. & Hartmann, L. Precise Positioning of Chiral Building Blocks in Monodisperse, Sequence-Defined Polyamides. *Macromolecular rapid communications* **32**, 197-202 (2011).
- 107 Schimka, S. *et al.* Photosensitive Peptidomimetic for Light-Controlled, Reversible DNA Compaction. *Biomacromolecules* **17**, 1959-1968 (2016).
- 108 Wojcik, F., O'Brien, A. G., Götze, S., Seeberger, P. H. & Hartmann, L. Synthesis of Carbohydrate-Functionalised Sequence-Defined Oligo (amidoamine) s by Photochemical Thiol–Ene Coupling in a Continuous Flow Reactor. *Chemistry—A European Journal* **19**, 3090-3098 (2013).
- 109 Baier, M., Giesler, M. & Hartmann, L. Split-and-Combine Approach Towards Branched Precision Glycomacromolecules and Their Lectin Binding Behavior. *Chemistry—A European Journal* **24**, 1619-1630 (2018).
- 110 Freichel, T., Eierhoff, S., Snyder, N. L. & Hartmann, L. Toward Orthogonal Preparation of Sequence-Defined Monodisperse Heteromultivalent Glycomacromolecules on Solid Support Using Staudinger Ligation and Copper-Catalyzed Click Reactions. *The Journal of organic chemistry* **82**, 9400-9409 (2017).
- 111 Ponader, D. *Synthesis of Sequence-defined Glycooligomers for Studying Multivalent Interactions*, (2014).
- 112 Boden, S., Wagner, K., Karg, M. & Hartmann, L. Presenting Precision Glycomacromolecules on Gold Nanoparticles for Increased Lectin Binding. *Polymers* **9**, 716 (2017).
- 113 Kolb, H. C., Finn, M. & Sharpless, K. B. Click-Chemie: diverse chemische Funktionalität mit einer Handvoll guter Reaktionen. *Angewandte Chemie* **113**, 2056-2075 (2001).
- 114 Zhang, L. *et al.* Ruthenium-catalyzed cycloaddition of alkynes and organic azides. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 15998-15999 (2005).
- 115 Dondoni, A. Die Entwicklung der Thiol-En-Kupplung als Klick-Prozess für die Materialwissenschaften und die bioorganische Chemie. *Angew. Chem.* **120**, 9133-9135, doi:10.1002/ange.200802516 (2008).
- 116 Hoyle, C. E. & Bowman, C. N. Thiol–Ene Click Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 1540-1573, doi:10.1002/anie.200903924 (2010).
- 117 Hein, J. E. & Fokin, V. V. Copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper (I) acetylides. *Chemical Society Reviews* **39**, 1302-1315 (2010).
- 118 Liang, L. & Astruc, D. The copper (I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC)“click” reaction and its applications. An overview. *Coordination Chemistry Reviews* **255**, 2933-2945 (2011).
- 119 Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. & Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem.* **114**, 2708-2711, doi:10.1002/1521-3757(20020715)114:14<2708::AID-ANGE2708>3.0.CO;2-0 (2002).
- 120 Okada, M. Molecular design and syntheses of glycopolymers. *Prog. Polym. Sci.* **26**, 67-104, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00038-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00038-1) (2001).
- 121 Wang, Q., Dordick, J. S. & Linhardt, R. J. Synthesis and Application of Carbohydrate-Containing Polymers. *Chem. Mater.* **14**, 3232-3244, doi:10.1021/cm0200137 (2002).

- 122 Sletten, E. T., Loka, R. S., Yu, F. & Nguyen, H. M. Glycosidase inhibition by multivalent presentation of heparan sulfate saccharides on bottlebrush polymers. *Biomacromolecules* **18**, 3387-3399 (2017).
- 123 Rele, S. M. *et al.* Dendrimer-Like PEO Glycopolymers Exhibit Anti-Inflammatory Properties. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 10132-10133, doi:10.1021/ja0511974 (2005).
- 124 Salvadó, M., Reina, J. J., Rojo, J., Castellón, S. & Boutureira, O. Topological defects in hyperbranched glycopolymers enhance binding to lectins. *Chemistry—A European Journal* **23**, 15790-15794 (2017).
- 125 Vázquez-Dorbatt, V., Lee, J., Lin, E. W. & Maynard, H. D. Synthesis of glycopolymers by controlled radical polymerization techniques and their applications. *ChemBioChem* **13**, 2478-2487 (2012).
- 126 Bernard, J., Hao, X., Davis, T. P., Barner-Kowollik, C. & Stenzel, M. H. Synthesis of various glycopolymer architectures via RAFT polymerization: from block copolymers to stars. *Biomacromolecules* **7**, 232-238 (2006).
- 127 Lowe, A. B. & McCormick, C. L. Reversible addition–fragmentation chain transfer (RAFT) radical polymerization and the synthesis of water-soluble (co)polymers under homogeneous conditions in organic and aqueous media. *Progress in Polymer Science* **32**, 283-351, doi:https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.11.003 (2007).
- 128 Fernández-Tejada, A., Cañada, F. J. & Jiménez-Barbero, J. Recent developments in synthetic carbohydrate-based diagnostics, vaccines, and therapeutics. *Chemistry—A European Journal* **21**, 10616-10628 (2015).
- 129 DeMarco, M. L. & Woods, R. J. Structural glycobiology: a game of snakes and ladders. *Glycobiology* **18**, 426-440 (2008).
- 130 Wulff, G., Schmid, J. & Venhoff, T. The synthesis of polymerizable vinyl sugars. *Macromol. Chem. Phys.* **197**, 259-274, doi:10.1002/macp.1996.021970120 (1996).
- 131 Pearson, S., Chen, G. & Stenzel, M. H. Synthesis of glycopolymers. *Engineered Carbohydrate-Based Materials for Biomedical Applications*, 1-118 (2011).
- 132 Grande, D., Baskaran, S., Baskaran, C., Gnanou, Y. & Chaikof, E. L. Glycosaminoglycan-Mimetic Biomaterials. 1. Nonsulfated and Sulfated Glycopolymers by Cyanoxyl-Mediated Free-Radical Polymerization. *Macromolecules* **33**, 1123-1125, doi:10.1021/ma991579s (2000).
- 133 Kumar, J., McDowall, L., Chen, G. & Stenzel, M. H. Synthesis of thermo-responsive glycopolymers via copper catalysed azide-alkyne 'click' chemistry for inhibition of ricin: the effect of spacer between polymer backbone and galactose. *Polymer Chemistry* **2**, 1879-1886, doi:10.1039/C1PY00048A (2011).
- 134 Mueller, R.-J. Biological degradation of synthetic polyesters—enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochem.* **41**, 2124-2128 (2006).
- 135 Suriano, F. *et al.* Synthesis of a family of amphiphilic glycopolymers via controlled ring-opening polymerization of functionalized cyclic carbonates and their application in drug delivery. *Biomaterials* **31**, 2637-2645, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.12.022> (2010).
- 136 Kobayashi, K., Tsuchida, A., Usui, T. & Akaike, T. A New Type of Artificial Glycoconjugate Polymer: A Convenient Synthesis and Its Interaction with Lectins. *Macromolecules* **30**, 2016-2020, doi:10.1021/ma961681e (1997).
- 137 Ambrosi, M. *et al.* Influence of preparation procedure on polymer composition: synthesis and characterisation of polymethacrylates bearing [small beta]-D-glucopyranoside and [small

- beta]-D-galactopyranoside residues. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 45-52, doi:10.1039/B108421F (2002).
- 138 Martínez, G., Fernández-García, M. & Sánchez-Chaves, M. Synthesis and characterization of N-vinylpyrrolidone-tert-butyl methacrylate-methacrylic acid terpolymers having amino sugar or bioactive amino side compounds. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **43**, 18-27, doi:10.1002/pola.20347 (2005).
- 139 Deng, Z., Li, S., Jiang, X. & Narain, R. Well-Defined Galactose-Containing Multi-Functional Copolymers and Glyconanoparticles for Biomolecular Recognition Processes. *Macromolecules* **42**, 6393-6405, doi:10.1021/ma9010457 (2009).
- 140 Sánchez-Chaves, M., Ruiz, C., Cerrada, M. L. & Fernández-García, M. Novel glycopolymers containing aminosaccharide pendant groups by chemical modification of ethylene-vinyl alcohol copolymers. *Polymer* **49**, 2801-2807, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2008.04.047> (2008).
- 141 Nicolas, J. *et al.* Nitroxide-mediated polymerization. *Progress in Polymer Science* **38**, 63-235 (2013).
- 142 Matyjaszewski, K. Atom transfer radical polymerization (ATRP): current status and future perspectives. *Macromolecules* **45**, 4015-4039 (2012).
- 143 Chiefari, J. *et al.* Living free-radical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfer: the RAFT process. *Macromolecules* **31**, 5559-5562 (1998).
- 144 Perrier, S. & Takolpuckdee, P. Macromolecular design via reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT)/xanthates (MADIX) polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **43**, 5347-5393 (2005).
- 145 Davies, M. C., Dawkins, J. V. & Hourston, D. J. Radical copolymerization of maleic anhydride and substituted styrenes by reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization. *Polymer* **46**, 1739-1753 (2005).
- 146 Stenzel, M. H., Zhang, L. & Huck, W. T. Temperature-Responsive Glycopolymer Brushes Synthesized via RAFT Polymerization Using the Z-group Approach. *Macromol. Rapid Commun.* **27**, 1121-1126 (2006).
- 147 Zhang, L., Bernard, J., Davis, T. P., Barner-Kowollik, C. & Stenzel, M. H. Acid-Degradable Core-Crosslinked Micelles Prepared from Thermosensitive Glycopolymers Synthesized via RAFT Polymerization. *Macromol. Rapid Commun.* **29**, 123-129 (2008).
- 148 Percec, V. *et al.* Controlling polymer shape through the self-assembly of dendritic side-groups. *Nature* **391**, 161-164 (1998).
- 149 Wintermantel, M. *et al.* Molecular Bottlebrushes. *Macromolecules* **29**, 978-983, doi:10.1021/ma950227s (1996).
- 150 Cheng, C., Khoshdel, E. & Wooley, K. L. Facile One-Pot Synthesis of Brush Polymers through Tandem Catalysis Using Grubbs' Catalyst for Both Ring-Opening Metathesis and Atom Transfer Radical Polymerizations. *Nano Lett.* **6**, 1741-1746, doi:10.1021/nl0611900 (2006).
- 151 Denesyuk, N. A. Bottle-brush polymers as an intermediate between star and cylindrical polymers. *Physical Review E* **68**, 031803 (2003).
- 152 Du, J.-Z., Tang, L.-Y., Song, W.-J., Shi, Y. & Wang, J. Evaluation of Polymeric Micelles from Brush Polymer with Poly( $\epsilon$ -caprolactone)-b-Poly(ethylene glycol) Side Chains as Drug Carrier. *Biomacromolecules* **10**, 2169-2174, doi:10.1021/bm900345m (2009).

- 153 Zou, J. *et al.* pH-Sensitive brush polymer-drug conjugates by ring-opening metathesis copolymerization. *Chemical Communications* **47**, 4493-4495, doi:10.1039/C0CC05531J (2011).
- 154 Johnson, J. A. *et al.* Drug-Loaded, Bivalent-Bottle-Brush Polymers by Graft-through ROMP. *Macromolecules* **43**, 10326-10335, doi:10.1021/ma1021506 (2010).
- 155 Kataoka, K., Harada, A. & Nagasaki, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Advanced Drug Delivery Reviews* **47**, 113-131, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00124-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00124-1) (2001).
- 156 Foster, J. C., Varlas, S., Couturaud, B., Coe, Z. & O'Reilly, R. K. Getting into Shape: Reflections on a New Generation of Cylindrical Nanostructures' Self-Assembly Using Polymer Building Blocks. *Journal of the American Chemical Society* **141**, 2742-2753, doi:10.1021/jacs.8b08648 (2019).
- 157 Beers, K. L., Gaynor, S. G., Matyjaszewski, K., Sheiko, S. S. & Möller, M. The Synthesis of Densely Grafted Copolymers by Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* **31**, 9413-9415, doi:10.1021/ma981402i (1998).
- 158 Jain, K., Kesharwani, P., Gupta, U. & Jain, N. K. A review of glycosylated carriers for drug delivery. *Biomaterials* **33**, 4166-4186, doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.02.033> (2012).
- 159 Ting, S. R. S., Chen, G. & Stenzel, M. H. Synthesis of glycopolymers and their multivalent recognitions with lectins. *Polymer Chemistry* **1**, 1392-1412, doi:10.1039/C0PY00141D (2010).
- 160 Tsukahara, Y., Tsutsumi, K., Yamashita, Y. & Shimada, S. Radical polymerization behavior of macromonomers. 2. Comparison of styrene macromonomers having a methacryloyl end group and a vinylbenzyl end group. *Macromolecules* **23**, 5201-5208 (1990).
- 161 Eberhardt, M., Mruk, R., Zentel, R. & Théato, P. Synthesis of pentafluorophenyl (meth) acrylate polymers: New precursor polymers for the synthesis of multifunctional materials. *Eur. Polym. J.* **41**, 1569-1575 (2005).
- 162 Ladmiral, V., Melia, E. & Haddleton, D. M. Synthetic glycopolymers: an overview. *Eur. Polym. J.* **40**, 431-449, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2003.10.019> (2004).
- 163 Ponader, D. *et al.* Photoswitchable precision glycooligomers and their lectin binding. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **10**, 1603-1612, doi:10.3762/bjoc.10.166 (2014).
- 164 Gerke, C. *et al.* Sequence-Controlled Glycopolymers via Step-Growth Polymerization of Precision Glycomacromolecules for Lectin Receptor Clustering. *Biomacromolecules* **18**, 787-796, doi:10.1021/acs.biomac.6b01657 (2017).
- 165 Wojcik, F., Mosca, S. & Hartmann, L. Solid-phase synthesis of asymmetrically branched sequence-defined poly/oligo (amidoamines). *The Journal of organic chemistry* **77**, 4226-4234 (2012).
- 166 Shamout, F. Synthesis of glyco-brush-polymers by a combination of solid phase synthesis and radical polymerization. *Masterarbeit* (2016).
- 167 Degirmenci, I. *et al.* Origins of the solvent effect on the propagation kinetics of acrylic acid and methacrylic acid. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **51**, 2024-2034, doi:10.1002/pola.26589 (2013).
- 168 Drobnik, J. *et al.* Enzymatic cleavage of side chains of synthetic water-soluble polymers. *Die Makromolekulare Chemie* **177**, 2833-2848, doi:doi:10.1002/macp.1976.021771003 (1976).
- 169 Feast, W. J., Gibson, V. C., Johnson, A. F., Khosravi, E. & Mohsin, M. A. Well-defined graft copolymers via coupled living anionic and living ring opening metathesis polymerisation.

- Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **115**, 37-42, doi:https://doi.org/10.1016/S1381-1169(96)00078-7 (1997).
- 170 Morandi, G., Mantovani, G., Montembault, V., Haddleton, D. M. & Fontaine, L. Synthesis of graft copolymers from  $\alpha$ -oxanorbornenyl macromonomers. *New Journal of Chemistry* **31**, 1826-1829, doi:10.1039/B705245F (2007).
- 171 Zhao, C. *et al.* Synthesis and characterization of pH-sensitive poly(N-2-hydroxyethyl acrylamide)-acrylic acid (poly(HEAA/AA)) nanogels with antifouling protection for controlled release. *Soft Matter* **8**, 7848-7857, doi:10.1039/C2SM25861G (2012).
- 172 Rosiak, J. M., Ulański, P., Pajewski, L. A., Yoshii, F. & Makuuchi, K. Radiation formation of hydrogels for biomedical purposes. Some remarks and comments. *Radiat. Phys. Chem.* **46**, 161-168, doi:https://doi.org/10.1016/0969-806X(95)00007-K (1995).
- 173 Wichterle, O. & LÍM, D. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* **185**, 117-118, doi:10.1038/185117a0 (1960).
- 174 Stickler, M. Free-radical polymerization kinetics of methyl methacrylate at very high conversions. *Die Makromolekulare Chemie* **184**, 2563-2579, doi:10.1002/macp.1983.021841216 (1983).
- 175 Ritter, H. *Makromoleküle*. (Springer, 2018).
- 176 Zhang, M. & Müller, A. H. E. Cylindrical polymer brushes. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **43**, 3461-3481, doi:10.1002/pola.20900 (2005).
- 177 Woodfield, P. A., Zhu, Y., Pei, Y. & Roth, P. J. Hydrophobically modified sulfobetaine copolymers with tunable aqueous UCST through postpolymerization modification of poly (pentafluorophenyl acrylate). *Macromolecules* **47**, 750-762 (2014).
- 178 Boyer, C. & Davis, T. P. One-pot synthesis and biofunctionalization of glycopolymers via RAFT polymerization and thiol-ene reactions. *Chemical Communications*, 6029-6031 (2009).
- 179 Roth, P. J., Jochum, F. D., Zentel, R. & Theato, P. Synthesis of hetero-telechelic  $\alpha$ ,  $\omega$  bio-functionalized polymers. *Biomacromolecules* **11**, 238-244 (2009).
- 180 Jochum, F. D., Roth, P. J., Kessler, D. & Theato, P. Double Thermoresponsive Block Copolymers Featuring a Biotin End Group. *Biomacromolecules* **11**, 2432-2439, doi:10.1021/bm1006085 (2010).
- 181 Schattling, P., Jochum, F. D. & Theato, P. Multi-responsive copolymers: using thermo-, light- and redox stimuli as three independent inputs towards polymeric information processing. *Chemical Communications* **47**, 8859-8861 (2011).
- 182 Theato, P. Synthesis of well-defined polymeric activated esters. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **46**, 6677-6687 (2008).
- 183 Boyer, C. & Davis, T. P. One- pot synthesis and biofunctionalization of glycopolymers via RAFT polymerization and thiol-ene reactions. *Chemical Communications*, 6029-6031, doi:10.1039/B910296E (2009).
- 184 Singha, N. K., Gibson, M. I., Koiry, B. P., Danial, M. & Klok, H.-A. Side-Chain Peptide-Synthetic Polymer Conjugates via Tandem "Ester-Amide/Thiol-Ene" Post-Polymerization Modification of Poly (pentafluorophenyl methacrylate) Obtained Using ATRP. *Biomacromolecules* **12**, 2908-2913 (2011).
- 185 Jesberger, M. *et al.* Hyperbranched polymers as scaffolds for multifunctional reversible addition-fragmentation chain-transfer agents: A route to polystyrene-core-polyesters and

- polystyrene-block-poly(butyl acrylate)-core-polyesters. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **41**, 3847-3861, doi:doi:10.1002/pola.10976 (2003).
- 186 Günay, K. A., Schüwer, N. & Klok, H.-A. Synthesis and post-polymerization modification of poly (pentafluorophenyl methacrylate) brushes. *Polymer Chemistry* **3**, 2186-2192 (2012).
- 187 Gibson, M. I., Fröhlich, E. & Klok, H. A. Postpolymerization modification of poly (pentafluorophenyl methacrylate): Synthesis of a diverse water-soluble polymer library. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **47**, 4332-4345 (2009).
- 188 Graisuwan, W., Zhao, H., Kiatkamjornwong, S., Theato, P. & Hoven, V. P. Formation of thermo-sensitive and cross-linkable micelles by self-assembly of poly (pentafluorophenyl acrylate)-containing block copolymer. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **53**, 1103-1113 (2015).
- 189 Gou, Y. *et al.* A detailed study on understanding glycopolymer library and Con A interactions. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **51**, 2588-2597 (2013).
- 190 Chen, Y., Lord, M. S., Piloni, A. & Stenzel, M. H. Correlation between Molecular Weight and Branch Structure of Glycopolymers Stars and Their Binding to Lectins. *Macromolecules* **48**, 346-357 (2015).
- 191 Nagao, M. *et al.* Design of glycopolymers carrying sialyl oligosaccharides for controlling the interaction with the influenza virus. *Biomacromolecules* **18**, 4385-4392 (2017).
- 192 Ellgaard, L., Sevier, C. S. & Bulleid, N. J. How Are Proteins Reduced in the Endoplasmic Reticulum? *Trends in Biochemical Sciences* **43**, 32-43, doi:10.1016/j.tibs.2017.10.006 (2018).
- 193 Yang, J., Chen, H., Vlahov, I. R., Cheng, J.-X. & Low, P. S. Evaluation of disulfide reduction during receptor-mediated endocytosis by using FRET imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 13872-13877, doi:10.1073/pnas.0601455103 (2006).
- 194 Giustarini, D. *et al.* Glutathione, glutathione disulfide, and S-glutathionylated proteins in cell cultures. *Free Radical Biology and Medicine* **89**, 972-981, doi:https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.410 (2015).
- 195 Saito, G., Swanson, J. A. & Lee, K.-D. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**, 199-215, doi:https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00179-5 (2003).
- 196 Li, C., Gunari, N., Fischer, K., Janshoff, A. & Schmidt, M. New Perspectives for the Design of Molecular Actuators: Thermally Induced Collapse of Single Macromolecules from Cylindrical Brushes to Spheres. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 1101-1104, doi:10.1002/anie.200352845 (2004).
- 197 Lutz, J.-F., Akdemir, Ö. & Hoth, A. Point by Point Comparison of Two Thermosensitive Polymers Exhibiting a Similar LCST: Is the Age of Poly(NIPAM) Over? *Journal of the American Chemical Society* **128**, 13046-13047, doi:10.1021/ja065324n (2006).
- 198 Pelton, R. Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) is never hydrophobic. *Journal of Colloid and Interface Science* **348**, 673-674, doi:https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.05.034 (2010).
- 199 Durand, A. & Hourdet, D. Synthesis and thermoassociative properties in aqueous solution of graft copolymers containing poly(N-isopropylacrylamide) side chains. *Polymer* **40**, 4941-4951, doi:https://doi.org/10.1016/S0032-3861(98)00698-3 (1999).
- 200 Zhu, X., Yan, C., Winnik, F. & Leckband, D. End-grafted low-molecular-weight PNIPAM does not collapse above the LCST. *Langmuir* **23**, 162-169 (2007).

- 201 Yu, Y. *et al.* Stretching of collapsed polymers causes an enhanced dissipative response of PNIPAM brushes near their LCST. *Soft matter* **11**, 8508-8516 (2015).
- 202 Jain, K., Vedarajan, R., Watanabe, M., Ishikiriyama, M. & Matsumi, N. Tunable LCST behavior of poly (N-isopropylacrylamide/ionic liquid) copolymers. *Polymer Chemistry* **6**, 6819-6825 (2015).
- 203 Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D. & Howley, P. M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**, 495-505, doi:[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90384-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90384-3) (1993).
- 204 Kenter, G. G. *et al.* Vaccination against HPV-16 Oncoproteins for Vulvar Intraepithelial Neoplasia. *New England Journal of Medicine* **361**, 1838-1847, doi:10.1056/NEJMoa0810097 (2009).
- 205 Shafti-Keramat, S. *et al.* Different Heparan Sulfate Proteoglycans Serve as Cellular Receptors for Human Papillomaviruses. *Journal of Virology* **77**, 13125-13135, doi:10.1128/jvi.77.24.13125-13135.2003 (2003).
- 206 Cerqueira, C. *et al.* Heparin increases the infectivity of Human Papillomavirus Type 16 independent of cell surface proteoglycans and induces L1 epitope exposure. *Cellular microbiology* **15**, 1818-1836 (2013).
- 207 Buck, C. B., Day, P. M. & Trus, B. L. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology* **445**, 169-174, doi:<https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.038> (2013).
- 208 Sapp, M. & Day, P. M. Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. *Virology* **384**, 400-409, doi:<https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.12.022> (2009).
- 209 DiGiuseppe, S., Bienkowska-Haba, M., Guion, L. G. & Sapp, M. Cruising the cellular highways: How human papillomavirus travels from the surface to the nucleus. *Virus Research* **231**, 1-9, doi:<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.10.015> (2017).
- 210 Homola, J. & Piliarik, M. in *Surface plasmon resonance based sensors* 45-67 (Springer, 2006).
- 211 Mandal, D. K., Kishore, N. & Brewer, C. F. Thermodynamics of Lectin-Carbohydrate Interactions. Titration Microcalorimetry Measurements of the Binding of N-Linked Carbohydrates and Ovalbumin to Concanavalin A. *Biochemistry* **33**, 1149-1156, doi:10.1021/bi00171a014 (1994).
- 212 Ambrosi, M., Cameron, N. R. & Davis, B. G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Organic & Biomolecular Chemistry* **3**, 1593-1608, doi:10.1039/B414350G (2005).
- 213 Ambrosi, M., Cameron, N. R., Davis, B. G. & Stolnik, S. Investigation of the interaction between peanut agglutinin and synthetic glycopolymeric multivalent ligands. *Organic & Biomolecular Chemistry* **3**, 1476-1480, doi:10.1039/B411555B (2005).
- 214 Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J. & Wyns, L. Legume lectin structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1383**, 9-36, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838\(97\)00182-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838(97)00182-9) (1998).
- 215 Johnsson, M. & Edwards, K. Liposomes, disks, and spherical micelles: aggregate structure in mixtures of gel phase phosphatidylcholines and poly (ethylene glycol)-phospholipids. *Biophysical Journal* **85**, 3839-3847 (2003).
- 216 Israelachvili, J. The different faces of poly (ethylene glycol). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 8378-8379 (1997).

- 217 Cuniberti, C. & Ferrando, R. Electron microscope investigation of poly(ethylene oxide) supermolecular particles in solution. *Polymer* **13**, 379-384, doi:[https://doi.org/10.1016/0032-3861\(72\)90058-4](https://doi.org/10.1016/0032-3861(72)90058-4) (1972).
- 218 Racho, J. & Mario, S. Prerequisites of Heparan Sulfates as receptors for Human Papillomavirus (HPV)  $\alpha$ -types. *University of Cologne* (2019).
- 219 Cerqueira, C. *et al.* Heparin increases the infectivity of Human Papillomavirus Type 16 independent of cell surface proteoglycans and induces L1 epitope exposure. *Cellular Microbiology* **15**, 1818-1836, doi:10.1111/cmi.12150 (2013).
- 220 Day, P. M. & Schelhaas, M. Concepts of papillomavirus entry into host cells. *Current opinion in virology* **4**, 24-31 (2014).
- 221 Becker, M., Greune, L., Schmidt, M. A. & Schelhaas, M. Extracellular Conformational Changes in the Capsid of Human Papillomaviruses Contribute to Asynchronous Uptake into Host Cells. *Journal of Virology* **92**, e02106-02117, doi:10.1128/jvi.02106-17 (2018).
- 222 Kao, E. C., Culbertson, B. M. & Xie, D. Preparation of glass ionomer cement using N-acryloyl-substituted amino acid monomers—evaluation of physical properties. *Dental Materials* **12**, 44-51 (1996).