

Synthese von Leucin-basierten Peptid- Präzisionsmakromolekül-Konjugaten und ihr strukturabhängiges Aggregationsverhalten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dana Itskalov

aus Riga

Düsseldorf, Februar 2022

Aus dem Institut für Organische und Makromolekulare Chemie der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Laura Hartmann
2. Prof. Dr. Thomas J. J. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2021

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2017 bis Dezember 2020 am Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Laura Hartmann durchgeführt.

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Diese Dissertation wurde weder in der vorliegenden noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution eingereicht, noch wurden bisher anderweitige Promotionsversuche meinerseits unternommen.

Düsseldorf, den 15.02.2022

(Dana Itskalov)

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meiner Betreuerin Prof. Dr. Laura Hartmann bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, in ihrer Arbeitsgruppe zu promovieren. Ich möchte mich bei ihr für die interessanten Projekte und die Kollaborationen während meiner Doktorarbeit bedanken. Ich möchte mich auch dafür bedanken, dass ich die Möglichkeit hatte, einen Forschungsaufenthalt an der Southern University of Denmark, Odense, zu absolvieren, wodurch ich sowohl meine persönlichen als auch meine wissenschaftlichen Fähigkeiten erweitern konnte.

Ein großer Dank gilt der Ernst-Jäger-Stiftung für die finanzielle Unterstützung, welche mir die Promotion am Institut für Makromolekulare Chemie ermöglicht hat. Für Ihr Interesse und Ihre Unterstützung bedanke ich mich auch persönlich bei Dr. Christian Jäger, Dr. Peter Manshausen, Prof. Dr. Thomas J. J. Müller und Prof. Dr. Karl-Heinz Spatschek.

Zudem möchte ich Prof. Dr. Thomas J. J. Müller dafür danken, dass er sich bereit erklärt hat, Zweitkorrektor dieser Arbeit zu sein.

Ein besonderer Dank geht an Morten F. Ebbesen, der es mir ermöglichte einen Forschungsaufenthalt in Odense, Dänemark, zu absolvieren. Ich danke ihm für die Zeit, die ich mit ihm verbringen konnte und für die vielen hilfreichen Diskussionen, Ratschläge und dafür, dass er immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Zudem möchte ich mich bei den Technikerinnen Stephanie Scheelen, Sonja Coors und Birgit Ohler für die Bereitstellung der Laborgeräte und die lustigen Mittagspausen in der Küche bedanken. Weiterhin möchte ich mich bei Frau Maria Beuer und Herrn Dr. Peter Tommes für die Messung meiner NMR- und MALDI-TOF-MS-Proben bedanken. Darüber hinaus möchte ich mich bei der Sekretärin Michaela Kitzka dafür bedanken, dass sie mich immer in allen organisatorischen Angelegenheiten geduldig und verständnisvoll beraten hat. Und ich möchte Dr. Mina Tabatabai dafür danken, dass sie mich mit all ihrem wissenschaftlichen Wissen und ihren Ratschlägen unterstützt hat.

Außerdem möchte ich meinem Bachelor-Studenten Antonio Luigi Figueroa Bietti für die schöne Zusammenarbeit danken. Ich bin besonders dankbar für seinen Enthusiasmus und seine Motivation an dem Projekt.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die Unterstützung, Ermutigung und die herausragende Atmosphäre bedanken. Nie werde ich die legendären Einstandspartys, Weihnachtspartys und die Klassenfahrten in die Niederlande und nach Malta vergessen. Es hat mir

sehr viel Spaß gemacht, mit euch zu arbeiten. Aber noch mehr hat es mir Spaß gemacht mit euch zu lachen.

Besonderer Dank gilt meinen „Büro-Jungs“ Patrick Konietzny, Markus Giesler, Philipp Reuther und Lorand Bonda. Es war die lustigste Zeit, an die ich immer mit Freude zurückdenken werde. Ich vermisse euch, die konstruktiven Gespräche und die Geduld, die ihr mit mir hattet. Ihr habt es immer wieder geschafft mich an schlechten Tagen zu motivieren und mir ein Lächeln ins Gesicht zu zaubern. Ich danke Markus, meinen Arbeits-Ehemann, mit dem ich Büro und Labor teilen durfte, für seine lustigen Wutausbrüche, seine (un-)gesunde Haltung am Schreibtisch, seine Geschichten und Witze, sein stummes Lachen (bei dem ich zwischendurch dachte, dass er platzt) und natürlich sein wertvolles Erbe. Vielen Dank auch an Patrick, der immer ein offenes Ohr für mich hatte und mir Ratschläge gegeben hat, wenn ich sie dringend brauchte. Lorand danke ich für seinen Optimismus und seine Leichtigkeit, welche mir in den letzten Monaten der Promotion stets als Anker dienten.

Weiterhin möchte ich mich bei Fadi Shamout für die zahlreichen humorvollen und anregenden Gespräche, sowie seine Ratschläge bedanken. Sie haben mich in vielen Fällen zum aktiven Handeln und „Out-of-the-box“-Denken ermutigt.

Zudem möchte mich bei Dr. Sophia Boden bedanken, die mich vom ersten Tag des Studiums bis zur Promotion begleitet hat. Durch ihren Ehrgeiz und ihre verständnisvolle Art, war sie mir während dieser Zeit nicht nur ein Vorbild, sondern auch eine Freundin.

Schließlich gilt mein größter Dank an meine Eltern Alissa und Mark Itskalov und meinem Freund Fawad Jacobi, die mich während der gesamten Promotion unterstützt haben. Danke für euer Verständnis und eure Geduld. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt, mich beraten und ermuntert habt.

Kurzzusammenfassung

Peptide gehören zu einer wichtigen Klasse von Biopolymeren. Sie sind hoch-definierte multifunktionale Moleküle, die wichtige Prozesse im Stoffwechsel von Lebewesen erfüllen. Ihre Funktion beruht dabei maßgeblich auf der Fähigkeit verschiedene überdimensionale Strukturen auszubilden. Entscheidend dabei ist der Aufbau der Primärstruktur, welche von der Anordnung der zwanzig proteinogenen Aminosäuren abhängig ist. Ausgelöst durch nicht-kovalente, intra- und inter-molekulare Wechselwirkungen finden Aggregationsprozesse statt, die zunächst zur Bildung von Sekundärstrukturen (α -Helices oder β -Faltblätter) und schließlich zur Bildung von komplexeren Tertiär- und Quartärstrukturen führen. Aufgrund dieser Eigenschaft werden Peptide erfolgreich für verschiedene Anwendungen in der Biomedizin oder Biotechnologie eingesetzt. So finden sie Einsatz in der Materialchemie, z.B. zur Herstellung von Hydrogelen oder zur Beschichtung und Funktionalisierung von Oberflächen, als auch im Drug-Delivery-Bereich zur Bekämpfung von Krankheiten, wie Krebs und Diabetes. Zur Verbesserung ihrer Stabilität, werden Peptide häufig mit synthetischen Polymeren verknüpft. Hierbei wird eine neue Materialklasse erzeugt, die die Vorteile beider Strukturen miteinander verknüpft. Ziel dieser Arbeit ist es erstmalig Hybrid-Strukturen, s.g. Peptid-Polymer-Konjugate, zu erzeugen, in denen sowohl das Peptid als auch das Polymer monodispers und sequenzdefiniert ist. Dadurch können gezielt strukturelle Variationen erzeugt werden, die auf ihren Effekt zur Aggregation hin untersucht werden. Als Polymer-Gerüst kommen hier die zuvor von *Hartmann et al.* entwickelten Oligo(amidoamine) zum Einsatz. Diese lassen sich, analog zur synthetischen Erzeugung von Peptiden, mittels der von *Merrifield* entwickelten Festphasensynthese herstellen und bieten somit einfachen Zugang zu sequenzdefinierten Peptid-Polymer-Konjugaten.

Zu diesem Zweck wurden Peptid-Präzisionsmakromolekül-Konjugate (PPMKs) hergestellt, die Oligoleucin-Ketten als funktionale Peptideinheit trugen. Über Selbstassemblierungsprozesse ordneten sich die Konjugate zu Aggregaten an, die abhängig von der Präparationsmethode als Wirkstofftransportsystem oder als Makrogel angewendet werden könnte.

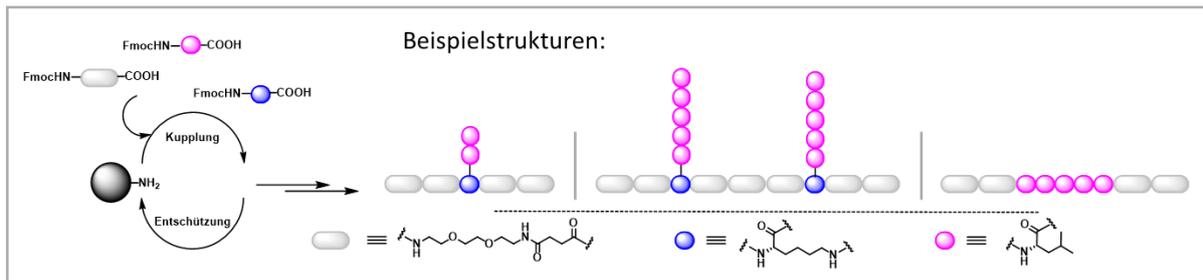
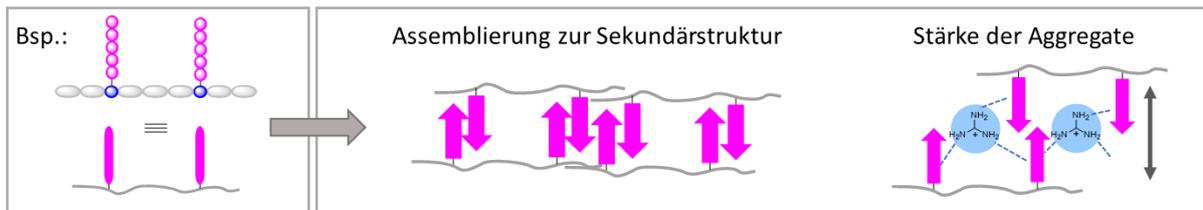
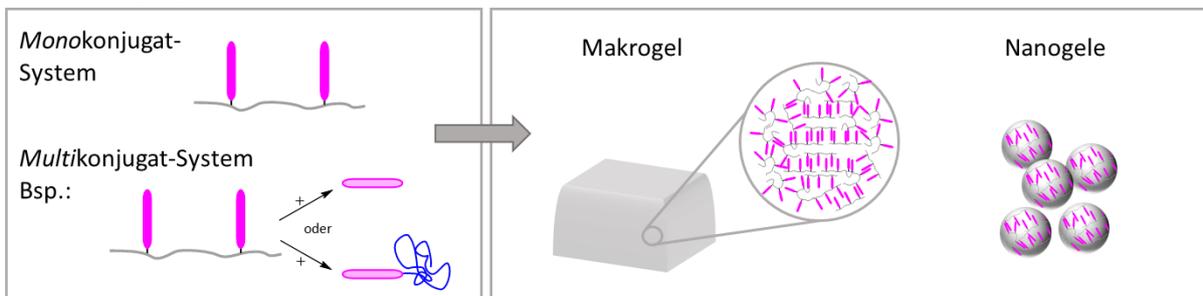
Synthese:**Aggregationsverhalten:****Materialpräparation:**

Abbildung 1: Übersicht zur vorliegenden Arbeit zur Synthese und Charakterisierung von Peptid-Präzisionsmakromolekül-Konjugaten (PPMK).

Hierzu wurde im ersten Teil mittels der Festphasensynthese eine Reihe von Leucin-basierten PPMKs synthetisiert, die sich in Architektur, Valenz und Peptid-Kettenlänge unterschieden. Es wurden verzweigte Pfropf-co-PPMKs synthetisiert, bei denen Pentaleucin oder Dileucin als Seitenkette an das aus hydrophilen Bausteinen bestehende Oligo(amidoamin)-Rückgrat gekuppelt wurde. Außerdem wurden lineare Block-co-PPMKs synthetisiert bei denen Leucin-Einheiten in unterschiedlicher Reihenfolge in das Rückgrat integriert wurden. Weiterhin wurden das reine Pentaleucin sowie ein PEG-Pentaleucin-Derivat hergestellt. Analysen mit FTIR und CD-Spektroskopie im zweiten Teil der Arbeit zeigten, dass sich das divalente und trivalente Pentaleucin-Pfropf-co-PPMK über Selbstassemblierung zu β -Faltblatt-Strukturen anordnete. Denaturierungsstudien mit dem chaotropen Salz Guanidinhydrochlorid (GdnHCl) und Studien zur kritischen Aggregationskonzentration (KAK) mit Thioflavin T (ThT) bestätigten die Formation dieser Konjugate zu stabilen Aggregaten.

Im dritten Teil der Arbeit wurde anhand der gewonnenen Informationen zum Aggregationsverhalten unterschiedliche Präparationsmethoden zur gezielten Erzeugung von Makrogelen oder Nanopartikeln

untersucht. Aufgrund der stark ausgeprägten Hydrophobie der Strukturen eignen sie sich für den Einsatz als niedermolekulare Gelatoren. Hierzu wurden in DMSO gequollene Organogele hergestellt, die zum einen aus den reinen Dimer- oder Trimer-PPMKs bestanden, oder aus Mischkonjugatsystemen, bei dem das Dimer bzw. Trimer in einem bestimmten Verhältnis mit dem freien Pentaleucin bzw. PEG-Pentaleucin vermischt wurde. Frequenz-Sweep-Messungen am Rheometer ergaben hohe Speichermodule für die Monokonjugatsysteme von $G' = 10$ bzw. 20 kPa. Die Verwendung von Multikomponentensystemen, insbesondere die Zugabe des reinen Pentaleucins, führte zum Bruch intermolekularer Bindungen zwischen den Konjugaten, sodass sich die Viskosität der Gele auf $G' = 0.7$ bis 5 kPa erhöhte. Nanopartikel wurden mittels der Solvent-Switch-Methode hergestellt. Die DLS-Messungen zeigten eine konzentrationsabhängige Abnahme der Partikelgröße bis zu 51 nm für das Dimer (bei $2 \mu\text{M}$) und 88 nm für das Trimer (bei $1 \mu\text{M}$). Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass das Verwenden von Multikonjugatsystemen, insbesondere die Kombination mit dem freien Pentaleucin, die Wechselwirkungen zwischen den Pfropf-co-PPMK-Molekülen unterbrach. Unabhängig von dem Mischungsverhältnis konnten deutlich kleinere Partikelgröße von etwa 30 nm erreicht werden. Schließlich zeigten Toxizitätsstudien sowohl der Mono- als auch der Multikomponentensysteme an MDA-MB-231- und MCF-12A-Zellen keine zytotoxische Wirkung. Demnach eignen sich diese Materialien für zukünftige Anwendungen im biomedizinischen Bereich.

Ein Nebenprojekt dieser Arbeit, war die Herstellung von Lipid-Makromolekül-Konjugaten, bei dem das Oligo(amidoamin) Hepta-EDS als PEG-Alternative zur Oberflächenmodifizierung von Liposomen untersucht wurde. Hierzu wurde das Konjugat DOPES-Pep-OI synthetisiert, welches zusätzlich zu dem Phospholipid DOPES und dem Oligo(amidoamin) die spaltbare Peptideinheit GFLG trug. Toxizitätstudien an HeLa-Zellen zeigten, dass das Konjugat keine zytotoxische Wirkung besitzt. Dennoch wiesen Experimente an Zebrafischlarven eine schlechtere Leistung der Oligo(amidoamine)-Liposome im Vergleich zu den bereits verwendeten PEGylierten Liposomen auf. Nichtsdestotrotz konnte durch Aufnahmestudien in HeLa-Zellen festgestellt werden, dass die spaltbare GFLG-Sequenz eine interessante Möglichkeit bietet, die Oligo(amidoamin)-Schutzschicht in unmittelbarer Zellnähe abzulösen und somit die Aufnahme zu verbessern.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	VI
Kurzzusammenfassung.....	IX
1 Allgemeine Einleitung.....	1
1.1 Peptide in der Medizin	1
1.1.1 Von der Entdeckung zum Therapeutikum – Ein historischer Werdegang	1
1.1.2 Festphasen-Peptidsynthese	3
1.1.2.1 Der Ursprung und das allgemeine Prinzip der Festphasensynthese.....	3
1.1.2.2 Festphasensynthese von Präzisions-Makromolekülen	8
1.1.3 Die Vielfalt der Peptidstrukturen und ihre Anwendungen	9
1.1.3.1 Selbstassemblierung von Peptiden	10
1.1.3.2. Anwendungen von selbstassemblierten Peptiden.....	13
1.1.3.2.1 Wirkstofftransport.....	14
1.1.3.2.2 Tissue Engineering.....	17
1.1.3.3 Enzymresponsive Peptide	19
1.1.4 Selbst-assemblierte Hybrid-Biomaterialien.....	21
1.1.4.1 Peptid-Polymer-Konjugate	22
1.1.4.2 Lipid-Polymer-Konjugate	24
2 Motivation und Zielsetzung.....	27
3 Ergebnisse und Diskussion	30
3.1 Synthese von Leucin-basierten Präzisions-Peptid-Oligomer-Konjugaten und ihr strukturabhängiges Aggregationsverhalten	30
3.1.1 Synthese der Peptid-Präzisionsmakromolekül-Konjugate	30
3.1.2 Untersuchung der Sekundärstruktur der PPMKs	40
3.1.2.1 Fourier-Transform Infrared Spektroskopie	40
3.1.2.2 Zirkulardichroismus-Spektroskopie.....	42
3.1.2.3 Löslichkeitsstudien mit Guanidinhydrochlorid.....	46
3.1.2.4 Verifizierung der Löslichkeitsstudie durch Thioflavin T.....	49
3.1.2.5 Bestimmung der kritischen Aggregationskonzentration durch Thioflavin T.....	52
3.1.3 Gezielte Formulierung der PPMK-Aggregate für Biotechnologische Anwendungen.....	55
3.1.3.1 Formulierung und Analyse von PPMK-Organogelen.....	56
3.1.3.1 Formulierung und Analyse von PPMK-Nanopartikel.....	61
3.1.3.1.1 Bestimmung der PPMK-Partikelgröße mittels Dynamische Lichtstreuung.....	61
3.1.3.1.2 Bestimmung der PPMK-Partikel mittels Transmissionselektronenmikroskop.....	68
3.1.3.1.3 Toxizitätsstudie.....	71

3.2 Synthese von bioabbaubaren Lipid-Polymer-Konjugaten mit Oligo(amidoamin) als PEG-Alternative	73
3.2.1 Synthese der biodegradierbaren Oligo(amidoamin)-Lipo-Makromoleküle	74
3.2.2 Synthese und Analyse der Oligo(amidoamin)-Lipo-Makromolekül-Liposome	77
4 Zusammenfassung und Ausblick	81
5 Experimenteller Teil	86
5.1 Material	86
5.2 Geräte	87
5.3 Methoden	89
5.4 Synthese	93
5.4.1 Baustein Synthese	93
5.4.1 Synthese der Peptid-Präzisionsmakromolekül-Konjugate	94
5.4.1 Synthese der Oligo(amidoamin)-Lipo-Makromoleküle	104
6 Anhang.....	109
6.1 Abkürzungsverzeichnis	109
6.2 Abbildungsverzeichnis	115
6.3 Schemaverzeichnis	119
6.4 Tabellenverzeichnis	119
6.5 Appendix.....	120
7 Literatur	143

1 Allgemeine Einleitung

1.1 Peptide in der Medizin

1.1.1 Von der Entdeckung zum Therapeutikum – Ein historischer Werdegang

Millionen Jahre der Evolution hat die Natur mit einem Erfahrungsschatz ausgestattet, welches den Forschern von heute als Inspirationsquelle für die Entwicklung von Produkten von morgen dient. Aufgrund ihrer hochdefinierten Struktur sind Peptide eines von der Natur hervorgebrachten perfekten Systeme, ohne die „Das Leben“ das wir es heute kennen nicht mehr vorstellbar wäre. Durch ihre strukturelle und funktionale Vielfalt sind sie bedeutungsvolle Akteure in komplizierten biologischen Prozessen, beispielsweise als Hormone, Signalmoleküle oder als Antikörper - um nur einige zu nennen. So scheint es nicht verwunderlich, dass sich Wissenschaftler ebendiese Moleküle für die Entwicklung neuartiger Materialien in biomedizinischen und biotechnologischen Bereichen als Vorbilder nehmen.^[1]

Die Erfolgsgeschichte begann mit der Entdeckung der ersten Aminosäuren Glycin und Leucin durch den französischen Chemiker *Henri Braconnot*^[2] Mitte des 19ten Jahrhunderts. Weitere Nachforschungen namhafter Wissenschaftler wie *Franz Hofmeister*^[3] und *Emil Fischer*^[4] setzten um 1900 weitere Meilensteine zur Entschlüsselung der Peptidstruktur, indem sie beweisen konnten, dass bei der Verknüpfung von Aminosäuren durch Kondensation Amid-Verbindungen entstehen. Mit dem erlangten Wissen gelang es *Fischer et al.*^[5] die Herstellung des ersten synthetische Oligopeptids, einem Octadecapeptid zusammengesetzt aus drei Leucin- und fünfzehn Glycin-Einheiten. Diese Erkenntnisse katalysierten die Untersuchung und Entschlüsselung zahlreicher Peptide bis hin zur Größenordnung von Proteinen, die durch fortschreitende Techniken auch aus Tieren^[6], Pflanzen^[7-8], Bakterien^[9-10] und Pilzen^[11] isoliert werden konnten. Die neuen Entdeckungen eröffneten ein völlig neues Forschungsfeld, das die Entwicklung neuartiger molekularbiologischer Verfahren, sowie die Verbesserung der Peptidaufreinigung und -analyse, vorantrieb.^[12] Letztendlich führte dies zu einer vollständigen Strukturaufklärung und Synthese des Insulins^[13], dem ersten peptidhaltigen Therapeutikum, das in den 1920er Jahren Menschen mit Diabetes verabreicht wurde. Heute gehören die s.g. biologischen Präparate zu den `Block-Buster` auf dem Arzneimittelmarkt. Mit \$40 Milliarden Jahresumsatz bilden Wirkstoffe basierend auf Peptiden, Proteinen und Antikörpern 10 % der gesamten Einnahmen in der Pharmazeutischen Industrie.^[12]

Viele vorteilhafte Eigenschaften haben den Vormarsch der Peptide in der Medizin begünstigt. Aufgrund ihrer durchschnittlichen Länge von 30 Aminosäure-Einheiten eignen sie sich als potenzieller Lückenfüller zwischen den zwei bis dato allgemein verwendeten Wirkstoff-Kategorien (siehe Abb. 2): Den kleinen Molekülen mit Molekulargewichten <500 Da und den viel Größeren `biologischen`

Molekülen typischerweise >5000 Da.^[14] Nachteile der konventionell eingesetzten kleinen Moleküle sind ihre geringe Selektivität zum zu therapierenden Zielgewebe, welche nicht selten zu unerwünschten Nebenreaktionen führt.^[15-16] Im Vergleich dazu besitzen Proteine eine sehr hohe Spezifität, sind aber aufgrund ihrer Größe und damit einhergehenden geringen Membranpermeabilität weniger wirksam.^[17] Peptide sind somit eine Klasse von Molekülen, die die Vorteile beider Kategorien in sich vereint. Als kleinste funktionale Einheit eines Proteins bieten sie eine hohe Effizienz, Selektivität und Spezifität^[18] dar, haben aber im Vergleich zu ihren großen `Brüdern` aufgrund des geringen Molekulargewichts ein höheres Potenzial durch Gewebe- oder Tumorzellen zu penetrieren.^[19] Des Weiteren wird das Risiko einer Immunreaktion minimiert, da diese zum einen eine geringe Halbwertszeit^[20] besitzen und somit weniger im Gewebe akkumulieren, was das Risiko einer erhöhten Toxizität nach Metabolisierung mit sich führen könnte. Zusätzlich werden Komplikationen reduziert, da bei dem Abbau der Peptide körpereigene Aminosäuren entstehen.^[21-22]

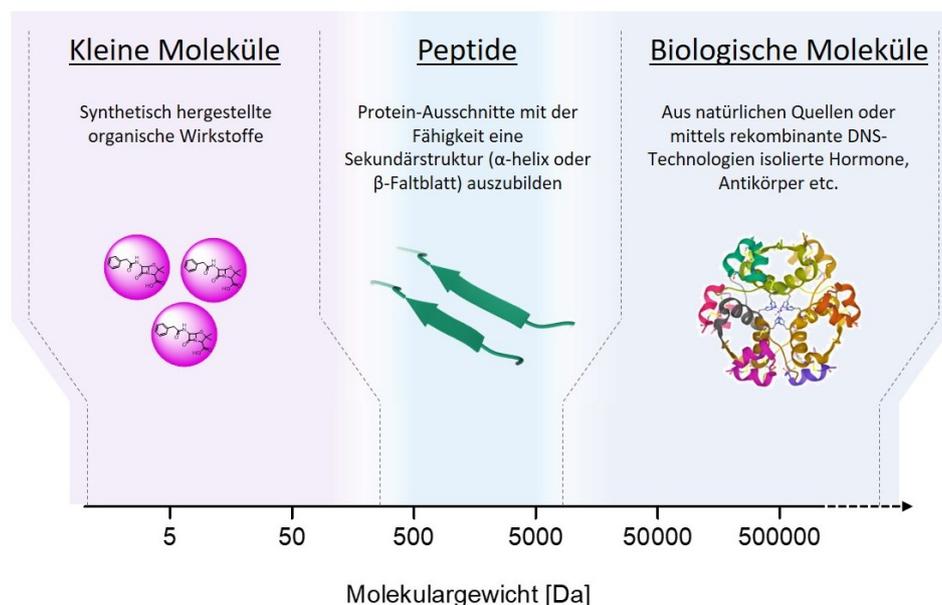


Abbildung 2: Molekulargewichtsverteilung der eingesetzten Wirkstoffmoleküle. Die bis zur Mitte des 20ten Jahrhunderts eingesetzten Wirkstoffmoleküle wurden in zwei Klassen unterteilt. Zum einen in sehr kleine, synthetisch hergestellte organische Wirkstoffe <500 Da (hier im Beispiel das Penicillin zur Bakterienbekämpfung) oder in sehr große biologische Moleküle >5000 Da (z.B. das Insulin; Proteinstruktur PDB ID (engl. Protein Data Bank identification code): 1OS4^[23]). Peptide vervollständigen dieses Spektrum, indem sie mit ihrer durchschnittlichen Größe von $500 - 5000$ Da die Lücke besetzen und indem sie die Vorteile beider Klassen in sich vereinen.

Weitere Vorteile ergeben sich aus den geringen Produktionskosten der Peptide. Traditionell wurden therapeutische Peptide entweder aus natürlichen oder bioaktiven Proteinen aus Pflanzen, Tieren oder Menschen, oder mithilfe von rekombinanten DNS-Technologien isoliert.^[24-25] Beide Methoden sind insbesondere zur Erzeugung von vollständigen Proteinsequenzen geeignet. Zur Gewinnung von den deutlich kleineren Peptiden hat sich diese Methode als suboptimal erwiesen. Genauso wenig wie der `natürliche` Weg war auch der bis dato durchgeführte chemische Syntheseweg ungeeignet. Die

nasschemische Synthese war mit sehr vielen Schritten und damit einhergehenden enormen Materialverbrauch verbunden. Gesucht war eine Methode, die es erlaubt Peptide in der Größenordnung von fünf bis fünfzig Aminosäureeinheiten im großen Maßstab synthetisch herzustellen.^[26-27] Mit der Entwicklung der Festphasenpeptidsynthese gelang es *Merrifield*^[28] in den 1960er Jahren genau das zu realisieren (siehe *Kapitel 1.1.2.1*). Unter der Verwendung von festen unlöslichen Trägern konnten Peptide simpel und ökonomisch synthetisiert, am Ende des Prozesses abgespalten und so isoliert in Lösung erhalten werden. Schnell wurden diese Strategien der Festphasenpeptidsynthese übernommen, die es der Forschung und der Pharmazeutischen Industrie die Generierung unendlich vieler, unterschiedlicher Peptide ermöglichte.^[29] Eine einfache Rechnung verdeutlicht die Anzahl an Möglichkeiten, die einem bei der Kreation neuer Peptidmotive offen stehen: Zwanzig proteinogene Aminosäuren können bei dem Aufbau eines Peptids verwendet werden (unbeachtet der unzähligen nicht-proteinogenen oder synthetischen Aminosäuren, die ebenfalls eingesetzt werden können). Mit der Annahme, dass das Peptid aus nur fünf Aminosäuren aufgebaut wird, ergeben sich $20^5 = 3.2$ Millionen verschiedene Möglichkeiten der Anordnung.

Diese neue Technologie ermöglichte eine neue Perspektive der Synthesestrategie. Zusätzlich zu dem geläufigen „Top-down“ Verfahren, bei dem bekannte, natürlich vorkommende Peptide untersucht und ihre funktionalen Abschnitte identifiziert wurden, kam die „Bottom-up“ Methode zum Einsatz. Durch letztere haben Wissenschaftler die Möglichkeit mit dem Design der Peptidstruktur die Funktion und damit auch die Anwendung zu beeinflussen.^[30] Dadurch wuchs die Vielfalt an synthetisch hergestellter Peptide und parallel dazu ihr Anwendungsspektrum.

1.1.2 Festphasen-Peptidsynthese

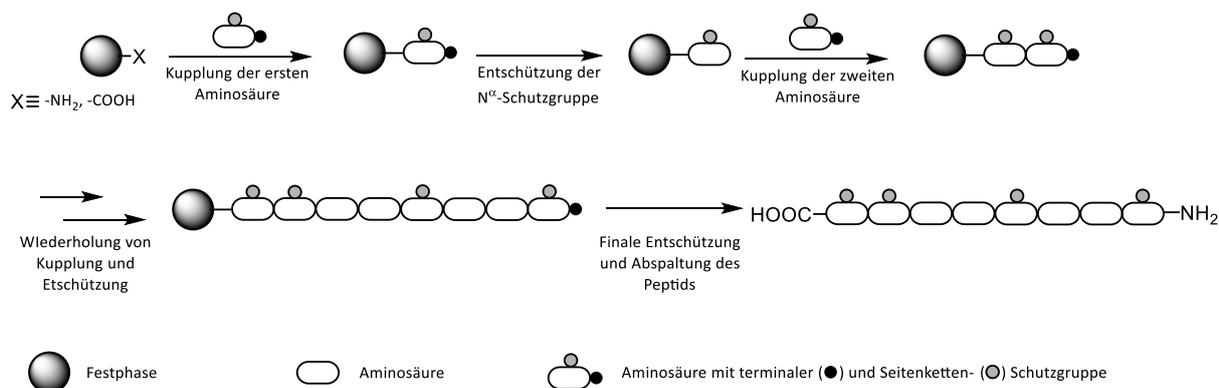
1.1.2.1 Der Ursprung und das allgemeine Prinzip der Festphasensynthese

Durch die vielfältigen Anwendungen der Peptide in der Natur, hat sich ein hoher Grad an funktioneller Diversität entwickelt, der maßgeblich von der Struktur vorgegeben wird. Sowohl die Anordnung als auch die Häufigkeit der zwanzig proteinogenen Aminosäuren ist demnach entscheidend für die Funktionalität des jeweiligen Peptids.^[31]

Die Synthese solcher komplizierter Strukturen war eine Herausforderung, deren sich einige Forscher des 20ten Jahrhunderts annahmen. Nachdem *Hofmeister*^[3] und *Curtius*^[32] erkannten, dass die Aminosäuren über Amid-Gruppen miteinander verbunden sind, gelang es *Fischer et al.* im Jahr 1902 das erste Mal Peptide herzustellen, zunächst das einfache Dipeptid Diglycin^[33], vier Jahre später aber schon ein Octadecapeptid.^[5] Trotz dieser bemerkenswerten Leistung, gelang es Fischer nicht, ein Peptid sequenzkontrolliert herzustellen. Ein wichtiger Fortschritt in der Peptidsynthese war die im Jahr

1932 von *Bergmann* und *Zervas*^[34] vorgestellten orthogonal abspaltbaren Amino-Schutzgruppen. Mit dem Aufkommen von Schutzgruppenstrategien wurde es möglich, kleine Peptidhormone zu synthetisieren, so wie das von *Vigneaud et al.*^[35] über eine Lösungsphasensynthese erzeugte Octapeptidhormon Oxytocin.

Doch erst die Einführung der Festphasen-basierten Peptidsynthese brachte nötige Technologie zur Erzeugung hochmolekularer Peptidstrukturen. Im Jahr 1963 beschrieb *Merrifield*^[28] die erste Festphasensynthese eines Peptids, eines Tetrapeptids. Die Festphasen-Peptidsynthese hat sich als effiziente Technik für die Herstellung zahlreicher Peptide erwiesen, indem eine Peptidkette schrittweise an einen festen Träger gebunden wird (siehe Schema 1). Während jeder Synthesestufe wird die wachsende Peptidkette kovalent an die unlösliche Matrix gebunden und kann daher nach Abschluss jeder Reaktion durch schnelles Filtrieren und Waschen leicht von nicht umgesetzten Reagenzien getrennt werden.



Schema 1: Allgemeine schematische Darstellung der Festphasen-Peptidsynthese zur Herstellung kleiner Peptidketten durch schrittweise Assemblierung der Aminosäuren auf einem festen Träger.^[36]

Die Festphasen-Peptidsynthese beginnt mit dem festen Träger, der mit einer Gruppe X funktionalisiert ist, die entweder eine Amin- oder eine Carboxygruppe sein kann. Da die Aminosäuren sequenziell in C->N-Richtung gekuppelt werden, wird die erste Aminosäure an ihrem Carboxy-Terminus durch eine kovalente Bindung an den Träger verankert. Die Aminosäure wird an der N-terminalen Stelle und ggf. an der reaktiven Seitenkette mit einer Schutzgruppe blockiert. Nach der Kupplung kann dann die terminale Schutzgruppe entfernt werden, ohne die Schutzgruppe der Seitenkette zu beeinträchtigen. Damit ist die Peptidkette für den nächsten Kupplungszyklus vorbereitet. Jeder Syntheseschritt, einschließlich dem Entschützen, Waschen und Kuppeln wird für jede Aminosäure wiederholt, bis die gewünschte Peptidsequenz aufgebaut ist. Um das Produkt zu erhalten, wird es schließlich mit einer sauren Spatlösung vom festen Träger abgespalten.^[36-37]

Mit Hilfe dieser Methode sind kleine Peptidketten leicht zu erzeugen. Bei längeren Sequenzen besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit für Nebenprodukte, die durch unvollständige Reaktionen aufgrund

unzureichender Diffusion der Reaktanten, unzureichender Quellung des Harzes und Aggregation der Peptidsequenz entstehen. Diese reichern sich während des Kettenaufbaus auf dem Harz an und verunreinigen das Endprodukt.^[38] Trotz dieses Problems bietet die Methode einige überzeugende Vorteile. Die Reaktionen werden durch die Verwendung von überschüssigen Reaktanten zur Vollendung getrieben. Da die einzelnen Reaktionsschritte in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt werden und somit der Verlust des wiederholten Transfers von Materialien vermieden wird, bietet es eine einfache und beschleunigte Technik. Außerdem ermöglicht dieses Reaktionsgefäß das Entfernen und Filtrieren von nicht umgesetzten Reaktanten und vermeidet somit eine aufwendige Isolierung und Reinigung von Zwischenprodukten, was ebenfalls große Verluste verhindert. Der Vorteil der Verankerung der Peptidkette auf einem unlöslichen Träger erhöht die Solvatation und vermindert gleichzeitig Aggregationsprozesse.^[39]

Feste Träger und Linker

Das erfolgreichste von Merrifield entwickelte Harz war ein Gel, das durch Suspensionspolymerisation eines Styrol-Copolymers synthetisiert wurde, das mit 1-2 % *m*-Divinylbenzol vernetzt war (siehe Abb. 3a). Aufgrund seiner relativ hohen Beladungskapazität von 0,5 - 3 mmol/g und seiner relativ geringen Kosten, ist es eines der am häufigsten verwendeten Harze.^[40] Es quillt in organischen Lösungsmitteln, z. B. Dichlormethan (DCM), auf das Sechsfache seines ursprünglichen Volumens auf. Da die Hauptreaktionen innerhalb der Matrix ablaufen, ist das Harz-Gerüst für die diffundierenden Reaktanten frei zugänglich.^[37] Der Merrifield-Typ des Trägers ist sehr hydrophob und nicht mit Wasser kompatibel. Daher wird eine andere beliebte Serie von Harzen hergestellt, indem das Merrifield-Harz mit 50 - 70 % Poly(ethylenglykol) (PEG) kombiniert wird. Diese so genannten TentaGel™-Harze verbessern nachweislich die Gesamtausbeute und die Reinheit des synthetisierten Peptids, insbesondere bei längeren Sequenzen und bei Peptiden, die zur Aggregation neigen. Ein weiterer Vorteil ist die größere Mobilität aufgrund des PEG-Spacers, der den Abstand zwischen der Oberfläche des Trägers und dem gebundenen Molekül vergrößert und somit sterische Wechselwirkungen verringert und/oder die interne Viskosität des Trägers selbst senkt. Außerdem hat es hervorragende Quelleigenschaften in polaren organischen Lösungsmitteln wie DMF und DCM sowie in polaren protischen Lösungsmitteln wie Wasser, Alkohol und Tetrahydrofuran.^[41-42]

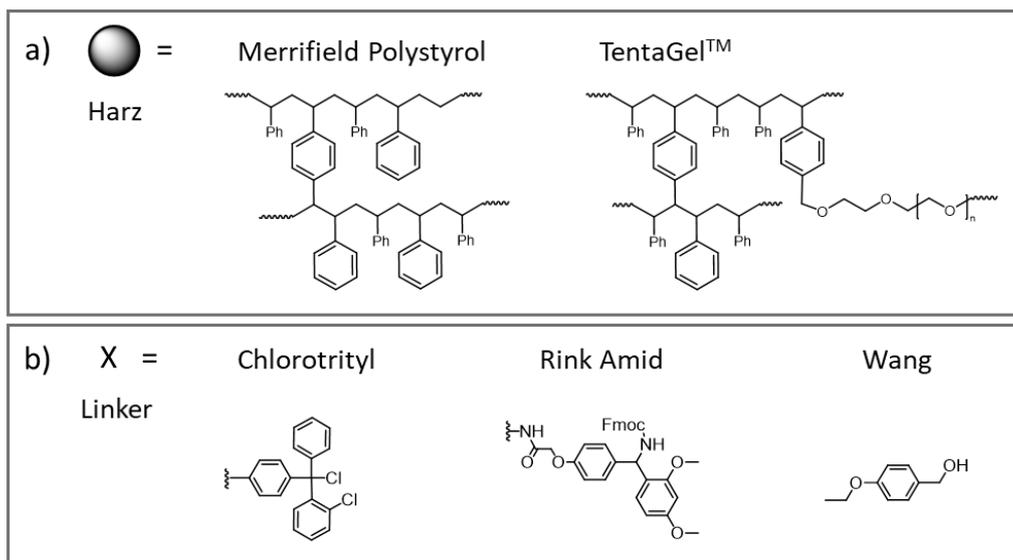


Abbildung 3: Darstellung gebräuchlicher Festphasenpeptid-Harze und Linker zum Einsatz in der Festphasenpeptidsynthese. (a) Das Merrifield-Harz aus Polystyrol mit 1-2 % *m*-Divinylbenzol und das TentaGel™-Harz bestehend aus dem vernetzten Polystyrol mit 50-70 % Poly(ethylenglycol). (b) Auswahl an spaltbaren Linkern. Die Abspaltung der Peptidketten von Wang- und Chlorotrityl-Linker ergeben eine terminale Säure-Gruppe, während die Spaltung vom Rink Amid-Linker in einem terminalen Amid resultiert.

Ein Linker wird als Brücke zwischen dem Harz und der wachsenden Peptidkette verwendet. Sie haben zwei Hauptfunktionalitäten. Zum einen schützen sie die α -Carboxygruppe der ersten Aminosäure, zum anderen setzen sie das Produkt unter wohldefinierten Bedingungen frei. Um das Peptid vom Träger freizusetzen, werden saure Bedingungen, zum Beispiel mit Trifluoressigsäure (TFA), verwendet. Je nach Wahl des Linkers wird eine TFA-Konzentration von 30 - 95 % in DCM verwendet. Je nach gewünschter Peptid-Endgruppe nach der Abspaltung wird ein spezifischer Linker ausgewählt, wie z. B. der 2-Chlorotritylchlorid- oder Wang-Linker (Carboxygruppe) oder der Rink Amid-Linker (Amid).^[43]

Amino-Schutzgruppen

Um eine Kontrolle der synthetisierten Peptide zu erreichen, werden Schutzgruppen benötigt. Zwei gängige Schutzgruppen für die N^{α} -Aminogruppe sind 9-Fuorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) und das *tert*-Butoxycarbonyl (Boc) (siehe Abb. 4). Die Boc-Gruppe wurde zuerst von Merrifield eingeführt. Sie ist in Gegenwart von moderaten Säuren wie Trifluoressigsäure (TFA) labil und kann daher während des Spaltprozesses eliminiert werden. Der Nachteil ist, dass die Abspaltung von Boc zwei Schritte erfordert. Zuerst muss die Schutzgruppe zur Abspaltung mit einer Säure behandelt werden und anschließend muss der Ansatz mit einer Base neutralisiert werden.

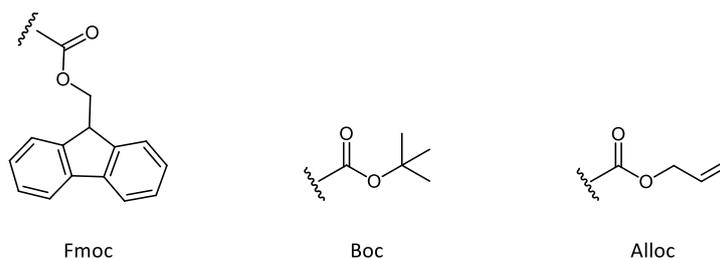


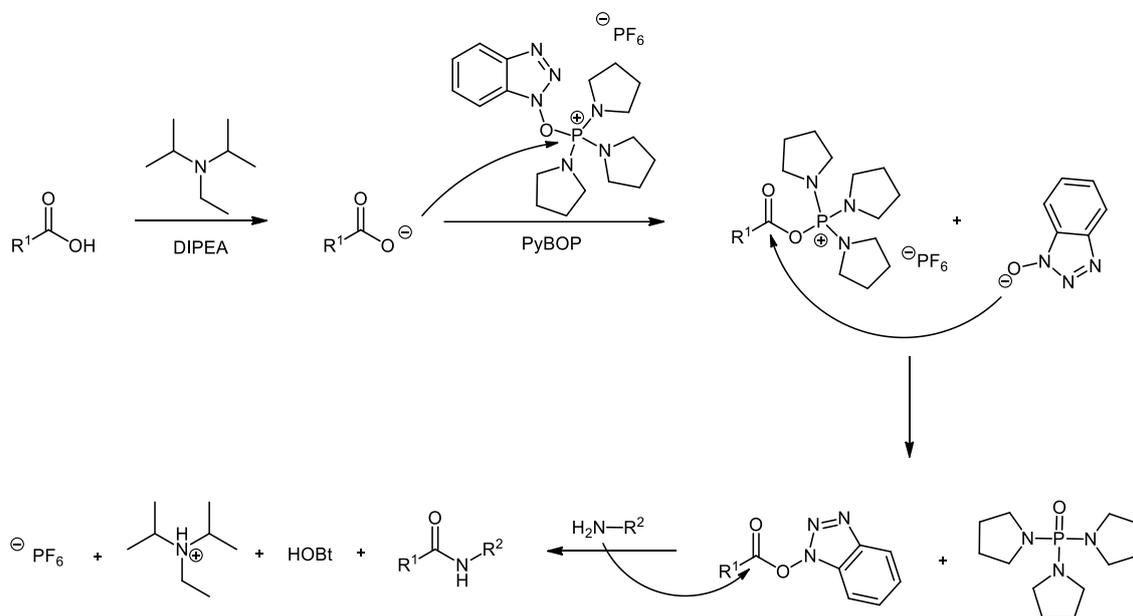
Abbildung 4: Drei Beispiele der gängigsten Amino-Schutzgruppen. Diese können sowohl am Terminus oder an den Seitenketten angebracht werden.

Um diesen Prozess zu verkürzen, wurde die Verwendung von Fmoc als temporäre Schutzgruppe untersucht. Die Abspaltung von Fmoc benötigt typischerweise nur milde basische Bedingungen mit einem sekundären Amin. Daher wird eine 20 - 25 %ige Lösung von Piperidin in DMF verwendet, die bereits in den ersten sechs Sekunden eine 20 %ige Spaltung ergibt. Außerdem ist die Bedingung, die für die Entfernung von Fmoc verwendet wird, orthogonal zu der Bedingung, die für die Peptidfreisetzung vom Träger erforderlich ist, sowie zu den Bedingungen, die für die Boc-Spaltung verwendet werden. Sie erlaubt daher die Verwendung von Boc als Seitenkettenschutzgruppe.^[44-45] Ein weiteres Beispiel für eine Seitenketten-Schutzgruppe ist die Allyloxycarbonyl (Alloc) Schutzgruppe (Abbildung 6). Sie ist bei trifunktionalen Aminosäuren, wie z. B. Lysin, üblich und wird aufgrund der Orthogonalität zu anderen Schutzgruppen häufig verwendet. Sie kann katalytisch durch Allyltransfer mit einem Pd(0)-Komplex wie Tetrakis(triphenylphosphan)palladium(0) freigesetzt werden.^[46]

Kupplungsreagenzien

Eine weitere bedeutende Entwicklung auf dem Gebiet der Peptidsynthese sind die Kupplungsreagenzien. Ihre Aufgabe besteht in der Aktivierung der Carbonsäurereste einer Aminosäure, der dann mit dem Aminrest der zweiten Aminosäure unter Bildung einer Amidbindung reagiert. Es wurde über eine Reihe verschiedener Aktivierungsreagenzien berichtet. Eines der ersten weit verbreiteten waren Carbodiimid-Reagenzien, wie z. B. *N,N*'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC). Aber dieses Reagenz hat einige Nachteile für die Festphasenreaktion, da es einige unlösliche Nebenprodukte erzeugt, die nicht einfach zu entfernen waren. *N,N*'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) umgeht diese Einschränkung und wurde daher für die Festphasensynthese als geeignet befunden. Um die zusätzlich auftretende Racemisierung zu vermeiden, wurden den Carbodiimid-Reagenzien sogenannte Racemisierungssuppressoren wie 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) zugesetzt. HOBt sorgt dafür, dass die optische Integrität des C-terminalen Aminosäurerestes während der Kupplungsschritte erhalten bleibt.^[47] Es wurden weitere in-situ-Kupplungsreagenzien entwickelt. Castro stellte das Kupplungsreagenz Benzotriazol-1-yloxytris(dimethyl-amino)phosphoniumhexafluorophosphat (BOP) vor. Die Bildung des Phosphoniumsalzes Hexamethylphosphorsäuretriämin (HMPA) ist die treibende

Kraft. Dieses erwies sich jedoch als sehr giftig und musste daher durch ein weniger problematisches Reagenz ersetzt werden. So wurde Benzotriazol-1-yloxytri(pyrrolidino)-phosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP) entwickelt (siehe Schema 2).^[48]



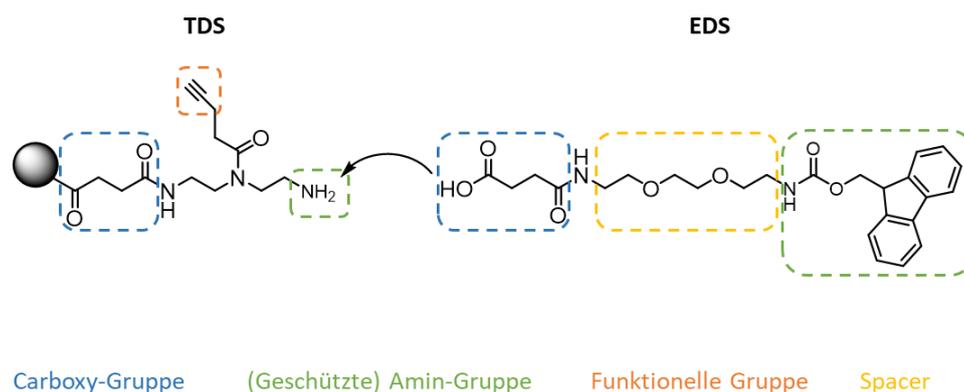
Schema 2: Reaktionsschema der Aktivierung des Carbonsäure-Restes einer Aminosäure und der Reaktion der Aminogruppe einer zweiten Aminosäure mit Hilfe von PyBOP und DIPEA unter Bildung einer Amid-Bindung.

1.1.2.2 Festphasensynthese von Präzisions-Makromolekülen

Der Vorteil der Festphasenpeptidsynthese besteht darin, dass nicht nur Peptidsequenzen hergestellt werden können. So wurde bereits der sequenzieller Aufbau u.A. von Oligonukleotiden^[49] und Oligosacchariden^[50-51] mit dieser Methode beschrieben.

Weiterhin ist die Synthese kurzketziger Polymere möglich. Mithilfe des von *Hartmann et al.*^[52-64] entwickelten Verfahrens konnten eine Reihe monodisperser, sequenzdefinierter Oligo(amidoamine) hergestellt werden. Der Unterschied zu der konventionellen Methode ist, dass keine Aminosäuren, sondern, inspiriert von der klassischen Polymersynthese, eigens konstruierte Monomere eingesetzt werden, die ebenfalls mit den für die Kupplung erforderlichen funktionellen Einheiten (Carboxy- und Amino-Gruppe) ausgestattet wurden. Demnach ermöglicht die als Festphasenpolymersynthese bezeichneten Methode eine sequenzielle Kupplung dieser s.g. Bausteine an eine feste Phase. In ihrer Funktion als Peptidmimetika, sind die erlangten Präzisionsmakromoleküle aufgrund ihres großen Potenzials für biomedizinische Anwendungen aufgefallen. Erste Studien deuten darauf hin, dass sie biokompatibel sind, eine geringe Zyto- und Hämotoxizität aufweisen und eine inhärente Immunogenität verhindern.^[65-66]

In der Arbeitsgruppe von *Hartmann* wurde bereits eine Reihe unterschiedlicher Bausteine synthetisiert.^[52-61] Damit sie erfolgreich in der Festphasensynthese eingesetzt werden können, müssen sie einige Anforderungen erfüllen: (i) Die Kupplung der Bausteine sollte nach dem Standard-Fmoc-Protokoll ablaufen; (ii) da pro Kupplungsschritt ein enormer Überschuss eingesetzt werden muss, sollten bevorzugt kostengünstige Reagenzien für die Bausteinsynthese verwendet werden und (iii) die Bausteine sollen im großen Maßstab herstellbar sein. Die Funktion der entwickelten Bausteine kann dabei in zwei Bereiche unterteilt werden. Zum einen werden sie als funktionelle oder als Spacer-Einheit eingesetzt. Die funktionellen Bausteine tragen eine Funktionalität an der Seitenkette, die die Anbringung einer weiteren Struktur, z.B. eines Zuckers oder einer Peptidkette ermöglicht. Als Beispiel dient hier der Baustein TDS^[52], der als funktionelle Einheit ein Alkin trägt, welches bspw. die Kupplung einer Azid-haltigen Verbindung über die Kupfer(I)-katalysierte Alkin-Azid-Zyklokonjugations-Reaktion^[67] ermöglicht. Der Spacer-Baustein wiederum dient dazu, die Abstände zwischen den funktionalen Einheiten zu regulieren. Mit einer Diethylenglykol-Einheit ausgestattet, trägt der EDS-Baustein^[52] flexible und hydrophile Eigenschaften.



Schema 3: Zwei Beispiele von Hartmann et al. synthetisierten Bausteine für die Festphasen-Polymersynthese. Der TDS-Baustein fungiert aufgrund der Alkin-Bindung als funktioneller Baustein, während das EDS durch die Diethylenglykol-Einheit als hydrophiler Spacer-Baustein eingesetzt wird.

Durch den Einsatz der Bausteine ist die Festphasenpeptidsynthese eine geeignete Methode für die Synthese von Präzisionsmakromolekülen, bei der das Strukturmotiv beliebig verändert werden kann. Das Verfahren ermöglicht eine Variation in der Architektur, dem Molekulargewicht, der Anbindung weiterer biologisch aktiver Liganden, der Anzahl sowie den Abstand zwischen den funktionellen Einheiten.^[68]

1.1.3 Die Vielfalt der Peptidstrukturen und ihre Anwendungen

In dem letzten Jahrhundert - seit der Entwicklung des ersten synthetischen Peptids – führten intensive Forschungen an Proteinen zu einem größeren Verständnis für die Beziehung von Struktur und Funktion

einzelner Peptidabschnitte auf die Gesamtfunktion des Proteins. Abhängig von der angestrebten Anwendung, konnten diese Erkenntnisse genutzt werden, indem kleine Peptide synthetisiert wurden, die die Funktion der Proteinabschnitte imitieren. Auf diese Weise wuchs die Anzahl der *de novo* synthetisierten Peptide und die ihrer Eigenschaften.^[69-72] So wurden u.A. Peptide mit antimikrobiellen^[73], klebenden^[74], leitfähigen^[75] oder fluoreszierenden^[76] Fähigkeiten entwickelt. Zu den prominentesten Eigenschaften aber gehört die Organisation einzelner Peptidmoleküle zu einer höher geordneten supramolekularen Struktur, die normalerweise als "Selbstorganisation" (engl. *self-assembly*) bezeichnet wird.^[77] Die Selbstassemblierung wird durch schwache physikalische, nicht kovalente Wechselwirkungen zwischen Molekülen vermittelt.^[78-79] Die Anhäufung dieser schwachen Wechselwirkungen führt zu einer stabilen, geordneten, supramolekularen Struktur, wie sie bei der Proteinfaltung beobachtet werden kann.^[80] Inspiriert von dem natürlichen Prozess können durch ein zielgerichtetes Design von Peptiden dreidimensionale Gerüste gebildet werden, die für verschiedene Anwendungen eingesetzt werden, z.B. für die Verabreichung von Arzneimitteln^[81], im Tissue Engineering^[82], für Biosensoren^[83] und Oberflächenbeschichtungen^[84].

1.1.3.1 Selbstassemblierung von Peptiden

Molekulare Selbstorganisation ist die spontane Bildung von geordneten Strukturen. Diese Prozesse finden unter thermodynamischen und kinetischen Bedingungen statt, die eine Folge von spezifischen und lokalen molekularen Wechselwirkungen sind. Sie sorgen dafür, dass Moleküle in einem stabilen Zustand mit niedriger Energie gehalten werden. Um dieses Energieminima zu erreichen, kommt es unter Bildung hierarchischer Strukturen zur Selbstassoziation.^[85] Diese Strukturen und ihre mechanischen Eigenschaften werden von mehreren Faktoren beeinflusst: (i) die Anordnung der Aminosäuren (die Primärstruktur), (ii) die Länge der Peptidsequenz und (iii) die Art der Aminosäure im Hinblick auf Seitenkettengruppen. Diese gibt einen Einblick auf den Grad des Ladungszustandes oder die Hydrophobie eines Peptids.^[86]

Auf Basis dieser Faktoren finden nicht-kovalente, intra- und intermolekulare Wechselwirkungen statt, die Selbstassemblierung der Peptide vorantreiben (siehe Abb. 5).^[85] Die folgenden Wechselwirkungen können die Selbstassoziation antreiben:

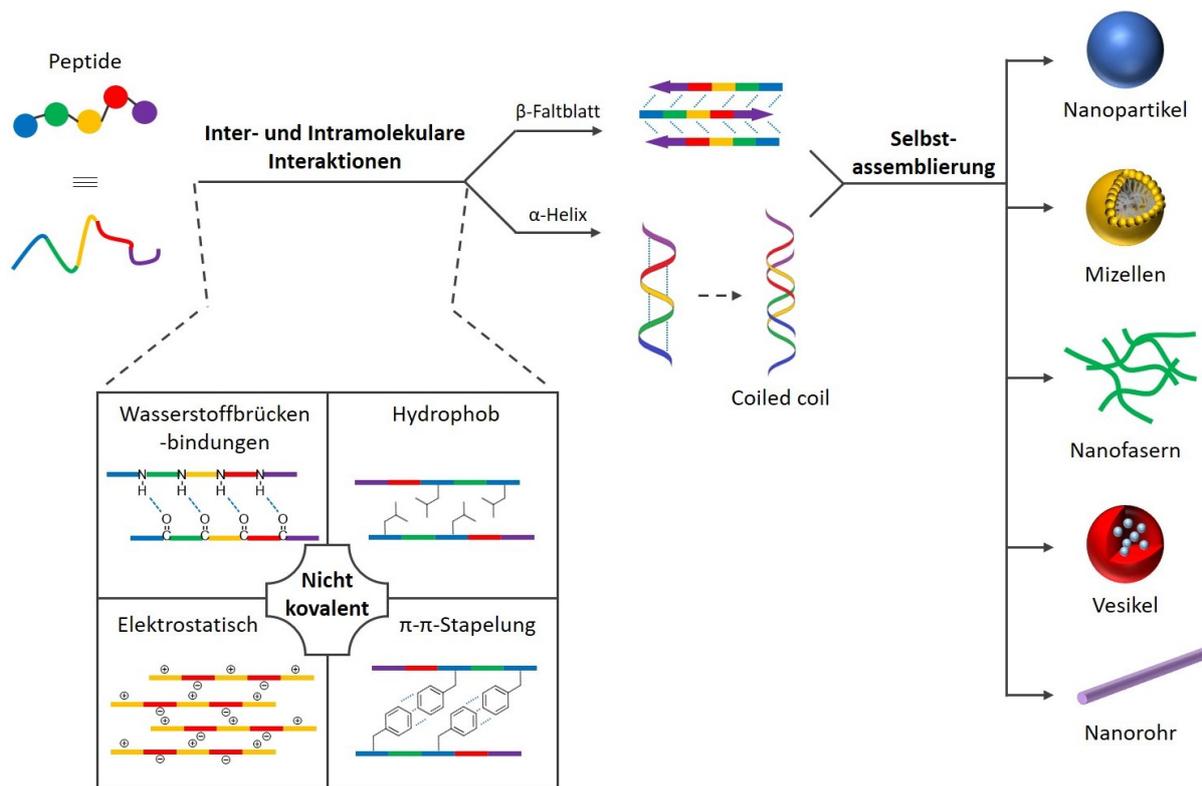


Abbildung 5: Mögliche Selbstassemblierung von Peptiden. Peptide können sich durch nicht-kovalente, intra- und intermolekulare Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe, elektrostatische und π - π -Wechselwirkungen, zu Sekundärstrukturen (α -Helix und β -Faltblatt) zusammensetzen, die weiter zu größeren Strukturen aggregieren.

Wasserstoffbrückenbindungen. Dies ist eine wichtige treibende Kraft für die Herstellung von Peptidarchitekturen, insbesondere bei der Stabilisierung der Sekundärstruktur des Peptids, seiner Faltung und der nachfolgenden Wechselwirkungen. Während Wasserstoffbrücken hauptsächlich zwischen den Peptidrückgraten gebildet werden, tragen die Seitenketten einiger Aminosäuren Hydroxyl-, Carboxyl-, Amin-, Amid- und Imidazolgruppen, die ebenfalls an den Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sein können.^[87] Da einige dieser polaren Gruppen in einer pH-abhängigen Weise dissoziieren können, kann die Assemblierung durch Änderung des pH-Werts der Lösung manuell gesteuert werden. Zusätzlich kann die Zugabe von Ionen auch die Anzahl der freien Wassermoleküle um jedes Peptidmolekül reduzieren, was vermutlich zu einer Schwächung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Peptiden und den Wassermolekülen führt. Des Weiteren können erhöhte Temperatur und Ultraschallbehandlung intermolekulare Wasserstoffbindungen brechen, was die potenziellen hydrophoben Effekte verstärken kann.^[88-90]

Elektrostatische Wechselwirkungen. Die Wechselwirkung zwischen Ladungen ist eine weitere bekannte Art der nicht-kovalenten Interaktionen. In Lösung können Coulombsche Anziehungskräfte zwischen entgegengesetzten Ladungen zur Bildung von Ionenpaaren führen. Die Stärke einer Ionenbindung ist abhängig vom Lösungsmittel und der Anwesenheit von mobilen Ionen.

Ionenbindungen sind im Allgemeinen stärker und von größerer Reichweite als Wasserstoffbrückenbindungen, obwohl ionische Wechselwirkungen bei großen Entfernungen schwächer sein können als Wasserstoffbrückenbindungen bei viel kleineren Entfernungen. Im Gegensatz zur Rolle von Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen, bieten elektrostatische Wechselwirkungen oft strukturelle Spezifität für geladene Peptide.^[91-92]

π - π Wechselwirkungen. Die π - π -Interaktionen kann die Selbstassemblierung von aromatischen Aminosäuren wie Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan antreiben. Aufgrund der begrenzten Löslichkeit der Moleküle mit den aromatischen Gruppen ist die Interaktion in Wasser oft sehr stabil.^[93]

Hydrophobe Wechselwirkungen. Hydrophobie als physikochemische Eigenschaft wird häufig zur Charakterisierung von Sekundärstrukturen von Proteinen verwendet. Schon früh wurde festgestellt, dass diese Eigenschaft von Aminosäuren die initialen Wechselwirkungen während der Proteinfaltung dominiert.^[94] Die Hydrophobie von Proteinen ist hauptsächlich auf die Seitenketten der Aminosäurereste zurückzuführen. Realisiert wird dies durch die Präsentation von Aryl- und Alkylgruppen, wie sie bspw. in Aminosäuren wie Isoleucin, Leucin, Phenylalanin und Valin zu finden sind. Diese bilden unter anderem einen wichtigen Bestandteil in amphiphilen Systemen, z.B. bei peptidhaltigen Tensiden. In Wasser gelöst, neigen amphiphile Moleküle mit zunehmender Konzentration zu aggregieren, indem die hydrophoben Teile dieser Moleküle den Kontakt zum Wasser minimieren, während die hydrophilen Teile dem Wasser ausgesetzt bleiben. Solche hydrophoben Wechselwirkungen werden eher durch eine günstige entropische Wechselwirkungen als durch eine günstige Enthalpie stabilisiert.^[95]

Anstatt eine einzige Art von Wechselwirkung zu verwenden, ist die Kombination verschiedener Arten von Wechselwirkungen einer der effizientesten Ansätze, um eine stabile Selbstorganisation für die Herstellung dreidimensionaler Strukturen zu erreichen.^[96] Diese erfolgt zunächst über eine Zwischenstufe, bei der ausgehend von der Primärstruktur und eben genannter Wechselwirkungen die Selbstassemblierung der einzelnen Moleküle zu sekundären Konformationen erfolgt.

Zu den häufigsten Sekundärstrukturen zählen α -Helix und β -Faltblatt. Die α -Helix ist ein gängiges Element in der Protein Sekundärstruktur. Sie bilden eine Helix, indem die Aminosäure-Seitenketten von der zentralen Windung wegzeigen. Eine α -Helix hat 3.6 Reste pro Windung, d.h. Seitenketten, die drei oder vier Reste voneinander entfernt sind, sind im Raum miteinander verbunden. So werden α -Helices durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff einer Aminosäure und dem Amid-Proton einer anderen Aminosäure vier Reste weiter entlang der Peptidkette stabilisiert. Zwei oder mehr α -Helices können sich zu Coiled Coils zusammensetzen. Sie wickeln sich umeinander und bilden eine s.g. Supercoil. Obwohl Dimere, Trimere und Tetramere die

häufigsten Strukturen sind, können auch größere Coiled Coils mit bis zu sieben Helices entworfen werden.^[97-98]

β -Stränge sind ein weiteres gängiges Sekundärstrukturelement. Bei den meisten gestalteten β -Strängen hat die Primärstruktur ein alternierendes Muster aus hydrophoben (z.B. Leucin oder Isoleucin) und polaren Aminosäuren (z.B. Lysin oder Asparaginsäure). Dies führt zu einer ausgedehnten Struktur, bei der die Aminosäure-Seitenketten zwischen den beiden Seiten des Strangs abwechseln und sich in einem Winkel von ca. 90 Grad von der Seite des Strangs in den Raum erstrecken.^[99] β -Faltblätter werden gebildet, wenn sich mehrere β -Stränge selbst assemblieren und durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Strängen stabilisiert werden. Dies führt zur Bildung von ausgedehnten amphipathischen Falblättern, bei denen hydrophobe Seitenketten in eine Richtung und polare Seitenketten in die andere Richtung zeigen. Wie Coiled Coils können β -Faltblätter parallele, antiparallele oder gemischte Anordnungen der einzelnen Stränge haben, wobei die meisten natürlichen Falblätter in Proteinen eher antiparallel sind.^[100]

Der Zusammenschluss aus mehreren Sekundärstrukturelementen ermöglicht die Generierung von nanoskalierbaren Konstrukten unterschiedlicher Morphologie. Diese können, wie im Fall von Nanopartikeln oder Nanovesikel, als eigenständige Gebilde, oder durch Vernetzung von Nanofasern oder Nanoröhren, als makroskopische dreidimensionale Strukturen eingesetzt werden.

1.1.3.2. Anwendungen von selbstassemblierten Peptiden

Versuche mit ultrakurzen Peptidsegmenten zeigen, dass bereits zwei Aminosäuren zur Entwicklung neuartige Materialien für den medizinischen Gebrauch genügen. Eines der meist untersuchten Dipeptide ist das Diphenylalanin (FF), das als das entscheidende Aggregationsmotiv an den Positionen 19. und 20. der Alzheimer-Amyloid-Polypeptide $A\beta_{40}$ und $A\beta_{42}$ identifiziert wurde.^[101] Weiterhin berichtete Gazit *et al.*^[102] über die Selbstorganisation eines Derivats von FF, dem mit einer aromatischen Schutzgruppe erweiterten Fluorenylmethyloxycarbonyl-Diphenylalanin (Fmoc-FF). Mittels Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäuren und mittels π - π -Interaktionen, einerseits durch die aromatischen Reste der Aminosäuren und andererseits durch die der Schutzgruppe, konnte Fmoc-FF sich zu Nanofasern organisieren, die unter physiologischem pH-Wert ein Hydrogel bildeten (siehe Abb. 6). Weitere Studien unterstrichen die strukturelle Vielseitigkeit dieses Motivs, indem sie zeigten, dass das FF-Homodipeptid trotz seiner molekularen Einfachheit in der Lage ist, komplexere supramolekulare Architekturen zu bilden. Nanoröhren, Nanodrähte, Nanofibrillen, sphärische Vesikel und Organogele sind nur einige Konstrukte, die mit FF-

Selbstorganisation gestaltet werden können. Eine Basis, die die Entwicklung neuer Materialien für verschieden Anwendungen in der Nanomedizin ermöglicht. ^[103]

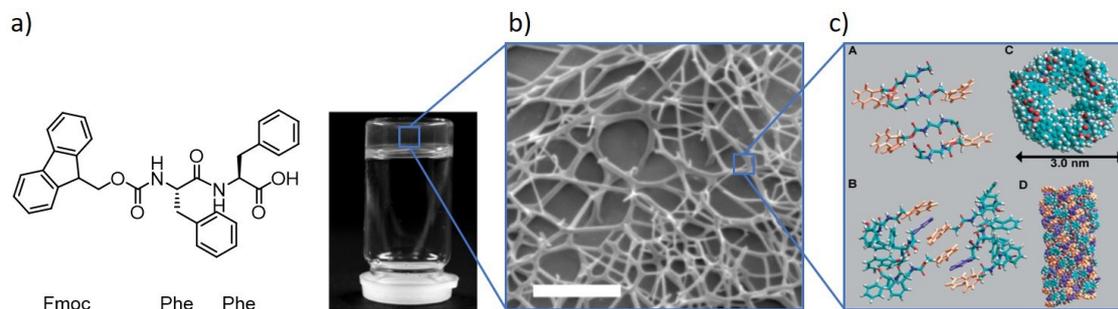


Abbildung 6: Selbstassemblierung von Fmoc-FF. (a) Chemische Struktur von Fmoc-FF (links). Das umgedrehte Glasgefäß (rechts) zeigt das durch Selbstassemblierungsprozesse erhaltene transparente Hydrogel. (b) Cryo-SEM-Bilder von der Hydrogel Struktur. Sie zeigen die Entwicklung von Nanofasern (Maßstabsbalken = 500 nm). (c) Strukturmodell von Fmoc-FF zeigt die Anordnung von Fmoc-FF-Peptide in einem antiparallelen β -Faltblattmuster. In dieser Darstellung sind die Fmoc-Gruppen in orange und die Phenylalanin-Seitenketten in violett dargestellt. (Abbildung arrangiert aus Graphiken aus Ref. ^[104])

Das Portfolio von selbstassemblierten Peptiden wird ständig erweitert und Fmoc-FF ist nur ein Beispiel aus vielen. Bis dato wurde eine breite Palette an Peptidstrukturen für Anwendungen in unterschiedlichen Bereichen entwickelt. Einige von ihnen werden im Folgenden hervorgehoben. Der Übersicht wegen liegt der Fokus auf Peptiden, die bevorzugt β -Faltblatt Strukturen einnehmen.

1.1.3.2.1 Wirkstofftransport

Viele Krankheiten wie Tumore und Arthritis treten in einem relativ lokalisierten Bereich des Körpers auf. Sie können entweder durch die direkte Verabreichung von Medikamenten in die krankhaften Bereiche oder durch die systematische Verabreichung des Medikaments behandelt werden. ^[105] Um die Wirksamkeit zu verbessern und die Nebenwirkungen von Medikamenten zu reduzieren und/oder den Aufwand für die Verabreichung zu verringern, werden Systeme für die kontrollierte Freisetzung von Medikamenten entwickelt, s.g. Drug-Delivery-Systeme. ^[106] Dabei sollte der ideale Wirkstoffträger folgende Eigenschaften besitzen: (i) gute Biokompatibilität, (ii) Ausrichtung auf das Zielgewebe, (iii) spezifische Freisetzung von Medikamenten in den Zielzellen und (iv) lange Zirkulationszeit im Körper. ^[107-108] Peptide sind aufgrund der genannten Vorteile, wie ihrer Biokompatibilität, Funktionalität und Spezifität ^[18], zu einem der wichtigsten Bausteine für die Konstruktion von intelligenten Wirkstofftransport-Systemen geworden. ^[109] Zudem besitzen sie reaktive Endgruppen (Amino- (-NH₂) und Carboxy- (-COOH) Gruppen), welche die Konjugation von Medikamenten oder Trägern mit Peptiden ermöglicht. ^[110] Die Verbesserung der Medikamenteneffizienz ist das wesentliche Ziel von Drug-Delivery-Systemen. Um dieses Ziel zu erreichen, ist die Konjugation von Medikamenten mit funktionellen Peptiden eine der wichtigen Strategien. Durch die Kupplung ausgewählter Peptide, können die schwerwiegenden Nachteile von Medikamenten ausgebessert werden. Dazu gehört die

Erhöhung der Löslichkeit, die Verlängerung der Halbwertszeit im Körper und der Erhöhung der Spezifität von Arzneimitteln an ihr Zielgewebe.^[111] Durch einen gezielten Aufbau der Grundstruktur konnten zahlreiche funktionelle Peptide mit einzigartigen Eigenschaften entwickelt werden, wie z. B. Targeting,^[85] Enzym- oder pH-Empfindlichkeit,^[112] Zellmembranpenetration^[113] und therapeutische Wirkungen.^[114]

Peptidmoleküle, die zur Selbstorganisation in geordnete supramolekulare Strukturen fähig sind, sind ideale Bausteine für den Einsatz im Wirkstofftransport. Durch den Aufbau dreidimensionaler Strukturen sind sie in der Lage, funktionelle Moleküle in ihre Gerüste einzubauen. Eine vielversprechender Lösungsansatz sind die Verwendung von peptidbasierten Hydrogelen.^[115] Hydrogele sind dreidimensional vernetzte Strukturen gebildet aus chemisch oder physikalisch vernetzten polymeren Molekülen, die in der Lage sind, große Mengen an Wasser aufzunehmen. Dadurch können die Hydrogel-Netzwerke in wässrigen Medien stark quellen. Da Wasser der größte Bestandteil des menschlichen Körpers ist, wird einem Hydrogel, das große Mengen an Wasser aufnehmen kann, ein großes Potenzial bei der Anwendung für biomedizinische Zwecke zugesprochen. Die Entwicklung peptidbasierter Hydrogele stellt eine gute Lösung für die Herstellung eines effizienten Medikamentenabgabesystems dar. Um Medikamente zu verabreichen, kann die poröse Struktur von Hydrogelen eine Matrix für die Medikamentenbeladung bieten und gleichzeitig die Medikamente vor der feindlichen Umgebung schützen. Außerdem kann diese Porosität durch Variation der Vernetzungsdichte der Gelmatrix gesteuert werden. Die Freisetzungsrates, ein weiterer wichtiger Parameter für Wirkstoffträger, hängt hauptsächlich vom Diffusionskoeffizienten dieses Moleküls durch das Gel-Netzwerk ab und kann ebenfalls entsprechend den spezifischen Anforderungen eingestellt werden.^[116] Entscheidend für das Design von Peptid Hydrogelen ist außerdem die Eigenschaft von einem flüssigen in einen feststoffähnlichen Zustand zu wechseln, auch bekannt als Sol-Gel-Übergang, welcher durch Änderung der Ionenstärke, der Temperatur oder des pH-Werts des Mediums ausgelöst werden kann.^[117]

Dahingehend wurde eine Vielzahl von peptidbasierten Hydrogelen synthetisiert. Ein klassisches Beispiel ist das von *Pochan* und *Schneider*^[118] entwickelte Peptid MAX8 (siehe Abb. 7a). Das 20-gliedrige Peptid MAX8 besteht aus zwei Hauptketten aus alternierend eingebautem Lysin und Valin, die die viergliedrige Sequenz V^DPPT umgeben. Das Peptid hat die Fähigkeit bei Änderung des pH-Wertes, Temperatur und Salzkonzentrationen eine β -Haarnadel Struktur zu entwickeln und durch Selbstassemblierung mechanisch starre, viskoelastische Gele zu bilden. MAX8 ist ein exzellenter Kandidat für die Entwicklung als multifunktionales Vehikel für die therapeutische Wirkstoffabgabe.^[119] Beispielsweise wurden hydrophobe Wirkstoffe wie Curcumin beladen und über einen Zeitraum von zwei Wochen freigesetzt, ohne die Wirkstoffaktivität oder die Steifigkeit des Hydrogels zu

beeinträchtigen.^[120] Zusätzlich wurden Studien veröffentlicht bei denen die Einkapselung und Freisetzung von neutralen und positiv geladenen Peptiden^[121], sowie von verschiedenen Wachstumsfaktoren^[119] durch das MAX8 erfolgreich demonstriert wurde.

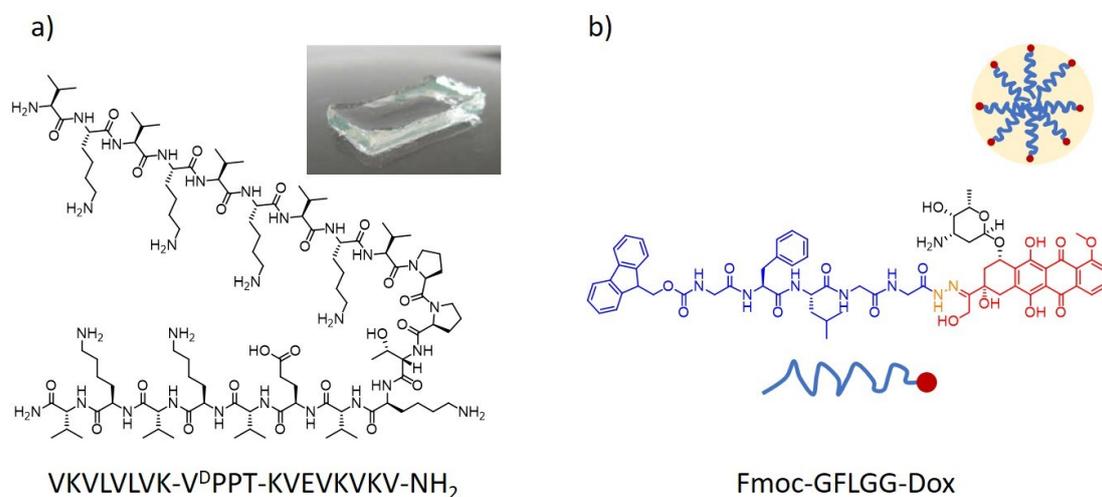


Abbildung 7: Beispiele für peptidbasierte Strukturen zur Anwendung im Wirkstofftransport. (a) Chemische Struktur des Peptids MAX8, das sich über Selbstorganisation zu einem Makrogel anordnet.^[122] (b) Beispiel für ein Nanogel: Chemische Struktur des kombinatorischen Peptid-Wirkstoff-Präparats Fmoc-GFLGG-Dox, das zur Bekämpfung von Krebs eingesetzt werden kann.^[123]

MAX8 ist ein Beispiel für Makrogele, die zur Verabreichung von Wirkstoffen kreiert wurde. Eine weitere Methode ist die Generierung von nanoskalierbaren Hydrogelen. Hydrogel-Nanopartikel, auch Nanogele genannt, scheinen für diesen Zweck besonders attraktiv zu sein. Sie vereinen die Vorteile von traditionellen Hydrogele und nanoskaligen Partikeln, bspw. Liposome^[124] oder Mizellen^[125]. Nanogele sind Aggregate im Submikronbereich, die aufgrund ihrer physikalisch kolloidalen Form über eine Injektion verabreicht werden können. Zusätzlich bietet die große Oberfläche einen Zugang für multivalente Biokonjugation, während das innere Netzwerk als Reservoir für die zusätzliche Inkorporation von Biomolekülen dienen kann. Darüber hinaus führt die geringe Größe dieser Formulierungen im Allgemeinen zu einer einfachen Ausscheidung über die Nieren, einer erhöhten Penetration durch das Zielgewebe und einer guten Stabilität für eine längere Zirkulation im Blutkreislauf.^[126]

Beispielhaft ist das von *Lyu et al.*^[123] entwickelte krebsbekämpfendes Nanogel, bei dem das Chemotherapeutikum Doxorubicin (Dox) über eine säureempfindliche Hydrazin-Bindung an die kurze Peptidsequenz Fmoc-GFLGG konjugiert wird (siehe Abb. 7b). Mit dem erhaltenen Peptid-Dox-Präparat möchten sie der Multiresistenz gegenüber Krebsmedikamenten entgegenwirken. Beim Eintritt in die Krebszelle, dessen Milieu einen leicht sauren pH-Wert aufweist, wird das Therapeutikum abgespalten und gelangt so in den Zellkern der Krebszelle. Dieses selbstassemblierte Nanogel zeigte eine verbesserte zelluläre Akkumulation des Wirkstoffs und kontrollierte Wirkstofffreisetzung. Zudem, im

Vergleich zu freien Dox-Molekülen hatten die Nanogele eine 6,8-fach erhöhte Anti-Multiresistenz-Wirkung auf Dox-resistente Krebszellen.

1.1.3.2.2 Tissue Engineering

Der Verlust von Gewebe oder das Versagen von Organen, verursacht durch Verletzungen oder andere Arten von Schäden, ist eines der verheerendsten und kostspieligsten Probleme im menschlichen Gesundheitswesen.^[127] Die derzeit verfügbaren Therapien für Gewebe-/Organverluste, zu denen Medikamente, synthetischer Materialersatz und Organ-/Gewebetransplantation gehören, weisen alle erhebliche Einschränkungen auf und sind nicht in der Lage, den Tod oder die schlechte Lebensqualität von vielen Patienten zu verhindern.^[128] Durch das Auftreten vielfältiger Komplikationen, wie der Abstoßung des fremden Gewebes oder der geringen Lebensdauer des gespendeten Organs, kann sich die Organtransplantation zu einem großen Risiko für den Gespendeten entwickeln. Zu den Hauptkomplikationen bei der Verwendung nicht-biologischer Materialien gehören Infektionen, mangelnde Biokompatibilität und begrenzte Haltbarkeit des Materials.^[127] Diese Einschränkungen haben zur Entstehung eines neuen Forschungsgebiets geführt, das als Tissue Engineering oder regenerative Medizin bezeichnet wird.

Als Tissue Engineering bezeichnet man "ein interdisziplinäres Gebiet, das die Prinzipien der Ingenieur- und Lebenswissenschaften auf die Entwicklung biologischer Ersatzstoffe anwendet, die die Gewebefunktion wiederherstellen, erhalten oder verbessern".^[129] Einfacher formuliert umfasst Tissue Engineering die Verwendung von *ex vivo* kultivierter gewebe- oder organspezifischer Zellen und der Einsatz dieser im krankhafte Gewebe des Patienten. Dieser Ansatz ist aufgrund des Verhaltens von Geweben und Zellen vielversprechend: Isolierte Zellen neigen dazu, unter günstigen Bedingungen *in vitro* die entsprechenden Gewebestrukturen zu bilden. Dabei benötigen sie eine Vorlage, um ihre Anordnung in die gewünschte Zielarchitektur zu lenken, eine s.g. Extrazelluläre Matrix. Ein geeigneter Ansatz zur Herstellung lebender Strukturen ist daher die Verwendung natürlicher, bioabbaubarer Materialien.^[130] Diese erfüllen idealerweise folgende Kriterien: (i) Sie bestehen aus Grundeinheiten, die sich leicht entwerfen und modifizieren lassen; (ii) die Materialien lassen sich unter biologischen Bedingungen kontrolliert abbauen; (iii) sie verhalten sich nicht toxisch; (iv) sie besitzen Eigenschaften, die spezifisch Zell-Material-Interaktionen fördern oder hemmen; (v) die Stoffe lassen sich einfach und skalierbar herstellen, aufbereiten und verarbeiten und (vi) sie besitzen eine chemische Kompatibilität mit wässrigen Lösungen und physiologischen Bedingungen.^[82] Selbst-assemblierende Peptidhydrogele, die die extrazelluläre Matrix von Zellen nachahmen, sind vielversprechende Materialien für Tissue Engineering und 3D-Zellkultur. In Hydrogelen kultivierte Zellen wird ein Wachstum in allen Richtungen, eine vielfältige Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, sowie einen

normalen Zellzyklus inklusive Protein- und Genexpression ermöglicht, vergleichbar mit den Bedingungen *in vivo*.^[131]

Eines der ersten für diese Anwendung eingesetzten Peptide wurde von *Zhang et al.* 1993^[132] entwickelt. Basierend auf den Untersuchungen des Hefeproteins Zuotin entdeckte die Gruppe das Peptid EAK16 (Ac-(AEAEAKAK)₂-NH₂) und gleichzeitig die Eigenschaft der Peptide zur Selbstassemblierung. *Zhang* leitete damit die Geburtsstunde der selbstorganisierten Peptide und ihrer Anwendungen ein. In Pufferlösung assemblieren die Peptide spontan zu gut geordneten Nanofasern und dann weiter zu Nanofasergerüst-Hydrogelen, die stabil gegenüber starken Temperatur- und pH-Schwankungen und chemischen Denaturierungssalzen wie Guanidiniumhydrochlorid, Natriumdodecylsulfat und Harnstoff sind. *Zhang* erkannte schnell das Potenzial von EAK16 und verwendete die Hydrogele für Zellanhaftung und -wachstum. Es wurde festgestellt, dass das Hydrogel die Anhaftung verschiedener Zelltypen unterstützt und darüber hinaus differenzierte Morphologien und Funktionen von Zellen beibehalten werden konnten.^[133]

Weiterhin von großem Interesse für die Synthese von biotechnologisch angewendeten Hydrogelen ist das Design und die Synthese von Peptiden mit niedrigem Molekulargewicht, den s.g. *low molecular weight gelators* (LMWGs).^[134-136] Sie haben typischerweise ein Molekulargewicht von <1000 Da und sind dementsprechend einfach und kostengünstig herzustellen, besitzen zudem aufgrund ihrer Größe eine geringe Akkumulation im Gewebe und lassen sich effektiv über die Nieren ausscheiden.^[137] Eine beträchtliche Anzahl von Peptiden wie Di-, Tri-, Tetra-, Penta- und Oligopeptide wurden synthetisiert.^[138-139] Dabei spielen hydrophobe Gruppen eine entscheidende Rolle, um eine gerichtete Anordnung der Moleküle zu gewährleisten.^[140] Wie bereits am Beispiel von Fmoc-FF dargestellt ist dabei sowohl die Wahl hydrophober Aminosäuren^[101] oder aromatischer Schutzgruppen^[141-142] am Ende der Peptidkette zielführend. Aber auch Aminosäuren mit aliphatischen Seitengruppen sind in der Lage erfolgreich supramolekulare Gebilde zu induzieren. *Hauser et al.*^[143] berichteten über die Selbstorganisation von kleinen aliphatischen Peptiden mit einer Länge von 3-6 Aminosäuren zu einem Hydrogel. Diese entworfenen Peptide bestanden aus einem hydrophilen Kopf mit geladenen nicht-aromatischen Aminosäuren am C-Terminus, gefolgt von einem Schwanz aus aliphatischen Aminosäureketten an ihrem N-Terminus.

Tissue Engineering umfasst einen sehr breiten Bereich. Dahingehend wurden selbstassemblierte Peptide für multiple Anwendungen konzipiert. Antimikrobielle Peptide, bspw. zur Wundbehandlung, gewinnen wachsendes Interesse, ausgelöst durch eine Steigende Antibiotika-Resistenz und einer erhöhten Sterblichkeit von Patienten durch Krankenhauskeime.^[144] Aufgrund ihres einzigartigen Wirkmechanismus können antimikrobielle Peptid-Hydrogele auf verletzte Bereiche mittels Verbände,

Implantatbeschichtungen und/oder Cremes aufgetragen werden.^[145] Darauf basierend wurden Peptide konzipiert, die auf jeglichen Oberflächen aufgetragen werden können und so als Prävention gegen Pathogenbefall oder auch Biofouling eingesetzt werden können.^[146] Darüber hinaus finden Peptidhydrogele Anwendung im Bioimaging^[147], in 3D-Biodruck-Verfahren^[148] und in vielen weiteren. Diese werden hier nicht weiter erläutert.

In den letzten Jahren haben Forscher verschiedene Peptide und peptidbasierte, biokompatible und biologisch abbaubare Moleküle mit komplexen biologischen Funktionen entworfen und synthetisiert. Die molekulare Selbstassemblierung von Peptiden und peptidbasierten Materialien bietet einen therapeutischen Ansatz für die Konstruktion funktioneller Biomaterialien. Selbstorganisierte Strukturen wachsen durch nicht-kovalente Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophoben Wechselwirkungen, zu übergeordneten Nanostrukturen unterschiedlicher Architekturen. Diese haben abhängig von ihrer Morphologie verschiedene Anwendungen u.A. im Bereich des Wirkstofftransports, Wirkstoffabgabe, Zellkultur, Wundheilung, Bioimaging und 3D-Bioprinting.

1.1.3.3 Enzymresponsive Peptide

Umgebungsabhängige biotechnologische Materialien, die als Reaktion auf einen oder mehrere Umgebungsreize physikalisch-chemische Veränderungen erfahren, gelten zu Recht als die „intelligenten“ Materialien der nächsten Generation. Ihre Fähigkeit auf biologische Umgebungen und Prozesse zu reagieren oder diese zu imitieren, stattet die Strukturen mit einer Kombination aus Spezifität und Biokompatibilität aus.^[149] Diese Fähigkeit könnte entscheidend sein, um verschiedene Fortschritte in der Biomedizin zu erzielen, einschließlich der Geweberegeneration und der kontrollierten Verabreichung biologischer Therapeutika.^[150]

Neben pH-abhängigem Materialverhalten^[151-152], gehören biologischer Abbau zu den häufigsten genutzten Systemen für biotechnologische Anwendungen.^[153] Bevorzugt eingesetzt waren Polymere, die durch Hydrolyse abgebaut werden, wie z. B. Poly(caprolacton)^[154] oder Poly(milchsäure)^[155]. Aufgrund lokalisierter Vorkommen unterschiedlicher Enzyme im Körper sowie der Spezifität des enzymatischen Angriffs werden Systeme, die einem Enzym-katalysierten Abbau unterliegen, immer attraktiver. Durch ihr natürliches Vorkommen und der damit einhergehenden Erkennbarkeit durch die körpereigenen Enzyme, eignen sich Peptide insbesondere, um einen gezielten enzymatischen Abbau von Biomaterialien zu erreichen.^[112]

Angestrebt werden eine gezielte Anwendung in der Medikamentenverabreichung, bei der es darum geht, ein therapeutisches Mittel ausschließlich an die Stelle im Körper zu bringen, an der es benötigt

wird.^[156] Beispielsweise kann ein krebsspezifisches Enzym, das von Tumorzellen produziert wird, die Freisetzung eines therapeutischen Mittels auslösen, um die Metastasierung zu verhindern oder zu reduzieren (gezielte Chemotherapie).^[157] So wurden Systeme entwickelt, bei denen ein therapeutischer Wirkstoff über einen enzymatisch-spaltbaren Linker kovalent an ein Polymer^[158] oder einen Hydrogelator^[159] gebunden wurde, wobei die kovalente Freisetzung durch eine selektive enzymatische Hydrolyse-reaktion erfolgt (siehe Abb. 8a). Ein neuer Ansatz besteht darin, Wirkstoffmoleküle physikalisch einzuschließen und sie freizusetzen, wenn ein Enzym supramolekulare Strukturen in dem Gel auflösen (siehe Abb. 8b). Die letztere Methode hat den Vorteil, dass sie keine kovalente Modifikation der Wirkstoffmoleküle erfordert und die Freisetzung nicht mehr direkt von der Enzymkinetik abhängt.^[160]

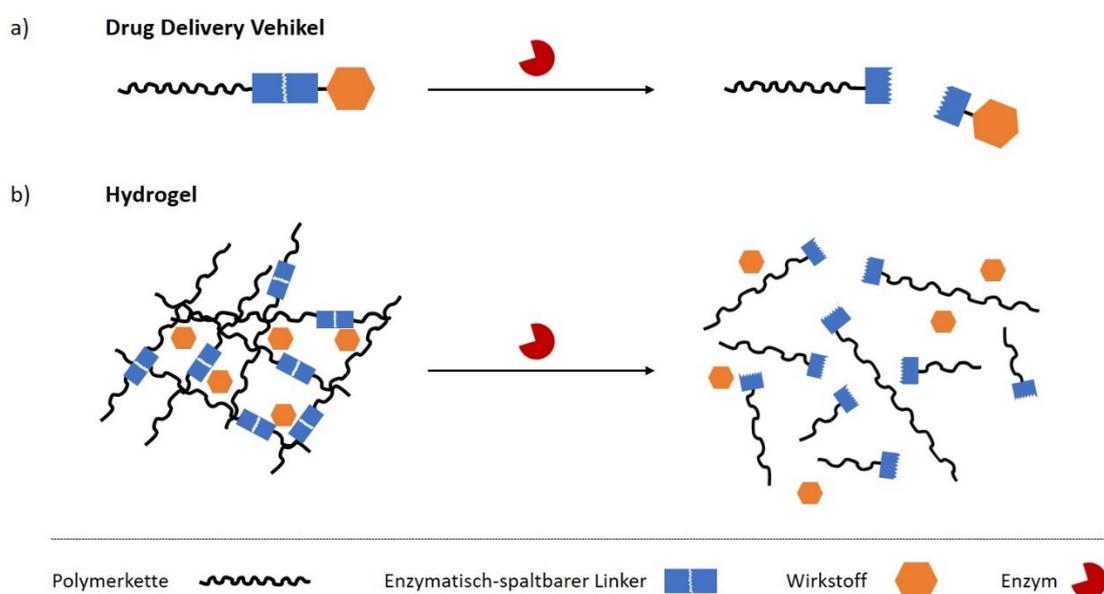


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Anwendung enzymatisch spaltbarer Einheiten zur Medikamentenverabreichung. Denkbar sind zwei Vorgehensweisen: (a) Beispielhafte Darstellung eines kovalent über einen enzymatisch-spaltbaren Linker gebundenen Wirkstoff an ein Polymer. Nach dem enzymatischen Abbau des Linkers erfolgt die Freisetzung des Wirkstoffs. Darstellung (b) beschreibt die nicht-kovalente Einkapselung des Wirkstoffs in einem Hydrogel-Netzwerk. Die Wirkstofffreisetzung erfolgt nach enzymatischer Spaltung der Polymerketten, welches die Auflösung des Gels hervorruft.

Eines der anvisierten Ziel-Enzyme ist das Cathepsin B, eine lysosomale Cysteinprotease, die in vielen Tumorzellen, wie z. B. der Brustkrebs-Zelllinie, überexprimiert wird.^[161-162] Neben der Funktion einer Endopeptidase wirkt sie auch als Peptidyl-dipeptidase, eine Exopeptidase, die Dipeptide vom C-Terminus von Proteinen entfernt.^[163] Es wurde festgestellt, dass Cathepsin B eine starke Selektivität für Glycin besitzt, aber auch aromatische Reste, wie sie in der Aminosäure Phenylalanin enthalten sind, bevorzugt.^[164] Dies stellt eine Voraussetzung zur Entwicklung zielgerichteter Enzym-responsiver Drug-Delivery-Vehikel dar. Kopeček *et al.*^[165-167] verwendete erstmals den Tetrapeptid-Linker Glycin-Phenylalanin-Leucin-Glycin (GFLG) als spaltbare Sequenz zwischen Antitumor-Medikamenten und *N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) Polymeren, welche sich mittels Cathepsin B spalten

lassen. Weitere Studien bestätigten eine gute Stabilität der Polymer-Wirkstoff-Therapeutika im Plasma und im Serum und ermöglichten eine erfolgreiche intralysosomale Wirkstofffreisetzung nach Endozytose.^[168-169]

Forschungsergebnisse wie diese verdeutlichen die steigende Popularität von Enzym-responsiven Materialien in den letzten Jahren. Das Potential der Verwendung von Enzymen als mechanischer Zersetzer von Materialien eröffnet eine Reihe möglicher biotechnologischer Anwendungen, bspw. in der Medikamentenverabreichung.

1.1.4 Selbst-assemblierte Hybrid-Biomaterialien

Das 20te Jahrhundert brachte eine Reihe von technologischen Errungenschaften mit sich. Parallel zum aufstrebenden Forschungsbereich zu präzisen Biomakromolekülen, wie den Peptiden und Proteinen, fand auch die Entwicklung synthetischer Makromoleküle ihren Anfang. Seit der Entdeckung der Polymere in den 1920er Jahren durch *Staudinger*^[170] nimmt die Polymerwissenschaft einen enormen Einfluss auf das moderne Leben, sei es bei der Entwicklung neuer Materialien für den industriellen oder medizinischen Sektor oder in unserem alltäglichen Gebrauch. Damals erkannte Staudinger das Potenzial, natürliche polymere Strukturen zu imitieren und diese durch synthetische Polymere zu ersetzen. Trotz immenser Fortschritte sind die Polymerwissenschaftler jedoch noch weit davon entfernt, die Bausteine der Natur durch Polymere zu substituieren. Neuartige Polymerisationstechniken ermöglichen heutzutage eine nahezu monodisperse Größenverteilung der Polymere.^[171] Dennoch war es den Forschern noch nicht möglich den einzigartigen Informationsgehalt der Peptide, beispielsweise durch die Konstruktion komplizierter Copolymer-Architekturen (wie Dextrimere oder Pfropf-co-Polymere), zu erreichen.^[172] Stattdessen fand eine neue Strategie den Erfolg – der Verknüpfung von biologischen und synthetischen Polymeren zu einem Material. Dahingehend schlug *Ringsdorf*^[173] 1975 erstmals das Konzept der Polymer-Biomakromolekül-Konjugate vor, ein allgemeines Modell für pharmakologisch aktive Polymer-Wirkstoff-Konjugate. Zwei Jahre später berichteten *Abuchowski et al.*^[174-175] über die Konjugation von Poly(ethylenglykol) (PEG) an ein Protein. In dieser Arbeit wurde PEG kovalent an Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA) gebunden. In dieser Studie wurde beobachtet, dass das resultierende Konjugat aufgrund der abschirmenden Wirkung des eingebauten Polymers eine reduzierte Immunogenität aufweist. Ermutigt durch diese Ergebnisse wurde eine Vielzahl von Polymer-Biomakromolekül-Konjugaten entwickelt und in unterschiedlichen Bereichen eingesetzt, darunter Medikamententransport^[176], Bioimaging^[177] und Zellkulturprozesse.^[178]

1.1.4.1 Peptid-Polymer-Konjugate

Peptide sind das Produkt einer über Millionen Jahre andauernden Selektion, bei der sie sich perfekt an die physiologischen Bedingungen unseres Organismus angepasst haben. Damit besitzen Peptide Vorteile, bspw. eine hohe Selektivität, hohe strukturelle und funktionale Diversität und geringe Toxizität, die sie prinzipiell zu optimalen Kandidaten für Anwendungen im Biomedizinischen Bereich machen.^[179] Dennoch, aufgrund eben dieser physikochemischen Eigenschaften, besitzen Peptide Nachteile, die sie für den Einsatz in der Biomedizin ungeeignet machen. Zu den größten Limitierungen gehören (i) ihre geringe metabolische Stabilität aufgrund des schnellen Abbaus durch proteolytische Enzyme in dem digestiven System und im Blutplasma; (ii) eine kurze Zirkulations-Halbwertszeit (Minuten bis wenige Stunden) aufgrund schneller Entfernung durch Leber und Nieren und (iii) eine geringe orale Bioverfügbarkeit, was die Verabreichung über Injektionen erforderlich macht.^[180] Zur Überwindung dieser Einschränkungen wurden Strategien entwickelt, die abhängig von der Anwendung entweder eines oder im besten Fall alle Nachteile eliminieren. Ein Ansatz ist die Modifizierung bestehender Peptidsequenzen zur Erzeugung von Peptidomimetika, d. h. Peptiden mit modifizierten Aminosäuren oder chemischen Strukturveränderungen.^[181] Hierzu gehören Methoden wie u. A. die Substitution von L- zu D-Aminosäuren^[182], der Einsatz von unnatürlichen Aminosäuren^[183] oder die Zyklisierung des Peptidrückgrats.^[184]

Ein weiterer Ansatz ist die Erzeugung s.g. Hybrid-Konjugate. Diese Strukturen basieren auf der Verknüpfung von Peptiden mit anderen biologischen oder synthetischen Einheiten. Synthetisch hergestellte Polymere stellen in Kombination mit Peptiden einen vielversprechenden Partner im Bereich der Polymer-Biokonjugationsforschung dar. Der Grund dafür ist: Hybridmaterialien, die sowohl Protein- als auch synthetische Polymerelemente enthalten, könnten die Eigenschaften der einzelnen Komponenten synergetisch kombinieren und einige ihrer Einschränkungen überwinden. Somit erhält man Materialien, die das Positive beider Welten miteinander vereinen (siehe Abb. 9).^[185] Konkret, verbinden Peptid-Polymer-Konjugate die Vorteile sequenzdefinierter Segmente, die präzise Funktionalität und (Bio)Funktion beisteuern, mit denen synthetischer Polymere, die eine einfache Verarbeitung, hohe Löslichkeit und Stabilität im physikochemischen Medium, mechanische Eigenschaften und besondere Preiswürdigkeit bieten.^[186]

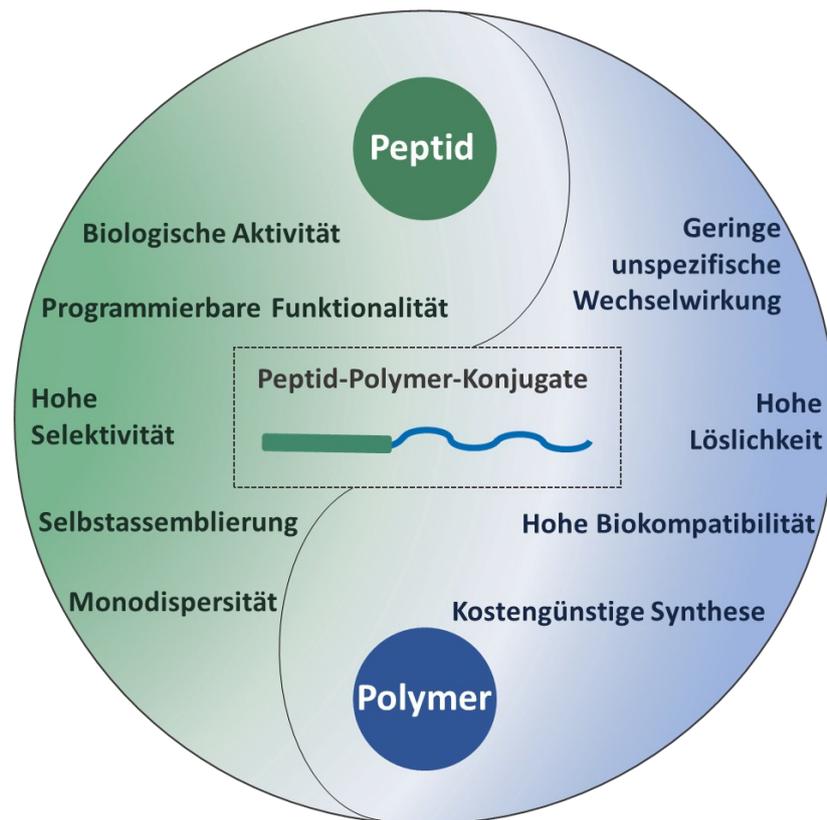


Abbildung 9: Positiver synergetischer Effekt von Peptid-Polymer-Hybrid-Konjugaten. Durch die kovalente Verknüpfung beider Strukturen, erhält man neuartige Materialien, die die Vorteile beider Komponenten in sich vereinen.

Polymere wie Poly(*N*-isopropylacryl-amid) (PNIPAM)^[187], Poly(acrylat)e^[188] und Poly(ethylenglycol) (PEG)^[189] wurden bereits in bioinspirierte Hybridkonjugate integriert. Insbesondere Konjugate, bei der PEG als Polymer verwendet wurde, zeigte vielversprechende Resultate. Die Studien zeigten, dass die PEGylierung zu einer erhöhten Löslichkeit und Stabilität, z.B. gegen enzymatischen Abbau, führt. Diese Eigenschaft wird allgemein als der *Stealth Effekt* bezeichnet. Gleichzeitig wird die Immunsuppression reduziert, welches sich wiederum zu einer erhöhten Plasmahalbwertszeit auswirkt. Letztlich verhindert die PEGylierung eine rapide Ausscheidung des Konjugats und ermöglicht somit, bspw. im Einsatz als Therapeutikum, eine geringere und niedriger frequentierte Dosierung des Medikaments.^[174]

Die Synthese von Peptid-Polymer-Konjugaten kann auf drei verschiedenen Wegen erfolgen (siehe Abb. 10): (i) die „*grafting-to*“ Methode, bei dem Peptid und Polymer separat voneinander synthetisiert werden und über funktionelle Gruppen aneinander konjugiert werden^[190]; (ii) bei der „*grafting-from*“ Strategie wird ein Initiator an eine definierte Stelle des Biomakromolekuls angebracht, von der aus die Polymerisation synthetischer Monomere initiiert wird^[191] oder (iii) am Peptid angebrachte Monomer-Einheit bildet ein polymerisierbares Peptid-Makromolekül, welches in der „*grafting-through*“ Methode polymerisiert werden kann.^[192]

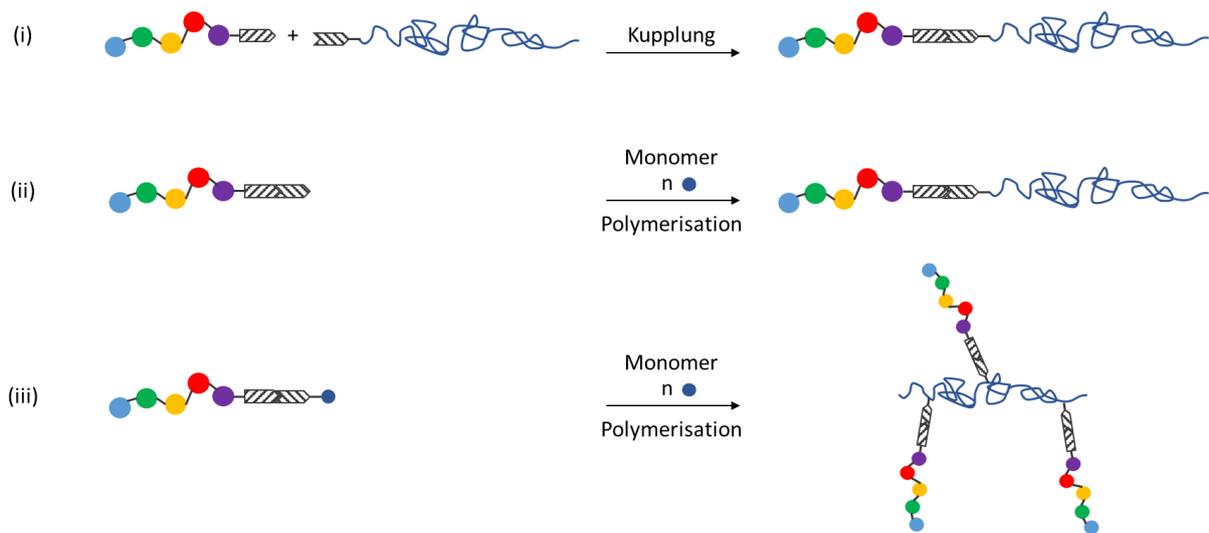


Abbildung 10: Die drei primären Methoden zur Synthese von Peptid-Polymer-Konjugaten.

Zusammengefasst, ist die Konjugation von Biomakromolekülen, wie Peptiden oder Proteinen, und synthetischen Polymeren eine attraktive Strategie zur Herstellung neuartiger Materialien mit interessanten Eigenschaften. Die kovalente Kombination eines biologischen Polymers und eines synthetischen Polymers kann zu Materialien führen, die die Eigenschaften der einzelnen Komponenten synergetisch kombinieren und mehrere ihrer Einschränkungen überwinden. Bioresponsive Hybridpolymere werden bereits als Medikamente^[193] eingesetzt und zeigen darüber hinaus ein großes Potenzial in anderen biotechnologischen Anwendungen, bspw. als Hydrogele im Tissue Engineering.
[178]

1.1.4.2 Lipid-Polymer-Konjugate

Neben Peptiden kommen auch andere von der Natur inspirierte Systeme in der Medizin zum Einsatz. Liposome sind eine davon. Liposome sind kugelförmige Vesikel mit einer Lipid-Doppelschichtmembran, die sowohl aus hydrophilen als auch aus lipophilen Lipidmolekülen besteht. Die Lipidmembran kann dabei aus natürlichen oder synthetischen Phospholipiden aufgebaut sein (siehe Abb. 11).^[194] Bei dem Aufbau der Lipid-Nanopartikel finden ebenfalls Selbstassemblierungsprozesse statt, die durch die hydrophoben Alkyl-Seitenkette der Liposome hervorgerufen werden. Um sich von der wässrigen Umgebung zu schützen, richten sich die Alkyl-Ketten ins Innere der Partikel (hydrophober Kern), während die hydrophilen Einheiten zum wässrigen Medium ausgerichtet sind (hydrophile Schale).^[195] Die Kern-Schale-Struktur der Nanopartikel eignet sich dementsprechend für die Verkapselung und den Transport sowohl schwer wasserlöslicher als auch hydrophiler Wirkstoffe.^[196] Gleichzeitig verringern die Liposome eine vorzeitige Ausscheidung von den

Therapeutika, was zu einer langen Halbwertszeit in der Zirkulation führt. Dies ermöglicht es Wirkstoffe mit einer anhaltenden Rate im optimalen Bereich der Wirkstoffkonzentration freizusetzen und mit Targeting-Liganden für eine differenzierte Abgabe weiter funktionalisiert zu werden.^[197]

Allerdings schränken einige Nachteile den Einsatz von Liposomen in biomedizinischen Anwendungen ein. Zum einen führen Oxidation und Hydrolyse der liposomalen Phospholipide zu einer Degradation der liposomalen Struktur, was zu einer sprunghaften Freisetzung des Wirkstoffs führt. Weiterhin verändert die Oxidation der Lipide die Eigenschaften der Membran, wie z. B. die Steifigkeit, welche Auswirkungen auf die zelluläre Permeabilität hat. Die physikalische und chemische Instabilität reduziert die Haltbarkeit der Liposomen. Zusätzlich behindern versehentliches Auslaufen, eine ungewollte Fusion von eingekapselten Medikamenten mit Lipiden, reduzierte Effizienz der Verkapselung hydrophober Medikamente, Lagerungsinstabilität und hohe Produktionskosten die Anwendung von Liposomen.^[198-199] Schließlich können insbesondere negativ geladene Liposome^[200] schnell opsonisiert und von den fixierten Makrophagen massiv abgebaut werden.^[201]

Ein Lösungsansatz ist hier ebenfalls die Konjugation von Polymeren an die Lipid-Struktur zu s.g. Lipid-Polymer-Hybrid-Konjugaten.^[202] Dieses Hybridsystem überwindet die Einschränkungen von Lipiden und bietet damit ein enormes Potenzial im Bereich der Nanomedizin. Eine Oberflächenmodifizierung mit hydrophilen Polymeren wie PEG führen zu einer Verbesserung der Zirkulationszeit und reduzieren das Risiko einer Opsonisierung durch das Immunsystem.^[203]

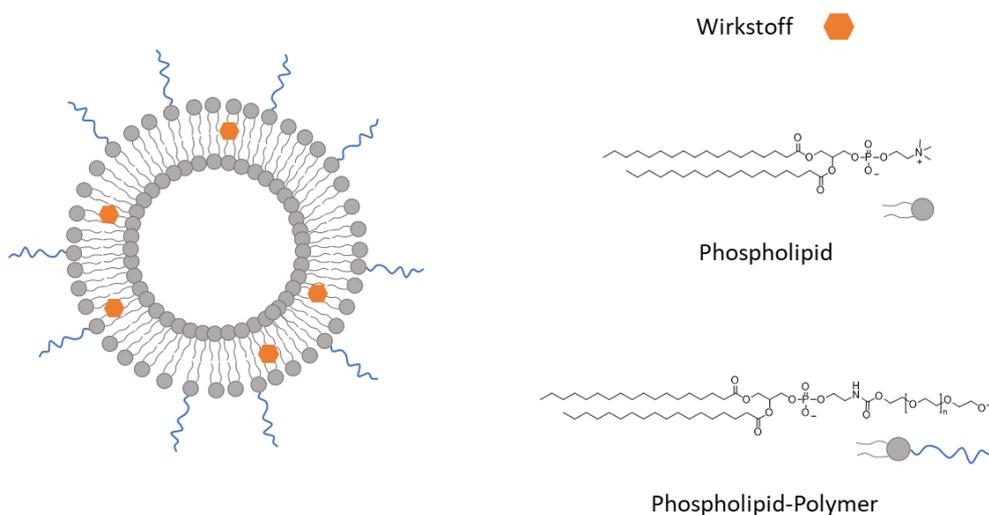


Abbildung 11: Schematische Darstellung eines selbstassemblierten Liposoms durch Phospholipide und Phospholipid-Polymer-Hybriden.

Obwohl PEG-modifizierte Liposome durch ihre hohe Biokompatibilität herausstechen, haben kürzlich veröffentlichte Studien einige durch PEG ausgelöste negative Auswirkungen festgestellt. Da das Polymer bereits in einer Vielzahl von Produkten in unserem alltäglichen Leben eingesetzt wird (z.B.

Kosmetika, Lebensmittel und Therapeutika), wurde erkannt, dass PEG eine spezifische und unspezifische Erkennung durch das Immunsystem induzieren kann, was zu einer immunogenen Reaktion des Körpers führt. Einige Studien berichten, dass PEG zu Überempfindlichkeitsreaktionen führen kann, die einen anaphylaktischen Schock auslösen können.^[204] Darüber hinaus wurde eine PEG-induzierte Bildung von Anti-PEG-IgM-Antikörpern beobachtet. Studien berichteten über das Phänomen einer beschleunigten Ausscheidung von PEGylierten Liposomen in Anwesenheit von Antikörpern gegen PEG oder gegen die PEG-Lipid-Konjugate.^[205] Ein bereits beschriebener Nachteil von PEG ist die nicht biologische Abbaubarkeit. Aufgrund der Gefahr der Akkumulation wäre es vorzuziehen, PEG mit niedriger Molekularmasse zu verwenden. Es wurde jedoch festgestellt, dass Polymerketten mit einer molaren Masse unter 400 Da für den Menschen toxisch sind, da eine sequenzielle Oxidation zur Disäure und Hydroxysäure stattfindet, die durch Alkohol- und Aldehyddehydrogenase metabolisiert wird. Dieser oxidative Abbau kann durch die Verwendung von PEG mit höherem Molekulargewicht verhindert werden.^[206]

Aufgrund der Nachteile der PEGylierung, gewinnt die Suche nach alternative Polymerstrukturen zur Oberflächenmodifikation von Liposomen zunehmend an Aufmerksamkeit. Die Herausforderung der Forschung beruht darauf einen Ersatz zu finden, der ähnliche positive Eigenschaften wie PEG hervorruft, gleichzeitig aber nicht toxisch oder immunsuppressiv zu wirken.

2 Motivation und Zielsetzung

Peptide gehören zu den bedeutendsten Akteuren zur Regelung essenzieller Prozesse in allen lebenden Systemen. Die Anordnung der zwanzig proteinogenen Aminosäuren ist ausschlaggebend für die Struktur und damit auch für die Funktion des Peptids. Aufgrund der hohen Vielseitigkeit der Peptidstrukturen ergeben sich eine nahezu unendliche Anzahl an möglichen Funktionalitäten, sich als attraktiv für Forschungsfelder im Bereich der Biotechnologie und Biomedizin erweist.^[1, 29, 31] Neue Verfahren, wie die von *Merrifield*^[28] entwickelte Festphasenpeptidsynthese, ermöglichen einen sequenzdefinierten Aufbau von Peptiden bis zu einer Größe von hundert Aminosäuren. Dieser technologische Fortschritt ermöglichte den Wissenschaftler*innen nicht nur die Imitierung und Untersuchung kurzer nativer Proteinabschnitte, sondern auch die Kreation neuer nicht biologischer Sequenzen. Dahingehend entwickelten Wissenschaftler*innen neue Peptidsequenzen mit veränderter Anordnung der Aminosäuren, z.B. Sequenzen, bei denen Aminosäuren durch andere substituiert wurden, um so ihre Eigenschaften gezielt zu verändern oder Homopeptide, Peptidstrukturen bestehend aus nur einer Aminosäureart.^[30] Nachteil der Peptide, insbesondere in medizinischen Anwendungen, ist ihr schneller Abbau durch körpereigene Enzyme und die damit resultierende schnelle Ausscheidung aus dem Körper. Die Substituierung einiger Aminosäuren durch Peptidmimetika oder die kovalente Kupplung der Peptidsequenzen an synthetische Polymere zur Generierung s.g. Peptid-Polymer-Konjugate^[185], stellte sich als geeignete Strategie zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Peptiden dar.^[186]

Die von *Hartmann et al.*^[52-63, 68, 207] entwickelte Methode der Festphasenpolymersynthese ermöglicht eine Kombination aus beiden Strategien. Ähnlich wie bei der klassischen Polymersynthese werden Monomere chemisch synthetisiert, die mittels der Festphasenpeptidsynthese zu Präzisionsmakromolekülen mit sich wiederholender Einheit miteinander verknüpft werden. Da die als Bausteine bezeichneten Monomere typische Merkmale von Peptiden tragen (terminale Amin- und Carboxy-Gruppe), werden durch ihre Verknüpfung monodisperse, sequenzdefinierte Oligo(amidoamine) generiert, die als Peptidmimetika eingesetzt werden können. Bis dato haben die Mitarbeiter*innen der Arbeitsgruppe ein Portfolio aus unterschiedlichen Bausteinen entwickelt, die in zwei Kategorien unterteilt werden können. Zum einen ermöglichen funktionelle Bausteine die Anbringung einer funktionalen Struktureinheit, bspw. ein Peptid.^[52, 58-59, 63] Zum anderen regulieren Spacer-Bausteine den Abstand zwischen den funktionalen Einheiten und gleichzeitig die Hydrophilie der Endstruktur.^[52, 57]

Das Ziel dieser Arbeit ist es, durch die Kombination von Peptiden und den von *Hartmann et al.* entwickelten Bausteinen, eine Reihe von selbstassemblierten Peptid-Präzisionsmakromolekül-

Konjugaten (PPMK) zu synthetisieren. Als Peptidmotiv soll Oligoleucin verwendet werden, das initiiert durch die hydrophoben Eigenschaften der Leucin-Seitenkette die Ausbildung von Sekundärstrukturen induzieren und letztlich in der Aggregation zu überdimensionalen Gerüsten führen soll. Nach einer erfolgreichen Ermittlung der geeigneten Syntheseroute, sollen unterschiedliche Leucin-basierende Konjugate generiert werden, die sich in ihrer Architektur, der Anzahl der Homoleucin-Einheiten und Länge der Homoleucin-Ketten unterscheiden.

Anschließend soll das Aggregationsverhalten der Konjugate ermittelt und miteinander verglichen werden. Hierfür ist die vorherige Untersuchung, ob die Konjugate die Ausbildung einer sekundären Struktur und damit auch eine Bereitschaft zu Selbstassemblierung haben, von großer Bedeutung. Diese erfolgt über Fourier-Transform-Infrarotspektrometrie (FTIR) und Circular Dichroism (CD) Spektroskopie. Darüber hinaus soll die Stabilität der zu Aggregation neigenden Konjugate ermittelt werden, indem sie mit dem stark chaotropen Salz Guanidinhydrochlorid (GdnHCl) unterschiedlicher Konzentration versetzt wird. Die Untersuchung der kritischen Aggregationskonzentration erfolgt mithilfe eines bei Aggregation fluoreszierenden Farbstoffs.

Peptid-basierte Konjugate finden aufgrund ihrer Eigenschaften zur Selbstassemblierung Anwendung als Hydrogele oder Drug-Delivery-Systeme. Das Ziel dieser Arbeit ist die Präparationsmethode individuell anzupassen, um gezielt PPMK-Gele oder PPMK-Nanopartikel für diesen Zweck zu generieren. In Betracht dessen sollen die Leucin-basierten Konjugate zur Herstellung von Makrogelen eingesetzt. Hierbei sollen in DMSO gequollene Organogele hergestellt werden, die einerseits aus den reinen Konjugaten und andererseits aus Mischungen von Konjugaten in unterschiedlichem Verhältnis bestehen. Die Stärke der erhaltenen Gele wird mittels Analyse am Rheometer untersucht.

Im weiteren Schritt sollen Nanogele hergestellt werden, deren Partikelgröße über Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Transmissionselektronenmikroskop (TEM) verifiziert werden. Da die Partikelgröße entscheidend für die erfolgreiche Aufnahme der Aggregate in das Körpergewebe ist, sollen durch Verwendung unterschiedlicher Konjugat-Konzentrationen oder durch Konjugat-Mischungen (in den Verhältnissen wie sie schon bei der Herstellung der Organogele verwendet werden) eine Kontrolle über die Partikelgröße angestrebt werden.

Im letzten Schritt soll die Toxizität der Nanogele und damit die mögliche Anwendung der PPMK in der Biomedizin untersucht werden. Dabei soll die Viabilität von gesunden Brustzellen und Brustkrebszellen nach einer Exposition mit ausgewählten Konjugat-Nanopartikel gemessen werden.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit besteht aus einer Kooperation mit *Prof. Dr. R. Süß* und *S. Bleher* vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg und *Dr. M. F Ebbesen* von der Southern University of Denmark in Odense. Das Ziel dieser Kooperation

ist eine Alternative zu Polyethylenglykol (PEG) zur Herstellung von biokompatiblen Liposomen zu entwickeln. Dabei sollte die Alternative die positiven Eigenschaften von PEG, wie den Stealth-Effekt, besitzen und gleichzeitig keine Immunantwort des Körpers hervorrufen. Da der von der *Hartmann*-Gruppe entwickelte Baustein EDS eine Diglykol-Einheit ausweist und Studien eine Unbedenklichkeit der EDS-haltigen Oligo(amidoamine) bestätigt, wurde EDS als eine mögliche geeignete Alternative zu PEG untersucht. Dahingehend sollen unterschiedliche Lipopolymere synthetisiert werden, die aus einer Oligo-EDS-Kette und einem Phospholipid bestehen, welche über die spaltbare Peptideinheit Glycin-Phenylalanin-Leucin-Glycin (GFLG) miteinander kovalent verbunden werden. Letztere soll das Abspalten der Oligo-EDS-Schutzschicht bei dem Eintritt in die Zelle gewährleisten. Die in dieser Arbeit synthetisierten Lipopolymere sollen anschließend von *S. Bleher* auf ihre Wirksamkeit als geeignetes Wirkstofftransport-System an Zebrafischlarven und HeLa-Zellen untersucht werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese von Leucin-basierten Präzisions-Peptid-Oligomer-Konjugaten und ihr strukturabhängiges Aggregationsverhalten

Das Ziel dieser Arbeit ist die Synthese von monodispersen, sequenzdefinierten Peptid-Präzisionsmakromolekül-Konjugaten (PPMK) für zukünftige Anwendungen im Drug-Delivery- oder Tissue Engineering-Bereich. Hierbei sollen der Einfluss von (i) Konjugat-Architektur, (ii) Valenz und (ii) Peptid-Kettenlänge auf deren jeweiliges Aggregationsverhalten untersucht werden (siehe Abb. 12). Das Aggregationsverhalten des jeweiligen Konjugats gibt wiederum Aufschluss über die Eignung als Nanogel für die Anwendung im Wirkstoffbereich oder als Makrogel zur Anwendung in der Wundversorgung, Zellkultivierung oder der Oberflächenbeschichtung.

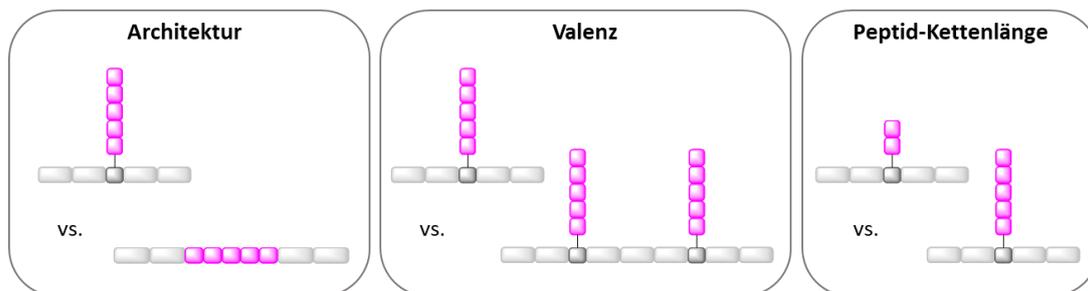


Abbildung 12: Überblick über das Design der geplanten Peptid-Präzisionsmakromolekül-Konjugaten (PPMK). Dabei soll die Struktur der Konjugate in ihrer Architektur (links) der Valenz (Mitte) und Peptid-Kettenlänge (rechts) variieren.

Als Peptidmotiv wird eine Homo-L-Leucin-Kette verwendet. Aus der Literatur ist bekannt, dass Oligoleucin von drei bis zu fünfzehn Wiederholungseinheiten eine β -Faltblatt- und darüber hinaus eine α -Helix-Struktur ausbildet.^[208-211] Wegen seiner Hydrophobie wird Leucin bevorzugt zur Stabilisierung von Peptidstrukturen verwendet. Dabei zeigte sich, dass die Substituierung einer zur Stabilität beitragenden Aminosäure durch Leucin die thermale Stabilität des gesamten Peptids erhöht.^[212-213] Darüber hinaus zeigten Studien von *Kuroyanagi et al.*^[214-215] eine erfolgreiche Behandlung von Brandwunden mithilfe einer von ihm entwickelten Wundauflage auf Basis eines Silbersulfadiazin (AgSD)-imprägnierten Poly(L-Leucin) (PLL)-Schwamms. Die PLL Matrix erwies sich aufgrund ihrer hohen Biokompatibilität, der schwammig-porösen Struktur nach Lyophilisierung und der Implementierung von antibakteriellen Wirkstoffen als vorteilhaft.^[216]

3.1.1 Synthese der Peptid-Präzisionsmakromolekül-Konjugate

Mithilfe der von *Merrifield*^[28] entwickelten Festphasenpeptidsynthese lassen sich anhand des Standard-Fmoc-Protokolls sequenzkontrollierte Peptide generieren. Der Reaktionsmechanismus erfolgt dabei über einen sich wiederholenden zweistufigen Prozess. Zunächst wurden Fmoc-geschützte

Aminosäuren unter Verwendung der Kupplungsreagenzien PyBOP und DIPEA sequenziell an eine Amin-funktionalisierte Festphase gekuppelt. Im zweiten Schritt erfolgte die Entschützung der Fmoc-Gruppe durch eine 25 %ige Piperidin in DMF-Lösung, bei der das freie Amin wieder freigesetzt wurde. Dies erlaubt die Wiederholung des Zyklus, bei dem die nächste Aminosäure an die feste Phase gekuppelt werden kann. Dieser Vorgang wurde fortgesetzt, bis die gewünschte Struktur erreicht wurde. Nach der Schützung der terminalen Amin-Gruppe mit Essigsäureanhydrid, wurde das Konjugat mit einem Cocktail aus Trifluoressigsäure (TFA), Triisopropylsilan (TIPS) und Dichlormethan (DCM) (95/2.5/2.5) vom festen Träger abgespalten.

Der Vorteil bei der Festphasensynthese ist, dass sowohl die Länge und Architektur als auch die Anzahl und Position der jeweiligen Aminosäuren im Peptid klar definiert ist. Dies nutzt die Arbeitsgruppe von *Hartmann et al.*^[52-63, 68] um Präzisionsmakromoleküle zu synthetisieren, die funktionale Strukturelemente integrieren können. Dafür entwickelte die Gruppe eine Bibliothek an Monomeren, welche mittels der Standard Fmoc-Festphasensynthese aneinander gekuppelt werden, d.h. sie tragen terminale Carboxy- und geschützte Amin-Funktionalitäten. Zwei Kategorien von den s.g. Bausteinen wurden zu diesem Zweck verwendet (funktionaler und Spacer-Baustein), welche die Anforderungen an das Verfahren erfüllen. Der häufig verwendete Baustein TDS^[52] trägt eine Alkin-Gruppe in der Seitenkette und ermöglicht mittels einer Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Zyklokonjugations-Reaktion (*Cu-mediated alkyne azide conjugation*, CuAAC) die Anbindung von Peptiden mit einer Azid-Gruppe. Den Abstand zwischen den Peptid-Ketten wurde wiederum von dem Spacer-Baustein EDS^[52] definiert. Basierend auf einer Diethylenglykol-Einheit, gehört er zu den flexiblen und hydrophilen Spacer-Bausteinen.

Zur Synthese der PPMKs sind grundsätzlich zwei unterschiedliche Synthesewege denkbar. Bei beiden Routen wird zunächst das Präzisionsmakromolekül durch Aneinanderreihung von funktionellem und Spacer-Baustein synthetisiert. Dabei ist für die spätere Anbindung der Leucin-Kette entscheidend, welcher funktionelle Baustein verwendet wird. Bei dem „*grafting-to*“-Weg (siehe Abb. 13a) wird separat dazu die Leucin-Kette mit einer terminalen funktionellen Gruppe hergestellt und anschließend an das Oligomer gekuppelt. Zur Realisierung dieser Route wurde TDS als funktioneller Baustein verwendet, der eine Alkin-Gruppe an der Seitenkette trägt. Mittels eines Azids, das an die Pentaleucin-Kette gekuppelt wurde, erfolgt die Anbringung der Peptidkette über die CuAAC-Reaktion an das Makromolekül. Dabei wurde das Peptid ebenfalls über die Festphasensynthese hergestellt und vor der Abspaltung von der Festphase, mit der zur Kupplung benötigten, 6-Azidohexansäure ausgestattet. Nach der Kupplung, welche unter Verwendung von 3 Äq. CuI und 10 Äq. Ascorbinsäure in DMSO über

Nacht und bei Raumtemperatur erfolgt, ist das Makromolekül und die Peptideinheit durch ein 1,2,3-Triazol miteinander verbunden.

Bei dem zweiten Weg, der „grafting-from“-Route (siehe Abb. 13b) wurde ein Baustein eingesetzt, welcher eine Amin-Funktionalität trägt. Dieser Weg wurde durch die Verwendung von L-Lysin als funktionaler Baustein ermöglicht. Durch die zweite Amin-Funktionalität an der Seitenkette der Aminosäure, konnte die Leucinkette in weiteren Schritten sukzessiv mittels Festphasensynthese an dem Grundgerüst aufgebaut werden. Zudem besteht der Vorteil, dass das gesamte Molekül in einem beliebigen Ansatz automatisiert an einem Peptid-Synthesizer hergestellt werden konnte.

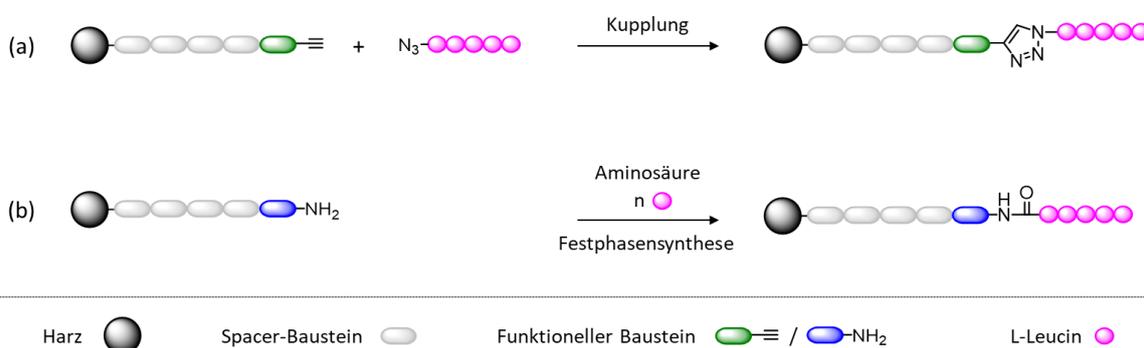


Abbildung 13: Darstellung der zwei Syntheserouten (a) „grafting-to“ und (b) „grafting-from“ zur Herstellung der PPMKs.

Basierend auf den beiden Synthesewegen konnten jeweils zwei Pfropf-co-PPMKs synthetisiert werden, ein monovalentes und ein divalentes Konjugat (siehe Abb. 14). Um sich an der in diesem System möglichen Kettenlänge der Peptideinheit zu orientieren, wurde zunächst ein Oligoleucin mit fünf Wiederholungseinheiten hergestellt. Der Erhalt der vier Konjugate konnte mittels RP-HPLC nachgewiesen werden. Die Produktreinheiten (ermittelt durch das UV-Signal bei 214 nm bei RP-HPLC-Analyse) beliefen sich auf 90 % (monovalent) und 80 % (divalent) für die Konjugate vom ersten Syntheseweg und auf 98 % (monovalent) und 85 % (divalent) für die Konjugate vom zweiten Syntheseweg. Da es sich um nicht aufgereinigte Substanzen handelt, befinden sich im RP-HPLC-Chromatogramm neben dem Produkt-Peak Signale von Unreinheiten, die auf Abbruchsequenzen während der Festphasensynthese zurückzuführen sind.

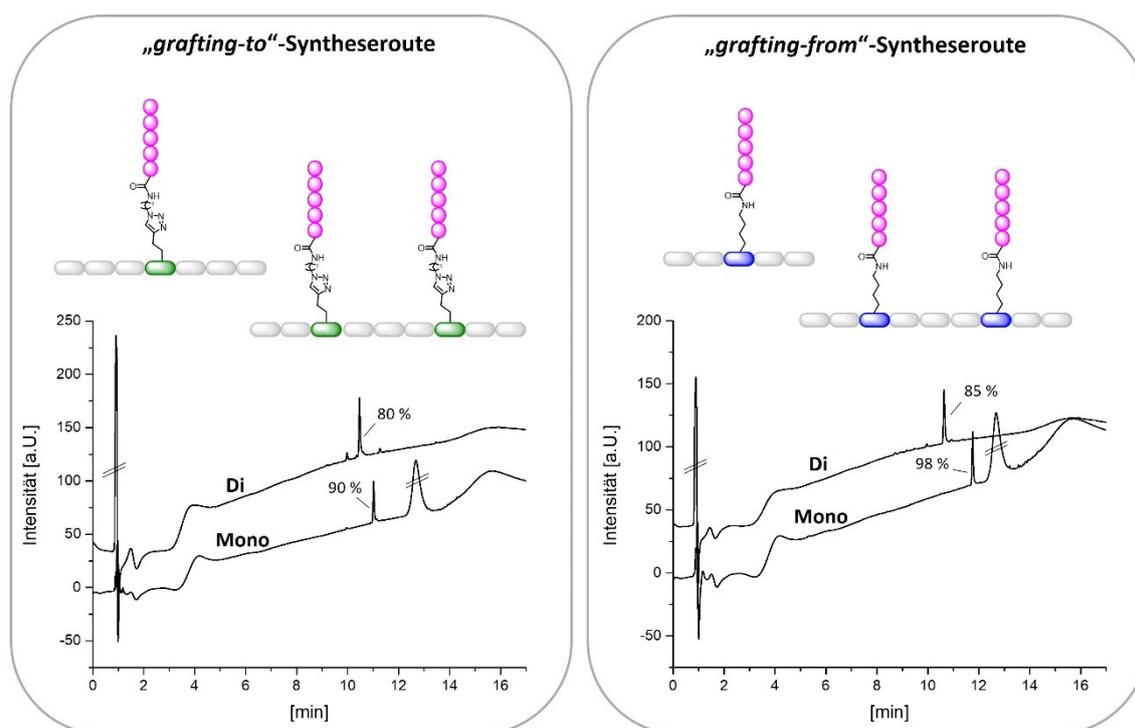


Abbildung 14: Graphische Darstellung und die RP-HPLC-Spektren der über die zwei Syntheserouten hergestellten PPMKs. Sowohl über den „grafting-to“ (links) als auch über den „grafting-from“-Syntheseweg (rechts) konnten jeweils ein monovalentes und ein divalentes Konjugat mit einem oder zwei Pentaleucin-Seitenketten synthetisiert werden. Bedingungen der RP-HPLC-Analyse von den beiden monovalenten Konjugaten: 95/5 H₂O/MeCN mit 0.1 % Ameisensäure (A) und 5/95 H₂O/MeCN mit 0.1 % Ameisensäure (B), 100 % A bis 50 % A in 15 min, 2 min 100 % MeCN mit 0.1 % Ameisensäure, bestimmt bei 214 nm. Bedingungen der RP-HPLC-Analyse von den divalenten Konjugaten: 95/5 H₂O/MeCN mit 0.1 % Ameisensäure (A) und 5/95 H₂O/MeCN mit 0.1 % Ameisensäure (B), 100 % A bis 100 % B in 15 min, 2 min 100 % MeCN mit 0.1 % Ameisensäure, bestimmt bei 214 nm.

Obwohl beide Synthesewege grundsätzlich die Generierung der Konjugate ermöglichten, gab es dennoch Unterschiede in der Durchführung. In der Literatur ist bereits bekannt, dass Poly-L-Leucin aufgrund seiner hohen Hydrophobie eine geringe bis keine Löslichkeit in wässrigen oder organischen Lösungsmitteln besitzt.^[217] Bei der Herstellung der PPMKs wurde ebenfalls festgestellt, dass bereits diese kurze Pentaleucin-Kette, insbesondere in Kombination mit der hydrophoben aliphatischen Kette der 6-Azidohexansäure, nur bedingt löslich ist. Löslichkeitsexperimente in unterschiedlichen Lösungsmitteln mit Zugabe von Säuren, Basen und unter Hitzeeinwirkung (bis zu 60 °C), konnten ausschließlich eine Löslichkeit des Pentaleucin-Konjugats in DMSO bei 60 °C und in geringer Konzentration (35 µM) nachweisen. Aufgrund dieser Einschränkung konnte das Produkt durch die „grafting-to“-Route nur in einem geringen Maßstab (15 µM) synthetisiert werden. Da hier die Hochskalierung des Produktes sowie die Erhöhung der Anzahl der Peptidketten demnach nicht einfach möglich ist, wird die erste Syntheseroute nicht weiterverfolgt. Ähnliche Probleme werden bei der Verwendung der zweiten Syntheseroute vermieden, da hier die Leucinkette sukzessiv an das Rückgrat gekuppelt wird.

Mithilfe der „grafting-from“-Syntheseroute konnte eine Reihe von Pfropf-co-PPMKs hergestellt werden. Die detaillierte Synthese erfolgte demnach wie folgt (siehe Abb. 15, Beispiel an der Dimer-Synthese): Zunächst wurde das Präzisionsmakromolekül-Rückgrat aus EDS- und L-Lysin(Boc)-Einheiten synthetisiert und mit einer Acetyl-Gruppe terminal geschützt. Um den hydrophilen Charakter der Strukturen zu erhöhen, wurden drei EDS-Einheiten zwischen jeder Peptideinheit und jeweils zwei EDS Bausteine an den Enden eingebaut. Nach der Entschützung der Boc-Schutzgruppe mit 4M HCl in 1,6-Dioxanlösung wurde die freigesetzte Amin-Funktionalität verwendet, um die Pentaleucin-Kette auf dem Rückgrat gemäß dem Festphasenprotokoll aufzubauen. Die Pentaleucin-Ketten wurden ebenfalls Acetylierung und das PPMK final von der Festphase abgespalten.

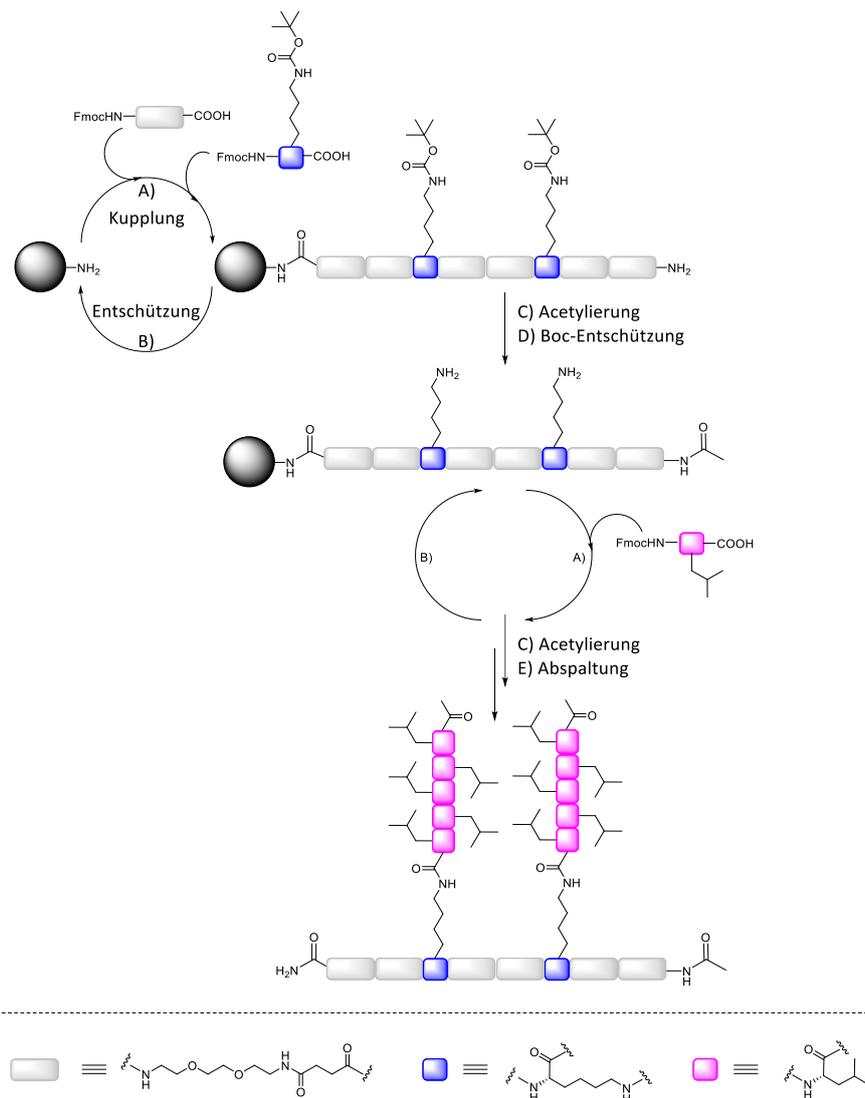
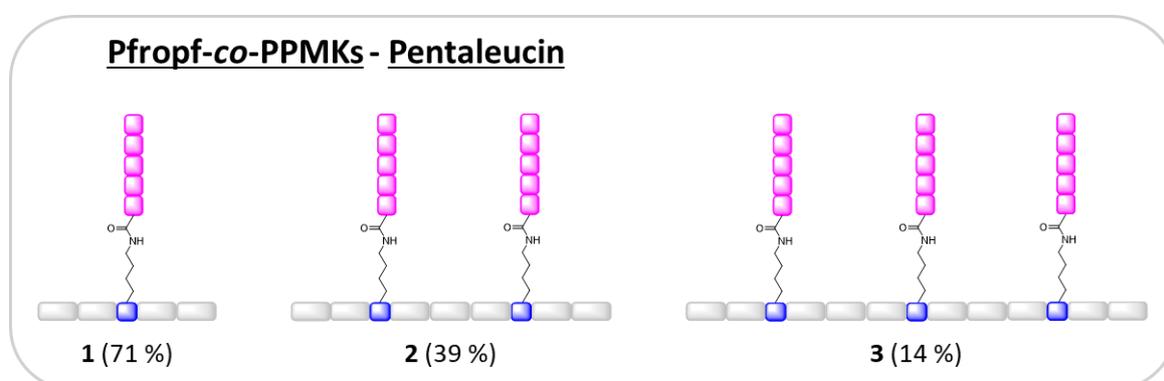


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Synthese von Leucin-basierten Pfropf-co-PPMKs mittels Festphasensynthese am Beispiel des Dimers. (A) Kupplungsreaktion unter Verwendung von 5 Äq. des Bausteins, 5 Äq. PyBOB und 10 Äq. DIPEA. Beim Aufbau der Peptidseitenkette vervielfacht sich die Verwendung von Fmoc-L-Leucin und den Kupplungsreagenzien mit der Anzahl der Valenz (B) Fmoc-Entschützung mit 25 %iger Piperidin in DMF-Lösung. (C) Acetylierung mit Ac_2O . (D) Boc-Entschützung mit 4M HCl in 1,6-Dioxan. (E) Abspaltung vom festen Träger mit 95 % TFA/2.5 % TIPS/2.5 % DCM.

Alle Schritte, außer der endgültigen Abspaltung von der festen Phase, wurden auf einem automatisierten Peptidsynthesizer durchgeführt. Neben der automatisierten Herstellung der Strukturen, besteht bei Gebrauch des Synthesizers ein zusätzlicher Vorteil der Überwachung des Dibenzofulven-Piperidin-Addukts während der Fmoc-Abspaltung. Diese wird über die UV-Absorption bei 301 nm nachgewiesen. Falls erforderlich, wiederholt der Synthesizer das Entschützungsprotokoll, bis weniger als 10 % Addukt nachgewiesen wird, was zu Produkten mit höherer Reinheit und höherer Ausbeute führt. Dennoch mussten die Konjugate durch präparative RP-HPLC gereinigt werden, um Endstrukturen mit hohen Reinheiten $\geq 98\%$ zu erhalten (bestimmt durch das UV-Signal bei 214 nm der RP-HPLC). Alle Endprodukte wurden mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und analytischer RP-HPLC mit gekoppelter ESI-MS oder mit MALDI-TOF-MS analysiert (siehe *Anhang*).

Die synthetisierten Peptid-Präzisionsmakromolekül-Konjugate können in drei Kategorien unterteilt werden (siehe Abb. 16). Zunächst die verzweigten Pfropf-co-PPMKs **1-3**, die abhängig von der Valenz eine, zwei oder drei Pentaleucin-Seitenketten an dem Makromolekül-Rückgrat tragen. Zusätzlich wurden `Kontroll-Konjugate` **4-6** hergestellt, die anstatt fünf nur zwei Leucine-Einheiten präsentieren. So soll festgestellt werden, ob das Rückgrat, das ebenfalls über Peptid-ähnliche Bausteine verfügt, Einfluss auf die Bildung einer Sekundärstruktur ausübt. Außerdem wurden lineare Block-co-PPMKs (**7-10**) mit fünf in dem Rückgrat eingebauten Leucin-Einheiten erzeugt. Die Konjugate **7** und **8** sind Diastereomere, da sie beide aus fünf Leucin- und vier EDS-Einheiten aufgebaut sind, jedoch in unterschiedlicher Weise angeordnet. Dies gibt die Möglichkeit zu untersuchen, ob die verteilte (**7**) oder lineare (**8**) Anordnung der Leucine einen Unterschied in ihrem Aggregationsverhalten macht. Zusätzlich wurden reines Pentaleucin (**9**) und Pentaleucin-PEG-Konjugat (**10**) synthetisiert. Letzteres wurde durch die Verwendung der Festphase TentaGel PAP[®][218-219] erhalten, die vom Hersteller Rapp mit PEG-Ketten auf der Festphasen-Oberfläche mit einem Molekulargewicht von 3400 Da ausgestattet wurden. Nach dem Aufbau des Peptids wird das erhaltene Peptid-Polymer-Konjugat durch Zugabe von Trifluoressigsäure, Thioanisol und Trimethylsilylbromid (94/5/1) von der Festphase abgespalten.



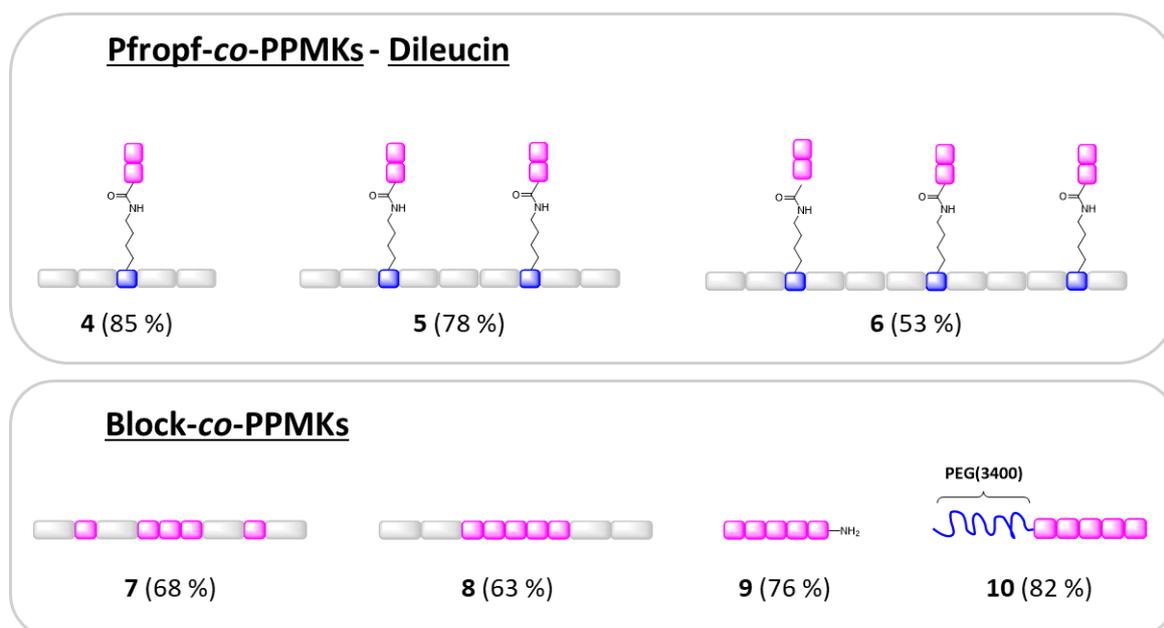


Abbildung 16: Darstellung der über die Festphasensynthese hergestellten PPMKs (Ausbeute der Produkte ist in Klammern angegeben). Diese lassen sich in drei Kategorien unterteilen: Die Pfropf-co-PPMKs mit Pentaleucin- (oben) und mit Dileucin-Ketten (mitte) als Seitenkette und die linearen Block-co-PPMKs mit in der Hauptkette integriertem Leucin (unten).

Besonders auffällig ist, dass die Pfropf-co-PPMKs mit zunehmender Valenz in immer geringerer Ausbeute isoliert werden konnte. Denn, anhand der RP-HPLC-Spektren der Rohprodukte, konnte mit steigender Valenz auch eine Zunahme der Verunreinigungen durch Abbruchsequenzen festgestellt werden. Dieser Zusammenhang lässt sich mit der Erhöhung des hydrophoben Anteils erklären, welche das Kollabieren des Makromoleküls an der Festphase induzieren könnte. Zusätzlich ist dies ein Indiz, dass es zu einer Wechselwirkung zwischen den Peptidketten kommt, welche das Molekül zur Aggregation bewegt. In beiden Fällen wird Kupplung von weiteren Leucin-Einheiten und damit der Aufbau des gesamten Peptids erschwert. Löslichkeitsprobleme sind außerdem bei dem freien Pentaleucin **9** aufgetreten. Ähnlich wie das Pentaleucin-Derivat, welches bei dem „grafting-to“-Syntheseweg hergestellt wurde, war das terminal geschützte Leu₅-Ac unlöslich in sämtlichen Lösungsmitteln und unter veränderten pH- und Temperaturänderungen. Aus diesem Grund wurde die Hydrophilie erhöht, indem das terminale Amin nicht mit der Acetylgruppe geschützt wurde.

Die Abb. 17 zeigt exemplarisch ein ¹H-Spektrum des Unimer-Konjugats **1**, aufgenommen in DMSO-*d*₆. Charakteristisch sind die Amid-Gruppen der Struktur im Tieffeld zwischen 7.60 - 8.05 ppm vorzufinden. Dabei ist die Aufspaltung der Amide, die den Leucinen und dem Lysin zuzuordnen sind, deutlich von den Amidgruppen des EDS-Rückgrats zu unterscheiden. Am weitesten im Tieffeld verschoben befinden sich die NH-Gruppen, der letzten beiden Leucin-Einheiten (**i**) und (**h**) und das der Lysin-Einheit (**c**), die jeweils bei 8.02, 7.99 und 7.96 ppm in Dupletts aufgespalten wurden. Gefolgt davon befinden sich die Amide (**a**) und (**b**) der EDS Bausteine in Form eines Multipletts zwischen 7.84 – 7.84 ppm. Daraufhin

befinden sich die beiden Triplets bei 7.81 und 7.71 ppm der Amide (**f**), (**g**) und (**d**), gefolgt von dem letzten Amid-Duplett (**e**) bei 7.64 ppm. Nach der Abspaltung des Konjugats von der Festphase entsteht ein terminales primäres Amid, deren beide Protonenkerne diastereotop zueinander stehen. Beide Kerne erzeugen Singulett-Signale bei 7.71 (**i**) und 7.26 ppm (**ii**). Weiterhin charakteristisch sind die C $^{\alpha}$ -Protonen der jeweiligen Aminosäuren. Diese befinden sich idealerweise zwischen 4.00 und 4.50 ppm. Bei den hier synthetisierten Konjugaten erzeugen die C $^{\alpha}$ -Protonen (**10**) der Leucine, im Fall des Unimers mit einem Integral von fünf, ein Multiplett bei 4.17 – 4.28 ppm und das C $^{\alpha}$ -Proton (**5**) des Lysins ebenfalls ein Multiplett bei 4.10 – 4.14 ppm. Die Signale der beiden Methyl-Gruppen der Leucin-Einheiten befinden sich am weitesten Hochfeld verschoben. Da die beiden CH $_3$ -Gruppen (**13a**) und (**13b**) ebenfalls diastereotop zueinander stehen, erzeugen sie ein Duplett von Quartett mit bei 0.78 – 0.90 ppm jeweiligen Integralen von 15 Protonen. Die weiteren Signale sind dem EDS-Baustein im Konjugat-Rückgrat, der Alkin-Kette im Lysin und den C $^{\beta}$ - und C $^{\gamma}$ -Protonen der Leucine zuzuordnen.

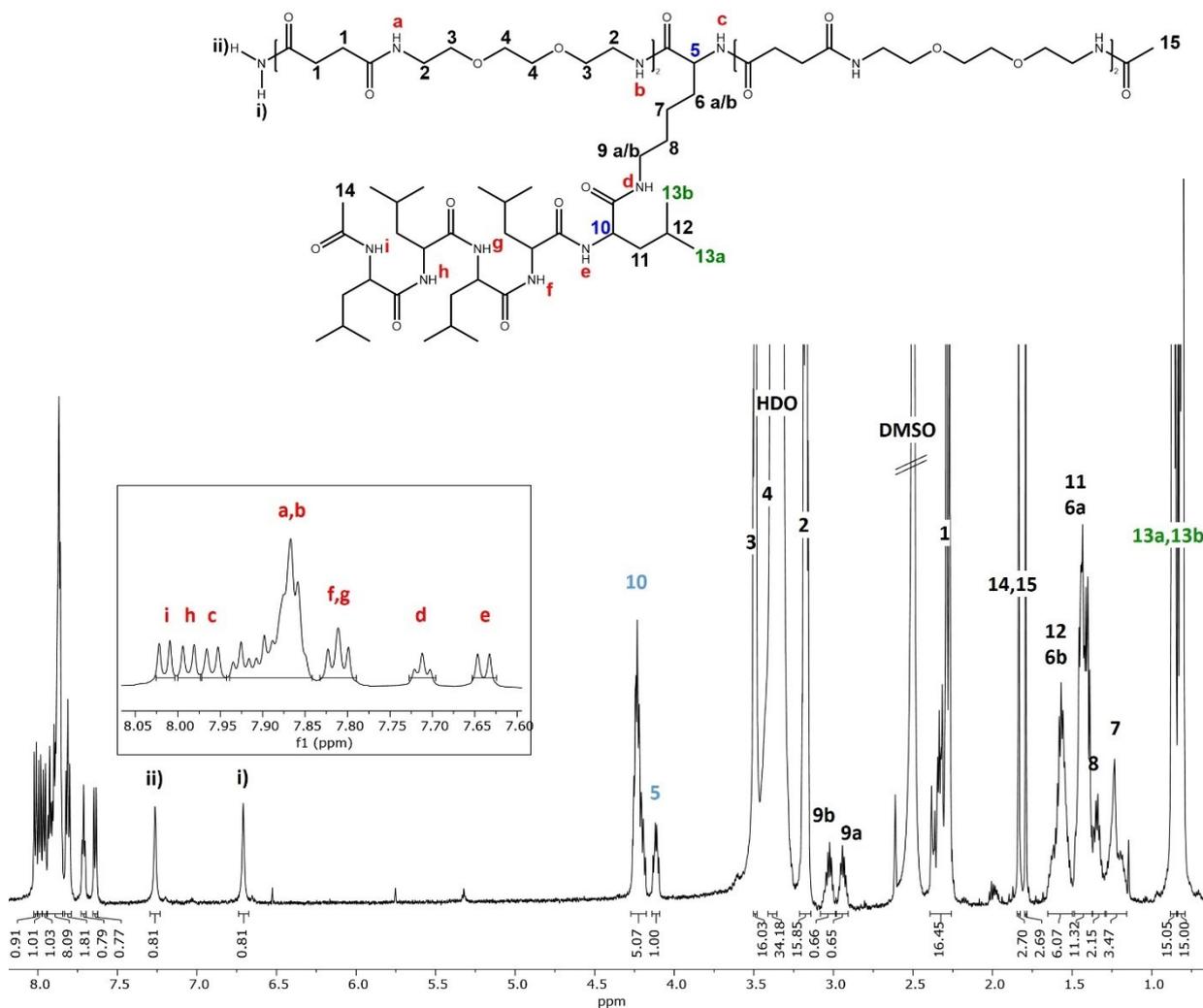


Abbildung 17: $^1\text{H-NMR}$ von dem PPMK **1** (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, 25°C).

Außerdem wurden die relative Reinheit und Monodispersität der synthetisierten Konjugate durch RP-HPLC bestimmt. Zur Veranschaulichung der Retentionszeiten, wurden die RP-HPLC-Chromatogramme der PPMKs **1-9** gegeneinander aufgetragen (siehe Abb. 18). Aufgrund der PEG-Einheit konnte kein HPLC-Spektrum von Konjugat **10** aufgenommen werden. Die Proben wurden in einem Lösungsmittelgemisch aus H₂O und MeCN (1/1, v/v) gelöst und anschließend mit einem Spritzenfilter mit 0.2 µm Porengröße gefiltert. Alle Chromatogramme wurden mit einer mobilen Phase von 95/5 H₂O/MeCN mit 0.1 % Ameisensäure (A) und 5/95 H₂O/MeCN mit 0.1 % Ameisensäure (B) in 30 Minuten bei 25° C mit einem UV-Detektor aufgenommen, der so eingestellt war, dass die Absorption der Amid-Gruppen bei 214 nm detektiert wurde. Zur besseren Übersicht wurden die Chromatogramme der drei Konjugat-Kategorien farblich unterteilt in schwarz (Pfropf-co-PPMKs mit Pentaleucin), blau (Pfropf-co-PPMKs mit Dileucin) und grün (Block-co-PPMKs).

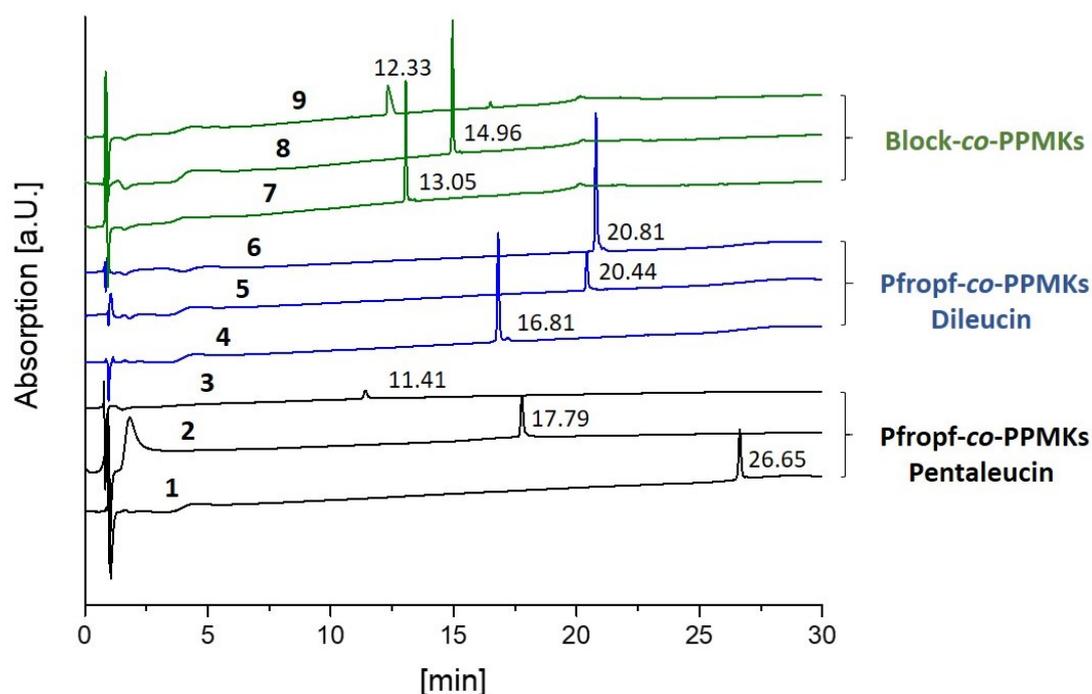


Abbildung 18: RP-HPLC-Chromatogramme der synthetisierten PPMKs und die ermittelten Retentionszeiten. Bedingungen der RP-HPLC-Analyse: 95/5 H₂O/MeCN mit 0.1 % Ameisensäure (A) und 5/95 H₂O/MeCN mit 0.1 % Ameisensäure (B), 100 % A bis 100 % B in 30 min, 25° C, bestimmt bei 214 nm.

Das Retentionsverhalten einer Struktur während der RP-HPLC-Messung wird maßgeblich von der Molekülstruktur beeinflusst. Zu den Faktoren, die das Retentionsverhalten von Peptiden in der RP-HPLC beeinflussen, gehören (i) die Aminosäurezusammensetzung und damit die Hydrophilie/Hydrophobie oder die Peptid-Architektur, (ii) die Peptidkettenlänge und (iii) sequenzabhängige Effekte, z.B. die Ausbildung einer sekundären Struktur. Peptide, die zur Bildung einer Sekundärstruktur neigen, haben eine stärkere Wechselwirkung mit der hydrophoben C18-Säulenmatrix und eluieren daher zu einem späteren Zeitpunkt.^[220] Selbes gilt auch für die Hydrophobie.

Je hydrophober das Molekül, desto später ist die Retentionszeit. Andersherum lassen sich mit den Informationen über das Retentionsverhalten Schlüsse auf die Struktur von Peptiden ziehen.^[221]

Im Hinblick auf eine veränderte Retentionszeit bei veränderter Konjugatstruktur, eignen sich die diastereomeren PPMKs **7** und **8** für einen direkten Vergleich. Beide besitzen die gleiche Anzahl und Art an Bausteinen (beide werden aus vier EDS-Bausteinen und fünf Leucin-Einheiten synthetisiert), aber auf unterschiedliche Weise angeordnet. Das Chromatogramm der RP-HPLC zeigen eine höhere Retentionszeit für **8** (14.96 min), das Konjugat, bei dem alle fünf Leucin-Einheiten in einer Reihe sequenziert wurden. Konjugat **7**, bei dem die Leucin-Einheiten statistisch über das Rückgrat verteilt sind, wurde etwa zwei Minuten früher von der Säule eluiert. Dies verdeutlicht, dass die Anordnung der Aminosäuren Einfluss auf die Polarität und somit auch auf die Wechselwirkung zum Säulenmaterial hat. Obwohl beide Konjugate über die gleichen Bausteine verfügen, erscheint die Struktur **8** hydrophober als Struktur **7**. Das reine Pentaleucin **9** eluiert bereits bei 12.33 min, welches auf die geringe Kettenlänge zurückzuführen ist. Zudem wurde aufgrund von Problemen bei der Löslichkeit auf die terminale Acetyl-Schutzgruppe verzichtet. Die damit resultierende freie Amin-Gruppe macht das Molekül deutlich hydrophiler, was sich in der kürzeren Retentionszeit widerspiegelt.

Besonders interessant aber ist der Anstieg der Retentionszeit bei Änderung der strukturellen Architektur. Bei PPMK **1** ist das Pentaleucin nicht im Rückgrat integriert, sondern als Seitenkette an das Rückgrat gekuppelt, wodurch sich die Retentionszeit auf 26.65 min im Vergleich zu 14.96 min bei Konjugat **8** fast verdoppelt hat. Dieser Effekt kann auch durch die hydrophobe Alkinkette des Lysins verstärkt werden. Es könnte aber auch zeigen, dass die Leucine in den Pfropf-co-Konjugate aufgrund ihrer Architektur stärker mit dem hydrophoben Säulenmaterial interagieren als die Block-co-Konjugate. Erstaunlicherweise zeigen das Dimer **2** und das Trimer **3** eine abnehmende Retentionszeit von 17.79 bzw. 11.41 min im Vergleich zu **1**, obwohl die Hydrophobie aufgrund einer höheren Anzahl an Leucin-Seitenketten gestiegen ist. Eine Erklärung könnte eine Abnahme der Löslichkeit der Strukturen in der mobilen Phase sein, welche zu einer geringeren Wechselwirkung mit der Säulenmatrix führt und daher schneller eluiert. Diese Vermutung deckt sich ebenfalls mit der verringerten Intensität der Signale. Bei Konjugat **3** ist nur ein kleiner Peak zu sehen, der darauf hinweist, dass wenig gelöstes Material gemessen werden konnte. Dies lässt sich durch Beobachtungen bestätigen. Leider lag das Material bei Vermischung mit dem Lösungsmittelgemisch größtenteils ungelöst vor und wurde bei der Filtration entfernt.

Die Retentionszeiten der Pfropf-co-PPMKs mit Dileucin zeigen ein erwartets Ergebnis. Mit Erhöhung des Leucin-Anteils, vergrößert sich die Hydrophobie der Strukturen worauf das Material später von der

Säulenmatrix gespült wird. Die Elutionszeit von Dimer **5** und Trimer **6** unterscheidet sich hingegen nicht erheblich. Der Vergleich zwischen den beiden Unimer-Konjugaten zeigt, dass das Dileucin-Konjugat **4** etwa 10 min schneller eluiert als das Pentaleucin-Konjugat **1**, welches auf die erhöhte Hydrophobie hindeutet. Anders ist es bei dem Vergleich der Dimer-Konjugate. Das Pentaleucin-Konjugat **2** hat eine niedrigere Retentionszeit, was aber auf die zuvor angesprochene reduzierte Löslichkeit zurückzuführen ist.

Im Hinblick auf die mögliche Verbindung zwischen Strukturaufbau und Aggregationsverhalten, lassen die RP-HPLC-Chromatogramme folgende Zusammenhänge erahnen: Die Aneinanderreihung von Leucin-Einheiten in Form von Homoleucin, angebracht als Seitenkette an das Oligomer-Rückgrat, könnte eine Aggregation begünstigen. Dies verdeutlicht insbesondere der direkte Vergleich zwischen dem verzweigten Konjugat **1** und dem linearen Konjugat **8**. Dabei scheint eine Homoleucin-Kette mit zwei Leucin-Einheit für eine Aggregation nicht ausreichend zu sein. Zusätzlich zeigt sich insbesondere bei den Pentaleucin-Pfropf-co-PPMKs, dass die Erhöhung der Valenz die Löslichkeit der Konjugate verringert. Dieses Resultat ist ein Indiz für die Ausbildung von überdimensionalen Strukturen. Ob diese durch die Ausbildung einer Peptidfaltung oder aufgrund von hydrophoben Effekten resultieren, soll in den weiteren Schritten ermittelt werden.

3.1.2 Untersuchung der Sekundärstruktur der PPMKs

Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung von Hybrid-Konjugaten, die als Drug-Delivery-System oder Hydrogel in der Medizin Anwendung finden können. Diese Anforderungen lassen sich nur erreichen, wenn die Konjugate, induziert durch intra- und intermolekulare Wechselwirkungen, zu überdimensionalen Strukturen aggregieren können. Dementsprechend ist die Information, ob die Konjugate Sekundärstrukturen ausbilden können für die weiteren Schritte von großer Bedeutung. Im Folgenden werden unter Verwendung gezielter analytischer Verfahren das Aggregationsverhalten in Abhängigkeit der PPMK-Struktur untersucht.

3.1.2.1 *Fourier-Transform Infrared Spektroskopie*

Eine Methode, die Hinweise auf die entwickelte Sekundärstruktur gibt, ist die FTIR-Spektroskopie. Die FTIR-Spektroskopie misst die Wellenlänge und Intensität der Absorption von IR-Strahlung durch eine Probe. Die Absorption von IR-Strahlung regt Schwingungsübergänge in Molekülen an. Da die Schwingungsfrequenz und die Absorptionswahrscheinlichkeit von der Stärke und Polarität der schwingenden Bindungen abhängen, werden sie durch intramolekulare und intermolekulare Effekte beeinflusst. Proteinmoleküle weisen neun charakteristische Amid-Schwingungsfrequenzen auf,

welche sich aus der Polypeptid-Wiederholungseinheit ergeben. Die unterschiedlichen Muster in den H-Bindungen und geometrischen Orientierungen der Amid-Bindungen in α -Helices, β -Faltblättern und ungeordneten Strukturen erlauben es, anhand der unterschiedlichen Schwingungsfrequenzen auf individuelle sekundärstrukturelle Faltungen zu schließen. Der empfindlichste Spektralbereich für Protein-Sekundärstruktur ist die Amid I-Frequenz, die von der C=O-Streckschwingung der Amid-Gruppe stammt. Die Position der Amid I-Bande, welche sich über den Bereich zwischen 1550 und 1700 cm^{-1} erstreckt, wurde häufig zur Quantifizierung der Sekundärstrukturzusammensetzung von Proteinen und Polypeptiden verwendet.^[222] So sagt die Amid I-Absorption um 1648 - 1657 cm^{-1} eine α -Helix-Struktur, 1623 - 1641 cm^{-1} eine β -Faltblatt-Struktur und 1642 - 1657 cm^{-1} die Ausbildung ungeordneter Strukturen voraus.^[223]

Die FTIR-Spektroskopie von PPMKs wurde mit lyophilisiertem Material auf einem Single-Diamant-Spektrometer durchgeführt (siehe Abb. 19). Zur Hervorhebung der Amid I-Bande, wurde das Spektrum auf den Bereich zwischen 1550 - 1750 cm^{-1} fokussiert. Die Banden wurden zusätzlich in Tabelle 1 zusammengefasst.

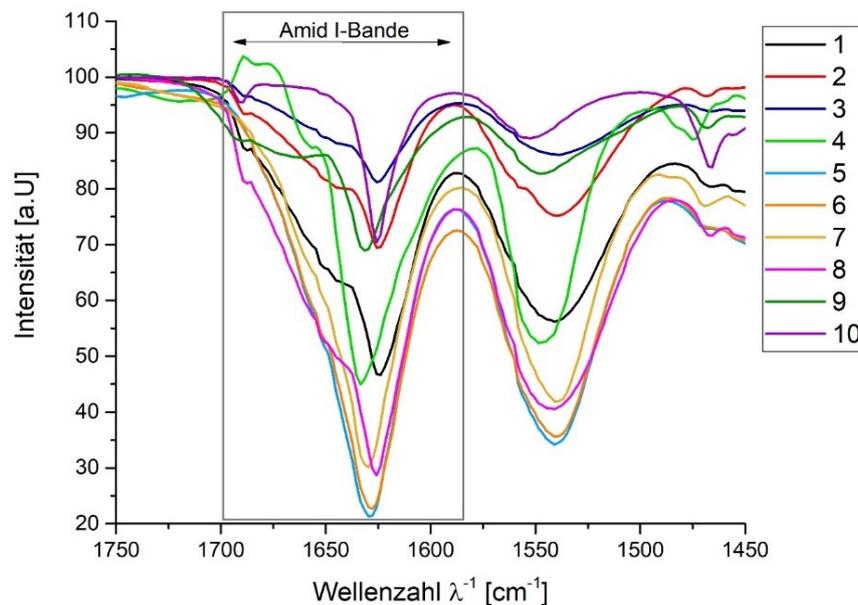


Abbildung 19: FTIR-Spektren der PPMKs. Das Spektrum wird in dem Bereich von 1450 bis 1750 cm^{-1} dargestellt, sodass der Fokus auf der Amid I-Bande der Konjugate liegt.

Tabelle 1: Über die FTIR Spektroskopie ermittelten Amid I-Banden der PPMKs.

Konjugat	λ^{-1} [cm^{-1}]	Konjugat	λ^{-1} [cm^{-1}]	Konjugat	λ^{-1} [cm^{-1}]
1	1624	4	1633	7	1632
2	1626	5	1632	8	1628
3	1626	6	1630	9	1630
				10	1624

Alle Konjugate zeigen eine Amid I-Absorption bei 1624 - 1633 cm^{-1} und geben damit einen Hinweis darauf, dass alle PPMKs β -Faltblattstrukturen ausbilden. Dennoch lässt sich eine gewisse Tendenz aus den Banden ableiten, anhand derer die Konjugate in zwei Gruppen unterteilt werden können: Die Konjugate, die bereits in der RP-HPLC-Analyse eine positives Aggregationsverhalten der Konjugate andeuteten, besitzen in der FTIR-Spektroskopie einen Bandenwert von $< 1630 \text{ cm}^{-1}$. Dazu gehören die Pfropf-co-PPMKs mit Pentaleucin (**1-3**) und das lineare Block-co-PPMK **8**, sowie das PEG-Pentaleucin-Konjugat **10**. Diesen Strukturen könnte somit eine erhöhte Präferenz zur Aggregation zugeschrieben werden. Alle weiteren Konjugate, zu denen die Pfropf-co-PPMKs mit Dileucin (**4-6**), das Block-co-PPMK **7** und das Pentaleucin **9** gehören, besitzen Amid I-Banden mit einer Wellenzahl $\geq 1630 \text{ cm}^{-1}$. Dennoch, da diese Tendenz keine eindeutige Aussagekraft über das Aggregationsverhalten der PPMKs gibt, sind weitere Analysen notwendig.

3.1.2.2 Zirkulardichroismus-Spektroskopie

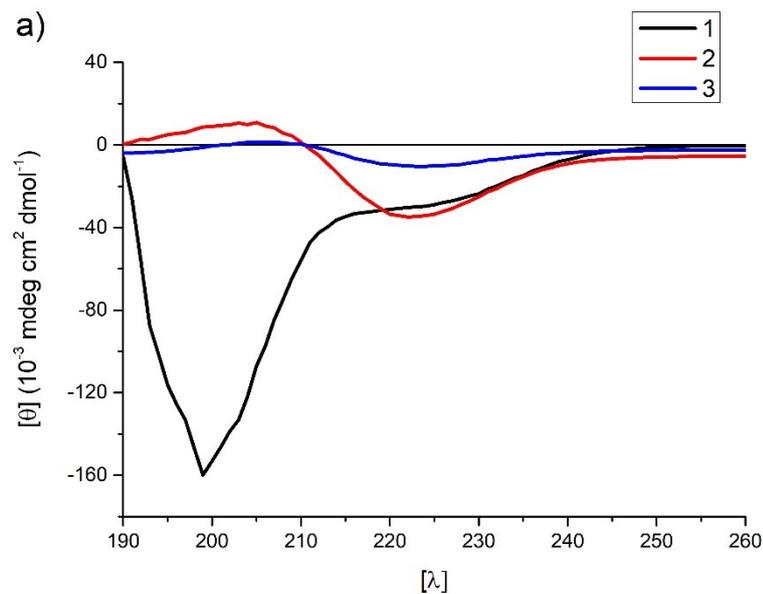
CD-Spektroskopie ist eine hervorragende Methode zur Bestimmung der Sekundärstruktur, Faltung und Bindungseigenschaften von Proteinen. Unter Zirkulardichroismus versteht man die ungleiche Absorption von links- und rechtsdrehendem, also zirkular polarisiertem Licht. Einem Lichtstrahl sind zeitabhängige elektrische und magnetische Felder zugeordnet. Wird das Licht durch geeignete Prismen oder Filter polarisiert, so schwingt sein elektrisches Feld E sinusförmig in einer einzigen Ebene. Von vorne betrachtet kann man sich die Sinuswelle als Resultat zweier gleich langer Vektoren vorstellen, die Kreise nachzeichnen, von denen einer im Uhrzeigersinn (E_R) und der andere gegen den Uhrzeigersinn (E_L) rotiert. Die Wellen sind um 90 Grad zueinander phasenverschoben und können mit verschiedenen Prismen oder elektronischen Geräten getrennt werden. Wenn asymmetrische Moleküle mit Licht interagieren, können sie rechts- und linksdrehend zirkular polarisiertes Licht in unterschiedlichem Maße absorbieren. Die Addition der E_R - und E_L -Vektoren ergeben einen Vektor, die ellipsenförmig zirkuliert. CD wird entweder in Einheiten von ΔE , der Differenz der Absorption von E_R und E_L , oder in Grad Elliptizität angegeben, die als der Winkel θ definiert ist. Die molare Elliptizität $[\theta]$

ergibt sich aus der Elliptizität geteilt durch die eingesetzte molare Konzentration c des Peptids und der Schichtdicke d der verwendeten Küvette.^[224]

$$[\theta] = \theta / (10 \cdot c \cdot d)$$

Jede strukturelle Einheit weist ein charakteristisches CD-Spektrum auf. Zum Beispiel haben α -helikale Proteine zwei negative Banden bei 222 nm und 208 nm und eine positive Bande bei 193 nm.^[225] Proteine mit gut definierten antiparallelen β -Faltblättern haben ein negative Bande bei 218 nm und eine positive Bande bei 195 nm^[226], während ungeordnete Proteine eine sehr geringes Maximum oberhalb von 210 nm und eine negative Bande bei 195 nm aufweisen.^[227]

Aufgrund der eindeutigen Bestimmbarkeit ob und welche Art von Sekundärstruktur ausgebildet werden, wurden die PPMKs mittels der CD-Spektroskopie analysiert. Zur Erhöhung der Löslichkeit, wurden die Konjugate in einer Mischlösung aus MeCN und MQ-Wasser (5/95, v/v) suspendiert oder gelöst. Die Spektren wurden mit einem CD-Spektropolarimeter bei 20 °C unter Mittelung von 10 sich wiederholenden Scans zwischen 260 und 190 nm mit 1 nm Datenabstand bestimmt (siehe Abb. 20a-c). Die Ergebnisse werden in Tabelle 2 zusammengefasst.



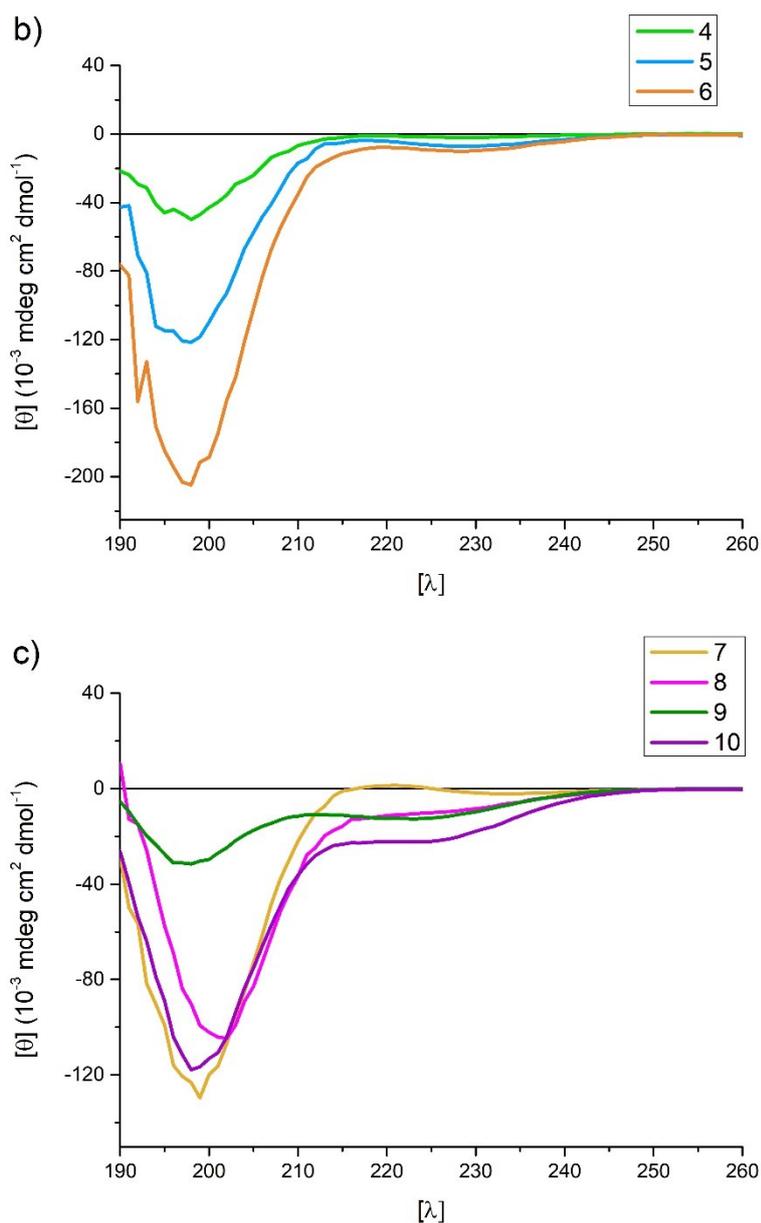


Abbildung 20: CD-Spektren der PPMKs. Zur besseren Übersicht wurden die Spektren kategorisch zusammengefasst in (a) Pentaleucin-Propf-co-PPMKs, (b) Dileucin-Propf-co-PPMKs und (c) die Block-co-PPMKs.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den CD-Analysen.

Konjugat	2, 3	1, 4, 5, 6, 8, 9, 10	7
Struktur	β -Faltblatt	Überwiegend ungeordnet mit einer Tendenz zur β -Faltblatt-Ausbildung	ungeordnet

Die Analyse mit CD-Spektroskopie zeigt, dass es unter den Konjugaten deutliche Unterschiede im Hinblick auf ihr Aggregationsverhalten gibt. Betrachtet man die Spektren der Propf-co-PPMKs mit Pentaleucin (Abb. 19a), ist eine deutliche Tendenz zur Ausbildung von β -Faltblättern mit Erhöhung der Valenz erkennbar. Die CD-Spektren der Konjugate **2** und **3**, welche dem Dimer und Trimer entsprechen, zeigen einen typischen Kurvenverlauf einer sich entwickelnden β -Faltblatt-Struktur, mit einem negativen Peak bei 222 nm und einem positiven bei 205 nm. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Literatur, die besagt, dass ein Homopeptid mit 3 - 15 Leucin-Einheiten β -Faltblätter auszubilden.^[208-211] Aufgrund der höheren Unlöslichkeit des Konjugats **3** und der daraus resultierenden abnehmenden Konzentration des gelösten Materials, weist die Kurve eine geringere Peak-Intensität auf. Interessanterweise deuten diese CD-Analysen darauf hin, dass mehr als eine Pentaleucin-Kette notwendig, um eine stabile Aggregation zu induzieren. Der Vergleich zu dem Unimer **1** zeigt, dass eine Peptid-Kette zur Ausbildung einer eindeutigen β -Faltblatt-Struktur nicht genügt. Das Spektrum des Unimers zeigt eine Kombination aus ungeordneter Struktur und β -Faltblatt, erkennbar an den zwei Minima, ein Starkes bei 200 nm und ein Schwaches bei 222 nm. Wäre die Struktur vollständig ungeordnet, wäre läge ein schwaches Maximum bei 210 nm. Da dies nicht der Fall ist, lässt sich vermuten, dass eine intermolekulare Wechselwirkung zwar stattfindet, diese aber nicht zur Aggregation der Konjugate führt. Eine andere Erklärung wäre, dass das ungeordnete Makromolekül-Rückgrat, da es das polarisierende Licht nicht absorbiert, in der Auswertung deutlich dominanter erscheint und es demnach als überwiegend ungeordnet im Spektrum abgebildet wird. Ähnliche Daten zeigen die Spektren der Propf-co-PPMKs mit Dileucin **4-6** (Abb. 19b) und die Block-co-PPMKs **8-10** (Abb. 19c). Auch sie besitzen eine ungeordnete Einheit (starkes Minimum bei ca. 200 nm) und eine β -Faltblatt ausbildende Einheit (schwaches Minimum bei ca. 222 nm). Demnach ist eine Peptidkette mit zwei Leucin-Einheiten nicht ausreichend für eine vollständige Ausbildung einer Sekundärstruktur. Auch konnte ein verstärkter Einfluss der in dem Rückgrat befindlichen Amid-Gruppen zur Ausbildung einer Sekundärstruktur nicht bestätigt werden. Zu den eindeutig ungeordneten Strukturen zählt das lineare Konjugat **7** (Abb. 19c, gelbe Linie), bei dem das Leucin verteilt im Rückgrat angeordnet wurde. Dies widerspricht der FTIR-Messung, die die Ausbildung einer Sekundärfaltung vorausgesagt hat. Aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Leucin-Seitenketten, könnten im wässrigen Medium Interaktionen zwischen den Konjugatmolekülen stattfinden. Diese resultieren laut CD aber nicht in der einer Entwicklung einer β -Peptidfaltung.

Wie in Tabelle 2 zusammengefasst, konnten die Konjugate **2** und **3** eine eindeutige β -Faltblatt-Struktur ausbilden. Diese Auswirkung, insbesondere im Vergleich zum Unimer **1**, lässt vermuten, dass zu den intermolekularen Wechselwirkungen, zusätzliche intramolekulare Interaktion innerhalb des Konjugat-Moleküls auftreten und so die Ausbildung der Sekundärstruktur verstärken. Ebenfalls eindeutig ist,

dass PPMK **7** eine ungeordnete Struktur ausbildet und damit ungeeignet zur Herstellung von Aggregaten für die biotechnologische Anwendung ist. undefiniert dagegen erscheinen die CD-Spektren der restlichen Konjugate, da sie eine Kombination aus zwei Struktureinheiten tragen, der ungeordneten und der β -Faltblatt-Struktur. Infolgedessen ist eine Untersuchung, inwiefern die Strukturen stabile Aggregate ausbilden, in weiteren Schritten notwendig.

3.1.2.3 Löslichkeitsstudien mit Guanidinhydrochlorid

Die Stabilität einer Peptid-Aggregation kann untersucht werden, indem diese durch äußeres Einwirken gezielt aufgebrochen werden. Es gibt viele Möglichkeiten das zu erreichen, entweder durch Erhöhung der Temperatur, Veränderung des pH-Wertes oder durch Erhöhung der Ionenstärke.^[228] Das Ziel ist die inter- oder intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Peptid-Ketten zu unterbrechen, worauf das Peptid wieder in seine gelöste Form zurückgeführt wird. Das Peptid-Aggregat gilt als stabil, wenn es bei extremeren Veränderungen seiner Umgebung weiterhin in der naturnahen Form vorliegt.

In dieser Arbeit wurde der Ansatz der Erhöhung der Ionenstärke gewählt. Hierfür wurden Ionen gemäß der *Hofmeister-Reihe* gewählt. Die *Hofmeister-Reihe*^[229-230], die ursprünglich 1888 erwähnt wurde, ordnet den relativen Einfluss von Ionen auf das physikalische Verhalten einer Vielzahl von Prozessen in wässrigem Medium ein, die von der kolloidalen Assemblierung bis zur Proteinfaltung reichen. Dabei hängt die Stabilität des Systems sowohl von direkten Ionen-Makromolekül-Wechselwirkungen als auch von Wechselwirkungen mit Wassermolekülen in der ersten Hydratschale des Makromoleküls ab.^[231] Die *Hofmeister-Reihe* wurde zunächst nur für Anionen beschrieben und im Nachhinein in weiteren Untersuchungen für die Kation erweitert. Die jeweiligen Ionen lassen sich in zwei verschiedene Kategorien klassifizieren, in die kosmotropen und die chaotropen Ionen. Die Kosmotrope sind stark hydratisiert und haben stabilisierende und aussalzende Effekte auf die Proteinstruktur. Auf der anderen Seite sind Chaotrope dafür bekannt, gefaltete Proteine zu destabilisieren und ein Einsalz-Verhalten hervorzurufen, wobei ihre Löslichkeit in der Regel erhöht wird.^[232]

Zur Untersuchung der Stabilität der hier entwickelten PPMK-Aggregate wurde Guanidinhydrochlorid (GdnHCl) verwendet. Das Gdn⁺-Kation ist eines der stärksten Protein-Denaturierungsmittel, das häufig in Studien zur Untersuchung der Proteinstabilität und -faltung verwendet wird. In der *Hofmeister-Reihe* wird es deshalb als ein stark chaotropes Salz klassifiziert. Der Prozess der Denaturierung ist noch nicht vollständig entschlüsselt. Es wird vermutet, dass aufgrund seiner drei Amin-Gruppen, das Gdn⁺-Ion Wechselwirkungen mit den Amid-Gruppen des Peptids eingeht, welche maßgeblich für die Faltung verantwortlich sind. Diese Interaktionen zwischen dem Kation und den Amidgruppen des Peptids führen zur

einer Reduktion der Wechselwirkung zwischen den Peptid-Ketten und letztendlich zur Denaturierung des Peptid-Aggregats.^[233]

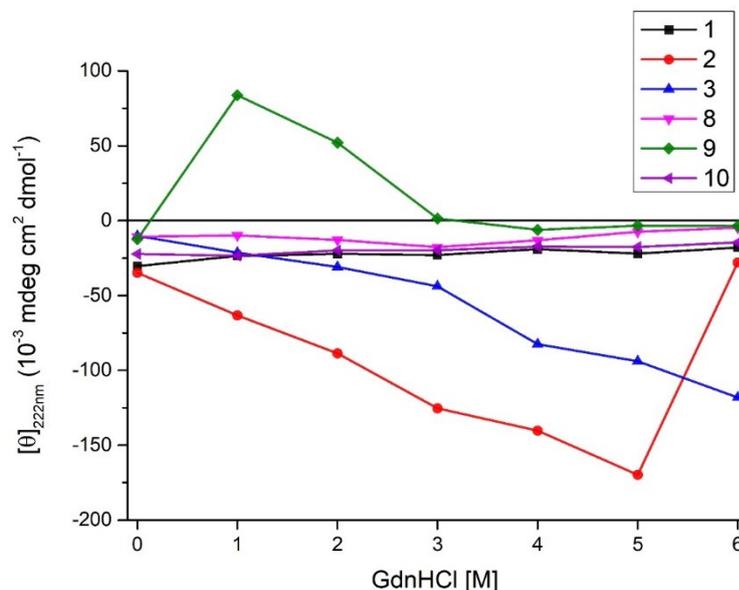


Abbildung 21: Untersuchung der Konjugat-Stabilität durch Degradierung der Konjugat-Aggregate mittels GdnHCl. Dabei wurden die Konjugate **1-3** und **8-10** in Abhängigkeit von der Salzkonzentration (1-6 M) an dem CD-Spektrometer gemessen. Die Datenpunkte bei 222 nm der jeweiligen Spektren wurden verwendet und gegen die Salzkonzentration aufgetragen.

Die Konjugate wurden in einer Mischlösung aus MeCN und MQ-Wasser (5/95, v/v) mit einer Salzkonzentration von jeweils 1, 2, 3, 4, 5 oder 6 M GdnHCl gelöst bzw., da es hier ebenfalls zu Löslichkeitsproblemen kam, suspendiert. Die jeweiligen Proben wurden anschließend ebenfalls am CD-Spektrometer analysiert. Da das Konjugat **7** und die Dileucin-Konjugate **4-6** in der CD keine oder eine sehr schwache β -Faltblatt-Entwicklung zeigten (siehe Kapitel 3.1.2.2), wurden sie in diesem Experiment nicht berücksichtigt. Um das Denaturierungsverhalten der Konjugate im Vergleich zur Salzkonzentration zu untersuchen, wurden die Datenpunkte bei 222 nm der jeweiligen CD-Spektren gegen die Konzentration des Salzes aufgetragen (siehe Abb. 21).

Die Analyse der Degradierungsstudie zeigen zum Teil unerwartete Ergebnisse. Das Spektrum sollte wie folgt aussehen: Da ein Anstieg der GdnHCl-Konzentration eine Zerstörung der Konjugat-Aggregation bewirkt, sollte die Intensität der Datenpunkte bei 222 nm stetig sinken, d.h sich in Richtung null $[\theta]$ bewegen. Konkret für die hier entwickelten Konjugate bedeutet es, dass die β -Faltblatt-Struktur in eine ungeordnete Struktur denaturiert wird. Wie in der Abb. 20 zu sehen, ist sogar ein gegenteiliger Trend zu erkennen. Zunächst zeigten die PPMKs **1**, **8** und **10** bei Erhöhung der Salzkonzentration nahezu keine Veränderung im Aggregationsverhalten. Dies lässt darauf schließen, dass Konjugate, ob nun in Form eines Pfropf- oder eines Block-co-Konjugats mit nur einer Pentaleucin-Einheit, keine starken intermolekularen Wechselwirkungen und somit kaum Sekundärfaltung entwickeln. Wie bereits bei den CD-Analysen ohne GdnHCl erläutert (siehe Kapitel 3.1.2.2) scheint der ungeordnete Anteil dieser

Strukturen zu überwiegen. Sie sind demnach nicht für die Anwendung als Drug-Delivery-Vehikel oder gar für die Entwicklung von Hydrogelen geeignet.

Auf der anderen Seite zeigen die multivalenten Konjugate **2** und **3** den unerwarteten Trend. Entgegen den vorhin beschriebenen Erwartungen gehen die Daten in die entgegengesetzte Richtung. Die Intensität nimmt mit steigender GdnHCl-Konzentration zu. Schließlich erreicht das Dimer **2** bei 6 M GdnHCl einen Wendepunkt, bei der die Peptidfaltung vollständig aufgebrochen wurde. Dies ist am letzten Datenpunkt, der fast auf null $[\theta]$ zurückfällt, erkennbar. Im Falle des Konjugats **3** wurde dieser Punkt gar nicht erreicht. Stattdessen nahm die Peak-Intensität ebenfalls mit Erhöhung der Salzkonzentration bis zu 6 M zu. Interessanterweise zeigte das freie Pentaleucin **9** bei Zugabe von 1 - 3 M GdnHCl einen positiven Cotton-Effekt, welcher auf eine sich bildende Peptidfaltung zurückzuführen ist. Nach 4 M Salz sinkt die Kurve wieder auf den vorherigen Wert von ca. 0 $[\theta]$. In diesem Fall scheint die Zugabe einer geringen Menge GdnHCl die Aggregation fördert.

Eine Erklärung für diese Daten könnte die schwache Löslichkeit der Strukturen sein. Durch den hohen Anteil an hydrophoben Seitenketten der Konjugate **2** und **3**, konnten beide nicht in dem für die CD-Messungen verwendeten Wasser-Acetonitril-Gemisch vollständig gelöst werden. Da davon ausgegangen werden kann, dass nur die in Lösung befindlichen Aggregate von der Messung erfasst werden können, könnte die Erhöhung der Salzkonzentration zu einer schrittweisen Entzerrung der Sekundärstrukturen führen, die überwiegend durch intermolekulare Interaktionen gebildet wurden. Die in Lösung gebrachten Konjugate wären somit durch das Gerät detektierbar. Die beiden multivalenten Konjugate **2** und **3** können darüber hinaus noch intramolekulare Wechselwirkungen eingehen. Im Hinblick auf die erhöhte gelöste Material-Konzentration, könnte die steigende Nachweisbarkeit der intramolekularen β -Faltblatt-Strukturen die Zunahme der Peak-Intensität erklären.

Weitere Indizien finden sich bereits in der Literatur. Einige Studien beschreiben eine Resistenz gegenüber der Denaturierung von Peptiden durch das Gdn^+ -Kation.^[234] Dies wurde insbesondere an hydrophoben Membranproteinen und spezifisch an Poly-L-Leucin oder Poly-L-Phenylalanin beobachtet.^[235-236] Eine mögliche Erklärung wäre die Vernetzung oder Komplexierung der Peptide durch die drei Amin-Funktionalitäten des Kations. Dies würde das naturierte Stadium des Peptids erhalten oder sogar induzieren. Dieser Effekt wurde bei der Verwendung einer niedrigen Gdn^+ -Konzentration beobachtet.^[237]

Diese Erkenntnis könnte die plötzliche Ausbildung einer Peptidfaltung des Pentaleucins **9** bei der Zugabe von 1 M GdnHCl erklären (siehe Abb. 22). Ohne das Salz liegen die Pentaleucin-Ketten frei in der Lösung vor (Abb. 21a). Die geringe Menge an Kation (in der Abb. blau eingekreist) führt zu einer

Vernetzung von zwei oder mehr Peptid-Ketten, die durch die räumliche Annäherung intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können (Abb. 22b). Dies führt zu einer Aggregation des Materials, welche optisch durch eine Trübung der Lösung bestätigt werden kann. Da die CD-Messung einen unnatürlichen Verlauf annimmt (der Peak nimmt positive $[\theta]$ -Werte an und nicht negative), ist die Art der gebildeten Peptidfaltung, also β -Faltblatt- oder α -Helix-Struktur, nicht eindeutig. Bei einer hohen Konzentration an Salz (laut CD ab 4 M GdnHCl) herrscht ein Überschuss an Gdn^+ (Abb. 22c). Die Kationen blockieren alle oder einen überwiegenden Teil der Amid-Gruppen und verhindern auf diese Weise die Ausbildung der intermolekularen Wechselwirkungen. An dieser Stelle werden die Aggregate wieder aufgebrochen.

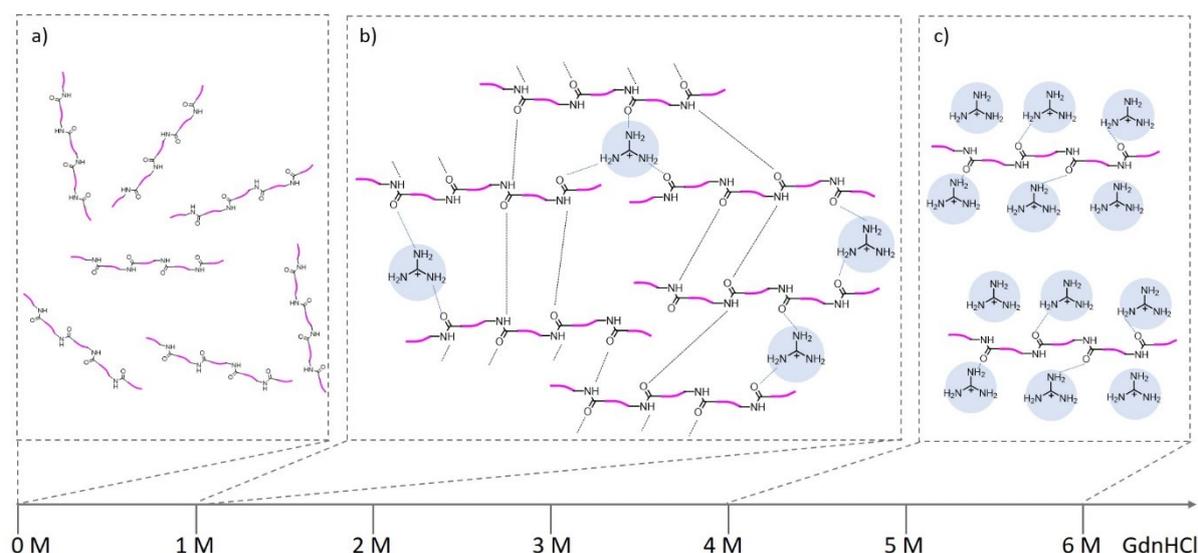


Abbildung 22: Schematische Darstellung der durch GdnHCl induzierten Aggregation des Pentaleucin-Konjugats 9. Vermutlich führt eine geringe Konzentration des Salzes zu einer Vernetzung der Peptid-Ketten (b), die bei der räumlichen Annäherung Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und anschließend aggregieren. Ab einer Konzentration von 4 M Salz wird diese Aggregation wiederum aufgebrochen (c), indem ein Überschuss an Gdn^+ -Kation an die Peptide konjugieren und so intermolekulare Wechselwirkungen verhindern.

Doch die Konjugate 2 und 3 entwickelten bereits ohne Zugabe des Salzes Sekundärstrukturen. Laut der CD-Messung scheint das GdnHCl die Ausbildung weiterer Peptidfaltungen zu unterstützen. Die Hypothese lautet demnach: Je mehr Salz, desto mehr β -Faltblätter werden gebildet. Ob dies der Fall ist, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

3.1.2.4 Verifizierung der Löslichkeitsstudie durch Thioflavin T

Thioflavin T (ThT) ist ein Farbstoff, der häufig zur Bestimmung des Vorkommens von Amyloid-Fibrillen verwendet wird.^[238] Amyloid-Fibrillen sind missgebildete Polypeptide, die durch genetische Fehler verursacht werden. Sie werden mit einer Reihe von Krankheiten in Verbindung gebracht, wie z. B. der Alzheimer-Krankheit und Typ-2-Diabetes.^[239] Vermutlich sind strukturelle Merkmale der Amyloid-Fibrillen wichtig für die Bindung von ThT. So wird angenommen, dass Amyloid-Fibrillen eine

einheitliche Sekundärstruktur mit einer charakteristischen Anordnung von zusammenhängenden β -Faltblatt-Polypeptidketten enthalten.^[238] Die minimale Bindungsstelle des Farbstoffs auf der Fibrillen-Oberfläche soll dabei vier aufeinanderfolgende β -Stränge überspannen.^[240] Wegen seiner Affinität zu β -Faltblättern, unabhängig davon ob sie bei Amyloid-Strukturen oder bei anderen Peptiden auftreten, wird der Farbstoff bevorzugt zu dessen Bestimmung eingesetzt. Die Detektion basiert auf den Fluoreszenzeigenschaften von ThT. Freies ThT fluoresziert schwach mit Anregungs- und Emissionsmaxima bei 350 bzw. 440 nm. Bei Interaktion mit Amyloid-Fibrillen wird eine deutlich verstärkte ThT-Fluoreszenz mit Anregungs- und Emissionsmaxima bei etwa 450 bzw. 482 nm beobachtet.^[241]

Wegen dem unerwarteten Verlauf der CD-Messungen und die damit aufkommenden Fragen zum Auftreten von β -Faltblatt-Strukturen nach GdnHCl-Zugabe, wurden ThT-Bindungsstudien an den Leucin-PPMKs **2**, **3** und **9** durchgeführt. Dafür wurden die für die CD-Spektroskopie verwendeten Konjugat-GdnHCl-Lösungen in 96-Well-Polystyrol-Mikrotiterplatten pipettiert. Eine Lösung aus ThT in MQ-Wasser wurde zu den Konjugat-Salz-Mischungen zugegeben, wodurch sich eine Farbstoff-Endkonzentration von 10 μ M ergab. Nach 24 h Schüttelzeit wurden die Mischungen auf einem Fluoreszenz-Mikroplatten-Reader analysiert. Die Fluoreszenzintensität wurde gegen die GdnHCl-Konzentration aufgetragen (siehe Abb. 23).

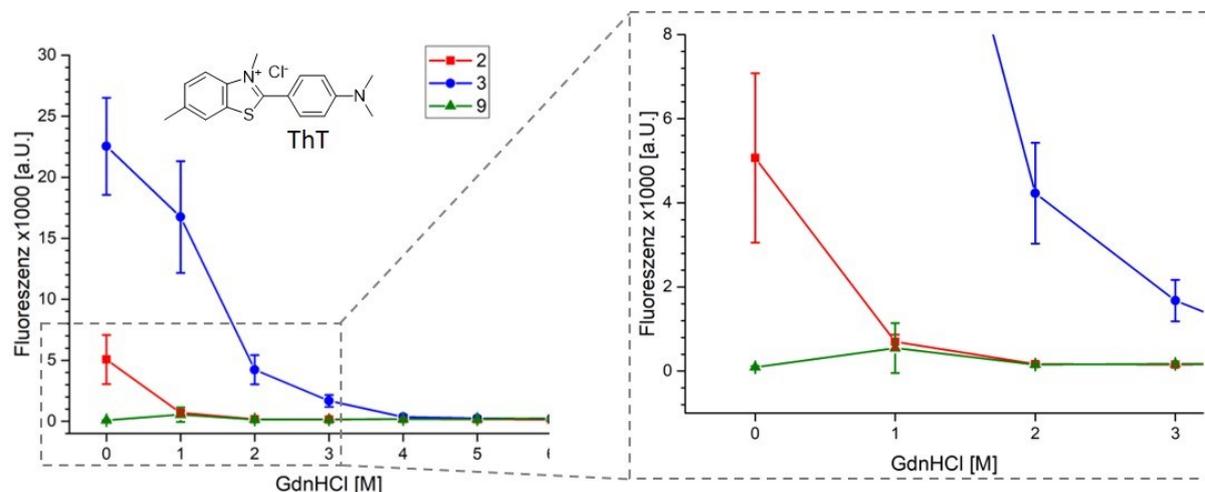


Abbildung 23: ThT-Bindungsstudien zur Bestimmung der β -Faltblatt-Ausbildung während der Degradierung durch GdnHCl. Untersucht werden die multivalenten Konjugate **2**, **3** und das freie Pentaleucin **9**. Zur besseren Übersicht über die Ergebnisse des Dimer- und des Pentaleucin-Konjugats, wurde der Ausschnitt zwischen 0 und 3 M GdnHCl zusätzlich vergrößert dargestellt. (Messung in Triplikaten, Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.)

Wie in der Abb. 22 zu erkennen ist, zeigen die ThT-Bindungsstudien von Konjugat **2** und **3** nach Zugabe von GdnHCl eine Reduktion an β -Faltblatt-Ausbildung. Dies ist erkennbar an der fallenden Fluoreszenzintensität mit Erhöhung der Salzkonzentration. Aufgrund der zusätzlichen Peptid-Einheit im Trimer-PPMK, ist die Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Dimer etwa fünfmal höher. Das

Konjugat ist demnach in der Lage eine größere Anzahl an sekundären Strukturen auszubilden, die zum vollständigen Aufbrechen wiederum mehr Salz benötigen. Laut Fluoreszenzmessung wurde Sekundärfaltung des Dimers **2** nach der Zugabe von 2 M Gdn^+ und die des Trimers **3** nach Zugabe von 4 M Salz vollständig aufgebrochen. Erkennbar ist dies an der Fluoreszenzintensität, die einen Wert von ca. null einnimmt. Das Pentaleucin zeigt nach Zugabe von 1 M Salz eine Erhöhung der Intensität, welche ab 2 M wieder auf den ursprünglichen Wert herabsinkt. Letzteres stimmt mit den Ergebnissen der Degradierungs-CD-Messung überein. Damit konnte die oben beschriebene Hypothese (siehe Kapitel 3.1.2.3) bestätigt werden. Demnach bildet das freie Pentaleucin nach Zugabe einer geringen Konzentration Gdn^+ Faltblatt-ähnliche Strukturen aus. Diese sind auf die komplexierende Wirkung des Kations zurückzuführen. Bei Überschreitung einer kritischen Salzkonzentration werden die Bindungen zwischen den Peptidketten wieder gebrochen und das Strukturnetzwerk löst sich auf.

Bei den beiden multivalenten Konjugaten wird die chaotrope Wirkung des Guanidin Salzes durch die Bindungsstudie bestätigt. Diese Ergebnisse widersprechen denen der CD-Messungen. Während die CD-Spektroskopie mit Zunahme der Salzkonzentration eine Zunahme der Sekundärfaltung vorausgesagt hat, zeigen die Bindungsstudien eine Abnahme. Eine Vermutung wird in Abb. 24 anhand des Dimers graphisch dargestellt.

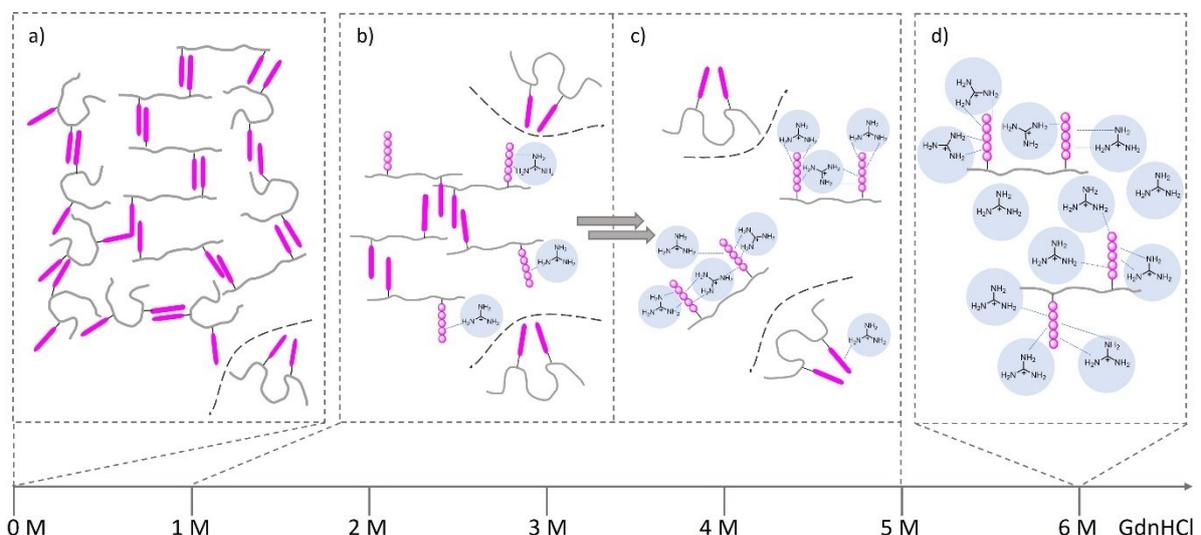


Abbildung 24: Schematische Darstellung der durch GdnHCl aufgebrochenen Aggregation des Dimer-Konjugats **2**. Ohne Zugabe des Salzes befindet sich nahezu das gesamte Material in einem kollabierten aggregierten Zustand (Ausbildung von inter- und intramolekularen Wechselwirkungen) (a). Nach Salz-Zugabe (1 M) wird die Aggregation nach und nach aufgebrochen, indem einzelne Konjugat-Moleküle abgespalten werden. Diese sind in der Lage intramolekulare Wechselwirkungen auszubilden (b). Bei Erhöhung der Gdn^+ -Konzentration befinden sich die Konjugate ausschließlich in Lösung, wobei ein Teil weiterhin β -Faltblatt-Strukturen ausbilden können und der andere Teil durch das Kation komplexiert keine Sekundärstruktur mehr aufweist (c). Letzteres Stadium wird ab 6 M Salz erreicht. Der Überschuss an Kation führt zu einer vollständigen Spaltung der inter- und intramolekularen Aggregate (d).

Basierend auf den ThT-Ergebnissen, wird eine schrittweise Abnahme der gebildeten Sekundärstrukturen mit Zugabe des Salzes angenommen. Ohne das GdnHCl findet die Vernetzung über inter- und intramolekulare Interaktionen statt (Abb. 24a). Aufgrund der starken hydrophoben Wechselwirkungen befindet sich ein überwiegender Teil des Materials in einem kollabierten Zustand, wobei nur eine geringe Konzentration in der Lösung vorliegt. Dieses gelöste Material kann von dem CD-Spektrometer detektiert werden. Bei Zugabe einer geringen Menge Gdn⁺ (1 M, Abb. 24b), werden zunächst die intermolekularen Wechselwirkungen gebrochen, wobei einige Konjugate nun ungebunden sind und intramolekulare Interaktionen ausbilden können. Da die einzelnen Konjugat-Moleküle nun frei in Lösung vorliegen, können sie von dem CD-Spektrometer detektiert werden. Die Peak-Intensität steigt und zeigt eine vermeintliche Zunahme an β -Faltblatt-Strukturen an. Mit stetiger Zugabe des Salzes (2 – 5 M, Abb. 24c) wird die Vernetzung immer weiter aufgelöst, wobei einzelne Moleküle in den gelösten Zustand übergehen. Diese werden wiederum vom CD-Spektrometer erfasst und die Peak-Intensität steigt weiter an. Da die Ausbildung der β -Faltblatt-Strukturen laut ThT-Bindungsstudie mit der Erhöhung der Salzkonzentration weiter zerfällt, werden einige Konjugat-Moleküle vermutlich durch das Gdn⁺-Kation komplexiert, wobei diese keine Sekundärstruktur mehr ausbilden können. Dieses Stadium wird laut CD final bei 6 M Salz erreicht (Abb. 24d). Es herrscht ein Überschuss an Kationen, welche die Konjugate an der Ausbildung der Peptidfaltung hindern. Die Sekundärstrukturen werden vollständig aufgebrochen.

Der Grund, weswegen der vollständige Bruch der Aggregate laut Bindungsstudie bereits bei niedrigeren Konzentrationen erfolgt, als bei der CD-Messung, könnte auf die Bindungsaffinität des Thioflavin T-Farbstoffs zurückzuführen sein. Laut Studien geht der Farbstoff eine Bindung mit minimal vier β -Strängen ein.^[240] Erst in diesem Zustand verändert sich das Fluoreszenzspektrum des Farbstoffs. Da das Dimer, aber nur zwei und das Trimer drei Peptid-Einheiten trägt, kann das ThT keine vollständige Bindung mit den Konjugaten, die frei in Lösung vorliegenden, eingehen. In diesem Fall wird die Ausbildung der Sekundärfaltung fälschlicherweise nicht detektiert. Kombiniert man die Ergebnisse aus beiden Studien, den Gdn⁺- und den ThT-Studien, kann davon ausgegangen werden, dass das Dimer bei 2 - 5 M GdnHCl ausschließlich intramolekulare Wechselwirkungen ausbildet und das Trimer ab 4 M.

3.1.2.5 Bestimmung der kritischen Aggregationskonzentration durch Thioflavin T

Ein weiterer Parameter, der für die Selbstassemblierung von Biomolekülen wichtig ist, ist die Konzentration. Analog zu den Tensiden, bei der die kritische Mizellenkonzentration bestimmt wird, findet die Selbstassemblierung von Peptid-Konjugaten abhängig von der Konzentration statt. Dabei

liegen die Konjugate unterhalb der kritischen Aggregationskonzentration (KAK) in der monomeren Form vor. Während und oberhalb der KAK beginnen die Konjugate sich zu Aggregaten anzuordnen. Der KAK-Wert ist ein wichtiger Wert zur Abschätzung der bei der Aggregatsbildung beteiligten Bindungsenergie und Bindungskinetik.^[242]

Die Bestimmung der KAK der Leucin-PPMKs fand ebenfalls unter der Verwendung des Farbstoffs ThT statt. Es ist eine gängige Methode, bei der das ThT unterschiedlichen Konzentrationen der β -Faltblatt-induzierenden Peptide beigemischt wird.^[243] Die Auswertung erfolgt durch Bestimmung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Konjugat-Konzentration. Hierfür wurden Stammlösungen der Konjugate hergestellt und auf Konzentrationen von 0,5, 0,25, 0,125, 0,063, 0,0313, 0,0156, 0,0078 und 0,0039 mg ml⁻¹ verdünnt. Die Lösungen wurden in 95-Well-Mikroplatten pipettiert, gefolgt von der ThT-Lösung, so dass die endgültige ThT-Konzentration in jeder Probe 10 μ M betrug. Die Platte wurde über Nacht geschüttelt und anschließend am Fluoreszenzspektrometer analysiert.

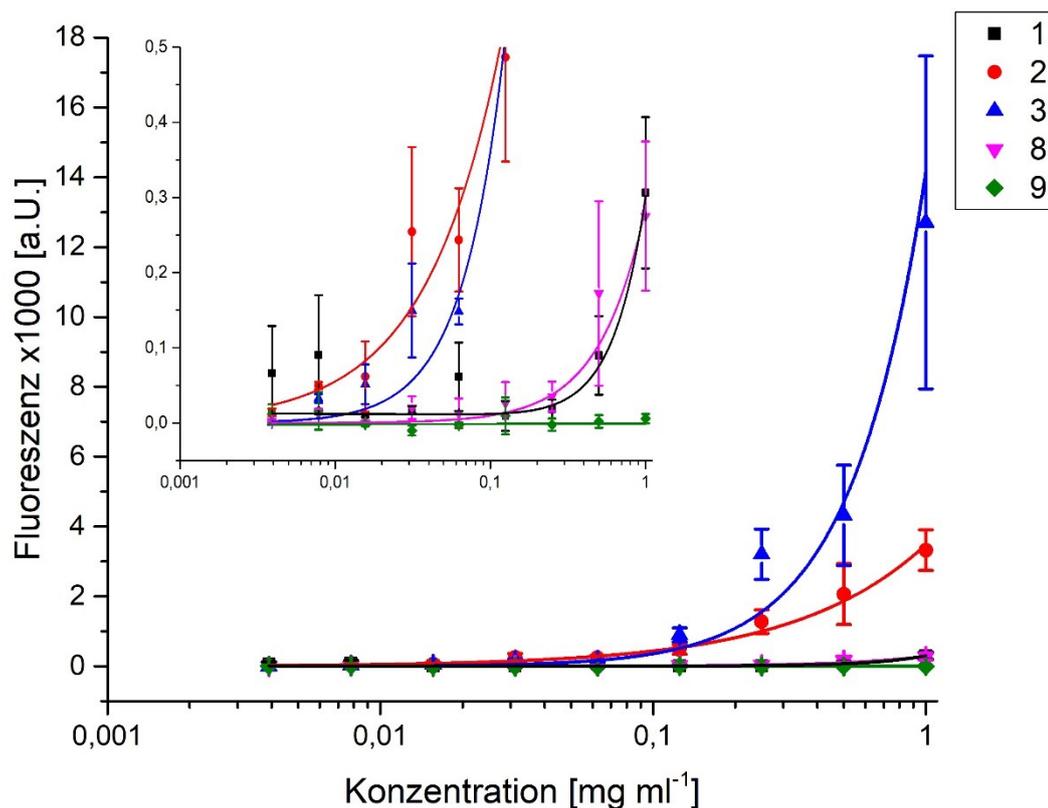


Abbildung 25: Bestimmung der Kritischen Aggregationskonzentration der verzweigten PPMKs 1, 2, und 3 und den linearen PPMKs 8 und 9 mittels Bindungsstudien mit Thioflavin T. Der Ausschnitt zwischen der Fluoreszenzintensität 0 und 0,5 wurde zusätzlich vergrößert dargestellt. (Messung in Triplikaten, Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.)

Die Fluoreszenzmessungen zeigen deutlich die um ein Vielfaches erhöhte Aggregation der Konjugate mit mehreren Pentaleucin-Ketten im Vergleich zu den Konjugaten mit einer Pentaleucin-Einheit (siehe

Abb. 25). Das verzweigte Konjugat **1** und die lineare Struktur **8** mit jeweils einer Peptideinheit weisen einen ähnlichen Kurvenverlauf auf. Beide Strukturen beginnen etwa bei etwa 0.2 mg ml^{-1} Sekundärstrukturen auszubilden. Da wie bereits beschrieben das ThT vier Faltblatt-Stränge zur Bindung benötigt^[240], liegt der wirkliche KAK-Wert vermutlich bei etwas niedrigeren Konzentrationen. Dennoch zeigt sich ein deutlicher Trend, dass die Erhöhung der Peptid-Anzahl Auswirkungen auf das Aggregationsverhalten der Konjugate hat. Die beiden multivalenten Konjugate **2** und **3** bilden etwa bereits bei der niedrigsten gemessenen Konzentration (bei ca. $40 \mu\text{g ml}^{-1}$) höher geordnete Strukturen aus. Eine KAK kann bei den Strukturen demnach nicht bestimmt werden. Außerdem zeigt der Vergleich zwischen den verzweigten PPMKs einen deutlichen Anstieg an Aggregation mit der Multivalenz. Bei einer Konzentration von 1 mg ml^{-1} steigt die Fluoreszenzintensität von Unimer zum Dimer auf das zehnfache und vom Unimer zum Trimer sogar um das ca. 45-fache. Ein möglicher Grund dafür ist, dass die multivalenten Konjugate inter- und intramolekulare Wechselwirkungen ausbilden können, die zu wenigen großen Aggregaten anstatt zu vielen kleinen Aggregaten führen. Überraschenderweise zeigt die freie Leucinkette **9** mit Erhöhung der Konzentration keine Veränderung im Aggregationsverhalten. Die Fluoreszenzintensität zeigt bei allen Messpunkten keine Veränderung.

Zusammenfassend konnte ein Zusammenhang zwischen dem Aggregationsverhalten und der Struktur der Konjugate festgestellt werden. Die multivalenten Konjugate, das Dimer **2** und das Trimer **3**, bilden bereits bei geringen Konzentrationen β -Faltblatt-Strukturen aus. Diese lassen sich zum einen durch die hohe Hydrophobie von Leucin erklären, die gelöst in Wasser die Annäherung der Peptidketten und damit die Ausbildung der Wasserstoffbrücken begünstigt. Andererseits werden diese Effekte durch eine Erhöhung der Valenz verstärkt. Konkret tragen neben den intermolekularen Wechselwirkungen auch die intramolekulare eine Rolle zur Bildung von Aggregaten bei. So zeigten die GdnHCl-Studien, dass die Zugabe von Gdn^+ zunächst die intermolekularen Interaktionen aufbricht, wobei einzelne Konjugatmoleküle freigesetzt wurden. Diese waren über intramolekulare Wechselwirkungen trotzdem in der Lage Sekundärstrukturen auszubilden. Im Vergleich dazu sind monovalente Konjugate mit einer Pentaleucin-Einheit nur fähig intermolekular induzierte Sekundärstrukturen auszubilden. Das verzweigte Konjugat **1** und das Block-co-Konjugat **8** zeigen zwar eine konzentrationsabhängige Aggregation ab 0.2 mg ml^{-1} , dennoch deuten die Löslichkeitsstudien mit GdnHCl auf schwache Wechselwirkungen zwischen den Sekundärstrukturen hin. Bestätigt werden diese Ergebnisse durch die CD-Spektroskopie. Diese Konjugate, sowie das freie Pentaleucin **9** und das PEG-Pentaleucin-Konjugat **10** zeigen neben einer schwachen β -Faltblatt-Ausbildung eine deutliche ungeordnete Komponente. Interessanterweise zeigte das Leu_5 -Konjugat die Ausbildung einer Sekundärfaltung nach Zugabe von 1 M Gdn^+ -Salz, welches auf die Fähigkeit des Kations Komplexe zu bilden, zurückzuführen ist. Ebenso wie die linearen Konjugate, zeigen die Ppropf-co-PPMKs mit Dileucin als Peptideinheit anhand der CD-

Spektren, dass die Kettenlänge mit zwei Leucin-Einheiten zum Aufbau einer Sekundärstruktur möglicherweise ausreicht. Dennoch besitzen die Konjugate ebenfalls über einen überwiegend ungeordneten Strukturanteil, der eine Aggregatsbildung verhindern könnte. Auch konnte die Hypothese des Sekundärstruktur-induzierenden Einflusses der Rückgrat-Amide auf die Gesamtstruktur nicht bestätigt werden. Des Weiteren zeigt die CD-Messung, dass eine statistische Verteilung der Leucin-Bausteine, wie sie bei Konjugat **7** vorzufinden sind, nicht zu der Ausbildung einer Sekundärstruktur führt. Aufgrund dieser Erkenntnisse scheinen nur die Konjugate **2** und **3** für weitere Anwendungen als Nanopartikel oder Makrogele geeignet zu sein.

3.1.3 Gezielte Formulierung der PPMK-Aggregate für Biotechnologische Anwendungen

Das allumfassende Ziel der Arbeit ist die Formulierung wohldefinierter Aggregate, welche durch die Kontrolle über das Herstellungsverfahren erzeugt werden. Konkret bedeutet es, Parameter gezielt zu verändern, um große Makroaggregate zur Anwendung im Bereich des Tissue Engineering oder kleine Nanoaggregate zu generieren, die als Drug-Delivery-Vehikel eingesetzt werden könnten. Hierzu soll der Vernetzungsgrad, also das Verhältnis zwischen inter- und intramolekularen Interaktionen kontrolliert werden. Zur Herstellung von den hochgradig vernetzten Makrogelen werden demnach überwiegend intermolekulare Wechselwirkungen gefördert (siehe Abb. 26a). Andersherum werden zur Synthese von Nanogelen die intermolekularen Wechselwirkungen zu Gunsten von intramolekularen aufgebrochen, sodass Nanopartikel durch die Assemblierung von einigen wenigen Konjugaten stattfindet (Ausbildung von inter- und intramolekularen Wechselwirkungen) (siehe Abb. 26b). Finden nur noch intermolekulare Wechselwirkungen statt (siehe Abb. 26c), kann das Einzelmolekül-Aggregat ebenfalls zum Wirkstofftransport eingesetzt werden.

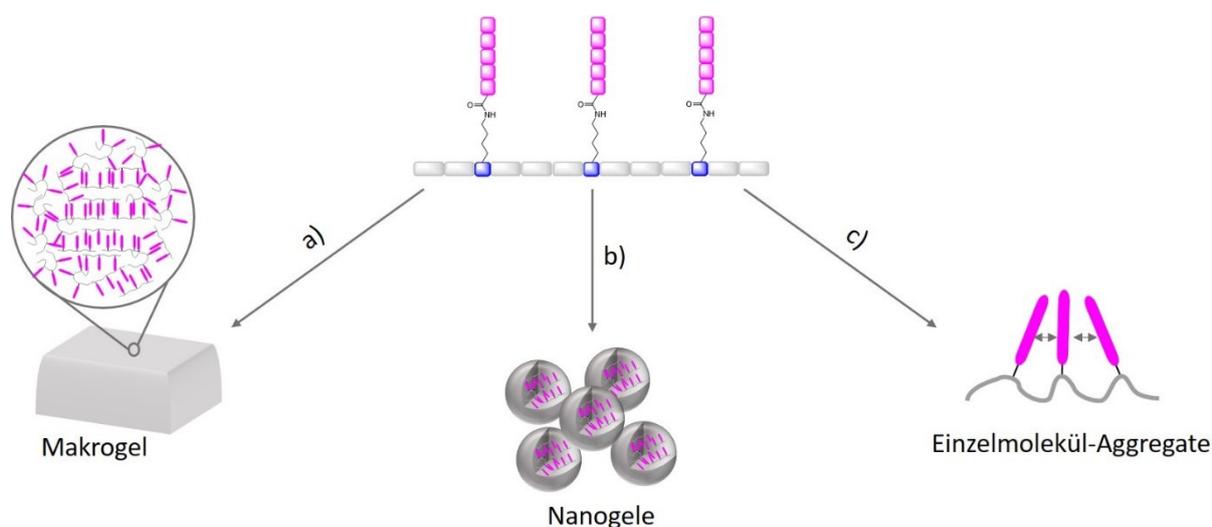


Abbildung 26: Darstellung der drei möglichen Aggregatsbildungen am Beispiel der Selbstassemblierung des Trimers **5**. Dabei kann nach kontrolliertem Herstellungsverfahren entweder ein Makrogel erzeugt werden, bei dem überwiegend

intermolekulare Wechselwirkungen gebildet werden (a), oder Nanogele, die durch die Bindung weniger Konjugate generiert werden können (b). Hierbei finden vermutlich zu gleichen Teilen inter- und intramolekulare Wechselwirkungen statt. Ebenfalls möglich ist die Generierung von Einzelmolekül-Aggregaten, welche nur über intramolekulare Bindungen assemblieren (c).

Da die beiden multivalenten Konjugate **2** und **3** in den Studien zum Aggregationsverhalten eine eindeutige Ausbildung von β -Faltblatt-Strukturen gezeigt haben, werden sie zur Herstellung der Aggregate verwendet. Im Folgenden wird die Synthese der Makrogele und der Nanogele diskutiert. Der Nachweis über die ausschließliche Bildung von Einzelmolekül-Aggregaten hat sich dagegen als schwierig erwiesen. Grund dafür ist die niedrige kritische Aggregationskonzentration (KAK) dieser Konjugate. Wie die Studien zur KAK mit ThT gezeigt haben, bilden die Konjugate **2** und **3** bereits bei der niedrigsten gemessenen Konzentration von $0.0039 \text{ mg ml}^{-1}$, demnach bei einer Molarität von ca. 1.2 nM für das Dimer und ca. 0.8 nM für das Trimer, Aggregate. Die Analysemethoden, mit denen das Auftreten von Einzelmolekül-Aggregaten bestimmt werden kann (z.B. NMR), sind nicht sensitiv genug für diese geringen Materialmengen und wurden demnach verworfen. Auch die Verwendung von ThT ist hierfür nicht sinnvoll, da die für die Bindung benötigten vier Faltblatt-Stränge bei einem Konjugat-Molekül nicht gegeben ist. Eine Möglichkeit wäre auf andere β -Faltblatt-bindenden Farbstoffsysteme zurückzugreifen, die an höchstens zwei Faltblatt-Strängen binden.

3.1.3.1 Formulierung und Analyse von PPMK-Organogelen

Peptid-basierte Gele sind wegen ihrer Eigenschaft zur Selbstassemblierung eine der wichtigsten Produkte zur Anwendung im Wirkstofftransport^[115] oder im Tissue Engineering.^[130] Aufgrund ihrer 3D-vernetzten Matrix sind sie in der Lage Wirkstoffmoleküle einzuschließen und diese über einen bestimmten Zeitraum sukzessiv abzugeben.^[116] Des Weiteren dienen sie zur Herstellung von Gewebeimitaten als Gerüst für die Kultivierung von körpereigenen Zellen.^[131] Unter anderem entscheidend für die erfolgreiche Abgabe des Wirkstoffs oder der Zellkultivierung ist der Grad der Vernetzung. Sie gibt an wie porös oder steif/stark das Gelmaterial ist. Der Vernetzungsgrad kann dabei durch Veränderung der Peptidkonzentration, der Ionenstärke oder des pH-Werts angepasst werden.^[244] Eine andere Methode ist die Kombination von Peptiden mit unterschiedlichen Kettenlängen. Hier haben Studien von *Boothroyd et al.*^[245] und *Scelsi et al.*^[246] gezeigt, dass die Stärke eines aus kurzen Peptiden generiertes Gel, durch Zugabe des Peptids mit gleicher Sequenz, aber der doppelten Länge, erhöht wird. Demnach hat das längere Peptid einen Einfluss auf das gesamte Gelnetzwerk, indem es den Vernetzungsdichte steigert. Des Weiteren werden Peptide als Vernetzer in Polymerhydrogelen eingesetzt. Verwendet werden kurze Peptid-Sequenzen mit hydrophoben Aminosäuren, die s.g. niedermolekularen Gelierer (engl. *low-molecular-weight gelators*, LMWG)^[134-136], die mittels der hydrophoben Wechselwirkungen eine gerichtete Anordnung der Peptidketten gewährleisten.^[140]

Aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen der Pentaleucin-Ketten und die daraus resultierende Aggregation zu β -Faltblatt-Strukturen, haben die in dieser Arbeit synthetisierten Konjugate das Potenzial als LMWGs eingesetzt zu werden. Die Bestimmung der Gel-Stärke erfolgte dabei typischerweise mit Hilfe des Rheometers. Die wichtigste rheologische Methode zur Charakterisierung von Hydrogelen ist die oszillatorische Scherung bei kleiner Amplitude. Hierfür wird eine kleine Probenmenge (<1g) zwischen parallelen Scheiben oder einem Kegel und einer Scheibe platziert, welche durch eine kleinamplitudige Drehschwingung einen Scherfluss in der Probe erzeugt. Im linear-viskoelastischen Zustand kann in Abhängigkeit zu der Frequenz die dynamischen Module G' (Speichermodul) und G'' (Verlustmodul) genutzt werden, um wichtige Aspekte der Gelstruktur (z.B. den Vernetzungsgrad) und des mechanischen Verhaltens (z.B. den Glasübergang) abzuleiten.^[247]

Die Bestimmung der Vernetzungsdichte der Leucin-basierten PPMK-Gele erfolgte über eine Frequenz-Sweep-Messung, bei der das Speichermodul G' in Abhängigkeit von der Frequenz bei 0.1 bis 100 Hz gemessen wurde (Abb. 26). Vom medizinischen Standpunkt aus ist die Verwendung von Hydrogelen, also in Wasser gequollene Gele, aufgrund der physiologischen Bedingungen ideal. Da die Leucin-basierten PPMKs eine schlechte Löslichkeit in Wasser besitzen, wurden die Messungen an Gelen durchgeführt, die in DMSO als Lösungsmittel erzeugt wurden. Die Organogele wurden hergestellt, indem die Konjugate in DMSO gelöst wurden, bis eine finale Konzentration von 25 mM erhalten wurde. Eine vollständige Löslichkeit wurde durch Erwärmen auf ca. 80° C erreicht. Die heißen Konjugat-Lösungen wurden anschließend in einen Spritzenbehälter mit abgeschnittener Spitze überführt und für 24 h senkrecht zur Gelierung fixiert. Die zylinderförmigen Gele wurden dann mit dem Kolben aus der Spritze herausgedrückt und auf die Rheometer-Messplatte aufgetragen (siehe schematische Darstellung der Vorgehensweise in Abb. 27a und die damit erzeugten Gele in Abb. 27c). Da sich bei diesem Vorgang Teile des Gels durch Vibration oder Druck verformen, wurde das Gel noch eine weitere Stunde auf der Platte belassen, bevor die Messung gestartet wurde. Wie in Abb. 26d zu sehen, besitzen die PPMK **2** und **3** eine hohe Gelstärke mit Speichermodulen G' von 10 bzw. 20 kPa. Dass das Trimer im Vergleich zum Dimer eine höhere Gelstärke aufweist, entspricht den Erwartungen, da die zusätzliche Pentaleucin-Einheit zu einer dichteren Vernetzung des Gels führt. Allerdings ist interessant, dass die Anbringung der dritten Peptidkette insgesamt zu einer Verdopplung der Gelstärke führt. Mit diesen Werten gehören die beiden PPMK-Gele zu den höherviskosen Peptid-Gelen. Die mechanischen Eigenschaften von Peptidhydrogelen liegen typischerweise im Bereich von $G' = 7 \text{ Pa} - 4 \text{ kPa}$.^[248] Zum Vergleich, Studien am Dipeptid Fmoc-LL zeigten sogar nur Speichermodule von $G' = 1 \text{ Pa}$.^[249] Die Messungen wurden bei einer Peptidkonzentration von 10 mM durchgeführt, dennoch zeigt dies deutlich, dass die Länge der Peptidkette und die Valenz einen deutlichen Einfluss auf die Gelstärke besitzt. Weitere Experimente mit reinen Leucinketten wurden aufgrund der Löslichkeitsdefizite nicht

hergestellt. Stattdessen wurden Polypeptide durch die Kombination von Leucin mit einer polaren Aminosäure, z.B. Lysin, synthetisiert. Durch den überwiegend ungeordneten Teil der Polylysin-Kette, konnten hier ebenfalls nur Viskositäten von $G' = 100$ Pa (bei 8 mM Konzentration) erreicht werden.^[250] Anders sieht es bei dem Dipeptid Fmoc-FF aus, welches ausgelöst durch π - π -Wechselwirkungen ebenfalls β -Faltblatt-Strukturen ausbildet. Bei einer Konzentration von 20 mM erzeugt dieses Material Gele mit einer mechanischen Stärke von $G' = 10$ kPa^[104] und ist damit mit den hier erzeugten Konjugaten vergleichbar.

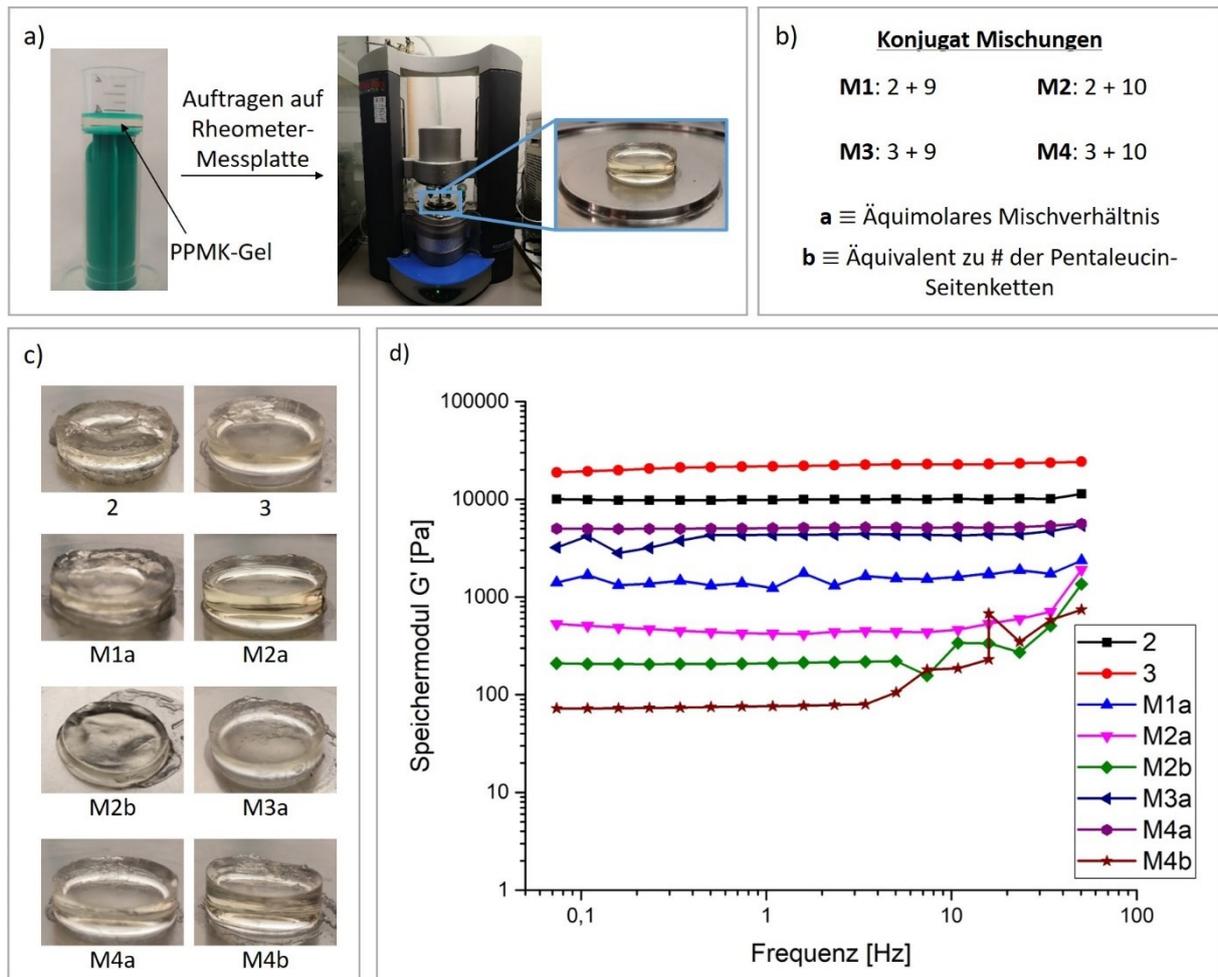


Abbildung 27: Bestimmung der Gelstärken der PPMK-Gele. Die Speichermodule G' wurden am Rheometer in Abhängigkeit von der Frequenz bei 0.1 bis 100 Hz erzeugt. Dabei wurden die Konjugat-Lösungen in vorgefertigten Spritzenbehältern zu zylinderförmigen Gelen geliert und auf die Rheometer-Messplatte durch Herausdrücken aufgebracht (a). Es wurden Gele von den reinen Konjugaten **2** und **3**, sowie den Mischungen aus den beiden Konjugaten mit den linearen Pentaleucin-Konjugaten **9** und **10** im definierten Mischverhältnis hergestellt (b). Bilder, der erzeugten PPMK-(Misch-)Gele (c). Kumulierter Graph aller gemessenen Gele (d).

Angelehnt an den Studien bei dem die mechanischen Eigenschaften des Peptidgels bei Verwendung eines Multikomponentensystems eingestellt werden^[245-246], wurden in diesen Studien zusätzlich Mischgele aus zwei verschiedenen PPMK-Konjugaten untersucht. Hierfür wurden die multivalenten Konjugate **2** und **3** mit den linearen Pentaleucin-Konjugaten **9** und **10** in definierten Verhältnissen

vermischt und wie oben beschrieben in DMSO geliert. Wie bei den Monokomponenten-Gelen, betrug die finale Konzentration der Multikonjugat-Gelen 25 μM . Die Mischungen wurden so hergestellt, dass immer die gleiche Anzahl an Pentaleucin-Ketten in der Lösung vorhanden war, damit sie mit den Ergebnissen der reinen Konjugate verglichen werden konnten (siehe Tabelle in Abb. 27b). Es wurden zwei verschiedene Mischungsverhältnisse untersucht. Zum einen das äquimolare Verhältnis 1:1, bei dem 50 % Konjugat und 50 % Pentaleucin-Kette in der Lösung vorhanden sind (im Folgenden als Konjugatmischung **MXa** deklariert). Zum anderen ein an der Anzahl der Leucinketten angepasstes Verhältnis, das bei Verwendung des Dimers ein Verhältnis von 1:2 und bei Verwendung des Trimers 1:3 beträgt (im Folgenden als Konjugatgemisch **MXb** deklariert). Die Bilder der Mischgele wurden ebenfalls in Abb. 27c dargestellt.

Im Zuge der Vergleichbarkeit wurden von den reinen Unimer-Konjugaten **1**, **9** und **10** ebenfalls Gel-Ansatzlösungen hergestellt. Diese blieben aber auch nach einer Gelierzeit von 72 h noch flüssig. Die Erklärung für dafür liegt auf der Hand: Da pro Molekül nur eine Pentaleucin-Kette vorhanden ist, kann es keine Vernetzung und damit kein stabiles dreidimensionales Gelgerüst aufgebaut werden. Zur erfolgreichen Gelierung müsste möglicherweise eine viel höhere Peptidkonzentration eingesetzt werden, wie sie bei der Studie von *Scelsi et al.*^[246] Verwendung findet. Hier konnten Gele mit dem Peptid SFFSF-NH₂ Gele bei Konzentrationen zwischen 113 – 322 mM (0.7 – 2 Gewichts-%, w/v) erhalten werden. Interessant ist, dass die Mischkonjugate **M1b** und **M3b** ebenfalls nicht geliert sind. Die äquivalente Zugabe des Pentaleucins **9** zu der Anzahl der Peptid-Einheiten des jeweiligen Konjugats führt demnach zu einem vollständigen Bruch des Konjugat-Netzwerks. Erstaunlicherweise tritt diese Folge bei der Zugabe des Polymer-Peptid-Konjugats **10** nicht auf. Die Tatsache, dass eine Gelierung bei gleicher Menge PEG-Leu₅ möglich ist, ist auf das erhöhte Quellverhalten der PEG-Kette zurückzuführen, die in solchen Fällen oft als Additiv zur Unterstützung der Gelierung zugesetzt wird.^[251]

Die stärksten Mischkonjugat-Gele wurden aus dem Trimer und dem jeweiligen Oligoleucin-Konjugat im Verhältnis 1:1 erhalten (**M4a** und **M3a**). Diese haben ähnliche Speichermodul von $G' = 4 - 5 \text{ kPa}$ und sind damit 4-5-mal schwächer als die Gele aus dem reinen Trimer-Konjugat. Danach folgen die Dimere im Verhältnis 1:1, wobei **M1a** eine Stärke von 1500 Pa (ca. 7-mal schwächer als das reine Dimer-Gel) und **M2a** eine Stärke von 500 Pa (20-mal schwächeres Gel im Vergleich zum reinen Dimer) aufweist. Die schwächsten messbaren Gele sind die Konjugate in Kombination mit dem PEG-Leu₅ in einem Verhältnis von 1:2 bei **M2b** bzw. 1:3 bei **M4b** mit 200 Pa und 70 Pa.

Zusammengefasst bilden die Trimer-Mischkonjugat-Gele stärkere Gelstrukturen aus als die Mischkonjugat-Gele mit dem Dimer. Auch hier lässt sich der höhere Vernetzungsgrad durch die

zusätzliche Leucin-Kette erklären. Insgesamt ist ein deutlicher Trend bei den Mischungen sichtbar (siehe Abb. 28 am Beispiel des Trimers): Bei geringer Zugabe der kurzen Peptidketten wird das Netzwerk teilweise aufgebrochen, was sogleich die Viskosität des Gels erhöht. Ist die Anzahl der Peptidketten äquivalent zu der Anzahl der konjugierten Leucin-Ketten so ist die Gelstruktur entweder sehr schwach vernetzt (wie bei **M4b**, wobei hier nicht untersucht wurde, ob eine Gelierung durch Peptid-Wechselwirkung zustande kommt oder durch die Gel-induzierten Eigenschaften des PEG-Polymers) oder es kommt zu einem vollständigen Bruch, sodass keine Gelierung erfolgen kann (siehe **M1b** und **M3b**). Natürlich ist der Verlust der Gelstärke auch darauf zurückzuführen, dass multivalente Moleküle durch Monovalente ersetzt werden. Folglich wird die Menge der Vernetzer-Moleküle in der Mischung und somit auch die Vernetzungsdichte reduziert. Bei den Mischungen von 1:2 (beim Dimer) und 1:3 (beim Trimer) sind folglich zu wenig multivalente Konjugate für eine stabile Vernetzung zur Verfügung. Eine weitere Hypothese ist, dass die Pentaleucin-Ketten die konjugierten Peptidketten blockieren und diese bei der Wechselwirkung zu anderen Peptid-Einheiten hindern.

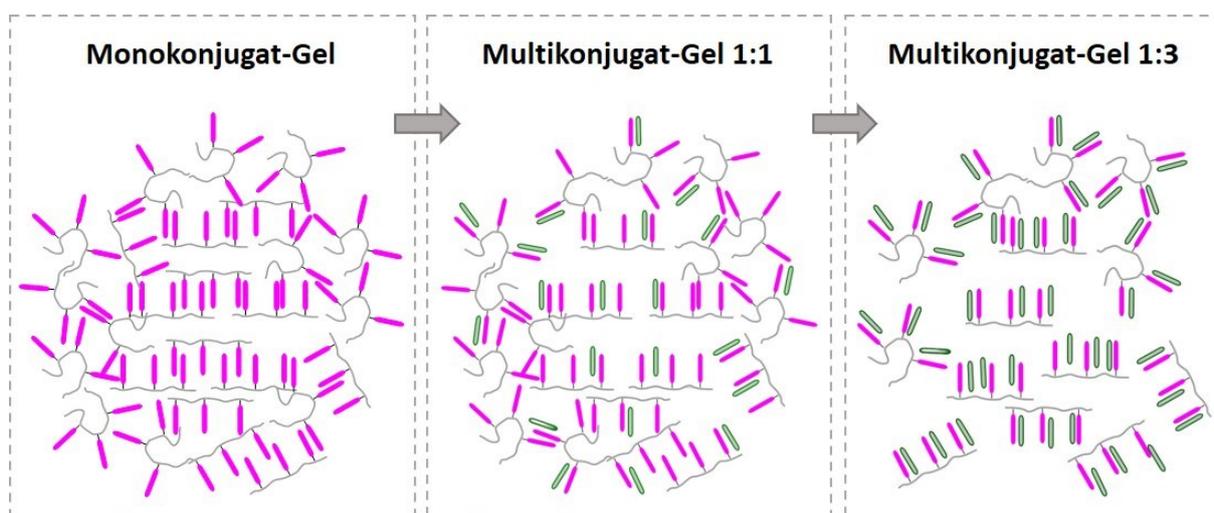


Abbildung 28: Graphische Darstellung des Gel-Netzwerks am Beispiel des Trimers **3** allein oder als Multikonjugat-Gel mit dem Pentaleucin **9** (in diesem Fall grün dargestellt) im äquimolaren Mischverhältnis (1:1, **M3a**) und im äquivalenten Verhältnis zu der Anzahl der Leucin-Seitenketten (1:3, **M3b**).

Die Untersuchungen der Multikonjugat-Gele haben gezeigt, dass die Gelstärke der Dimer- und Trimer-Gele durch Zugabe der reinen Peptid-(Polymer-)Sequenz angepasst werden kann. Unter Verlust des Vernetzungsgrades können dadurch viskosere Gele von Speichermodulen zwischen $G' = 0.7$ und 5 kPa erzeugt werden. Studien haben gezeigt, dass Gele mit einer Stärke von <1 kPa nicht stark genug sind, um funktionelle Gewebestrukturen zu imitieren. Steifere Hydrogele mit einer Stärke von >10 kPa aber können gute Kandidaten sein.^[248] Die Konjugat-Mischungen sind demnach für den Einsatz der Zellkultivierung wenig geeignet. Anders ist es bei den multivalenten Konjugaten. Mit Speichermodulen von 10 und 20 kPa könnten sie zu diesem Zweck eingesetzt werden.

3.1.3.1 Formulierung und Analyse von PPMK-Nanopartikel

Peptide haben zudem das Potenzial, intelligente Drug-Delivery-Systeme zu konstruieren. Durch intermolekulare Wechselwirkungen lagern sich die Peptide zu kolloidalen Partikeln zusammen und gewährleisten durch den Aufbau einer Kern-Schalen-Struktur den Einbau von Wirkstoffen im Partikelinneren.^[126] Angestrebt werden dabei Partikelgrößen im nanoskalierbaren Bereich von ca. 100 nm. Studien haben gezeigt, dass 100 nm große Nanopartikel eine 2.5-fach größere Aufnahme im Vergleich zu Partikeln mit einem Durchmesser von 1 µm und eine 6-fach größere Aufnahme als 10 µm große Partikel aufweisen. Denn zu großer Partikel werden von 200 nm oder größer neigen dazu das lymphatische System zu aktivieren und werden daher schneller aus dem Kreislauf entfernt. Dagegen scheinen zu kleine Partikel mit Größen von unter 100 nm ebenfalls wegen dem ungünstigen Volumen-zu-Oberfläche Verhältnis weniger geeignet zu sein.^[252] Zudem können sie wegen der geringen Größe nicht mit einer ausreichenden Menge an Medikamenten beladen werden.^[253] Somit stehen Peptid-basierte Wirkstofftransportsysteme für den finalen Einsatz in der Medizin vor gewissen Herausforderungen. Diese sind: (i) die präzise Kontrolle der Partikelgröße (während der Herstellung); (ii) ob sie konsistente Ergebnisse in vivo und in vitro erzielen können; (iii) ob sie im Vergleich zu freien Medikamenten eine verlängerte Halbwertszeit im Blutkreislauf haben; und (iv) ob sie eine akute Immunreaktion oder eine mögliche Toxizität vermeiden können.^[81]

Die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung, ob die Leucin-basierten PPMKs potenziell im Bereich des Wirkstofftransports eingesetzt werden können, wurde anhand der Kriterien (i) und (iv) beurteilt. Experimente zur Herstellung der Organogele konnten die Ausbildung überdimensionaler Strukturen bereits bestätigen. Die Frage, die sich folglich gestellt hat, war: Können durch Veränderungen der Präparationsmethode oder anderer Parameter gezielt PPMK-Partikel im Nanobereich hergestellt werden? Und können sie durch die Verwendung von Mischkonjugat-Systemen, welche die strukturelle und somit auch physikalische Beschaffenheit der Gele änderte, ebenfalls Veränderungen in der Größe und/oder Form der Nanogele erzeugen? Diese Fragen wurden im Folgenden behandelt.

3.1.3.1.1 Bestimmung der PPMK-Partikelgröße mittels Dynamische Lichtstreuung

Die Herstellung der Nanopartikel erfolgte mittels einer schnellen Solvent-Switch-Methode.^[198] Dabei wurden die Konjugate in einem geeigneten, wassermischbaren Lösungsmittel vollständig gelöst und anschließend in ein Anti-Lösungsmittel überführt, welches zu der Ausfällung der Konjugate geführt hat. In diesem Fall wurden unterschiedliche Konzentrationen der Konjugate in DMSO gelöst und anschließend in vorgefiltertes MQ-Wasser kontrolliert zugegeben. Eine schnelle Durchmischung der beiden Lösungen begünstigt die Bildung kleinerer Partikel. Um das zu erreichen, wurde die automatisierte analytische Hamilton-Spritze eVol® XR verwendet (siehe graphische

Versuchsdurchführung im *Experimentellen Teil* in Abb. 36). Sowohl der kleine Durchmesser der Spritzennadel als auch die Fähigkeit, die Konjugat-DMSO-Lösung mit einer konstanten und schnellen Rate (ca. 8.6 ml s^{-1}) zu dispergieren, sind Voraussetzungen für eine adäquate Ausfällung in kleine Partikel. Um eine gute Durchmischung während der Zugabe der Konjugat-Mischung zu gewährleisten, wurde die wässrige Phase zudem kontinuierlich mit ca. 500 U/min rotiert. Nach der Zugabe wurde die Größe der gebildeten Partikel sofort mittels Dynamische Lichtstreuung (DLS) bestimmt.

DLS, auch bekannt als Photonenkorrelationsspektroskopie oder quasi-elastische Lichtstreuung, ist eine gängige Methode zur Bestimmung der Größe von Makromolekülen und Partikeln. In erster Linie wird die Brownsche Molekularbewegung von Partikeln in Lösung gemessen, die durch die Bestrahlung monochromatischen Lichts auf Lösungsmittelmolekülen entsteht. Die dadurch angeregte Diffusion der Teilchen hängt von ihrer Größe, Form, der Temperatur und der Viskosität des Lösungsmittels ab. Die Kenntnis der genauen Temperatur für DLS-Messungen ist unerlässlich, da die Viskosität des Lösungsmittels von der Temperatur abhängt. Betrachtet man die Bewegung von Teilchen über einen Zeitbereich, können Informationen über die Größe von Partikel gewonnen werden, da große Teilchen langsam diffundieren, was zu ähnlichen Positionen zu verschiedenen Zeitpunkten führt. Im Vergleich dazu bewegen sich kleinen Teilchen schneller und nehmen daher keine bestimmte Position im Medium ein. Mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung, lassen sich über den gemessenen Diffusionskoeffizient D der hydrodynamische Radius R_h der Partikel bestimmen.^[254]

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}$$

wobei k_B die Boltzmannkonstante ($1.380 \times 10^{-23} \text{ kg m}^2 \text{ s}^{-2} \text{ K}^{-1}$), T die Temperatur und η die Viskosität des Lösungsmittels ist.

Die DLS-Messungen zeigten für Dimer **2** und Trimer **3** sowie für das Pentaleucin **9** eine starke Fähigkeit zur Bildung von Aggregaten. Wie in Tabelle 3 und 4 zu sehen ist, wurde eine Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration und der resultierenden Partikelgröße sowie der Partikelgrößenverteilung (PDI) untersucht. Die Messungen zeigen mit der Verringerung der Konzentration eine stetige Reduktion der Partikelgröße. Gleichzeitig führte die Verringerung der Konzentration zu einer Verringerung der PDI und damit zu einer Vereinheitlichung der Partikelgrößen. Zum Vergleich wurden ebenfalls Messungen mit Konjugat **1** und **10** durchgeführt. Diese zeigten allerdings eine starke Fluktuation in der zeitabhängigen Korrelationsfunktion, ähnlich der des reinen Lösungsmittels. Daher wurde von keiner Aggregatsbildung der monovalenten Konjugate ausgegangen.

Tabelle 3: Über DLS-Messungen ermittelter hydrodynamischer Durchmesser und PDI der Konjugate **2** und **3**.

Nr.	Konz. [μM]	D_h [nm]	PDI	Nr.	Konz. [μM]	D_h [nm]	PDI
2	100	785 ± 227	0.784 ± 0.114	3	100	6182 ± 2352	0.484 ± 0.267
	50	314 ± 29	0.515 ± 0.043		50	3186 ± 408	0.458 ± 0.143
	30	103 ± 8	0.155 ± 0.014		30	1178 ± 119	0.454 ± 0.079
	10	80 ± 3	0.090 ± 0.019		10	1492 ± 101	0.508 ± 0.084
	8	68 ± 7	0.131 ± 0.016		8	2444 ± 268	0.398 ± 0.039
	6	68 ± 3	0.115 ± 0.022		6	610 ± 133	0.391 ± 0.114
	4	66 ± 2	0.134 ± 0.013		4	276 ± 6	0.246 ± 0.018
	2	51 ± 2	0.210 ± 0.025		2	160 ± 3	0.162 ± 0.014
				1	88 ± 3	0.125 ± 0.013	

Tabelle 4: Über DLS-Messungen ermittelter hydrodynamischer Durchmesser und PDI des Pentaleucins **9** und der Konjugat-Mischungen.

Nr.	Konz. [μM]	D_h [nm]	PDI	Nr.	D_h [nm]	PDI
9	500	40 ± 7	0.318 ± 0.081	M1a	29 ± 1	0.214 ± 0.022
	300	26 ± 4	0.368 ± 0.105	M1b	30 ± 1	0.237 ± 0.012
	100	449 ± 123	0.696 ± 0.153	M2a	83 ± 4	0.141 ± 0.010
	80	202 ± 72	0.535 ± 0.171	M2b	66 ± 2	0.175 ± 0.051
	50	187 ± 23	0.127 ± 0.009	M3a	29 ± 2	0.117 ± 0.019
	30	224 ± 17	0.156 ± 0.062	M3b	25 ± 0.4	0.155 ± 0.014
	10	68 ± 53	0.538 ± 0.144	M4a	1060 ± 46	0.668 ± 0.035
				M4b	206 ± 19	0.514 ± 0.021

Betrachtet man die DLS-Ergebnisse der Konjugate **2** und **3**, so fällt ein deutlicher Größenunterschied der gebildeten Agglomerate der Nanopartikel auf. Bei der höchsten gemessenen Konzentration von 100 μM bildeten sich große Agglomerate von 800 nm für **2** und weit über 6000 nm für **3**, was ebenfalls durch Trübung der Lösung zu beobachten war. Dieser Trend setzt sich auch in den anderen Messpunkten fort. Die Hinzufügung einer Pentaleucin-Kette erhöht nicht nur die Hydrophobie und damit die Neigung zur Aggregation, sondern auch die intermolekulare Wechselwirkung zu anderen Konjugatmolekülen, was letztlich zu den großen Aggregaten führen kann. In diesem Fall kann nicht von einer Ausbildung einzelner großer Partikel ausgegangen werden, sondern einer Ansammlung unzähliger Aggregate, die durch den Zusammenschluss in der Lösung kollabieren. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass die größere Molekülstruktur von **3** einen Einfluss auf die Bildung großer Partikel hat. Dieser Unterschied führt auch dazu, dass das Trimer schon bei geringeren Konzentrationen Nanopartikel bildet als das Dimer. Demnach konnte **2** bei einer Endkonzentration von 2 μM und einer Größe von 51 nm Partikel mit einem PDI von 0.210 bilden. Das Trimer konnte bei 1 μM Partikel mit einer Größe von 88 nm und einem PDI von 0.125 erzeugen. Dies waren auch die kleinsten nachgewiesenen Partikelgrößen für beide Strukturen. Die DLS-Messungen mit niedrigeren Konzentrationen ergaben ebenfalls aufgrund von starken Abweichungen in der zeitabhängigen Korrelationsfunktion keine eindeutigen Daten. Interessanterweise steht das freie Pentaleucin nicht im Einklang mit dem oben beschriebenen Trend. Aufgrund der einfachen Valenz wurden die Daten für das Pentaleucin mit der 3- bis 5-fache Konzentration - im Vergleich zu den PPMKs - aufgenommen. Wie in Tabelle 4 zu sehen ist, konnten kleine Partikel, die eine Größe von ca. 26 und 40 nm mit einem PDI von 0.368 bzw. 0.318 aufweisen, bei Konzentrationen von 300 und 500 μM detektiert werden. Durch die Verwendung kleinerer Konzentrationen werden die Agglomerate und deren PDI größer. Eine mögliche Erklärung könnte den Tensid-ähnliche Eigenschaften des L-Leucin zugeschrieben werden.^[255] In der Literatur wird beschrieben, dass es sich bei Pentaleucin demnach auch um eine oberflächenaktive Substanz handeln könnte, bei der die kurzen Peptidketten in geringeren Konzentrationen an der Wasser-Luft-Grenze angeordnet sind, wobei die hydrophoben Seitenketten des Leucins in die Luft und das hydrophile Amid in die Wasseroberfläche ragen. Die großen "Partikel" (z. B. bei 100 μM : 449 nm bei 0.696 PDI) könnten also durch die Verteilung der Moleküle in der Lösung und an der Oberfläche erklärt werden. Diese Hypothese wurde in dieser Arbeit allerdings nicht weiter untersucht.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Verwendung eines Multikomponenten-Systems auf die Partikelgrößen untersucht. Die Experimente an den Organogelen haben gezeigt, dass die Zugabe der linearen Pentaleucin-Konjugate **9** oder **10** die multivalenten Wechselwirkungen des Dimers und Trimers unterbrochen haben, wobei dadurch schwächere (oder viskosere) Gele erzeugt wurden. Motiviert die Kontrolle über die Partikelgrößen während des Herstellungsprozesses zu erhalten, wurde

ebenfalls die Bildung von Nanopartikeln durch Mischkonjugate untersucht. Es wurden die gleichen Mischungen mit den selben Mischverhältnissen erzeugt (siehe *Kapitel 3.1.3.1*, Abb. 27). Damit auch hier die Vergleichbarkeit gewährleistet ist, befinden sich in den Mischungen die gleiche Anzahl an Pentaleucin-Ketten wie in den Monokonjugat-Lösungen. Die Entstehung von Nanogelen von Konjugat-Mischungen wurden bei einer Endkonzentration von 30 μM untersucht. Hierfür wurden zunächst von jedem Konjugat Stammlösungen hergestellt, die für die Herstellung der Mischungen entsprechend verdünnt wurden. Anschließend wurden Partikel nach dem oben beschriebenen Prinzip hergestellt und direkt am DLS analysiert. Die Ergebnisse der Messungen werden in Tabelle 4 und in Abb. 28 graphisch dargestellt.

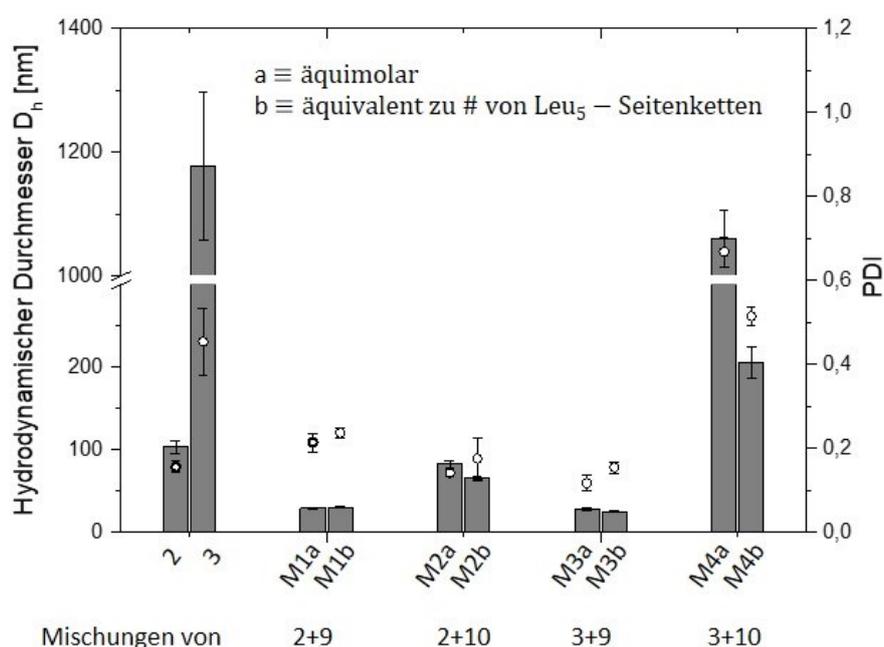


Abbildung 29: DLS-Ergebnisse der Konjugat-Mischungen aus **2** und **3** mit den jeweiligen Pentaleucin-Konjugaten **9** und **10**.

Eindeutig ist, dass die Zugabe von freien Pentaleucin-Ketten die Größe der detektierten Mischpartikel signifikant reduziert. Ein deutlicher Unterschied ergibt sich, wenn die Konjugate **2** und **3** mit freiem Pentaleucin kombiniert werden (**M1** und **M3**), da Partikelgrößen von ca. 30 nm erreicht werden konnten. Überraschenderweise hat der Anteil von Pentaleucin keinen Einfluss auf die Partikelgröße, da sowohl äquimolare (**a**) als auch Leu₅-äquivalente (**b**) Zugabe zu ähnlichen Durchmessern und PDI führen. Die Mischungen mit PEG-Pentaleucin **10** tragen ebenfalls zu einer Verringerung der Partikelgröße bei, allerdings wird in diesem Fall eine geringe Größenreduktion erreicht. Die Partikelgröße bei den Gemischen aus dem Dimer mit dem PEG-Pentaleucin nimmt bei äquimolarer Zugabe auf 83 nm (**M2a**) und nach Leu₅-äquivalenter Zugabe auf 66 nm (**M2b**) ab. Eine Kombination von Trimer mit **10** führt bei **M4a** zu keiner relevanten Veränderung der Partikel (von 1178 nm des reinen Konjugats auf 1060 nm des Konjugat-Gemisches). Eine Verdreifachung des freien

Peptidkettenanteils (**M4b**) wiederum bewirkt eine Abnahme der Partikel auf einen Wert von ca. 200 nm. Offensichtlich ist die geringere Reduktion der Partikelgröße bei Zugabe des Polymer-Pentaleucin-Konjugats auf die PEG-Kette zurückzuführen, die sich einerseits aufgrund ihrer Länge expansiv verhält und sich durch hydrophobe Wechselwirkung um die eigene Pentaleucin-Einheit anordnet und gleichzeitig Wasserstoffbrücken mit den umgebenden Wassermolekülen bildet.^[256] Dies bewirkt eine sterische Abschirmung^[257] und verhindert die Wechselwirkung der Pentaleucin-Kette mit den Konjugaten, sodass die Interaktionen zwischen den Konjugat-Molekülen nicht aufgebrochen werden (siehe **M4a**). Mit höherer Zugabe des Polymer-Konjugats, wie es bei **M4b** der Fall ist, steigt allerdings die Wahrscheinlichkeit der Peptid-Interaktionen, worauf die Partikelgröße wieder reduziert werden konnte. Andererseits könnte die hydrophile Ethylenglycol-Einheit des PEGs die Bildung einer Hydrathülle begünstigen. Diese würde das Mischkonjugat-Gebilde umschließen und von der DLS als Partikel mit höheren hydrodynamischen Durchmessern detektiert werden.

Interessant dagegen ist, dass die resultierenden kleinen Nanopartikeln von ca. 30 nm bei der Vermischung der Konjugate mit dem freien Pentaleucin vergleichbar ist mit dem Ergebnis der Partikelgenerierung des reinen Pentaleucins **9** bei hoher Konzentration (siehe Tabelle 4 bei 300 und 500 μM). Wie bereits beschrieben könnte die oberflächenaktiven Eigenschaften des Pentaleucins, die die Ausbildung von Mizellen begünstigen, dabei eine Rolle spielen. Bei 30 μM konnte das freie Peptid keine kleinen Partikel (ggf. Mizellen) erzeugen, da hier ein hoher Wert von ca. 224 nm detektiert wurde (siehe Tabelle 4). Nur in Kombination mit den Konjugaten, unabhängig von der Konzentration und der Valenz der Konjugate, werden die kleinen Partikel erzeugt. Möglicherweise fördert die Reduktion der Oberflächenspannung die Bildung von (Misch-)Konjugat-Partikeln. Im Laufe dieser Arbeit konnte nicht hinreichend untersucht werden, ob das Pentaleucin in die Partikel integriert wurde und so einen Bruch der intermolekularen PPMKs-Wechselwirkungen hervorgerufen hat oder, ob es eine Umgebung geschaffen hat, bei der die reinen PPMKs kleine Partikel generierten. Letzteres würde Ausbildung von Misch-Partikeln ausschließen. Zur Verifizierung dieser Hypothesen ist die Durchführung weiterer Experimente notwendig.

Die Untersuchungen der Leucin-basierten PPMKs haben ergeben, dass mit Hilfe eines kontrollierten Herstellungsverfahrens kleine Partikel für den Einsatz als Wirkstofftransport hergestellt werden können. Die Studien mit der DLS hat gezeigt, dass bereits das freie Dimer-Konjugat bei Konzentrationen von 10 bis 30 μM geeignete Partikel mit einer aus medizinischen Sicht angestrebten Größe von 100 nm erzeugt werden konnten. Wegen seiner höheren Valenz und die damit verstärkte Tendenz sich zu vernetzen, wurden diese Partikelgrößen beim Trimer nur bei Konzentrationen von 1 μM (88 nm) erreicht. Für ein optimales Drug-Delivery-System könnte diese Konzentration zu gering sein, um Wirkstoffe in ausreichender Menge zu verabreichen. Bei höheren Konzentrationen des Trimers finden

sich Aggregate zu großen Gebilden zusammen, sodass Durchmesser von über 1000 nm erreicht werden (ab 8 μM) (siehe Abb. 30a). Erstaunlicherweise zeigen Mischungen aus den Konjugaten mit Pentaleucin (in der Abb. Grün dargestellt) eine Reduktion der Partikelgröße auf 25 – 30 nm (Abb. 30b). Dabei scheint der Anteil des freien Peptids in der Mischung, ob äquimolar zur Konjugat-Konzentration oder äquivalent zu der Anzahl der Pentaleucin-Seitenketten, keinen Einfluss auf die resultierenden Partikelgröße zu haben. Stattdessen wurden Partikel mit nahezu monodisperser Größenverteilung mit niedrigen PDI von ca. 0.22 für die Dimer-Gemische und von ca. 0.13 für die Trimer-Gemische erhalten. Mischungen mit den Peptid-Polymer-Konjugat PEG-Leu₅ (Abb. 30c) zeigten dagegen eine geringe Größenreduktion. Grund dafür könnte die Abschirmende Wirkung des PEGs sein, welches sich um die Pentaleucin-Einheit wickelt und auf diese Weise eine Wechselwirkung zu den Konjugaten verhindert. Stattdessen liegt es frei in der Lösung vor. Dennoch scheinen einige PEG-Leu₅-Konjugate mit den Trimer-Konjugaten in Wechselwirkung getreten zu sein, da es trotzdem zu einer Größenreduktion gekommen ist. Wahrscheinlich ist, dass sich die PEG-Einheiten an der Oberfläche des Partikels anordnen und die Ausbildung einer Hydrathülle bewirken, sodass die Nanopartikel von der DLS mit größeren hydrodynamischen Durchmessern detektiert werden.

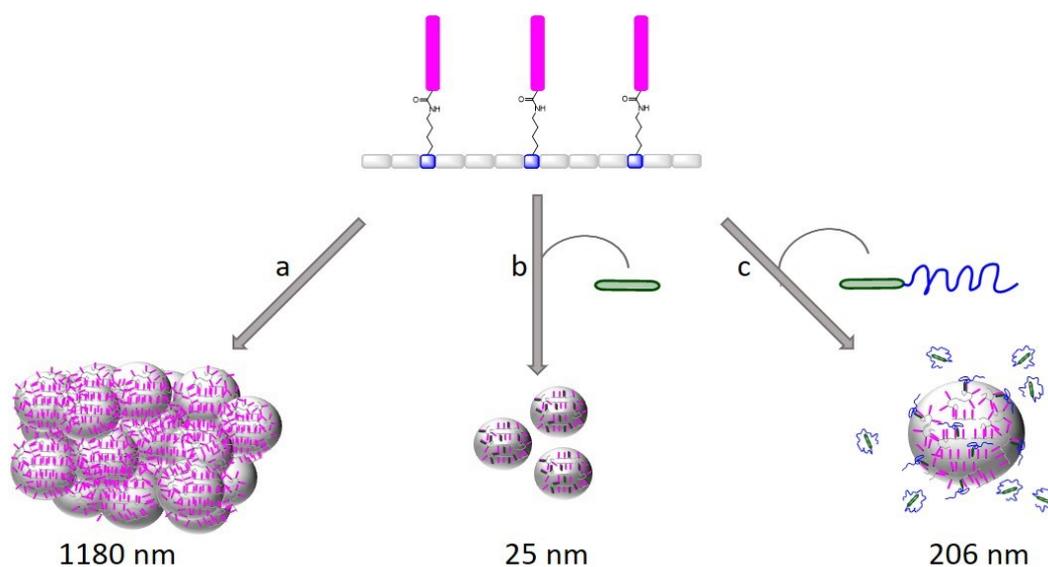


Abbildung 30: Graphische Darstellung der Ergebnisse aus der Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers der PPMK-(Misch-)Nanopartikel mittels DLS. Hier am Beispiel des Trimers **3** dargestellt. Es wurden Partikel aus dem reinen Trimer Konjugat hergestellt (a), wobei sehr großen Aggregate von 11180 nm erzeugt wurden. Außerdem wurden Partikel aus Konjugat-Mischungen erzeugt. Trimer und das Pentaleucin **9** (b) zeigten die Bildung kleiner Nanopartikel von 25 nm. Die Mischung aus Trimer und PEG-Leu₅ **10** (c) führte zur Bildung größerer Nanopartikel (ca. 200 nm). Die Probenkonzentration betrug immer 30 μM .

3.1.3.1.2 Bestimmung der PPMK-Partikel mittels Transmissionselektronenmikroskop

Mit Hilfe der DLS konnte die Herstellung von PPMK-Nanopartikeln nachgewiesen werden sowie ihr hydrodynamischer Durchmesser ermittelt werden. Im Folgenden sollen die Ergebnisse unter Verwendung eines Transmissionselektronenmikroskops (TEM) verifiziert werden.

TEM ist eine elektronenmikroskopische Technik, die häufig zur Charakterisierung von Nanomaterialien eingesetzt wird, insbesondere zur Analyse der Größe, Morphologie, kristallographischen Struktur und chemischen Zusammensetzung der Nanomaterialien. Dieses Verfahren gehört damit zu den wenigen Methoden, die eine räumliche Auflösung bietet, wobei sie zuverlässig den gesamten Nanometer-Größenbereich von 1 bis 100 nm abdeckt. Die Analyse mit dem TEM kann ohne weiteres direkte hochauflösende 2D-Bilder der Nanomaterialien erzeugen. Außerdem ermöglicht TEM die Beurteilung des Agglomerations- und/oder Aggregationszustandes eines Materials, sodass zu einem gewissen Grad durch Agglomeration/Aggregation einzelne Partikel identifiziert werden können.^[258] Die Methode funktioniert dabei wie folgt: Ein einfallender hochenergetischer Elektronenstrahl wird durch eine ultradünne Probe geleitet. Wenn der Elektronenstrahl in die dünne Probe eintritt, werden die einfallenden Elektronen durch Elektron-Elektronen-Wechselwirkungen zwischen dem Strahl und der Probe in ungestreute, elastisch gestreute oder inelastisch gestreute Elektronen umgewandelt. Die gestreuten oder ungestreuten Elektronen werden auf eine Reihe von elektromagnetischen Linsen fokussiert und dann auf einen Bildschirm projiziert, um ein Elektronenbeugungsbild, ein Amplitudenkontrastbild, ein Phasenkontrastbild oder ein Schattenbild mit variabler Dunkelheit basierend auf der Dichte der ungestreuten Elektronen zu erzeugen. Hierbei ist ein Hochvakuum erforderlich, um die Ablenkung oder Abschwächung des Elektronenstrahls durch Gasmoleküle in der Luft zu vermeiden.^[259]

Auf diese Weise wurden TEM-Bilder von den PPMK- und den Gemisch-PPMK-Proben aufgenommen (siehe Abb. 31). Die Aufnahmen wurden durchgeführt von *M. Otten* vom Lehrstuhl für Kolloide und Nanooptik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Methode soll die Form, Größe und Aggregation der Konjugat-Nanopartikel bildlich veranschaulichen. Hierzu wurden frisch präparierten Partikel-Lösungen nach dem in *Kapitel 3.1.3.1.1* beschriebenen Verfahren hergestellt und auf einem mit Kohlenstoff bedruckten Kupfergitter der Maschenweite von 200 aufgetragen. Um die Ergebnisse der TEM-Analyse direkt mit den Ergebnissen der DLS-Studie zu vergleichen, lag die Konjugat-Endkonzentration ebenfalls bei 30 μM . Nach einer ein-minütigen Absorption wurde die Probe mit einem Tuch abgetragen, das Gitter mit MQ-Wasser gespült und die Partikel abschließend mit einer 3 %igen Uranylacetatlösung eingefärbt.

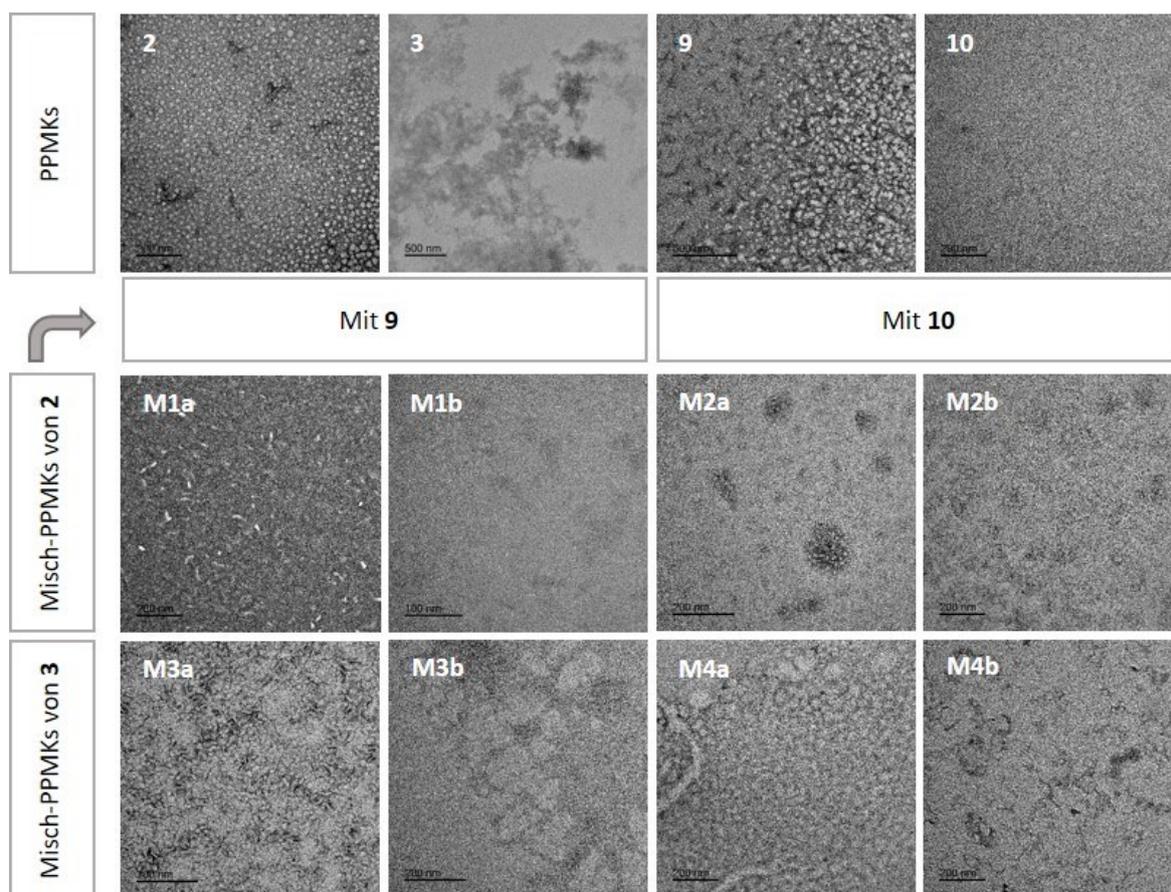


Abbildung 31: TEM-Bilder der PPMK- und Misch-PPMK-Partikellösungen. In der obersten Reihe befinden sich die Bilder der reinen Konjugat-Partikel **2**, **3**, **9** und **10**. Die mittlere und die untere Reihe zeigen die Abbildungen der Misch-Konjugat-Partikel von **2** und **9** (**M1a**, **M1b**), **2** und **10** (**M2a**, **M2b**), **3** und **9** (**M3a**, **M3b**) und **3** und **10** (**M4a**, **M4b**). Die Konjugat-Lösungen wurden bei einer Konzentration von $30 \mu\text{M}$ hergestellt. Die Maßstabsleiste beträgt 200 nm , mit Ausnahme von Bild **5** und **11**, bei denen der Maßstab 500 nm beträgt und Bild **M1b** beträgt der Maßstab 100 nm .

Wie in Abb. 30 zu sehen, zeigen das Dimer-Konjugat **2** sowie das Pentaleucin **9** überwiegend kugelförmige Aggregate mit einer Größe von durchschnittlich 28 bzw. 80 nm . Diese sind um ein Vielfaches kleiner als die in der DLS ermittelten Partikelgrößen. Grund dafür könnte an der Analyseverfahren liegen. Während die Partikel in der DLS im wässrigen Milieu im gequollenen Zustand mit zusätzlicher Hydrathülle untersucht wurden, befinden sich die Partikel auf dem Kupfergitter für die TEM-Untersuchungen in einem trockenen Zustand. Nach dem Wasserentzug schrumpft das Volumen der Partikel und erklärt damit die Reduktion der Partikelgröße bei den TEM-Aufnahme. Weiterhin ist bei Konjugat **3** nur eine Bedeckung von Material ohne definierte Form auf der Gitteroberfläche zu sehen. Dies bestätigt die zuvor getroffene Annahme, dass sich die Partikel in Lösung zu größeren Gebilden agglomerieren und deshalb keine definierte Größe und Form annehmen. Das Polymer-Peptid-Konjugat **10** zeigt dagegen überhaupt kein Material auf der Oberfläche. Auch diese Beobachtung deckt sich mit den DLS-Analysen, bei denen keine Partikelformation detektiert werden konnte. Bei der Analyse der Konjugat-Mischungen, in denen das Pentaleucin den Konjugaten **2** und **3** zugesetzt wurde (**M1** und **M3**), sind für **M1a** und **M3a** längere, partikelartige Strukturen erkennbar. Im

Vergleich zu dem reinen Dimer-Konjugat hat sich die Partikelstruktur von **M1a** also nicht wesentlich verändert. Im Gegensatz dazu wurden bei der Mischung vom Trimer mit dem Leu₅ (**M3a**) definierte Strukturen von ca. 30 nm Größe erreicht. Dies zeigt, dass das Pentaleucin einen Einfluss auf die Partikelausbildung des Trimers hin zu kleineren Aggregaten hat. Bei dem höheren Anteil an Pentaleucin (**M1b** und **M3b**) ändern sich die Bilder erneut. Bei **M1b** sind kaum noch Partikel zu sehen. Dies lässt darauf schließen, dass die Aggregation des Dimers vollständig aufgebrochen wurde oder das Größenlimit des Geräts erreicht wurde, da hier Partikel unter der Größe von 20 nm erwartet wurden. Bei **M3b** ist wiederum keine definierte Struktur zu sehen, sondern eine gleichmäßige Verteilung des Materials an der Oberfläche. Bei dieser Abbildung wird nicht klar, ob es sich um kleine Partikel handelt, die bereits in Lösung miteinander agglomeriert sind oder, ob sich die Partikel während der Absorption auf dem Kupfergitter aufgrund hydrophober Wechselwirkungen nebeneinander angeordnet haben. Im Gegensatz dazu zeigen die TEM-Analysen der Konjugat-Mischungen mit dem PEG-Pentaleucin **10** (**M2** und **M4**) keine Ausbildung von definierten Strukturen. Stattdessen sind bei allen vier Abbildungen große Material-Zusammenschlüsse – insbesondere bei **M2a** und **M4a** - zu erkennen, die aber bei höherer Zugabe von **10** (also in **M2b** und **M4b**) kleiner werden. Vermutlich ist ein Aufbrechen der Struktur bei höherer Zugabe des PEG-Leu₅-Struktur anzunehmen. Dennoch zeigen diese Ergebnisse eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen der DLS, dass das PEG-Pentaleucin-Konjugat nicht zur Reduktion der Partikelgröße geführt hat.

Insgesamt stimmen die Ergebnisse der TEM-Versuche nur teilweise mit denen der DLS überein. Zunächst weisen die Abbildungen mit den klar definierten Partikeln, wie bei **2**, **9** und **M1a**, kleinere Partikelgrößen auf. Diese lässt sich allerdings auf die Präparationsmethode und dem dehydrierten Zustand der Partikel zurückführen. Zudem zeigte die DLS bei allen Konjugat-Mischungen mit Pentaleucin **9** eine ähnliche Partikelgröße auf (alle ca. 25-30 nm). Dies ist bei TEM nicht der Fall. Mit höherer Zugabe des Peptids scheinen demnach kleinere Partikel ausgebildet worden zu sein, die bei **M1b** nicht abgebildet werden konnten. Im Fall von **M3b** haben sich die Partikel vermutlich aufgrund starker hydrophober Wechselwirkungen während der Probenapplikation auf der Oberfläche nebeneinander angeordnet. Dadurch entsteht der Eindruck, dass sich große, undefinierte Agglomerate gebildet haben, deren Größe am TEM nicht ermittelt werden kann. Dieses Problem stellt einen großen Nachteil bei der Verwendung des TEM dar. Bei zu hohen Proben-Konzentrationen könnten sich die Aggregate übereinander anordnen und können demnach nicht als einzelne Partikel identifiziert werden. Diese Limitierung besteht bei der DLS nicht, da die Partikel sich frei verteilt im wässrigen Medium befinden. Bei den Gemischen mit dem PEG-Peptid-Konjugat **10**, wie bspw. bei **M2a**, sind große Strukturen von ca. 200 nm zu sehen. Diese Probe zeigte bei der DLS eine Partikelgröße von 83 nm. Auch konnten bei den Proben **M2b**, **M4a** und **M4b** keine definierten Partikel ermittelt werden.

Die PEG-Kette des Konjugats **10** scheint demnach für die Ausbildung von kleinen separaten Partikeln hinderlich zu sein. Wie bereits beschrieben legt sich das an der Oberfläche befindliche PEG aufgrund seines Abschirmungseffekts entweder um die agglomerierten Partikel und unterbindet auf diese Weise eine Interaktion mit weiteren Peptiden oder es hindert das an das PEG konjugierte Pentaleucin daran Wechselwirkungen mit den PPMKs einzugehen. In beiden Fällen würde es die Ausbildung kleiner Partikel verhindern. Zusammengefasst kann die Partikelgröße und -form aufgrund der unklaren TEM-Abbildungen der PPMKs und der Mischkonjugat-Systeme nicht aussagekräftig analysiert werden. Im Zusammenhang mit den DLS-Daten lässt sich aber erahnen, dass mit zunehmender Zugabe des freien Peptids **11** eine Verringerung der Partikelgrößen erreicht werden kann.

3.1.3.1.3 Toxizitätsstudie

Die Aggregationsstudien haben gezeigt, dass die Leucin-basierten PPMKs das Potenzial zur Herstellung von Nanopartikeln als auch von Makrogelen besitzen. Für einen erfolgreichen Einsatz in der Medizin, sind zusätzlich noch weitere Voraussetzungen notwendig. Wie bereits beschrieben besteht bei Peptid-basierten System außerdem die Herausforderung, eine Immunreaktion oder eine mögliche Toxizität zu verhindern.^[81] Dies ist insbesondere für die Herstellung von Wirkstofftransportsystemen wichtig, die zwar potenziell toxische Substanzen transportieren sollen (bspw. in der Krebstherapie), aber selber keine Toxizität entwickeln. Sollte das Peptid potenziell toxisch auf bestimmte Zellen wirken, kann dieses auch als Wirkstoff eingesetzt werden. Das Dipeptid L-Leucin-L-Leucin-OMe (Leu₂-OMe) zeigte genau diese Wirkung. Frühere Studien haben die selektiven Wirkungen von Leu₂-OMe auf humane oder murine lymphoide Zellen mit zytolytischem Potential beschrieben. Es verursacht die Apoptose von Monozyten, polymorphkernigen Leukozyten und myeloischen Tumorzelllinien, während Zelllinien, die nicht aus dem Knochenmark stammen, völlig resistent gegen jegliche toxische Wirkung dieses Mittels zu sein scheinen.^[260-261] Die erhöhte Empfindlichkeit dieser Zellen hängt mit ihrem hohen Gehalt an Cathepsin C zusammen, einer Dipetidylpeptidase I. Nachdem das Leu₂-OMe durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen und in die Lysosomen transportiert wird, wird das Dipeptid mittels der Peptidase in das Tensid (Leu₂)_n-OMe (n>3) umgewandelt. Dieses verursacht die Fragmentierung der Lipiddoppelschicht, die letztlich zum Tod der Lysosomen führt.^[261]

Aufgrund der strukturellen Nähe der in dieser Arbeit hergestellten Pentaleucin-basierten Materialien zu den von der Dipeptidylpeptidase erzeugten Oligoleucinen, lässt sich eine ähnliche lysosomotropische Wirkung der PPMKs vermuten. Diese wurde im Folgenden untersucht. Es sollte ermittelt werden, ob die PPMKs zytotoxisch auf gesunde, aber auch kranke Zellen (z.B. Krebszellen) wirken. Daher wurden Versuche an den Zelllinien MDA-MB-231 (Brustkrebszellen) und MCF-12A (gesunde Brustzellen) durchgeführt. Die Experimente wurden an der Southern University of Denmark

in Odense in Kooperation mit *Dr. Morten F Ebbesen* durchgeführt. Dabei wurden die Konjugatmischungen mit einem Leu₅-äquivalenten Mischungsverhältnis (**M1b**, **M2b**, **M3b**, **M4b**) verwendet, unter der Annahme, dass die kleinen Partikel eine größere Chance haben von den Zellen aufgenommen zu werden. Hierzu wurden die zuvor abgewogenen Konjugatmischungen in DMSO in verschiedenen Konzentrationen (30-0.3 mM) vorgelöst und anschließend im Verhältnis 1:1000 in das Zellmedium überführt. 100 µl der Konjugat-Lösung wurde zu den Zellen gegeben und 72 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Lebensfähigkeit der Zellen mit Hilfe des Farbstoffs Resazurin untersucht. Gesunde, lebensfähige Zellen können Resazurin - einen blauen, nicht fluoreszierenden Farbstoff - zu dem stark fluoreszierenden pinken Farbstoff Resorufin metabolisieren (siehe Abb. 32), welcher mit einem Fluoreszenzspektrometer (Ex. 560 nm / Em. 590 nm) ermittelt werden kann.^[262]

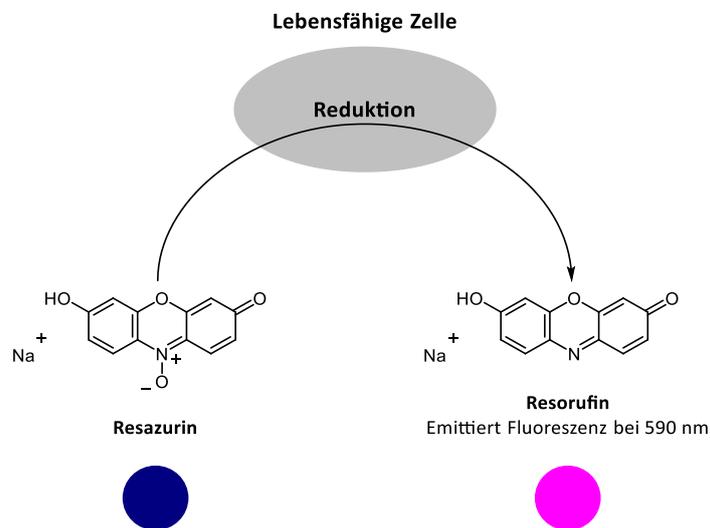


Abbildung 32: Darstellung der Reduktionsreaktion von Resazurin zu Resorufin durch lebensfähige Zellen. (Darstellung basierend an Abb. 1 des CellTiter-Blue® Instruktionsprotokolls von Promega^[263])

Als Referenz dienen unbehandelte Zellen. Die bei der Fluoreszenzmessung detektierten Werte aller behandelten Zellen wurden auf die Resorufin-Intensität der unbehandelten Zellen normiert. Wie an der Abb. 32 zu erkennen, wurde weder bei den Brustkrebszellen noch bei den Brustzellen eine Veränderung in der Viabilität festgestellt werden. So lag sowohl bei der höchsten gemessenen Misch-Konjugat-Konzentration (30 µM) als auch bei der kleinsten Konzentration (0.3 µM) die Lebensfähigkeit bei ca. 100 %. Die Zellen waren demnach in der Lage genauso viel Farbstoff umzuwandeln, wie die unbehandelten Zellen. Dies lässt darauf schließen, dass die in dieser Arbeit synthetisierten PPMKs keine toxische Wirkung auf die beiden Zelllinien haben. Diese Ergebnisse stützen die Studien, bei dem keine Toxizität an Zellen, die nicht aus dem Knochenmark stammen, nachgewiesen worden ist.^[260-261]

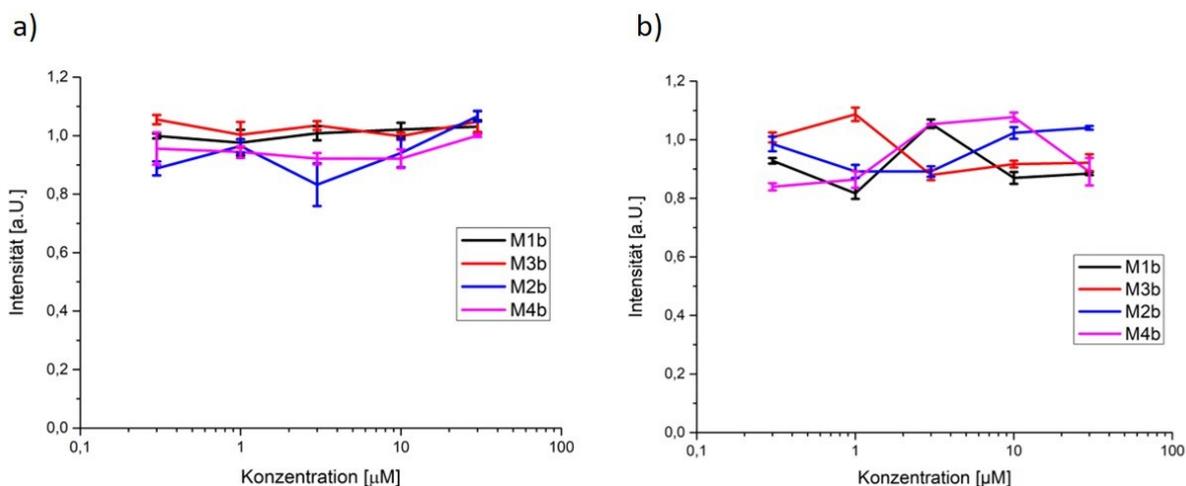


Abbildung 33: Toxizitätsstudie ausgewählter Multikomponenten-PPMKs an MDA-MB-231 (a) und MCF-12A (b) Zellkulturen. (Messung in Triplikaten, Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.)

3.2 Synthese von bioabbaubaren Lipid-Polymer-Konjugaten mit Oligo(amidoamin) als PEG-Alternative

Die Fusion von natürlichen und synthetischen Komponenten ist eine vielversprechende Strategie zur Erzeugung neuartiger Materialien für medizinische oder biotechnologische Anwendungen. Ähnlich wie bei den Peptid-Polymer-Konjugaten werden Kombinationen aus Lipiden und Polymeren aufgrund deren Eigenschaft zur Selbstassemblierung bevorzugt zur Herstellung von Nanopartikeln eingesetzt.^[202] Diese ordnen sich zu Liposomen an, die das Transportieren von Wirkstoffmolekülen ermöglichen.^[195-196] Ein zu diesem Zweck oft verwendetes Polymer ist das PEG, das sich durch seine besonderen Stealth-Eigenschaften auszeichnet.^[203] Kürzlich veröffentlichte Studien legen allerdings potenzielle Gefahren von PEG auf. Demnach führt ein hoher Konsum von PEG u.A. zur Ausbildung von spezifischen und unspezifischen Immunreaktion bis hin zu einem anaphylaktischen Schock^[204], sowie der Ausbildung von Anti-PEG-Antikörpern.^[205] Eine regelmäßige Einnahme von PEG begünstigt zusätzlich die Akkumulation des Polymers im Gewebe, welches durch die Verwendung kurzkettiger PEG-Einheiten verhindert werden kann. Diese bergen jedoch die Gefahr toxische Abbauprodukte zu erzeugen.^[206] Aufgrund dieser Nachteile liegt die Aufmerksamkeit zunehmend auf der Suche nach alternativen Materialien.

Der von *Hartmann et al.* entwickelten hydrophile Baustein EDS^[52] hat das Potenzial eine geeignete Alternative für PEG zu sein. Die Kupplung mehrerer EDS-Einheiten zu einem EDS-Oligo(amidoamin) könnte ein Ersatz für PEG werden, das sich überdies aufgrund der Diglykol-Einheit des Bausteins

strukturell ähnelt. Studien haben zudem bereits gezeigt, dass Oligo(amidoamine) nicht immunogen und nicht toxisch sind.^[65-66, 264] Sie eignen sich daher für Anwendungen im biomedizinischen Bereich.

Das Ziel dieser Arbeit ist Oligo-EDS-Lipid-Konjugate zu synthetisieren und ihr Potenzial als Drug-Delivery-System zu untersuchen. Diese Studien wurden in Kooperation mit *Dr. Stefan Bleher* und *Prof. Dr. Regine Süss* vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie des Instituts für Pharmazeutische Wissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau und *Dr. Morten F Ebbesen* von der Southern University of Denmark, Odense, Dänemark, durchgeführt. In dieser Arbeit wird der Fokus auf die Synthese der Oligo(amidoamin)-Lipide gelegt. Die von *Dr. Stefan Bleher* durchgeführte Herstellung der Liposome und deren Analysen werden anschließend kurz zusammengefasst.

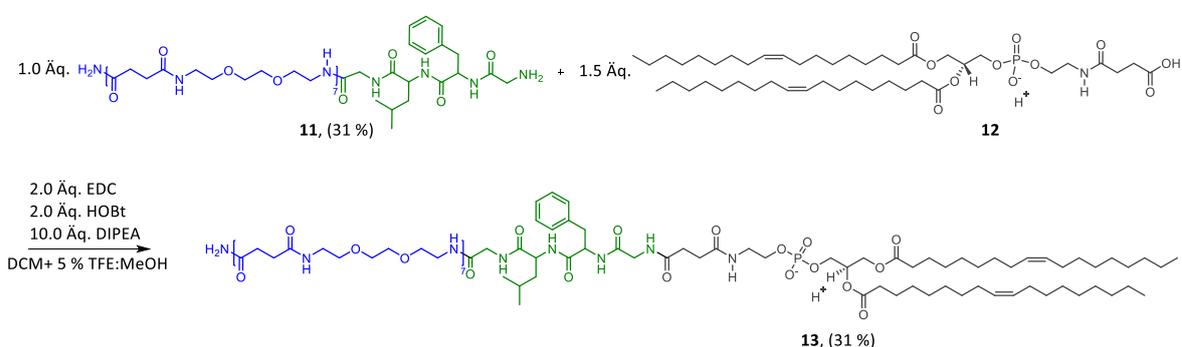
3.2.1 Synthese der biodegradierbaren Oligo(amidoamin)-Lipo-Makromoleküle

Das in dieser Arbeit synthetisierte Liposom besteht aus drei funktionalen Domänen. Die erste Struktureinheit ist das hydrophile Hepta-EDS-Oligo(amidoamin), welches als potenzielle Alternative zu PEG fungieren soll. Hierbei sollte das Oligo-EDS die gewünschten positiven (Stealth-)Eigenschaften von PEG übernehmen, indem es das Lipid mit einer Schutzschicht umhüllt und somit dem Liposom zu einer höheren Lebensdauer verhilft. Ein wesentliches Element der synthetisierten Oligo(amidoamin)-Lipo-Makromoleküls ist die Peptidsequenz Glycin-Phenylalanin-Leucin-Glycin (GFLG), welche die Spaltung des Oligomers von dem Lipid ermöglicht und damit die Aufnahme in die Zelle erhöht. Die GFLG-Sequenz kann durch die lysosomale Cysteinprotease Cathepsin B gespalten werden^[165-167], die sich in endozytären Vesikeln sowie in hohen Konzentrationen in verschiedenen Tumorzellen befinden. Diese Tumorzellen sind in der Lage das Cathepsin B in die extrazelluläre Matrix abzusondern.^[265] Daher stellt das Design von Drug-Delivery-Vesikeln, die sich die erhöhten Konzentrationen von Cathepsin B innerhalb und außerhalb von malignen Zellen gezielt zunutze machen, einen vielversprechenden Ansatz dar. Für die GFLG-Spaltung durch Cathepsin B kommen mehrere Möglichkeiten in Frage. Das GFLG könnte durch das im extrazellulären Raum befindliche Cathepsin B in der Nähe von Tumorzellen gespalten werden und so zur Ablösung der Oligo(amidoamin)-Schutzhülle und anschließenden Aufnahme des Lipids führen. Eine andere Möglichkeit wäre die Aufnahme der Liposomen in die Zelle und die anschließende Spaltung der GFLG-Sequenz im Endosom. Die dritte Struktureinheit bildet das Phospholipid 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin-*N*-succinyl-Natrium-Salz (DOPES).

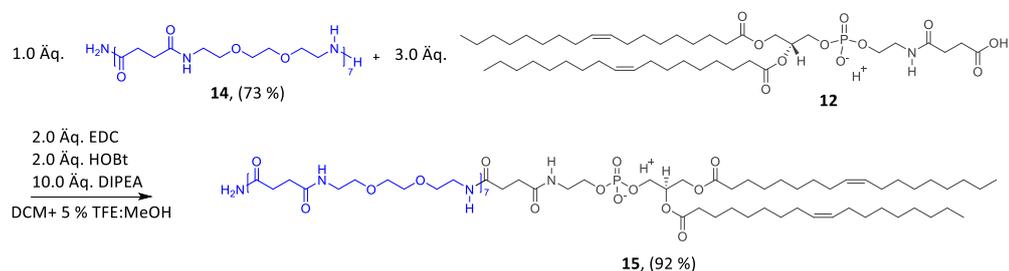
Zur Synthese des Oligo(amidoamin)-Lipo-Makromoleküls (siehe Schema 4a) wurde das Hepta-EDS-GFLG-NH₂ zunächst mittels der von *Hartmann et al.*^[52] etablierten Festphasenpolymersynthese (siehe *Kapitel 1.1.2.2*) durch Aneinanderreihung von sieben EDS-Bausteinen und anschließender Kupplung der Aminosäuren synthetisiert. Nach Abspaltung von der Festphase wurde das Oligo(amidoamin) mit

Hilfe der präparativen RP-HPLC von möglichen Abbruchsequenzen getrennt, wodurch eine Substanzreinheit von > 99 % erreicht werden konnte (bestimmt anhand der RP-HPLC, siehe *Anhang*). Anschließend wurde das DOPES an das Oligo(amidoamin) unter der Verwendung der Kupplungsreagenzien 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC), 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und Diisopropylethylamin (DIPEA) unter Stickstoff-Atmosphäre aneinander gekuppelt. Nach einer Reaktionszeit von 24h wurde das Produkt in Diethylether gefällt und mehrmals gewaschen. Nach der Entfernung des Lösungsmittels konnte das Produkt 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin-*N*-succinyl-Gly-Phe-Leu-Gly-Oligo(amidoamin)-Natrium-Salz (DOPES-Pep-OI, **13**) mit einer Ausbeute von 31 % erhalten werden.

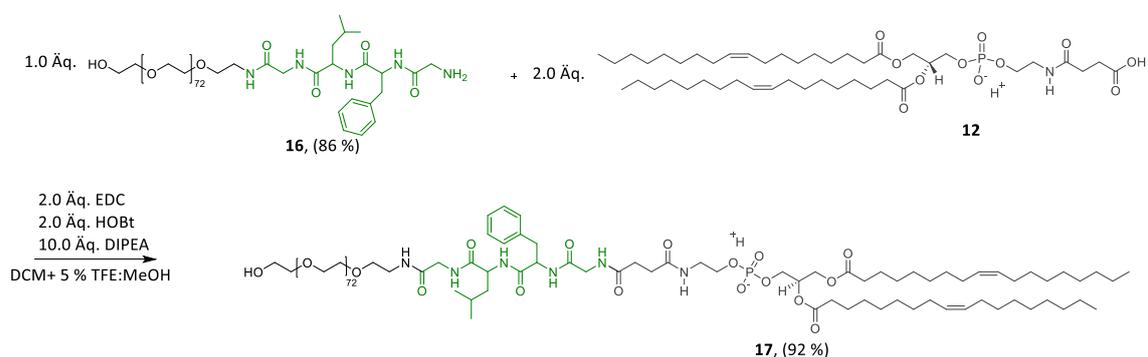
a)



b)



c)



Schema 4: Reaktionsgleichungen der synthetisierten Oligo(amidoamin)-Lipo-Makromoleküle. Das Oligo(amidoamin) (blau) und das GFLG (grün) wurden farblich gekennzeichnet. (a) DOPES-Pep-OI, (b) DOPES-OI, (c) DOPES-Pep-PEG.

Weiterhin wurden zwei Kontrollstrukturen synthetisiert. DOPES-OI (**15**, 92 %, Schema 4b) wurde ohne die spaltbare Peptideinheit hergestellt, damit eine ungespaltene Liposom-Aufnahme in Zellen

untersucht werden kann. Bei der dritten Struktur (DOPES-Pep-PEG, **17**, 92 %, Schema 4c) wurde das Oligo(amidoamin) durch ein PEG mit einem Molekulargewicht von 3200 Da ersetzt. Hierbei sollen die Eigenschaften des Oligomers im direkten Vergleich zu PEG untersucht werden. Zur Herstellung von **17** wurde das PEG-GFLG-NH₂ unter Verwendung des PAP-Harzes mit konjugierten PEG₇₂ synthetisiert, indem die Peptid-Einheit sequenziell an das Polymer gekuppelt wurde. Nach der Abspaltung vom Harz wurde das Polymer-Peptid-Konjugat wie bereits beschrieben an das DOPES konjugiert. Die Oligoamidoamin-Strukturen wurden anhand RP-HPLC und ¹H-NMR (siehe *Anhang*), die Lipid-Konjugate wurden anhand MALDI-TOF-MS und ¹H-NMR verifiziert (siehe *Anhang*). Abbildung 34 zeigt die ¹H-NMR-Spektren der drei Strukturen im direkten Vergleich.

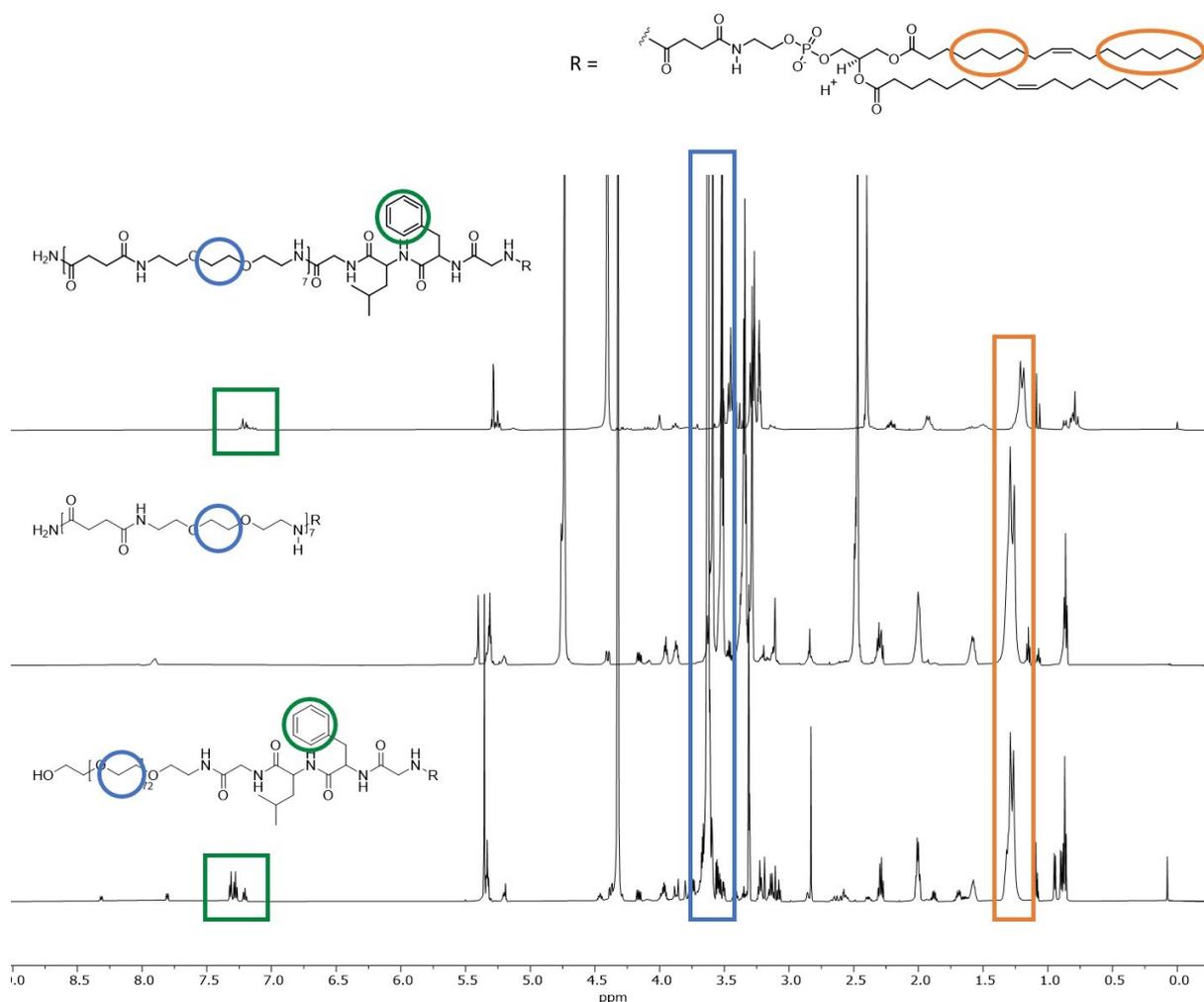


Abbildung 34: ¹H-NMR-Spektren der Oligo(amidoamin)/PEG-Lipo-Makromoleküle DOPES-Pep-OI (oben), DOPES-OI (mitte) und DOPES-PEG (unten). Die obere und mittlere Struktur wurde in Dichlormethan:Methan 1:4 (v/v) und die untere Struktur in Dichlormethan:Methan 1:1 (v/v) bei 600 MHz gemessen. Das DOPES-Pep-OI wurde bei 300 MHz gemessen.

Die drei unterschiedlichen Domänen erzeugen charakteristische Signale, an denen der Erfolg der Kupplung kontrolliert wurde. Einige von ihnen wurden farblich hervorgehoben. Die im Tieffeld bei ca. 7.22 ppm befindlichen Protonensignale können den Aryl-Protonen des Phenylalanins zugeordnet

werden (grüner Kasten). Diese spalten sich in zwei Triplets für die zwei Meta-Protonen und dem Para-Proton auf, sowie einem Duplett für die zwei an der Ortho-Position befindlichen Wasserstoff-Atome. Da das DOPES-OL-Lipo-Makromolekül keine Peptideinheit trägt, sind diese Signale in dem NMR nicht detektiert worden. Der Beweis für die erfolgreiche Kupplung des Lipids wurde an dem im Hochfeld bei 1.28 ppm freistehenden Multipllett festgestellt (oranger Kasten). Diese werden den Methylen-Protonen der Alkyl-Kette zugewiesen und sollen ein Integral von 40 Protonen ergeben. Die Methylen-Protonen der Glykol-Einheiten, die sich sowohl bei dem EDS-Baustein als auch dem PEG befinden, sind als Singulett bei einer chemischen Verschiebung von 3.60 ppm (blauer Kasten) detektiert worden. In den ^1H -NMRs der Produkte DOPES-OL und DOPES-Pep-PEG wurden einige Verunreinigungen festgestellt, die dem EDC-HCl-Salz zugeordnet werden können. Anhand des NMRs konnten eine Kontamination des Produktes mit jeweils 2.6 gew-% und 3.7 gew-% des EDC-HCl-Salz festgestellt werden. Dieses stellt für die Generierung der Liposome kein Hindernis dar und kann durch zahlreiche Reinigungsschritte im Herstellungsprozess entfernt werden.

3.2.2 Synthese und Analyse der Oligo(amidoamin)-Lipo-Makromolekül-Liposome

Die Herstellung und die Analyse der Liposome wurden von Stefan Bleher durchgeführt (siehe Dissertation, Bleher, S.: Evaluation of novel lipopolymers to impart stealth-like properties to liposomes^[266])

Dabei untersuchte er zunächst die Biokompatibilität und damit die Toxizität der Oligo(amidoamin)-Lipid-Konjugate an HeLa-Zellen. Diese wurden mit den Ergebnissen von DSPE-mPEG2k verglichen, einer "Stealth"-Komponente, die bereits häufig in zugelassenen Drug-Delivery-Systemen verwendet wird. Die Oligo(amidoamin)-Konjugate zeigten eine gute Biokompatibilität, da sie selbst in Konzentrationen, die um ein Vielfaches höher waren als die in den regulären Zell- und Zebrafisch-Versuchen verwendeten Konzentrationen, keine Zytotoxizität aufwiesen.

Die Herstellung der Liposome fand mittels der Post-Insertion-Technik (PIT) statt, bei dem die Lipopolymere selektiv in die äußere Schicht der vorgeformten Liposomen integriert werden. Die Charakterisierung der Liposomen ergab eine monodisperse Größenverteilung mit überwiegend großen unilamellaren Vesikeln mit hydrodynamischen Durchmessern von 114 nm (PDI 0.06) für die Oligo(amidoamin)-Lipo-Makromoleküle und 125 nm (PDI 0.06) für das DOPES-Pep-PEG (siehe Cryo-TEM-Bilder Abb. 35a). Des Weiteren wurde die Oberflächenladung der Liposome bestimmt und sie mit dem ζ -Potential des freien DOPES-Liposomes ohne konjugiertes Polymer verglichen. Letzteres zeigt aufgrund der negativen Ladung der Phosphat-Gruppe ein negatives Potential von -41 mV an. Die Konjugation der Oligo(amidoamine) und des PEGs bewirkt eine Reduktion der Oberflächenladung auf

einen quasi neutralen Wert von -10 mV bzw. -4 mV. Dies zeigt, dass die Ladung des DOPES durch Konjugation des Oligomers oder Polymers erfolgreich abgeschirmt wird.

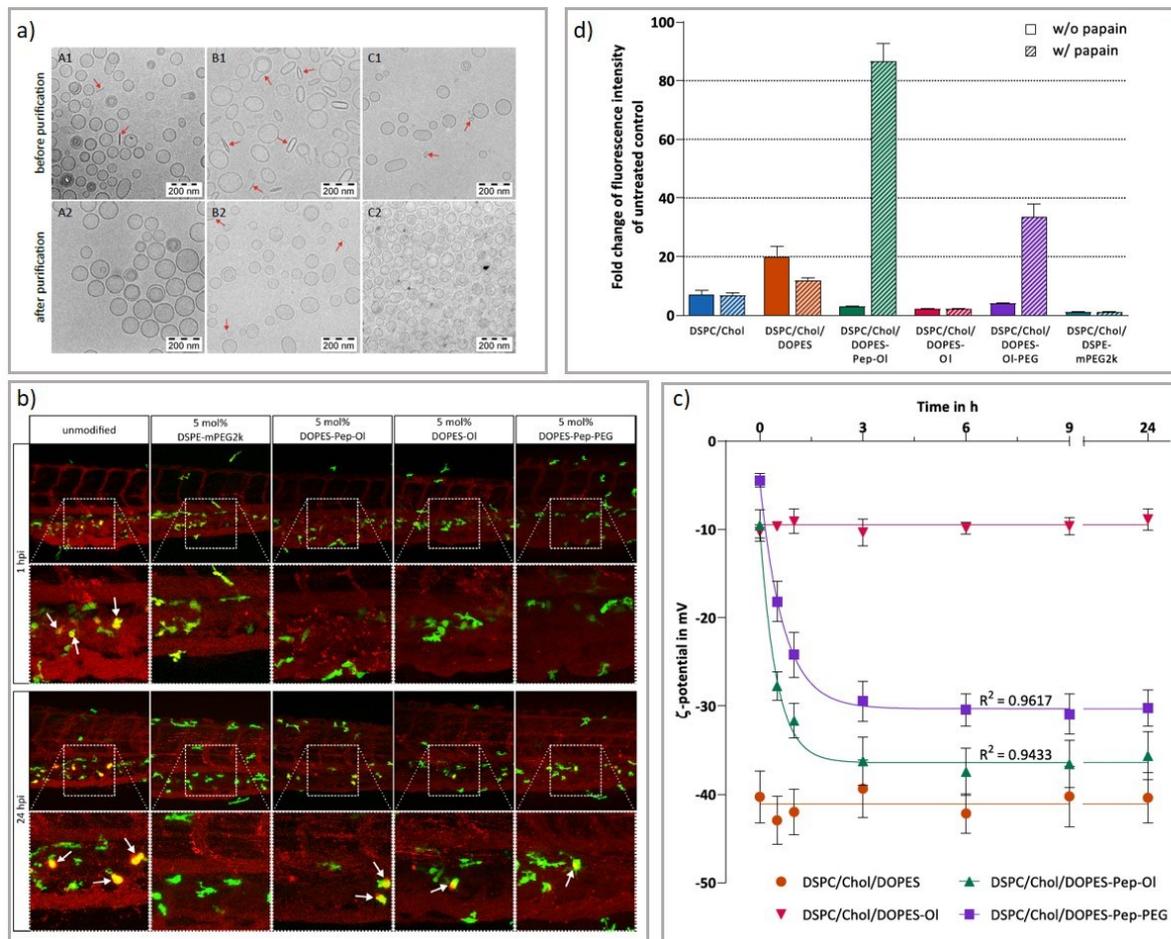


Abbildung 35: Ergebnisse aus Herstellung und Analyse der Oligo(amidoamin)-Lipo-Makromolekül-Liposome. (a) Cryo-TEM-Aufnahmen der mit DOPES-Pep-OI (A), DOPES-OI (B) und DOPES-Pep-PEG (C) modifizierte Liposomen vor und nach der Aufreinigung. Pfeile zeigen scheibenartige und wurstartige Vesikel und andere ungewöhnliche Strukturen an. (b) Makrophagen-Aufnahme von Oligo(amidoamin)-modifizierten Liposomen in Zebrafischlarven. Konfokale Bilder der Schwanzregion wurden nach 1 h und 24 h aufgenommen. Die Kolo-kalisation von grün fluoreszierenden Makrophagen und rot fluoreszierenden Liposomen ergibt gelbe Flecken (durch weiße Pfeile gekennzeichnet). (c) Änderung des ζ -Potentials verschiedener mit Papain behandelter liposomaler Formulierungen. Unmodifizierte Liposomen (roter Kreis), mit DOPES-Pep-OI modifizierte Liposomen (grünes Dreieck), mit DOPES-Pep-OI modifizierte Liposomen (pinkes Dreieck) und mit DOPES-Pep-PEG modifizierte Liposomen (lila Viereck). Entsprechende Linien für Kontrollliposomen wurden zur besseren Veranschaulichung hinzugefügt und stellen keine linearen Regressionskurven dar. (d) Aufnahme von Oligo(amidoamin)-modifizierten Liposomen und Kontrollen in HeLa-Zellen vor (gefüllte Balken) und nach (gestrichelte Balken) Behandlung mit Papain. (Kollage erstellt durch Übernahme der Abbildung aus der Dissertation von S. Bleher [266])

Weiterhin wurde die Ausscheidung von DOPES-Pep-OI modifizierten Liposomen durch Makrophagen wurde *in vivo* in transgenen Zebrafischen untersucht (siehe Abb. 35b). Dazu wurden mit dem Farbstoff Dil markierte Liposomen in den Blutkreislauf von Zebrafischen injiziert. Das Zirkulationsverhalten der drei Konjugate wurde im Vergleich zu unmodifizierten Liposomen und dem DSPE-mPEG2k nach 1 h und 24 h untersucht. Nach 1 h konnte bereits eine Kolo-kalisation von Makrophagen und unmodifizierten Liposomen nachgewiesen werden, was auf eine Ausscheidung durch Makrophagen hinweist. Dagegen zeigten die oberflächenmodifizierte Liposomen zu diesem Zeitpunkt keine

Kolokalisation, was auf ein gutes Zirkulationsverhalten hinweist. Die Unterschiede zwischen den Formulierungen waren nach 24 h stärker ausgeprägt. Unmodifizierte Liposomen zeigten eine starke Kolokalisierung mit Makrophagen, was auf schlechte Zirkulationseigenschaften hindeutet. Eine signifikante Erhöhung der Makrophagen-Ausscheidung wurde auch für die mit DOPES-Pep-OI modifizierten Liposomen beobachtet. Darüber hinaus gab es nur eine geringe Kolokalisation für DOPES-OI und DOPES-Pep-PEG modifizierte Liposomen und Makrophagen. Im Vergleich dazu zeigten die Kontroll-Liposomen mit DSPE-mPEG2k eine minimale Kolokalisation auf. Zusammengefasst konnte nach der Modifikation mit DOPES-Pep-OI oder der beiden anderen Lipo-Makromoleküle keine vergleichbaren Zirkulationseigenschaften wie mit DSPE-mPEG2k erreicht werden. Insbesondere die erhöhte Makrophagen-Ausscheidung ist ein starker Indikator für eine schlechtere Wirksamkeit. Dennoch zeigen die Ergebnisse eine Verbesserung gegenüber unmodifizierten Liposomen.

Neben dem Oligo(amidoamin) war das spaltbare GFLG-Peptid eine wichtige Domäne bei der Herstellung der Lipo-Makromoleküle, welche nach der Spaltung für eine erhöhte Aufnahme der Liposome in die Zellen gewährleisten soll. Die Degradierung wurde mit einer kostengünstigeren Alternative zu Cathepsin B durchgeführt, der Cysteinprotease Papain.^[207] Der Abbau der Tetrapeptide wurde mittels ζ -Potential-Analyse kontrolliert und mit den Werten von DOPES-OI-modifizierte Liposomen und DOPES-Liposomen verglichen (siehe Abb. 35c). Die Liposomen wurden mit präinkubierter Papain-Lösung inkubiert, wobei das ζ -Potential über einen Zeitraum von 24 h überwacht wurde. Wie erwartet, blieb das ζ -Potential für DOPES-OI-modifizierte Liposomen über den Zeitverlauf unverändert bei etwa -10 mV. Ähnliche Beobachtungen wurden für DOPES Kontroll-Liposomen erhalten. Das ζ -Potential lag hier konstant bei etwa -41 mV. Beide Strukturen enthalten keine spaltbare Peptideinheit. Eine Veränderung der Oberflächenladung wurden demnach nicht erwartet. Das ζ -Potential von DOPES-Pep-OI-modifizierten Liposomen lag zunächst bei etwa -10 mV. Anschließend wurde nach 0.5 h wurde eine starke Abnahme auf -28 mV beobachtet und erreichte nach 3 h ein Gleichgewicht von ca. -36 mV. Analog dazu verhielt sich das Potential von DOPES-Pep-PEG-modifizierten Liposomen. Die anfängliche -Spannung von -4 mV fiel nach 0.5 h stark auf etwa -18 mV ab und letztlich auf -29 mV nach 3 h Inkubationszeit. Wie bei den DOPES-Pep-OI-modifizierten Liposomen wurde nach 3 h ein Gleichgewicht erreicht und die Spannung blieb unverändert. Die Abnahme der ζ -Potentialwerte der beiden spaltbaren Lipo-Makromoleküle ist ein Beweis für den erfolgreichen Abbau der Tetrapeptidsequenz.

Der Einfluss der GFLG-Spaltung auf die Aufnahme von Oligo(amidoamin)-modifizierten Liposomen wurde in HeLa-Zellen untersucht. Hierfür wurde die Aufnahme der Liposome vor und nach der Peptidspaltung geprüft (siehe Abb. 35d). Die Zellen wurden für 3 h mit den Liposomen inkubiert. Unmittelbar vor der Zugabe der Liposomen zu den Zellen wurde für 3 h eine GFLG-Spaltung

durchgeführt. Zusätzlich wurden verschiedene Kontroll-Liposomen hergestellt, um den Einfluss von Papain auf die Aufnahme zu ermitteln. Vor der Inkubation mit Papain war die Fluoreszenzintensität bei allen Liposomen, die mit Oligo(amidoamin)-Derivaten modifiziert wurden um das Zwei- bis Vierfache im Vergleich zu den unbehandelten Zellen erhöht. Diese Aufnahme war signifikant geringer als bei den beiden unmodifizierten Kontroll-Liposomen-Proben DSPC/Chol und DCPC/Chol/DOPES (sieben- und zwanzig-fache Aufnahme) und eher in einem ähnlichen Bereich wie für PEGylierte Liposomen, welches aufgrund der Stealth-Eigenschaften des PEGs nur eine etwa um 1.2-fach erhöhte Aufnahme aufweisen konnte. Komplementär zu diesen Beobachtungen wuchs die zelluläre Aufnahme der Liposomen, die mit DOPES-Pep-OI und DOPES-Pep-PEG modifiziert wurden, nach der Inkubation mit Papain stark an. Die Aufnahme stieg auf das 85-fache bzw. 33-fache für DOPES-Pep-OI- und DOPES-Pep-PEG-modifizierte Liposomen. Wegen der fehlenden spaltbaren Peptideinheit blieb die Aufnahme der DOPES-OI-modifizierten Liposome auch nach der Behandlung mit Papain konstant. Unterschiede in der Aufnahme, die beim Vergleich von DOPES-Pep-OI und DOPES-Pep-PEG-modifizierten Liposomen vor und nach der Papain-Behandlung beobachtet wurden, lassen sich durch die erfolgreiche Spaltung von GFLG und damit einen Verlust des Oberflächenschutzes erklären. Die nun frei-liegenden Carboxylgruppen führen zu einer Zunahme der liposomalen Oberflächenladung, welche die Zellaufnahme begünstigt.^[267] Zusätzlich könnten die nach der Spaltung auf der liposomalen Oberfläche verbleibenden Aminosäurereste die Aufnahme weiter beeinflussen.^[268]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Post-Insertion-Technik erfolgreich zur Herstellung der DOPES-Pep-OI-modifizierten Liposomen geführt hat. Das Zirkulationsverhalten dieser Liposome in den Zebrafischlarven verbesserte sich im Vergleich zu der unmodifizierten Liposomen. Allerdings konnten diese Ergebnisse nicht mit den bereits verwendeten PEGylierten Liposomen mithalten. Weiterhin konnte eine Spaltung des GFLG-Linkers in unmittelbarer Nähe der liposomalen Oberfläche nachgewiesen werden. Ein durch Cathepsin B ausgelöstes Abspalten der Oligomer-Schutzschicht in unmittelbarer Umgebung zum Tumor könnte eine Verbesserung der Aufnahme in die Zelle ermöglichen.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war die Synthese von Leucin-basierten Peptid-Präzisionsmakromolekül-Konjugaten (PPMK) zur Herstellung von Aggregaten für zukünftige Anwendungen im biomedizinischen und biotechnologischen Bereich. Die Peptid-Konjugate besitzen die Fähigkeit durch Selbstassemblierung dreidimensionale Gerüste auszubilden, die als Wirkstofftransport, in der Wundheilung oder der Zellkultivierung eingesetzt werden können. In Anbetracht dessen sollte durch gezielte Steuerung der Präparationsmethode sowohl PPMK-Nanopartikel als auch PPMK-Makrogele erzeugt werden.

Im ersten Schritt wurde mittels der Festphasensynthese eine Reihe von PPMKs mit Oligoleucin als Peptidmotiv synthetisiert, die sich in Architektur, Valenz und Peptid-Kettenlänge unterschieden. Über den „grafting-to“-Syntheseweg wurden Ppropf-co-PPMKs hergestellt, die ein, zwei oder drei Leucin-Seitenketten an dem Oligo(amidoamin)-Rückgrat trugen. Wegen den PEG-ähnlichen, hydrophilen Eigenschaften wurde der von *Hartmann et al.*^[52] entwickelte EDS-Baustein zum Aufbau des Oligomer-Rückgrats verwendet. Die synthetisierten Ppropf-co-PPMKs unterschieden sich nicht nur in der Anzahl der Valenz, sondern auch in der Länge der Homoleucin-Kette. Auf diese Weise sollte festgestellt werden, wie viele Leucin-Einheiten für eine erfolgreiche Aggregation der Konjugate notwendig sind und ob das Rückgrat die Ausbildung einer Sekundärstruktur positiv beeinflusst. Demnach wurden jeweils drei Ppropf-co-PPMKs mit Pentaleucin- und mit Dileucin-Seitenketten synthetisiert. Hier konnte festgestellt werden, dass mit steigender Valenz und steigender Peptid-Kettenlänge, die Reinheit der Produkte kontinuierlich sank. Auch konnte das trivalente Dileucin-Konjugat nicht als Hauptprodukt isoliert werden, sondern eine Abbruchsequenz mit insgesamt vier Leucin-Einheiten. Dies zeigt, dass mit Zunahme der Leucin-Einheiten gleichzeitig der hydrophobe Anteil der Strukturen erhöht wird, welches die Konjugate an der Festphase kollabieren lässt. Um das Ausfallender Strukturen während der Synthese künftig zu vermeiden, könnten chaotrope Salze, wie das Guanidinhydrochlorid (GdnHCl) der Reaktionslösung zugesetzt, oder die Reaktionstemperatur erhöht werden. Weiterhin ist die Verwendung der Mikrowellen-Technologie^[269] möglich, die häufig zur Herstellung von anspruchsvollen Peptiden genutzt wird. Neben den verzweigten Konjugaten wurden vier lineare PPMKs synthetisiert. Zwei der Block-co-PPMKs sind Diastereomere, die sich in der Anordnung der Leucin-Einheiten unterscheiden. So wurden fünf Leucin-Einheiten entweder verteilt oder sequenziell in das Oligo(amidoamin)-Rückgrat integriert. Des Weiteren wurde das freie Pentaleucin und ein PEG-Pentaleucin-Konjugat synthetisiert.

Im weiteren Schritt wurde das Aggregationsverhalten der PPMKs in Abhängigkeit zu der Struktur untersucht. Das Ziel war es zu ermitteln, ob die Konjugate Sekundärstrukturen ausbilden, die über

Selbstassemblierungsprozesse die Formierung zu überdimensionalen Gebilden ermöglicht. Während die Analyse mit der FTIR-Spektroskopie allen PPMKs die Fähigkeit zur Ausbildung von β -Faltblättern zugewiesen hat, konnte mittels CD-Spektroskopie eindeutig geklärt werden, dass nur das divalente und trivalente Ppropf-co-PPMK sich zu Faltblatt-Strukturen anordnet. Das lineare PPMK, bei dem die Leucine in dem Rückgrat verteilt waren, konnte keine Sekundärstruktur ausbilden und ist somit nicht geeignet für die hier angestrebte Anwendung. Für alle anderen PPMKs war keine eindeutige strukturelle Zuordnung möglich, da die Strukturen eine Mischung aus ungeordneten und β -Faltblättern ausbilden. Da das CD eine schwache Tendenz der Ppropf-co-PPMKs mit Dileucin-Seitenketten zur Ausbildung einer Sekundärfaltung andeutete, konnte auch in diesem Fall die Formation zu stabilen Aggregaten ausgeschlossen werden.

Die Erkenntnisse aus der CD-Spektroskopie wurden durch Löslichkeitsstudien mit GdnHCl in Kombination mit dem an β -Faltblatt-Strukturen bindenden Farbstoff Thioflavin T (ThT) unterstützt. Mit der Zugabe des Denaturierungsmittels GdnHCl, sollte die Stärke der Sekundärfaltung untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass das monovalente, verzweigte PPMK sowie die linearen Konjugate PEG-Pentaleucin und das Oligo(amidoamin)-Pentaleucin mit erhöhter Gdn⁺-Konzentration sich strukturell nicht veränderten. Diese Strukturen waren demnach nicht in der Lage stabile Sekundärstrukturen auszubilden und sind folglich ebenfalls ungeeignet zur Herstellung von Aggregaten. Überraschenderweise brachte die Studie für das freie Pentaleucin und die beiden multivalenten Ppropf-co-PPMKs unerwartete Ergebnisse. Erst mit Unterstützung des Farbstoffs ThT konnte hinreichend geklärt werden, dass eine geringe Konzentration an Gdn⁺-Kationen durch Koordination an die Amid-Gruppen des Peptids, eine intermolekulare Wechselwirkung der Pentaleucin-Ketten induzierte und zur Bildung β -Faltblatt-ähnlicher Strukturen führte. Das Dimer- und Trimer-Konjugat zeigten im CD mit kontinuierlicher Zugabe des Salzes ebenfalls eine zunehmende Ausbildung der Sekundärfaltung. Die Überprüfung mit ThT offenbarte dagegen mit steigender Gdn⁺-Konzentration eine stetige Denaturierung der Konjugate. Dies lässt vermuten, dass mit Erhöhung der Salz-Konzentration einzelne Konjugat-Moleküle aus dem kollabierten Aggregat-Netzwerk durch Brechen der intermolekularen Wechselwirkungen abgespalten wurden. Da die Strukturen folglich in Lösung vorlagen und trotzdem β -Faltblätter durch intramolekulare Interaktionen ausbilden konnten, wurden sie mit einer steigenden Intensität vom CD-Spektrometer detektiert. Die Kombination aus den Ergebnissen der Gdn⁺- und den ThT-Studien zeigen, dass das Dimer nach einer Konzentration von 6 M GdnHCl vollständig aufgebrochen wurden. Wegen der zusätzlichen Peptidkette des Trimers und der damit erhöhten Fähigkeit intramolekular miteinander zu interagieren, konnte selbst nach ab 6 M GdnHCl keine vollständige Denaturierung festgestellt werden.

Dass das Dimer und das Trimer bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen β -Faltblatt-Strukturen ausbilden, konnten anhand der Studien zur kritischen Aggregationskonzentration (KAK) mit ThT nachgewiesen werden. So bildeten die beiden multivalenten Konjugate bereits bei der niedrigsten gemessenen Konzentration (bei ca. $40 \mu\text{g ml}^{-1}$) höher geordnete Strukturen aus. Im Vergleich dazu bildete das reine Pentaleucin selbst bei 1 mg ml^{-1} keine Sekundärstruktur aus. Dies verdeutlicht, dass eine multivalente Dekoration der Konjugate mit den Peptiden essenziell für eine erfolgreiche Aggregation ist. Interessanterweise zeigen die monovalenten Konjugate, das verzweigte Unimer und das lineare Pendant, bei dem die Leucine nacheinander im Rückgrat integriert wurden, eine konzentrationsabhängige Aggregation ab etwa 0.2 mg ml^{-1} . Die im Vergleich zum freien Peptid verstärkte Aggregation kann durch den Einfluss der im Rückgrat befindlichen Amide interpretiert werden. Dennoch, die unterschiedliche Architektur (Pfropf vs. Block) deutet nicht auf ein verändertes Verhalten in der Aggregation hin. Da ab einer Valenz von zwei Peptid-Einheiten eine eindeutige Ausbildung von Sekundärstrukturen erreicht werden kann, müssten zur Untersuchung dieser Fragestellung ebenfalls multivalente Block-*co*-PPMKs synthetisiert werden, die zwei bzw. drei Pentaleucin-Blöcke besitzen. Obwohl das ThT ein geeignetes Werkzeug zur Ermittlung der Faltblatt-Strukturen ist, hat es den Nachteil, dass es nicht signifikant mit kleinen Aggregationsintermediaten von unter vier β -Strängen zu interagieren scheint.^[240] Somit sind die wahren kritischen Aggregationskonzentrationen der PPMKs möglicherweise niedriger, als in dieser Arbeit ermittelt. In der Literatur werden bereits alternative Farbstoffe^[270-271] eingesetzt, die ebenfalls zur Bestimmung der Leucin-basierten PPMKs verwendet werden könnten.

Da das divalente und trivalente Pfropf-*co*-PPMK bereits bei niedrigen Konzentrationen stabile Sekundärstrukturen ausbilden, waren sie die geeigneten Kandidaten zur Herstellung von Aggregaten. Durch eine gezielte Steuerung der Präparationsparameter konnten makroskopische Gele oder nanoskalierbare Gelpartikel erzeugt werden. Der Vernetzungsgrad der in DMSO gequollenen Organogele wurde mittels des Rheometers bestimmt. Die Analysen ergaben hohe Gelstärken mit Speichermodulen G' von 10 bzw. 20 kPa für das Dimer- bzw. Trimer-Organogel. Weiterhin wurden Studien zu den mechanischen Eigenschaften von Organogelen unter Verwendung eines Multikomponentensystems durchgeführt, indem Mischgele aus zwei verschiedenen PPMK-Konjugaten hergestellt wurden. Hierfür wurden die multivalenten Konjugate mit dem Pentaleucin oder dem PEG-Pentaleucin-Konjugaten in definierten Verhältnissen vermischt. Die Untersuchungen der Multikonjugat-Gele haben gezeigt, dass die Gelstärken der Dimer- und Trimer-Gele durch Zugabe der reinen Peptid-(Polymer-)Sequenz angepasst werden kann. Unter Verlust des Vernetzungsgrades konnten viskosere Gele von Speichermodulen zwischen $G' = 0.7$ und 5 kPa erzeugt werden. Die

Verwendung des Pentaleucins in dem Verhältnis 1:2 bzw. 1:3 führte sogar zum vollständigen Bruch der Gelstruktur.

Die Herstellung der Nanopartikel erfolgte mittels der Solvent-Switch-Methode. Die Größe der gebildeten Partikel wurde anschließend sofort mittels DLS bestimmt. Diese verdeutlichten, dass die Reduktion der Konjugat-Konzentration mit der Reduktion der Partikelgröße einhergeht, wobei das Trimer grundsätzlich größere Partikel erzeugte als das Dimer. Interessanterweise wurden bei dem reinem Pentleucin definierte, kleine Partikel bei Verwendung von hohen Konjugat-Konzentrationen erzeugt. Vermutlich deutet dies auf ein oberflächenaktives Verhalten des Peptids hin, das bei hohen Konzentrationen zur Ausbildung Mizellen-artiger Partikel führt. Zur eindeutigen Aufklärung dieser Hypothese sollte im weiteren Schritt die Oberflächenspannung der Pentaleucin-Lösung bei unterschiedlichen Konzentrationen bestimmt werden.

Analog zu den Organogel-Studien, wurden Partikel aus Multikomponentensystemen erzeugt und die Partikelgrößen ebenfalls mittels DLS untersucht. Erstaunlicherweise zeigen Mischungen aus den Konjugaten mit Pentaleucin eine Reduktion der Partikelgröße auf 25 – 30 nm. Dabei scheint der Anteil des freien Peptids in der Mischung, ob äquimolar zur Konjugat-Konzentration oder äquivalent zu der Anzahl der Pentaleucin-Seitenketten, keinen Einfluss auf die resultierenden Partikelgröße zu haben. Stattdessen wurden Partikel mit nahezu monodisperser Größenverteilung mit niedrigen PDI erhalten. Mischungen mit dem PEG-Pentaleucin-Konjugat zeigten dagegen eine geringe Größenreduktion. Grund dafür könnte die Abschirmende Wirkung des PEGs^[257] sein, welches die Pentaleucin-Einheit oder die bereits gebildeten Mischkonjugat-Partikel umhüllt und auf diese Weise eine Wechselwirkung zu weiteren Konjugaten verhindert.

Ähnliche Resultate wurden bei der Bestimmung der Nanopartikel-Aggregation mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) erhalten. Obwohl eine eindeutige Aufklärung der TEM-Bilder schwierig war, konnte die gleiche Tendenz wie bei den DLS-Analysen festgestellt werden. Diese zeigte, dass mit Zunahme des freien Pentaleucin-Anteils in der Mischkonjugat-Lösung eine Verringerung der Partikelgrößen erreicht werden kann. Die Verwendung von TEM birgt einige Nachteile, z.B. die Trocknung der Proben auf dem Kupfer-Raster und die damit resultierende Veränderung der Partikelgröße und -form. Um dieses Problem zu umgehen, könnten in weiteren Schritten Kryo-TEM-Aufnahmen generiert werden. Das Einfrieren der Partikellösungen ermöglicht die Bestimmung der Partikel-Morphologie in Lösung^[272] und gleichzeitig einen direkten Vergleich zu den DLS-Daten.

Im letzten Schritt wurden Toxizitätsstudien ausgewählter (Misch-)Konjugat-Partikel an gesunden Brustzellen und krankhaften Brustkrebszellen durchgeführt. Bei beiden Zelllinien konnte keine

Einschränkung der Zell-Viabilität bei Konzentrationen zwischen 0.3 und 30 μM festgestellt werden. Dies könnte daran liegen, dass Oligoleucine sich bevorzugt toxisch bei myeloischen Zelllinien verhielten.^[260-261] Ob dies auch der Fall für die Leucin-basierten PPMKs ist, könnte in Toxizitätsstudien an Blutzellen nachgewiesen werden. Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob die Partikel überhaupt von den Zellen aufgenommen werden. Hierzu sollten die Partikel mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden und die Zellen nach der Exposition mit den Konjugaten unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden. Dabei wäre die Zugabe des hydrophoben Farbstoffs während der Partikel-Herstellung sinnvoll, sodass dieser in dem Partikelkern eingeschlossen werden kann. Eine kovalente Konjugation des Farbstoffs an das PPMK-Molekül sollte allerdings vermieden werden, da die hohe Hydrophobie des Farbstoffs sich negativ auf die Löslichkeit des ohnehin schon schwer-löslichen Konjugats auswirken kann.

Ein Nebenprojekt dieser Arbeit, war die Herstellung von Lipid-Makromolekül-Konjugaten, bei dem das Oligo(amidoamin) Hepta-EDS als PEG-Alternative zur Oberflächenmodifizierung von Liposomen untersucht wurde. Hierzu wurde das Konjugat DOPES-Pep-OI synthetisiert, welches zusätzlich zu dem Phospholipid DOPES und dem Oligo(amidoamin) die spaltbare Peptideinheit GFLG trug. Um einen direkten Vergleich zu den mit PEG-modifizierten Lipiden zu erhalten, konnten außerdem das Derivat DOPES-Pep-PEG erfolgreich synthetisiert werden. Als weitere Kontrollstruktur wurde das DOPES-OI ohne spaltbare GFLG-Einheit hergestellt. Die Herstellung und Analyse der Liposome wurde von *S. Bleher* von der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau, durchgeführt. Die Studien zeigten, dass die Strukturen keine Zytotoxizität gegenüber HeLa-Zellen entwickelten. Dennoch wiesen Experimente an Zebrafischlarven eine schlechtere Leistung der Oligo(amidoamine)-Liposome im Vergleich zu den bereits verwendeten PEGylierten Liposome auf. Nichtsdestotrotz konnte durch Aufnahmestudien in HeLa-Zellen festgestellt werden, dass die spaltbare GFLG-Sequenz eine interessante Möglichkeit bietet, die Oligo(amidoamin)-Schutzschicht in unmittelbarer Zellnähe abzulösen und somit die Aufnahme zu verbessern.

5 Experimenteller Teil

5.1 Material

Alle Reagenzien und Lösungsmittel wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Diethylether (mit BHT als Inhibitor, $\geq 99.8\%$), Triisopropylsilan (TIPS) (98%), Triethylsilan (99%), konz. Salzsäure (p.a.), Oxalylchlorid ($\geq 99\%$), 4-Pentinsäure (95%), Hydroxybenzotriazol (HOBt) (97%), Hydrocortison ($\geq 98\%$), Choleratoxin ($\geq 90\%$), menschlicher epidermaler Wachstumsfaktor (human epidermal growth factor, EGF) und Insulin ($\geq 99\%$) wurden von Sigma-Aldrich erworben. *N,N*-Diisopropylethylamine (DIPEA) ($\geq 99\%$) und Guanidinhydrochlorid ($> 98\%$) wurden von Carl Roth erworben. Fmoc-L-Leu-OH ($\geq 99\%$, Iris Biotech). Fmoc-Lys(Boc)-OH ($\geq 99\%$) und Thioflavin T ($\geq 99\%$) wurden von Merck erworben. Ethyl trifluoroacetate (99%, Alfa Aesar). Methanol (p.a.), Essigsäure (99.7%) und Fetales Kälberserum ($> 96\%$) (fetal bovine serum, FBS) wurden von VWR BDH Prolabo Chemicals erworben. Dimethylformamid (DMF) (99.8%, für die Peptidsynthese), Piperidine (99%), Triphenylmethylchlorid (Trt-Cl) (98%), Bernsteinsäureanhydrid (99%) und 1,4-Dioxane (99.5%) wurden von Acros Organics erworben. 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin-*N*-bersteinsäure ($\geq 99\%$, Avanti). (Dichloromethane (DCM) (99.99%), Tetrahydrofuran (THF) (Analytische Qualität), Ethylacetat (Analytische Qualität), Natriumhydrogencarbonat (Analytische Qualität) und Toluol (Analytische Qualität) wurden von Fisher Scientific erworben. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC, GE Healthcare Bio-Sciences). Kaliumcarbonate (für die Analyse), Zitronensäure (für die Analyse) und Triethylamin (pur) wurden von AppliChem erworben. Trifluoroessigsäure (TFA) (99%) und (Benzotriazol-1-yl)oxy)tripyrrolidino-phosphonium Hexafluorophosphat (PyBOP) wurden von Fluorochem erworben. 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (Fmoc-Cl) (98%, ChemPur). Natriumsulfat (wasserfrei, Caelo). TentaGel® S RAM resin and TentaGel® PAP resin wurden von Rapp Polymers erworben. Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) AQmedia™, DMEM/F12 1/1 Medium, Penicillin und Streptomycin wurden von Invitrogen erworben. Uranylacetat ($\geq 98\%$, Thermo Fisher Scientific). CellTiter Blue® (Promega).

Destilliertes Wasser wurde mit einem Milli-Q System (Millipore) mit einem finalen spezifischen Widerstand von 18 M Ω cm aufgereinigt.

Alle nasschemischen Reaktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) mit MACHERY-NAGEL Silicagel 60 F254 (0.20 mm Dicke) kontrolliert. Die TLC-Platten wurden mit UV-Licht und durch Ninhydrin-Färbung visualisiert.

5.2 Geräte

Festphasen-Peptid-Reaktoren und -Synthesizer

Die Festphasenreaktionen wurden manuell oder mittels automatisiertem Peptidsynthesizer durchgeführt. Für die manuelle Festphasensynthese wurden Polypropylen-Chromabond-Säulen von 5, 10 oder 20 mL mit einer Polypropylen-Fritte verwendet, die am Boden mit einem Luer-Stopfen von Multisyntech verschlossen wurden. Die automatische Festphasensynthese wurde mit dem Peptidsynthesizer Activo P-11 von Activotec in 10 oder 40 mL Einmalreaktoren durchgeführt. Alle Reaktionen wurden unter N₂-Strom (99,999%) durchgeführt.

Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)

¹H-NMR-Spektroskopie wurde mit einem Bruker Avance III 300 (300 MHz) und 600 (600 MHz) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Daten sind wie folgt charakterisiert: (Frequenz in MHz, deuteriertes Lösungsmittel) chemische Verschiebungen in Einheiten von Teilen pro Million (Multiplikation, Kopplungskonstante in Hertz, Integral, Zuordnung zum jeweiligen Proton). Chemische Verschiebungen werden relativ zu den restlichen ¹H-Peaks des verwendeten Lösungsmittels als interne Standards referenziert (DMSO-d₆: 2.50; CD₂Cl₂: 5.32; MeOD-d₄: 3.31). Multiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, t = Triplett, dt = Dublett vom Triplett, q = Quartett und m = Multipllett.

Gefriertrockner

Die Lyophilisation der fertigen Konjugate wurde auf einem Alpha 1-4 LD plus Gerät der Martin Christ Freeze Dryers GmbH durchgeführt. Die Haupttrocknungsmethode wurde auf -54°C und 0.1 mbar eingestellt.

Reversed Phase-Hochdruckflüssigkeitschromatographie - Massenspektrometrie (RP-HPLC-MS)

Die RP-HPLC-MS-Analyse wurde auf einem Agilent 1260 Infinity-Gerät durchgeführt, das mit einem Detektor mit variabler Wellenlänge (VWD) (eingestellt auf 214 nm) und einem Agilent 6120 Quadrupol LC/MS mit einer Elektrospray-Ionisationsquelle (ESI) gekoppelt war, die im positiven Ionisierungsmodus in einem m/z-Bereich von 200 bis 2000 arbeitete. Als HPLC-Säule wurde eine Poroshell 120 EC-C18 1.8 µm (3.0x50 mm, 2.5 µm) RP-Säule von Agilent verwendet. Die mobilen Phasen A und B waren 95/5 H₂O/MeCN, 0.1% Ameisensäure (A) und 5/95 H₂O/MeCN, 0.1% Ameisensäure (B). Die Proben wurden bei einer Flussrate von 0.4 mL/min unter Verwendung eines linearen Gradienten von 100 % A bis 100 % B in einem Zeitbereich von 30 min bei 25 °C analysiert.

Präparative Reversed Phase-Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (Prep-RP-HPLC)

Die Prep-RP-HPLC-Analyse wurde auf einem Agilent Technologies 1260 Infinity-Gerät durchgeführt, das mit einem Detektor mit variabler Wellenlänge (VWD) (eingestellt auf 214 nm) gekoppelt war. Als HPLC-Säule wurde eine CAPCELL PAK C18 (20 mm I.D. x 250 mm, 5 µM) RP-Säule verwendet. Die mobilen Phasen A und B waren H₂O, 0.1 % Ameisensäure (A) und MeCN, 0.1 % Ameisensäure (B); die mobilen Phasen A1 und B1 waren H₂O (A1) und MeCN (B1). Die Konjugate **2**, **3** und **9** wurden in Methanol (HPLC-Qualität) und ein paar Tropfen Ameisensäure gelöst. Konjugat **8** wurde in H₂O/MeCN (1/1, v/v) gelöst. Die Proben wurden mit einer Flussrate von 10 mL/min bei 25 °C unter Verwendung eines linearen Gradienten von 40 % bis 80 % B für **2**, 50 % bis 100 % B für **3** und 30 % bis 70 % B für **4**, **5**, **6**, **7** und **8** in einem Zeitbereich von 10 min gereinigt. Oligo(amidoamin) **11** wurde in H₂O gelöst und mit einer Flussrate von 20 mL/min bei 25 °C unter Verwendung eines linearen Gradienten von 20% auf 30% B gereinigt.

Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisations-Time of Flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

MALDI-Messungen wurden auf einem MALDI-TOF Ultraflex I (Bruker Daltonics) mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) und α -Cyano-4-hydroxymizinsäure (CHCA) als Matrix durchgeführt. Das Verhältnis von Verbindung zu Matrix war 10:1.

Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD)

CD-Spektren wurden bei 20 °C mit einem Jasco J-715-Spektropolarimeter unter Verwendung einer Zelle von 0.1 cm Weglänge und der Mittelung von zehn sich wiederholenden Scans zwischen 260 und 190 nm mit einem Datenabstand von 1 nm, einer Bandbreite von 2 nm, einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min und einer Reaktionszeit von 1 s erhalten. Die mittlere Rückstandselliptizität ($[\Theta]$) wurde mit der Gleichung $[\Theta] = \Theta / (10 \times c \times d)$ berechnet, wobei d die Schichtdicke der Zelle (0.1 cm), Θ die Elliptizität, gemessen in Milli-Grad (Maschineneinheiten), und c die konjugierte Konzentration ist.

Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR)

Die FTIR-Spektren wurden mit einem Nicolett 6700 Fourier-Transform gemessen, das mit einem Einzelpunkt-gedämpften Diamant bei Raumtemperatur ausgestattet war und einer Auflösung von 1 cm⁻¹ aus 52 aufeinanderfolgenden Scans gemittelt wurde.

Mikrotiterplatten-Spektrophotometer

Fluoreszenzmessungen mit Thioflavin T wurden an einem CLARIOstar® Mikrotiterplatten-Reader von BMG LABTECH (Freiburg, Deutschland) bei 20 °C durchgeführt, indem eine Anregungswellenlänge von 450 nm und 490 nm für die Emission verwendet wurde. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der BMG Mars Software. Für alle Messungen wurden die durchsichtigen Corning® 96-Well Polystyrol-Mikrotiterplatten mit flachem Boden verwendet.

Rheologie

Die Messung wurde auf einem Haake Mars II Rheometer durchgeführt und mit der Software Haake RheoWin Data Manager ausgewertet. Die viskoelastischen Eigenschaften wurden mit einem 20-mm-Kegel (2°-Winkel) in Abhängigkeit von Frequenz-Sweeps zwischen 0.1 und 100 Hz bei konstanter Dehnung (0.1 %) aufgezeichnet.

Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Messungen wurden auf einem Malvern NanoZS (Malvern Panalytical, Kassel, Deutschland) durchgeführt, das mit einem 633 nm He/Ne-Laser in Rückstreuungskonfiguration (171°) ausgestattet war. Nanogel-Proben in 1 cm Polystyrol-Küvetten wurden bei einer Temperatur von 20 °C analysiert. Zur Auswertung der Autokorrelationsfunktionen wurden die Abklingkonstante und der erste Kumulant durch exponentielle Fits bestimmt und die hydrodynamischen Radien durch die Stokes-Einstein-Beziehung berechnet.

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) (durchgeführt von *M. Otten*, Heinrich-Heine-Universität)

Die Aufnahmen der Partikel wurden an einem JOEL JEM-2100Plus Elektronenmikroskop im Brightfield-Modus bei 80 kV durchgeführt. Nanopartikellösungen wurden auf ein kohlenstoffbeschichtetes Kupfergitter der Größe 200 Mesh von ScienceServices aufgetragen.

5.3 Methoden

CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie wurde für die Analyse der Sekundärstrukturen der Konjugate verwendet. Die Proben wurden in 5 % MeCN in MQ-Wasser-Lösung in Konzentrationen von 0.25 mg ml⁻¹ für **1** und **4-10** und 1 mg ml⁻¹ für **2** und **3** gelöst oder suspendiert. Diese Lösungen wurden über Nacht geschüttelt und am CD-Spektrometer analysiert.

Denaturierungsexperimente mit Guanidiniumhydrochlorid (GdnHCl)

Die Proben wurden in 5 % MeCN in MQ-Wasserlösung, die 1, 2, 3, 4, 5 und 6 M GdnHCl enthielt gelöst bzw. suspendiert. Die Konjugatkonzentrationen waren 0.25 mg ml^{-1} für **1** und **4-10** und 1 mg ml^{-1} für **2** und **3**. Diese Lösungen wurden über Nacht geschüttelt. Der Bruch der Sekundärstrukturen wurde mittels CD-Spektroskopie analysiert.

Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FTIR)

Die Konjugate wurden in MQ-Wasser gelöst oder suspendiert und am Gefriertrockner lyophilisiert. Das resultierende getrocknete Material wurde für die Analyse verwendet.

Thioflavin T (ThT) Bindungsstudien

Die strukturabhängige Aggregation wurde anhand des β -Faltblattbinden Farbstoffs Thioflavin T untersucht. Es wurden zwei verschiedene Experimente durchgeführt: 1) Brechen der β -Faltblattstrukturen durch Erhöhung der GdnHCl-Konzentration. Hierfür wurden die gleichen Proben genommen, die bereits für die GdnHCl-Denaturierungsstudien der Konjugate **2**, **3** und **9** verwendet wurden. 2) Konzentrationsabhängige Aggregation der Konjugate **1**, **2**, **3**, **8** und **9**. Sie wurden in MQ-Wasser in Konzentrationen von 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.0313, 0.0156, 0.0078 und 0.039 mg ml^{-1} gelöst bzw. suspendiert und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt.

Beide Experimente wurden gleichermaßen durchgeführt. Eine 10 mM Thioflavin T (ThT) Stammlösung wurde durch Lösen von 32 mg in 10 ml MQ-Wasser hergestellt und durch einen $0.2 \mu\text{m}$ Spritzenfilter filtriert. Die tatsächliche Konzentration der Farbstofflösung wurde durch UV-Absorptionsspektroskopie mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $36\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 412 nm bestimmt. Die Endkonzentration wurde auf $100 \mu\text{M}$ eingestellt. $72 \mu\text{l}$ der Konjugatlösung wurden in durchsichtige Corning® 96-Well Polystyrol-Mikroplatten mit flachem Boden pipettiert, gefolgt von $7 \mu\text{l}$ frisch hergestellter ThT-Lösung, was eine ThT-Endkonzentration von $10 \mu\text{M}$ ergab. Die Mikroplatten wurden mit Aluminiumfolie abgedeckt und für 24 h geschüttelt. Die spektroskopischen Daten wurden mit einem Mikroplatten-Spektrophotometer aufgenommen.

Organogel-Herstellung

Gele von Konjugat und Konjugatmischungen wurden in Konzentrationen von 25 mM in DMSO hergestellt. Zur Herstellung der Multikonjugat-Gele wurden die einzelnen Konjugate gravimetrisch an der Waage abgewogen und in DMSO bis zur gewünschten Konzentration gelöst. Hierzu wurden die Konjugate **2** und **3** mit **9** oder **10** gemischt, um entweder äquimolare Verhältnisse (1:1) oder Verhältnisse zu erhalten, die der Anzahl der Leucin-Seitenketten entsprechen (1:2 bzw. 1:3). Zur

vollständigen Lösung der Konjugat-DMSO-Lösung war eine Erwärmung auf 80 °C erforderlich. Die heiße Lösung wurde in eine 10-ml-Spritze mit abgeschnittener Spitze überführt, um zylindrisch geformte Gele zu erhalten. Um Verdunstung zu verhindern, wurde der Spritzenkopf mit drei Lagen Parafilm abgedeckt. Das Organogel wurde für 24 h senkrecht zur Gelierung an einer Muffe befestigt.

Rheologie-Messung

Das zylindrisch geformte Organogel wurde direkt auf die Rheologie-Messplatte aufgebracht. Vor der Messung und um Einflüsse durch eine Beschädigung des Gels nach dem Auftragen auf die Platte zu reduzieren, wurde das Gel 1 h lang "nachgelieren". Anschließend wurden die Rheologie-Messungen durchgeführt.

Nanopartikel-Herstellung

Die Nanopartikel wurden nach der "Solvent-Switch"-Methode hergestellt. Dazu wurden Konjugate oder Konjugatgemische in DMSO in einer vordefinierten Konzentration gelöst und in MQ-Wasser überführt, was zu einer Aggregation der PPMKs führte. Um eine schnelle Ausfällung der Partikel mit niedrigem PDI zu gewährleisten, wurde die automatisierte analytische Spritze eVol® XR verwendet, die die Lösung mit der vorinstallierten Geschwindigkeit 10 (ca. 8.6 ml/s) direkt in das Wasser dosierte. Eine homogene Verteilung der Partikel wurde durch konstantes Rotieren der Polyesterol-Küvette mit einer Geschwindigkeit von 500 U/min ermöglicht, während die konjugierte DMSO-Lösung in das Wasser gegeben wurde.

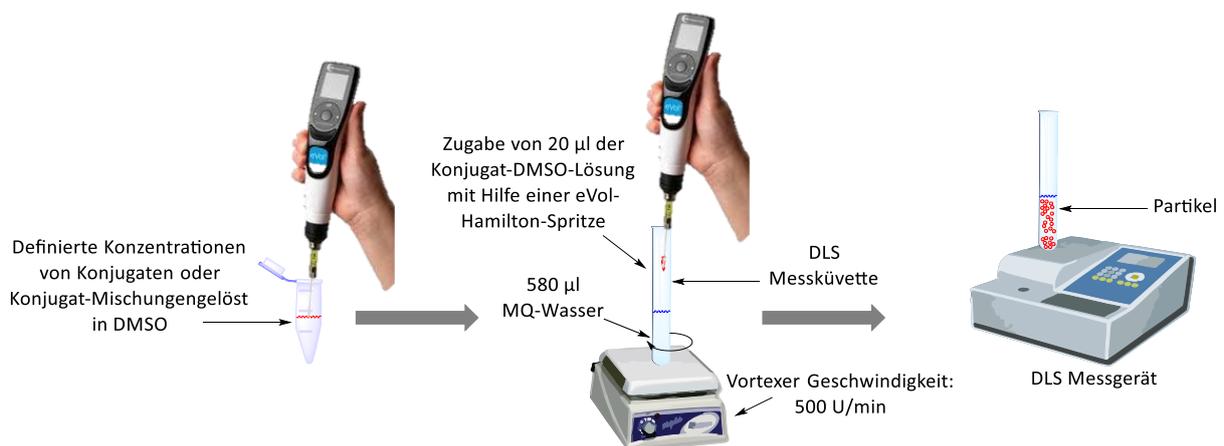


Abbildung 36: Graphische Darstellung der Nanopartikel-Herstellung.

Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Das Verhältnis der Partikelgröße zur Konjugatkonzentration wurde mittels DLS aufgezeichnet. Dazu wurden Stammlösungen von in DMSO gelösten Konjugaten in einer Konzentration von 10 mg ml⁻¹ von

2 und **9** und 15 mg ml^{-1} von **3** hergestellt. Zur Analyse der konzentrationsabhängigen Nanopartikelbildung wurden die Konjugat-DMSO-Lösungen auf 3, 1.5, 0.9, 0.3, 0.24, 0.12, 0.06 und 0.03 mM für Konjugat **2** und **3** und 15, 9, 3, 1.5, 0.9 und 0.3 mM für **9** in DMSO verdünnt. 20 μl der Konjugatlösung wurden in einem eVol[®] XR mit einer 100- μl -Hamilton-Spritze aufgezogen und in saubere DLS-Polystyrol-Gefäße mit 580 μl vorgefiltertem (0.45 μm -Spritzenfilter) MQ-Wasser dispensiert, was endgültige Partikellösungen von 100, 50, 30, 10, 8, 6, 4, 2 und 1 μM für **2** und **3** und 500, 300, 100, 80, 50, 30 und 10 μM für **9** ergab. Die Partikelgröße der Konjugatmischungen wurde bei 30 μM (Endkonzentration) erfasst. Daher wurden 0.3 mM Mischlösungen in DMSO unter Verwendung der gleichen Stammlösungen wie oben beschrieben hergestellt, indem die Konjugate **2** und **3** mit **9** oder **10** gemischt wurden, um entweder äquimolare Verhältnisse (1:1) oder Verhältnisse zu erhalten, die der Anzahl der Leucin-Seitenketten entsprechen (1:2 bzw. 1:3). Die Größe der gebildeten Partikel wurde direkt mittels DLS gemessen.

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Form und Aggregation der Mischungspartikel wurden unter dem Elektronenmikroskop beobachtet. 7 μl der Nanopartikellösungen mit einer Endpartikelkonzentration von 30 μM wurden auf ein kohlenstoffbeschichtetes Kupfergitter aufgetragen und für 1 Minute zur Absorption stehen gelassen. Die überschüssige Lösung wurde mit Filterpapier abgetupft. Dann wurde das Gitter mit einem Tropfen 3 %iger Uranylacetatlösung bedeckt und sofort über das Löschpapier entfernt. Erneut wurde ein Tropfen 3 %ige Uranylacetatlösung auf das Gitter gegeben und 30 Sekunden lang absorbiert. Nach dem Entfernen der überschüssigen Lösung ließ man das Gitter 20 Minuten lang trocknen. Die Aufnahmen der Partikel wurden am TEM durchgeführt.

Zellstudien

Potenzielle toxikologische Effekte von den PPMKs wurden an MDA-MB-231 (krebsartige menschliche Brustzellen) und MCF-12A Zellen (gesunde menschliche Brustzellen) untersucht. MDA-MB-231 Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) AQmediaTM mit 10 % fötalem Rinderserum (FBS), 1 % Penicilin/Streptomycin und $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ Insulin kultiviert. MCF-12A-Zellen wurden in DMEM/F12 1/1 Medium mit 10 % fötalem Rinderserum (FBS), 1 % Penicilin/Streptomycin, $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ Insulin, $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Hydrocortison, $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ Cholera toxin und $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ epidermale Wachstumsfaktor (EGF) kultiviert. Die Zellen wurden bis zu 90 % Konfluenz kultiviert und dann subkultiviert. Für Toxizitätsstudien wurden die Zellen für 1 min trypsiniert, gezählt und verdünnt, um ca. 25.000 Zellen pro 100 μl zu erhalten. 100 μl der Zellsuspension wurden in die Kammern einer 96-Well-Polystyrol-Mikroplatte mit Deckel überführt und für 24 h bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. PPMK-

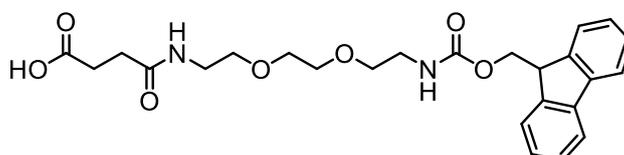
Nanopartikel der Mischungen M1b, M2b, M3b und M4b wurden wie in 'Nanopartikel-Herstellung' beschrieben hergestellt: Die Konjugatmischungen wurden in DMSO in Konzentrationen von 0.3, 1, 3, 10 und 30 mM aufgelöst. Anschließend wurden die Konjugate in einem zweistufigen Prozess in das jeweilige Medium überführt. Zunächst wurden Nanopartikel gebildet, indem 5 µl der Konjugatlösung in 145 µl MQ-Wasser gegeben wurden. Im weiteren Schritt wurden 30 µl der Nanopartikellösung in 970 µl Zellmedien überführt, wobei die FBS-Konzentration von 10 % auf 2 % reduziert wurde, um eine mögliche Verklumpung der Konjugate in den Medien zu vermeiden. Die Endkonzentration der PPMKs in den Medien betrug daher 0.3, 1, 3, 10 und 30 µM. Proben mit hoher Konjugatkonzentration (30 und 10 µM) mussten für 15 min bei Raumtemperatur in einem Ultraschallbad behandelt, da es nach dem Transfer der Nanopartikel in Medien zu einer Ausfällung der Konjugate kam. Nach 24 h Zellinkubation wurde das Zellmedium entfernt und durch 100 µl der Konjugat-Medium-Lösung ersetzt und für 72 h inkubiert. Danach wurde die Lebensfähigkeit der Zellen durch Zugabe von 20 µl CellTiter Blue® in das Zellmedium getestet und für 3 h inkubiert. Die Fluoreszenzspektroskopie wurde zur Detektion der Farbveränderung des Farbstoffs verwendet, die Aufschluss über die Lebensfähigkeit der Zellen gibt. Die spektroskopischen Daten wurden mit einer Anregungswellenlänge von 550 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm aufgenommen.

5.4 Synthese

5.4.1 Baustein Synthese

Die Methode, die für die Synthese des Spacer-Bausteins EDS verwendet wurde, erfolgte entsprechend den Berichten von *Hartmann et al.*^[52]

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



[470.21]

Die Gesamtausbeute der Synthese betrug 78 %.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 12.05 (br s, OH), 7.88 (d, 3H, ³J = 7.25 Hz, NH, Ar-H), 7.69 (d, 2H, ³J = 7.47 Hz, Ar-H), 7.21 (dt, 2H, ³J = 7.19 Hz, Ar-H), 7.32 (dt, 3H, ³J = 7.35 Hz, NH, Ar-H), 4.29 (d, 2H, ³J = 6.97, -C(O)-O-CH₂-CHR₂-), 4.21 (t, 1H, ³J = 7.25 Hz, -C(O)-O-CH₂-CHR₂-), 3.50 (s, 4H, -O-C₂H₄-O-), 3.38

(m, 4H, -NH-CH₂-CH₂-O-, Überlappung mit HDO), 3.16 (m, 4H, -NH-CH₂-CH₂-O-), 2.41 (dt, ³J = 6.83 Hz, COOH-CH₂-CH₂-C(O)-), 2.31 (dt, ³J = 6.83, COOH-CH₂-CH₂-C(O)-).

RP-HPLC (Linearer Gradient 0-50% Eluent B in 15 min bei 25 °C): t_r= 12.2 min. Reinheit: 99%.

5.4.1 Synthese der Peptid-Präzisionsmakromolekül-Konjugate

Die Festphasensynthese der PPMKs wurde nach dem Standard-Fmoc-Protokoll synthetisiert.^[28, 38, 43, 273]

Zur Herstellung der verzweigten PPMKs wurden der „grafting-from“-Syntheseweg verwendet, bei dem zunächst das Oligo(amidoamin)-Rückgrat am Peptid-Synthesizer synthetisiert und terminal mit der Acetyl-Gruppe geschützt wurde. Nach der manuellen Abspaltung der Boc-Schutzgruppe, wurden die Leucin-Seitenketten ebenfalls am Peptid-Synthesizer aufgebaut und terminal geschützt. Die Synthese der linearen PPMKs wurden vollständig am Peptid-Synthesizer durchgeführt und (außer bei Pentaleucin **9**) terminal geschützt. Das allgemeine Festphasenprotokoll wird im Folgenden erläutert.

Allgemeines Kupplungs- und Fmoc-Entschützungs-Protokoll

Als Harz für die Festphasensynthese wurde das handelsübliche, mit einem modifizierten Rink-Amid-Linker funktionalisierte TentaGel® S RAM (Beladung 0.023 g/mol) und TentaGel® PAP Harz (Beladung 0.025 g/mol) verwendet. Nach zweimaligem Quellen von 0.05 mmol des Harzes in 4 mL DCM für 15 min wurde die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Zur Entschützung der Fmoc-Schutzgruppe wurden 4 mL 25%iges Piperidin in DMF für 5 min zugegeben. Dann wurde die Entschützungslösung freigesetzt, gefolgt von drei schnellen Waschungen von 30 sec mit 4 ml DMF. Dieser Entschützungsschritt wurde 15 min lang wiederholt, um eine vollständige Entschützung der Fmoc-Gruppe zu erreichen. Um eine vollständige Freisetzung der Schutzgruppe zu erhalten, wurde die Entschützung mit einem installierten UV-Spektrometer überwacht, indem die freigesetzte Konzentration des Dibenzofulvene-Piperidin-Addukts bei 301 nm gemessen wurde. War die freigesetzte Konzentration des Addukts höher als 10 % im Vergleich zur Konzentration des freigesetzten Farbstoffs nach der ersten Entschützung, wurde dieser Entschützungsvorgang bis zu sechsmal für jeweils 10 min wiederholt. Zwischen den Entschützungs- und Kopplungsschritten wurde das Harz sechsmal für 60 s mit 5 ml DMF gewaschen. Anschließend erfolgte die initiale Kupplung durch Lösen von 0.25 mmol (5 Äq.) Baustein oder Aminosäure und 0.25 mmol (5 Äq.) PyBOP in DMF (2 mL), gefolgt von der Zugabe von 1.5 mL 1M DIPEA in DMF-Lösung. Für verzweigte Konjugate mit Leucin in der Seitenkette wurden 0.5 mmol (10 Äq.) Fmoc-L-Leucin-OH pro Anzahl der Seitenketten eingesetzt. Dementsprechend wurde die Menge der 1M DIPEA-Lösung mit der Anzahl der Seitenketten erhöht. Diese Mischung wurde für 3 Minuten mit Stickstoff gespült. Dann wurde die Mischung zum Harz gegeben und 40 Minuten lang geschüttelt. Anschließend wurde das Harz von nicht umgesetztem Reagenz sechsmal für 60 Sekunden mit 5 mL

DMF gewaschen. Schließlich wurde das Harz nach der Entschützung an der letzten Position 6-mal für 60 s mit DMF und 2-mal für 3 min mit DCM gewaschen.

Schützung des terminalen Amins

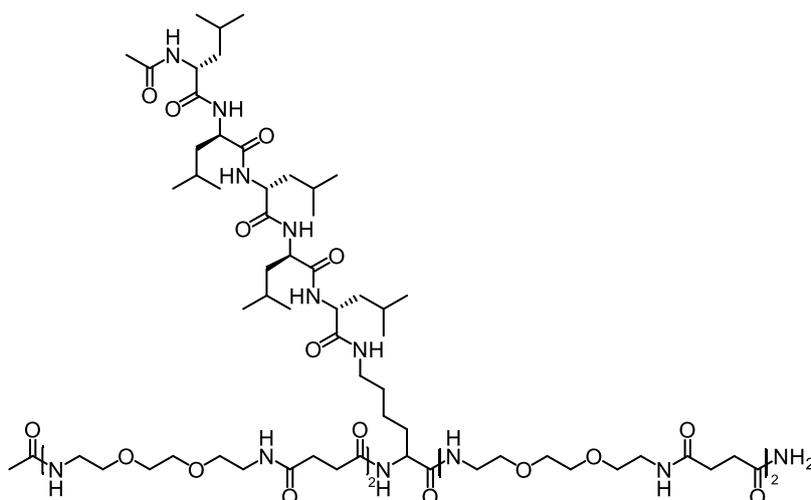
Nach erfolgreicher Kupplung der gewünschten Anzahl an Bausteinen an der Festphase wurde das terminale Amin mit einer Acetylgruppe geschützt. Dazu wurde das Harz mit 6 ml Essigsäureanhydrid versetzt und sieben Minuten lang geschüttelt. Danach wurde das Harz sechsmal für 60 s mit 5 mL DMF gewaschen.

Boc-Entschützung

Eine Lösung aus 4 M HCl in kaltem 1,6-Dioxan wurde zweimal zu dem Harz gegeben und jeweils 15 Minuten lang geschüttelt. Dann wurde das Harz mit kalter 2 M DIPEA in DMF-Lösung neutralisiert. Anschließend wurde das Harz 10-mal mit jeweils 5 mL DMF und DCM gewaschen. Dieser Ansatz wurde wiederholt, bis die Entschützung vollständig war, was durch den Kaiser-Test bestätigt wurde.

Abspaltung vom festen Träger

Die Spaltungsmischung für PPMKs **1 - 9** war 95 % TFA/2.5 % TIPS/2.5 % DCM, und für **10** wurde ein Cocktail aus 94 % TFA/ 1 % Trimethylsilylbromid/ 5 % Thioanisol zum Harz gegeben und 90 bzw. 60 Minuten lang geschüttelt. Für eine erfolgreiche Fällung des Konjugats in kaltem Et₂O (45 mL) wurde das Filtrat in ein 50 mL Falcon-Röhrchen gegeben, um den größten Teil der TFA-Lösung durch N₂-Strom zu verdampfen. Der resultierende Niederschlag wurde zentrifugiert und der Ether wurde dekantiert. Das Produkt wurde zwei Mal mit Et₂O gewaschen. Das Rohprodukt wurde im N₂-Strom getrocknet und unter Vakuum getrocknet oder, falls wasserlöslich, in 2 mL MQ-Wasser gelöst und lyophilisiert. Je nach Grad der Verunreinigung wurde das Produkt an der präparativen RP-HPLC aufgereinigt.

Monovalentes Pentaleucin-Pfropf-co-PPMK, 1

[1715.07]

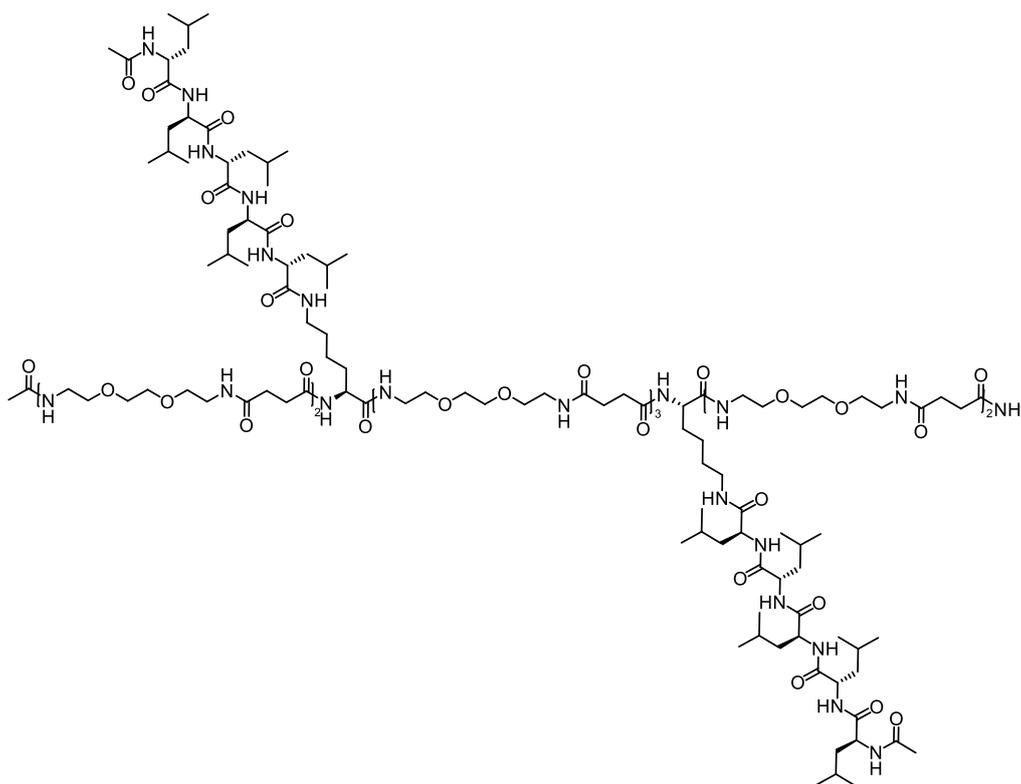
Die Gesamtausbeute von **1** betrug 71%.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 8.02 (d, 1H, $^3J = 7.44$ Hz, NH (Leu)), 7.99 (d, 1H, $^3J = 8.03$ Hz, NH (Leu)), 7.96 (d, 1H, $^3J = 8.03$ Hz, NH (Lys_{Rückgrat})), 7.94 – 7.84 (m, 8H, NH (Rückgrat)), 7.81 (t, 2H, $^3J = 7.54$ Hz, NH (Leu)), 7.71 (t, 1H, $^3J = 5.46$ Hz, NH (Lys_{Seitenkette})), 7.64 (d, 1H, $^3J = 8.63$ Hz, NH (Leu)), 7.26 (s, 1H, NHH), 6.71 (s, 1H, NHH), 4.28 – 4.17 (m, 5H, C ^{α} _{Leu}H), 4.11 (m, 1H, C ^{α} _{Lys}H), 3.49 (t, 16H, $^3J = 5.32$ Hz, -NH-CH₂-CH₂-O-), 3.38 (m, 18H, -O-C₂H₄-O-, Überlappung mit HDO), 3.18 (m, 16H, -NH-CH₂-CH₂-O-), 3.03 (m, 1H, C ^{ϵ} _{Lys}HH), 2.94 (m, 1H, C ^{ϵ} _{Lys}HH), 2.40 – 2.24 (m, 16H, NH₂-C(O)-C₂H₄-C(O)-), 1.84 (s, 3H, -CH₃ (Leu-Seitenkette)), 1.79 (s, 3H, -CH₃ (Rückgrat)), 1.66 – 1.50 (m, 6H, C ^{ν} _{Leu}H, C ^{β} _{Lys}HH), 1.49 – 1.37 (m, 11H, C ^{β} _{Leu}H₂, C ^{β} _{Lys}HH), 1.37 – 1.30 (m, 2H, C ^{δ} _{Lys}H₂), 1.29 – 1.16 (m, 3H, C ^{ν} _{Lys}H₂), 0.90 – 0.84 (m, 15H, -CH₃ (Leu)), 0.84 – 0.78 (m, 15H, -CH₃ (Leu)).

RP-HPLC (Linearer Gradient 0-100% Eluent B in 30 min, 25 °C): $t_r = 26.65$ min. Reinheit: 98 %

ESI-MS: m/z kalk. for C₇₂H₁₃₂N₁₄O₂₂ [M+2H]²⁺ 858.54; gef. 858.75.

FTIR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3263 (m), 3086 (w), 2956 (w), 2929 (w), 2870 (w), 1624 (s), 1543 (s), 1435 (m), 1281 (m), 1281 (m), 1092 (m).

Divalentes Pentaleucin-Pfropf-co-PPMK, 2

[3140.98]

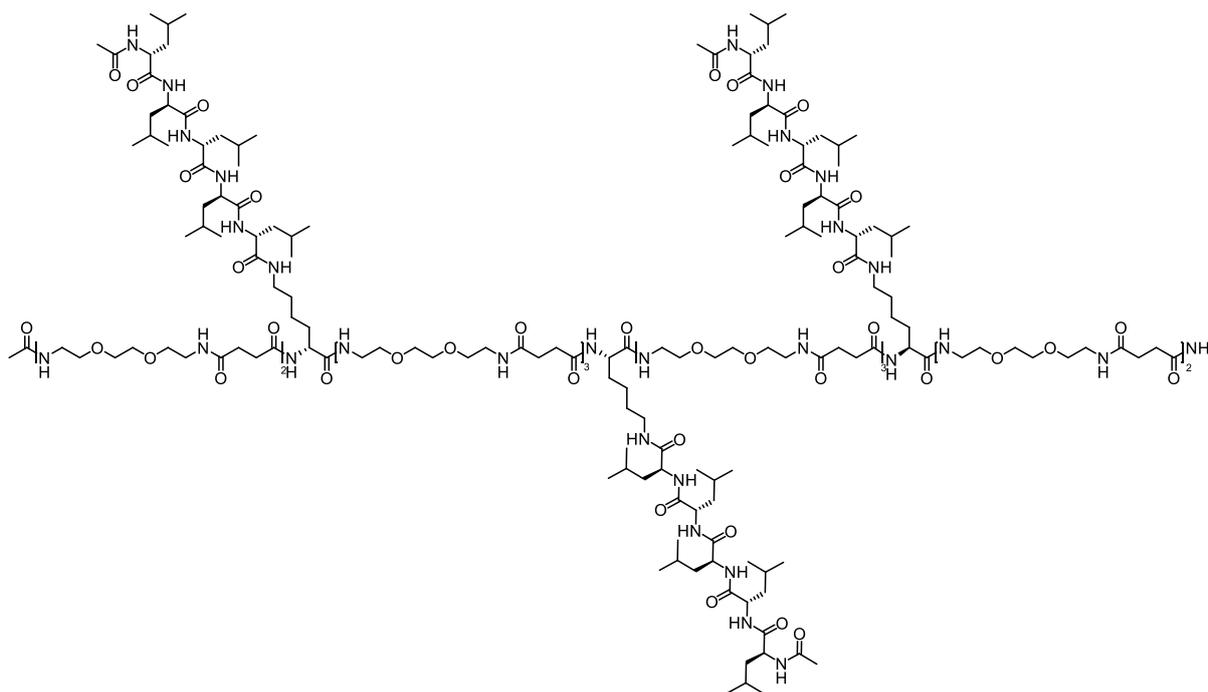
Die Gesamtausbeute von **2** betrug 39%.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 8.03 (d, 2H, $^3J = 8.00$ Hz, NH (Leu)), 8.00 (d, 2H, $^3J = 8.00$ Hz, NH (Leu)), 7.96 (d, 2H, $^3J = 8.00$ Hz, NH (LySRückgrat)), 7.95 – 7.85 (m, 14H, NH (Rückgrat)), 7.81 (t, 4H, $^3J = 7.30$ Hz, NH (Leu)), 7.71 (t, 2H, $^3J = 5.67$ Hz, NH (LyS-Seitenkette)), 7.65 (d, 2H, $^3J = 8.34$ Hz, NH (Leu)), 7.24 (s, 1H, -NHH), 6.71 (s, 1H, -NHH), 4.29 – 4.17 (m, 10H, C ^{α} _{Leu}H), 4.12 (m, 2H, C ^{α} _{Lys}H), 3.49 (d, 28H, $^3J = 4.54$ Hz, -NH-CH₂-CH₂-O-), 3.38 (m, 33H, -O-C₂H₄-O-, Überlappung mit HDO), 3.55 – 3.14 (m, 28H, -NH-CH₂-CH₂-O-), 3.03 (m, 2H, C ^{ϵ} _{Lys}HH), 2.94 (m, 2H, C ^{ϵ} _{Lys}HH), 2.40 – 2.26 (m, 28H, NH₂-C(O)-C₂H₄-C(O)-), 1.84 (s, 6H, -CH₃ (Leu-Seitenkette)), 1.79 (s, 3H, -CH₃ (Rückgrat)), 1.63 – 1.50 (m, 12H, C ^{γ} _{Leu}H, C ^{β} _{Lys}HH), 1.50 – 1.38 (m, 22H, C ^{β} _{Leu}H₂, C ^{β} _{Lys}HH), 1.37 – 1.31 (m, 4H, C ^{δ} _{Lys}H₂), 1.28 – 1.22 (m, 5H, C ^{γ} _{Lys}H₂), 0.88 – 0.84 (m, 30H, -CH₃ (Leu)), 0.84 – 0.79 (m, 30H, -CH₃ (Leu)).

RP-HPLC (Linearer Gradient 0-100% Eluent B in 30 min, 25 °C): $t_r = 17.79$ min. Reinheit: 98%.

ESI-MS: m/z kalk. for C₁₄₈H₂₆₉N₂₉O₄₃ [M+3H]³⁺ 1047.99; gef. 1048.25.

FTIR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3263 (m), 2929 (w), 2870 (w), 1626 (s), 1541 (s), 1348 (m), 1095 (m), 710 (m).

Trivalentes Pentaleucin-Pfropf-co-PPMK, 3

[4566.88]

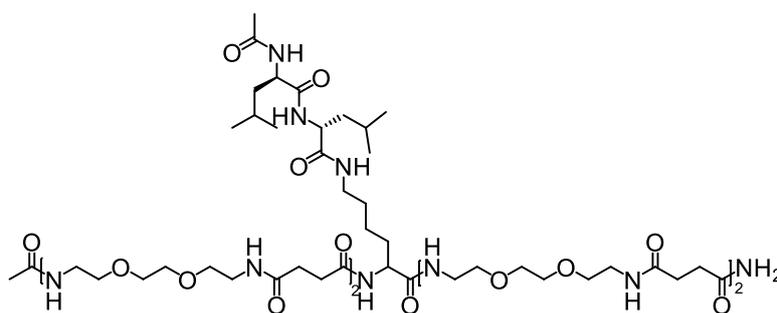
Die Gesamtausbeute von **3** betrug 14%.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 8.14 – 8.03 (m, 6H, NH (Leu)), 7.99 – 7.96 (d, 3H, ³*J* = 7.21 Hz, NH (LySRückgrat)), 7.96 – 7.84 (m, 20H, NH (Rückgrat)), 7.84 – 7.77 (m, 6H, NH (Leu)), 7.77 – 7.57 (m, 6H, NH (Leu, LySSeitenkette)), 7.27 (s, 1H, -NHH), 6.71 (s, 1H, -NHH), 4.29 – 4.15 (m, 15H, C^α_{Leu}H), 4.10 (m, 3H, C^α_{Lys}H), 3.49 (d, 40H, ³*J* = 6.34 Hz, -NH-CH₂-CH₂-O-), 3.40 (m, 40H, -O-C₂H₄-O-, Überlappung mit HDO), 3.22 – 3.15 (m, 40H, -NH-CH₂-CH₂-O-), 3.03 (m, 3H, C^ε_{Lys}HH), 2.96 (m, 3H, C^ε_{Lys}HH), 2.39 – 2.25 (m, 40H, NH₂-C(O)-C₂H₄-C(O)-), 1.84 (2s, 9H, -CH₃ (Leu-Seitenkette)), 1.78 (2s, 3H, -CH₃ (Rückgrat)), 1.65 – 1.53 (m, 18H, C^γ_{Leu}H, C^β_{Lys}HH), 1.52 – 1.38 (m, 33H, C^β_{Leu}H₂, C^β_{Lys}HH), 1.37 – 1.31 (m, 6H, C^δ_{Lys}H₂), 1.28 – 1.19 (m, 6H, C^γ_{Lys}H₂), 0.94 – 0.84 (m, 45H, -CH₃ (Leu)), 0.84 – 0.75 (m, 45H, -CH₃ (Leu)).

RP-HPLC (Linearer Gradient 0-100% Eluent B in 30 min, 25 °C): t_r = 11.41 min. Reinheit: 99%.

ESI-MS: m/z kalk. for C₂₁₆H₃₉₂N₄₂O₆₂ [M+4H]⁴⁺ 1142.73; gef. 1143.35.

FTIR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3265 (m), 3084 (w), 2955 (w), 2929 (w), 2870 (w), 1626 (s), 1539 (s), 1441 (m), 1259 (m), 1093 (m), 713 (m).

Monovalentes Dileucin-Pfropf-co-PPMK, 4

[1375.82]

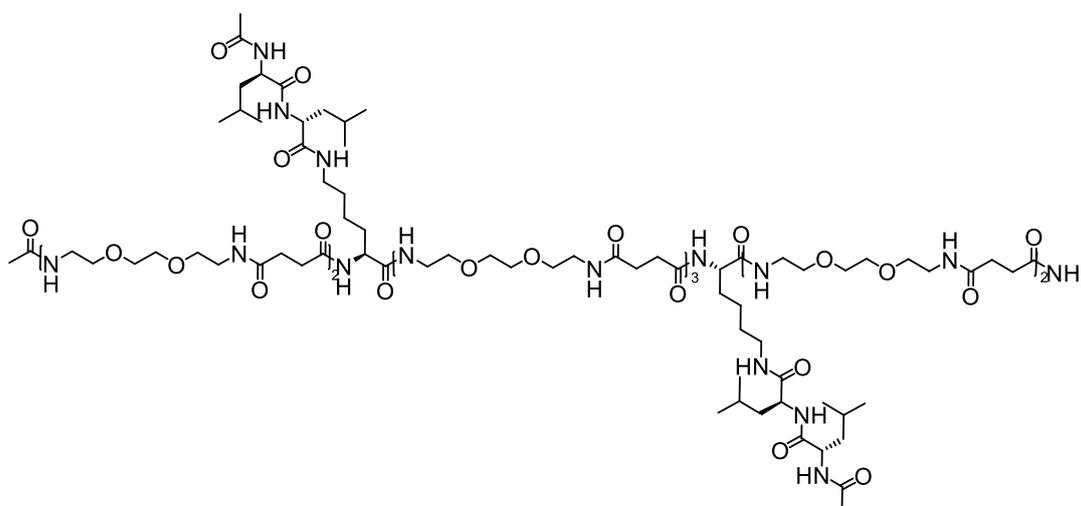
Die Gesamtausbeute von **4** betrug 85 %.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 8.01 (d, 1H, $^3J = 7.81$ Hz, NH (Leu)), 7.98 (d, 1H, $^3J = 8.13$ Hz, NH (Lys_{Rückgrat})), 7.94 (t, 1H, $^3J = 5.42$ Hz, NH (Rückgrat)), 7.92 – 7.85 (m, 7H, NH (Rückgrat)), 7.83 (d, 1H, $^3J = 8.57$ Hz, NH (Leu)), 7.75 (t, 1H, $^3J = 5.43$ Hz, NH (Lys_{Seitenkette})), 7.27 (s, 1H, NHH), 6.71 (s, 1H, NHH), 4.25 – 4.18 (m, 2H, C ^{α} _{Leu}H), 4.11 (m, 1H, C ^{α} _{Lys}H), 3.49 (t, 16H, $^3J = 5.32$ Hz, -NH-CH₂-CH₂-O-), 3.38 (m, 18H, -O-C₂H₄-O-, Überlappung mit HDO), 3.18 (m, 16H, -NH-CH₂-CH₂-O-), 3.06 - 2.99 (m, 1H, C ^{ϵ} _{Lys}HH), 2.99 – 2.91 (m, 1H, C ^{ϵ} _{Lys}HH), 2.39 – 2.25 (m, 16H, NH₂-C(O)-C₂H₄-C(O)-), 1.84 (s, 3H, -CH₃ (Leu-Seitenkette)), 1.79 (s, 3H, -CH₃ (Rückgrat)), 1.66 – 1.49 (m, 3H, C ^{γ} _{Leu}H, C ^{β} _{Lys}HH), 1.49 – 1.38 (m, 5H, C ^{β} _{Leu}H₂, C ^{β} _{Lys}HH), 1.37 – 1.30 (m, 2H, C ^{δ} _{Lys}H₂), 1.30 – 1.15 (m, 2H, C ^{γ} _{Lys}H₂), 0.87 (dd, 6H, $J = 6.7, 2.6$ Hz, -CH₃ (Leu)), 0.82 (t, 6H, $^3J = 5.58$ Hz, -CH₃ (Leu)).

RP-HPLC (Linearer Gradient 0-100% Eluent B in 30 min, 25 °C): $t_r = 16.81$ min. Reinheit: 96 %

ESI-MS: m/z kalk. for C₆₂H₁₁₃N₁₃O₂₁ [M+H]⁺ 1376.82; gef. 1376.65.

FTIR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3288 (m), 3205 (w), 3089 (w), 2943 (w), 2862 (w), 1633 (s), 1547 (s), 1475 (w), 1427 (w), 1373 (m), 1346 (m), 1306 (m), 1213 (m), 1128 (m), 1107 (m), 1034 (w), 958 (w), 687 (m), 604 (m).

Divalentes Dileucin-Pfropf-co-PPMK, 5

[2462.47]

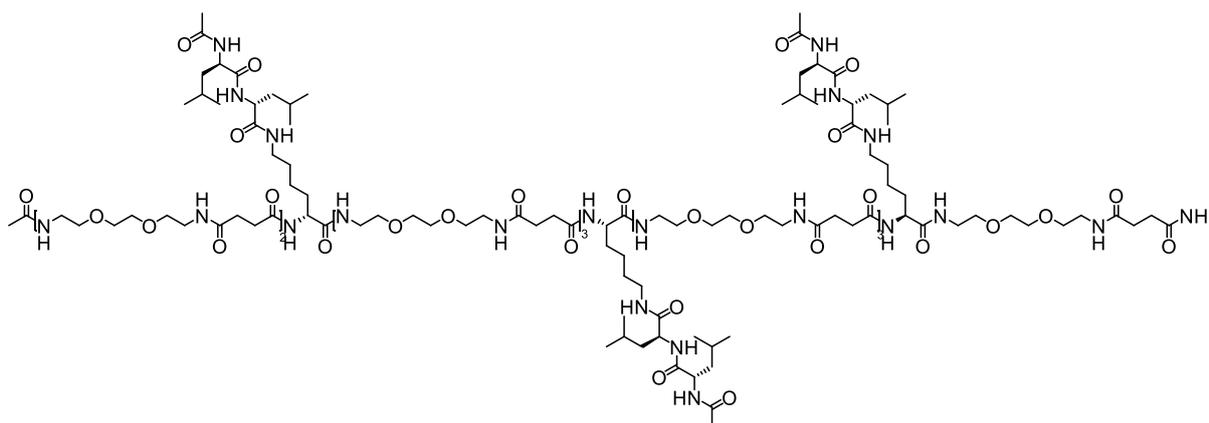
Die Gesamtausbeute von **5** betrug 78%.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7.98 (dd, 4H, $^3J = 8.20, 8.02$ Hz, NH (Leu), (Lys_{Rückgrat})), 7.93 (t, 2H, $^3J = 5.52$ Hz, NH (Rückgrat)), 7.91 – 7.84 (m, 12H, NH (Rückgrat)), 7.80 (d, 2H, $^3J = 8.57$ Hz, NH (Leu)), 7.74 (t, 2H, $^3J = 5.65$ Hz, NH (Lys_{Seitenkette})), 7.26 (s, 1H, -NHH), 6.71 (s, 1H, -NHH), 4.25 – 4.18 (m, 4H, C ^{α} _{Leu}H), 4.11 (m, 2H, C ^{α} _{Lys}H), 3.49 (d, 28H, $^3J = 4.54$ Hz, -NH-CH₂-CH₂-O-), 3.38 (m, 33H, -O-C₂H₄-O-, Überlappung mit HDO), 3.18 (m, 28H, -NH-CH₂-CH₂-O-), 3.07 – 3.00 (m, 2H, C ^{ϵ} _{Lys}HH), 3.00 – 2.91 (m, 2H, C ^{ϵ} _{Lys}HH), 2.39 – 2.26 (m, 28H, NH₂-C(O)-C₂H₄-C(O)-), 1.84 (s, 6H, -CH₃ (Leu-Seitenkette), 1.79 (s, 3H, -CH₃ (Rückgrat)), 1.66 – 1.49 (m, 6H, C ^{γ} _{Leu}H, C ^{β} _{Lys}HH), 1.48 – 1.38 (m, 10H, C ^{β} _{Leu}H₂, C ^{β} _{Lys}HH), 1.38 – 1.30 (m, 4H, C ^{δ} _{Lys}H₂), 1.29 – 1.15 (m, 5H, C ^{γ} _{Lys}H₂), 0.87 (dd, 12H, $J = 6.38, 2.15$ Hz, -CH₃ (Leu)), 0.82 (t, 12H, $^3J = 5.38$ Hz, -CH₃ (Leu)).

RP-HPLC (Linearer Gradient 0-100% Eluent B in 30 min, 25 °C): $t_r = 20.42$ min. Reinheit: 99 %.

ESI-MS: m/z kalk. for C₁₁₂H₂₀₃N₂₃O₃₇ [M+2H]²⁺ 1232.24; gef. 1232.50.

FTIR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3284 (m), 3082 (w), 2933 (w), 2870 (w), 1632 (s), 1541 (s), 1431 (m), 1367 (m), 1340 (m), 1215 (m), 1097 (m), 930 (w), 881 (w), 704 (m), 602 (m).

Trivalentes Dileucin-Pfropf-co-PPMK, 6

[3318.99]

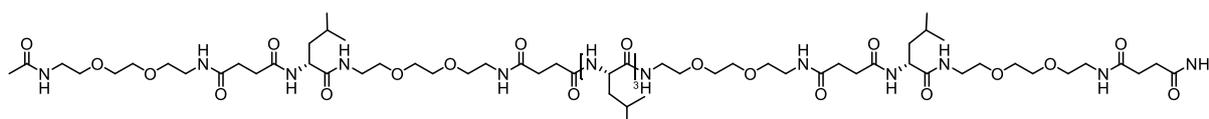
Die Gesamtausbeute von **6** betrug 53%.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 8.01 (d, 3H, $^3J = 7.97$ Hz, NH (Leu)), 7.98 (d, 3H, $^3J = 7.97$ Hz, NH (LySRückgrat)), 7.94 (t, 3H, $^3J = 5.43$ Hz, NH (Rückgrat)), 7.92 – 7.86 (m, 15H, NH (Rückgrat)), 7.82 (d, 3H, $^3J = 8.08$ Hz, NH (Leu)), 7.75 (t, 3H, $^3J = 5.19$ Hz, NH (Leu, LySseitenkette)), 7.29 (s, 1H, -NHH), 6.71 (s, 1H, -NHH), 4.24 – 4.17 (m, 6H, C ^{α} _{Leu}H), 4.11 (m, 3H, C ^{α} _{Lys}H), 3.49 (d, 38H, $^3J = 6.34$ Hz, -NH-CH₂-CH₂-O-), 3.40 – 3.36 (m, 38H, -O-C₂H₄-O-, Überlappung mit HDO), 3.21 – 3.14 (m, 38H, -NH-CH₂-CH₂-O-), 3.05 – 2.99 (m, 3H, C ^{ϵ} _{Lys}HH), 2.98 – 2.91 (m, 3H, C ^{ϵ} _{Lys}HH), 2.41 – 2.25 (m, 38H, NH₂-C(O)-C₂H₄-C(O)-), 1.83 (s, 9H, -CH₃ (Leu-Seitenkette)), 1.79 (2s, 3H, -CH₃ (Rückgrat)), 1.65 – 1.50 (m, 9H, C ^{γ} _{Leu}H, C ^{β} _{Lys}HH), 1.48 – 1.38 (m, 15H, C ^{β} _{Leu}H₂, C ^{β} _{Lys}HH), 1.37 – 1.30 (m, 6H, C ^{δ} _{Lys}H₂), 1.28 – 1.15 (m, 6H, C ^{γ} _{Lys}H₂), 0.87 (dd, 18H, $J = 6.68$, 2.75 Hz, -CH₃ (Leu)), 0.82 (t, 18H, $^3J = 5.93$ Hz, -CH₃ (Leu)).

RP-HPLC (Linearer Gradient 0-100% Eluent B in 30 min, 25 °C): $t_r = 20.80$ min. Reinheit: 97 %.

ESI-MS: m/z kalk. for C₁₅₂H₂₇₅N₃₁O₄₉ [M+2H]²⁺ 1660.50; gef. 1660.35.

FTIR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3284 (m), 3088 (w), 2933 (w), 2870 (w), 1630 (s), 1541 (s), 1433 (m), 1352 (m), 1261 (m), 1093 (m), 924 (w), 881 (w), 702 (m), 604 (m).

Block-co-PPMK, 7

[1544.96]

Die Gesamtausbeute von **7** betrug 69 %.

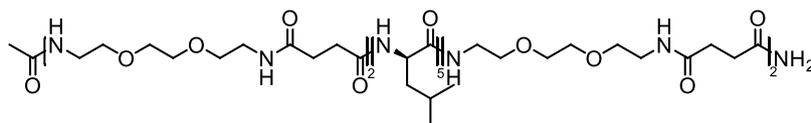
¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 8.30 (d, 1H, ³*J* = 6.43, NH), 8.11 (t, 1H, ³*J* = 5.72 Hz, NH), 8.05 (d, 1H, ³*J* = 8.01, NH), 7.94 – 7.90 (m, 4H, NH), 7.90 – 7.84 (m, 2H, NH), 7.56 (t, 1H, ³*J* = 5.72 Hz, NH), 7.42 (d, 1H, ³*J* = 8.47 Hz, NH), 7.26 (s, 1H, -NHH), 6.71 (s, 1H, -NHH), 4.24 – 4.12 (m, 4H, C ^{α} _{Leu}H), 4.09 (q, 1H, ³*J* = 7.2 Hz, C ^{α} _{Leu}H), 3.50 – 3.47 (m, 16H, -NH-CH₂-CH₂-O-), 3.44 – 3.40 (m, 16H, Überlappung mit HDO, -O-C₂H₄-O-), 3.21 – 3.14 (m, 16H, -NH-CH₂-CH₂-O-), 2.44 – 2.25 (m, 16H, NH₂-C(O)-C₂H₄-C(O)-), 1.79 (s, 3H, -CH₃ (Rückgrat)), 1.70 – 1.52 (m, 5H, C ^{γ} _{Leu}H₂), 1.51 – 1.37 (m, 10H, C ^{β} _{Leu}H₂), 0.90 – 0.77 (m, 30H, -CH₃ (Leu)).

RP-HPLC (Linearer Gradient 0-100% Eluent B in 30 min, 25 °C): *t*_r = 13.05 min. Reinheit: 98%.

ESI-MS: *m/z* kalk. for C₇₂H₁₃₂N₁₄O₂₂ [M+H]⁺ 1545.97; gef. 1545.40.

FTIR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3290 (m), 3082 (w), 2955 (w), 2870 (w), 1632 (s), 1541 (s), 1427 (m), 1340 (m), 1213 (m), 1124 (m), 698 (m).

Block-co-PPMK, 8



[1544.96]

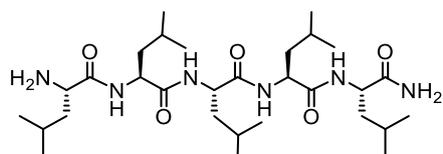
Die Gesamtausbeute von **8** betrug 63%.

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 8.46 (d, 1H, ³*J* = 6.01, NH), 8.20 (t, 1H, ³*J* = 5.72 Hz, NH), 8.08 (d, 1H, ³*J* = 7.39, NH), 7.91 – 7.83 (m, 6H, NH), 7.61 (t, 1H, ³*J* = 5.72 Hz, NH), 7.47 (t, 3H, ³*J* = 7.87 Hz, NH), 7.27 (s, 1H, -NHH), 6.71 (s, 1H, -NHH), 4.23 – 4.06 (m, 4H, C ^{α} _{Leu}H), 4.03 (dt, 1H, *J* = 10.5, 5.5 Hz, C ^{α} _{Leu}H), 3.49 (m, 16H, -NH-CH₂-CH₂-O-), 3.40 – 3.37 (m, 16H, Überlappung mit HDO, -O-C₂H₄-O-), 3.20 – 3.15 (m, 16H, -NH-CH₂-CH₂-O-), 2.46 – 2.26 (m, 3H, NH₂-C(O)-C₂H₄-C(O)-), 2.30 – 2.24 (m, 13H, NH₂-C(O)-C₂H₄-C(O)-), 1.79 (s, 3H, -CH₃ (Rückgrat)), 1.73 – 1.56 (m, 5H, C ^{γ} _{Leu}H₂), 1.56 – 1.39 (m, 10H, C ^{β} _{Leu}H₂), 0.91 – 0.85 (m, 15H, -CH₃ (Leu)), 0.84 – 0.78 (m, 15H, -CH₃ (Leu)).

RP-HPLC (Linearer Gradient 0-100% Eluent B in 30 min, 25 °C): *t*_r = 14.96 min. Reinheit: 99%.

ESI-MS: *m/z* kalk. for C₇₂H₁₃₂N₁₄O₂₂ [M+H]⁺ 1545.97; gef. 1545.50.

FTIR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3263 (m), 3087 (w), 2953 (w), 2927 (w), 2870 (w), 1628 (s), 1541 (s), 1439 (m), 1348 (m), 1277 (m), 1095 (s), 712 (m), 594 (m), 561 (m).

Block-co-PPMK, 9

[582.45]

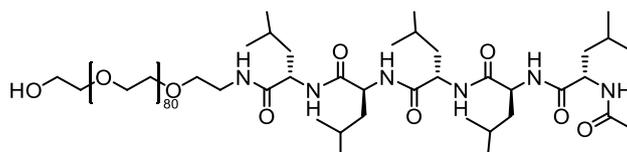
Die Gesamtausbeute von **9** betrug 76%. Die Verunreinigungen bei δ 3.50 ppm im $^1\text{H-NMR}$ und bei $t_r = 16.52$ min im RP-HPLC können PEG zugewiesen werden, welches während der Abspaltung vom Hart ebenfalls abgespalten wurde.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 8.57 (d, 1H, $^3J = 8.4$ Hz, NH), 8.20 (d, 1H, $^3J = 8.3$ Hz, NH), 8.15 – 8.08 (s, 2H, -NH₂), 7.93 (d, 1H, $^3J = 8.2$ Hz, NH), 7.71 (d, 1H, $^3J = 8.5$ Hz, NH), 7.25 (s, 1H, $^3J = 2.1$ Hz, -NHH), 6.96 (s, 1H, $^3J = 2.2$ Hz, -NHH), 4.42 (td, 1H, $J = 7.8, 7.3, 5.6$ Hz, C ^{α} _{Leu}H), 4.35 – 4.25 (m, 2H, C ^{α} _{Leu}H), 4.21 (td, 1H, $J = 8.6, 6.1$ Hz, C ^{α} _{Leu}H), 3.77 (s, 1H, C ^{α} _{Leu}H), 1.66 – 1.37 (m, 15H, C ^{β} _{Leu}H₂, C ^{γ} _{Leu}H₂), 0.92 – 0.79 (m, 30H, -CH₃ (Leu)).

RP-HPLC (Linearer Gradient 0-100% Eluent B in 30 min, 25 °C): $t_r = 12.33$ min. Reinheit: 92%.

ESI-MS: m/z kalk. for C₃₀H₅₈N₆O₅ [M+H]⁺ 583.45; gef. 583.20.

FTIR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3269 (m), 3084 (w), 2955 (m), 2929 (w), 2875 (w), 1664 (m), 1630 (s), 1545 (m), 1470 (w), 1388 (w), 1201 (m), 1138 (m), 837 (w), 798 (w), 719 (m), 594 (w).

Block-co-PPMK, 10

[4234.61]

Die Gesamtausbeute von **10** betrug 82%.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 8.00 (t, 2H, $^3J = 7.8$ Hz, NH), 7.81 (t, 2H, $^3J = 7.6$ Hz, NH), 7.67 (d, 1H, $^3J = 8.4$ Hz, NH), 4.57 (t, 1H, $^3J = 5.4$ Hz, -OH), 4.30 – 4.20 (m, 5H, C ^{α} _{Leu}H), 3.77 – 3.70 (m, 4H, -O-CH₂-CH₂-OH, -O-CH₂-CH₂-NH-), 3.51 (s, 326H, PEG Rückgrat -O-CH₂-O-), 3.30 – 3.24 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-OH), 3.23 – 3.10 (m, 2H, -O-CH₂-CH₂-NH-), 1.83 (s, 3H, -CH₃), 1.65 – 1.34 (m, 15H, C ^{β} _{Leu}H₂, C ^{γ} _{Leu}H₂), 0.93 – 0.72 (m, 30H, -CH₃ (Leu)).

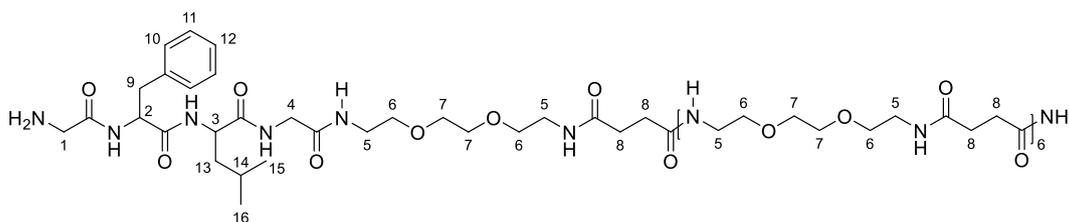
MALDI-TOF-MS: m/z kalk. for C₁₈₈H₃₇₂N₆O₈₄ [M(PEG₇₂)+H]⁺ 4059.51; gef. 4059.87.

FTIR: $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3267 (w), 2879 (m), 1691 (w), 1624 (m), 1554 (w), 1468 (m), 1342 (m), 1279 (m), 1240 (m), 1099 (s), 1061 (m), 962 (m), 841 (m), 715 (w), 530 (w).

5.4.1 Synthese der Oligo(amidoamin)-Lipo-Makromoleküle

Zur Herstellung der Oligo(amidoamin)-Lipo-Makromoleküle wurde das Oligo(amidoamin) zunächst gemäß des Fmoc-basierten Festphasenprotokolls am Peptid-Synthesizer hergestellt und vom Harz abgespalten. Anschließend fand die Kupplung des Phospholipids DOPES in Lösung statt.

EDS₇-GFLG-NH₂, **11**



[2002.11]

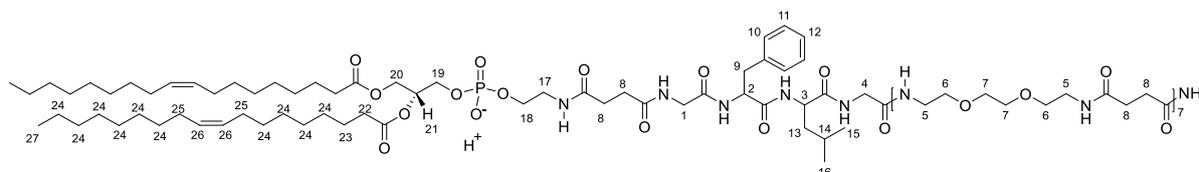
Oligo(amidoamin) **11** wurde nach dem allgemeinen Kupplungs- und Entschützungsprotokoll synthetisiert. Nach der endgültigen Abspaltung vom festen Träger wurde das Rohprodukt in der präparativen RP-HPLC aufgereinigt. Das gewünschte Produkt konnte mit einer Ausbeute von 31 % erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, CD₂Cl₂:MeOD-*d*₄ (1:1, v/v)): δ (ppm) 7.77 (m, NH), 7.27 (m, 5H, H10, H11, H12), 4.61 (m, Überlappung mit HDO, H2), 4.34 (m, 1H, H3), 3.96 (m, 2H, H4), 3.73 (m, 2H, H1), 3.62 (s, 28 H, H7), 3.55 (t, ³J = 5.77 Hz, 28H, H6), 3.38 (t, ³J = 5.37 Hz, 28 H, H5), 3.18 (m, 1H, H9), 2.98 (m, 1H, H9), 2.50 (s, 28H, H8), 1.62 (m, 3H, H13, H14), 0.94 (d, ³J_{H-H} = 6.13 Hz, 3H, H15), 0.99 (d, ³J = 6.13 Hz, 3H, H16).

LC-MS: (Linearer Gradient 0-50% Eluent B in 30 min, 25 °C): t_r = 13.457 min. Reinheit: 99%.

MALDI-TOF-MS: m/z kalk. for C₈₉H₁₅₅N₁₉O₃₂ [M+Na]⁺ 2025.2; gef. 2025.1.

DOPES-Pep-Ol, **13**



[2826.65]

220.0 mg (0.11 mmol) des Oligo(amidoamins) **11**, 46.5 mg (0.24 mmol) 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 37.6 mg (0.24 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)

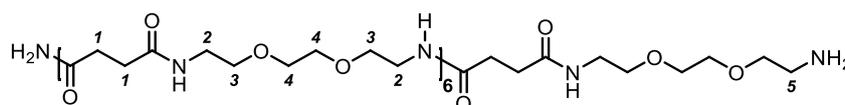
wurden in ein Schlenk-Röhrchen eingewogen, in Wasser gelöst und anschließend zum Entfernen von Restwasser gefriergetrocknet. Dann wurde das Gemisch zur Entfernung des gesamten Sauerstoffs abwechselnd evakuiert und dreimal mit Stickstoff gespült. Anschließend wurde die Mischung in 5 ml Dichlormethan (DCM) + 5 % Trifluorethanol (TFE) und 3 ml Methanol (MeOH) gelöst und 150.0 mg (1.74 mmol) des in 3 ml DCM + 5 % TFE-Lösung gelösten Lipids **12** zugegeben. Schließlich wurde die Reaktion durch Zugabe von 142 mg (1.1 mmol, 0.2 ml) Diisopropylethylamin (DIPEA) gestartet. Das Reaktionsgemisch wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Gemisch in eiskaltem Ether ausgefällt. Der entstandene Niederschlag wurde zentrifugiert und der Ether dekantiert. Das Produkt wurde dreimal mit Et₂O gewaschen und unter Stickstoffstrom getrocknet. Nach einer Säulenchromatographie mit Methanol:Ethylacetat 5:1 (v/v) als mobiler Phase konnten 96.58 mg (0.034 mmol, 31 %) des Produkts erhalten werden.

¹H-NMR (300 MHz, CD₂Cl₂:MeOD-*d*₄ (1:1, v/v)): δ (ppm) 0.92 (m, 12H, H15, H16, H27), 1.30 (m, 40H, H24), 1.64 (m, 7H, H13, H14, H23), 2.02 (m, 8H, H25), 2.31 (m, 4H, H22), 2.54 (m, 2H, H9), 3.38 (t, ³J = 5.39 Hz, 32H, H5, H17), 3.55 (t, ³J = 5.39 Hz, 28H, H6), 3.62 (s, 28H, H7), 3.83 (m, 4H, H1, H4), 3.97 (m, 3H, H18, H3), 4.18 (m, 2H, H19, H20), 4.38 (m, 2H, H19, H20), 4.55 (1H, H2, Überlagerung mit H₂O), 5.22 (m, 1H, H21), 5.35 (m, 4H, H26), 7.28 (m, 5H, H10, H11, H12), 7.73 (m, NH).

MALDI-TOF-MS: m/z kalk. for C₈₉H₁₅₅N₁₉O₃₂ [M-H]⁻ 2826.6 ; gef. 2826.4.

ESI-MS: m/z kalk. For C₈₉H₁₅₅N₁₉O₃₂ [M+H]²⁺ 1415.8, [M+H]³⁺ 944.5; gef. [M+H]²⁺ 1415.8, [M+H]³⁺ 944.5.

EDS₇-NH₂, **14**



[1627.91]

Die Gesamtausbeute von **14** betrug 73 %.

¹H-NMR (300 MHz, CD₂Cl₂:MeOD-*d*₄, (1:1, v/v)): δ (ppm) 2.46 (s, 28H, H1), 3.12 (t, ³J = 5.05 Hz, 2H, H5), 3.35 (t, ³J = 5.40 Hz, 26H, H2), 3.52 (t, ³J = 5.35 Hz, 28H, H3), 3.58 (s, 28H, H4), 7.58 (br-s, 1H, NH).

LC-MS: (Linearer Gradient 0-50% Eluent B in 30 min, 25 °C): t_r = 9.57 min. Reinheit: 97%.

ESI-MS: m/z kalk. For C₇₀H₁₂₉N₁₅O₂₈ [M+H]²⁺ 814.96, [M+H]³⁺ 543.64; gef. [M+H]²⁺ 815.00, [M+H]³⁺ 543.60

Zugabe von 106.4 mg (0.83 mmol, 0.14 ml) DIPEA gestartet. Die Reaktionsmischung wurde 72 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Gemisch in eiskalten Et₂O gegeben. Der entstandene Niederschlag wurde zentrifugiert und der Et₂O dekantiert. Das Produkt wurde dreimal mit Et₂O gewaschen und unter Stickstoffstrom getrocknet. 338 mg (0.076 mmol, 92 %) des Produkts konnten als weißer Feststoff erhalten werden. Das Produkt ist mit 3.7 Gew.-% EDC-HCl-Salz verunreinigt, das bei der Reaktion als Kupplungsreagenz verwendet wurde.

¹H-NMR (600 MHz, CD₂Cl₂:MeOD-*d*₄ (1:1, v/v), 25 °C): δ (ppm) 0.88 (m, 9H, H9 + H27), 0.95 (d, ³J = 6.36 Hz, 3H, H10), 1.28 (m, 44H, H24), 1.57 (m, 3H, H23), 1.68 (m, 3H, H7 + H8), 2.01 (q, ³J = 6.02, ⁴J = 6.79 Hz, 8H, H23), 2.29 (m, 4H, H22), 2.83 (s, 4H, H16), 3.35 (m, 1H, H12 oder H12'), 3.42 (m, 1H, H12 oder H12'), 3.49-3.57 (m, 4H, H4 + H17), 3.59-3.68 (m, 310H, H1+ H2+ H3), 3.73-3.88 (m, 7H, H5+H18+H19 or H19'), 3.97 (m, 3H, H6+H19 or H19'+H21 or H21'), 4.16 (dd, ³J_{H-H} = 6.65 Hz, 1H, H21 or H21'), 4.46 (m, 1H, H11), 5.20 (m, 1H, H20), 5.33 (m, 4H, H26), 7.21 (t, ³J = 7.27 Hz, 1H, H15), 7.28 (t, ³J = 7.57 Hz, 2H, H14), 7.32 (d, ³J = 7.21 Hz, 2H, H13), 7.80 (d, ³J = 7.52 Hz, 1H, NH), 8.31 (d, ³J = 7.52 Hz, 0.5H, NH).

Im ¹H-NMR wurden Verunreinigungen gefunden, die dem EDC-HCl-Salz zugeordnet werden können: δ (ppm) 1.09 (m), 1.90 (m), 2.39 (m), 2.53-2.68 (m), 3.06-3.25 (m).

MALDI-TOF-MS: m/z kalk. für PEG₆₅-GFLG-Lipid C₁₉₈H₃₇₇N₆O₈₁P[M+2xNa]⁺ 4212.5; gef. 4213.5

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

<i>Abkürzung</i>	<i>Definition</i>
<i>et al.</i>	und andere (et alii)
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
Äq.	Äquivalente
gef.	gefunden
kalk.	kalkuliert
s.g.	so genannte(n)
u.A.	unter Anderem
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel
<i>Chemikalien</i>	<i>Trivialname und IUPAC</i>
AgSD	Silbersulfadiazin
Alloc	Allyloxycarbonyl
A β ₄₀	Alzheimer-Amyloid-Polypeptide
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
BOP	Benzotriazol-1-yloxytris(dimethyl-amino)phosphoniumhexafluorophosphat
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
CD ₂ Cl ₂	deutერიertes Dichlormethan
CO ₂	Kohlendioxid
CuI	Kupferiodid

DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	Deuteriertes Dimethylsulfoxid
DOPES	<i>1,2</i> -Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin- <i>N</i> -succinyl-Natrium-Salz
DOPES-Pep-OI	<i>1,2</i> -Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin- <i>N</i> -succinyl-Gly-Phe-Leu-Gly-Oligo(amidoamin)-Natrium-Salz
DOPES-Pep-PEG	<i>1,2</i> -Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin- <i>N</i> -succinyl-Gly-Phe-Leu-Gly-Polyethylenglykol-Natrium-Salz
DOX	Doxorubicin
EDC	<i>1</i> -Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDS	<i>1</i> -(9 <i>H</i> -fluoren-9-yl)-3,14-dioxo-2,7,10-trioxa-4,13-diazaheptadecan-17-Säure
Et ₂ O	Ether
FF	Diphenylalanin
Fmoc	9-Fuorenylmethyloxycarbonyl
Fmoc-LL	9-Fuorenylmethyloxycarbonyl-Dileucin
Fmoc-PP	9-Fuorenylmethyloxycarbonyl-Diphenylalanin
Gdn ⁺	Guanidin-Kation
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid
GFLG	Glycin-Phenylalanin-Leucin-Glycin
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HMPA	Hexamethylphosphorsäuretriamin
HOBt	<i>1</i> -Hydroxybenzotriazol

HPMA	<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methacrylamide
Leu ₅	Pentaleucin
LMWG	low-molecular-weight gelators, Niedermolekularen Gelierer
MeCN	Acetonitril
MeOD- <i>d</i> ₄	deuteriertes Methanol
MQ-Wasser	Milli-Q-Wasser
N ₂	Stickstoff
Pd	Palladium
PEG	Polyethylenglykol
PEG-GFLG-NH ₂	Polyethylenglykol-Glyci-Phenylalanin-Leucin-Glycin-Amin
PLL	Poly(L-Leucin)
PNIPAM	Poly(<i>N</i> -isopropylacryl-amid)
PPMK	Peptid-Präzisionsmakromolekül-Konjugat
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxytri(pyrrolidino)- phosphoniumhexafluorophosphat
TDS	1-(Fluorenyl)-3,11-dioxo-7-(pent-4-ynoyl)-2-oxa-4,7,10- triazatetradecan-14-Säure
TFA	Trifluoressigsäure
ThT	Thioflavin T
TIPS	Triisopropylsilan
<i>Methoden</i>	<i>Definition</i>
CuAAC	<i>Cu-mediated alkyne azide conjugation</i> , Kupfer-katalysierte Alkin-Azid-Zyklokonjugations-Reaktion
CD	Circular Dicroism
DLS	Dynamische Lichtstreuung
ESI-MS	Elektrosprayionisation- Massenspektroskopie
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot-Spektrometrie

KAK	Kritische Aggregationskonzentration
MALDI-TOF-MS	Matrix–Assistierte Laser–Desorption–Ionisierung – <i>time of flight</i> - Massenspektroskopie
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanz
PIT	Post-Insertion-Technik
RP-HPLC	<i>Reversed phase - high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
TEM	Transmissionselektronenmikroskop

<i>Einheiten und Symbole</i>	<i>Definition</i>
%	Prozent
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
[θ]	molare Elliptizität
<	kleiner als
>	größer als
\geq	größer gleich
°C	Grad Celsius
μM	Mikromol
μm	Mikrometer
Ala, A	Alanin
C	Kohlenstoff-Atom
<i>c</i>	Konzentration
CH ₃ -	Methyl-Gruppen
cm	Zentimeter
COOH-	Carboxy-Gruppe
D-	rechts-drehend
<i>d</i>	Schichtdicke
<i>D</i>	Diffusionskoeffizient

Da	Dalton
D _h	hydrodynamischer Durchmesser
E _L	linksdrehender Vektor
Em	Emission
E _R	rechtsdrehender Vektor
Ex	Extinktion
g	Gramm
g/mol	Gramm pro Mol
G'	Speichermodul
G''	Verlustmodul
Glu, E	Glutaminsäure
Gly, G	Glycin
h	Stunde
Hz	Hertz
J	Kupplungskonstante
k _B	Boltzmannkonstante
kPa	Kilopascal
L-	links-drehend
l, L	Liter
Leu, L	Leucin
Lys, K	Lysin
M	Molar (Mol pro Liter)
MHz	Megahertz
min	Minuten
ml, mL	Milliliter
mM	Millimolar (Millimol pro Liter)
mmol	Millimol

mV	Millivolt
N	Stickstoff-Atom
NH ₂ -	Amino-Gruppe
nm	nanometer
Pa	Pascal
PDI	Partikelgrößenverteilung
pH	potentia hydrogenii
Phe, F	Phenylalanin
ppm	<i>part per million</i>
Pro, P	Prolin
R _h	Hydrodynamischer Radius
s	Sekunde
Ser, S	Serin
T	Temperatur
t _r	Retentionszeit
U/min	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumenanteile
Val, V	Valin
α	Alpha
β	beta
δ	Chemische Verschiebung
ζ	Zeta, Oberflächenladung
η	Viskosität
θ	Theta, Elliptizität
λ	Lambda, Wellenlänge
π	Pi

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht zur vorliegenden Arbeit zur Synthese und Charakterisierung von Peptid-Präzisionsmakromolekül-Konjugaten (PPMK).....	X
Abbildung 2: Molekulargewichtsverteilung der eingesetzten Wirkstoffmoleküle. Die bis zur Mitte des 20ten Jahrhunderts eingesetzten Wirkstoffmoleküle wurden in zwei Klassen unterteilt. Zum einen in sehr kleine, synthetisch hergestellte organische Wirkstoffe <500 Da (hier im Beispiel das Penicillin zur Bakterienbekämpfung) oder in sehr große biologische Moleküle >5000 Da (z.B. das Insulin; Proteinstruktur PDB ID (engl. Protein Data Bank identification code): 1OS4 ^[23]). Peptide vervollständigen dieses Spektrum, indem sie mit ihrer durchschnittlichen Größe von 500 – 5000 Da die Lücke besetzen und indem sie die Vorteile beider Klassen in sich vereinen.	2
Abbildung 3: Darstellung gebräuchlicher Festphasenpeptid-Harze und Linker zum Einsatz in der Festphasenpeptidsynthese. (a) Das Merrifield-Harz aus Polystyrol mit 1-2 % m-Divinylbenzol und das TentaGel™-Harz bestehend aus dem vernetzten Polystyrol mit 50-70 % Poly(ethylenglycol). (b) Auswahl an spaltbaren Linkern. Die Abspaltung der Peptidketten von Wang- und Chlorotrityl-Linker ergeben eine terminale Säure-Gruppe, während die Spaltung vom Rink Amid-Linker in einem terminalen Amid resultiert.	6
Abbildung 4: Drei Beispiele der gängigsten Amino-Schutzgruppen. Diese können sowohl am Terminus oder an den Seitenketten angebracht werden.	7
Abbildung 5: Mögliche Selbstassemblierung von Peptiden. Peptide können sich durch nicht-kovalente, intra- und intermolekulare Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe, elektrostatische und π - π -Wechselwirkungen, zu Sekundärstrukturen (α -Helix und β -Faltblatt) zusammensetzen, die weiter zu größeren Strukturen aggregieren.	11
Abbildung 6: Selbstassemblierung von Fmoc-FF. (a) Chemische Struktur von Fmoc-FF (links). Das umgedrehte Glasgefäß (rechts) zeigt das durch Selbstassemblierungsprozesse erhaltene transparente Hydrogel. (b) Cryo-SEM-Bilder von der Hydrogel Struktur. Sie zeigen die Entwicklung von Nanofasern (Maßstabsbalken = 500 nm). (c) Strukturmodell von Fmoc-FF zeigt die Anordnung von Fmoc-FF-Peptide in einem antiparallelen β -Faltblattemuster. In dieser Darstellung sind die Fmoc-Gruppen in orange und die Phenylalanin-Seitenketten in violett dargestellt. (Abbildung arrangiert aus Graphiken aus Ref. ^[104]).....	14
Abbildung 7: Beispiele für peptidbasierte Strukturen zur Anwendung im Wirkstofftransport. (a) Chemische Struktur des Peptids MAX8, das sich über Selbstorganisation zu einem Makrogel anordnet. ^[122] (b) Beispiel für ein Nanogel: Chemische Struktur des kombinatorischen Peptid-Wirkstoff-Präparats Fmoc-GFLGG-Dox, das zur Bekämpfung von Krebs eingesetzt werden kann. ^[123]	16
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Anwendung enzymatisch spaltbarer Einheiten zur Medikamentenverabreichung. Denkbar sind zwei Vorgehensweisen: (a) Beispielhafte Darstellung eines kovalent über einen enzymatisch-spaltbaren Linker gebundenen Wirkstoff an ein Polymer. Nach dem enzymatischen Abbau des Linkers erfolgt die Freisetzung des Wirkstoffs. Darstellung (b) beschreibt die nicht-kovalente Einkapselung des Wirkstoffs in einem Hydrogel-Netzwerk. Die Wirkstofffreisetzung erfolgt nach enzymatischer Spaltung der Polymerketten, welches die Auflösung des Gels hervorruft.....	20
Abbildung 9: Positiver synergetischer Effekt von Peptid-Polymer-Hybrid-Konjugaten. Durch die kovalente Verknüpfung beider Strukturen, erhält man neuartige Materialien, die die Vorteile beider Komponenten in sich vereinen.....	23
Abbildung 10: Die drei primären Methoden zur Synthese von Peptid-Polymer-Konjugaten.	24

- Abbildung 11:** Schamtische Darstellung eines selbstassemblierten Liposoms durch Phospholipide und Phospholipid-Polymer-Hybriden. 25
- Abbildung 12:** Überblick über das Design der geplanten Peptid-Präzisionsmakromolekül-Konjugaten (PPMK). Dabei soll die Struktur der Konjugate in ihrer Architektur (links) der Valenz (mitte) und Peptid-Kettenlänge (rechts) variieren. 30
- Abbildung 13:** Darstellung der zwei Syntheserouten (a) „grafting-to“ und (b) „grafting-from“ zur Herstellung der PPMKs. 32
- Abbildung 14:** Graphische Darstellung und die RP-HPLC-Spektren der über die zwei Syntheserouten hergestellten PPMKs. Sowohl über den „grafting-to“ (links) als auch über den „grafting-from“-Syntheseweg (rechts) konnten jeweils ein monovalentes und ein divalentes Konjugat mit einem oder zwei Pentaleucin-Seitenketten synthetisiert werden. Bedingungen der RP-HPLC-Analyse von den beiden monovalenten Konjugaten: 95/5 H₂O/MeCN mit 0.1 % Ameisensäure (A) und 5/95 H₂O/MeCN mit 0.1 % Ameisensäure (B), 100 % A bis 50 % A in 15 min, 2 min 100 % MeCN mit 0.1 % Ameisensäure, bestimmt bei 214 nm. Bedingungen der RP-HPLC-Analyse von den divalenten Konjugaten: 95/5 H₂O/MeCN mit 0.1 % Ameisensäure (A) und 5/95 H₂O/MeCN mit 0.1 % Ameisensäure (B), 100 % A bis 100 % B in 15 min, 2 min 100 % MeCN mit 0.1 % Ameisensäure, bestimmt bei 214 nm. 33
- Abbildung 15:** Schematische Darstellung der Synthese von Leucin-basierten Propf-co-PPMKs mittels Festphasensynthese am Beispiel des Dimers. (A) Kupplungsreaktion unter Verwendung von 5 Äq. des Bausteins, 5 Äq. PyBOB und 10 Äq. DIPEA. Beim Aufbau der Peptidseitenkette vervielfacht sich die Verwendung von Fmoc-L-Leucin und den Kupplungsreagenzien mit der Anzahl der Valenz (B) Fmoc-Entschützung mit 25 %iger Piperidin in DMF-Lösung. (C) Acetylierung mit Ac₂O. (D) Boc-Entschützung mit 4M HCl in 1,6-Dioxan. (E) Abspaltung vom festen Träger mit 95 % TFA/2.5 % TIPS/2.5 % DCM. ... 34
- Abbildung 16:** Darstellung der über die Festphasensynthese hergestellten PPMKs (Ausbeute der Produkte ist in Klammern angegeben). Diese lassen sich in drei Kategorien unterteilen: Die Ppropf-co-PPMKs mit Pentaleucin- (oben) und mit Dileucin-Ketten (mitte) als Seitenkette und die linearen Block-co-PPMKs mit in der Hauptkette integriertem Leucin (unten). 36
- Abbildung 17:** ¹H-NMR von dem PPMK **1** (600 MHz, DMSO-d₆, 25° C). 37
- Abbildung 18:** RP-HPLC-Chromatogramme der synthetisierten PPMKs und die ermittelten Retentionszeiten. Bedingungen der RP-HPLC-Analyse: 95/5 H₂O/MeCN mit 0.1 % Ameisensäure (A) und 5/95 H₂O/MeCN mit 0.1 % Ameisensäure (B), 100 % A bis 100 % B in 30 min, 25° C, bestimmt bei 214 nm. 38
- Abbildung 19:** FTIR-Spektren der PPMKs. Das Spektrum wird in dem Bereich von 1450 bis 1750 cm⁻¹ dargestellt, sodass der Fokus auf der Amid I-Bande der Konjugate liegt. 41
- Abbildung 20:** CD-Spektren der PPMKs. Zur besseren Übersicht wurden die Spektren kategorisch zusammengefasst in (a) Pentaleucin-Propf-co-PPMKs, (b) Dileucin-Propf-co-PPMKs und (c) die Block-co-PPKMs. 44
- Abbildung 21:** Untersuchung der Konjugat-Stabilität durch Degradierung der Konjugat-Aggregate mittels GdnHCl. Dabei wurden die Konjugate **1-3** und **8-10** in Abhängigkeit von der Salzkonzentration (1-6 M) an dem CD-Spektrometer gemessen. Die Datenpunkte bei 222 nm der jeweiligen Spektren wurden verwendet und gegen die Salzkonzentration aufgetragen. 47
- Abbildung 22:** Schematische Darstellung der durch GdnHCl induzierten Aggregation des Pentaleucin-Konjugats **9**. Vermutlich führt eine geringe Konzentration des Salzes zu einer Vernetzung der Peptid-Ketten (b), die bei der räumlichen Annäherung Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und anschließend aggregieren. Ab einer Konzentration von 4 M Salz wird diese Aggregation wiederum

- aufgebrochen (c), indem ein Überschuss an Gdn⁺-Kation an die Peptide konjugieren und so intermolekulare Wechselwirkungen verhindern. 49
- Abbildung 23:** ThT-Bindungsstudien zur Bestimmung der β -Faltblatt-Ausbildung während der Degradierung durch GdnHCl. Untersucht werden die multivalenten Konjugate **2**, **3** und das freie Pentaleucin **9**. Zur besseren Übersicht über die Ergebnisse des Dimer- und des Pentaleucin-Konjugats, wurde der Ausschnitt zwischen 0 und 3 M GdnHCl zusätzlich vergrößert dargestellt. (Messung in Triplikaten, Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.) 50
- Abbildung 24:** Schematische Darstellung der durch GdnHCl aufgebrochenen Aggregation des Dimer-Konjugats **2**. Ohne Zugabe des Salzes befindet sich nahezu das gesamte Material in einem kollabierten aggregierten Zustand (Ausbildung von inter- und intramolekularen Wechselwirkungen) (a). Nach Salz-Zugabe (1 M) wird die Aggregation nach und nach aufgebrochen, indem einzelne Konjugat-Moleküle abgespalten werden. Diese sind in der Lage intramolekulare Wechselwirkungen auszubilden (b). Bei Erhöhung der Gdn⁺-Konzentration befinden sich die Konjugate ausschließlich in Lösung, wobei ein Teil weiterhin β -Faltblatt-Strukturen ausbilden können und der andere Teil durch das Kation komplexiert keine Sekundärstruktur mehr aufweist (c). Letzteres Stadium wird ab 6 M Salz erreicht. Der Überschuss an Kation führt zu einer vollständigen Spaltung der inter- und intramolekularen Aggregate (d). 51
- Abbildung 25:** Bestimmung der Kritischen Aggregationskonzentration der verzweigten PPMKs **1**, **2**, und **3** und den linearen PPMKs **8** und **9** mittels Bindungsstudien mit Thioflavin T. Der Ausschnitt zwischen der Fluoreszenzintensität 0 und 0.5 wurde zusätzlich vergrößert dargestellt. (Messung in Triplikaten, Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.) 53
- Abbildung 26:** Darstellung der drei möglichen Aggregatsbildungen am Beispiel der Selbstassemblierung des Trimers **5**. Dabei kann nach kontrolliertem Herstellungsverfahren entweder ein Makrogel erzeugt werden, bei dem überwiegend intermolekulare Wechselwirkungen gebildet werden (a), oder Nanogele, die durch die Bindung weniger Konjugate generiert werden können (b). Hierbei finden vermutlich zu gleichen Teilen inter- und intramolekulare Wechselwirkungen statt. Ebenfalls möglich ist die Generierung von Einzelmolekül-Aggregaten, welche nur über intramolekulare Bindungen assemblieren (c). 55
- Abbildung 27:** Bestimmung der Gelstärken der PPMK-Gele. Die Speichermodule G' wurden am Rheometer in Abhängigkeit von der Frequenz bei 0.1 bis 100 Hz erzeugt. Dabei wurden die Konjugat-Lösungen in vorgefertigten Spritzenbehältern zu zylinderförmigen Gelen geliert und auf die Rheometer-Messplatte durch Herausdrücken aufgebracht (a). Es wurden Gele von den reinen Konjugaten **2** und **3**, sowie den Mischungen aus den beiden Konjugaten mit den linearen Pentaleucin-Konjugaten **9** und **10** im definierten Mischverhältnis hergestellt (b). Bilder, der erzeugten PPMK-(Misch-)Gele (c). Kumulierter Graph aller gemessenen Gele (d). 58
- Abbildung 28:** Graphische Darstellung des Gel-Netzwerks am Beispiel des Trimers **3** allein oder als Multikonjugat-Gel mit dem Pentaleucin **9** (in diesem Fall grün dargestellt) im äquimolaren Mischverhältnis (1:1, **M3a**) und im äquivalenten Verhältnis zu der Anzahl der Leucin-Seitenketten (1:3, **M3b**) 60
- Abbildung 29:** DLS-Ergebnisse der Konjugat-Mischungen aus **2** und **3** mit den jeweiligen Pentaleucin-Konjugaten **9** und **10**. 65
- Abbildung 30:** Graphische Darstellung der Ergebnisse aus der Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers der PPMK-(Misch-)Nanopartikel mittels DLS. Hier am Beispiel des Trimers **3** dargestellt. Es wurden Partikel aus dem reinen Trimer Konjugat hergestellt (a), wobei sehr großen Aggregate von 11180 nm erzeugt wurden. Außerdem wurden Partikel aus Konjugat-Mischungen erzeugt. Trimer und das Pentaleucin **9** (b) zeigten die Bildung kleiner Nanopartikel von 25 nm. Die

Mischung aus Trimer und PEG-Leu₅ **10** (c) führte zur Bildung größerer Nanopartikel (ca. 200 nm). Die Probenkonzentration betrug immer 30 µM..... 67

Abbildung 31: TEM-Bilder der PPMK- und Misch-PPMK-Partikellösungen. In der obersten Reihe befinden sich die Bilder der reinen Konjugat-Partikel **2**, **3**, **9** und **10**. Die mittlere und die untere Reihe zeigen die Abbildungen der Misch-Konjugat-Partikel von **2** und **9** (**M1a**, **M1b**), **2** und **10** (**M2a**, **M2b**), **3** und **9** (**M3a**, **M3b**) und **3** und **10** (**M4a**, **M4b**). Die Konjugat-Lösungen wurden bei einer Konzentration von 30 µM hergestellt. Die Maßstabsleiste beträgt 200 nm, mit Ausnahme von Bild **5** und **11**, bei denen der Maßstab 500 nm beträgt und Bild **M1b** beträgt der Maßstab 100 nm..... 69

Abbildung 32: Darstellung der Reduktionsreaktion von Rasazurin zu Resorufin durch lebensfähige Zellen. (Darstellung basierend an Abb. 1 des CellTiter-Blue® Instruktionsprotokolls von Promega^[263]) 72

Abbildung 33: Toxizitätsstudie ausgewählter Multikomponenten-PPMKs an MDA-MB-231 (a) und MCF-12A (b) Zellkulturen. (Messung in Triplikaten, Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.) 73

Abbildung 34: ¹H-NMR-Spektren der Oligo(amidoamin)/PEG-Lipo-Makromoleküle DOPES-Pep-OI (oben), DOPES-OI (mitte) und DOPES-PEP-PEG (unten). Die obere und mittlere Struktur wurde in Dichlormethan:Methan 1:4 (v/v) und die untere Struktur in Dichlormethan:Methan 1:1 (v/v) bei 600 MHz gemessen. Das DOPES-Pep-OI wurde bei 300 MHz gemessen..... 76

Abbildung 35: Ergebnisse aus Herstellung und Analyse der Oligo(amidoamin)-Lipo-Makromolekül-Liposome. (a) Cryo-TEM-Aufnahmen der mit DOPES-Pep-OI (A), DOPES-OI (B) und DOPES-Pep-PEG (C) modifizierte Liposomen vor und nach der Aufreinigung. Pfeile zeigen scheibenartige und wurstartige Vesikel und andere ungewöhnliche Strukturen an. (b) Makrophagen-Aufnahme von Oligo(amidoamin)-modifizierten Liposomen in Zebrafischlarven. Konfokale Bilder der Schwanzregion wurden nach 1 h und 24 h aufgenommen. Die Kollokalisierung von grün fluoreszierenden Makrophagen und rot fluoreszierenden Liposomen ergibt gelbe Flecken (durch weiße Pfeile gekennzeichnet). (c) Änderung des ζ-Potentials verschiedener mit Papain behandelte liposomale Formulierungen. Unmodifizierte Liposomen (roter Kreis), mit DOPES-Pep-OI modifizierte Liposomen (grünes Dreieck), mit DOPES-Pep-OI modifizierte Liposomen (pinkes Dreieck) und mit DOPES-Pep-PEG modifizierte Liposomen (lila Viereck). Entsprechende Linien für Kontrollliposomen wurden zur besseren Veranschaulichung hinzugefügt und stellen keine linearen Regressionskurven dar. (d) Aufnahme von Oligo(amidoamin)-modifizierten Liposomen und Kontrollen in HeLa-Zellen vor (gefüllte Balken) und nach (gestrichelte Balken) Behandlung mit Papain. (Kollage erstellt durch Übernahme der Abbildung aus der Dissertation von S. Bleher^[266]) 78

Abbildung 36: Graphische Darstellung der Nanopartikel-Herstellung. 91

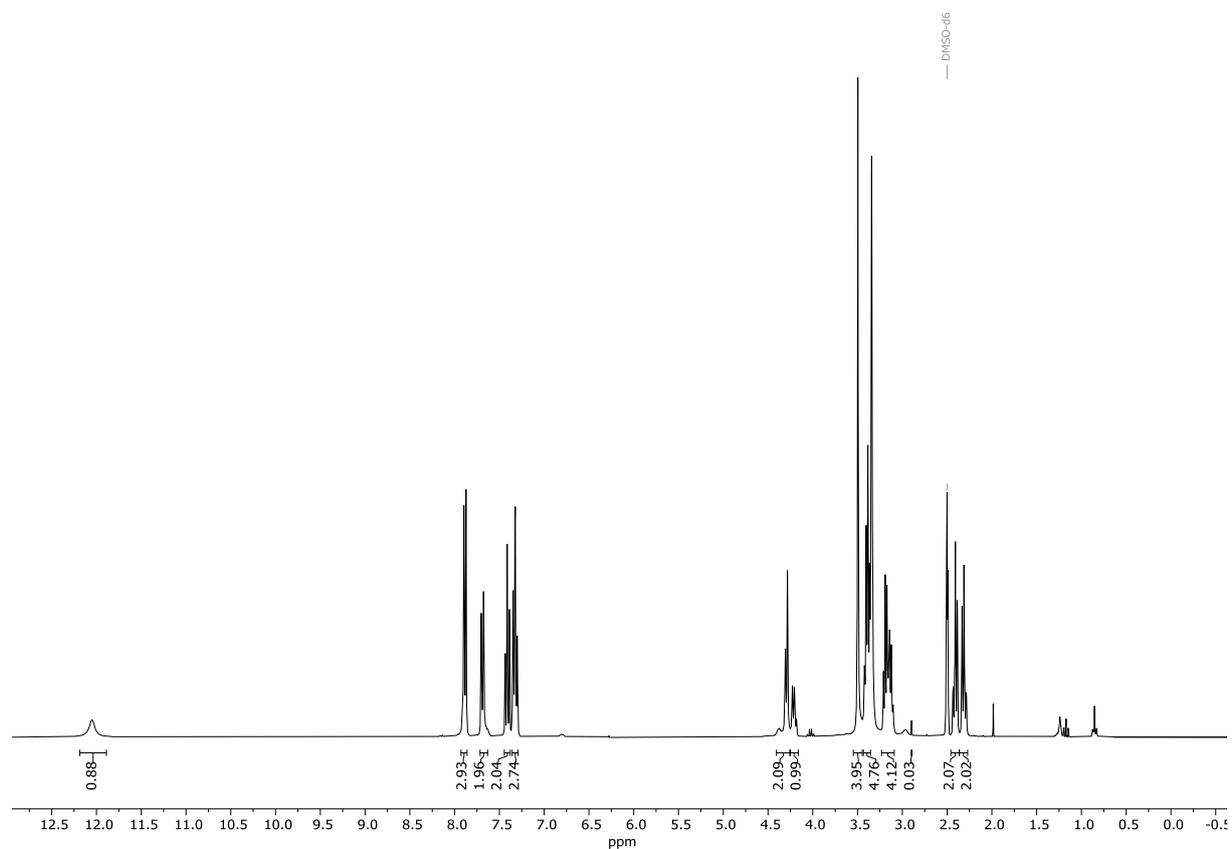
6.3 Schemaverzeichnis

Schema 1: Allgemeine schematische Darstellung der Festphasen-Peptidsynthese zur Herstellung kleiner Peptidketten durch schrittweise Assemblierung der Aminosäuren auf einem festen Träger. ^[36]	4
Schema 2: Reaktionsschema der Aktivierung des Carbonsäure-Restes einer Aminosäure und der Reaktion der Aminogruppe einer zweiten Aminosäure mit Hilfe von PyBOP und DIPEA unter Bildung einer Amid-Bindung.....	8
Schema 3: Zwei Beispiele von Hartmann et al. synthetisierten Bausteine für die Festphasen-Polymersynthese. Der TDS-Baustein fungiert aufgrund der Alkin-Bindung als funktioneller Baustein, während das EDS durch die Diethylenglykol-Einheit als hydrophiler Spacer-Baustein eingesetzt wird.	9
Schema 4: Reaktionsgleichungen der synthetisierten Oligo(amidoamin)-Lipo-Makromoleküle. Das Oligo(amidoamin) (blau) und das GFLG (grün) wurden farblich gekennzeichnet. (a) DOPES-Pep-OI, (b) DOPES-OI, (c) DOPES-Pep-PEG.	75

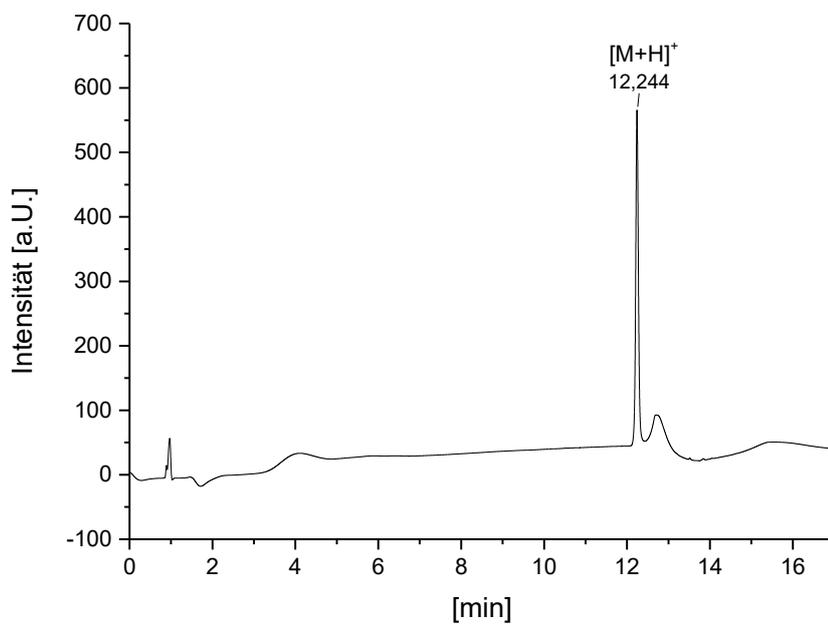
6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Über die FTIR Spektroskopie ermittelten Amid I-Banden der PPMKs.....	42
Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den CD-Analysen.	44
Tabelle 3: Über DLS-Messungen ermittelter hydrodynamischer Durchmesser und PDI der Konjugate 2 und 3	63
Tabelle 4: Über DLS-Messungen ermittelter hydrodynamischer Durchmesser und PDI des Pentaleucins 9 und der Konjugat-Mischungen.	63

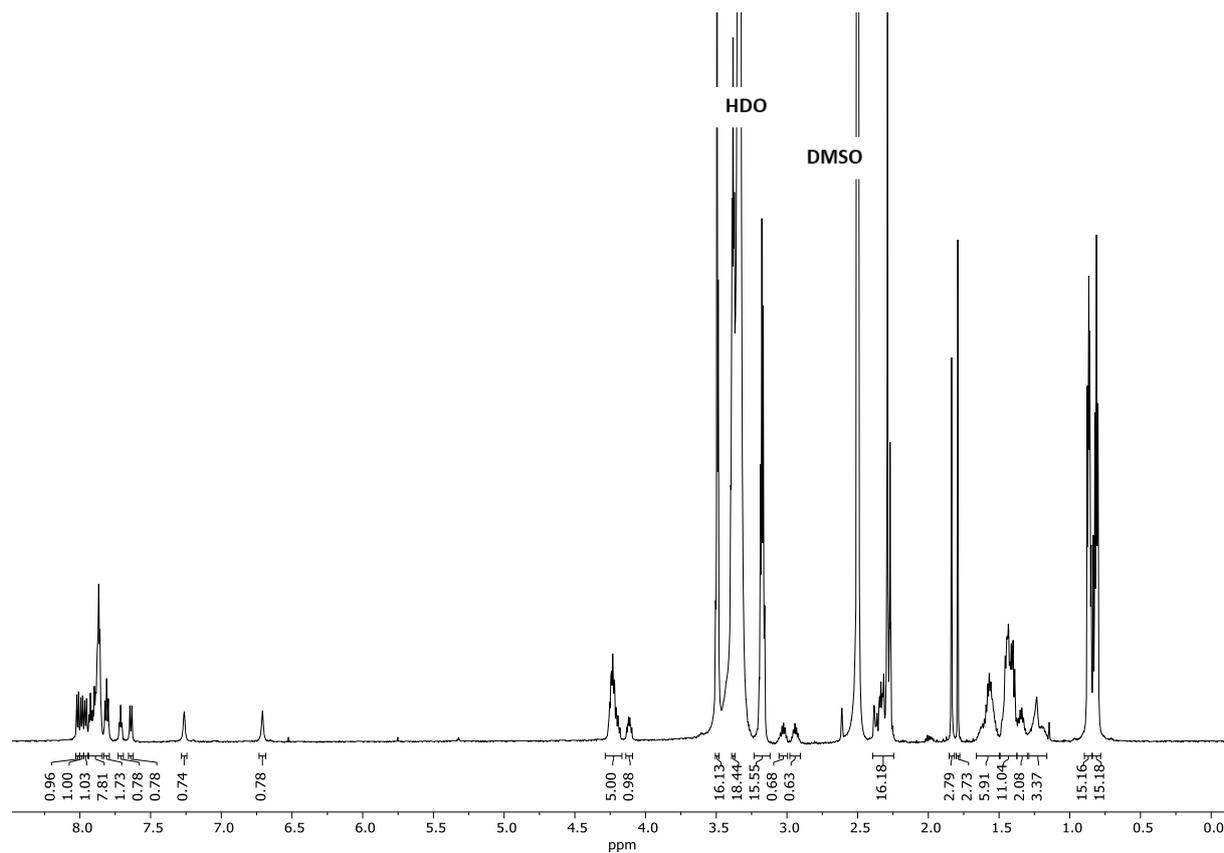
6.5 Appendix



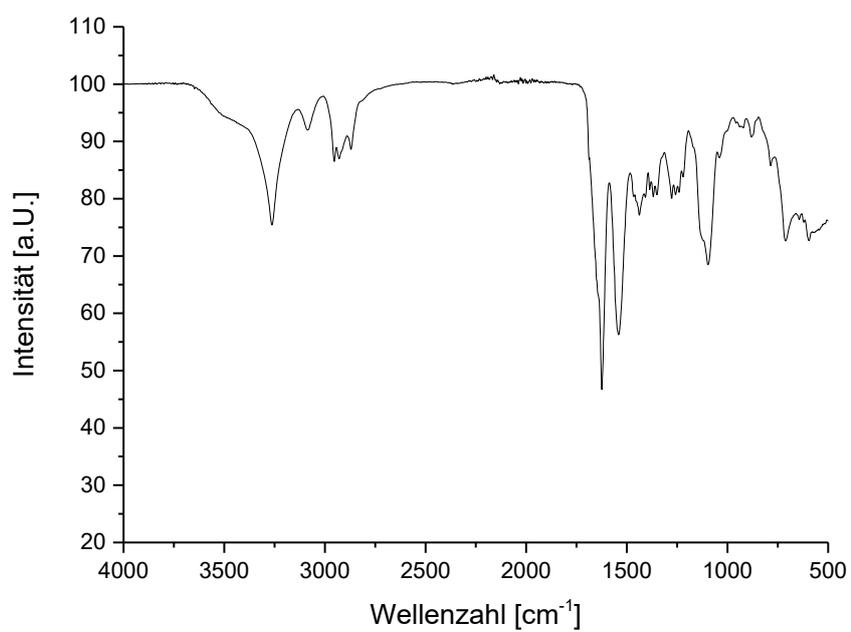
Appendix 1: ¹H-NMR von EDS (300 MHz, 25° C, DMSO-d₆).



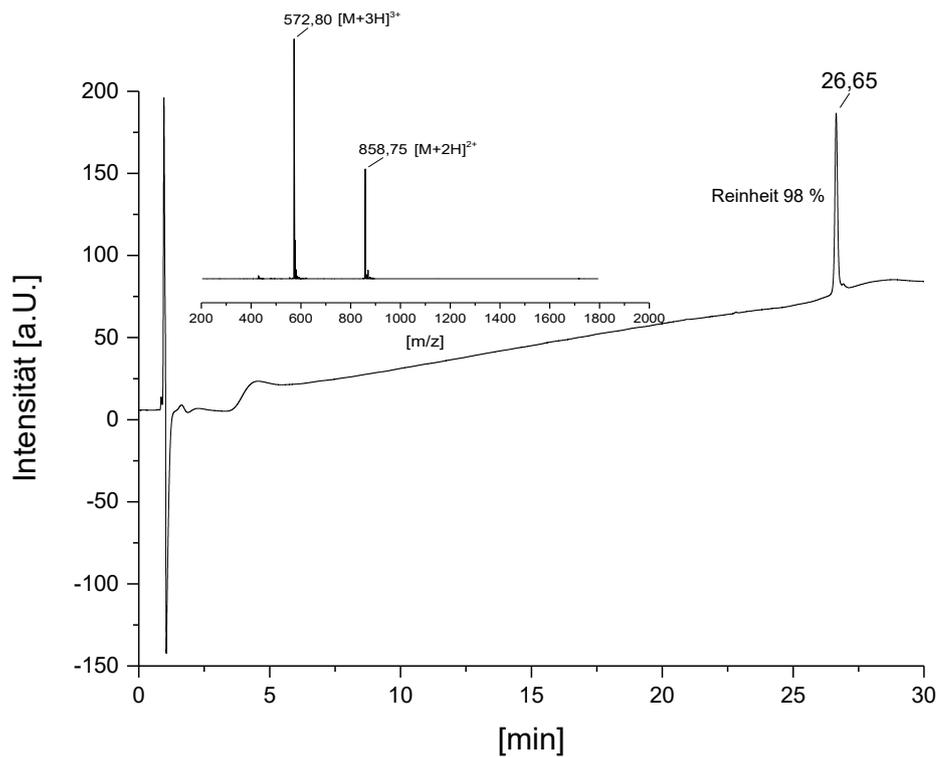
Appendix 2: RP-HPLC-Chromatogramm von EDS (Linearer Gradient 0-50% Eluent B in 15 min, 25 °C).



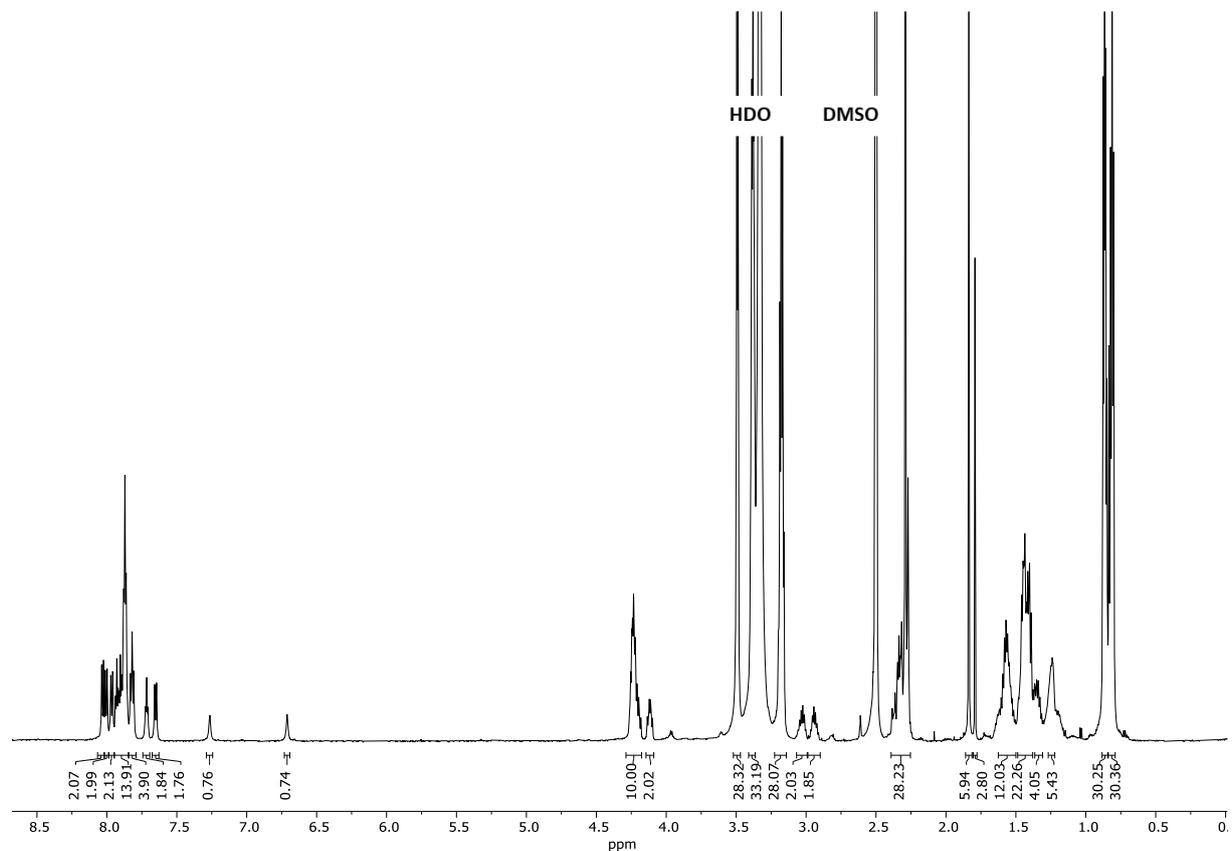
Appendix 3: ¹H-NMR von **1** (600 MHz, 25°C, DMSO-d₆).



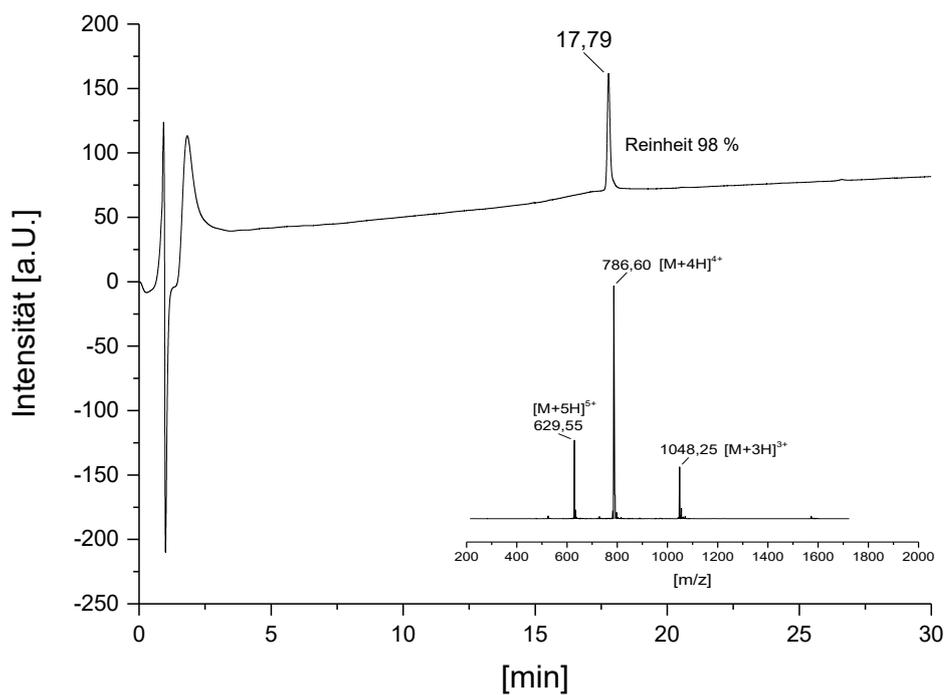
Appendix 4: FTIR-Chromatogramm von **1**.



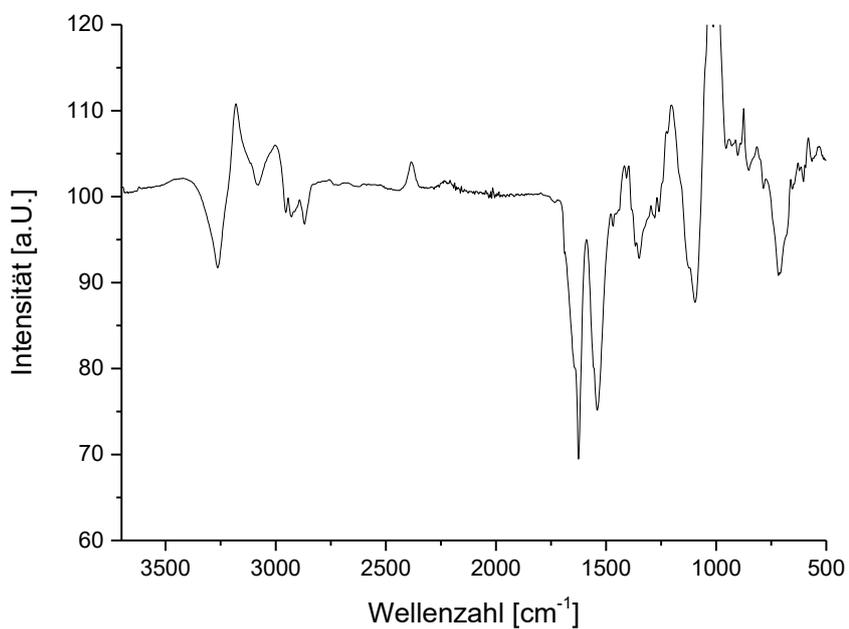
Appendix 5: RP-HPLC-Chromatogramm und ESI-MS von **1** (Linearer Gradient 0-100% Eluent B in 30 min, 25 °C).



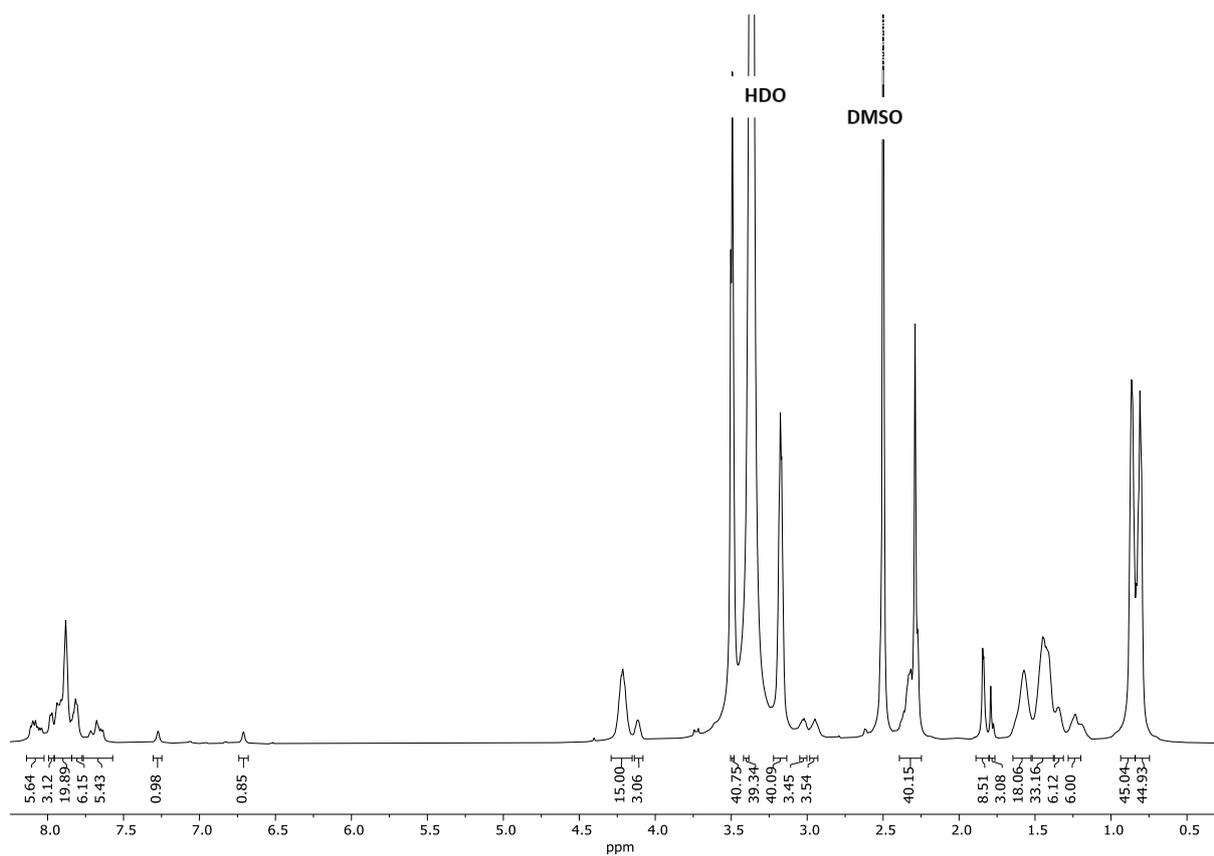
Appendix 6: 1H -NMR von **2** (600 MHz, 25 °C, $DMSO-d_6$).



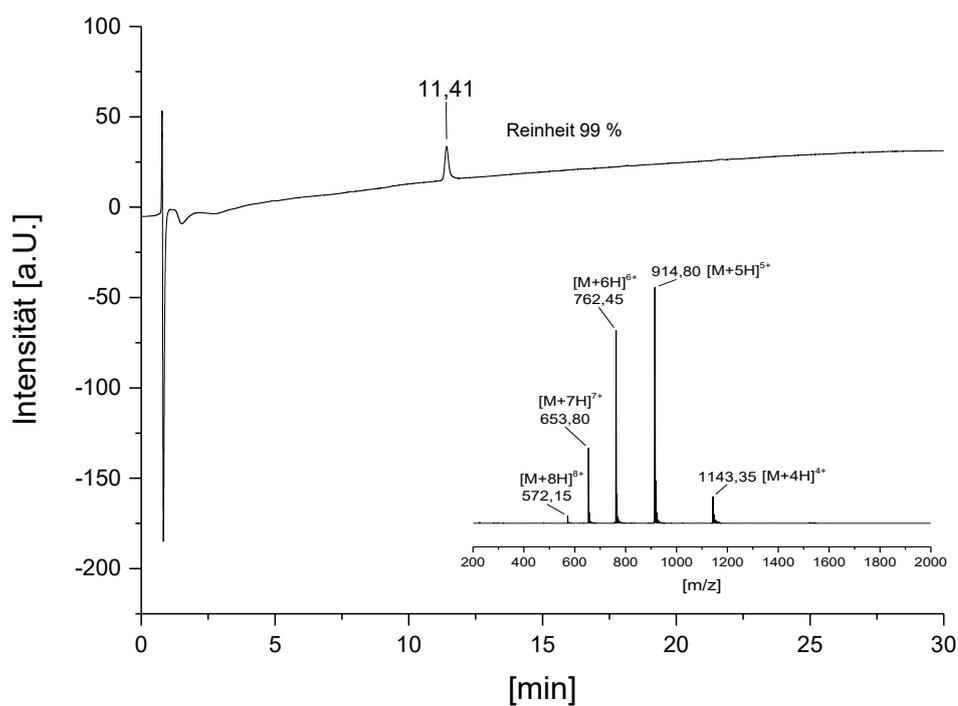
Appendix 7: RP-HPLC-Chromatogramm und ESI-MS von **2** (Linearer Gradient 0-100% Eluent B in 30 min, 25 °C).



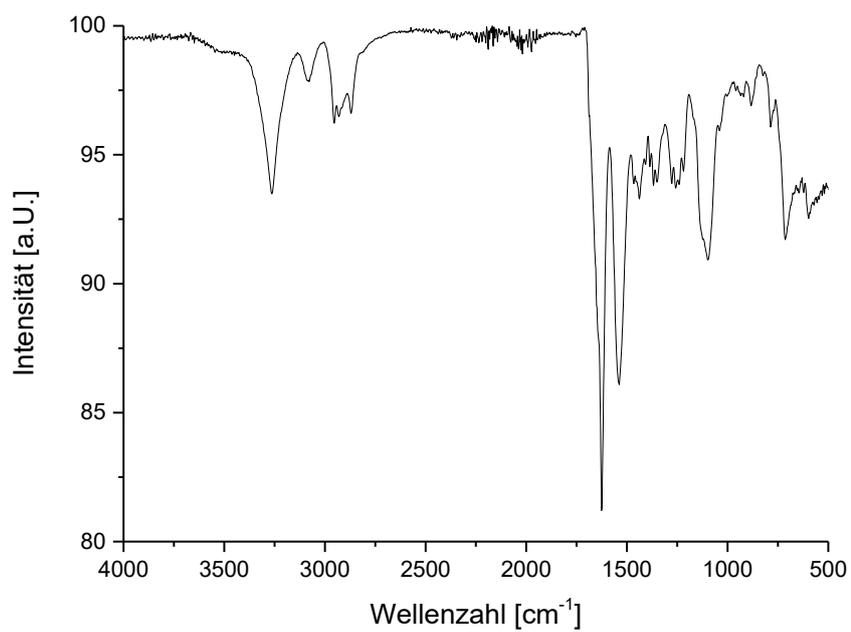
Appendix 8: FTIR-Chromatogramm von **2**.



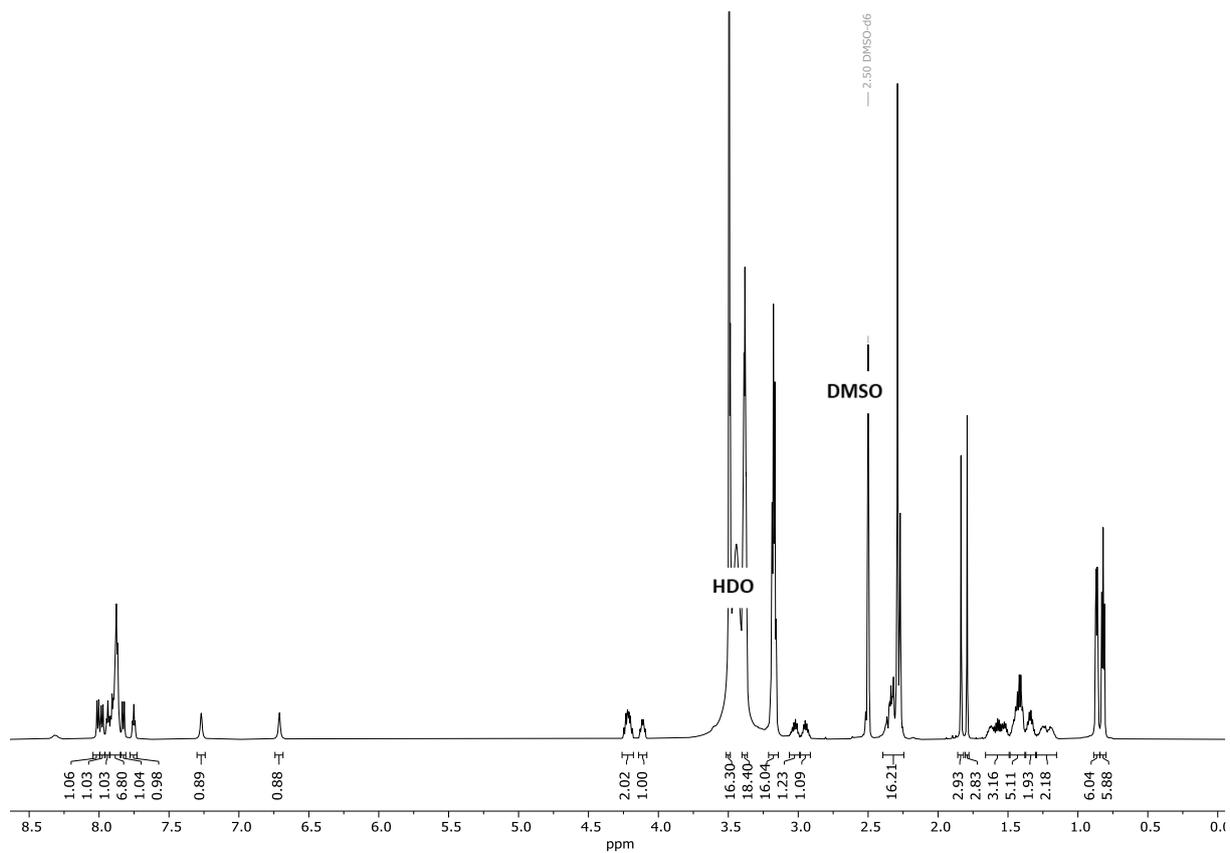
Appendix 9: $^1\text{H-NMR}$ von **3** (600 MHz, 25° C, DMSO- d_6).



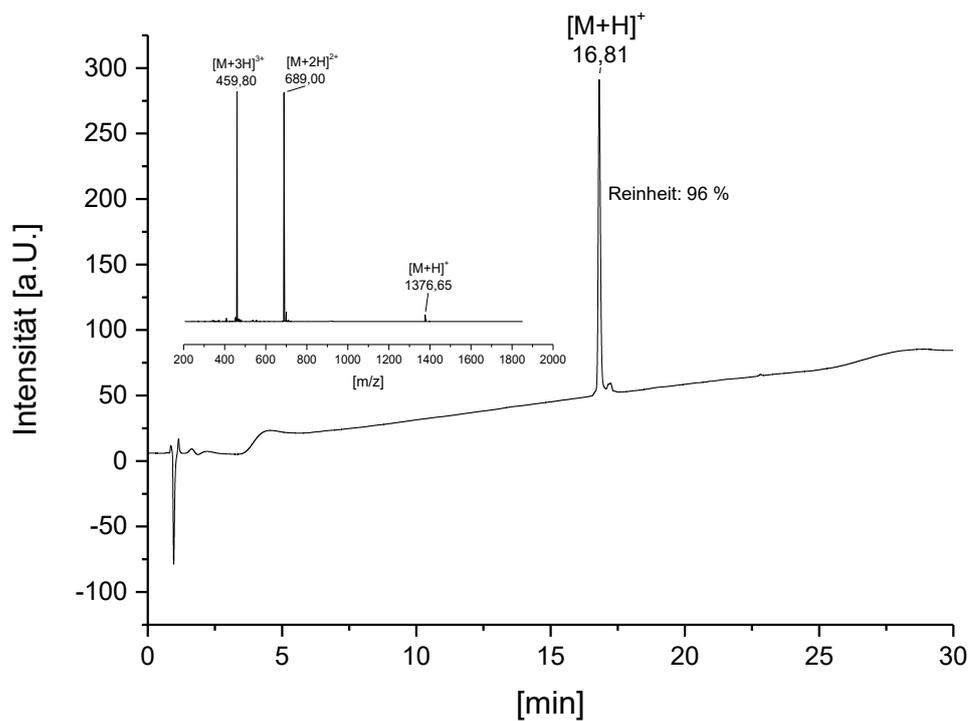
Appendix 10: RP-HPLC-Chromatogramm und ESI-MS von **3** (Linearer Gradient 0-100% Eluent B in 30 min, 25° C).



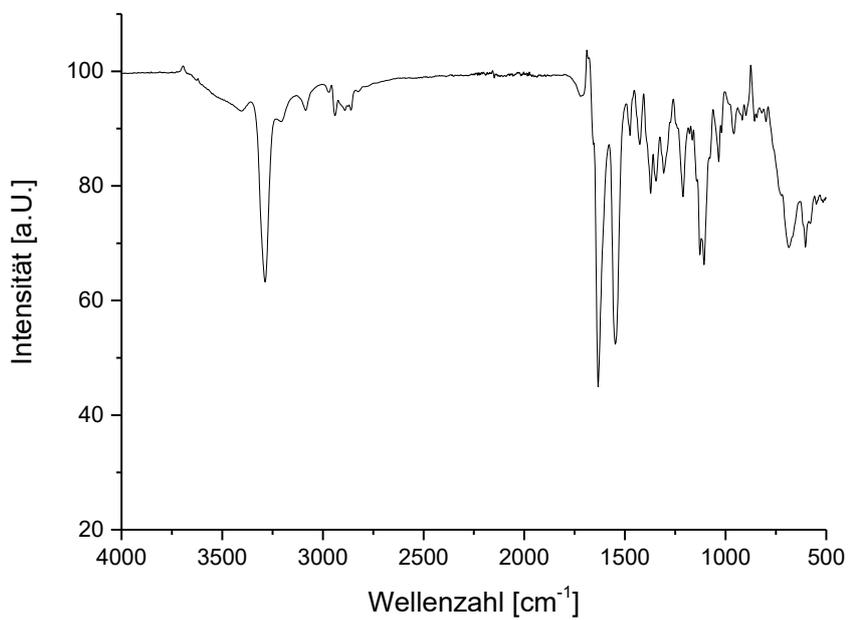
Appendix 11: FTIR-Chromatogramm von **3**.



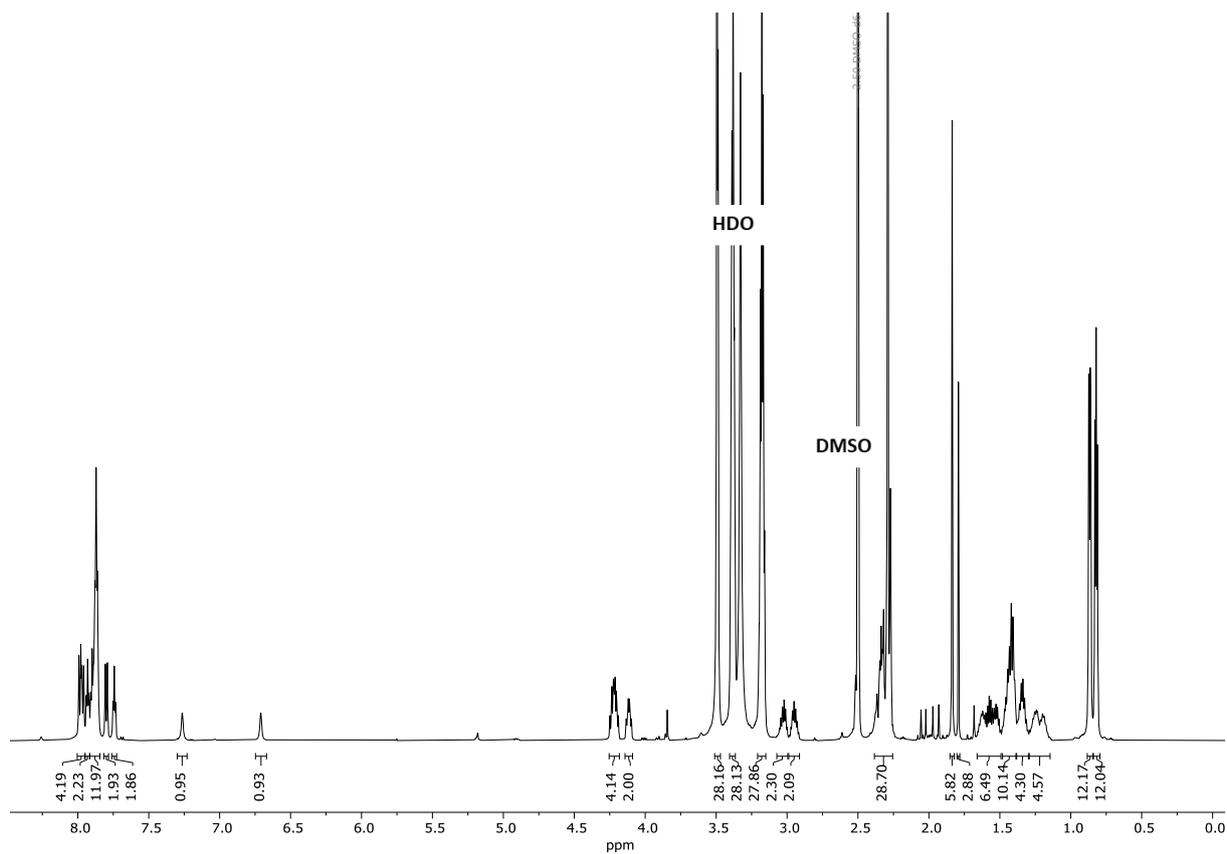
Appendix 12: ¹H-NMR von **4** (600 MHz, 25° C, DMSO-d₆).



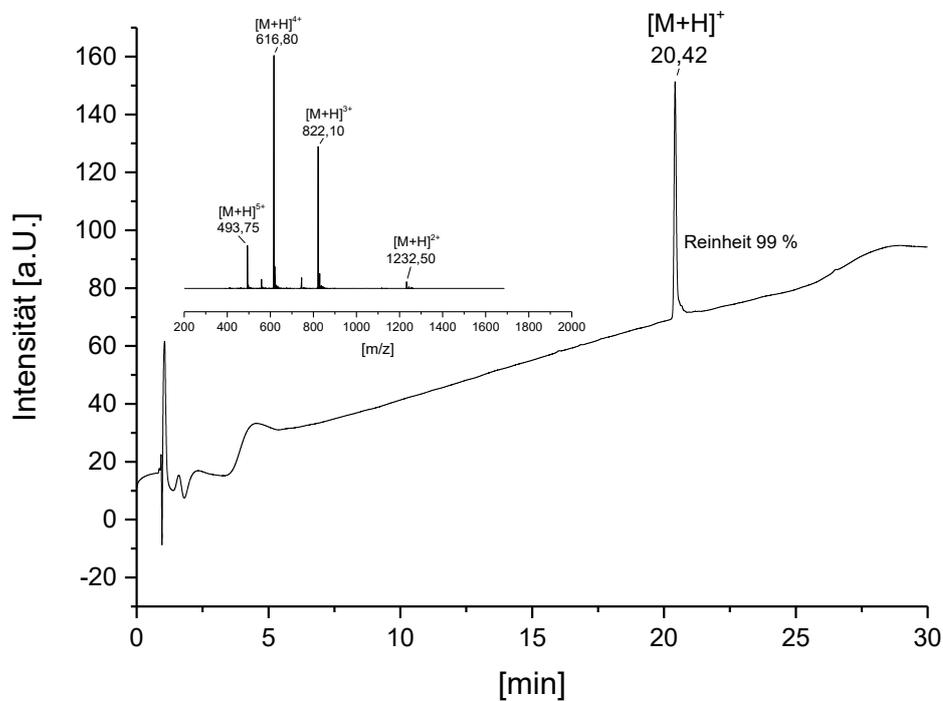
Appendix 13: RP-HPLC-Chromatogramm und ESI-MS von **4** (Linearer Gradient 0-100% Eluent B in 30 min, 25 °C).



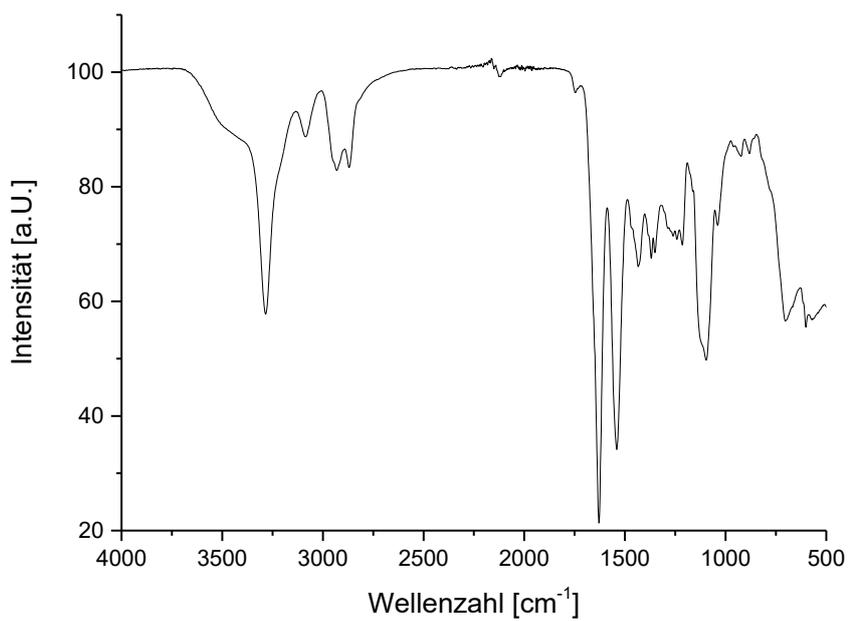
Appendix 14: FTIR-Chromatogramm von **4**.



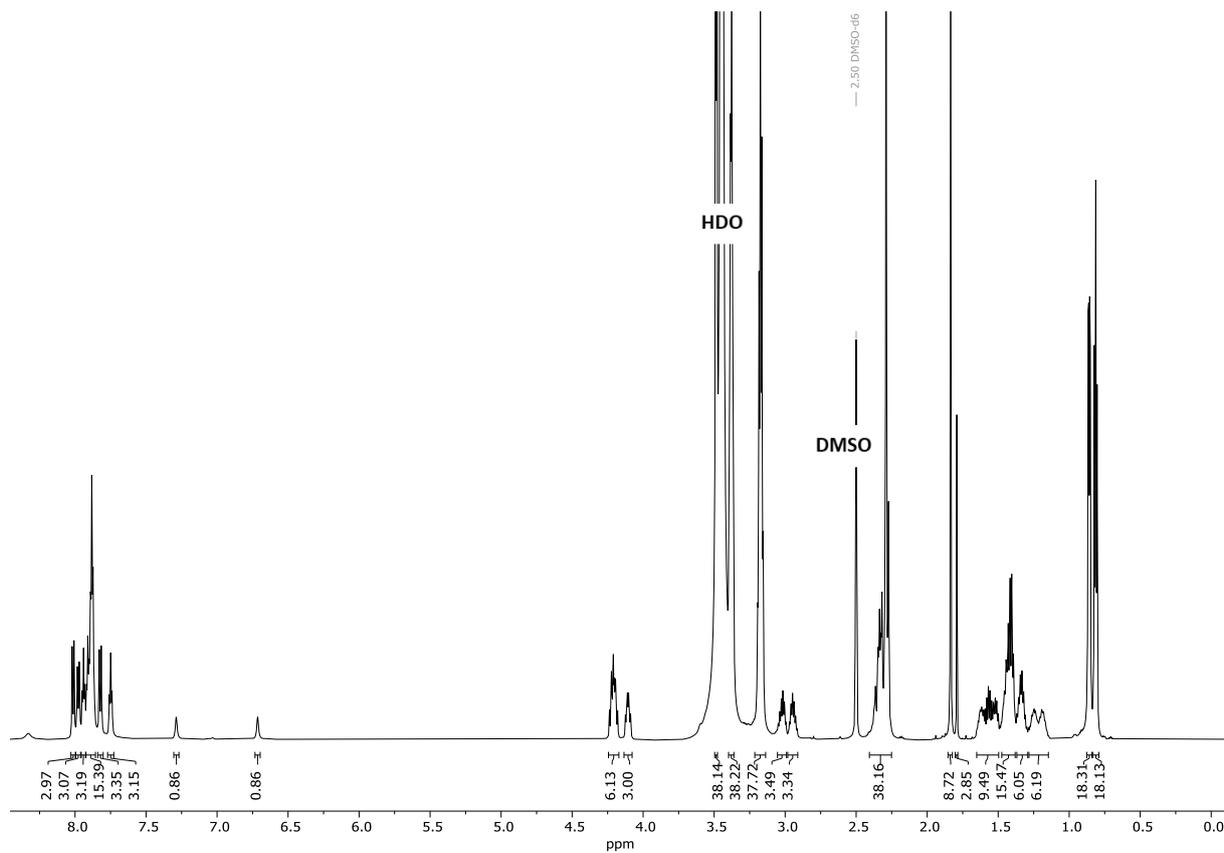
Appendix 15: $^1\text{H-NMR}$ von **5** (600 MHz, 25 °C, DMSO-d_6).



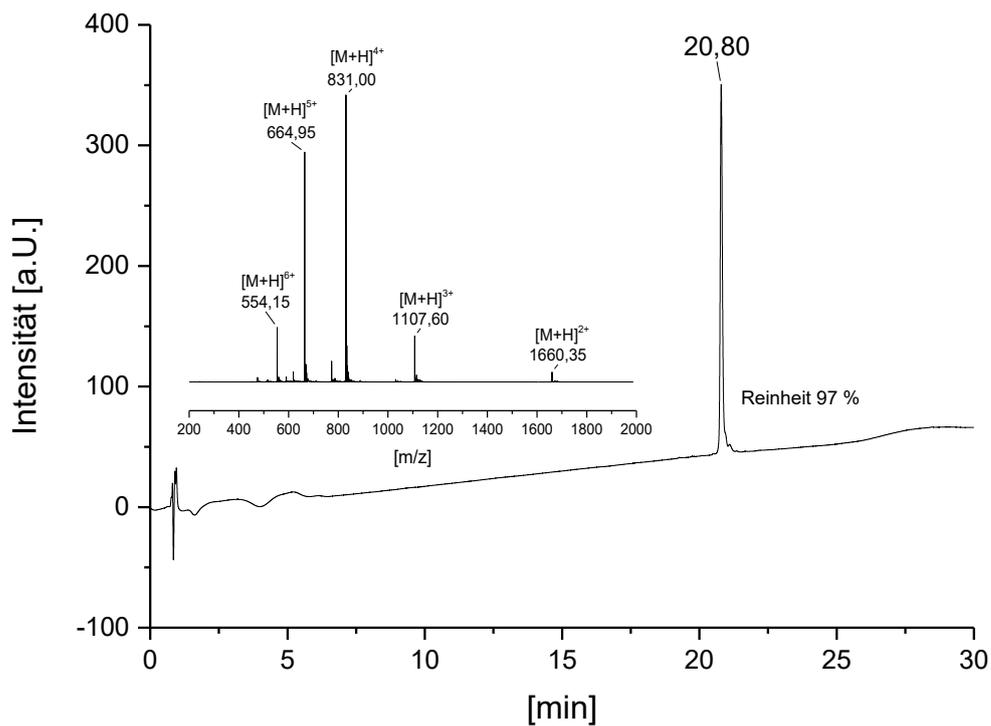
Appendix 16: RP-HPLC-Chromatogramm und ESI-MS von **5** (Linearer Gradient 0-100% Eluent B in 30 min, 25 °C).



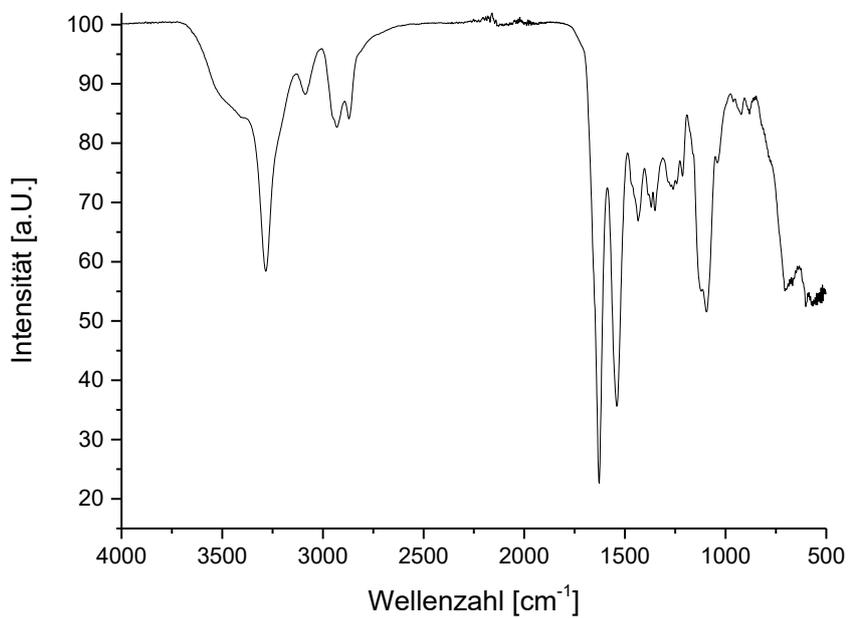
Appendix 17: FTIR-Chromatogramm von **5**.



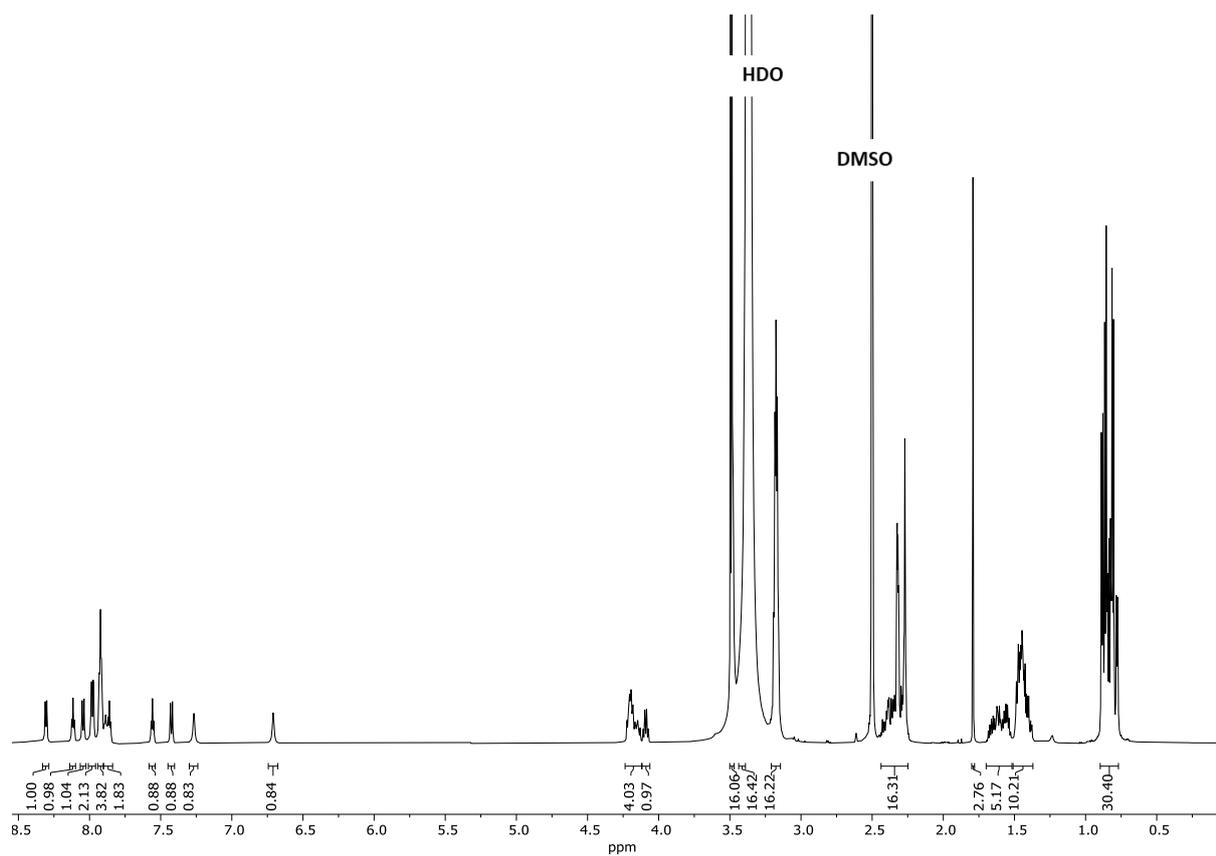
Appendix 18: $^1\text{H-NMR}$ von **6** (600 MHz, 25° C, DMSO-d_6).



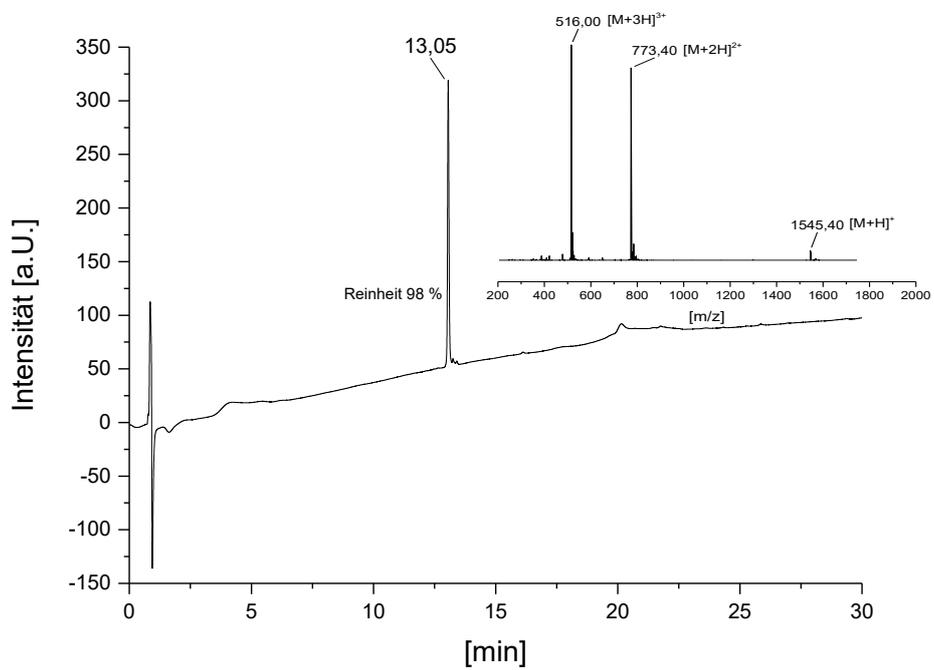
Appendix 19: RP-HPLC-Chromatogramm und ESI-MS von **6** (Linearer Gradient 0-100% Eluent B in 30 min, 25 °C).



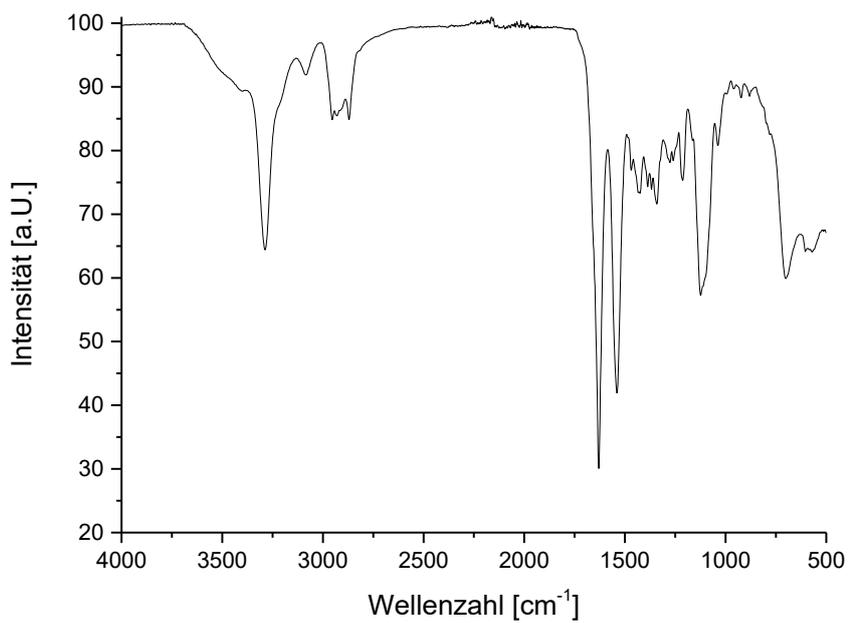
Appendix 20: FTIR-Chromatogramm von **6**.



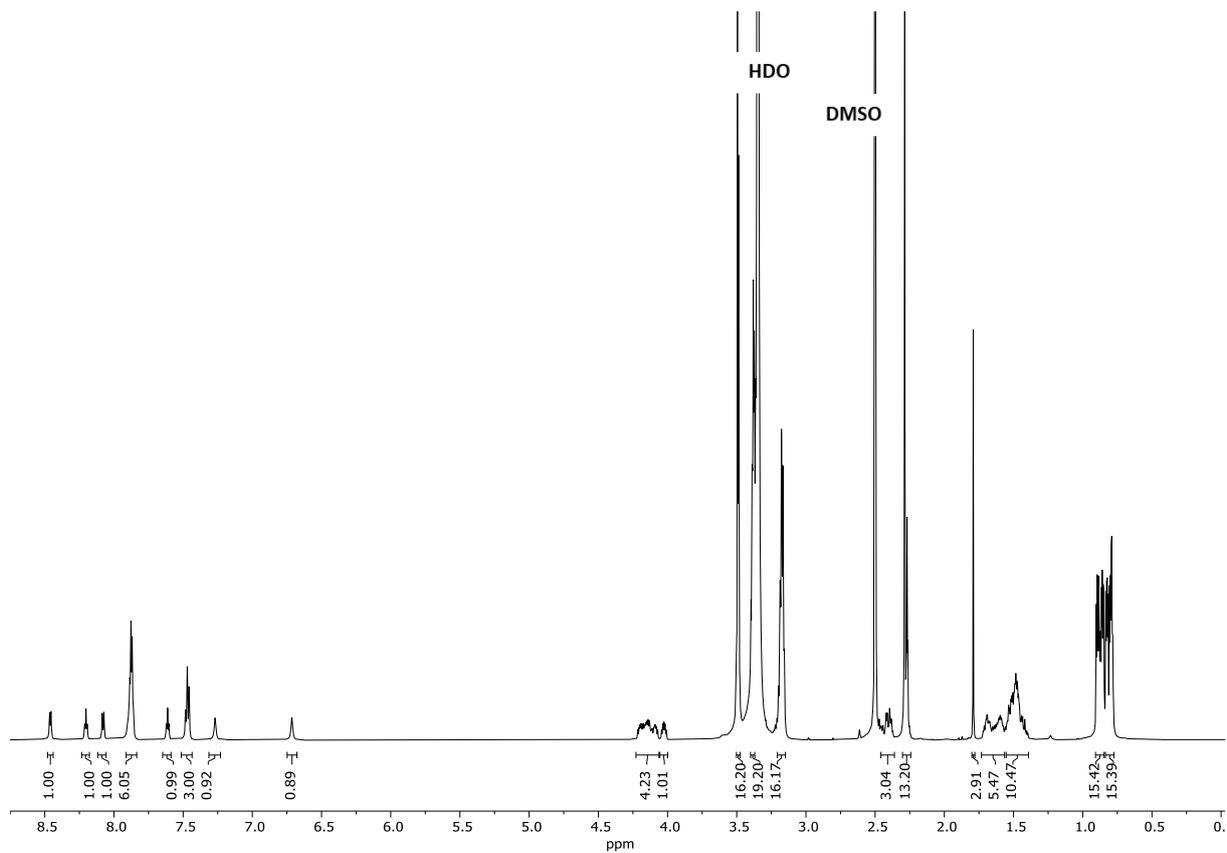
Appendix 21: $^1\text{H-NMR}$ von **7** (600 MHz, 25 °C, DMSO-d_6).



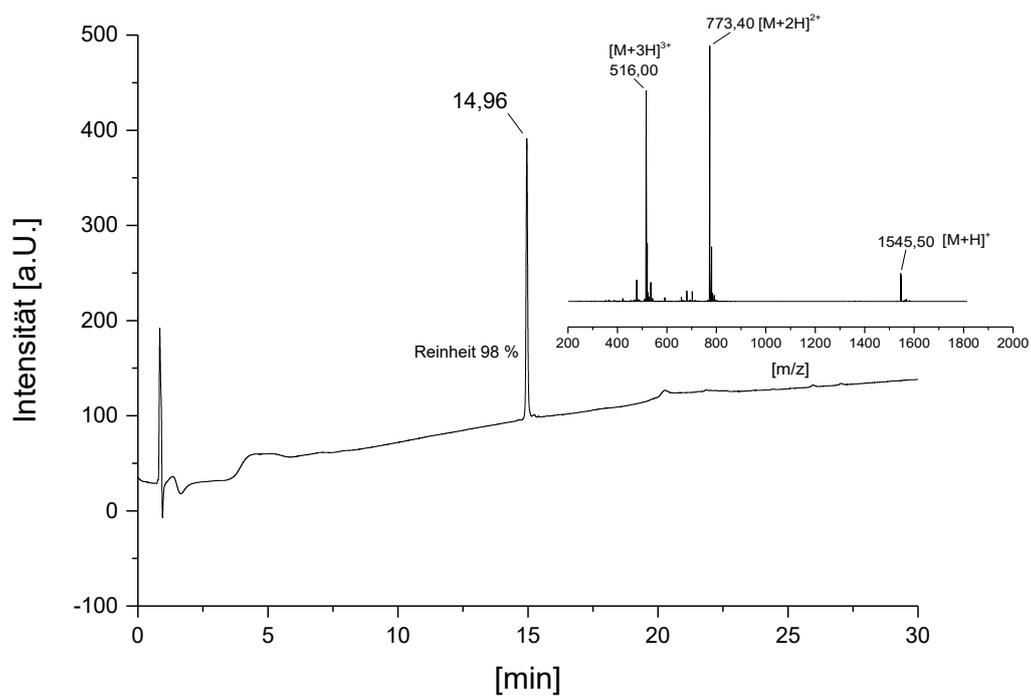
Appendix 22: RP-HPLC-Chromatogramm und ESI-MS von **7** (Linearer Gradient 0-100% Eluent B in 30 min, 25 °C).



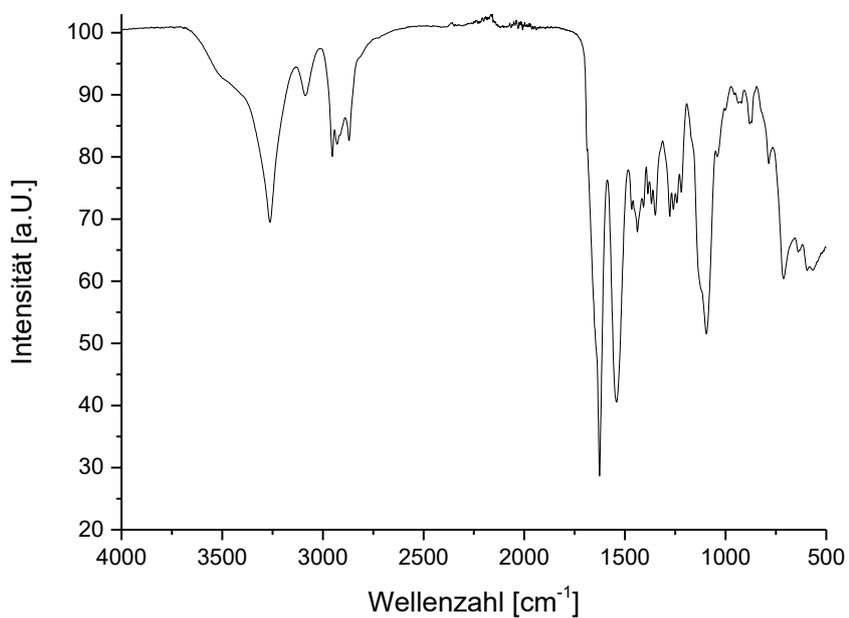
Appendix 23: FTIR-Chromatogramm von **7**.



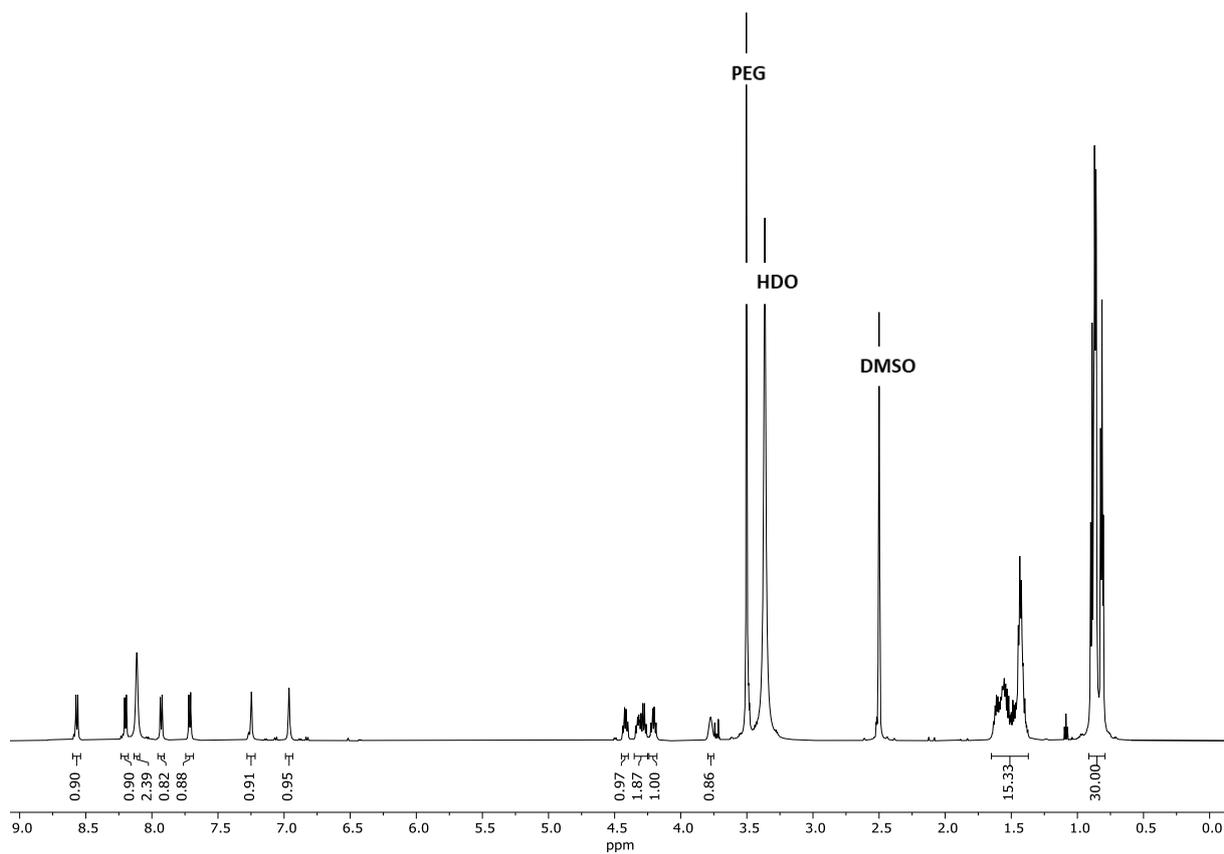
Appendix 24: ¹H-NMR von **8** (600 MHz, 25° C, DMSO-d₆).



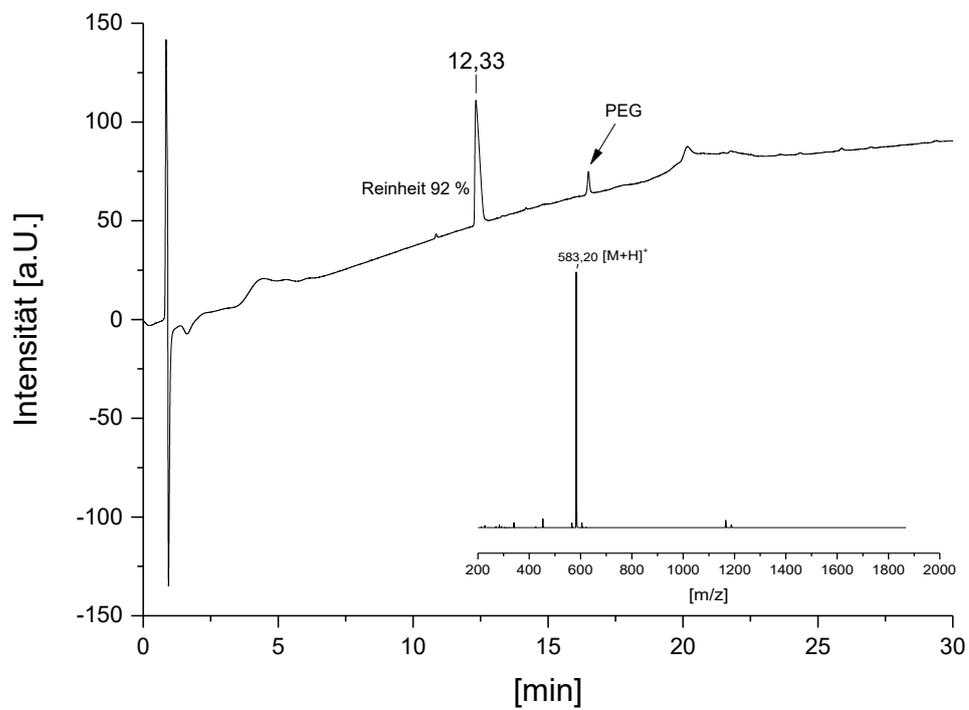
Appendix 25: RP-HPLC-Chromatogramm und ESI-MS von **8** (Linearer Gradient 0-100% Eluent B in 30 min, 25 °C).



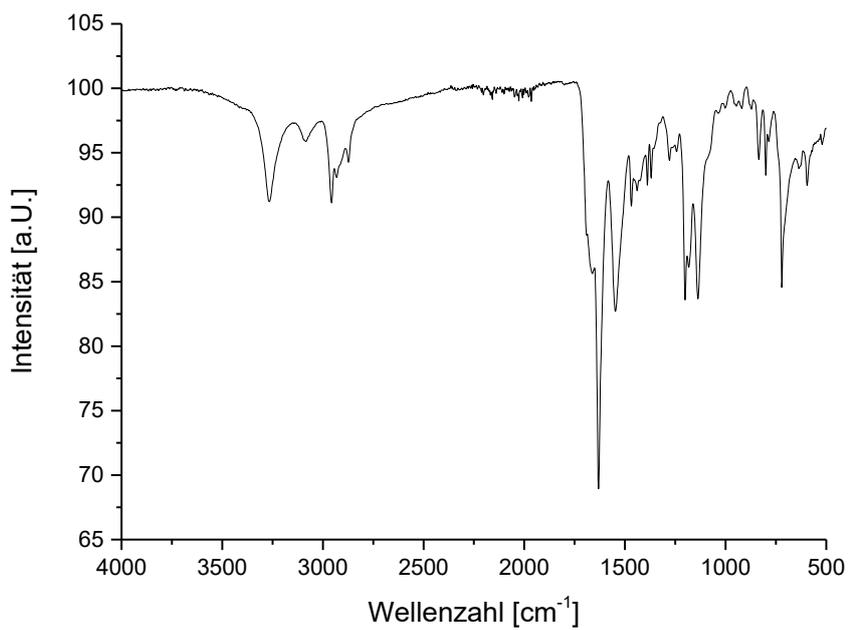
Appendix 26: FTIR-Chromatogramm von **8**.



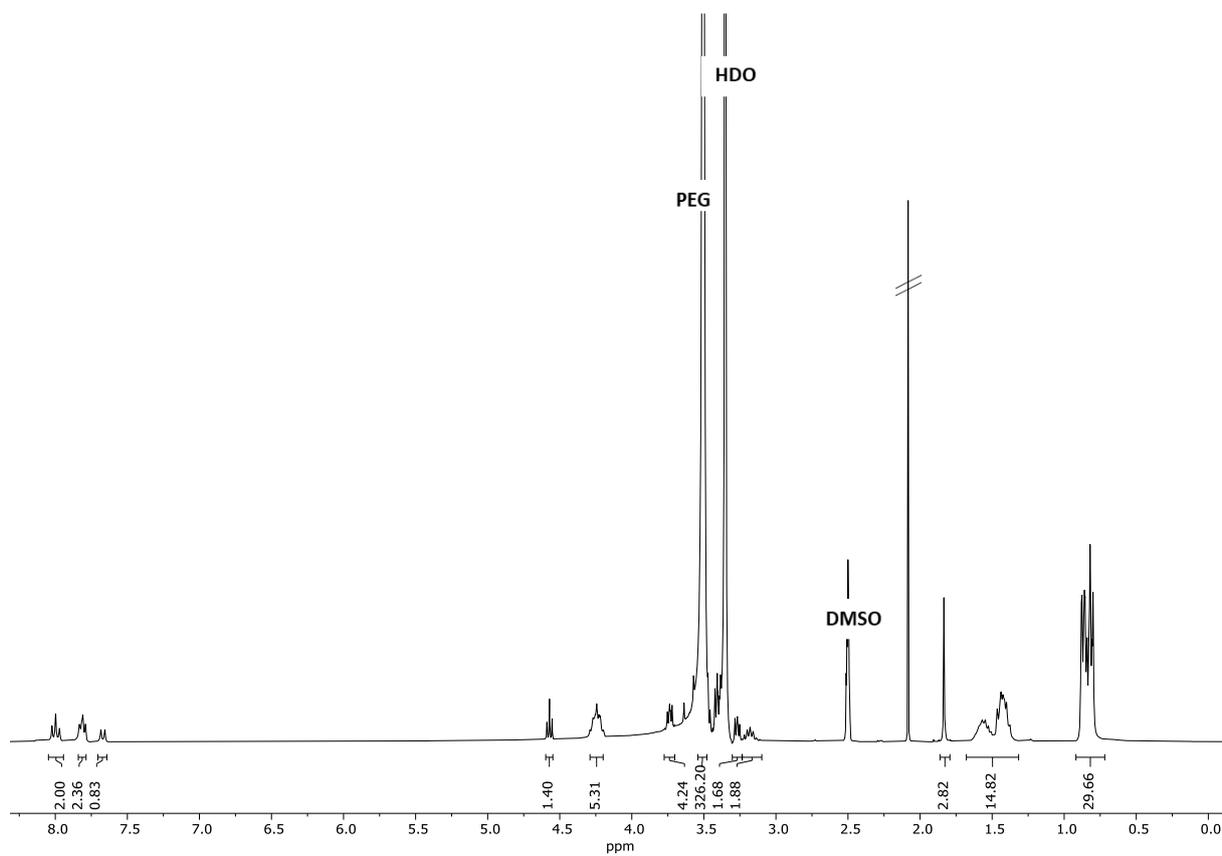
Appendix 27: $^1\text{H-NMR}$ von **9** (600 MHz, 25 °C, DMSO-d_6).



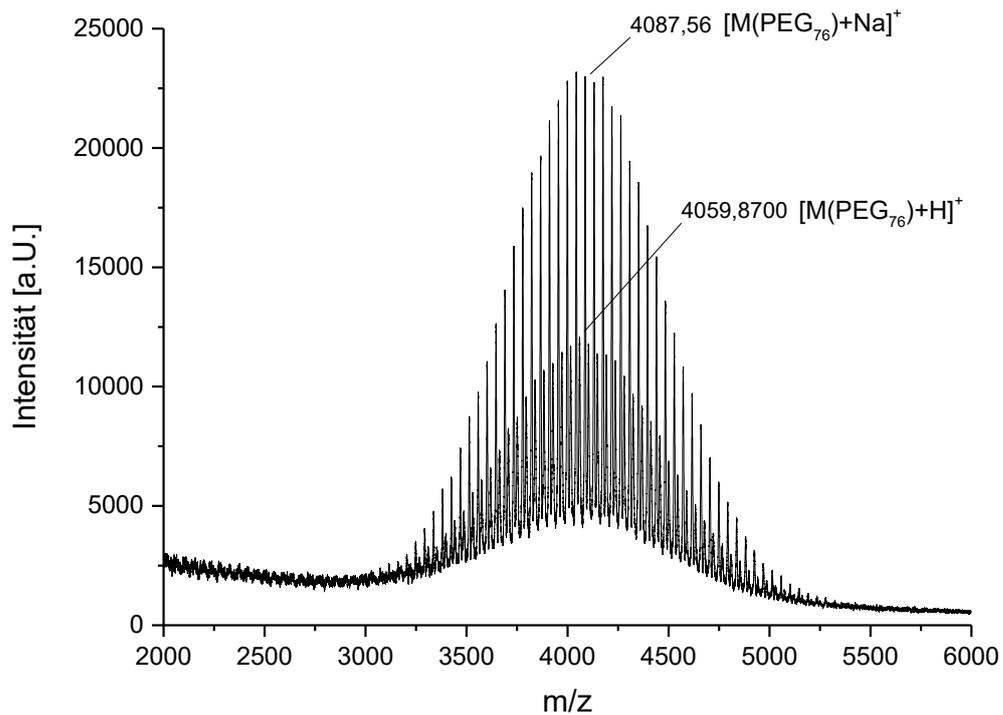
Appendix 28: RP-HPLC-Chromatogramm und ESI-MS von **9** (Linearer Gradient 0-100% Eluent B in 30 min, 25 °C).



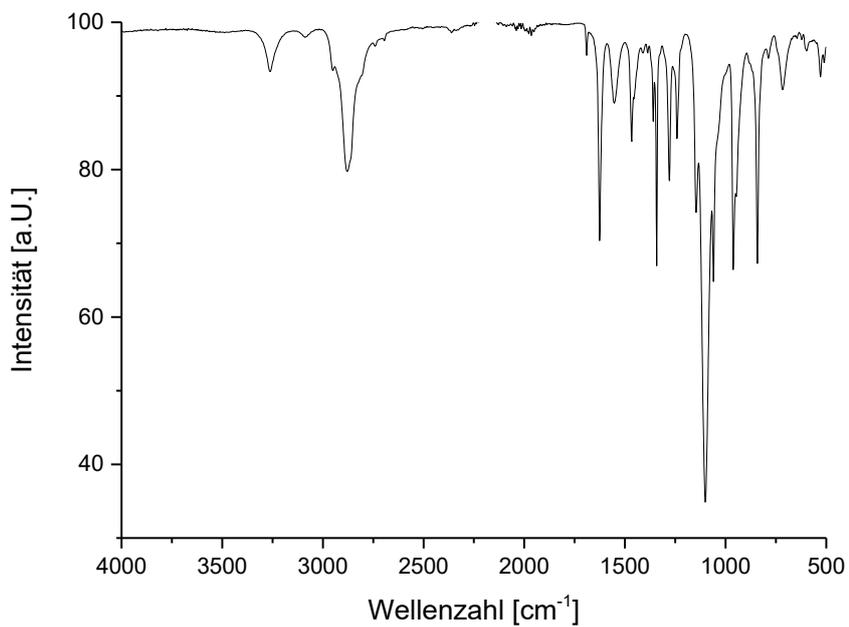
Appendix 29: FTIR-Chromatogramm von **9**.



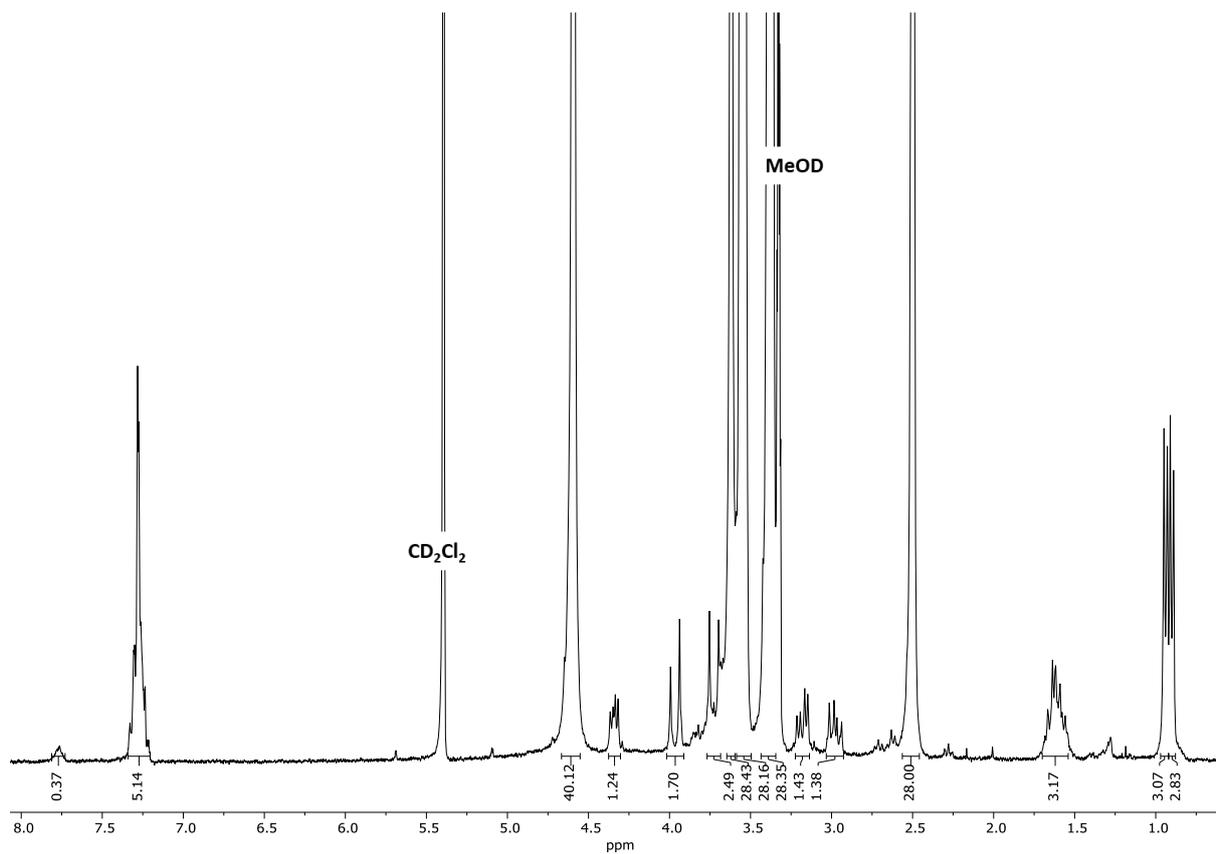
Appendix 30: ¹H-NMR von **10** (300 MHz, 25° C, DMSO-d₆).



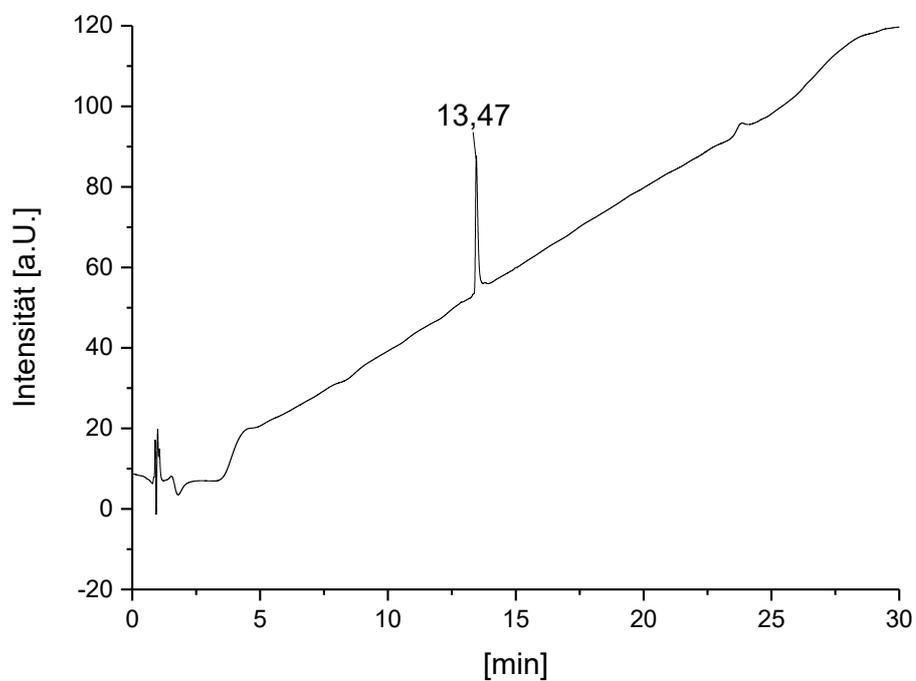
Appendix 31: MALDI-TOF-MS von **10**.



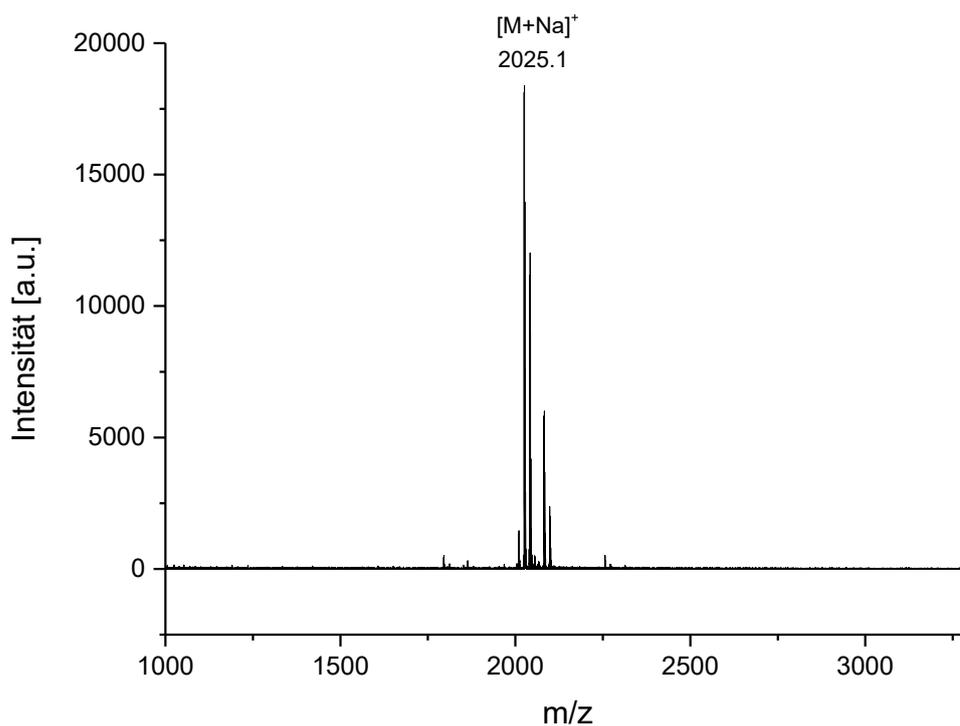
Appendix 32: FTIR-Chromatogramm von **10**.



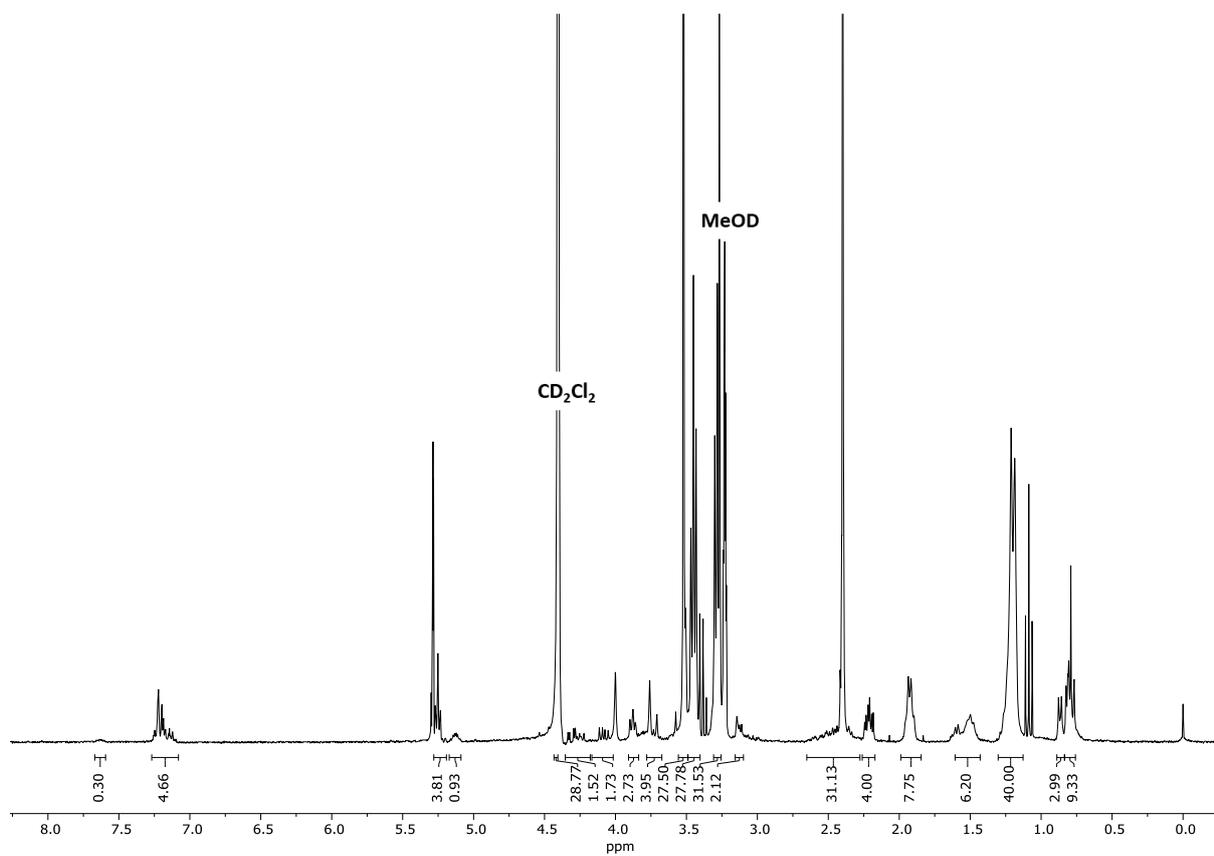
Appendix 33: $^1\text{H-NMR}$ von **11** (300 MHz, CD_2Cl_2 : MeOD-d_4 (1:1, v/v)).



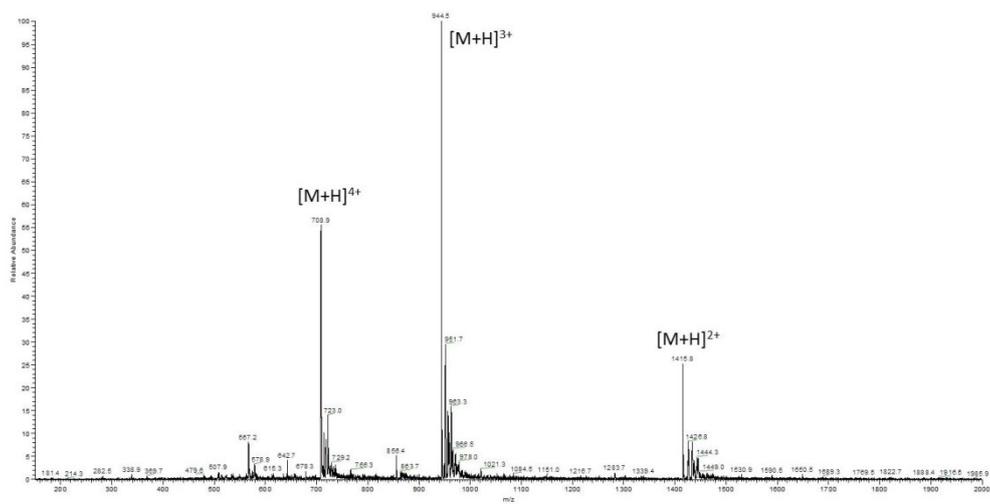
Appendix 34: RP-HPLC-Chromatogramm von **11** (Linearer Gradient 0-50% Eluent B in 30 min, 25 °C).



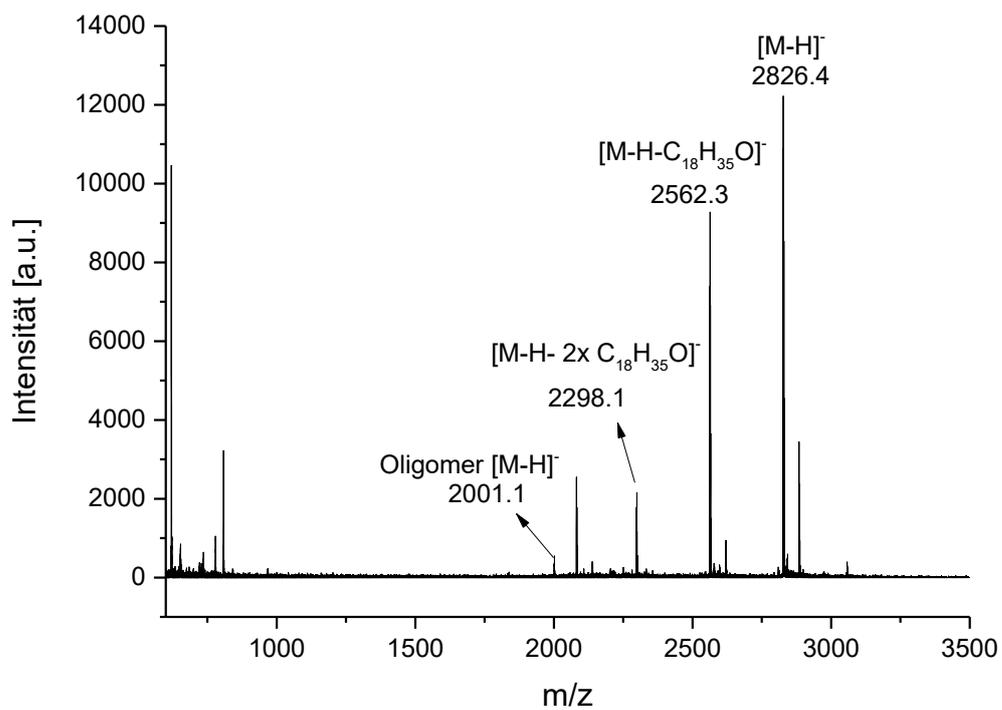
Appendix 35: MALDI-TOF-MS von **11**.



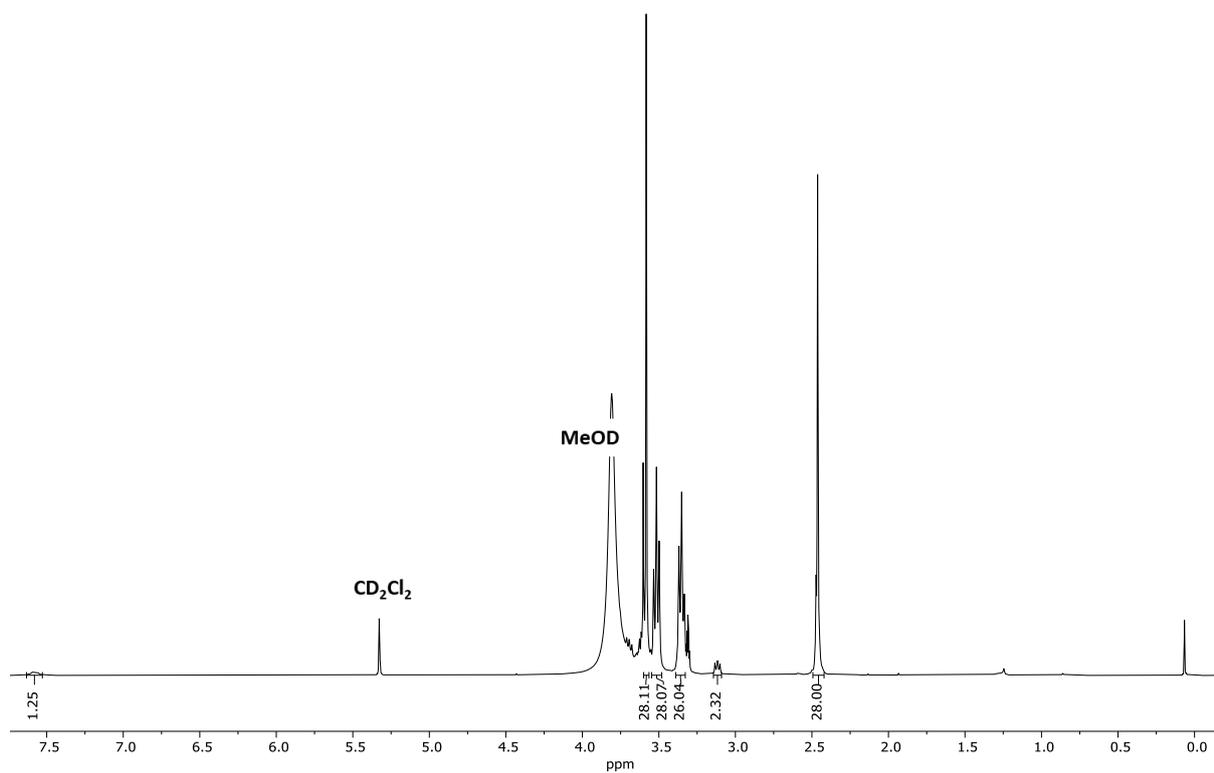
Appendix 36: 1H -NMR von **13** (300 MHz, CD_2Cl_2 :MeOD- d_4 (1:1, v/v)).



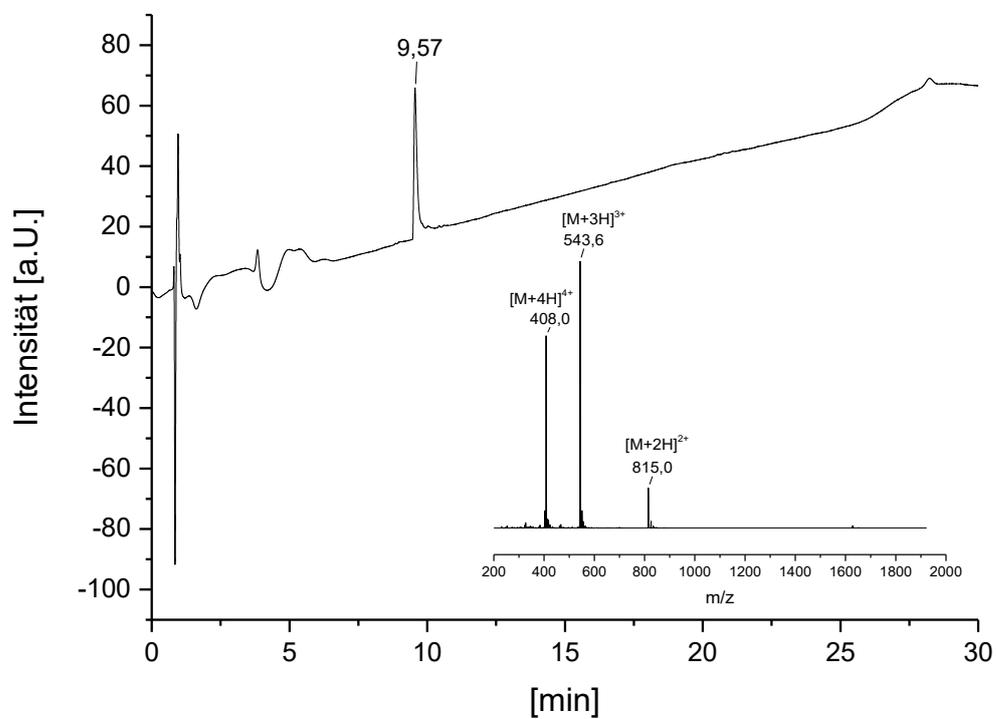
Appendix 37: ESI-MS von **13**.



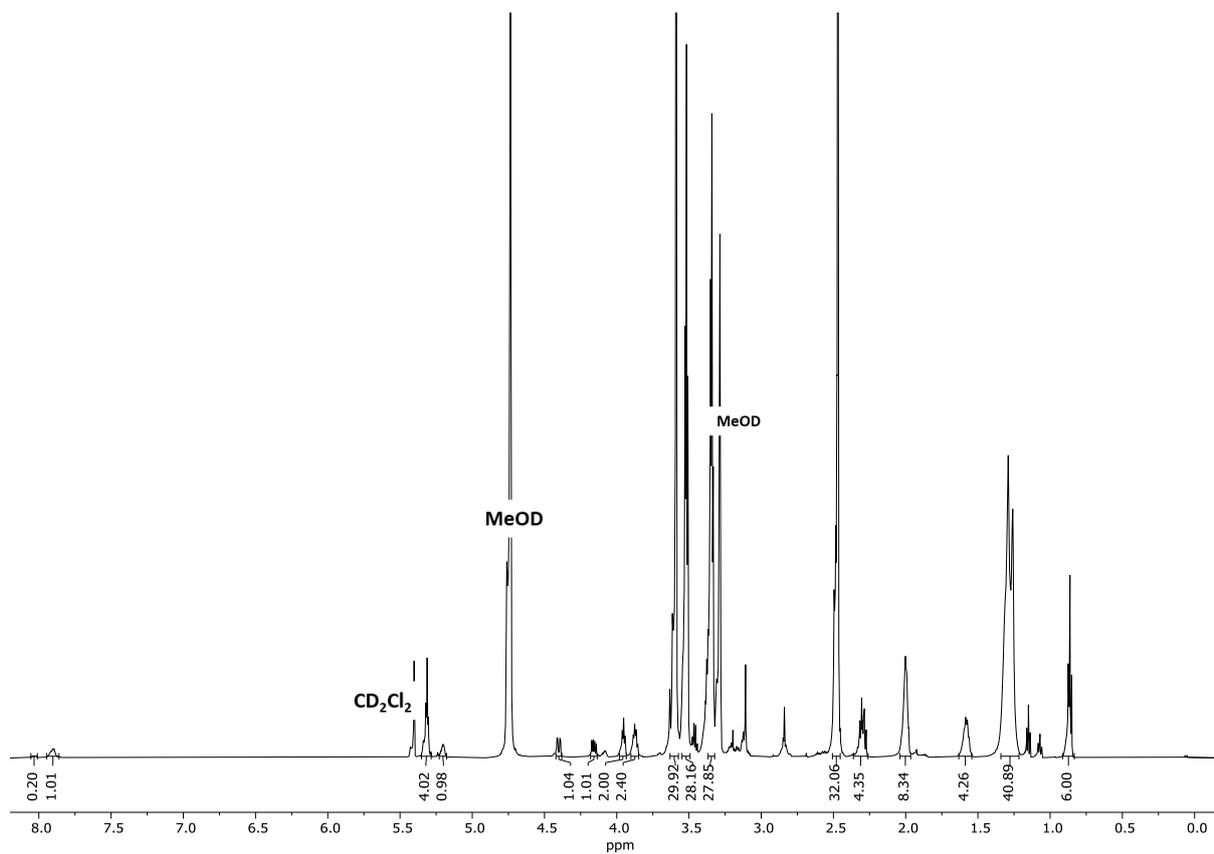
Appendix 38: MALDI-TOF-MS von **13** (Negativ Modus).



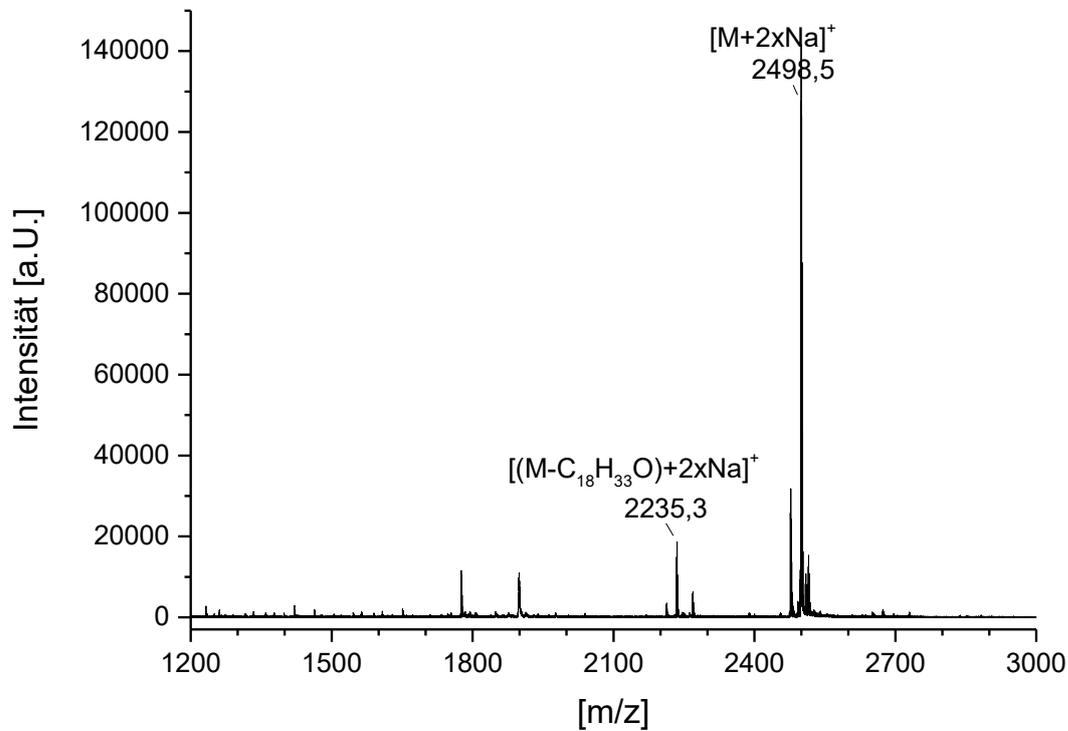
Appendix 39: $^1\text{H-NMR}$ von **14** (300 MHz, $\text{CD}_2\text{Cl}_2:\text{MeOD-}d_4$ (1:1, v/v)).



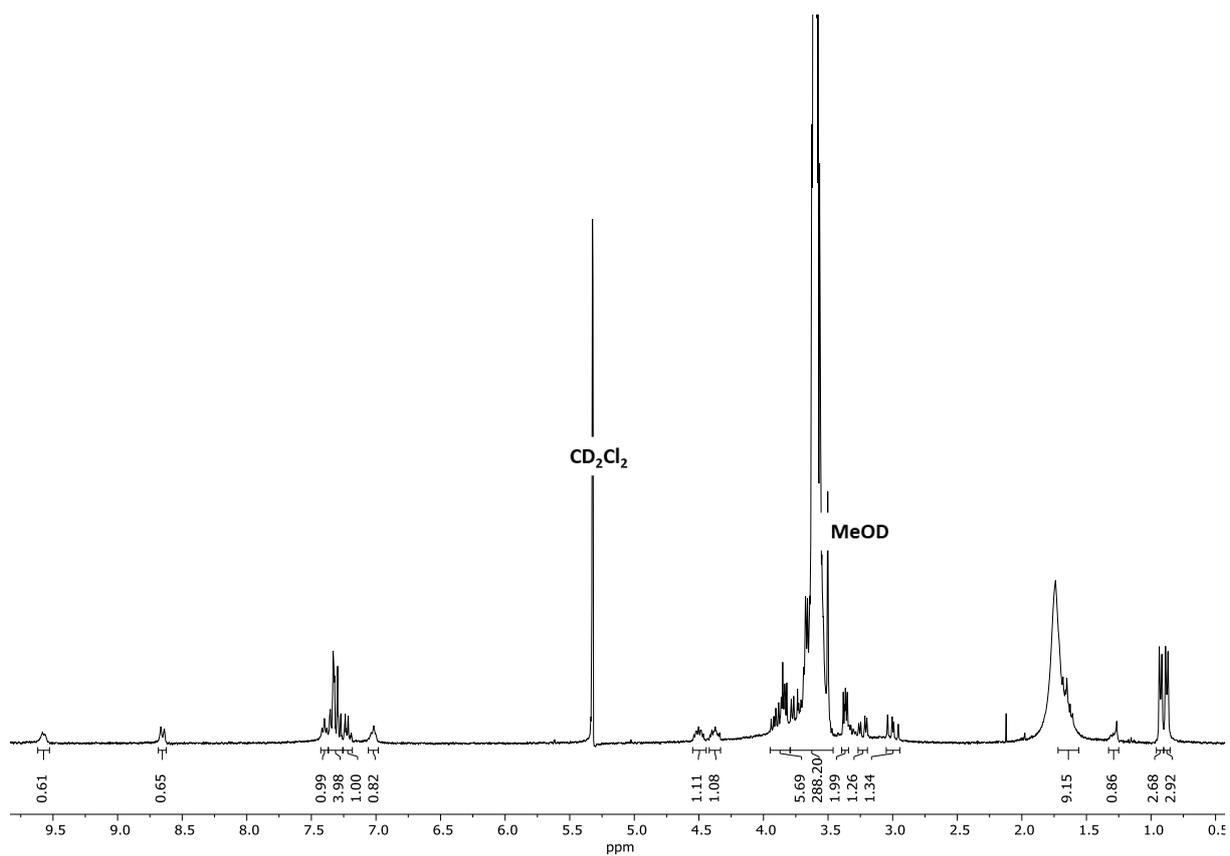
Appendix 40: RP-HPLC-Chromatogramm und ESI-MS von **14** (Linearer Gradient 0-50% Eluent B in 30 min, 25 °C).



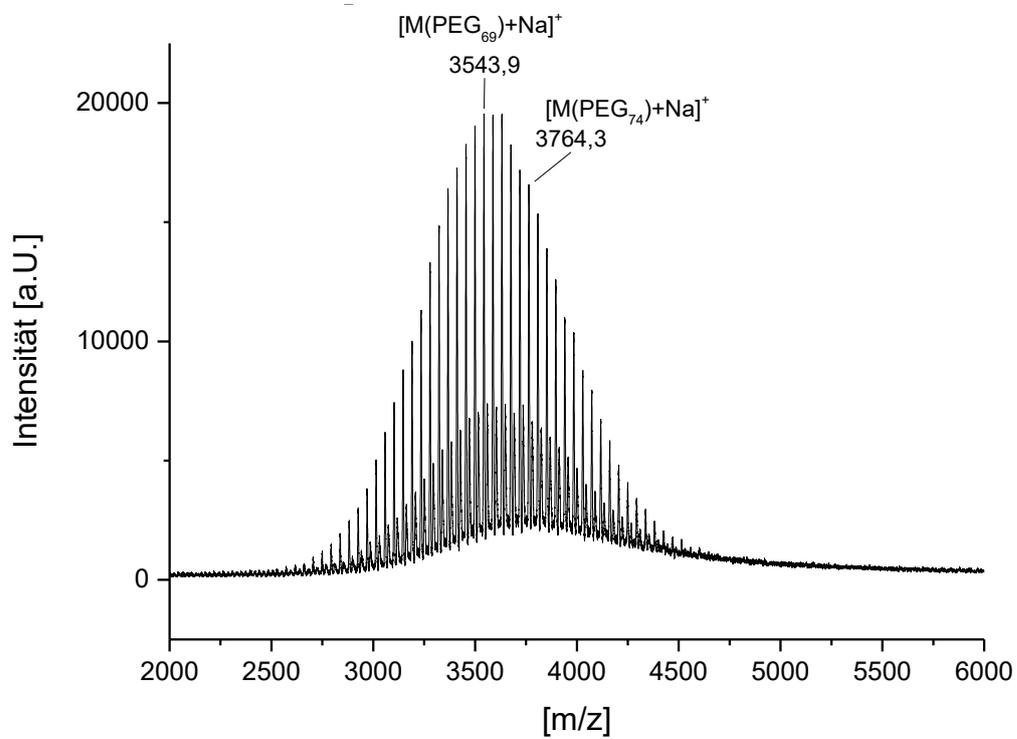
Appendix 41: $^1\text{H-NMR}$ von **15** (600 MHz, $\text{CD}_2\text{Cl}_2:\text{MeOD-}d_4$ (1:4, v/v)).



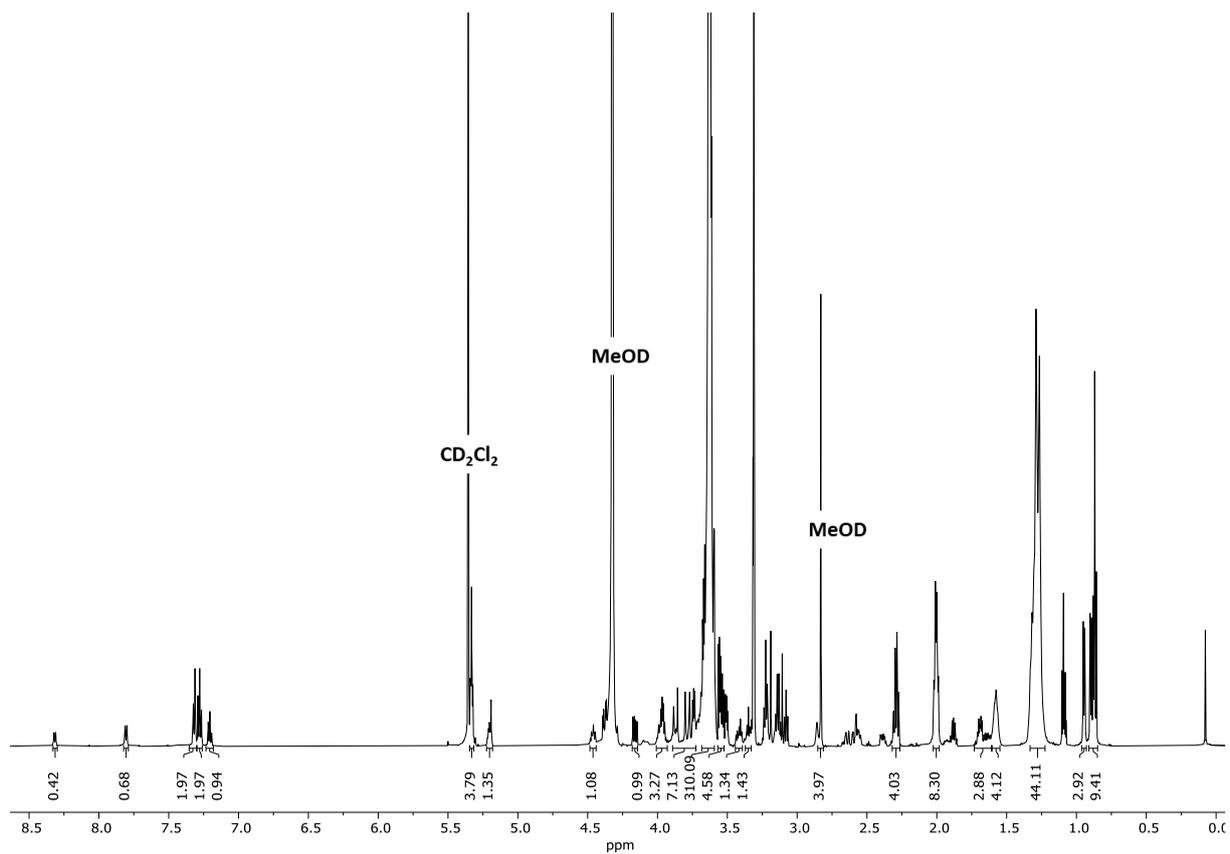
Appendix 42: MALDI-TOF-MS von **15**.



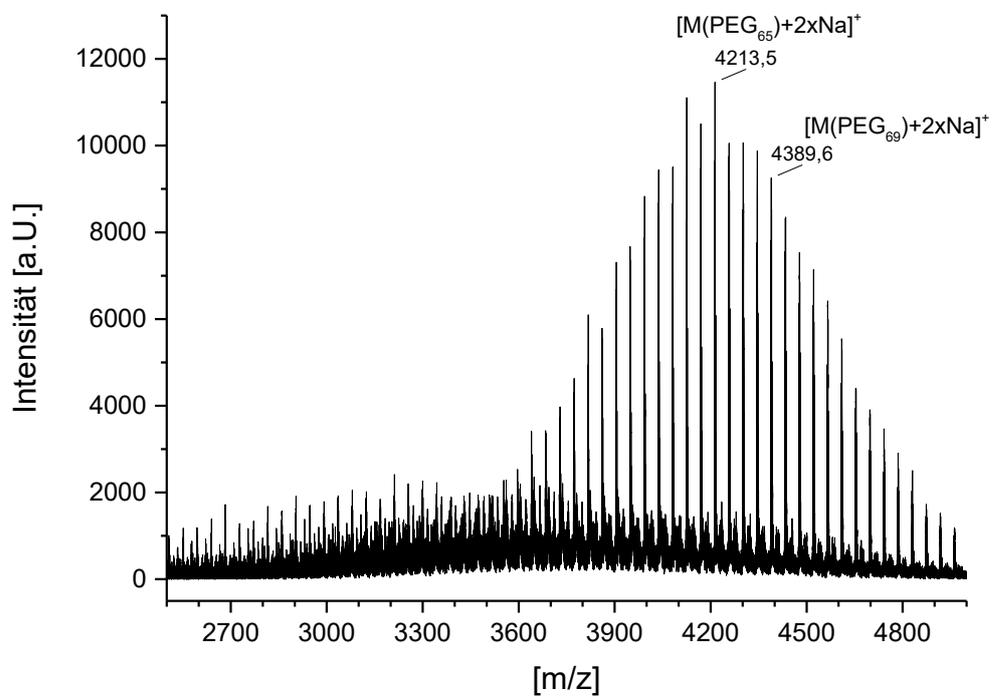
Appendix 43: $^1\text{H-NMR}$ von **16** (300 MHz, $\text{CD}_2\text{Cl}_2:\text{MeOD-}d_4$ (1:4, v/v)).



Appendix 44: MALDI-TOF-MS von **16**.



Appendix 45: ¹H-NMR von **17** (600 MHz, CD₂Cl₂:MeOD-d₄ (1:4, v/v)).



Appendix 46: MALDI-TOF-MS von **17**.

7 Literatur

- [1] D. Chow, M. L. Nunalee, D. W. Lim, A. J. Simnick, A. Chilkoti, *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **2008**, *62*, 125-155.
- [2] P. Labrude, C. Becq, *Revue d'histoire de la pharmacie* **2003**, *51*, 61-78.
- [3] J. S. Fruton, *Proc Am Philos Soc* **1985**, *129*, 313-370.
- [4] E. Fischer, in *Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine (1899–1906)*, Springer, **1906**, pp. 302-314.
- [5] E. Fischer, **1907**, *40*, 1754-1767.
- [6] Z. F. Bhat, S. Kumar, H. F. Bhat, *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 5377-5392.
- [7] K.-H. Lee, *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 500-516.
- [8] W. F. Broekaert, F. Terras, B. Cammue, R. W. Osborn, *Plant Physiol.* **1995**, *108*, 1353-1358.
- [9] C. Raveschot, B. Cudennec, F. Coutte, C. Flahaut, M. Fremont, D. Drider, P. Dhulster, *Front. Microbiol.* **2018**, *9*.
- [10] T. R. Klaenhammer, *FEMS Microbio. Rev.* **1993**, *12*, 39-85.
- [11] F. S. Youssef, M. L. Ashour, A. N. B. Singab, M. Wink, *Marine Drugs* **2019**, *17*, 559.
- [12] D. J. Craik, D. P. Fairlie, S. Liras, D. Price, *Chem. Biol. Drug Des.* **2013**, *81*, 136-147.
- [13] F. G. Banting, C. H. Best, J. B. Collip, W. R. Campbell, A. A. Fletcher, *Can Med Assoc J* **1922**, *12*, 141-146.
- [14] W. Danho, J. Swistok, W. Khan, X. J. Chu, A. Cheung, D. Fry, H. Sun, G. Kurylko, L. Rumennik, J. Cefalu, G. Cefalu, P. Nunn, *Adv Exp Med Biol* **2009**, *611*, 467-469.
- [15] P. R. Kraus, L. Meng, L. Freeman-Cook, *Methods Mol Biol* **2010**, *632*, 251-267.
- [16] E. V. Gurevich, V. V. Gurevich, *Handb Exp Pharmacol* **2014**, *219*, 1-12.
- [17] L. Di, *AAPS* **2015**, *17*, 134-143.
- [18] G. Hummel, U. Reineke, U. Reimer, *Mol. Biosyst.* **2006**, *2*, 499.
- [19] R. C. Ladner, A. K. Sato, J. Gorzelany, M. de Souza, *Drug discov today* **2004**, *9*, 525-529.
- [20] D. Mathur, S. Prakash, P. Anand, H. Kaur, P. Agrawal, A. Mehta, R. Kumar, S. Singh, G. P. S. Raghava, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36617.
- [21] A. Loffet, *J. Pept. Sci.* **2002**, *8*, 1-7.
- [22] P. L. Scognamiglio, C. D. Natale, G. Perretta, D. Marasco, *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 3803-3817.
- [23] G. D. Smith, R. H. Blessing, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2003**, *59*, 1384-1394.
- [24] P. W. Latham, *Nat Biotechnol* **1999**, *17*, 755-757.
- [25] A. K. Sato, M. Viswanathan, R. B. Kent, C. R. Wood, *Curr Opin Biotechnol* **2006**, *17*, 638-642.
- [26] P. Vlieghe, V. Lisowski, J. Martinez, M. Khrestchatisky, *Drug discov today* **2010**, *15*, 40-56.
- [27] F. Guzman, S. Barberis, A. Illanes, *Electron. J. Biotechnol.* **2007**, *10*, 0-0.
- [28] R. B. Merrifield, *JACS* **1963**, *85*, 2149-2154.

- [29] B. J. Bruno, G. D. Miller, C. S. Lim, *Ther. Deliv.* **2013**, *4*, 1443-1467.
- [30] E. Gazit, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1263-1269.
- [31] R. P. Cheng, S. H. Gellman, W. F. DeGrado, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219-3232.
- [32] T. Curtius, *J. Prakt. Chem.* **1904**, *70*, 57-72.
- [33] E. Fischer, E. Fourneau, in *Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine (1899–1906)*, Springer, **1906**, pp. 279-289.
- [34] M. Bergmann, L. Zervas, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1932**, *65*, 1192-1201.
- [35] V. d. Vigneaud, C. Ressler, C. J. M. Swan, C. W. Roberts, P. G. Katsoyannis, S. Gordon, *JACS* **1953**, *75*, 4879-4880.
- [36] J. M. Palomo, *RSC Advances* **2014**, *4*, 32658-32672.
- [37] R. Merrifield, *Science* **1986**, *232*, 341-347.
- [38] I. Coin, M. Beyermann, M. Bienert, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 3247-3256.
- [39] R. Behrendt, P. White, J. Offer, *J. Pept. Sci.* **2016**, *22*, 4-27.
- [40] I. Sucholeiki, *Mol Divers* **1999**, *4*, 25-30.
- [41] M. Amblard, J.-A. Fehrentz, J. Martinez, G. Subra, *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 239-254.
- [42] W. Li, B. Yan, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4092-4097.
- [43] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091-2158.
- [44] E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, R. Sheppard, *Chem Comm* **1978**, 539-540.
- [45] L. A. Carpino, *Acc. Chem. Res.* **1987**, *20*, 401-407.
- [46] H. Kunz, C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1984**, *23*, 436-437.
- [47] S.-Y. Han, Y.-A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467.
- [48] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208.
- [49] S. L. Beaucage, R. P. Iyer, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2223-2311.
- [50] M. Schuster, P. Wang, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *JACS* **1994**, *116*, 1135-1136.
- [51] S. Danishefsky, K. McClure, J. Randolph, R. Ruggeri, *Science* **1993**, *260*, 1307-1309.
- [52] D. Ponader, F. Wojcik, F. Beceren-Braun, J. Dervede, L. Hartmann, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1845-1852.
- [53] F. Wojcik, S. Mosca, L. Hartmann, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 4226-4234.
- [54] F. Wojcik, A. G. O'Brien, S. Götze, P. H. Seeberger, L. Hartmann, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 3090-3098.
- [55] D. Ponader, S. Igde, M. Wehle, K. Märker, M. Santer, D. Bléger, L. Hartmann, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1603-1612.
- [56] T. Freichel, S. Eierhoff, N. L. Snyder, L. Hartmann, *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 9400-9409.
- [57] S. Boden, K. G. Wagner, M. Karg, L. Hartmann, *Polymers* **2017**, *9*, 716.
- [58] M. Baier, M. Giesler, L. Hartmann, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 1619-1630.
- [59] C. Gerke, F. Jacobi, L. E. Goodwin, F. Pieper, S. Schmidt, L. Hartmann, *Macromolecules* **2018**, *51*, 5608-5619.

- [60] K. S. Bücher, P. B. Konietzny, N. L. Snyder, L. Hartmann, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 3301-3309.
- [61] L. Fischer, A. K. Strzelczyk, N. Wedler, C. Kropf, S. Schmidt, L. Hartmann, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 9919-9924.
- [62] L. Fischer, R. C. Steffens, T. J. Paul, L. Hartmann, *Polym. Chem.* **2020**, *11*, 6091-6096.
- [63] K. Neuhaus, E.-C. Wamhoff, T. Freichel, A. Grafmüller, C. Rademacher, L. Hartmann, *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 4088-4095.
- [64] L. Hartmann, E. Krause, M. Antonietti, H. G. Börner, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 1239-1244.
- [65] L. Hartmann, *Macromol. Chem. Phys.* **2011**, *212*, 8-13.
- [66] P. Ferruti, M. A. Marchisio, R. Duncan, *Macromol. Rapid Commun.* **2002**, *23*, 332-355.
- [67] R. Huisgen, G. Szeimies, L. Möbius, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 2494-2507.
- [68] F. Wojcik, D. Ponader, S. Mosca, L. Hartmann, *ACS Symp. Ser. Am. Chem. Soc.* **2014**, *1170*, 85-101.
- [69] A. L. Boyle, D. N. Woolfson, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4295-4306.
- [70] L. Otvos, Jr., *Methods Mol Biol* **2008**, *494*, 1-8.
- [71] P. M. Saladin, B. D. Zhang, J. M. Reichert, *IDrugs* **2009**, *12*, 779-784.
- [72] V. M. Ahrens, K. Bellmann-Sickert, A. G. Beck-Sickinger, *Future Med Chem* **2012**, *4*, 1567-1586.
- [73] J. Lei, L. Sun, S. Huang, C. Zhu, P. Li, J. He, V. Mackey, D. H. Coy, Q. He, *Am. J. Transl. Res.* **2019**, *11*, 3919-3931.
- [74] Y. Li, J. Cheng, P. Delparastan, H. Wang, S. J. Sigg, K. G. DeFrates, Y. Cao, P. B. Messersmith, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3895.
- [75] K. M. Cosert, A. Castro-Forero, R. J. Steidl, R. M. Worden, G. Reguera, *ASM* **2019**, *10*, e02721-02719.
- [76] L. Mendive-Tapia, J. Wang, M. Vendrell, *J. Pept. Sci.* **2020**.
- [77] G. M. Whitesides, B. Grzybowski, *Science* **2002**, *295*, 2418-2421.
- [78] L. C. Palmer, Y. S. Velichko, M. O. de la Cruz, S. I. Stupp, *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* **2007**, *365*, 1417-1433.
- [79] S. I. Stupp, R. H. Zha, L. C. Palmer, H. Cui, R. Bitton, *Faraday discuss* **2013**, *166*, 9-30.
- [80] S. Zhang, *Nat Biotechnol* **2003**, *21*, 1171-1178.
- [81] Z. Lian, T. Ji, *J. Mater. Chem.* **2020**, *8*, 6517-6529.
- [82] T. C. Holmes, *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 16-21.
- [83] M. Yemini, M. Reches, J. Rishpon, E. Gazit, *Nano letters* **2005**, *5*, 183-186.
- [84] H. Yazici, M. B. O'Neill, T. Kacar, B. R. Wilson, E. E. Oren, M. Sarikaya, C. Tamerler, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 5070-5081.
- [85] N. Habibi, N. Kamaly, A. Memic, H. Shafiee, *Nano Today* **2016**, *11*, 41-60.
- [86] S. Gupta, I. Singh, A. K. Sharma, P. Kumar, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*.
- [87] T. P. Knowles, A. W. Fitzpatrick, S. Meehan, H. R. Mott, M. Vendruscolo, C. M. Dobson, M. E. Welland, *Science* **2007**, *318*, 1900-1903.

- [88] A. Aggeli, M. Bell, L. M. Carrick, C. W. G. Fishwick, R. Harding, P. J. Mawer, S. E. Radford, A. E. Strong, N. Boden, *JACS* **2003**, *125*, 9619-9628.
- [89] A. D. Ozkan, A. B. Tekinay, M. O. Guler, E. D. Tekin, *RSC Advances* **2016**, *6*, 104201-104214.
- [90] G. Cravotto, P. Cintas, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2684-2697.
- [91] C. F. J. Faul, M. Antonietti, *Adv Mater* **2003**, *15*, 673-683.
- [92] T. H. Rehm, C. Schmuck, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3597-3611.
- [93] K. M. Makwana, R. Mahalakshmi, *Protein Sci.* **2015**, *24*, 1920-1933.
- [94] S. Simm, J. Einloft, O. Mirus, E. Schleiff, *Biol. Res.* **2016**, *49*.
- [95] S. Toksoz, H. Acar, M. O. Guler, *Soft Matter* **2010**, *6*, 5839-5849.
- [96] J. Wang, K. Liu, R. Xing, X. Yan, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 5589-5604.
- [97] Y. Wu, J. H. Collier, *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnology* **2017**, *9*, e1424.
- [98] A. N. Lupas, M. Gruber, in *Adv. Protein Chem., Vol. 70*, Academic Press, **2005**, pp. 37-38.
- [99] R. M. Hughes, M. L. Waters, *Current opinion in structural biology* **2006**, *16*, 514-524.
- [100] C. K. Smith, L. Regan, *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 153-161.
- [101] M. Reches, E. Gazit, *Science* **2003**, *300*, 625-627.
- [102] M. Reches, E. Gazit, *Isr. J. Chem.* **2005**, *45*, 363-371.
- [103] X. Yan, P. Zhu, J. Li, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1877.
- [104] A. M. Smith, R. J. Williams, C. Tang, P. Coppo, R. F. Collins, M. L. Turner, A. Saiani, R. V. Ulijn, *Adv Mater* **2008**, *20*, 37-41.
- [105] T. Ji, D. S. Kohane, *Nano today* **2019**, *28*, 100765.
- [106] K. Park, *J Control Release* **2014**, *190*, 3-8.
- [107] G. Tiwari, R. Tiwari, B. Sriwastawa, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey, S. K. Bannerjee, *Int. J. Pharm. Investig.* **2012**, *2*, 2-11.
- [108] C. Li, J. Wang, Y. Wang, H. Gao, G. Wei, Y. Huang, H. Yu, Y. Gan, Y. Wang, L. Mei, H. Chen, H. Hu, Z. Zhang, Y. Jin, *Acta Pharm. Sin. B.* **2019**, *9*, 1145-1162.
- [109] D. Tesauro, A. Accardo, C. Diaferia, V. Milano, J. Guillon, L. Ronga, F. Rossi, *Molecules* **2019**, *24*, 351.
- [110] Y. Cheng, C. Sun, R. Liu, J. Yang, J. Dai, T. Zhai, X. Lou, F. Xia, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 5049-5053.
- [111] J. K. Patra, G. Das, L. F. Fraceto, E. V. R. Campos, M. d. P. Rodriguez-Torres, L. S. Acosta-Torres, L. A. Diaz-Torres, R. Grillo, M. K. Swamy, S. Sharma, S. Habtemariam, H.-S. Shin, *J. Nanobiotechnology* **2018**, *16*, 71.
- [112] R. V. Ulijn, *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 2217-2225.
- [113] F. Heitz, M. C. Morris, G. Divita, *Br J Pharmacol* **2009**, *157*, 195-206.
- [114] H. K. Kang, C. Kim, C. H. Seo, Y. Park, *J Microbiol* **2017**, *55*, 1-12.
- [115] Y. Nagai, L. D. Unsworth, S. Koutsopoulos, S. Zhang, *J Control Release* **2006**, *115*, 18-25.
- [116] Q. Chai, Y. Jiao, X. Yu, *Gels* **2017**, *3*, 6.
- [117] J. Chen, X. Zou, *Bioact. Mater.* **2019**, *4*, 120-131.

- [118] L. Haines-Butterick, K. Rajagopal, M. Branco, D. Salick, R. Rughani, M. Pilarz, M. S. Lamm, D. J. Pochan, J. P. Schneider, *PNAS* **2007**, *104*, 7791-7796.
- [119] S. Lindsey, J. H. Piatt, P. Worthington, C. Sönmez, S. Satheye, J. P. Schneider, D. J. Pochan, S. A. Langhans, *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 2672-2683.
- [120] A. Altunbas, S. J. Lee, S. A. Rajasekaran, J. P. Schneider, D. J. Pochan, *Biomaterials* **2011**, *32*, 5906-5914.
- [121] M. C. Branco, D. J. Pochan, N. J. Wagner, J. P. Schneider, *Biomaterials* **2010**, *31*, 9527-9534.
- [122] M. C. Branco, D. J. Pochan, N. J. Wagner, J. P. Schneider, *Biomaterials* **2009**, *30*, 1339-1347.
- [123] L. Lyu, F. Liu, X. Wang, M. Hu, J. Mu, H. Cheong, G. Liu, B. Xing, *Chem. Asian J.* **2017**, *12*, 744-752.
- [124] P. Ringhieri, C. Avitabile, M. Saviano, G. Morelli, A. Romanelli, A. Accardo, *Colloids Surf. B* **2016**, *145*, 462-469.
- [125] T. Rafeeq, M. M. Ana, G. P. William, A. H. Ghaleb, *Curr. Pharm. Des.* **2016**, *22*, 2796-2807.
- [126] E. Rosa, C. Diaferia, E. Gallo, G. Morelli, A. Accardo, *Molecules* **2020**, *25*.
- [127] S.-J. Shieh, J. P. Vacanti, *Surgery* **2005**, *137*, 1-7.
- [128] Y. Hirano, D. J. Mooney, *Adv Mater* **2004**, *16*, 17-25.
- [129] R. Langer, J. P. Vacanti, *Science* **1993**, *260*, 920.
- [130] J. P. Vacanti, R. Langer, *Lancet Infect. Dis.* **1999**, *354*, S32-S34.
- [131] K. H. Chan, B. Xue, R. C. Robinson, C. A. E. Hauser, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 12897.
- [132] S. Zhang, C. Lockshin, R. Cook, A. Rich, *Biopolymers* **1994**, *34*, 663-672.
- [133] S. Zhang, T. C. Holmes, C. M. DiPersio, R. O. Hynes, X. Su, A. Rich, *Biomaterials* **1995**, *16*, 1385-1393.
- [134] C. Tomasini, N. Castellucci, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 156-172.
- [135] A. K. Das, P. K. Gavel, *Soft Matter* **2020**, *16*, 10065-10095.
- [136] E. R. Draper, D. J. Adams, *Chem* **2017**, *3*, 390-410.
- [137] G. Fichman, E. Gazit, *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 1671-1682.
- [138] W. Y. Seow, C. A. E. Hauser, *Mater. Today* **2014**, *17*, 381-388.
- [139] N. Yadav, M. K. Chauhan, V. S. Chauhan, *Biomater. Sci.* **2020**, *8*, 84-100.
- [140] C. J. Bowerman, D. M. Ryan, D. A. Nissan, B. L. Nilsson, *Mol. Biosyst* **2009**, *5*, 1058.
- [141] R. Vegners, I. Shestakova, I. Kalvinsh, R. M. Ezzell, P. A. Janmey, *J. Pept. Sci.* **1995**, *1*, 371-378.
- [142] D. B. Rasale, I. Maity, A. K. Das, *RSC Advances* **2012**, *2*, 9791-9794.
- [143] C. A. Hauser, R. Deng, A. Mishra, Y. Loo, U. Khoe, F. Zhuang, D. W. Cheong, A. Accardo, M. B. Sullivan, C. Riekell, *PNAS* **2011**, *108*, 1361-1366.
- [144] X. Kang, F. Dong, C. Shi, S. Liu, J. Sun, J. Chen, H. Li, H. Xu, X. Lao, H. Zheng, *Sci. Data* **2019**, *6*, 1-10.
- [145] J.-K. Lee, T. Luchian, Y. Park, *Oncotarget* **2018**, *9*, 15616.
- [146] S. Maity, S. Nir, T. Zada, M. Rechtes, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 11154-11157.

- [147] Y.-H. Liu, S.-M. Hsu, F.-Y. Wu, H. Cheng, M.-Y. Yeh, H.-C. Lin, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 1794-1800.
- [148] C. B. Highley, C. B. Rodell, J. A. Burdick, *Adv Mater* **2015**, *27*, 5075-5079.
- [149] M. Caldorera-Moore, N. A. Peppas, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 1391-1401.
- [150] J. M. Knipe, N. A. Peppas, *Regen. Biomater.* **2014**, *1*, 57-65.
- [151] J. M. Knipe, F. Chen, N. A. Peppas, *J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, *131*.
- [152] Y. J. Zhu, F. Chen, *Chem. Asian J.* **2015**, *10*, 284-305.
- [153] J. Hu, G. Zhang, S. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5933-5949.
- [154] L. L. Lao, S. S. Venkatraman, N. A. Peppas, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *70*, 796-803.
- [155] J. M. Anderson, M. S. Shive, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 72-82.
- [156] R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 347-360.
- [157] L. C. Glangchai, M. Caldorera-Moore, L. Shi, K. Roy, *J Control Release* **2008**, *125*, 263-272.
- [158] T. Ooya, M. Eguchi, N. Yui, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 200-203.
- [159] P.-Y. Yeh, P. Kopečková, J. Kopeček, *Macromol. Chem. Phys.* **1995**, *196*, 2183-2202.
- [160] M. D. Burke, J. O. Park, M. Srinivasarao, S. A. Khan, *J. Control. Release* **2005**, *104*, 141-153.
- [161] B. E. Linebaugh, M. Sameni, N. A. Day, B. F. Sloane, D. Keppler, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *264*, 100-109.
- [162] C. Jedeszko, B. F. Sloane, *Biol Chem* **2004**, *385*, 1017-1027.
- [163] B. Turk, D. Turk, V. Turk, *Biochim Biophys Acta* **2000**, *1477*, 98-111.
- [164] M. L. Biniossek, M. Niemer, K. Maksimchuk, B. Mayer, J. Fuchs, P. F. Huesgen, D. G. McCafferty, B. Turk, G. Fritz, J. Mayer, G. Haecker, L. Mach, O. Schilling, *Mol. Cell. Proteom.* **2016**, *15*, 2515-2524.
- [165] H. Pan, J. Yang, P. Kopečková, J. Kopeček, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 247-252.
- [166] J. Yang, K. Luo, H. Pan, P. Kopečková, J. Kopeček, *React. Funct. Polym.* **2011**, *71*, 294-302.
- [167] P. Rejmanová, J. Kopeček, J. Pohl, M. Baudyš, V. Kostka, *Makromol. Chem.* **1983**, *184*, 2009-2020.
- [168] L. L. Lock, A. G. Cheetham, P. Zhang, H. Cui, *ACS Nano* **2013**, *7*, 4924-4932.
- [169] C. Zhang, L.-H. Liu, W.-X. Qiu, Y.-H. Zhang, W. Song, L. Zhang, S.-B. Wang, X.-Z. Zhang, *Small* **2018**, *14*, 1703321.
- [170] R. Mülhaupt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1054-1063.
- [171] R. Whitfield, K. Parkatzidis, N. P. Truong, T. Junkers, A. Anastasaki, *Chem* **2020**, *6*, 1340-1352.
- [172] H. G. Börner, H. Schlaad, *Soft Matter* **2007**, *3*, 394-408.
- [173] H. Ringsdorf, *J. Polym. Sci., Part C: Polym. Symp.* **1975**, *51*, 135-153.
- [174] A. Abuchowski, J. R. McCoy, N. C. Palczuk, T. van Es, F. F. Davis, *J Biol Chem* **1977**, *252*, 3582-3586.
- [175] A. Abuchowski, T. van Es, N. C. Palczuk, F. F. Davis, *J Biol Chem* **1977**, *252*, 3578-3581.
- [176] A. Chilkoti, M. R. Dreher, D. E. Meyer, D. Raucher, *Adv Drug Deliv Rev* **2002**, *54*, 613-630.

- [177] P. S. Stayton, A. S. Hoffman, M. El-Sayed, S. Kulkarni, T. Shimoboji, N. Murthy, V. Bulmus, C. Lackey, *Proc. IEEE* **2005**, *93*, 726-736.
- [178] E. Radvar, H. S. Azevedo, *Macromol. Biosci.* **2019**, *19*, 1800221.
- [179] J. L. Lau, M. K. Dunn, *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 2700-2707.
- [180] L. Otvos, Jr., J. D. Wade, *Front Chem* **2014**, *2*, 62.
- [181] J. E. Bock, J. Gavenonis, J. A. Kritzer, *ACS Chemical Biology* **2013**, *8*, 488-499.
- [182] P. Grieco, A. Carotenuto, L. Auriemma, M. R. Saviello, P. Campiglia, I. M. Gomez-Monterrey, L. Marcellini, V. Luca, D. Barra, E. Novellino, M. L. Mangoni, *Biochim Biophys Acta Biomembr BBA-BIOMEMBRANES* **2013**, *1828*, 652-660.
- [183] J. Grünewald, G. S. Hunt, L. Dong, F. Niessen, B. G. Wen, M. L. Tsao, R. Perera, M. Kang, B. A. Laffitte, S. Azarian, W. Ruf, M. Nasoff, R. A. Lerner, P. G. Schultz, V. V. Smider, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 4337-4342.
- [184] C. Gilon, D. Halle, M. Chorev, Z. Selinger, G. Byk, *Biopolymers* **1991**, *31*, 745-750.
- [185] H.-A. Klok, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2005**, *43*, 1-17.
- [186] N. ten Brummelhuis, P. Wilke, H. G. Börner, *Macromol. Rapid Commun.* **2017**, *38*, 1700632.
- [187] B. Trzebicka, B. Robak, R. Trzcinska, D. Szweda, P. Suder, J. Silberring, A. Dworak, *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 499-509.
- [188] C. M. Riccardi, K. S. Cole, K. R. Benson, J. R. Ward, K. M. Bassett, Y. Zhang, O. V. Zore, B. Stromer, R. M. Kasi, C. V. Kumar, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 1501-1510.
- [189] Z. Zarafshani, T. Obata, J.-F. Lutz, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2130-2135.
- [190] H. G. Börner, R. I. Sütterlin, P. Theato, K. T. Wiss, *Macromol. Rapid Commun.* **2014**, *35*, 180-185.
- [191] R. M. Broyer, G. M. Quaker, H. D. Maynard, *JACS* **2008**, *130*, 1041-1047.
- [192] H. D. Maynard, S. Y. Okada, R. H. Grubbs, *JACS* **2001**, *123*, 1275-1279.
- [193] B. A. Paik, S. R. Mane, X. Jia, K. L. Kiick, *J. Mater. Chem.* **2017**, *5*, 8274-8288.
- [194] L. Zhang, J. M. Chan, F. X. Gu, J.-W. Rhee, A. Z. Wang, A. F. Radovic-Moreno, F. Alexis, R. Langer, O. C. Farokhzad, *ACS Nano* **2008**, *2*, 1696-1702.
- [195] A. Wagner, K. Vorauer-Uhl, *J. Drug Deliv.* **2011**, *2011*.
- [196] A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S. W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi, K. Nejati-Koshki, *Nanoscale Res Lett* **2013**, *8*, 102-102.
- [197] V. P. Torchilin, *Pharm Res* **2007**, *24*, 1-16.
- [198] C. Pinto Reis, R. J. Neufeld, A. J. Ribeiro, F. Veiga, *J. Nanomed. Nanotechnol.* **2006**, *2*, 8-21.
- [199] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, *Nat Nanotechnol* **2007**, *2*, 751-760.
- [200] A. Chonn, P. R. Cullis, D. V. Devine, *J Immunol* **1991**, *146*, 4234-4241.
- [201] H. M. Patel, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **1992**, *9*, 39-90.
- [202] D. Needham, T. J. McIntosh, D. D. Lasic, *Biochim Biophys Acta* **1992**, *1108*, 40-48.
- [203] M. L. Immordino, F. Dosio, L. Cattel, *Int J Nanomedicine* **2006**, *1*, 297-315.
- [204] J. Szebeni, *Toxicology* **2005**, *216*, 106-121.

- [205] T. Ishida, H. Kiwada, *Biol Pharm Bull* **2013**, *36*, 889-891.
- [206] D. A. Herold, K. Keil, D. E. Bruns, *Biochem Pharmacol* **1989**, *38*, 73-76.
- [207] M. F. Ebbesen, C. Gerke, P. Hartwig, L. Hartmann, *Polym. Chem.* **2016**, *7*, 7086-7093.
- [208] S. Isokawa, M. Doi, R. Wakita, H. Sugawara, T. Asakura, M. Narita, *Macromolecules* **1987**, *20*, 1227-1234.
- [209] M. Narita, M. Doi, H. Sugawara, K. Ishikawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1985**, *58*, 1473-1479.
- [210] M. Narita, Y. Tomotake, S. Isokawa, T. Matsuzawa, T. Miyauchi, *Macromolecules* **1984**, *17*, 1903-1906.
- [211] M. Narita, S. Isokawa, Y. Tomotake, S. Nagasawa, *Polym. J.* **1983**, *15*, 25-32.
- [212] D. L. Atroshenko, I. V. Golubev, S. S. Savin, V. I. Tishkov, *Mosc. Univ. Chem. Bull.* **2016**, *71*, 243-252.
- [213] O. D. Monera, T. J. Sereda, N. E. Zhou, C. M. Kay, R. S. Hodges, *J. Pept. Sci.* **1995**, *1*, 319-329.
- [214] Y. Kuroyanagi, A. Shiraishi, Y. Shirasaki, N. Nakakita, Y. Yasutomi, Y. Takano, N. Shioya, *Wound Repair and Regen* **1994**, *2*, 122-129.
- [215] Y. Kuroyanagi, E. Kim, M. Kenmochi, K. Ui, H. Kageyama, M. Nakamura, A. Takeda, N. Shioya, *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **1992**, *3*, 153-161.
- [216] H.-J. Kim, E.-Y. Choi, J.-S. Oh, H.-C. Lee, S.-S. Park, C.-S. Cho, *Biomaterials* **2000**, *21*, 131-141.
- [217] E. P. Holowka, D. J. Pochan, T. J. Deming, *JACS* **2005**, *127*, 12423-12428.
- [218] E. Bayer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 113-129.
- [219] W. Rapp, *PEG Grafted Polystyrene Tentacle Polymers: Physico-Chemical Properties and Application in Chemical Synthesis*, **1996**.
- [220] Y. Huang, L. Pan, L. Zhao, C. T. Mant, R. S. Hodges, Y. Chen, *Biomed. Chromatogr.* **2014**, *28*, 511-517.
- [221] B. Tripet, D. Cepeniene, J. M. Kovacs, C. T. Mant, O. V. Krokhin, R. S. Hodges, *J. Chromatogr. A* **2007**, *1141*, 212-225.
- [222] H. Yang, S. Yang, J. Kong, A. Dong, S. Yu, *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 382-396.
- [223] A. Barth, *Biochim Biophys Acta Bioenerg BBA-BIOENERGETICS* **2007**, *1767*, 1073-1101.
- [224] N. J. Greenfield, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2876-2890.
- [225] G. Holzwarth, P. Doty, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 218-228.
- [226] N. Greenfield, G. D. Fasman, *Biochemistry* **1969**, *8*, 4108-4116.
- [227] S. Venyaminov, I. A. Baikarov, Z. M. Shen, C. S. Wu, J. T. Yang, *Analytical biochemistry* **1993**, *214*, 17-24.
- [228] K. Patel, R. T. Borchardt, *Pharm. Res.* **1990**, *07*, 703-711.
- [229] W. Kunz, J. Henle, B. W. Ninham, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2004**, *9*, 19-37.
- [230] F. Hofmeister, *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **1888**, *24*, 247-260.
- [231] Y. Zhang, P. S. Cremer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 658-663.
- [232] K. D. Collins, M. W. Washabaugh, *Q. Rev. Biophys.* **1985**, *18*, 323-422.

- [233] P. E. Mason, G. W. Neilson, C. E. Dempsey, A. C. Barnes, J. M. Cruickshank, *PNAS* **2003**, *100*, 4557-4561.
- [234] S. A. Cockle, R. M. Epand, M. A. Moscarello, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 8019-8026.
- [235] H. E. Auer, P. Doty, *Biochemistry* **1966**, *5*, 1716-1725.
- [236] L. J. Rizzolo, M. Le Marie, J. A. Reynolds, C. Tanford, *Biochemistry* **1976**, *15*, 3433-3437.
- [237] J. Heyda, H. I. Okur, J. Hladílková, K. B. Rembert, W. Hunn, T. Yang, J. Dzubiella, P. Jungwirth, P. S. Cremer, *JACS* **2017**, *139*, 863-870.
- [238] M. Groenning, L. Olsen, M. Van De Weert, J. M. Flink, S. Frokjaer, F. S. Jørgensen, *J. Struct. Biol.* **2007**, *158*, 358-369.
- [239] M. B. Pepys, *Annu. Rev. Med.* **2006**, *57*, 223-241.
- [240] M. Biancalana, K. Makabe, A. Koide, S. Koide, *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 1052-1063.
- [241] C. Xue, T. Y. Lin, D. Chang, Z. Guo, *R. Soc. Open Sci.* **2017**, *4*, 160696.
- [242] S. Y. Fung, C. Keyes, J. Duhamel, P. Chen, *Biophys. J.* **2003**, *85*, 537-548.
- [243] A. Kroes-Nijboer, P. Venema, J. Bouman, E. Van Der Linden, *Food Biophys.* **2009**, *4*, 59-63.
- [244] P. Chen, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2005**, *261*, 3-24.
- [245] S. Boothroyd, A. Saiani, A. F. Miller, *Biopolymers* **2014**, *101*, 669-680.
- [246] A. Scelsi, B. Bochicchio, A. Smith, V. L. Workman, L. A. Castillo Diaz, A. Saiani, A. Pepe, *J. Biomed. Mater. Res.* **2019**, *107*, 535-544.
- [247] J. M. Zuidema, C. J. Rivet, R. J. Gilbert, F. A. Morrison, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2014**, *102*, 1063-1073.
- [248] L. M. De Leon Rodriguez, Y. Hemar, J. Cornish, M. A. Brimble, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 4797-4824.
- [249] C. Tang, R. V. Ulijn, A. Saiani, *Eur. Phys. J. E* **2013**, *36*.
- [250] V. Breedveld, A. P. Nowak, J. Sato, T. J. Deming, D. J. Pine, *Macromolecules* **2004**, *37*, 3943-3953.
- [251] C.-C. Lin, K. S. Anseth, *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 631-643.
- [252] S. A. A. Rizvi, A. M. Saleh, *Saudi Pharm J* **2018**, *26*, 64-70.
- [253] W. H. De Jong, P. J. A. Borm, *Int J Nanomedicine* **2008**, *3*, 133-149.
- [254] J. Stetefeld, S. A. McKenna, T. R. Patel, *Biophys. Rev.* **2016**, *8*, 409-427.
- [255] J. Gliński, G. Chavepeyer, J.-K. Platten, *Biophys. Chem.* **2000**, *84*, 99-103.
- [256] Q. Mu, T. Hu, J. Yu, *PLoS One* **2013**, *8*, e68559-e68559.
- [257] N. M. Gulati, P. L. Stewart, N. F. Steinmetz, *Mol. Pharm.* **2018**, *15*, 2900-2909.
- [258] J. Mast, E. Verleysen, V.-D. Hodoroaba, R. Kaegi, in *Characterization of Nanoparticles* (Eds.: V.-D. Hodoroaba, W. E. S. Unger, A. G. Shard), Elsevier, **2020**, pp. 29-48.
- [259] M. Kaliva, M. Vamvakaki, in *Polymer Science and Nanotechnology* (Ed.: R. Narain), Elsevier, **2020**, pp. 401-433.
- [260] D. L. Thiele, P. E. Lipsky, *PNAS* **1990**, *87*, 83-87.
- [261] J. C. Simon, D. L. Thiele, E. Schöpf, R. D. Sontheimer, *J. Investig. Dermatol.* **1992**, *99*, S80-S82.

- [262] N. Shenoy, M. Stenson, J. Lawson, J. Abeykoon, M. Patnaik, X. Wu, T. Witzig, *Lab. Invest.* **2017**, *97*, 494-497.
- [263] CellTiter-Blue: <https://www.promega.de/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-blue-cell-viability-assay/?catNum=G8080#protocols>.
- [264] S. Richardson, P. Ferruti, R. Duncan, *J Drug Target* **1999**, *6*, 391-404.
- [265] N. Aggarwal, B. F. Sloane, *Proteomics Clin Appl* **2014**, *8*, 427-437.
- [266] S. Bleher, *Evaluation of novel lipopolymers to impart stealth-like properties to liposomes; Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau*, **2019**.
- [267] V. Holzapfel, M. Lorenz, C. K. Weiss, H. Schrezenmeier, K. Landfester, V. Mailänder, *J. Condens. Matter Phys.* **2006**, *18*, S2581-S2594.
- [268] Y. Liu, R. Ran, J. Chen, Q. Kuang, J. Tang, L. Mei, Q. Zhang, H. Gao, Z. Zhang, Q. He, *Biomaterials* **2014**, *35*, 4835-4847.
- [269] S. L. Pedersen, A. P. Tofteng, L. Malik, K. J. Jensen, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1826-1844.
- [270] E. V. Yates, G. Meisl, T. P. J. Knowles, C. M. Dobson, *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 2087-2094.
- [271] W. E. Klunk, R. F. Jacob, R. P. Mason, *Anal. Biochem.* **1999**, *266*, 66-76.
- [272] Z. Kochovski, G. Chen, J. Yuan, Y. Lu, *Colloid Polym. Sci.* **2020**, *298*, 707-717.
- [273] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **2009**, *35*, 161-214.