

Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung

Methoden zur Synthese von definierten bioorganisch-synthetischen Blockcopolymeren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“

(Dr.rer.nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin „Kolloidchemie“

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Potsdam

von

Hartmut Arnim Rettig

aus Hamburg

Potsdam, im April 2006

Inhaltsangabe:

1.	Einleitung und Zielsetzung.....	4
2.	Grundlagen.....	5
2.1	Bioorganisch–synthetische Blockcopolymere	5
2.2	Kontrollierte radikalische Polymerisation.....	7
2.2.1	Polymerisationsarten	7
2.2.2	ATRP (atom transfer radical polymerization).....	10
2.2.3	RAFT (Reversible addition fragmentation chain transfer polymerisation) .	19
2.3	Peptide.....	23
2.3.1	Aufbau und Struktur von Peptiden.....	23
2.3.2	Synthese von Peptiden	25
3.	Charakterisierungsmethoden.....	31
3.1	Polymercharakterisierung.....	31
3.1.1	Gelpermeationschromatographie (GPC).....	31
3.1.2	Maldi-TOF Massenspektrometrie	33
3.1.3	Bestimmung des Umsatzes bei ATRP Reaktionen über NMR- Spektroskopie	34
4.	Bioorganisch–synthetische Blockcopolymere über Kupplungstechniken.....	36
4.1	Einleitung	36
4.2	Eingesetzte Initiatoren zur Synthese von säureendfunktionalisierten Polyacrylaten zur Kupplung an Oligopeptide	40
4.3	Synthese eines säureendfunktionalisierten Polymers unter Verwendung einer <i>tert</i> -Butylschutzgruppe.....	42
4.4	Synthese eines säureendfunktionalisierten Polymers unter Verwendung einer Benzoinesterschutzgruppe.....	44
4.5	Synthese eines säureendfunktionalisierten Polymers unter Verwendung einer Benzylesterschutzgruppe.....	47
4.6	Kupplung von Oligopeptiden mit säureendfunktionalisierten Polyacrylaten	49
5.	Bioorganisch–synthetische Konjugate über Oligopeptid-ATRP-Makroinitiatoren.....	54
5.1	Einleitung	54
5.2	Vergleich von α -Säureamiden und α -Estern als ATRP-Initiatoren	55
5.3	Synthese von Oligopeptid-Makroinitiatoren.....	58
5.4	Polymerisation unter Verwendung von Pentamethyldiethylendiamin als Ligand	63

5.5	Einfluß des Oligopeptids auf die Polymerisation.....	68
5.6	BPED als Ligand bei der ATRP von Oligopeptid-Makroinitiatoren	73
6.	Bioorganisch-synthetische Blockcopolymere über RAFT-Polymerisation unter Zusatz eines Oligopeptidüberträgers.....	76
7.	Zusammenfassung und Ausblick	84
8.	Experimenteller Teil.....	86
8.1	Verwendete Chemikalien	86
8.2	Analytische Methoden:	87
8.3	Experimentelle Vorschriften:	89
8.3.1	Durchführung eines Kaisertests:	89
8.3.2	Durchführung eines Sangertests:.....	89
8.3.3	Annäherung des Beladungsgrads eines Fmoc-geschützten Harzes.....	89
8.3.4	Synthese von N-Fmoc-Aminoethanol:.....	90
8.3.5	Umsetzung des Chlor-2-Chlortritylharzes zu einem 2-Aminoethanol-2- Chlortritylharz.....	92
8.3.6	Allgemein: Synthese der eingesetzten Peptide.....	92
8.3.7	Allg. Vorschrift: Herstellung von 2-Brom-Propionsäure funktionalisierten Makroinitiatoren	93
8.3.8	Allgemein: Abspaltung von einem 2-Aminoethanol-2-Chlortritylharz	94
8.3.9	Synthese von 2-Brom-Propionsäurebenzylester	94
8.3.10	Synthese von 2-Brom-Propionsäurebenzoinester	95
8.3.11	Allg. Vorschrift: ATRP Polymerisation mit niedermolekularen Initiatoren	96
8.3.12	Entfernung der <i>tert</i> -Butylesterschutzgruppe mit Iodtrimethylsilan	100
8.3.13	Entfernung der <i>tert</i> -Butylesterschutzgruppe durch 30% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid.....	100
8.3.14	Entfernung der Benzoinerschutzgruppe	101
8.3.15	Entfernung der Benzylesterschutzgruppe.....	102
8.3.16	Kupplung von säureendfunktionalisierten Polyacrylaten an den N-Terminus von Festphasen gebundenen Oligopeptiden.....	103
8.3.17	Synthese von BPED	105
8.3.18	Durchführung von ATRP-Kinetiken unter Zusatz von gecaptem Oligopeptid	106
8.3.19	ATRP-Kinetiken unter Verwendung eines Oligopeptid Makroinitiators ..	107
8.3.20	Synthese von 4-cyano-4-((thiobenzyl)sulfanyl)pentansäure.....	109

8.3.21	Synthese des Oligopeptid-transferreagenz: (Ph-C(S)-S-C(CH ₃)(CN)-CH ₂ -CH ₂ -C(O)-Gly-Asp(<i>t</i> Bu)-Gly-Phe-Asp(<i>t</i> Bu)-NHCH ₂ CH ₂ OH)	109
8.3.22	Durchführung einer Kinetik zu einer RAFT-Polymerisation mit einem Oligopeptid-RAFT-Reagenz	111
8.3.23	Synthese des Oligopeptid-transferreagenz: (Ph-C(S)-S-CH(CH ₃)-C(O)-Gly-Asp(<i>t</i> Bu)-Gly-Phe-Asp(<i>t</i> Bu)-NHCH ₂ CH ₂ OH)	111
9.	Abkürzungsverzeichnis	113
10.	Literaturverzeichnis.....	115

1. Einleitung und Zielsetzung

Nach Homer ist die Chimäre in der griechischen Mythologie ein Ungeheuer, welches sich aus Löwe, Ziege und Schlange zusammensetzt¹, also eine Kombination verschiedener Spezies. In der heutigen Zeit bezeichnet dieses Wort Kombinationen, die aus formaler Sicht nicht zusammengehören; in der Biologie sind dieses z. B. Individuen, die aus genetisch unterschiedlichen Teilen bestehen. Dieses ist in dem Begriff „molekulare Chimera“² aufgegriffen worden. „Molekulare Chimera“ oder bioorganisch–synthetische Blockcopolymeren bestehen aus zwei Segmenten: einem klassischen synthetischen Polymer und einem Oligo- bzw. Polypeptid. Aufgrund der Verbindung dieser beiden Segmente wird der Zugang zu einer neuen und sehr interessanten Klasse von multifunktionalen Polymeren geschaffen, denen mehr und mehr Aufmerksamkeit geschenkt wird. Ihr Potential reicht von den Materialwissenschaften³ bis in den Bereich der Pharmazie und Medizin⁴.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung neuer Synthesewege zu bioorganisch-synthetischen Blockcopolymeren. Hierzu gibt es zwei Ansatzmöglichkeiten; zum einen die Synthese des Copolymers durch Kupplung der beiden Segmente, welches eine gezielte Endfunktionalisierung der Segmente voraussetzt; zum anderen den Aufbau des synthetischen Segments an dem Oligopeptidblock durch Polymerisation, wobei als Polymerisationsarten die kontrolliert radikalischen Methoden ATRP und RAFT ausgewählt wurden. Diese besitzen eine breite Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen und eine gute Kontrolle während der Polymerisation. Im Rahmen dieses Ansatzes werden verschiedene Synthesewege zu ATRP-Oligopeptid-Makroinitiatoren sowie zu RAFT-Oligopeptid-Transferreagenzien diskutiert. Ferner werden bei der Polymerisation mit dem funktionalisierten Oligopeptid die Vor- und Nachteile der jeweiligen Polymerisationsart in Gegenwart eines Oligopeptidblocks erörtert.

2. Grundlagen

2.1 *Bioorganisch–synthetische Blockcopolymere*

Viele der herausragenden Eigenschaften von Proteinen hängen direkt mit ihrer Aminosäuresequenz und dem sich daraus ergebenden hierarchischen Aufbau, der Faltung, zusammen. So lassen sich sowohl die Materialeigenschaften der Spinnenseide als auch die katalytische Aktivität von Enzymen auf die hochorganisierte Struktur der Peptide zurückführen. Doch weisen Proteine nur einen begrenzten Anwendungsbereich auf. Denn obwohl sie aus natürlichen Bausteinen, den Aminosäuren, aufgebaut sind, können sie toxische Eigenschaften besitzen oder eine Immunantwort hervorrufen. Zudem sind sie relativ anfällig gegenüber einem enzymatischen Abbau, lassen sich in nicht wässrigen Lösungsmitteln nur begrenzt lösen und sind in ihrer Struktur oft Temperatur und pH-Wert abhängig.⁵

Diese Nachteile können teilweise durch die Kombination von Peptiden mit einem synthetischen Polymer überwunden werden. Dabei wird versucht, die Eigenschaften der einzelnen Komponenten zu verbinden und so die Limitierungen der Einzelmaterialien zu überwinden bzw. deren positive Eigenschaften zu ergänzen.

Bisher lag das Hauptaugenmerk auf der Synthese von Protein-Polyethylenglykol Blockcopolymeren, da PEO in Wasser löslich und für die Anwendung in der Medizin zugelassen ist.

Dieses hatte zur Folge, dass der Bereich der bioorganisch–synthetischen Blockcopolymere, bestehend aus einem Polyethylenglycolsegment und einem medizinisch wirksamen Therapeutikum, auch am weitesten erforscht ist. Medizinisch wirksame Substanzen, die auf Antikörpern, Peptiden, oder Proteinen basieren, weisen bei ihrem Einsatz Probleme wie geringe Blutplasma Halbwertszeiten, geringe Stabilität und Aktivierung der Immunabwehr auf.^{6,7} Es konnte gezeigt werden, dass diese Probleme durch das Anbringen eines PEO Polymerblocks an den Wirkstoff erheblich verringert werden können.^{8,9,10} So wurden eine verbesserte Löslichkeit und Stabilität, z.B. gegenüber dem enzymatischen Abbau, eine reduzierte Reaktion der Immunabwehr und eine erhöhte Halbwertszeit im Blutplasma gemessen.

Inzwischen sind in dem Bereich der Protein-PEO Blockcopolymere bereits Therapeutika soweit entwickelt, dass sie in klinischen Studien getestet werden. Hierzu gehört zum Beispiel PEO- α -Interferon 2a (Pegasys)¹¹, welches auf seine Wirksamkeit gegenüber

Hepatitis C untersucht wird. Ein weiteres interessantes Anwendungsgebiet liegt im Bereich der Krebstherapie. Wegen der längeren Verweildauer von Copolymeren im Körper ist es durch den von Maeda¹² beschriebenen EPR-Effekt (enhanced permeability and retention effect) möglich, das Therapeutikum gezielt im Tumor anzureichern. Ein entstehender Krebstumor regt das Wachstum neuer Blutgefäße an, durch die der Tumor seine Nährstoffe erhält. Da die neu gebildeten Blutgefäße durchlässiger sind, ist es dem Therapeutikum an dieser Stelle möglich den Blutkreislauf zu verlassen und sich im Tumor anzureichern.

Ein sehr neues Feld ist die Kombination von Peptiden mit synthetischen Blöcken, die nicht aus PEO bestehen. Syntheseansätze zur Herstellung dieser Systeme liegen bisher nur sehr begrenzt vor. Sie erfolgen überwiegend an Festphase. Dieses führt jedoch aufgrund der Heterogenität der Reaktion und der dadurch auftretenden Konzentrationsunterschiede des Monomers innerhalb des Harzes zu einer breiten Molekulargewichtsverteilung der Polymere.

In dieser Arbeit werden sowohl Möglichkeiten zur Synthese von Oligopeptiden mit kurzen synthetischen Polymerblöcken über Kupplung als auch die Verwendung von Makroinitiatoren zur Synthese von Oligopeptiden mit längeren synthetischen Polymerblöcken vorgestellt. Zum Aufbau der synthetischen Blöcke wurden kontrolliert radikalische Polymerisationsmethoden verwendet, da durch diese Methoden eine große Anzahl von Monomeren bei gleichzeitiger Toleranz einer Vielzahl von funktionellen Gruppen zugänglich ist.

Aufgrund der Interdisziplinarität des bearbeiteten Projekts werden zunächst die Grundlagen zu den einzelnen Gebieten diskutiert. Hierzu gehören zum einen die Methoden der kontrolliert radikalischen Polymerisation und zum anderen die der Festphasenpeptidsynthese.

2.2 Kontrollierte radikalische Polymerisation

2.2.1 Polymerisationsarten

Die Entwicklung von Methoden zur kontrollierten radikalischen Polymerisation erfolgte mit dem Ziel, die Vorzüge der radikalischen Polymerisation mit denen der lebenden anionischen Polymerisation zu kombinieren.

Die Vorteile der radikalischen Polymerisation liegen in der Vielzahl von möglichen Monomeren und in der Toleranz gegenüber diversen funktionellen Gruppen bzw. Verunreinigungen. Als Monomere eignen sich viele Substanzen, die das in Abbildung 2.21 dargestellte Strukturelement Alken beinhalten:



Abbildung 2.2-1: Allgemeine Struktur von Monomeren, die für die radikalische Polymerisation geeignet sind

Die radikalische Polymerisation kann in Substanz, in Lösung, als Suspensions- oder als Emulsionspolymerisation erfolgen. Heterophasenpolymerisationen können in Wasser bei moderaten Temperaturen, üblicherweise 60 – 90 °C, durchgeführt werden. Durch die dadurch verbesserte Abfuhr der Reaktionswärme können unter anderem höhere Umsätze erreicht werden. Daher ist diese Methode auch in der Industrie zur Herstellung von Polymeren weit verbreitet.¹³

Die Nachteile der radikalischen Polymerisation liegen in der mangelnden molekularen Kontrolle während des Reaktionsverlaufs. Durch die kontinuierliche Initiierung der Polymerisation und der im Vergleich dazu hohen Polymerisationsgeschwindigkeit bei gleichzeitigem Vorliegen von Transfer- und Abbruchreaktionen erhält man Molekulargewichte mit breiter Molekulargewichtsverteilung. Die Verteilung der Molekulargewichte wird durch eine Schulz Flory Verteilung beschrieben.

Im Gegensatz zur radikalischen Polymerisation erlaubt die lebende anionische Polymerisation im Idealfall die Herstellung von definierten Polymeren mit einer engen Molekulargewichtsverteilung sowie die Kontrolle der Endfunktionalität des Polymers.

In diesem Zusammenhang wurde 1956 von Szwarc der Begriff der „lebenden Polymerisation“ (living polymerization) bei der anionischen Polymerisation eingeführt.^{14,15}

Lebende Polymerisationen sind in Initiierung und Wachstum unterteilte Kettenwachstumsreaktionen, bei denen keine Übertragungs- und Abbruchreaktionen auftreten. Sie sind gekennzeichnet durch eine schnelle Initiierung der Polymerisation im Vergleich zum Kettenwachstum und durch eine konstante Konzentration von aktiven Kettenenden während der Polymerisation. Daher ergibt sich für die Polymerisationsgeschwindigkeit eine Reaktionskinetik „pseudo“-erster Ordnung in Bezug auf die Monomerkonzentration. Die wachstumsfähigen Kettenenden bleiben nach dem Verbrauch des gesamten Monomers aktiv. So kann durch weitere Zugabe eines anderen Monomers ein Blockcopolymer aufgebaut¹⁶ oder durch die Wahl eines geeigneten Abbruchreagenzes eine Endfunktionalität eingeführt werden.¹⁷

Das Zahlenmittel des Polymerisationsgrades P_n läßt sich aus dem Verhältnis der Konzentration des bei der Polymerisation verbrauchten Monomers zu dem eingesetzten Initiator berechnen (Gleichung 2-1).

$$P_n = \frac{\Delta[M]}{[I]_0} = \frac{[M]_0 - [M]}{[I]_0} \quad (\text{Gl. 2-1})$$

Bei einer idealen lebenden Polymerisation wird die Molekulargewichtsverteilung durch eine Poisson-Verteilung dargestellt. Die Polydispersität der Polymere kann wie in Gleichung 2-2 beschrieben werden:

$$\frac{M_w}{M_n} = 1 + \frac{1}{P_n} \quad (\text{Gl. 2-2})$$

Die Polydispersität des Polymers ergibt sich aus dem Verhältnis des Gewichtsmittels des Molekulargewichts zu dem des Zahlenmittels. Dieses lässt sich auch unter Einbeziehung des Polymerisationsgrades ausdrücken und strebt für sehr hohe Polymerisationsgrade gegen 1.¹⁵

Die anionische Polymerisation von Standardmonomeren, wie Acrylaten, Methacrylaten, Styrol oder Ethylenoxid, erfolgt im Labormaßstab unter Inertgasatmosphäre, da das

wachsende Kettenende oft hoch reaktiv ist und durch den Kontakt mit Feuchtigkeit, Sauerstoff oder Kohlendioxid deaktiviert werden kann.^{18,19}

Als Monomere eignen sich funktionale Olefine oder gespannte cyclische Moleküle, die mit Hilfe von elektronenziehenden oder delokalisierend wirkenden Substituenten das wachstumsfähige Carbanion stabilisieren können.

Nach den ersten Veröffentlichungen über die lebenden anionischen Polymerisation wurden weitere Polymerisationstypen auf das Konzept der „lebenden“ Polymerisation hin untersucht. So wurden Polymerisationen verlaufend über kationische^{20,21}, metallkatalysierte Insertions-, Ringöffnungs- und Metathesemechanismen beschrieben, die unter kontrollierten Bedingungen geführt werden können.²²

Ein weiteres Konzept ist das der kontrollierten radikalischen Polymerisation. Es verbindet die Vorteile der freien radikalischen Polymerisation mit denen einer lebenden Polymerisation. Die Vorteile der freien radikalischen Polymerisation bestehen darin, dass durch sie eine Vielfalt von Monomeren, oft bei einer Unempfindlichkeit gegenüber Wasser und Kohlendioxid und einer verringerten Empfindlichkeit gegenüber Verunreinigungen, zugänglich sind. Bei der „lebenden“ Polymerisation dagegen liegen die Vorteile in den definierten Molekulargewichten und der geringen Polydispersität der Polymere bei gleichzeitiger Kontrolle der Endfunktionalisierung.

Das Prinzip der kontrollierten radikalischen Polymerisation basiert darauf, ein dynamisches Gleichgewicht zwischen einer sehr kleinen Konzentration aktiver wachsender Kettenenden und einer Mehrheit von schlafenden Spezies herzustellen.²³ Durch die starke Absenkung der Konzentration an aktiven Kettenenden sinkt zwar die Wachstumsgeschwindigkeit, aber es gelingt den Kettenabbruch weitgehend zu unterdrücken. Dieses ist darauf zurückzuführen, dass die Geschwindigkeit der Kettenabbruchreaktionen, im Gegensatz zu der der Kettenwachstumsreaktion, von der Konzentration der aktiven Kettenenden zum Quadrat abhängig ist. Da aber weiterhin in geringem Umfang Abbruchreaktionen stattfinden, wird in diesem Zusammenhang von einer kontrollierten, aber nicht von einer lebenden Polymerisation gesprochen.

Die drei wichtigsten Techniken der kontrolliert radikalischen Polymerisation sind die „Nitroxide Mediated Polymerization“ (NMP), die „Atom Transfer Radical Polymerisation“ (ATRP) und der „Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Process“ (RAFT). Daneben gibt es noch andere spezialisiertere Methoden, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Methoden der „Atom Transfer Radical Polymerisation“ und des „Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Process“ angewendet, daher werden ihre Grundlagen ausführlich in zwei eigenen Kapiteln erläutert (siehe 2.2.2 und 2.2.3).

Die Grundlagen der experimentell nicht angewendeten „Nitroxide Mediated Polymerization“ werden im Folgenden kurz skizziert.

Bei der NMP erfolgt die Initiierung der Polymerisation wie bei der freien radikalischen Polymerisation durch einen klassischen Radikalstarter (z.B. AIBN, BPO). Zusätzlich werden lineare oder cyclische Nitroxide als stabile Radikale hinzugegeben. Ein typisches Beispiel ist das 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO). Die stabilen Radikale reagieren reversibel mit den Radikalen der wachsenden Kettenenden unter Bildung von Alkoxyaminen. Bei Temperaturen über 110 °C (TEMPO) kommt es zu einer homolytischen Spaltung des gebildeten Alkoxyamin in das stabile Nitroxidradikal und ein freies Radikal, welches wieder als wachsendes Kettenende fungiert. Über die Temperatur und die Wahl des stabilen Radikals kann das Gleichgewicht auf die Seite der deaktivierten Spezies eingestellt werden, so dass eine Kontrolle über die Polymerisation erlangt werden kann. Das Gleichgewicht ist in Abbildung 2.2-2 dargestellt:

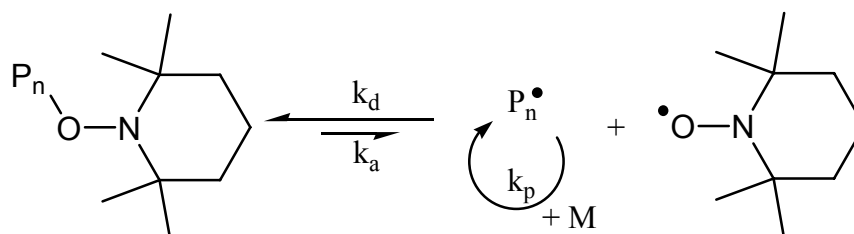


Abbildung 2.2-2: Die „Nitroxide Mediated Polymerization“ am Beispiel des Aktivierungs - Deaktivierungs-Gleichgewichts mit TEMPO als stabiles Radikal.

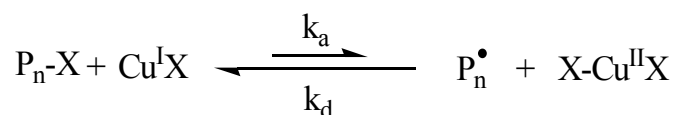
2.2.2 ATRP (atom transfer radical polymerization)

Die „atom transfer radical polymerization“ ist erstmalig 1995 durch Wang und Matyjaszewski beschrieben worden²⁴ und stellt eine Anwendung der in der organischen Chemie bekannten übergangsmetallkatalysierten „atom transfer radical addition“

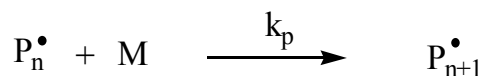
(ATRA)²⁵ auf die Synthese von Polymeren dar. Inzwischen hat sich die ATRP als vielseitige Polymerisationsmethode etabliert und umfasst eine große Anzahl von verschiedenen Übergangsmetallkatalysatoren, Liganden, Initiatoren und Monomeren.²⁶

Die ATRP basiert auf einer starken Absenkung der Konzentration der aktiven Kettenenden in Lösung durch Zugabe eines Katalysators. Durch diese Absenkung werden Nebenreaktionen unterdrückt. Während der Reaktion liegt der Hauptteil der Kettenenden als nicht wachstumsfähige, sogenannte „schlafende Spezies“ vor. Die reversible Aktivierung erfolgt durch den zugegebenen Katalysator. Der Mechanismus der ATRP Reaktion wird unter Einsatz eines Kupferkatalysators in Abbildung 2.2-3 verdeutlicht:

Aktivierung/Deaktivierung:



Kettenwachstum:



Kettenabbruch:

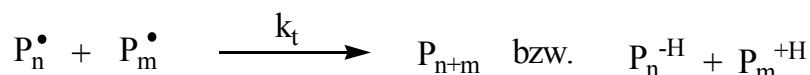


Abbildung 2.2-3: Mechanismus für die kupferkatalysierte ATRP mit Aktivierungs–Deaktivierungsgleichgewicht, Wachstumsschritt und Kettenabbruch.

Die Generierung des aktiven Primärradikals erfolgt durch einen reversiblen Redoxprozess an einem Initiatorhalogenid, wobei üblicherweise α -Halogen-carbonsäureester wie zum Beispiel α -Brompropionsäuremethylester oder α -Bromisobuttersäuremethylester verwendet werden. Die Abspaltung des Halogenids von dem inaktiven Makroradikal wird durch einen Kupfer(I)komplex katalysiert, der dabei durch einen 1-Elektronentransfer zum Kupfer(II)komplex oxidiert. Das Kettenwachstum erfolgt dann durch Anlagerung des Monomers an die aktive Spezies (P_n^\bullet). Durch anschließende Rückübertragung des Halogenids vom Kupfer(II)komplex auf das wachsende Kettenende erfolgt die

Deaktivierung. Daraus resultieren dann wieder ein Kupfer(I)komplex und ein Alkylhalogenid.

Der Nachweis, dass es sich bei diesem Prozess tatsächlich um eine radikalische Polymerisation handelt, ist durch verschiedene Beobachtungen bei Experimenten erbracht worden.

So konnten mittels ESR freie Radikale nachgewiesen werden, obwohl dieses durch die hohe Konzentration an Übergangsmetallen erschwert wurde.²⁷ Gegenüber der konventionellen radikalischen Polymerisation kann keine veränderte Regio- oder Stereoselektivität bei der kontrollierten radikalischen Polymerisation beobachtet werden. Es treten bei der Polymerisation Kopf-Schwanz Verknüpfungen auf,^{28,29} und auch die Taktizitäten entsprechen denen der freien radikalischen Polymerisation.³⁰ Daneben entsprechen auch die Chemoselektivität³¹ und die Reaktivität der aktiven Zentren denen der freien radikalischen Polymerisation.^{32,33}

Die kontrollierte Polymerisation kann auch durch Zugabe eines konventionellen radikalischen Initiators (AIBN, BPO) gestartet werden, wenn der Polymerisation zusätzlich $\text{Cu}^{\text{II}}\text{X}_2$ als Deaktivator zugesetzt wird. In diesem Fall entsteht ein definierteres Produkt. Diese Art der Polymerisation wird „inverse ATRP“ genannt.³⁴

Wie bei der freien radikalischen Polymerisation können auch bei der kontrollierten radikalischen Polymerisation Abbruchreaktionen durch Rekombination und Disproportionierung erfolgen. Dieses geschieht bei letzterer aber nur in sehr geringem Umfang, da die Gesamtkonzentration an den Kettenenden einem dynamischen Gleichgewicht zwischen der schlafenden, inaktiven Spezies ($\text{P}_n\text{-X}$) und der aktiven, wachsenden Spezies ($\text{P}_n\cdot$) unterliegt. Das Gleichgewicht liegt dabei auf der Seite der schlafenden Spezies, was eine nur sehr geringe Konzentration an aktiven Radikalen in der Lösung zur Folge hat (Abbildung 2.2-4).

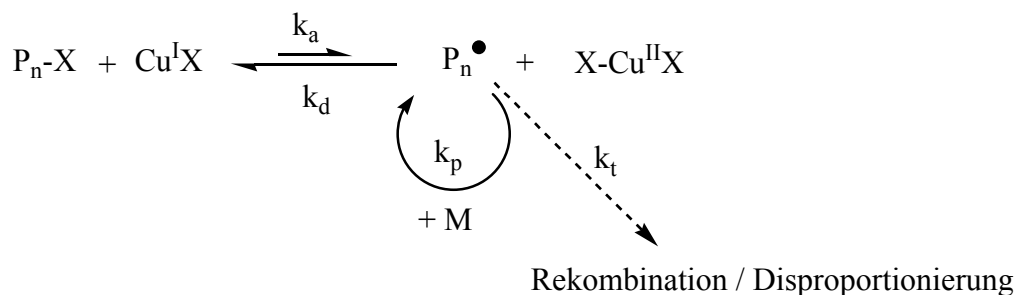


Abbildung 2.2-4: Kupfer katalysierte ATRP mit „persistent radical effect“ (PRE)

Treten irreversible Kettenabbruchreaktionen auf, entsteht dabei zusätzlicher Deaktivator $\text{Cu}^{\text{II}}\text{X}^2$. Dadurch wird das Initiatorgleichgewicht weiter auf die Seite der deaktivierten Spezies verlagert. Dieses hat zur Folge, dass weniger aktive Kettenenden in der Reaktion vorliegen. Damit wird die Polymerisationsgeschwindigkeit (v_p) zwar langsamer, aber die Geschwindigkeit der Kettenabbruchreaktionen (v_t) wird weit stärker zurückgedrängt, da sie bezogen auf die aktiven Kettenenden (P_n^\bullet) eine bimolekulare Reaktion darstellt (Gleichung 2-3).

$$v_p = k_p [\text{P}_n^\bullet] [\text{M}] \qquad v_t = k_t [\text{P}_n^\bullet] [\text{P}_n^\bullet] \qquad (\text{Gl. 2-3})$$

Im Laufe der Reaktion wird eine irreversible Abbruchreaktion immer unwahrscheinlicher, und es kommt zu einem gleichmäßigen Kettenwachstum. Dieser Umstand wird „persistent radical effect“ (PRE) genannt.³⁵

Zu Beginn der Reaktion, und zwar bis zur ausreichenden Bildung des Deaktivators $\text{Cu}(\text{II})$ und der Einstellung des dynamischen Gleichgewichts, gibt es eine kurze unkontrollierte Polymerisationsphase. Die Einstellung des Gleichgewichts zwischen der aktiven Spezies und der schlafenden Spezies kann durch Zugabe von Kupfer(II) beschleunigt werden. Damit wird die Phase des unkontrollierten Wachstums am Anfang der Reaktion vermindert.

Die Polymerisationsgeschwindigkeit (v_p) der Reaktion kann aus der Polymerisationsgeschwindigkeitskonstante (k_p), der Monomerkonzentration (M) und der Anzahl an aktiven Kettenenden (P_n^\bullet) berechnet werden. Die Anzahl der aktiven Kettenenden berechnet sich dabei aus der Initiatorkonzentration (I) und dem Aktivator/Deaktivator Gleichgewicht (Gl. 2-4).

$$v_p = k_p [\text{M}] [\text{P}_n^\bullet] \qquad [\text{P}_n^\bullet]_A = [\text{I}]_0 \frac{k_a [\text{Cu}^{\text{I}}\text{X}]}{k_d [\text{Cu}^{\text{II}}\text{X}_2]} \qquad (\text{Gl. 2-4})$$

Es ergibt sich ein Zusammenhang erster Ordnung zwischen der Polymerisationsgeschwindigkeit und der Konzentration des Monomers, aber auch bezüglich des Initiators und des Kupfer(I)-Komplexes.^{36,37,38,39} Die Reaktionsordnung bezüglich des Kupfer(II)-Komplexes läßt sich auf Grund des PRE-Effektes nur schwierig bestimmen.⁴⁰

Dennoch kann, da Abbruchreaktionen auftreten, und somit die Kupfer(II) Konzentration im Verlauf der Reaktion zunimmt, eine Abweichung von dem linearen Zusammenhang

beobachtet werden. Im Idealfall für kettenlängenunabhängige Abbruchreaktionen bewirkt der PRE-Effekt, dass die semilogarithmische Auftragung des Monomerumsatzes gegen die Zeit zum Exponenten $2/3$ einen linearen Zusammenhang ergibt.⁴⁰ Dennoch ergibt sich meist ein linearer Verlauf bei semilogarithmischer Auftragung gegen die Zeit (Abbildung 2.2-5). Dieses kann durch einen Zusatz an Kupfer(II) zu Beginn der Reaktion, durch die Kettenabhängigkeit der Abbruchreaktion oder durch eine unterschiedlich gute Löslichkeit der Kupfer(I)- und Kupfer(II)-Komplexe in der Reaktion zustande kommen.

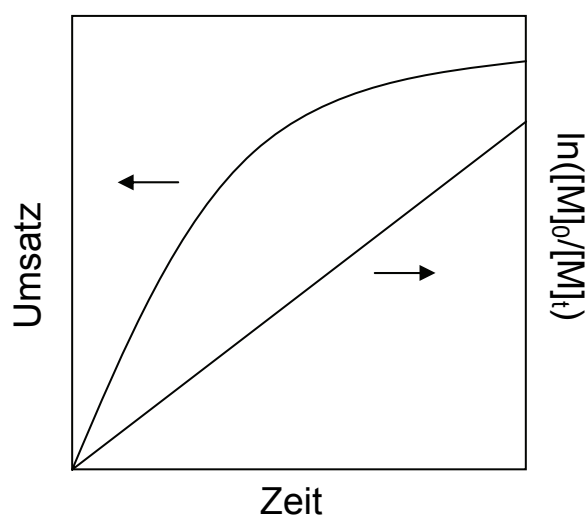


Abbildung 2.2-5: Schematische Darstellung der Abhängigkeit des Umsatzes von der Reaktionszeit bei linearer (links) und semilogarithmischer (rechts) Auftragung während einer kontrolliert radikalischen Polymerisation.

Die Kinetik der Reaktion verändert sich nach der Initiierung aufgrund der spontanen Kupfer(II) Generierung durch den PRE-Effekt, bis sich ein stabiles System gebildet hat. Im Aktivierungsschritt wird für jedes aktive Radikal auch ein Äquivalent der Kupfer(II) Spezies generiert. Ist die Anfangskonzentration des Deaktivators nicht hoch genug, um eine schnelle Deaktivierung ($k_d[\text{Cu(II)}]$) zu gewährleisten, so kommt es im Folgenden zu Abbruchreaktionen von aktiven Radikalen und damit zu einer Zunahme der Kupfer(II) Konzentration.^{35,41} Mit jeder bimolekularen Terminierung entstehen zwei zusätzliche Kupfer(II)salze bis die Konzentration ausreicht, um $k_t[\text{R}\cdot]^2 < k_d[\text{R}\cdot][\text{Cu(II)}]$ zu erfüllen. Wird am Anfang der Reaktion zusätzliches Kupfer(II) hinzugefügt, kann die Terminierung weiter reduziert werden, wobei die Löslichkeit der Kupfer(II)-Spezies in der Reaktion vorausgesetzt wird.^{36,42} Für den Sonderfall, dass die Löslichkeit zu gering ist (heterogenes

System), oder dass der Ligand bei der Komplexbildung der Kupfer(II)-Spezies in Konkurrenz mit dem Monomer oder Initiator steht, muß die effektive Kupfer(II)-Konzentration betrachtet werden. Ist es aufgrund der genannten Sonderfälle nicht möglich, eine effektive Kupfer(II)-Konzentration in Lösung aufzubauen, finden während des gesamten Reaktionsverlaufs Abbruchreaktionen statt.

Der Polymerisationsgrad (P_n) einer kontrollierten radikalischen Polymerisation wird analog zu der einer lebenden Polymerisation durch das Verhältnis des verbrauchten Monomers zum effektiven Initiator beschrieben (Gleichung 2-5).

$$P_n = [M_0 - M_t] / [I]_{\text{eff}} \quad (\text{Gl. 2-5})$$

Bis zu einer oberen Grenze von etwa 150000 g/mol können relativ leicht Polymere mit enger Verteilung aufgebaut werden.

Die Polydispersität liegt bei der ATRP im Normalfall zwischen 1.1 und 1.5. Unter der Voraussetzung, dass durch den PRE-Effekt die Abbruchreaktionen gegen Null gehen, und ein schnelles Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Deaktivierung entsteht, lässt sich die Polydispersität durch die Gleichung 2-6 beschreiben:

$$\frac{M_w}{M_n} = 1 + \left(\frac{([RX]_0 - [RX]_t) k_p}{k_d [Cu^{II} X_2]} \right) \left(\frac{2}{p} - 1 \right) \quad (\text{Gl. 2-6})$$

Dabei ist die Polydispersität abhängig von der Anfangskonzentration des Initiators $[RX]_0$, der Konzentration des Deaktivators $[Cu^{II} X_2]$, dem Umsatz des Monomers (p) und von der Wachstumsgeschwindigkeits- (k_p) und der Deaktivierungskonstante (k_d).⁴³ Daher ist es möglich, die Polydispersität durch die Lage des Aktivierungs-Deaktivierungs-Gleichgewichts mittels Absenken der Konzentration der aktiven Kettenenden zu beeinflussen. Gleiches kann auch durch Katalysatoren, die ein wachsendes Kettenende schneller deaktivieren, erreicht werden. Auch eine Zugabe von Deaktivator (Cu(II)) zu Beginn der Reaktion kann die Polydispersität senken, da sich so die anfängliche Phase der unkontrollierten Polymerisation maßgeblich verringern lässt. Allerdings sinkt dadurch die Polymerisationsgeschwindigkeit. Im Gegensatz dazu führt die Zugabe von metallischem Kupfer (Cu^0) zu einer Erhöhung der Polymerisationsgeschwindigkeit auf Kosten der Polydispersität. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Deaktivator (Cu(II)) durch Komproportionierung wieder zum Aktivator (Cu(I)) regeneriert wird.⁴⁴

Wie gezeigt wurde, haben die Katalysatoren einen großen Einfluß auf die Polymerisation. In der Regel werden hierzu Übergangsmetallkomplexe eingesetzt. Das Übergangsmetall muß mindestens zwei zugängliche Oxidationsstufen besitzen, die durch einen 1-Elektronenübergang getrennt sind, um den erforderlichen Redoxprozeß zu durchlaufen. Desweiteren sollte eine ausreichende Affinität zu Halogeniden vorliegen und eine starke Bindung zum chelatisierenden Ligand vorhanden sein, damit eine Freisetzung der Metalle während der Reaktion unterbleibt.⁴⁵

Es sind eine Reihe von verschiedenen Übergangsmetallen wie zum Beispiel Molybdän, Eisen, Nickel und Palladium für die Katalyse von ATRP Reaktionen getestet worden.⁴⁶ Allerdings haben sich in der Breite des Anwendungsspektrums hinsichtlich der zu polymerisierenden Monomere und hinsichtlich der Toleranz von funktionellen Gruppen und Lösungsmitteln die Kupferkatalysatoren als überlegen herausgestellt.

Der chelatisierende Ligand im Katalysatorkomplex dient zur Feinabstimmung des Redoxpotentials und zur Verbesserung der Löslichkeit der Kupfersalze im Reaktionsmedium.^{47,48} Das Redoxpotential legt die Lage und die Dynamik des Halogenaustauschgleichgewichts fest. Damit soll gewährleistet werden, dass das Gleichgewicht zwischen aktiver und deaktivierter Spezies auf der Seite der deaktivierten Form liegt. Gleichzeitig soll ein schneller Austausch zwischen der Aktivierung und der Deaktivierung der wachsenden Kettenenden stattfinden, damit gleichmäßiges Wachstum stattfindet.

Für die Polymerisation mit Kupferkatalysatoren eignen sich insbesondere mehrzählige Liganden mit Stickstoff als koordinierendem Atom.⁵⁰ Einige verwendete Ligandenklassen sind Phenanthroline,⁴⁹ Pyridine, Pyridinimine und aliphatische Amine.

Elektronische und sterische Effekte der Liganden üben einen großen Einfluß auf die Aktivität von Katalysatoren aus.⁵⁰ Die Effektivität der Katalysatoren wird durch den sterischen Anspruch der Liganden und durch elektronenziehende Substituenten an diesem verringert. Nach einem allgemeinen Schema zur Aktivität von Stickstoffliganden nimmt diese mit der sinkenden Anzahl der Koordinationszentren $N_4 > N_3 > N_2 >> N_1$ und der steigenden Anzahl der verbrückenden Kohlenstoffatome $C_2 > C_3 >> C_4$ ab. In Abbildung 2.2-6 werden einige Strukturen von Liganden, die in dieser Arbeit verwendet wurden, vorgestellt.

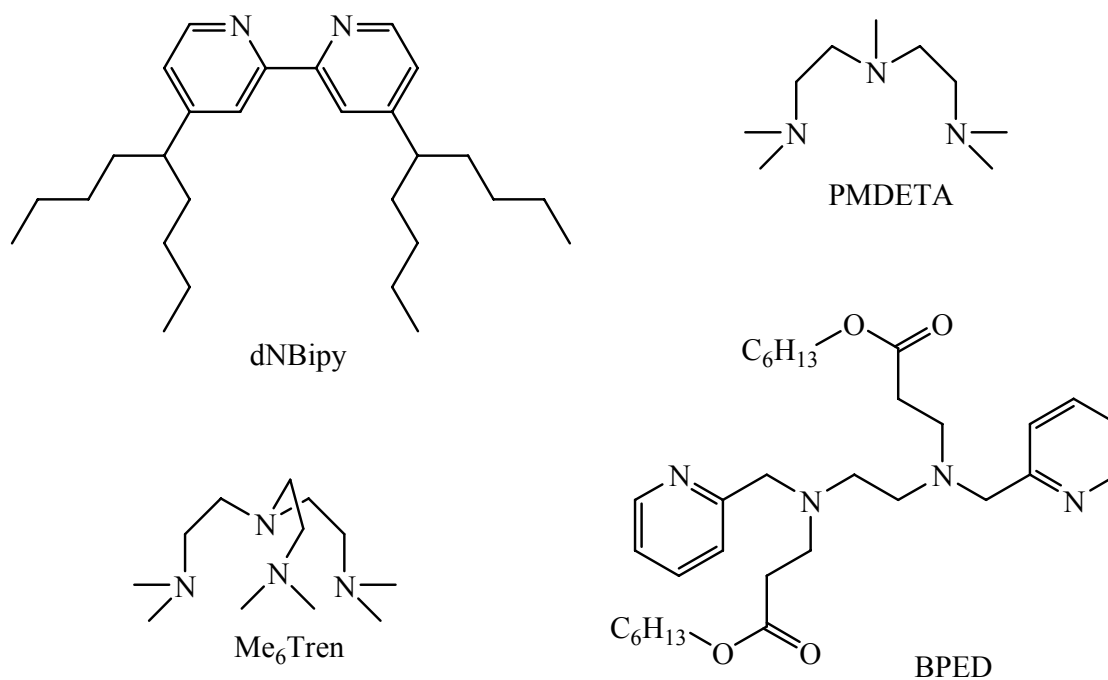


Abbildung 2.2-6: Strukturen von Liganden für die kupferkatalysierte ATRP. dNBipy (4,4'-di-5-nonyl-2,2'-dipyridyl), PMDETA (N,N,N',N'',N'''-pentamethyl-diethyltriamin), Me₆TREN (Tri[2-(dimethylamino)ethyl]amin), BPED (N,N',-di(pyridin-2-ylmethyl 3-hexoxo-3-oxopropyl)ethan-1,2-diamin).

Die Strukturen der gebildeten Katalysatorkomplexe sind abhängig von den eingesetzten Liganden und den Übergangsmetallen. Hierzu soll die Koordinationschemie von Kupfer näher betrachtet werden. Kupfer(I) bevorzugt die tetrahedrische oder die quadratisch-planare Anordnung. Mit einem vierzähligen Liganden oder mit zwei zweizähligen Liganden werden kationische Komplexe gebildet. Dreizählige Liganden hingegen bilden neutrale Komplexe aus.

Kupfer(II) dagegen formt mit einem vierzähligen bzw. zwei zweizähligen Liganden unter Einbindung eines Halogens eine trigonal bipyramidale Struktur mit positiver Ladung. Dreizählige Liganden formen hingegen neutrale, quadratisch pyramidale Komplexe mit zwei Halogenidliganden. Dabei ist die axiale Cu–X Bindungen im Vergleich zum Cu(I)-Komplex verlängert. In Abbildung 2.2-7 sind einige Beispielkomplexe dargestellt.

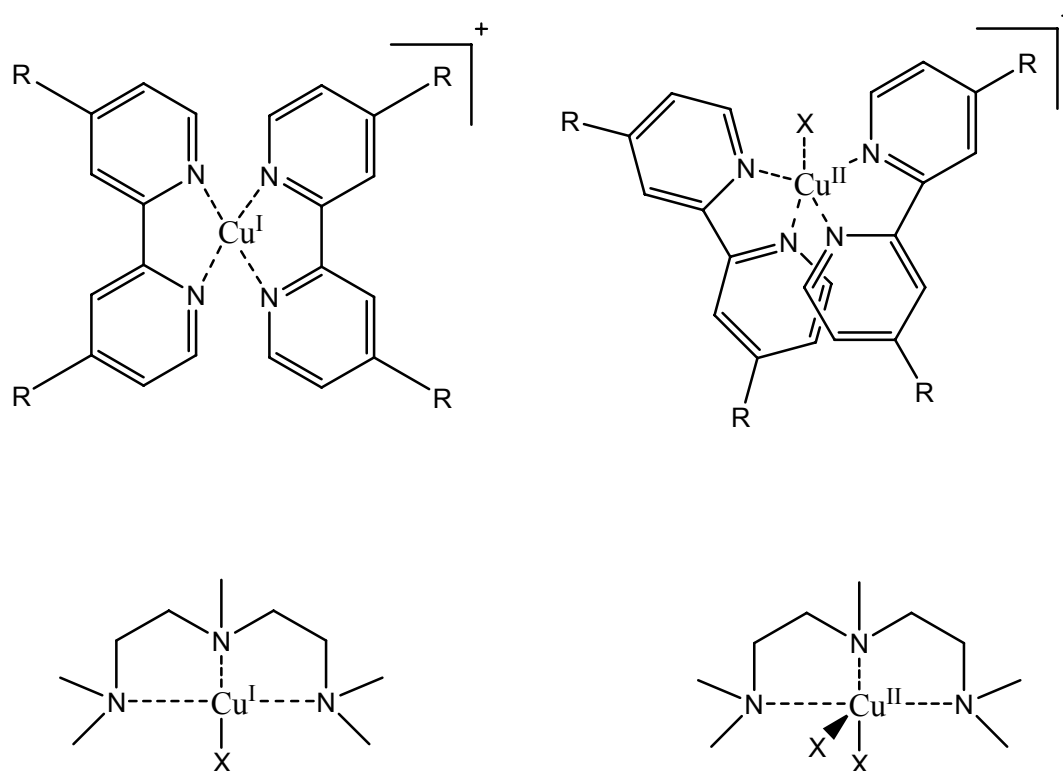


Abbildung 2.2-7: Einige Kupferkomplexe mit zwei bzw. dreizähligen Liganden und Zentralatom in verschiedenen Oxidationsstufen

Die Strukturen der katalytisch aktiven Komplexe sind bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Nach bisherigen Erkenntnissen sind diese abhängig von der Polarität des Lösungsmittels.⁵¹ Zudem finden während der Reaktion ein schneller Austausch und eine Reorganisation der Liganden statt.⁵² Einige Möglichkeiten hierzu sind von *Matyjaszewski et al.* postuliert worden.⁵³

Es sind viele Katalysatoren und Reaktionsbedingungen erforscht und in Übersichtsartikeln^{26,54,55} zusammengefasst worden. Die kontrolliert radikalische Polymerisation per ATRP ist sehr tolerant gegenüber funktionellen Gruppen und erlaubt eine breite Variation an Reaktionsparametern. Bei der ATRP unter Zusatz von Peptiden besteht allerdings die Möglichkeit, daß es zu Wechselwirkungen zwischen den Peptiden und den Katalysatoren kommen kann, ähnlich wie bei der Polymerisation von Acrylamid.

2.2.3 RAFT (Reversible addition fragmentation chain transfer polymerisation)

Eine weitere Methode zur kontrollierten radikalischen Polymerisation ist die RAFT-Polymerisation. Bei dieser wird ein sogenannter Überträger oder Transferreagenz zugesetzt, welches in der Lage ist, das Radikal zu stabilisieren und zu übertragen. Als Überträger haben sich die Dithioesterderivate (Abbildung 2.2-8) weitestgehend gegenüber den Dithiocarbamaten und Trithiocarbamaten durchgesetzt.

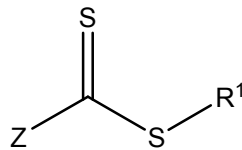


Abbildung 2.2-8: Allgemeine Struktur eines als Überträger eingesetzten Dithioesters

Wie bei der freien radikalischen Polymerisation erfolgt die Initiierung der RAFT-Polymerisation durch den Zusatz einer geringen Menge (5 - 10 Mol% bezogen auf den Überträger) eines Radikalstarters. In Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur können dies Azo- oder Peroxidinitiatoren sein. Die Bildung der freien Radikale erfolgt kontinuierlich über den gesamten Zeitraum der Polymerisation.

In Abbildung 2.2-9 ist der zurzeit diskutierte Mechanismus der Polymerisation dargestellt. Zunächst erfolgt der Zerfall des Radikalstarters unter Bildung von zwei Primärradikalen (1). Anschließend addiert sich Monomer an das wachsende Kettenende an (2), bis es zu einer Addition an einen Dithioester kommt. In diesem Fall kann eine Übertragung des Radikals auf ein anderes Kettenende erfolgen (3). An diesem gebildeten Radikal (P_m) erfolgt wiederum die Addition von Monomer, bis es zu einer Reaktion mit einem Überträger kommt (4). Mit welcher Wahrscheinlichkeit es zu einer Übertragung auf ein anderes Kettenende im Transferschritt kommt, wird später in diesem Abschnitt ausführlich diskutiert. Das Auftreten von bimolekularen Abbruchreaktionen, wie der Rekombination zweier wachstumsfähiger Makroradikale, ist durch die geringe Konzentration an freien Radikalen unwahrscheinlich, muß aber dennoch berücksichtigt werden.

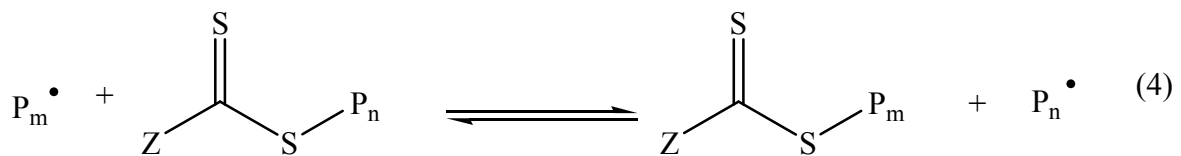
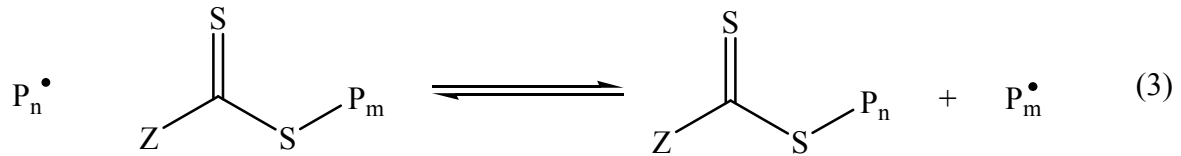
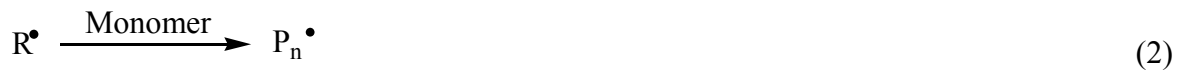


Abbildung 2.2-9: Mechanismus der RAFT-Polymerisation

Für ein gleichmäßiges Wachstum der Polymerketten ist eine hohe Übertragungsgeschwindigkeit des wachsenden Kettenendes im Vergleich zur Kettenwachstumsgeschwindigkeit notwendig. Die Übertragungsgeschwindigkeit kann durch eine Aktivierung der Thionylgruppe kontrolliert werden. Die Aktivierung der C=S Doppelbindung kann durch Einführung von Aryl-, Alkyl- oder Benzylgruppen an der Z-Position erfolgen.

Die Abgangsgruppe R des Überträgers muß in der Lage sein, das Radikal zu stabilisieren, um eine vergleichbare oder bessere Abgangsgruppe als das gebildete Initiatorradikal darzustellen. Zudem sollte es aktiv genug sein, um schnell mit einem Monomer zu reagieren. In Abbildung 2.2-10 ist das Gleichgewicht der Übertragung des wachsenden Kettenendes an einem Überträger dargestellt.

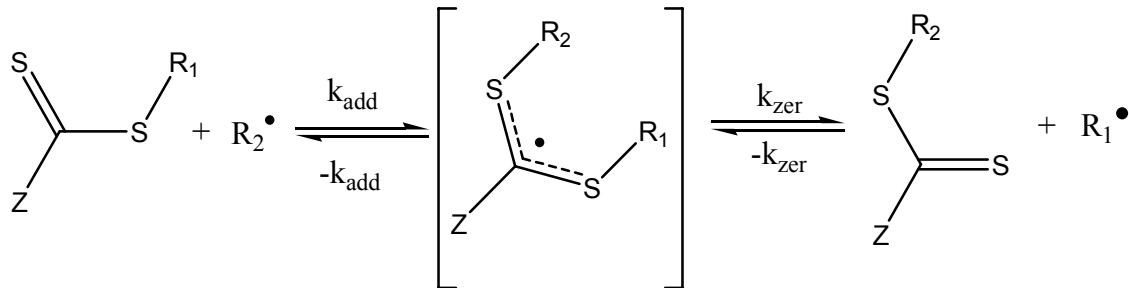


Abbildung 2.2-10: Gleichgewicht der Übertragung bei der Radikaltransferpolymerisation mit Zwischenprodukt

Aus der Bildung und dem Zerfall des Radikals mit der Dithioesterverbindung läßt sich die Geschwindigkeitskonstante k_{tr} berechnen.

$$k_{tr} = k_{add} \frac{k_{zer}}{k_{-add} + k_{zer}} \quad (\text{Gl. 2-7})$$

Sieht man vom ersten Übertragungsschritt ab, ist die Wahrscheinlichkeit, in welche Richtung das gebildete Intermediat zerfällt, gleich, da in beiden Fällen die Polymerketten, bis auf die Kettenlänge, die gleiche Struktur aufweisen. Dieses vereinfacht die Formel für die Geschwindigkeitskonstante k_{tr} und beinhaltet, dass diese unabhängig von der Geschwindigkeitskonstante der Fragmentation ist (Gleichung 2-8).

$$k_{tr} = 0.5 k_{add} \quad (\text{Gl. 2-8})$$

Die Übertragungsrate v_{tr} läßt sich aus der Geschwindigkeitskonstanten der Übertragung k_{tr} , der Konzentration an aktiven Kettenenden und der Konzentration des Überträgers folgendermaßen berechnen (Gleichung 2-9).

$$v_{tr} = k_{tr} [P_n^\bullet] [\text{Überträger}] \quad (\text{Gl. 2-9})$$

Die RAFT-Polymerisation hat gegenüber der ATRP bei der Synthese von bioorganisch-synthetischen Konjugaten Vorteile. Es ist davon auszugehen, daß zwischen Dithioestern und Peptiden eine geringere Wechselwirkung besteht als zwischen Übergangsmetallen basierenden ATRP-Katalysatoren und Peptiden. Zudem sind viele Übergangsmetalle

toxisch und müssen bei einem möglichen Einsatz in vitro aufwendig entfernt werden. Diese Probleme entfallen bei der RAFT-Polymerisation.

2.3 Peptide

2.3.1 Aufbau und Struktur von Peptiden

Peptide gehören zu den Grundbausteinen des Lebens und kommen in allen Zellen und Zellbestandteilen vor. Sie sind unentbehrlich für den Aufbau und die Funktion lebender Organismen.

Peptide sind Makromoleküle, die aus Aminosäuren aufgebaut sind. Es sind zwanzig Standardamino­säuren bekannt sind. Neben diesen gibt es andere, seltenere Aminosäuren, die durch Modifikation der Standardamino­säuren in Polypeptiden entstehen. Bis auf wenige bekannte Ausnahmen, z.B. in einigen Bakterienzellwänden, liegen alle natürlichen Aminosäuren in der L-Konfiguration vor.

Die Aminosäuren lassen sich anhand ihrer Seitenketten klassifizieren (Abbildung 2.3-1). Es wird zwischen unpolaren, aliphatischen (hydrophoben), polaren, ungeladenen oder basisch bzw. sauren Aminosäureseitenketten unterschieden.

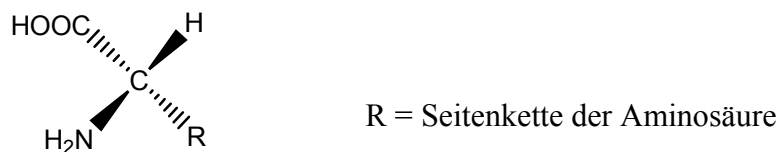


Abbildung 2.3-1: Allgemeine Struktur der Aminosäuren

Die Aminosäuren sind durch Peptidbindungen (Amidbindungen) miteinander verknüpft. Sie entstehen durch Kondensation einer α -Aminfunktion mit der α -Carboxyfunktion. Die Peptidbindung besitzt mit 132 pm einen relativ kurzen Bindungsabstand, da sie durch ihre Resonanzstruktur einen anteiligen Doppelbindungscharakter besitzt (Rotationsbarriere: 88 kJ/mol). Die Rotationsmöglichkeiten der Bindung sind daher beschränkt und die Konformation ist nahezu planar.

Die Proteinstruktur lässt sich mit Hilfe von vier Hierarchieebenen beschreiben. Die Primärstruktur beschreibt alle kovalenten Bindungen, hauptsächlich Peptidbindungen, aber auch Disulfidbrücken, und gibt die Aminosäuresequenz wieder. Damit werden die Wechselwirkungsmöglichkeiten und folglich die Bildung weiterer Überstrukturen festgelegt.

Die Sekundärstruktur beschreibt die durch nicht kovalente Wechselwirkungen stabilisierte Konformation der Aminosäurekette innerhalb des Peptids. Innerhalb der

Segmentanordnung werden definierte Bereiche in Helix-, Faltblatt- oder Schleifenkonformation unterschieden (Abbildung 2.3-2).

Anhand der möglichen Rotationswinkel der N-C α - und der C α -C-Bindung sind die sich daraus ergebenden theoretischen Sekundärstrukturen berechnet und nach Ramachandran in einem Diagramm graphisch dargestellt worden.

Das häufigste sekundäre Strukturelement ist die α -Helix. Sie kommt in der Natur ausschließlich in der rechtsgängigen helikalen Struktur vor. Ein prominentes Beispiel ist das α -Keratin, welches für die feste Struktur z.B. von Haaren, Fingernägeln oder Stacheln verantwortlich ist.

Die Stabilität der α -Helix kommt durch die optimale Ausnutzung der innermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen im Peptidsegment zustande. Eine Windung wird aus 3,6 Monomeren gebildet, ist über Wasserstoffbrücken mit der vorherigen verbunden und hat entlang der Längsachse eine Länge von 0,54 nm pro Windung. In Helixkonformation besitzen Peptide ein von der Länge der Helix abhängiges Dipolmoment, welches sich aus den Dipolen der einzelnen Peptidbindungen zusammensetzt. Zum Ausgleich des Dipolmoments befinden sich oft negativ geladene Aminosäuren am N-Terminus und positiv geladene Aminosäuren am C-Terminus. Eine Besonderheit stellt die linksgängige Kollagenhelix mit 3 Aminosäuren pro Windung dar.

Eine weitere Sekundärstruktur ist das β -Faltblatt, mit zwei Varianten. Die Peptidketten sind dabei parallel oder antiparallel zu einander angeordnet (Abbildung 2.3-2). Die Wiederholungseinheit (2 Aminosäuren) der parallelen Konformation ist mit 0,65 nm etwas kürzer als die der antiparallelen Konformation mit 0,70 nm.

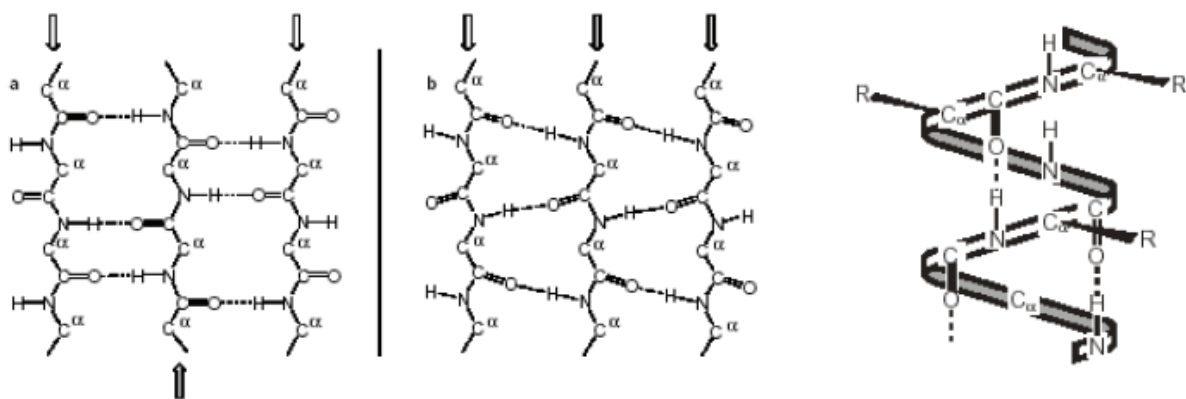


Abbildung 2.3-2: Beispiel für Sekundärstrukturen: antiparalleles - und paralleles Faltblatt, α - Helix

Werden die Wasserstoffbrücken durch äußere Einflüsse zerstört oder ist aufgrund der Primärstruktur eine Ausbildung von definierten Sekundärstrukturen nicht möglich, so liegt eine statistische Kettensegmentanordnung vor. Das Aufbrechen der Wasserstoffbrücken kann auch gezielt durch eine Temperaturerhöhung oder einen Einfluß von stark sauren Reagenzien z.B. Dichloressigsäure oder Trifluoressigsäure herbeigeführt werden.

Als Tertiärstruktur wird die Anordnung von Sekundärstrukturen in einem dreidimensionalen Raum bezeichnet. Diese zu beschreiben ist notwendig, da auch Sekundärstrukturelemente räumlich benachbart sein können, die nach der Primärstruktur weit von einander entfernt liegen.

Die Quartärstruktur beschreibt die Anordnung von mehreren separaten Peptidketten, zum Beispiel die aus drei Peptidketten bestehende Kollagen Trippelhelix.

2.3.2 Synthese von Peptiden

Um ein gewünschtes Peptid zu synthetisieren, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Ein Weg ist der Einsatz von gezielt veränderten E.coli Bakterien oder Hefezellen. Durch gezielte genetische Veränderung produzieren diese Zellen das Peptid. Das so gebildete Proteinprodukt kann bis zu 10% der Peptide in der Zelle ausmachen. Ein anderer Ansatz ist die Synthese von Peptiden an einem festen Träger, eine Methode, die 1962 von R.B. Merrifield vorgeschlagen und für die er 1984 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde. Ihm gelang es auf diese Weise, in kurzer Zeit ein Oligopeptid mit definierter Aminosäuresequenz in hoher Reinheit zu synthetisieren. Da dieses einen enormen Fortschritt darstellte, hat sich die Festphasen gebundene Synthese von Peptiden als vorherrschende Methode für die Synthese von Oligopeptiden mit bis zu 40 Aminosäuren durchgesetzt.

Bei der Peptidsynthese an Festphase erfolgt schrittweise ein Aufbau des Peptids durch einzelne Aminosäuren. Zunächst wird eine Aminosäure am N-Terminus durch eine Schutzgruppe geschützt. Anschließend wird die geschützte Aminosäure nach vorheriger Aktivierung an einen Träger gekuppelt. Ein klassischer Träger besteht aus einem mit 1% Divinylbenzol vernetzten Polystyrolmikrogel der Größenordnung 38 – 300 µm. Das Mikrogel wird mit einem Linker modifiziert, an dem das Peptid ausgehend vom C-Terminus zum N-Terminus aufgebaut wird. Nach der Kupplung können die Kupplungsreagenzien durch Waschen entfernt werden, da das aufzubauende Peptid an das

Trägermaterial gebunden ist. Dieses ist der Vorteil der Synthese an Festphase gegenüber der Synthese in Lösung. Es können hohe Überschüsse bei der Kupplung verwendet werden, da diese nach der Kupplung durch Waschen leicht wieder zu entfernen sind. In einem nächsten Schritt erfolgt erneut die Kupplung einer Aminosäure. Durch die sich wiederholenden Arbeitsschritte (kuppeln – waschen – kuppeln) ist es möglich, die Synthese zu automatisieren.

Die Effizienz der Kupplung liegt in der Regel über 99%. So ist es möglich, in einigen Tagen ein Peptid aus 100 Aminosäurebausteinen zu synthetisieren und durch Chromatographie zu reinigen. Es bleibt zu erwähnen, dass ein Bakterium für die Synthese desselben Peptids lediglich 5 Sekunden bei höherer Präzision benötigen würde.⁵⁶ In Abbildung 2.3-1 ist die Struktur eines Peptids am Harz gezeigt.

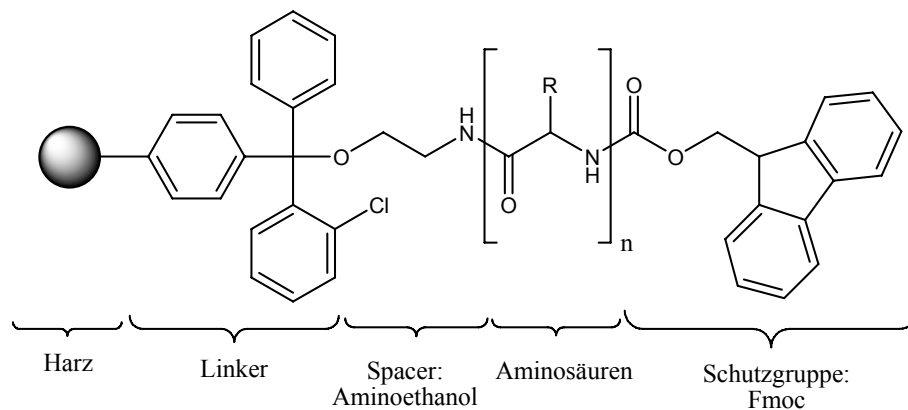


Abbildung 2.3-1: Schematischer Aufbau eines Trägermaterials für die Peptidsynthese. Harz mit 2-Chlortrityllinker, Aminoethanol Spacer und einer am N-Terminus mit 9-Fluorenylmethoxycarbonyl geschützten Aminosäure.

Funktionelle Seitenketten der Aminosäuren und der N-Terminus werden reversibel geschützt, um Nebenreaktionen bei der Kupplung zu vermeiden.

Bei der Festphasen gebundenen Synthese existieren zwei Schutzgruppenstrategien; zum einen gibt es die ^tBoc/Benzyl-Kombination, welche auf Merrifield zurück geht. Dabei wird der N-Terminus reversibel mit einer *tert*-Butoxycarbonyl (^tBoc) Gruppe geschützt. Die Entschützung erfolgt durch 20- bis 50%ige Trifluoressigsäure. Die funktionellen Gruppen der Seitenketten werden hingegen durch Benzylgruppen geschützt und sind unter den für die ^tBoc Abspaltung notwendigen Bedingungen stabil. Die Abspaltung der Schutzgruppen der Seitenketten und des Peptids vom Harz erfolgt durch Fluorwasserstoff.

Die andere Strategie besteht aus der Kombination der 9-Fluorenylmethoxycarbonyl - und *tert*-Butylschutzgruppe. Sie wurde 1970 von Carpino eingeführt. In Abbildung 2.3-2 ist der Prozeß des Peptidaufbaus mit dieser Methode an Festphase dargestellt.

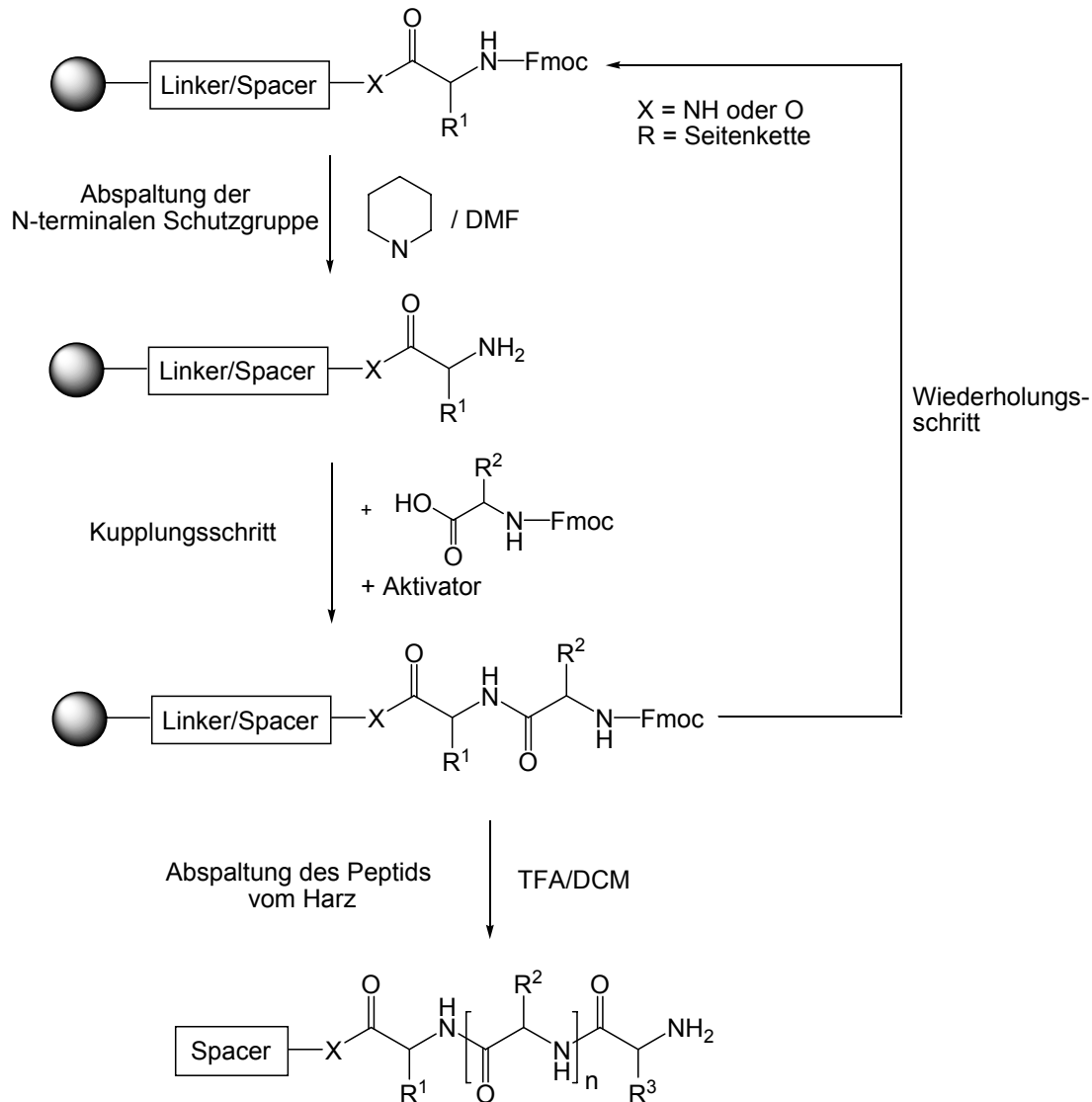


Abbildung 2.3-2: Reaktionsschema der Festphasen gebundenen Peptidsynthese.

Die Verwendung der Kombination der Fmoc- und *tert*-Butylschutzgruppe beruht auf einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie, da die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe unter basischen Bedingungen und die Abspaltung des Peptids bzw. die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppe unter sauren Reaktionsbedingungen durchgeführt wird. Desweiteren erlaubt die Verwendung der Fmoc-Schutzgruppen das Quantifizieren der Kupplung. Bei der Abspaltung der Fmoc-Gruppe mit Piperidin bildet sich als UV-

Chromophor das Dibenzofulven-Piperidin Addukt (Abbildung 2.3-3), dessen Konzentration spektrometrisch bei 301 nm beobachtet werden kann.

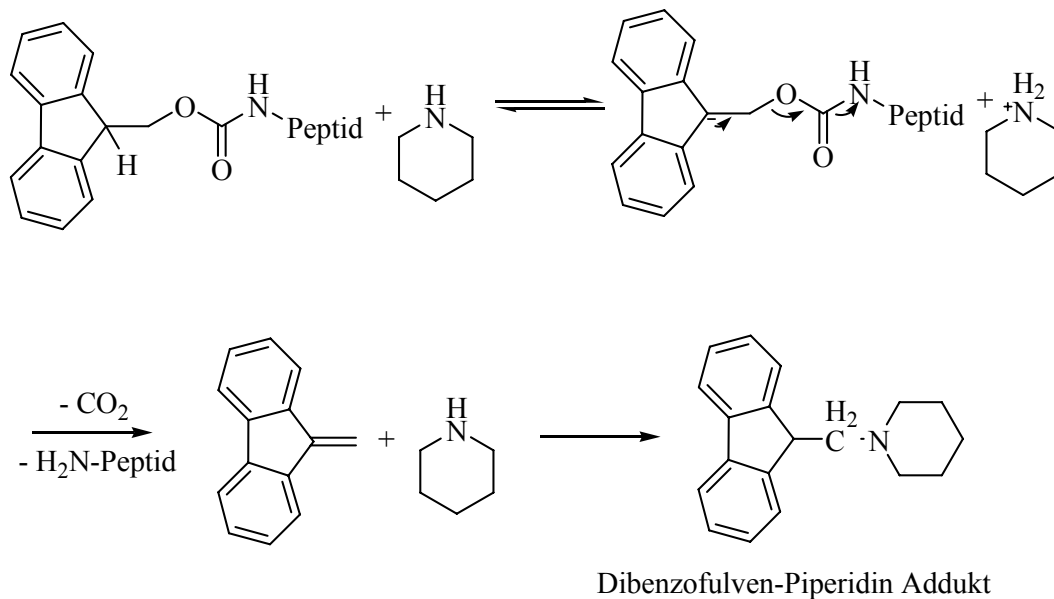


Abbildung 2.3-3: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin unter Bildung des Dibenzofulven-Piperidin Addukts.

Die Kupplung der Aminosäuren erfolgt durch Umsetzung der terminalen Aminogruppe des Festphasen gebundenen Peptids mit der Carbonsäure der freien Aminosäure. Eine direkte Umsetzung der Carbonsäuren mit Aminen ist bei Raumtemperatur nur sehr langsam möglich, da sich ein entsprechendes Salz bildet. Daher wird die Säuregruppe zunächst in einen reaktiveren Ester überführt. Für die Kupplung von Aminosäuren sind hierzu verschiedene Reagenzien entwickelt worden. Die Reaktivität der gängigsten Kupplungsreagenzien läßt sich wie folgt einordnen: DCC/HOBt < PyBOP < HBTU < HATU. Die dazugehörigen Strukturen sind in Abbildung 2.3-4 dargestellt.

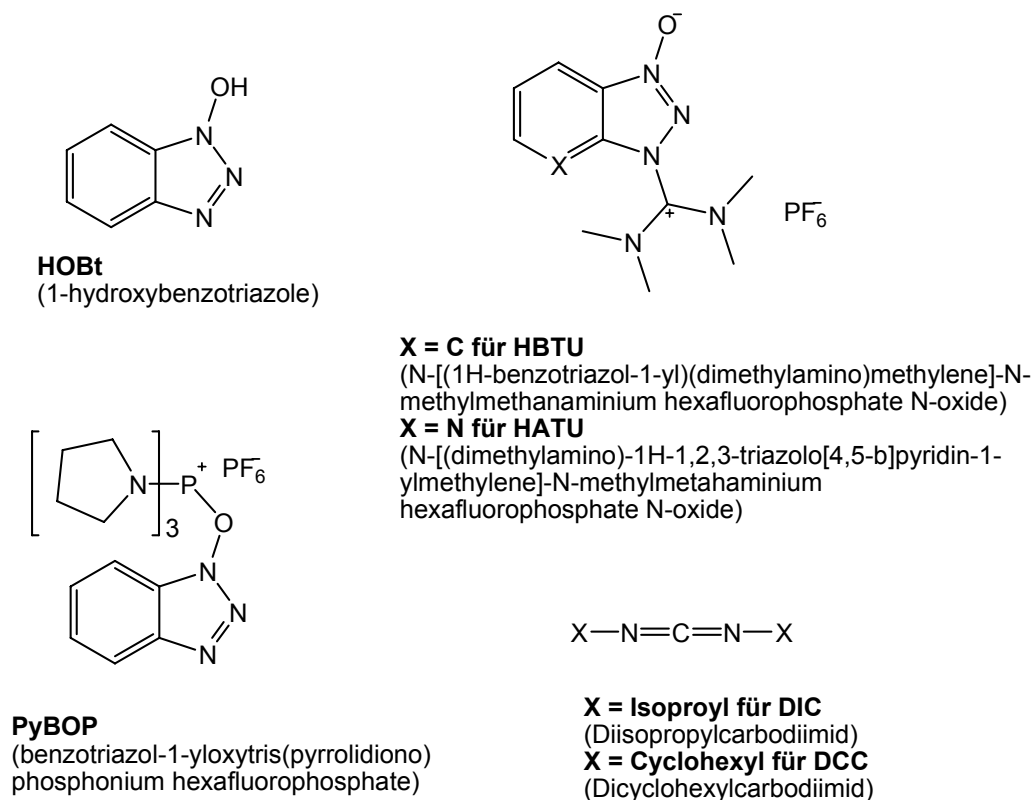


Abbildung 2.3-4: Reagenzien zur Aktivierung von Carbonsäuren bei der Peptidsynthese

Bei den eingesetzten Aktivierungsreagenzien wird als Aktivester für die Aminosäurekupplung ein 1-N-Benzotriazolester erhalten. Lediglich bei dem Einsatz von HATU entsteht stattdessen ein 1-N-7-Azabenzotriazolester.

Für die Kupplung mit DIC/HOBt ist der Mechanismus in Abbildung 2.3-5 dargestellt. Zunächst erfolgt eine Kupplung der Aminosäure an das Aktivierungsreagenz. Anschließend erfolgt eine nucleophile Substitution durch das HOBt-Anion zu dem gewünschten Aktivester.

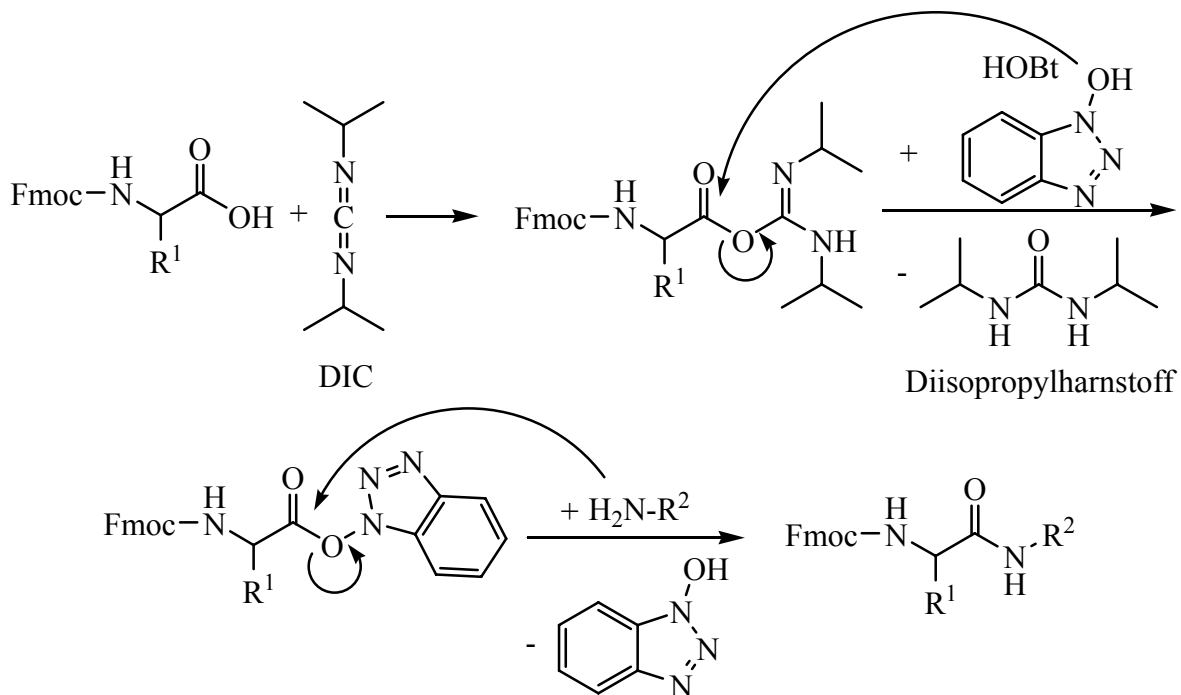


Abbildung 2.3-5: Aktivierung einer Aminosäure mit DIC/HOBT und anschließende Kupplung

Die Synthese von sehr langen Aminosäuresequenzen oder bestimmter Sequenzen, wie längeren Alaninsequenzen, ist problematisch, da Mikroaggregation der wachsenden Peptidketten auftritt. Dadurch sind nicht mehr alle Kettenenden zugänglich und es kommt zu unvollständigen Kupplungen oder Entschützungen. Dieses bedingt Fehlstellen in der Peptidsequenz und letztendlich findet keine Kupplung mehr statt. Die Aggregation wird durch das Ausbilden von Wasserstoffbrückenbindungen gefördert.

Die Festphasen gebundene Peptidsynthese ist eine sehr gute Methode, um eine große Vielfalt an verschiedenen Peptiden mit definierter Sequenz in kurzer Zeit herzustellen. An ihre Grenzen kommt diese Methode bei großen Peptiden oder aber bei komplizierten Sequenzen, wie zum Beispiel bei Alanin Multimeren.

3. Charakterisierungsmethoden

3.1 Polymercharakterisierung

3.1.1 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) oder Größenausschlußchromatographie (size exclusion chromatography, SEC) ist die am häufigsten angewandte Methode zur Bestimmung von Molekulargewichten und Molekulargewichtsverteilungen von Polymeren. Bei der Gelpermeationschromatographie erfolgt die Trennung nicht wie bei der Affinitätschromatographie durch Adsorption der Moleküle an einer stationären Phase, sondern durch ein Diffusionsgleichgewicht zwischen den Molekülen in der mobilen Phase und in den Poren des Säulenmaterials. Als stationäre Phase wird meist ein vernetztes Polymergel verwendet.

Die Trennung von Polymeren an den Poren erfolgt nach dem hydrodynamischen Radius. Im Idealfall treten nur entropische und keine enthalpischen Wechselwirkungen zwischen Polymermolekülen und Säulenmaterial auf. Übersteigt der hydrodynamische Radius der Makromoleküle den Durchmesser der Poren, so werden diese als sogenanntes oberes Ausschlußvolumen V_0 eluiert. Eine Trennung ist ab diesem Molekulargewicht nicht mehr möglich. Kleinere Moleküle diffundieren, abhängig von ihrem hydrodynamischen Radius, in die Poren hinein und verweilen damit länger auf der Säule. Das Elutionsvolumen V_e , bei dem die Moleküle eluieren, lässt sich berechnen nach:

$$V_e = V_0 + k_{GPC} \cdot V_i \quad (\text{Gl. 3-1})$$

Dabei ist k_{GPC} der Verteilungskoeffizient und V_i das Volumen innerhalb der Poren. Die Detektion der Polymerkonzentration in der flüssigen Phase erfolgt als Funktion der Zeit bzw. des Elutionsvolumens.

Als Standarddetektoren werden dabei ein Differentialrefraktometer (RI) zur Bestimmung des Brechungsindex und ein UV-Detektor verwendet. Letzterer setzt eine UV-aktive Gruppe in dem Molekül voraus. Als weiterer Detektor kann ein Viskosimeter eingesetzt werden. Bei dem RI-Detektor ist die Intensität des Signals proportional zur Konzentration und Masse des Polymers in der mobilen Phase. Bei der UV-Detektion kann die Absorption in zwei verschiedenen Modi erfolgen. Im Falle eines UV-aktiven Monomers wird ein

massenproportionales Signal (z.B. für PS $\lambda = 260$ nm) erhalten werden; liegt dagegen eine UV-aktive Endgruppe vor ist das Absorptionssignal proportional zur Endgruppe.

Bei der Bestimmung von Molekulargewichten mittels GPC ist eine Eichung erforderlich, da es sich um eine Relativmethode handelt. Erst danach lassen sich dem Elutionsvolumen entsprechende Molekulargewichte zuordnen. Die Eichung erfolgt mittels engverteilter Polymerstandards, deren Molekulargewichtsmittelwerte durch Absolutmethoden (Osmometrie, Lichtstreuung) bestimmt wurden. Das auf diese Weise ermittelte Elutionsvolumen wird als Funktion des Molekulargewichts M bzw. Polymerisationsgrads N dargestellt. Durch Interpolation mit Polynomen höherer Ordnung erhält man eine Eichkurve für das vermessene Polymer. Von unbekanntem Proben dieses Polymers können dann mit Hilfe der Eichkurve die Mittelwerte der Molekulargewichte und die Polydispersität ermittelt werden.

Prinzipiell muß für jedes Homopolymer eine spezielle Eichkurve erstellt werden. Dieses ist jedoch aus Mangel an geeigneten Polymerstandards nur selten möglich. Eine Abhilfe bietet die Erstellung von Eichkurven mittels universeller Kalibrierung, welche auf der Trennung der Polymeren mittels des hydrodynamischen Volumens V_h basiert. Besitzen zwei Polymere unter gleichen apparativen Bedingungen das gleiche Elutionsvolumen, so sind ihre hydrodynamischen Volumina identisch.

Nach der Fox-Flory Beziehung ist das hydrodynamische Volumen mit dem Molekulargewicht M und der intrinsischen Viskosität $[\eta]$ verknüpft.

$$V_h = \Phi' * [\eta] * M \quad \text{mit } [\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (\text{Gl. 3-2})$$

Hierbei ist Φ' die Fox-Flory Konstante und η_{sp} die spezifische Viskosität. Aufgrund dieser Beziehung ergibt sich die universelle Eichkurve aus der Auftragung $\log([\eta]M)$ als Funktion des Elutionsvolumens.

Die Eichkurven zweier Homopolymere können bei Kenntnis der Mark-Houwink Koeffizienten mittels der Mark-Houwink Beziehung ineinander überführt werden.

$$[\eta] = KM^\alpha \quad (\text{Gl. 3-3})$$

Für eine große Anzahl von verschiedenen Monomeren sind diese Koeffizienten in Standardwerken, z.B. dem Polymer Handbook, tabelliert.

Bei der Bestimmung der Molekulargewichte und Polydispersitäten von Blockcopolymeren dagegen werden meist nur apparente Werte ermittelt. Die Schwierigkeiten bestehen darin, dass nicht nur eine Verteilung der Gesamtmolekulargewichte vorliegt, sondern die jeweiligen Ketten desselben Molekulargewichts auch eine chemische Heterogenität aufweisen. Da das hydrodynamische Volumen nicht unbedingt linear mit der Copolymerzusammensetzung zusammenhängt, ist eine Bestimmung des Molekulargewichts in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen nicht eindeutig.

3.1.2 Maldi-TOF Massenspektrometrie

Die Maldi-TOF Massenspektrometrie zur Analyse von Makromolekülen wurde 1988 von Hillenkamp und Karas entwickelt. Denn da die Polymere meist nicht flüchtig und thermisch instabil sind, sind konventionell übliche Methoden zur Ionisation und Desorption nur unzureichend geeignet. Es kann zu Fragmentierungen und Umlagerungen kommen.

Bei der MALDI-Methode (matrix assisted laser desorption/ionisation) wird die zu analysierende Substanz in großer Verdünnung in eine Matrix eingebettet. Ihre Aufgabe besteht darin, die Energie des Laserpulses aufzunehmen. Die Wellenlänge des verwendeten Lasers liegt bei $\lambda = 337 \text{ nm}$.

Durch die Energieaufnahme verdampft die Matrix explosionsartig und die zu untersuchende Substanz wird in den Gasraum gebracht. Als Matrixsubstanzen werden meist substituierte aromatische Verbindungen verwendet, z.B. 1,8,9-Trihydroxyanthracen (Dithranol) oder 2,3-Dihydroxybenzoesäure (DHB).

In der Gasphase kommt es durch Protonentransfer oder Adduktbildung mit zugegebenen Alkali- oder Übergangsmetallen (z.B. AgTFA, KCl) zur Ionisierung der Makromoleküle. Die desorbierten Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und mit einem Time of Flight (ToF)-Detektor analysiert. Die Ionen haben aufgrund der unterschiedlichen Verhältnisse von Masse zu Ladung (m/z) verschiedene Geschwindigkeiten beim Verlassen der Beschleunigungsstrecke, so daß sie den Detektor nach unterschiedlichen Flugzeiten erreichen. Anhand der gemessenen Flugzeiten kann das entsprechende Molekulargewicht zugeordnet werden. Zu der notwendigen Kalibrierung des ToF-Detektors werden meist monodisperse Biomoleküle oder Polymerstandards mit enger Molekulargewichtsverteilung und bekannter Endgruppenzusammensetzung verwendet. Aus den erhaltenen Massenspektren sollte theoretisch die absolute Häufigkeitsverteilung der Molekulargewichte ersichtlich sein. Dieses ist aber nicht der Fall, da die

Desorptionswahrscheinlichkeit mit steigender Masse abnimmt. Im Experiment kommt es daher zu einer Untergewichtung hoher Massen.

Liegen zwei verschiedene Substanzen im Spektrum vor, so ist aus dem Verhältnis der Absorptionsintensitäten auch kein Rückschluß auf das Verhältnis der Substanzen zu ziehen. Selbst kleine Veränderungen an der Endgruppe können einen großen Einfluß auf die Ionisierungseigenschaften ausüben und das Ergebnis verfälschen.

Dagegen sind zur Identifizierung von Endgruppen an Polymeren hochauflösende Spektren sehr gut geeignet.

3.1.3 Bestimmung des Umsatzes bei ATRP Reaktionen über NMR-Spektroskopie

Die Kernresonanzspektroskopie ($^1\text{H-NMR}$) ist eine einfache und genaue Methode, um den Umsatz bei ATRP-Reaktionen zu verfolgen. Aus dem Flächenverhältnis charakteristischer Signale vom Monomer zur Kombination eines Signals, welches sowohl im Monomer als auch im Polymer vorliegt, läßt sich der Umsatz bestimmen.

Bei *n*-Butylacrylaten bietet sich beim Monomer eine Resonanz im Alkenbereich an (5.5 ppm bis 6.5 ppm). Als Referenz für die Summe an Monomer und bereits polymerisiertem Monomer in der Reaktion ist die Resonanz der Alkylgruppe des Esters α zur Carboxylgruppe gut geeignet (3.8 ppm bis 4.3 ppm). Sie liegt durch die Tieffeldverschiebung in einem Bereich, in dem es zu keinen Überlagerungen mit anderen Signalen, z.B. des Lösungsmittels, der Liganden, etc., kommt (Abbildung 3.1-1).

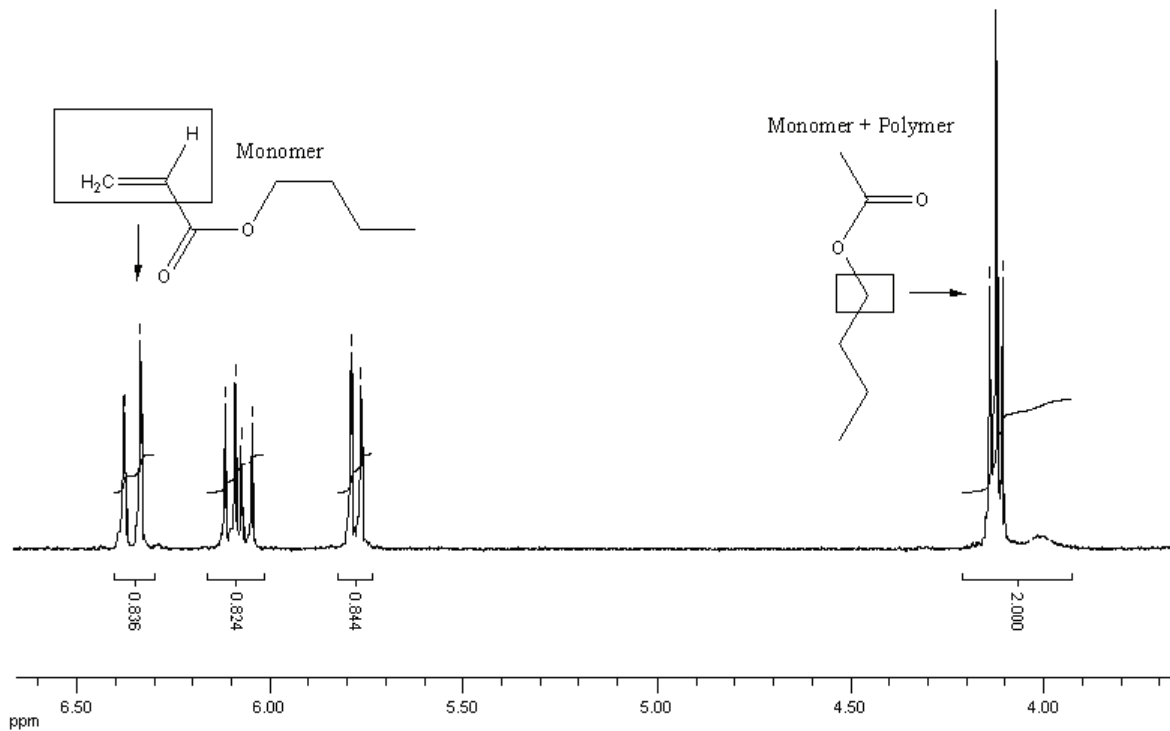


Abbildung 3.1-1: Ausschnitt aus einem ^1H -NMR, welches zur Ermittlung des Umsatzes herangezogen werden kann.

Wird der Bereich des kombinierten Signals von Monomer und Polymer auf 100% gesetzt, so lässt sich der Monomerverbrauch X aus der Abnahme der Fläche des Monomersignals ermitteln.

$$\frac{\text{Fläche}_{T=0}}{\text{Fläche}_{T=X}} = \frac{100}{X} \Rightarrow X = \frac{\text{Fläche}_{T=X}}{\text{Fläche}_{T=0}} * 100 \quad (\text{Gl.3-4})$$

Vor der Auswertung der Spektren wird eine Phasen- und Basislinienkorrektur durchgeführt, um den Fehler bei der Integration möglichst gering zu halten.

4. Bioorganisch–synthetische Blockcopolymere über Kupplungstechniken

4.1 Einleitung

Die Kupplung eines Oligopeptids mit einem synthetischen Polymer ist ein direkter Weg zu einem bioorganisch–synthetischen Blockcopolymer. Die Vorteile dieser Herangehensweise liegen in der Verwendung von zwei bekannten, definierten Blöcken. Hierbei ist eine spezifische Endfunktionalisierung zumindest des synthetischen Polymersegments notwendig, um eine selektive Kupplung zu erreichen. Erst durch eine hohe Selektivität des Kupplungsschrittes werden eine Regioselektivität der Kupplung und eine Kontrolle des Verhältnisses von Peptidsegment zu synthetischem Polymer erreicht. Im Idealfall ist die gezielte Kupplung eines synthetischen Polymers an ein Peptid möglich. Dabei ist es das Ziel, durch die geeignete Auswahl des Anknüpfungspunktes weder die Struktur noch die Funktion des Peptids negativ zu beeinflussen.

Die Kupplung der beiden Segmente kann entweder homogen in Lösung oder heterogen an Festphase erfolgen. Die Vorteile der homogenen Reaktion in Lösung liegen in der, im Vergleich zur Kupplung an Festphase, guten Zugänglichkeit der Reaktionszentren. Ein Problem bei der Kupplung in Lösung besteht darin, dass die Peptidfragmente häufig eine schlechte Löslichkeit besitzen. Darüberhinaus ist die Isolierung des Blockcopolymers von den nicht umgesetzten Segmenten sehr schwierig. Deshalb ist es notwendig, ohne den Einsatz eines großen Überschusses einer Komponente sehr hohe Umsätze bei der Kupplung zu erzielen.

Dieses Problem existiert bei der Kupplung an Festphase nicht. Es lassen sich ohne weiteres hohe Überschußäquivalente einsetzen, um einen maximalen Umsatz zu erreichen. Die Aufreinigung kann im Anschluss an die Kupplung sehr einfach durch Waschen der Festphase erfolgen, da das Produkt an dieser fixiert ist. Allerdings ist bei dieser Methode der Polymerisationsgrad des zu kuppelnden synthetischen Polymersegments begrenzt, da eine Diffusionslimitierung des Polymers in die Festphase in Abhängigkeit zum Polymerisationsgrad des Polymers vorliegt.

Beide Methoden haben wie beschrieben Vorteile und Nachteile. Von großem Interesse ist die Kupplung von PEO an Proteine oder Peptide, da PEO in Wasser löslich ist und einige Verbindungen zur Anwendung in der Medizin zugelassen sind. Daher sind in diesem

Bereich eine Vielzahl von homogenen Kupplungsstrategien entwickelt worden, die sich inzwischen etabliert haben⁵⁷. Bei der Kupplung der beiden Segmente bieten sich auf der Seite der bioorganischen Komponente aufgrund des Aufbaues aus Aminosäuren in deren Seitenketten verschiedene funktionelle Gruppen an. Zum Beispiel die Carboxylgruppe in Asparagin oder Glutaminsäure, eine Aminfunktionalität in Lysin oder eine Thiolgruppe in Cystein.

Bei den meisten Kupplungsstrategien erfolgt die Verknüpfung an der Thiolgruppe eines Cysteins, da diese spezifisch mit einer Reihe von funktionellen Gruppen reagiert. Desweiteren besitzt das Cystein den Vorteil, dass es relativ selten in natürlichen Proteinen vorkommt. Der Anteil liegt bei ungefähr 1,7% bezogen auf die Gesamtmenge an Aminosäuren⁵⁸. Daher ist bei einer Kupplung die Anzahl der Positionen, an denen die Polymere gekuppelt werden können, begrenzt. In Abbildung 4.1-1 sind einige Kupplungsreaktionen am Beispiel von endfunktionalisiertem Polyethylenglykol mit der Thiolgruppe eines gut zugänglichen Cysteins dargestellt.

Mit Maleinimid und Vinylsulfon reagiert die Thiolgruppe in einer Michaeladdition. Weitere selektive Kupplungsreaktionen sind mit Iodacetamid- und mit Orthopyridyldisulfid-funktionalitäten möglich. Die Reaktionen können unter milden Bedingungen in wässriger Lösung unter nativen Bedingungen durchgeführt werden.

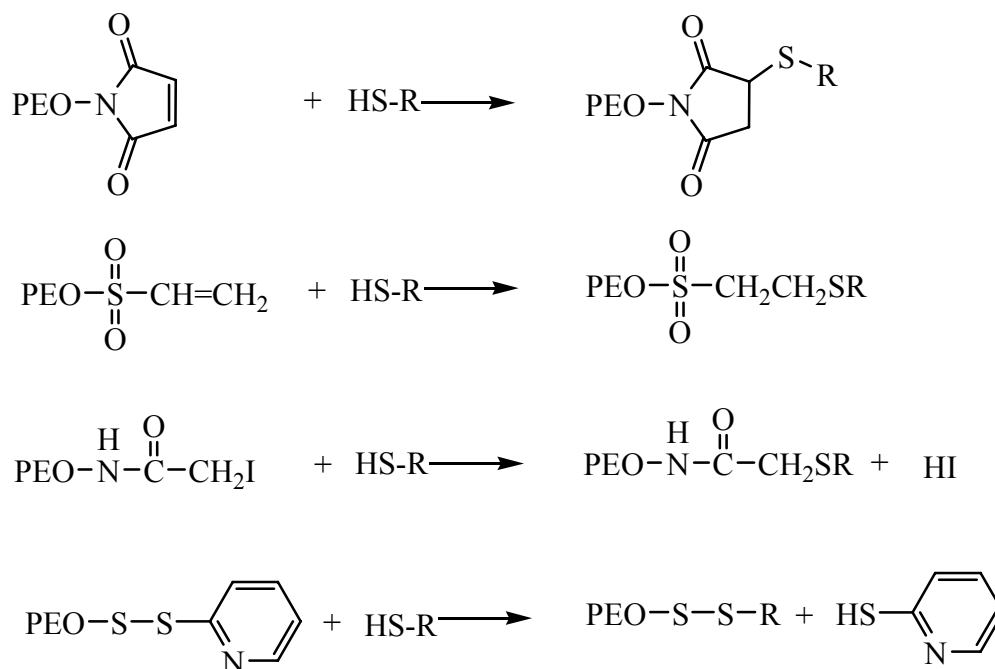


Abbildung 4.1-1: Kupplungsreaktionen von endfunktionalisiertem Polyethylenglykol mit der Thionylgruppe des Cysteins

Neben PEO sind auch auf Polyacrylamid basierende Copolymere über Maleinimid⁵⁹ und Vinylsulfon^{60,61,62} Endfunktionalisierungen verknüpft worden. Ferner konnte auch Polystyrol über eine Maleinimid⁶³ Endfunktionalisierung erfolgreich an Proteine gekoppelt werden.

Eine weitere PEO Kupplungsmethode verläuft über die reduktive Alkylierung von PEO-Aldehyd Derivaten am N-Terminus eines Peptids.^{57,64} Die Reaktion verläuft über eine Schiff'sche Base, welche *in situ* unter Zugabe von Natriumcyanoborhydrid zum gewünschten Produkt reduziert wird (Abbildung: 4.1-2). Bei dieser Reaktion ist eine Optimierung notwendig, da neben der Amingruppe am N-Terminus auch die Lysinseitenketten primäre Amine aufweisen. Diese unterscheiden sich allerdings in ihren pK_a-Werten. Die Amingruppe am N-Terminus besitzt einen pK_a-Wert von 7,6 bis 8,0, wohingegen der pK_a-Wert desamins der Lysinseitenkette bei 10,0 bis 10,2 liegt. Somit ist eine Reaktionsführung unter strenger Kontrolle des pH-Wertes notwendig. Es muss der pH-Wert so eingestellt werden, dass nur das terminale Amin nicht protoniert vorliegt und einen Verknüpfungspunkt bietet.

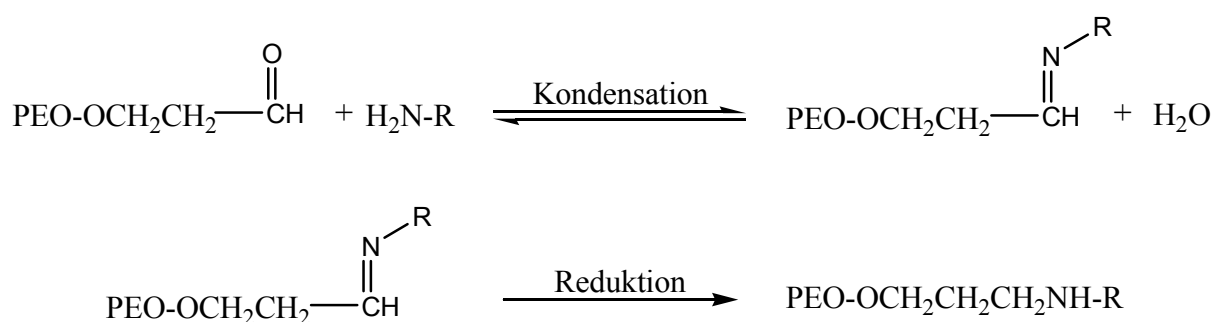


Abbildung 4.1-2: Kupplung eines Aldehyd endfunktionalisierten Polyethylenglykols mit dem N-Terminus eines Peptids über reduktive Alkylierung.

Zwei weitere Methoden, die in diesem Zusammenhang intensiv erforscht wurden, sind die Staudinger–Kupplung⁶⁵ und die Kupfer katalysierte Azid–Alkin [3+2] Cycloaddition („click-chemie“)⁶⁶. Die Methoden der Staudinger–Bindung^{67,68} und die der Click-Chemie⁶⁹ sind beide bereits erfolgreich zur Modifizierung von Zelloberflächen eingesetzt worden, da beide Kupplungen sehr selektiv sind und eine Vielzahl von funktionellen Gruppen tolerieren. Bei der Staudinger–Bindung erfolgt die Umsetzung eines mit einem

Azid endfunktionalisierten Polymers mit einer Phosphingruppe an einer modifizierten Zelloberfläche. Im Fall der Click-Chemie reagiert hingegen das Azid mit einem Alkin (Abbildung 4.1-3).

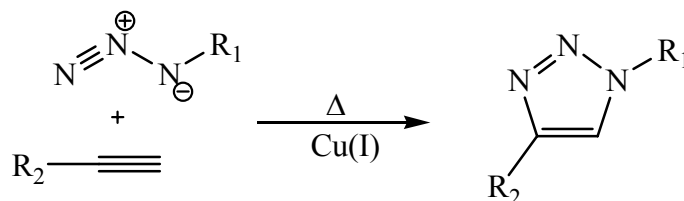


Abbildung 4.1-3: Kupplung von zwei Segmenten über kupferkatalysierte [3+2] Cycloaddition.

Die Herstellung von bioorganisch-synthetischen Blockcopolymeren über Kupplung wurde zunächst durch die Verknüpfung eines carboxy-funktionalisierten Polyethylenoxids an den N-Terminus eines Festphasen gebundenen Peptids durchgeführt.⁷⁰

Die Anwendung ist jedoch sowohl durch die Zugänglichkeit der N-terminalen Aminosäure, an die gekuppelt wird, als auch durch das Molekulargewicht des zu kuppelnden Polyethylenoxids limitiert.

Ein neuer eleganterer Weg ist die Verwendung von Tentagel PAP Harzen zur Peptidsynthese (Abbildung 4.1-4). Bei diesen besteht der Linker aus einem Benzylether, an den ein Polyethylenoxidsegment als Spacer angefügt wurde. Das Harz besteht aus Polystyrol, welches mit Divinylbenzol vernetzt worden ist.

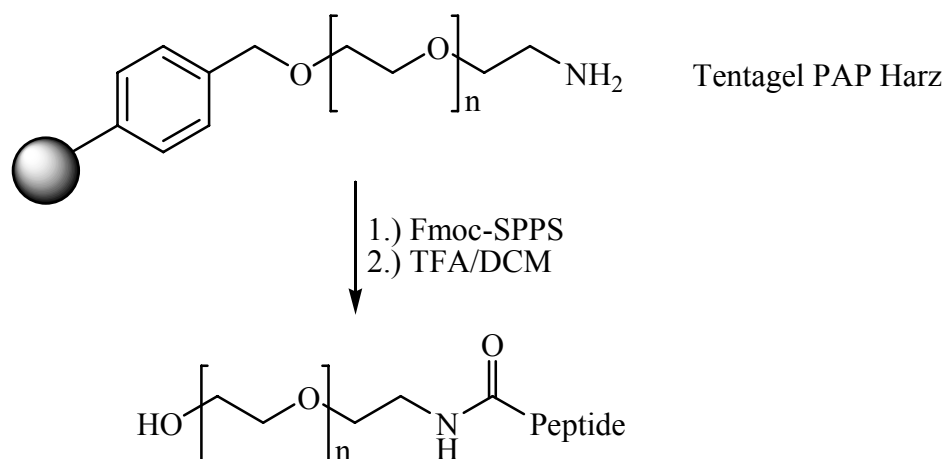


Abbildung 4.1-4: Schematische Darstellung eines Tentagel PAP Harzes und der Aufbau eines Blockcopolymeres.

Diese Methode ist zur Synthese verschiedener PEO-Peptid Blockcopolymere angewendet worden. So wurden zum Beispiel bioorganisch–synthetische Konjugate hergestellt, bei denen die Aminosäuresequenz eine β -Faltblattstruktur ausbildet.^{71,72,73}

Durch eine Kombination beider Methoden ist es zusätzlich gelungen, PEO-Peptid-PEO Triblockcopolymere herzustellen.

4.2 Eingesetzte Initiatoren zur Synthese von säure-endfunktionalisierten Polyacrylaten zur Kupplung an Oligopeptide

Die Vorteile der im Folgenden beschriebenen Methode zur Synthese von bioorganisch-synthetischen Konjugaten durch die Kupplung von zwei Blöcken liegt unter anderem in der Möglichkeit, die einzelnen Blöcke vor der Kupplung zu charakterisieren. Die Nachteile liegen in der Darstellung der selektiven Endfunktionalität des Polymerblocks. Gleichwohl ist dieses aber notwendig, um definierte Blockcopolymere zu erhalten. Um die Aufreinigung nach der Kupplung der beiden Segmente zu vereinfachen, soll die Kupplung an Festphase erfolgen. Dadurch läßt sich ein Überschuß des Polymers bei der Kupplung einsetzen, um einen verbesserten Umsatz zu erhalten. An einem Festphasen gebundenen Peptid bietet sich als Kupplungspunkt die N-terminale Aminogruppe an. Diese liegt unabhängig von der Sequenz des Peptids als terminale Funktionalität vor. Die Kupplung kann mit einem säure-endfunktionalisierten Polymer über eine Peptidbindung erfolgen (Abbildung 4.2-1).

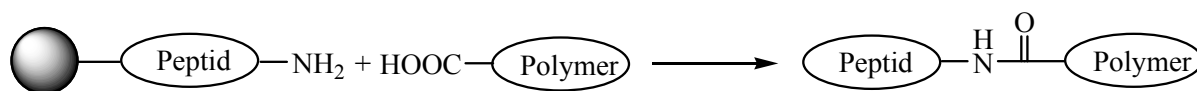


Abbildung 4.2-1: Schematische Darstellung der Synthese von biorganisch – synthetischen Blockcopolymeren über Kupplung des Polymers an das Peptid.

Als Modell für den synthetischen Block wurde Poly-*n*-butylacrylat gewählt, da es in verschiedenen Lösungsmitteln gut löslich und einfach zu synthetisieren ist. Desweiteren

weist es eine niedrige Glasübergangstemperatur $T_g = -49\text{ °C}$ auf und ist nicht kristallin. Die Herstellung von Poly-*n*-butylacrylat erfolgte durch ATRP. Dabei gibt es für die Einführung der terminalen Säurefunktionalität zwei Möglichkeiten. Sie kann entweder über den ATRP-Initiator oder nach der Polymerisation durch polymeranaloge Umsetzung des bei der ATRP Polymerisation gebildeten terminalen Halogens eingefügt werden. Die erste Variante ist jedoch Erfolg versprechender, da weniger Syntheseschritte am Polymer durchgeführt werden müssen. Außerdem kann es beim Abbruch der Polymerisation bei einem Teil der Kettenenden zu einem Verlust der Halogenfunktion kommen. Dadurch wäre eine anschließende Funktionalisierung unvollständig.

Die Einführung der Säurefunktionalität am ATRP-Initiator kann durch die kommerziell erhältlichen α -Bromcarbonsäuren und α -Bromcarbonsäureester erfolgen. α -Bromcarbonsäuren lassen sich allerdings nicht direkt als Initiatoren bei einer Polymerisation einsetzen, da ihre Säurefunktionalität den ATRP-Katalysator partiell deaktivieren würde. Daher ist es notwendig die Säurefunktionalität zu schützen. Es sind jedoch zwei Bedingungen zu berücksichtigen. Erstens muß die Schutzgruppe gegenüber den Polymerisationsbedingungen stabil sein, und zweitens muß es möglich sein, die Schutzgruppe selektiv zu entfernen, ohne dass dabei ein oder mehrere Ester der Acrylate verseift werden, da es sonst zur Kupplung mit mehreren Oligopeptiden kommen kann. Auf diese Bedingungen hin wurden mehrere Schutzgruppen für die Synthese von selektiv säureendfunktionalisierten Polyacrylaten untersucht (Abbildung 4.2-2).

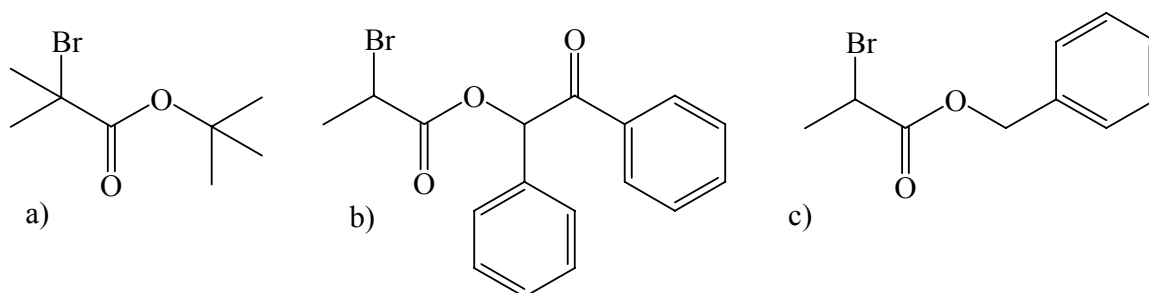


Abbildung 4.2-2: Initiatoren für die ATRP, a) 2-Bromisobuttersäure-*tert*-butylester, b) 2-Brompropionsäurebenzoinester c) 2-Brompropionsäurebenzylester,

Die *tert*-Butylesterschutzgruppe ist weit verbreitet und mit dem 2-Bromisobuttersäure-*tert*-butylester ist ein Initiator für die ATRP kommerziell erhältlich. Die Abspaltung der *tert*-Butylester kann unter sauren Bedingungen erfolgen und unterscheiden sich darin von den *n*-Butylestern des Polymers, die als primäre Ester leichter im basischen zu verseifen sind. Die Selektivität der Abspaltung ist aber möglicherweise nicht ausreichend, da auch eine

Verseifung der *n*-Butylester im stark sauren möglich ist. Sowohl der Benzylester als auch der Benzoinester der 2-Brompropionsäure sind kommerziell nicht erhältlich. Sie lassen sich durch Umsetzung von 2-Brompropionsäurebromid mit dem entsprechenden Alkohol synthetisieren.

Der Benzylester des Initiators kann im Gegensatz zum *n*-Butylester des Poly-*n*-butylacrylats reduktiv entfernt werden. Der eingesetzte Katalysator, Palladium auf Aktivkohle, läßt sich im Anschluß an die Reaktion durch Filtration wieder entfernen. Bei dieser Abspaltung wird gleichzeitig das terminale Halogenid des Polymers entfernt. Dieses ist von Vorteil, da die Halogenidfunktion potentiell eine Möglichkeit zur S_n-Reaktion mit anderen funktionellen Gruppen bietet.

Der Benzoinester ist eine photolytische Schutzgruppe, welche selektiv bei einer Wellenlänge von 350 nm abgespaltet wird.

4.3 Synthese eines säureendfunktionalisierten Polymers unter Verwendung einer *tert*-Butylschutzgruppe

Die Synthese eines *tert*-butylester-endfunktionalisierten Polybutylacrylats erfolgte mit 2-Bromisobuttersäuretertbutylester als Initiator. Die Polymerisation wurde mit 75 Äq. *n*-Butylacrylat und einem Lösungsmittelanteil von 29 vol.-% DMF bei 60 °C durchgeführt. Als Katalysatorkomplex wurde 1 Äq. CuBr/PMDETA mit einem Anteil von 5 % Kupfer(II)bromid verwendet. Es wurde ein viskoses Polymer erhalten. Eine Untersuchung des Polymers mittels GPC in THF ergab ein Molekulargewicht von $M_n = 4000$ und eine Polydispersität von 1,1.

Eine der Methode zur der selektiven Entfernung der *tert*-Butylesterschutzgruppe ist die Verwendung von Trimethylsilyliodid. Die Abspaltung von *tert*-Butylester wird in der Gegenwart von Methylestern an einem Polymer in der Literatur anhand der Herstellung eines Polymethylmethacrylat-*block*-Polyacrylsäureesters beschrieben⁷⁴.

Dabei wird das Polymer in trockenem Dichlormethan unter Schutzgas mit einem Überschuß an Trimethylsilyliodid versetzt und 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Polymer in eine Lösung aus Methanol mit einem katalytischen Anteil von wäßriger Salzsäure gegeben. Danach erfolgt die Isolierung des Polymers. Analog zu der beschriebenen Vorschrift wurde die Abspaltung eines *tert*-butylester-endfunktionalisierten Polybutylacrylats durchgeführt. Im ¹³C-NMR Spektrum waren

jedoch nach der Isolierung des Polymers noch die Signale der *tert*-Butylschutzgruppe sichtbar, und zwar sowohl das quartäre C-Atom bei 79,6 ppm als auch die der Methylgruppen bei 27,5 ppm. Das bedeutet, dass eine vollständige Abspaltung der Schutzgruppe unter diesen Bedingungen nicht erreicht werden konnte. Die Endgruppe besitzt eine veränderte Reaktivität. Eine Verlängerung der Reaktionszeit auf insgesamt fünf Stunden erbrachte zwar eine vollständige Abspaltung der *tert*-Butylschutzgruppe, allerdings zeigte sich im Maldi-TOF Massenspektrum (Abbildung 4.3-1), dass neben dem *tert*-Butylester auch einige *n*-Butylester verseift wurden.

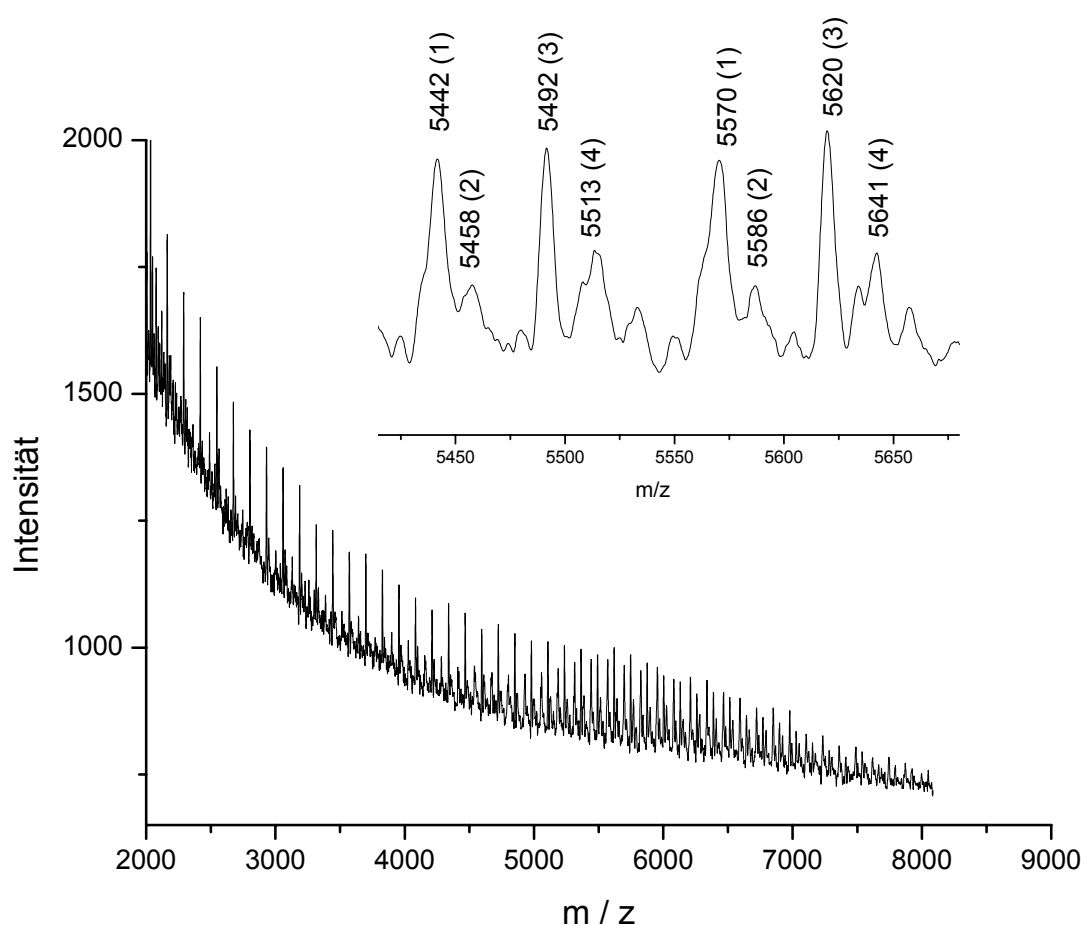


Abbildung 4.3-1: Massenspektrum des Polybutylacrylats nach der Abspaltung der terminalen *tert*-Butylschutzgruppe mit Trimethylsilyliodid

Es lassen sich 4 homologe Reihen jeweils einer charakteristischen Massenwiederholungseinheit von 128 Dalton zuordnen.

Die Reihe (1) lässt sich dem Natrium Addukt des selektiv entschützten Produktes $[M+Na]^+$ = 5570 zuordnen. Dieses entspricht einem Polymerisationsgrad von 42. Die Reihe (2) lässt

sich dem Kalium Addukt des selektiv geschützten Produktes $[M+K]^+ = 5586$ zuordnen. Die Reihe (3) läßt sich dem Natrium Addukt des selektiv geschützten Produktes, aber mit abgespaltener Bromid Endgruppe $[M-Br+Na]^+ = 5492$ zuordnen. Reihe (4) läßt sich dem Natrium Addukt des geschützten Produktes mit einem zusätzlichen abgespaltenen *n*-Butylgruppe $[M-nBu +Na]^+ = 5513$ zuordnen.

Die Abspaltung der *tert*-Butylschutzgruppe mittels Trimethylsilyliodid ist also möglich; allerdings ist diese Methode nicht selektiv genug, so dass es bei einem Teil der Polymere zu einer Verseifung eines Butylesters des Poly-*n*-butylesters kommt. Dadurch wird das Produkt für eine terminale Funktionalisierung mit einem Peptid unbrauchbar, weil über die zusätzliche Säurefunktion ein weiteres Peptid gekuppelt werden kann.

Als eine weitere Variante wurde die Abspaltung der *tert*-Butylgruppe mit 33% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid über 60 Minuten untersucht.

Für eine geringe Menge von ~ 50 mg Polymer gelang es, die *tert*-Butylschutzgruppe selektiv zu entfernen. Dieses konnte anhand eines Maldi-ToF Massenspektrums des Polymers gezeigt werden. Allerdings ist es nach der Abspaltung der Schutzgruppe von größeren Mengen Polymer problematisch, die Trifluoressigsäure schnell und vollständig zu entfernen. Desweiteren sind die Abspaltzeiten an die Kettenlänge des Polymers anzupassen, da sich die Abspaltzeiten aufgrund der Polymerendgruppenreaktivität in Abhängigkeit vom Polymerisationsgrad verändern. Ferner müßte die Abspaltprozedur für verschiedene Polymere optimiert werden, um eine selektive Abspaltung der *tert*-Butylschutzgruppe zu sichern.

4.4 Synthese eines säureendfunktionalisierten Polymers unter Verwendung einer Benzoinesterschutzgruppe

Eine alternative orthogonale Schutzgruppe für Säuren ist der Benzoinester. Hierbei handelt es sich um eine photolytisch abspaltbare Schutzgruppe. Er läßt sich bei einer Wellenlänge von 350 nm selektiv entfernen. Photolytische Abspaltmechanismen haben einige Aufmerksamkeit hinsichtlich ihrer Freisetzung von biologisch aktiven Substanzen erregt, denn mit ihrer Hilfe läßt sich eine räumliche und zeitliche Kontrolle über die Freisetzung einer Substanz erreichen.^{75,76}

Bei der Abspaltung des Benzoinesters wird davon ausgegangen, dass zunächst eine homolytische Bindungsspaltung auftritt. Anschließend kommt es zu einem ein Elektronentransfer (singel electron transfer, SET) und zu einer Umlagerung an der

abgespaltenen Schutzgruppe (1) unter Bildung eines 2-Phenylbenzofurans (2) (Abbildung 4.4-1).

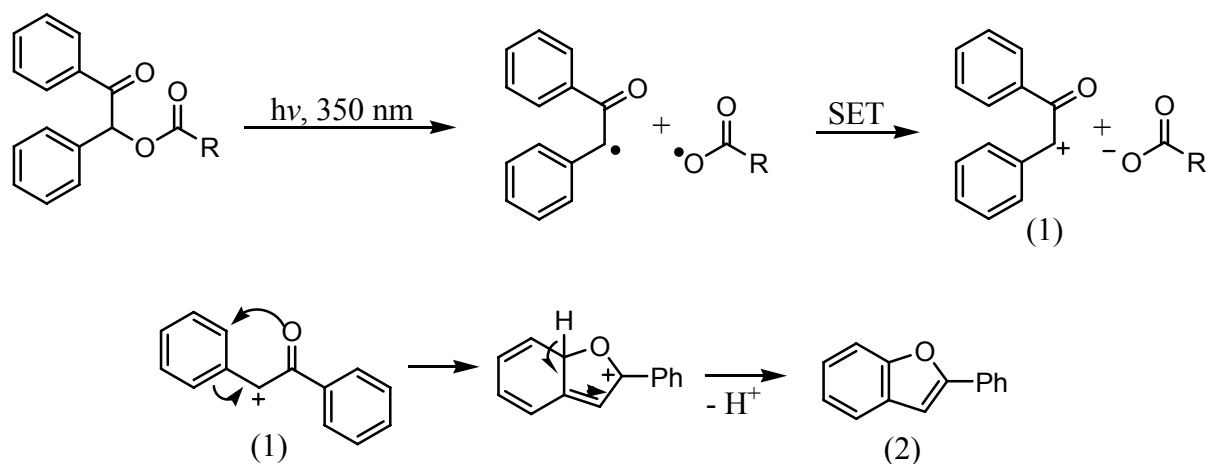


Abbildung 4.4-1: Vorgeschlagener Mechanismus für die photolytische Abspaltung der Benzoinenschutzgruppe.⁷⁷

Die Einführung des Benzoinesters erfolgt an dem ATRP-Initiator durch eine Umsetzung von 2-Brompropionsäurebromid mit Benzoin. Bei der Synthese des Polymers wurden 20 Äquivalente des Monomers *n*-Butylacrylat bezogen auf den Initiator eingesetzt. Als Katalysator wurde 1 Äquivalent des Cu(I)/PMDETA Komplexes mit einem Zusatz von 5% Cu(II)/PMDETA verwendet. Der Lösungsmittelanteil an DMF betrug 25 vol.-% und die Polymerisation erfolgte bei 60 °C.

Die Abspaltung erfolgte durch UV-Bestrahlung in Toluol. Das erhaltene Massenspektrum ist in Abbildung 4.4-2 dargestellt.

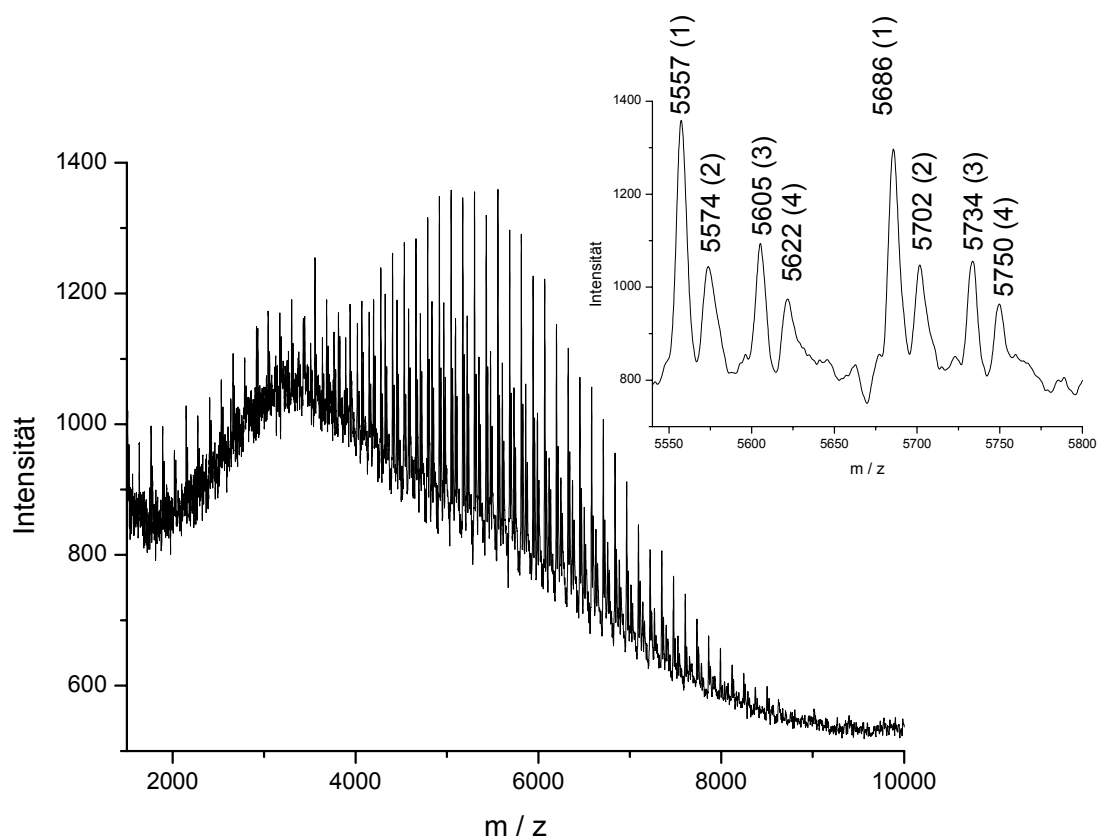


Abbildung 4.4-2: Maldi-TOF Massenspektrum von Poly-*n*-butylacrylat nach der Abspaltung der terminalen Benzoinchutzgruppe durch UV-Bestrahlung

Die Signale der 4 zu beobachtenden homologen Reihen wiederholen sich mit einer charakteristischen Massenwiederholungseinheit von jeweils 128 Dalton. Diese entspricht dem Molekulargewicht des eingesetzten Monomers *n*-Butylacrylat. Die Reihe (1) lässt sich dem Natrium-Addukt des Produkts $[M+Na]^+ = 5686$ bei einem Polymerisationsgrad von 43 zuordnen. Die Reihe (2) entspricht dem entsprechenden Kalium-Addukt $[M+K]^+ = 5702$. Die beiden homologen Reihen (3) bzw. (4) lassen sich dem Natrium- bzw Kalium-Addukt des Produktes zuordnen, bei dem neben der Benzoinchutzgruppe auch das Brom entfernt worden ist, $[M-Br+Na]^+ = 5605$ und $[M-Br+K]^+ = 5622$.

Mit dieser Methode gelang es in kleinem Maßstab das gewünschte Produkt zu erhalten, allerdings konnte die Abspaltung nicht einfach auf größere Polymermengen übertragen werden. Daher war diese Methode trotz ihrer Selektivität nicht geeignet, säureendfunktionalisierte Polymere herzustellen.

4.5 **Synthese eines säureendfunktionalisierten Polymers unter Verwendung einer Benzylesterschutzgruppe**

Eine weitere orthogonale Strategie zur Synthese eines säureendfunktionalisierten Polymers ist die Einführung einer Benzylesterschutzgruppe. Die Entfernung der Schutzgruppe sollte neben der klassischen Verseifung des Esters⁷⁸ auch durch eine katalytische Hydrierung⁷⁹ möglich sein. Letztere wird meist unter sehr milden Bedingungen mit Palladium als Katalysator durchgeführt. Dabei werden statt des molekularen Wasserstoffs⁸⁰ häufig auch andere Substanzen wie Cyclohexen⁸¹ oder Ammoniumformiat⁸² verwendet.

Die Einführung des Benzylesters an den ATRP-Initiator erfolgt durch eine Umsetzung von 2-Brompropionsäurebromid mit Benzylalkohol. Bei der Synthese des Polymers wurden 20 Äquivalente des Monomers *n*-Butylacrylat bezogen auf den Initiator eingesetzt. Als Katalysator wurde 1 Äquivalent des Cu(I)/PMDETA Komplexes mit einem Zusatz von 4% Cu(II)/PMDETA verwendet. Der Lösungsmittelanteil betrug 33 vol.-% und die Polymerisation erfolgte bei 60 °C.

Das Polymer wurde mittels NMR und MS charakterisiert, wobei das Vorliegen des Benzylesters bestätigt werden konnte. Durch GPC-Analyse wurde ein Molekulargewicht von $M_n = 3100$ und eine Polydispersität von 1,09 ermittelt.

Die Abspaltung der Benzylschutzgruppe wurde in absolutem Ethanol durchgeführt. Als Katalysator wurde Palladium auf Aktivkohle (10%) und als Wasserstoffspender Ammoniumformiat verwendet. Die Reaktion wurde unter Argonatmosphäre zwei Stunden bei 35 °C und anschließend zwölf Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

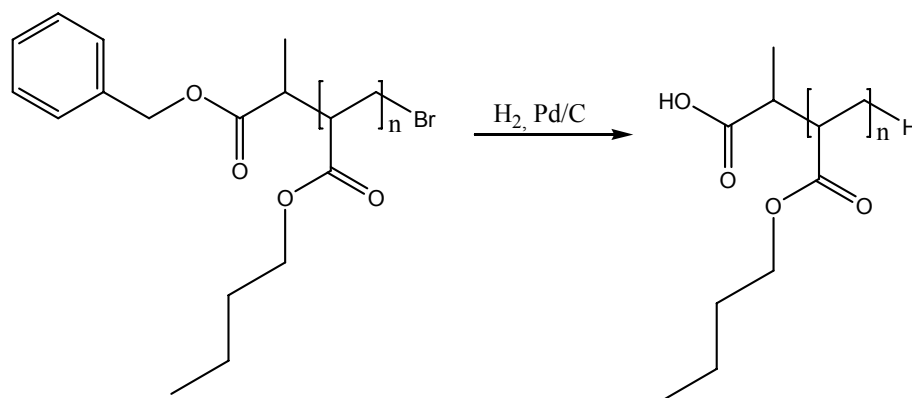


Abbildung 4.5-1 Reaktionsschema für die selektive Spaltung der Benzylesterschutzgruppe.

Durch $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie konnte die vollständige Abspaltung der Benzylschutzgruppe durch die Abwesenheit der Benzylprotonenresonanzen bei $\delta = 7,31$ ppm nachgewiesen werden. Dieses wurde durch eine Endgruppenanalyse mittels Maldi-TOF Massenspektrometrie bestätigt. Darüber hinaus wurde eine Abspaltung des terminalen Bromids festgestellt (Abbildung 4.5-2).

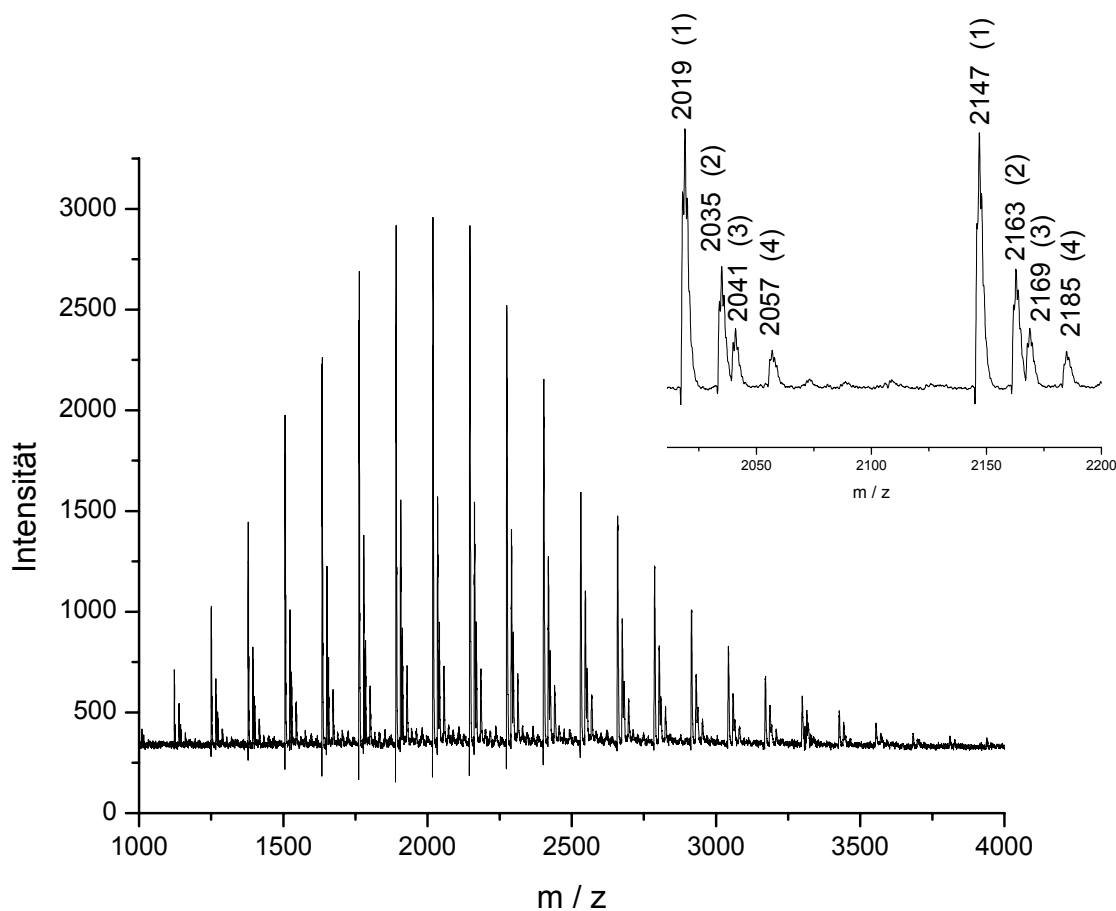


Abbildung 4.5-2: Maldi-TOF Massenspektrum des Polybutylacrylats nach der Abspaltung der terminalen Benzylesterschutzgruppe durch selektive Hydrierung.

Es wurden 4 homologe Reihen mit jeweils einer Massendifferenz von 128 Dalton ermittelt. Alle homologen Reihen können dem selektiv entschützten Produkt mit entfernter Bromendgruppe zugeordnet werden. Die Reihe (1) läßt sich dem Natrium Addukt $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 2019$ bei einem Polymerisationsgrad von 15 zuordnen. Die Reihe (2) dem entsprechenden Kalium Addukt $[\text{M}+\text{K}]^+ = 2035$, die Reihe (3) dem Natriumsalz des Produktes $[(\text{M}-\text{H}+\text{Na})+\text{Na}]^+ = 2041$ und die Reihe (4) dem Kaliumsalz des Produktes $[(\text{M}-\text{H}+\text{K})+\text{Na}]^+ = 2057$.

Diese Methode der Darstellung von säureendfunktionalisierten Polyacrylaten hat sich als die beste hinsichtlich der Selektivität und der Herstellung größerer Mengen des gewünschten Polymers erwiesen. Daher wurden nach dieser Methode zwei selektiv säureendfunktionalisierte Poly-*n*-butylacrylate unterschiedlichen Molekulargewichts zur Kupplung an Oligopeptide hergestellt.

Probenname	M _n in [g/mol]	Polydispersität
S-P <i>n</i> BA-1600	1600	1,21
S-P <i>n</i> BA-1000	1000	1,22

Tabelle 4.5-1: GPC Daten der zur weiteren Kupplung an Oligopeptiden hergestellten säureendfunktionalisierten Polybutylacrylate (Eluent THF, Eichgrade Polystyrol).

4.6 Kupplung von Oligopeptiden mit säureendfunktionalisierten Polyacrylaten

Die Kupplung von säureendfunktionalisierten Poly-*n*-butylacrylat erfolgte an ein Modeloligopeptid der Sequenz VPGVG (Valin-Prolin-Glycin-Valin-Glycin). Diese Sequenz ist ein Ausschnitt aus der nativen Elastinsequenz, einem natürlich vorkommenden, strukturgebenden Protein, welches sich zum Beispiel in Arterien, Haut und Lungengewebe befindet.

Die Synthese des Oligopeptids wurde an einem Aminoethanol-2-Chlortritylharz mit einem Beladungsgrad von 0,68 mmol/g durchgeführt. Dieses Harz ist gewählt worden, da die notwendigen Abspaltbedingungen mit 2% Trifluoressigsäure in Dichlormethan über 5 Minuten sehr mild sind. Die Synthese des Oligopeptids erfolgte mit Hilfe eines Peptidsynthesizers unter Verwendung von Standard Fmoc Schutzgruppentechnik. Um eine Aggregation der Oligopeptide an dem Harz zu vermeiden und somit eine gute Zugänglichkeit des N-Terminus zur Kupplung zu gewährleisten, wurde das Harz nach dem Entfernen der terminalen Fmoc-Schutzgruppe nur mit N-Methylpyrrolidon gewaschen. Es wurde nicht getrocknet.

Zu analytischen Zwecken wurden etwa 0,1 mmol Harz separiert und unter Standardbedingungen aufgearbeitet. Dabei konnten ca. 40 mg eines farblosen Feststoffes

gewonnen werden. Eine Bestimmung der Masse mit ESI-MS ergab zwei Signale (471 m/z und 493 m/z), die sich dem Protonen- bzw. dem Natrium Addukt des Oligopeptids zuordnen lassen.

Zur Kupplung an das Festphasen gebundene Oligopeptid wurden zunächst verschiedene aus der Peptidsynthese für die Aktivierung der Säure bekannte Reagenzien auf ihre Effektivität bei der Kupplung des Poly-*n*-butylacrylats hin untersucht. Als Aktivierungsreagenzien wurden DIC/HOBt, PyBOP und HBTU in verschiedenen Lösungsmitteln, wie NMP und DMF, verwendet. Das Lösungsmittel hat aufgrund des Quellverhaltens des Harzes und der Solvatisierungseigenschaften für das Oligopeptid einen Einfluß auf die Effektivität der Kupplung. Vor dem Verwenden wurden beide Lösungsmittel durch Destillation bzw. Gelfiltration von Aminen gereinigt. Dieses wurde durch einen Sangertest überprüft. Die Kupplungstests wurden an einem Harz mit einer Beladung von 0,05 mmol durchgeführt. Bei der Variation der Kupplungsbedingungen wurden jeweils 5 Äquivalente der säureendfunktionalisierten Polybutylacrylate (S-*Pn*BA-1000, S-*Pn*BA-1600) mit verschiedenen Aktivierungsreagenzien (DIC/HOBt, PyBOP, HBTU) und Lösungsmitteln (NMP, DMF) verwendet. Nach 22 Stunden und nach 48 Stunden wurde jeweils ein Kaisertest durchgeführt. Eine Blaufärbung des Harzes zeigte freie Amine am Harz an und ließ somit auf eine unvollständige Kupplung schließen. Die langen Kupplungszeiten im Vergleich zu einer Kupplung mit einer aktivierten Fmoc-Aminosäure (7 min. - 2 h) sind auf die langsame Diffusion des Polymers in das Harz und die Abschirmung der aktivierten Säure durch das Polymer zurückzuführen. Dieses sind auch gleichzeitig die limitierenden Faktoren bei der Kupplung an Festphase. Ab einer gewissen Länge des Polymers wird die Kupplungskinetik zu langsam oder findet quantitativ nicht mehr statt. Beeinflußt wird beides natürlich noch von den verwendeten Kupplungsbedingungen (z.B. Lösungsmittel, Kupplungsreagenz, Harz, Polymer).

Für die hier nicht näher betrachtete Kupplung in Lösung spielt dagegen bei optimierten Kupplungsbedingungen nur die Abschirmung der funktionellen Gruppe durch das Polymer hinsichtlich der Kupplungsgeschwindigkeit eine Rolle (Polymerendgruppenreaktivität).

Bei dem Vergleich der Kupplung in den Lösungsmitteln NMP und DMF wurden Unterschiede festgestellt. Die Kupplung des kürzeren Polyacrylats (S-*Pn*BA-1000) war in beiden Lösungsmitteln erfolgreich. Wurde dagegen das längere Polyacrylat (S-*Pn*BA-1600) verwendet, konnte unabhängig vom Aktivierungsreagenz in DMF, nicht aber in NMP, ein vollständiger Umsatz erreicht werden. Bei der Aktivierung mit PyBOP und DIC/HOBt war die Kupplung bereits nach 22 Stunden abgeschlossen, während es bei der

Aktivierung mit HBTU 48 Stunden dauerte. Das Lösungsmittel DMF scheint die einzelnen Reagenzien besser zu solubilisieren und/oder das Harz besser quellen zu lassen, so dass eine bessere Kupplung möglich ist.

Eine optimierte Kupplung wurde mit beiden säureendfunktionalisierten Poly-*n*-butylacrylaten an dem Festphasen gebundenen Oligopeptid mit PyBOP als Aktivierungsreagenz und DMF als Lösungsmittel durchgeführt. Nach 48 Stunden war der Kaisertest negativ und somit konnten keine freien Amine mehr am Harz nachgewiesen werden. Nach der Kupplung wurde das Harz gründlich gewaschen, um die eingesetzten Überschüsse der Reagenzien zu entfernen. Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit einer 2%igen Trifluoressigsäure in Methylenchlorid. Das Blockcopolymer wurde durch Waschen mit Dichlormethan aus dem Harz extrahiert. Die Abspatlösung wurde unter Zusatz von 20 mL Dioxan einrotiert mit dem Ziel, eine Aufkonzentration der Trifluoressigsäure zu verhindern, um eine Verseifung der *n*-Butylester zu vermeiden. Nach der Trocknung wurden zwei viskose Polymere gewonnen.

Das Vorliegen des Oligopeptids und des Polymers konnte in beiden Fällen durch $^1\text{H-NMR}$ Spektrometrie und Maldi-TOF Massenspektrometrie (Abbildung 4.6-1) bestätigt werden.

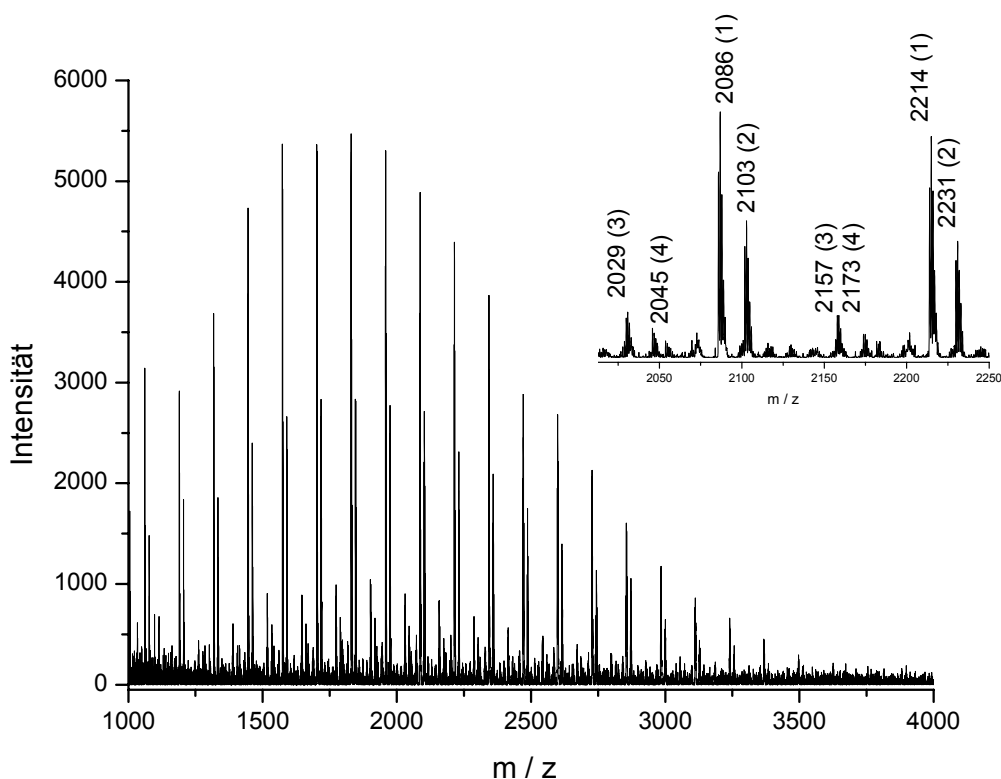


Abbildung 4.6-1: Maldi-TOF Massenspektrum des Oligopeptid-poly-*n*-butylacrylat Blockcopolymers

Es lassen sich vier homologe Reihen mit jeweils einer charakteristischen Massenwiederholungseinheit von 128 Dalton zuordnen. Diese Wiederholungseinheit entspricht dem Molekulargewicht des *n*-Butylacrylatmonomers. Die Reihe (1) entspricht für einen P

olymerisationsgrad von 12 dem Natrium Addukt des Blockcopolymers $[M+Na]^+ = 2086$ Dalton. Die Reihe (2) dem Kalium Addukt $[M+K]^+ = 2103$. Die homologen Reihen (3) $[M-Bu +Na]^+ = 2029$ und (4) $[M-Bu +K]^+ = 2045$ entsprechen dem Natrium bzw. Kalium Addukt des Blockcopolymers mit einer Massendifferenz von -57 Dalton. Die Massendifferenz entspricht einem verseiften Butylester in dem Poly-*n*-butylacrylatblock. Dieses ist wahrscheinlich während der Abspaltung des Blockcopolymers vom Harz aufgetreten. Das Nebenprodukt ist aber nicht von Bedeutung, da keine weitere Kupplung an einer Säurefunktionalität erfolgen soll.

Die Kupplung des Oligopeptids an das Poly-*n*-butylacrylat läßt sich auch durch CD-Spektroskopie bestätigen. Es wurde jeweils eine Lösung der Konzentration 0,5 g/L in Methanol vermessen. Das bioorganisch-synthetische Blockcopolymer weist im Gegensatz zu dem Poly-*n*-butylacrylat eine optische Aktivität auf und entspricht in seinem Verlauf dem der Oligopeptidsequenz. Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei Raumtemperatur. Es ist ein Minimum bei 204 nm zu erkennen. Dieses entspricht dem in der Literatur angegebenen Wert für Elastinsegmente.⁸³ Die Anknüpfung des Polymersegments verändert die Struktur des Oligopeptidsegments nicht nennenswert.

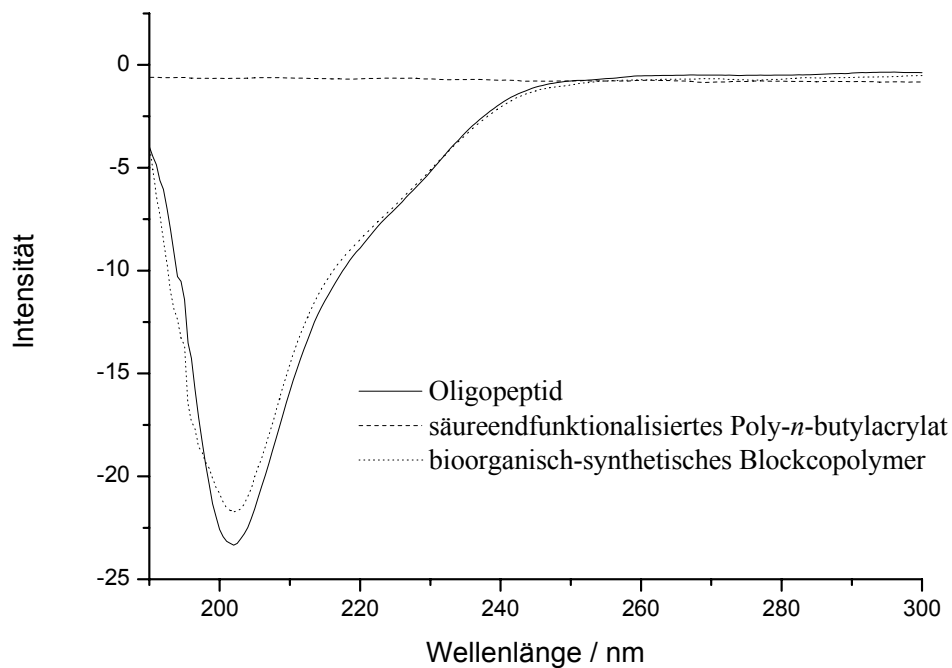


Abbildung 4.6-2: CD-Spektren des säureendfunktionalisierten Poly-*n*-butylacrylats, des Oligopeptids der Sequenz VPGVG und des Blockcopolymer aus diesen beiden Segmenten. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einer Konzentration von 0,5 g/L in MeOH bei Raumtemperatur.

Die Synthese von bioorganisch-synthetischen Blockcopolymeren über die Kupplung des synthetischen Segments an ein Festphasen gebundenes Oligopeptid ist für kurze synthetische Segmente gut geeignet, bei etwas größeren synthetischen Segmenten stößt diese Methode an ihre Grenzen. Um auch die größeren Blockcopolymere synthetisieren zu können, wurde ausgehend von einem Oligopeptid-Makroinitiator eine andere Methode entwickelt.

5. Bioorganisch–synthetische Konjugate über Oligopeptid-ATRP-Makroinitiatoren

5.1 Einleitung

Als eine elegante Methode, die Probleme der Kupplung von Polymeren an Peptide an Festphase zu umgehen, hat sich die Verwendung des Peptidblocks als Makroinitiator für die Initiierung der Polymerisation erwiesen. Makroinitiatoren können bei verschiedenen Polymerisationstechniken eingesetzt werden. Bei der Verwendung eines Peptidmakroinitiators liegt die Herausforderung für das Polymerisationssystem in der Multifunktionalität des Peptidsegments, also der Toleranz der funktionellen Gruppen in den Seitenketten der Aminosäuren, bzw. dem Peptidrückgrat. Da diese Toleranz bei der anionischen, kationischen, sowie freien und kontrollierten radikalischen Polymerisation nicht vorhanden ist, ist es notwendig sie bei dem Einsatz eines Peptidmakroinitiators zu schützen. Der Vorteil des Einsatzes eines Makroinitiators liegt in der Möglichkeit, ein hochmolekulares synthetisches Segment an dem bioorganischen Block aufzubauen. Zusätzlich ist es durch geeignete Schutzgruppentechnik möglich, den Initiator regioselektiv einzuführen.

Der Einsatz eines Festphasen gebundenen Makroinitiators weist bei der Polymerisation einige Nachteile auf, wie zum Beispiel bei der Polymerisationsgeschwindigkeit, der Molekulargewichtsverteilung und dem maximalen Polymerisationsgrad, da die Polymerisation in Abhängigkeit vom eingesetzten Mikrogel durch die Diffusion beeinflusst wird. Zudem kann es bei der Abspaltung vom Harz neben der Freisetzung des bioorganisch-synthetischen Blockcopolymers auch zu einer Veränderung im synthetischen Block kommen, wie zum Beispiel einer teilweisen Verseifung der Ester bei Acrylaten.

Diese Probleme können durch den Einsatz eines Oligopeptid-Makroinitiators in Lösung vermieden werden. Daraus resultieren eine höhere Polymerisationsgeschwindigkeit und ein höherer Polymerisationsgrad. Die Nachteile sind die begrenzte Löslichkeit eines voll geschützten Oligopeptid-Makroinitiators und die notwendige Aufreinigung nach der Polymerisation.

In der Literatur hat es verschiedene Ansätze zur Polymerisation mit funktionalisierten Oligopeptiden an Festphase gegeben. *Becker et al.*⁸⁴ haben hierzu ein Oligopeptid mit einem Alkoxyamin versehen. Anschließend wurden durch NMP *tert*-Butylacrylat und

danach Methylacrylat aufpolymerisiert. Aufgrund der komplexen Polymerarchitektur wurden keine genauen Angaben zur Kontrolle der Reaktion gemacht.

Einen ähnlichen Ansatz haben *Mei et al.*⁸⁵ gewählt. Es wurde an Festphase ein Oligopeptid mit einem ATRP-Initiator versehen und anschließend 2-Hydroxyethylmethacrylat aufpolymerisiert. Nach Abspaltung von der Festphase wurde ein Oligopeptid-*block*-Poly-2-Hydroxyethylmethacrylat mit einer Polydispersität erhalten, die nahe an dem minimalen Wert für die freie radikalische Polymerisation mit Abbruchreaktionen liegt. Weitere kinetische Daten zur Polymerisation wurden jedoch nicht angegeben.

Obwohl die Polymerisation an Festphase eine elegante Methode, gerade auch hinsichtlich der Aufreinigung, darstellt, weist sie dennoch gravierende Nachteile auf. Aufgrund der Immobilität des Initiators an Festphase ist keine homogene Durchmischung und Verdünnung möglich. Die Polymerisation ist von der Diffusionslimitierung innerhalb des Harzes stark geprägt. Dieses führt zu den beobachteten hohen Polydispersitäten der Polymere.

Ein etwas anderer Ansatz zum Einbau von Oligopeptiden ist die Verwendung von Oligopeptid funktionalisierten Makromonomeren. *Ayres et al.*⁸⁶ beschrieben die Polymerisation von Oligopeptid-Methacrylat Makromonomeren durch Atom-Transfer-Radical-Polymerisation. Es wurde ein Oligopeptid der Sequenz VDGVGV verwendet. Die so erhaltenen Polymethacrylat-*pfropf*-Oligopeptide besitzen einen Polymerisationsgrad von 8–14 und eine scheinbare Polydispersität um 1,24. Zum Zusammenhang zwischen Molekulargewicht und Umsatz wurden keine Angaben gemacht, da Makromonomerpolymerisationen schwer zu kontrollieren und schlecht zu analysieren sind.

Im Folgenden wird zunächst der Einfluß der Struktur des Initiators auf die Polymerisation untersucht. Anschließend wird die Synthese des Oligopeptid Makroinitiators diskutiert und die Polymerisation hinsichtlich unterschiedlicher Reaktionsparameter, wie verschiedene Liganden, Temperatur, Lösungsmittelanteil usw. betrachtet.

5.2 Vergleich von α -Säureamiden und α -Ethern als ATRP-Initiatoren

Als Initiatoren für die kontrollierte radikalische Atom Transfer Polymerisation werden hauptsächlich α -Halogenester verwendet. Die Verwendung von α -Brom-funktionalisierten

Säureamiden als Initiatoren findet sich häufig bei der Polymerisation von Acrylamiden mit Rutheniumkatalysatoren.⁸⁷ Eine Ausnahme ist ein von *van Hest et al.* durchgeführter Vergleich einer Polymerisation mit einem Polyethylenglykol Makroinitiator, der terminal zum einen über einen Ester und zum anderen über ein Säureamid mit 2-Bromisobuttersäure als ATRP-Initiator verküpft ist⁸⁸. Bei der Polymerisation des esterfunktionalisierten Makroinitiators wird nach ca. 50 Minuten ein Umsatz von 40% bei guter Polydispersität (< 1,2) erreicht. Bei der Polymerisation des über eine Säureamidfunktion eingeführten Initiators wird erst nach drei Tagen, bei Einsatz von mehr Äquivalenten Cu(I), ein Umsatz von ca. 40% erreicht. Dabei sind die Werte die Polydispersität erhöht.

Es werden zwei Gründe für die langsame Polymerisation genannt: Zum einen eine langsame Initiierung und zum anderen eine Komplexierung des Katalysators durch die Amidbindung.

Der Einfluss der beiden vermuteten Ursachen soll im Folgenden genauer untersucht werden, da die Funktionalisierung des Peptids über eine Amidbindung erfolgt, und auch die Aminosäuren des Peptids über eine Amidbindung verknüpft sind. Zum Vergleich der Initiierung wurde eine Polymerisation mit einem Ester und einem Amid als ATRP-Initiator durchgeführt (Abbildung 5.2-1).

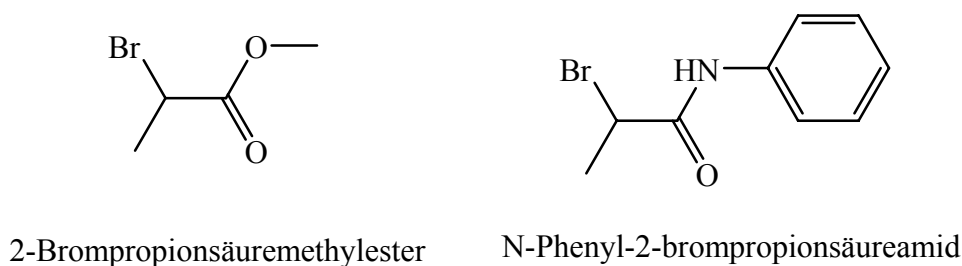


Abbildung 5.2-1: Eingesetzte Modellinitiatoren, zur Ermittlung des Einflusses der Amidbindung auf die Initiierung zu ermitteln.

Die Polymerisationen mit 2-Bromopropionsäuremethylester und N-Phenyl-2-bromopropionsäureamid als Initiator wurden unter Bedingungen durchgeführt, die sich für die Synthese mit Oligopeptidmakroinitiatoren eignen.

Im Folgenden sind die molaren Verhältnisse der bei der Polymerisation eingesetzten Substanzen angegeben: $[\text{Initiator}]_0/[\text{CuBr}]_0/[\text{CuBr}_2]_0/[\text{PMDETA}]_0/[\text{nBA}]_0 = 1/1/0,05/150$. Als Lösungsmittel wurde 90 vol.-% DMF zugesetzt. Die Polymerisation erfolgte bei 40 °C. Während der Polymerisation wurden Proben entnommen, um das Molekulargewicht und den Umsatz zu bestimmen.

In Abbildung 5.2-2 sind der Monomerverbrauch gegen die Zeit und das Molekulargewicht bzw. die Polydispersität gegen den Umsatz aufgetragen.

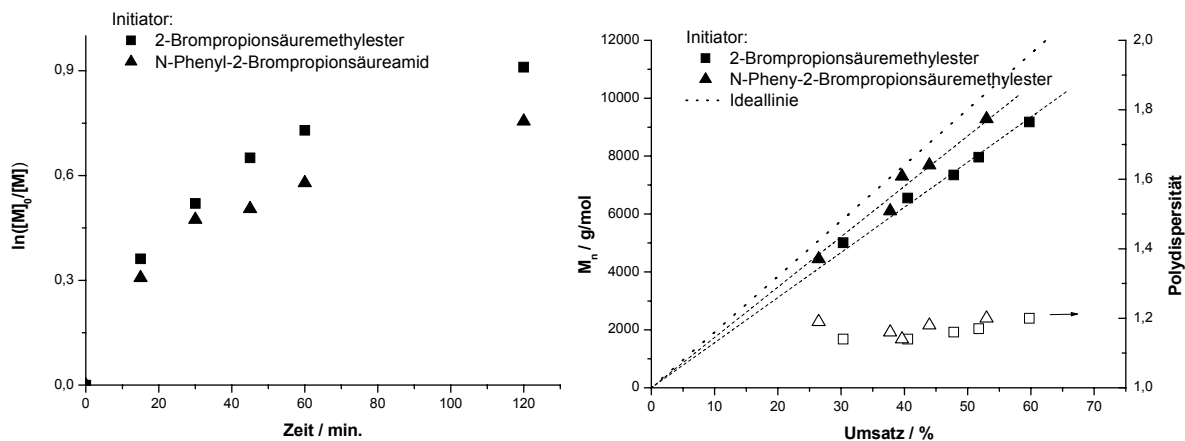


Abbildung 5.2-2: Vergleich eines 2-Br-Propiosäuremethylester und eines N-Phenyl-2-Brompropionsäureamids als Initiator bei der Atom Transfer Polymerisation.

Die Polymerisationsgeschwindigkeiten sind nicht dramatisch unterschiedlich, wie von *van Hest et al.* beschrieben. Eine Verringerung des Monomerverbrauches gegen die Zeit ist bei einem hohen Lösungsmittelanteil von 90% DMF mit steigendem Umsatz bei beiden Polymerisationen zu beobachten. Vermutlich ist dafür die geringe Monomerkonzentration verantwortlich. Ein Abbruch wachsender Ketten ist nicht naheliegend, da er zu einer Erhöhung der Polydispersität führen würde. Die Entwicklung der Molekulargewichte hingegen ist in beiden Fällen nahezu linear, und auch die Polydispersitäten entwickeln sich einheitlich im Rahmen des experimentellen Fehlers.

Es konnte bei der Verwendung von N-Phenyl-2-Brompropionsäureamid als Initiator keine extreme Verlangsamung der Polymerisationsreaktion gegenüber einem 2-Brompropionsäureester Initiator gefunden werden. Daraus ist zu schließen, dass eine Amidgruppe in einem niedermolekularen Initiator keinen wesentlichen Einfluß auf die Initiierung der Reaktion besitzt.

Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass unter anderen Bedingungen die unterschiedlich schnelle Aktivierung eines Broms in Nachbarschaft zu einem Ester bzw. einem Amid zum tragen kommen könnte. Prinzipiell sind $\alpha\text{-C}^*\text{-CONR}_2$ Radikale reaktiver als $\alpha\text{-C}^*\text{-COOR}$ Radikale. Sie werden also langsamer gebildet, initiieren aber schneller eine Polymerisation.

5.3 Synthese von Oligopeptid-Makroinitiatoren

Die Synthese des Oligopeptids erfolgte mit Hilfe eines Peptidsynthesizers an einem Aminoethanol-2-Chlortritylharz mit einem Beladungsgrad von 0,68 g/mmol. Dieses Harz wurde gewählt, da die notwendigen Abspaltbedingungen sehr mild sind (2 % Trifluoressigsäure in Dichlormethan für 2-5 Minuten). Desweiteren ist der C-Terminus nach der Abspaltung des Oligopeptids durch den Aminoethanolspacer blockiert. Dieses ist deshalb vorteilhaft, weil die ansonsten vorliegende Carboxyl-Funktion mit dem ATRP-Katalysator wechselwirken würde. Nach dem Aufbau des Oligopeptids wurde die terminale Fmoc-Schutzgruppe entfernt, und das Harz danach mit NMP gewaschen. Es erfolgte keine Trocknung des Harzes. Versuche, die Kupplung unter Verwendung eines mit Methylenchlorid gewaschenen und getrockneten Harzes durchzuführen, waren nicht erfolgreich. Dieses ist vermutlich durch schlechte Zugänglichkeit des N-Terminus aufgrund von Aggregation des Oligopeptids zu erklären. In Abbildung 5.3-1 ist ein ESI-MS des zu funktionalisierenden Oligopeptids der Sequenz Asp(tBu)-Phe-Gly-Asp(tBu)-Gly gezeigt. Die Sequenz sollte aufgrund des sterischen Anspruchs der geschützten Seitenketten der Asparaginsäureester eine geringe Tendenz zur Aggregation und damit eine gute Löslichkeit zeigen. Zudem besitzt die Sequenz durch den Einbau des Phenylalanins eine aromatische Gruppe als Marker, um die Analyse zu erleichtern.

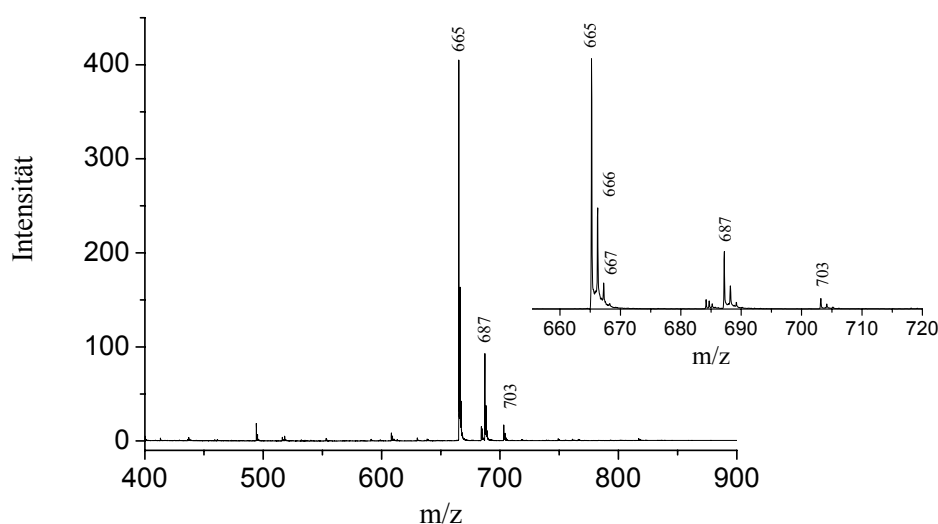


Abbildung 5.3-1: ESI-MS des Ausgangs oligopeptids der Sequenz DFGDG vor der Funktionalisierung

Die Signale des ESI Massenspektrums lassen sich eindeutig zuordnen. Danach wurde die chemische Struktur des Peptidprecursors bestätigt. Verunreinigungen wie Fehlsequenzen oder Doppelkupplung wurden nicht beobachtet (Tabelle 5.3-1).

Tabelle 5.3-1: Zuordnung der Signale des Massenspektrums aus Abb. 5.3-1

m / z	Zuordnung
665	$[M + H]^+$
687	$[M + Na]^+$
703	$[M + K]^+$

Die Kupplung der 2-Brompropionsäure an den N-Terminus des Oligopeptids mit Standardkupplungsreagenzien wie HBTU oder PyBOP gelang nur unvollständig bzw. gar nicht. Ursache hierfür war die Bildung von 2-Oxybenzoltriazolpropionsäure funktionalisierten Oligopeptiden in einer Konkurrenzreaktion (vergl. Abb. 5.3-2). Der Anteil des Nebenproduktes lag bei der Verwendung von HBTU als Aktivator bei ca. 20%. Bei der Verwendung von PyBOP wurde nur das mit Oxybenzoltriazolpropionsäure funktionalisierte Oligopeptid beobachtet. Die Bildung des unerwünschten Produktes lässt sich durch eine nukleophile Substitution des Bromids durch das in der Reaktion gebildete Oxybenzoltriazol-Anion erklären (Abbildung 5.3-2).

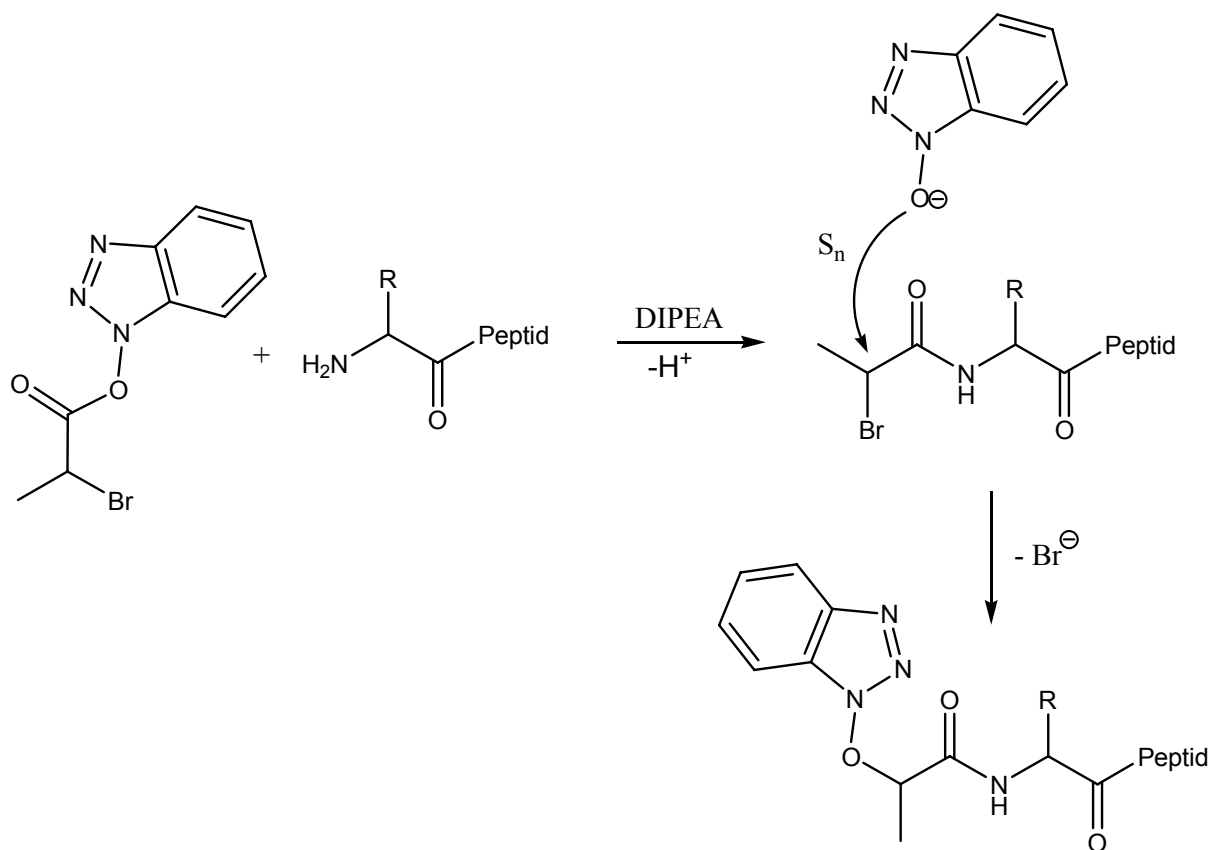


Abbildung 5.3-2: Nebenreaktion des HOBt-Alkoholats während der Kupplung des Initiators an das Peptid.

Die Verhältnisse der Produkte wurden über Intensitäten im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum bestimmt. Die Identifikation der Produkte dagegen fand mittels ESI-MS statt.

Eine alternative, HOBt-freie Route ist die Kupplung des Anhydrids der 2-Brompropionsäure durch Aktivierung mit DCC. Die Kupplung an den N-Terminus des Oligopeptids erfolgte bei Raumtemperatur mit $[\text{Oligopeptid}]:[2\text{-Brompropionsäureanhydrid}]:[\text{Diisopropylethylamin}] = 1:5:1$ in NMP. Nach 2 Stunden wurde mittels Kaisertest die Vollständigkeit der Substitution bestimmt. Im Falle von unvollständiger Kupplung wurde zunächst die Kupplungszeit auf 4 Stunden ausgedehnt bzw. eine doppelte Kupplung durchgeführt. Nach erfolgreicher Kupplung wurde das Harz gründlich gewaschen und getrocknet. Die Abspaltung erfolgte nach Standardbedingungen durch 2%ige Trifluoressigsäure in Methylenchlorid über 2-5 Minuten. Anschließend wurde das Oligopeptid durch Ausfällen in Diethylether isoliert. Nach der Gefriertrocknung aus Wasser/Acetonitril (1:1) wurde das funktionalisierte Oligopeptid durch Massenspektrometrie charakterisiert. Das Spektrum ist in Abbildung 5.3-3 dargestellt.

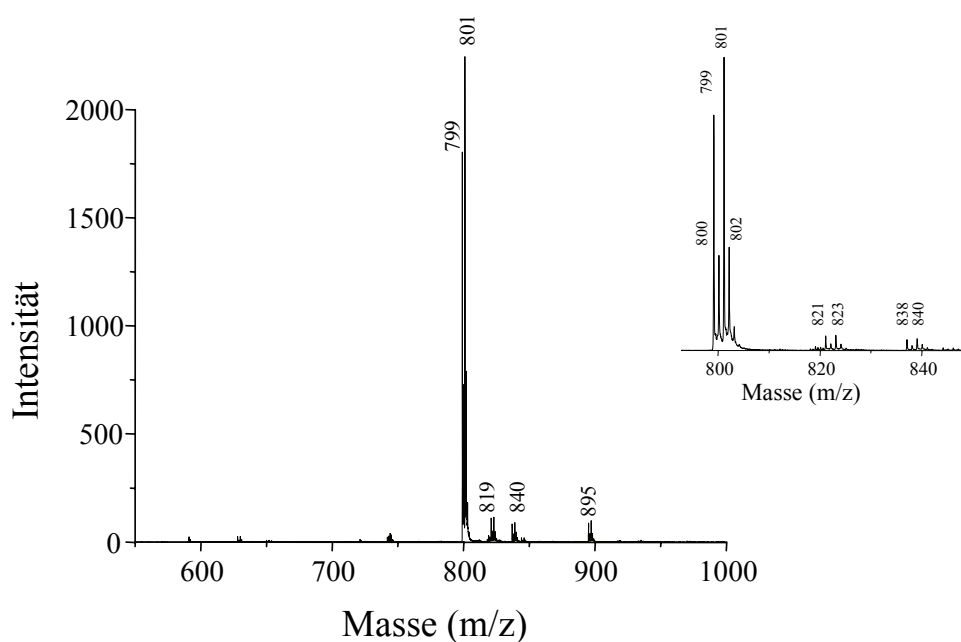


Abbildung 5.3-3: ESI-MS des mit 2-Brompropionsäure funktionalisierten Peptids der Sequenz GDGFD

Die Signale der massenspektrometrischen Untersuchung zeigen die für Bromverbindungen charakteristischen Doppelpicks mit einer Massendifferenz von zwei Dalton. Dies beweist die Einführung des Bromids und ist durch die charakteristische Isotopenverteilung (Br-79: 50,69%; Br-81: 49,31%) bedingt. Die Signale lassen sich, wie in Tabelle 5.3-2 zusammengestellt, eindeutig zuordnen und bestätigen die chemische Struktur des Oligopeptid-Makroinitiators.

Tabelle 5.3-2: Zuordnung der Signale des Massenspektrums aus Abbildung 5.3-3

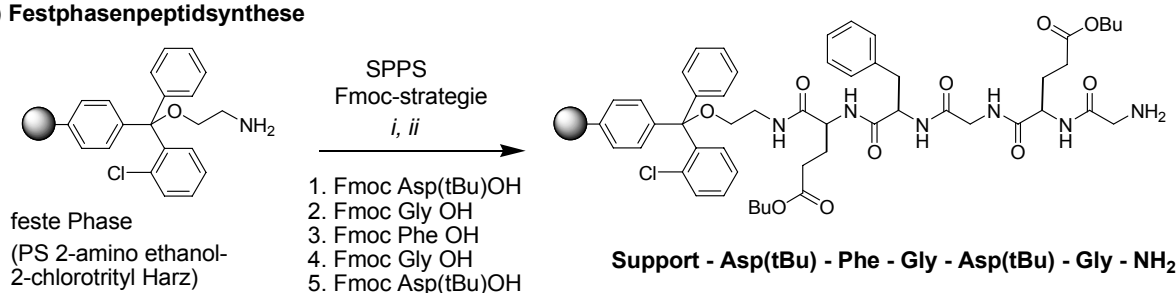
M / z	Zuordnung
799 + 801	$[M + H]^+$
821 + 823	$[M + Na]^+$
838 + 840	$[M + K]^+$
894 + 896	$[M + TFA - H_2O]^+$

Nebenreaktionen bei der Kupplung der 2-Brompropionsäure nach Aktivierung durch DCC wurden durch MS nicht beobachtet.

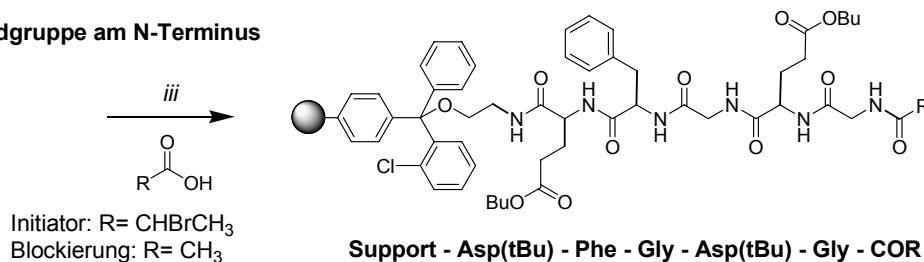
Die Funktionalisierung eines Oligopeptids mit einem ATRP-Initiator über die Anhydridroute ist möglich und stellt einen selektiven Weg zur Synthese von ATRP-Oligopeptid-Makroinitiatoren dar.

Die komplette Synthese des Makroinitiators über den Aufbau des Oligopeptids, die Einführung der Funktionalität am N-Terminus und die Freisetzung von der Festphase ist in der Abbildung 5.3-4 zusammengefasst. Die Synthese erfolgt am Beispiel des als Standard verwendeten Makroinitiators In-GDGFD und des acetylierten Oligopeptids Ac-GDGFD.

(a) Festphasenpeptidsynthese



(b) Einführung einer Endgruppe am N-Terminus



(c) Freisetzung von der Festphase

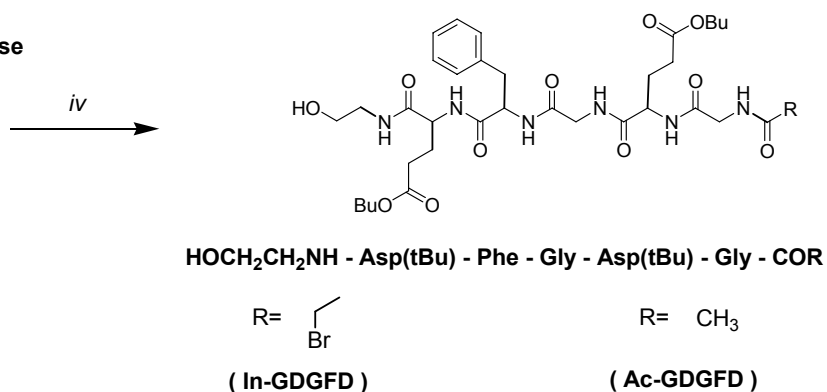


Abbildung 5.3-4: Schema des Aufbaus eines ATRP-Oligopeptid-Makroinitiators. Eingesetzte Reagenzien und Bedingungen:

- Fmoc-Aa-OH, HBTU, DIPEA, NMP, 7,5 min Kupplungszeit
- 20% Piperidin in NMP, 2-3 x 1.5 min. (UV-Detektion bei 301 nm)
- RCO₂H, DCC, NMP, 12 h.
- 2% Trifluoressigsäure in DCM, 10 min.

Durch die eingesetzten Reagenzien ist eine Synthese unter sehr milden Bedingungen möglich. Im Anschluß an die Synthese des Oligopeptid-Makroinitiators wird nun dessen Polymerisation in Lösung untersucht.

5.4 Polymerisation unter Verwendung von Pentamethyldiethyldiamin als Ligand

Der Ligand hat einen entscheidenden Einfluß auf die Polymerisation. Ein häufig verwendeter und kommerziell erhältlicher Ligand ist Pentamethyldiethyldiamin. Die ausgebildeten Kupferkomplexe sind in den verwendeten polaren organischen Lösungsmitteln wie DMSO oder DMF homogen löslich. Daher wurde zunächst dieser Ligand für die Polymerisation mit einem Oligopeptidmakroinitiator eingesetzt.

Bei der Polymerisation von *n*-Butylacrylat mit dem Oligopeptid-Makroinitiator (In-GDGF) wurde der Initiator vorgelegt, in dem Lösungsmittel DMF oder DMSO gelöst und anschließend mit Monomer versetzt. Die Initiierung der Reaktion erfolgte nach Erwärmen der Reaktionsmischung, indem der vorgebildete Katalysatorkomplex zu Initiator und Monomer zugegeben wurde. Diese Vorgehensweise war notwendig, da das Oligopeptid nicht gut in dem Monomer löslich ist. Zudem war ein Start der Polymerisation durch Zugabe des Initiators in einem kleinen Lösungsmittelvolumen wegen seiner begrenzten Löslichkeit und seinen daraus resultierenden Verlusten nicht praktikabel.

Als Katalysatorsystem wurde der PMDETA/CuBr-Komplex unter Zusatz von 5% CuBr₂ verwendet. Der Zusatz von Kupfer(II) zur Reaktion verringert die unkontrollierte Wachstumsphase zu Beginn der ATRP-Reaktion und reduziert damit das Auftreten von Abbruchreaktionen. In folgender Polymerisation wurde als Lösungsmittel für den Oligopeptidmakroinitiator DMSO in einem Anteil von 60 vol.-% in Bezug auf das Monomer verwendet. Auch nach Zugabe des Monomers lag eine klare, homogene Lösung vor. Dieses weist auf die ausreichende Löslichkeit der benutzten Komponenten unter diesen Bedingungen hin. Nach dem Start der Polymerisation durch Zugabe des Katalysators bei 60 °C wurden Proben zur Ermittlung des Polymerisationsfortschritts entnommen. In Abbildung 5.4-1. wird die Entwicklung der Molekulargewichte und Molekulargewichtsverteilungen in Abhängigkeit von der Reaktionszeit anhand von GPC Kurven gezeigt.

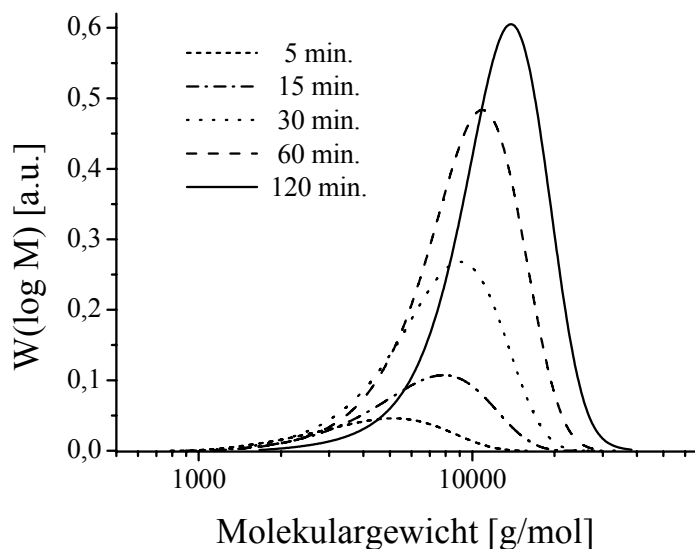


Abbildung 5.4-1: GPC Kurven für die ATRP von n-Butylacrylat initiiert mit einem Oligopeptid Makroinitiator (In-GDGF) bei 60°C. Reaktionsbedingungen: $[nBA]_0/[In]_0/[CuBr]_0/[CuBr_2]_0/[PMDETA]_0 = 114/1/1/0,05/1,05$; DMSO = 60 vol%

Es ist eine kontinuierliche Verschiebung zu höheren Molekulargewichten zu erkennen. Die Abwesenheit einer Bimodalität läßt auf eine weitgehende Unterdrückung der Abbruchreaktion durch Rekombination zweier Radikale schließen. Das so erhaltene Produkt (Oligopeptid-*block*-PnBA) weist ein Molekulargewicht von $M_n = 11000$ und eine Polydispersität von 1,19 auf.

Genauere Aussagen über den Verlauf der Reaktion lassen sich anhand der Reaktionskinetiken in Abbildung 5.4-2 machen.

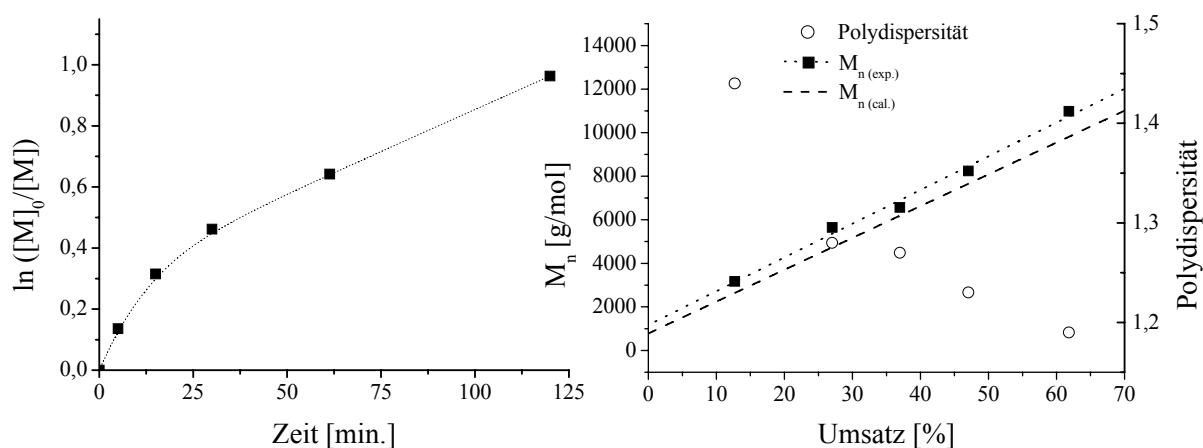


Abbildung 5.4-2: ATRP von *n*-Butylacrylat initiiert mit In-GDGF bei 60 °C. Links: Semilogarithmische Auftragung der Monomerkonzentration gegen die Zeit. Rechts: Abhängigkeit des Molekulargewichts und der Polydispersität vom Umsatz

Aus der Auftragung der Monomerkonzentration gegen die Zeit ist ersichtlich, daß der Umsatz bis zum Abbruch der Reaktion nach 120 Minuten steigt. Allerdings stellt der Verlauf des Monomerverbrauchs gegen die Zeit keine Kinetik erster Ordnung dar. Dieses läßt auf eine Veränderung der aktiven Radikalkonzentration schließen. Eine Abnahme der Radikalkonzentration kann möglicherweise durch eine Verdrängung des PMDETA-Liganden durch die Amidgruppen des Oligopeptidrückgrats als Liganden erklärt werden. Ein ähnliches Verhalten ist bei der ATRP von (Meth)acrylamiden beschrieben worden. Der ATRP-aktive Katalysatorkomplex wird dabei durch Ligandenaustausch in einen Komplex mit geringerer oder keiner ATRP-Aktivität überführt.^{89,90,91}

Als Alternative zu Dimethylsulfoxid wurde N,N-Dimethylformamid als Lösungsmittel verwendet, da in DMSO eine Limitierung hinsichtlich der Löslichkeit gegenüber Poly-*n*-butylacrylat vorliegt. Letzteres ist sowohl für den Oligopeptidblock als auch für das Polymer ein gutes Lösungsmittel. Es wurde zunächst eine Modellpolymerisation mit einem Oligopeptid-Makroinitiator der Sequenz GGFGG durchgeführt. Die Synthese des Oligopeptids erfolgte wieder an einem 2-Aminoethanol-2-Chlortritylharz und seine Funktionalisierung zum Makroinitiator durch 2-Brompropionsäure. Die Polymerisation mit dem Makroinitiator fand bei 60 °C unter folgenden Reaktionsbedingungen statt: $[nBA]_0/[In]_0/[CuBr]_0/[CuBr_2]_0/[PMDETA]_0 = 114/2/1/0,05/1,05$, DMF = 60 vol.-%.

Bei der Polymerisation wurde nach drei Stunden ein Umsatz von ca. 16% ermittelt. Eine Untersuchung der erhaltenen Polymerprobe mittels GPC in NMP/LiBr als Eluent ergab ein Molekulargewicht von $M_{n/app.} = 4000$ und eine Polydispersität von 1,24. Daraufhin wurde die Probe zusätzlich für eine massenspektroskopische Untersuchung durch Maldi-ToF-MS aufgearbeitet. Die erhaltene Verteilung der Massen ist in Abbildung 5.4-3 dargestellt. In dem Spektrum lassen sich zwei homologe Reihen mit einer Wiederholungseinheit von 128 Dalton zuordnen. Dieses Molekulargewicht entspricht dem als Monomer verwendeten *n*-Butylacrylat.

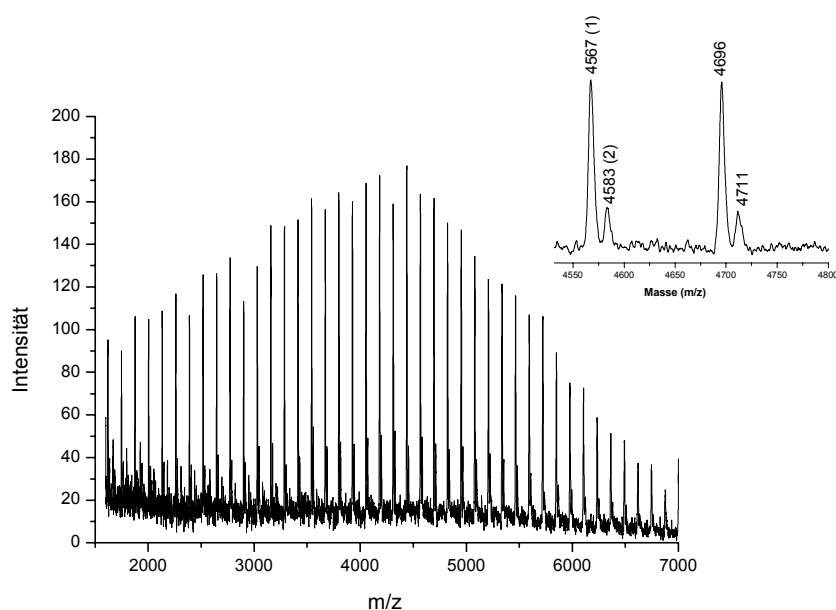


Abbildung 5.4-3: Maldi-ToF Massenspektrum des Blockcopolymers: GGFGG-*block*-Polybutylacrylat.

Die homologen Reihen lassen sich dem Natrium bzw. Kalium Addukt des Blockcopolymers GGFGG-*block*-Polybutylacrylat zuordnen, wobei die Bromendgruppe im Rahmen der Messungengenauigkeit vollständig vorhanden war (Tabelle 5.4-1).

Tabelle 5.4-1: Zuordnung der Signale des Massenspektrums aus Abb. 5.4-3

homologe Reihe	Zuordnung	$M_{th.}$ [Da] für DP_{12}	$M_{exp.}$ [Da]
1	$[M + Na]^+$	4569	4567
2	$[M + K]^+$	4585	4583

In einem weiteren Versuch wurde der Lösungsmittelanteil an der Polymerisation auf insgesamt 90 vol.-%. erhöht. Es sollte die Löslichkeit des Oligopeptid-Makroinitiators in der Reaktionslösung verbessert werden, da das relativ kurze Oligopeptid der Sequenz GDGFD bereits bei einem Lösungsmittelanteil von ca. 50 vol.-%. in der Polymerisationsreaktion nicht mehr vollständig löslich ist. Da aber auch Oligopeptid-Makroinitiatoren mit einer längeren Aminosäuresequenz eingesetzt werden sollen, ist es notwendig, ihre Löslichkeit in der Reaktionslösung zu verbessern. Dieses soll durch die Erhöhung des Lösungsmittelanteils erreicht werden.

Es wurde eine Polymerisation bei 40 °C unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: $[nBA]_0/[In]_0/[CuBr]_0/[CuBr_2]_0/[PMDETA]_0 = 150/1/1/0,05/1,05$, DMF = 90 vol.-%. In Abbildung 5.4-4 sind die Reaktionskinetiken über den Verlauf der Reaktion aufgetragen.

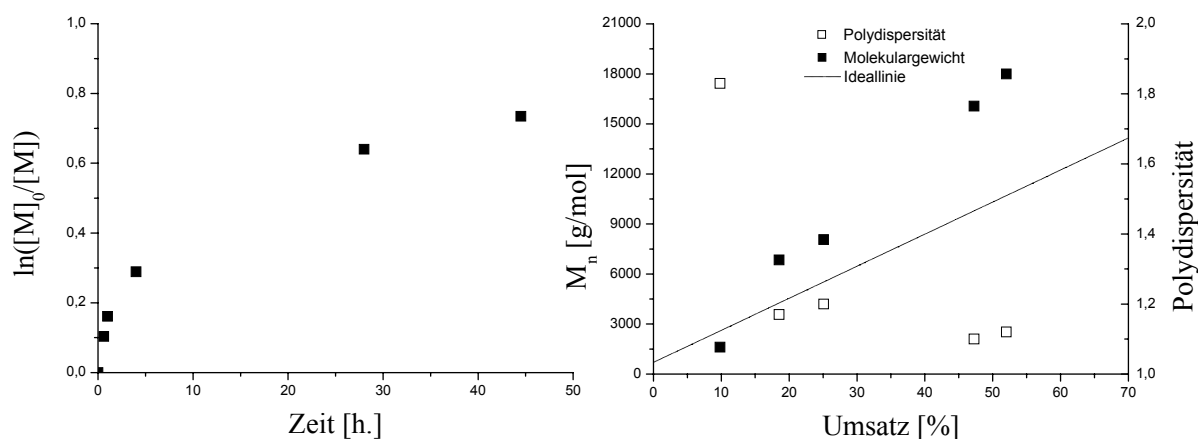


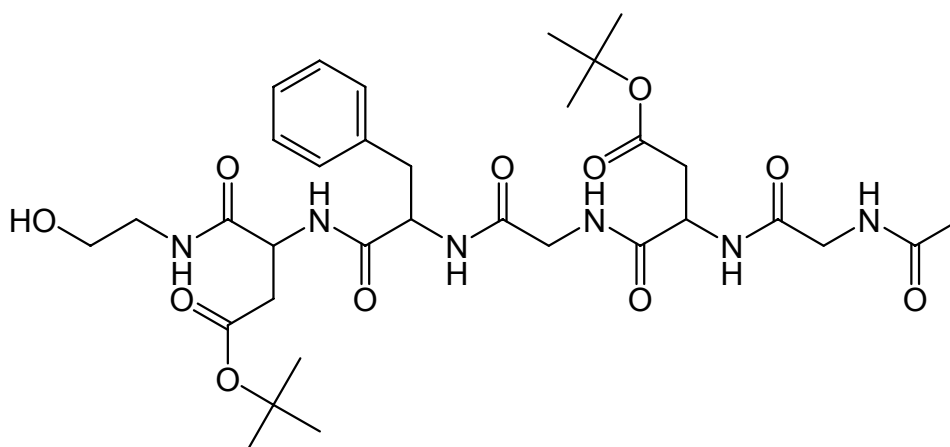
Abbildung 5.4-4: ATRP von *n*-Butylacrylat initiiert mit In-GDGFD bei 40 °C. $[nBA]_0/[In]_0/[CuBr]_0/[CuBr_2]_0/[PMDETA]_0 = 150/1/1/0,05/1,05$, DMF = 90 vol.-%. Links: Semilogarithmische Auftragung der Monomerkonzentration gegen die Zeit. Rechts: Auftragung der Abhängigkeit des Molekulargewichts und der Polydispersität von dem Umsatz.

Die Geschwindigkeit der Polymerisation ist im Vergleich zu der Reaktion bei 60 °C und einem Lösungsmittelanteil von 60 vol.-% stark gesunken. So wird ein Umsatz von 50% erst nach 30 Stunden erreicht. Die langsame Polymerisationsgeschwindigkeit im Vergleich zu der Reaktion mit einem Lösungsmittelanteil von 60 vol.-% ist auf die hohe Verdünnung der Reaktion zurückzuführen. Wie bei den vorherigen Reaktionen lässt sich auch bei dieser Polymerisation eine Verlangsamung der Polymerisationsgeschwindigkeit mit zunehmender Polymerisationsdauer feststellen. Die Entwicklung der Molekulargewichte gegenüber dem Umsatz bleibt aber linear und auch die Polydispersität der Polymerproben sinkt mit zunehmendem Molekulargewicht ab. Allerdings ist aus der Auftragung des Molekulargewichts gegen den Umsatz zu erkennen, dass keine vollständige Initiierung des Makroinitiators stattgefunden hat. Es läßt sich eine Effektivität der Initiierung von ca. 60% berechnen. Dieses kann auf eine verschlechterte Löslichkeit bei einer Reaktionstemperatur von 40 °C zurückzuführen sein.

Es wurde gezeigt, dass sich funktionalisierte Oligopeptide als Makroinitiatoren bei der ATRP Polymerisation eignen. Dieses geht aber im Vergleich zu einem niedermolekularen Initiator mit einer Verlangsamung der Polymerisationsgeschwindigkeit einher, und es ergeben sich Probleme bei der Initiierung. Daher soll im nächsten Kapitel der Einfluß des Peptids auf eine ATRP-Polymerisation näher untersucht werden. Im Anschluß daran wird noch ein stärker bindender Ligand untersucht, um die Polymerisationsgeschwindigkeit zu verbessern und eine vollständige Initiierung zu erreichen.

5.5 Einfluß des Oligopeptids auf die Polymerisation

Aufgrund des Peptidrückgrats und der Funktionalitäten der Seitenketten kann das Peptid potentiell als multidentaler Ligand für das Metallzentrum in Konkurrenz zu dem ATRP Liganden treten.⁹² Um diesen Einfluß zu untersuchen, wurden Reaktionen mit 2-Brompropionsäuremethylester als Initiator durchgeführt. Den Reaktionen wurden verschiedene Anteile an vollständig geschütztem Oligopeptid der Sequenz DFGDG (Asp(tBu)-Phe-Gly-Asp(tBu)-Gly) zugesetzt (Abbildung 5.5-1).

Abbildung 5.5-1: vollgeschütztes Oligopeptid der Sequenz HOCH₂CH₂-DFGDG-Ac

Der C-Terminus des Oligopeptids wurde durch Aminoalkohol blockiert, und der N-Terminus des Peptids wurde acetyliert. Somit entspricht die Sequenz des Oligopeptids dem zuvor verwendeten Makroinitiator, allerdings mit dem Unterschied, dass das acetylierte Oligopeptid die Reaktion nicht initiieren kann. Als Modellpolymerisation wurde die Reaktion mit folgenden Reaktandenverhältnissen $[n\text{Ba}]_0/[In]_0/[CuBr]_0/[CuBr]_0/[PMDTA]_0/[Oligopeptid]_0 = 114/1/1/0,05/1,05/$ (siehe Tabelle 5.5-1) in 60 vol.-% DMSO durchgeführt. 2-Brompropionsäuremethylester wurde als Initiator verwendet. Die Reaktionstemperatur betrug 60 °C. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe der Katalysatorlösung. Die Reagenzien wurden bis auf die Oligopeptidkonzentration immer in demselben Verhältnis zueinander eingesetzt. Die Reaktion wurde unter Zusatz von vier unterschiedlichen Oligopeptidäquivalenten durchgeführt.

Tabelle 5.5-1: Äquivalente des eingesetzten Oligopeptids bei den Reaktionen PEP0, PEP0,2, PEP1, PEP2.

Ansatz	PEP0	PEP0,2	PEP1	PEP2
[Pep]:[Kat]	0:1	0,2:1	1:1	2:1

Im Laufe der Reaktion wurden Proben genommen und mittels NMR der Umsatz der Reaktion bestimmt. Der ermittelte Monomerverbrauch wurde gegen die Reaktionszeit

aufgetragen und die Entwicklung des Molekulargewichtes wurde gegen den Umsatz in Abbildung 5.5-2 dargestellt.

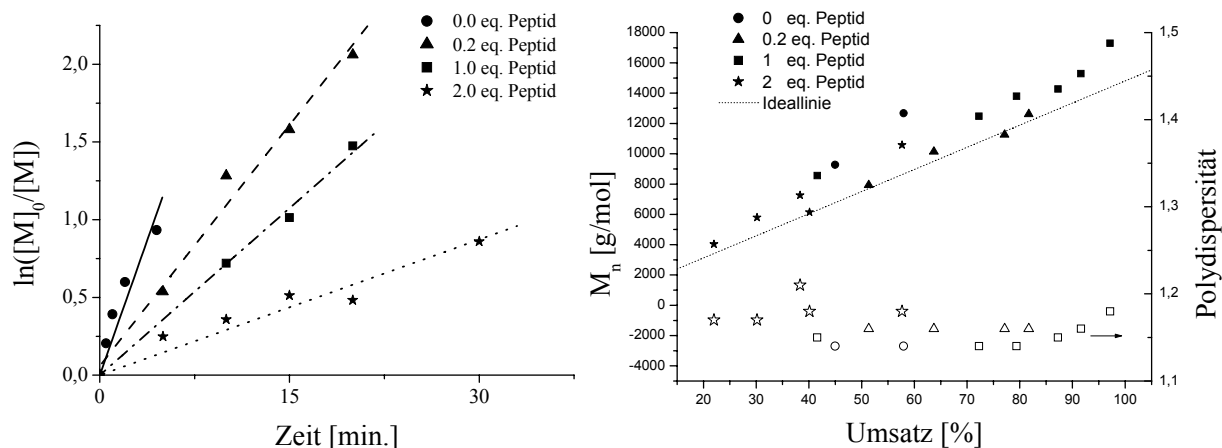


Abbildung 5.5-2: ATRP von *n*-Butylacrylat bei 60 °C mit 2-Brompropionsäuremethylester als Initiator unter Zusatz verschiedener Mengen an Oligopeptid (siehe Tabelle 5.5-1) Links: Semilogarithmische Auftragung der Monomerkonzentration gegen die Zeit. Rechts: Auftragung der Abhängigkeit des Molekulargewichts und der Polydispersität von dem Umsatz.

Bei der semilogarithmischen Auftragung des Monomerverbrauches gegen die Zeit ist ein deutlicher Abfall der Polymerisationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Menge an zugesetztem Oligopeptidanteil festzustellen. Andererseits hat die Zugabe von Oligopeptid aber keinen Einfluß auf die Entwicklung der Molekulargewichte bzw. Polydispersität. Dieses kann durch eine in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration verminderte Reaktivität des Kupferkatalysators erklärt werden.

Vermutlich tritt das Oligopeptid bei der Komplexbildung der Kupferzentren in Konkurrenz mit dem Pentamethyldiethyltriamin Liganden. Der Kupferkomplex kann seine Funktion als ATRP-Katalysator nicht mehr oder nur in vermindelter Effektivität ausüben. Dadurch sinkt die Polymerisationsgeschwindigkeit. Ein ähnlicher Effekt ist bei der Polymerisation von (Meth)acrylamiden beobachtet worden.^{93,94}

Um den systematischen Zusammenhang der Polymerisationsgeschwindigkeit mit der Oligopeptidkonzentration zu verdeutlichen, wurden diese in Abbildung 5.5-3 gegeneinander aufgetragen.

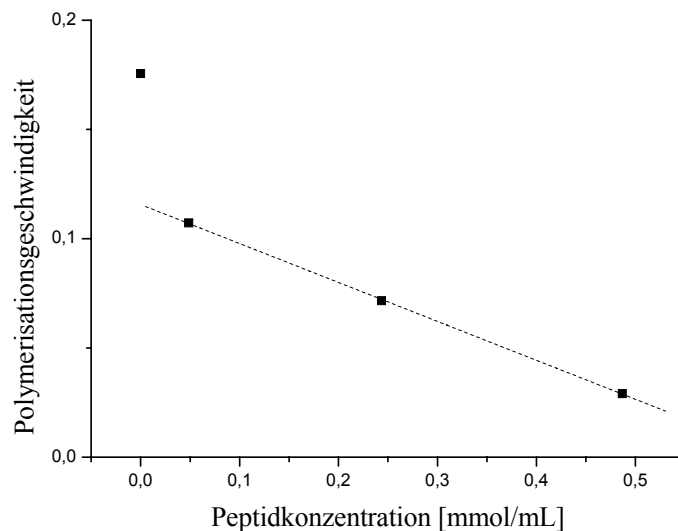


Abbildung 5.5-3: Abhängigkeit der Polymerisationsgeschwindigkeit von der Oligopeptidkonzentration

Aus der Auftragung ist eine lineare Abnahme der Polymerisationsgeschwindigkeit bezogen auf die Oligopeptidkonzentration zu beobachten. Die Polymerisationsgeschwindigkeit der Reaktion ohne Peptidanteil fällt aus der Geraden zugunsten einer höheren Geschwindigkeit heraus, dafür ist vermutlich eine mangelnde Abfuhr der Polymerisationswärme verantwortlich. Die Reaktion ohne Oligopeptid verläuft im Vergleich zu den Reaktionen mit Oligopeptid sehr schnell. Dadurch ist eine Temperaturkontrolle nur schwer möglich.

Der Einsatz von Oligopeptid-Makroinitiatoren für ATRP kontrollierte radikalische Polymerisation sollte bei einer guten Löslichkeit des Oligopeptids also lediglich zu einer Verringerung der Polymerisationsgeschwindigkeit führen, da eine Wechselwirkung mit den Kupfersalzen eintritt. Es sollten aber keine Nebenreaktionen auftreten, die den Aufbau des Polymers stören. Eine Möglichkeit, der Verringerung der Polymerisationsgeschwindigkeit entgegenzuwirken, wäre die Verwendung eines Liganden, der einen stabileren Komplex ausbildet. Hierfür bieten sich Liganden an, die bereits erfolgreich bei der Polymerisation von Acrylamid eingesetzt wurden,⁹⁷ denn Acrylamid tritt ähnlich dem Oligopeptid bei der Komplexbildung des Kupfers in Konkurrenz zu dem Liganden.^{93,94} Eine andere Möglichkeit besteht darin einen Überschuss des

Kupferkatalysators zu verwenden, um ein Abfangen des Katalysators durch die Oligopeptidkette zu kompensieren.⁹⁵

5.6 BPED als Ligand bei der ATRP von Oligopeptid-Makroinitiatoren

N,N'-bis(pyridin-2-yl-methyl-3-hexoxo-3-oxopropyl)ethane-1,2-diamine (BPED)⁹⁶ ist ein vielversprechender Ligand bei der ATRP mit Oligopeptid-Makroinitiatoren, da er bereits recht erfolgreich bei der Polymerisation von N,N-Dimethylacrylamid eingesetzt wurde.⁹⁷ Der mit Kupferhalogeniden gebildete Katalysatorkomplex ist hoch aktiv und zeigt eine gute Stabilität gegenüber Säureamiden und bewirkt eine hohe Polymerisationsgeschwindigkeit bei akzeptablen Polydispersitäten. Dieses soll für die Polymerisation mit Oligopeptid-Makroinitiatoren genutzt werden, um die Polymerisationsgeschwindigkeit zu steigern und eine Deaktivierung des Katalysators im Laufe der Polymerisation zu unterbinden.

In Modellreaktionen wurde zunächst die Polymerisationseigenschaften des Liganden in 90 vol.-% DMF bei verschiedenen Temperaturen mit 2-Brompropionsäuremethylester als niedermolekularem Initiator untersucht. In Abbildung 5.6-1 sind die Ergebnisse der kinetischen Untersuchung aufgetragen.

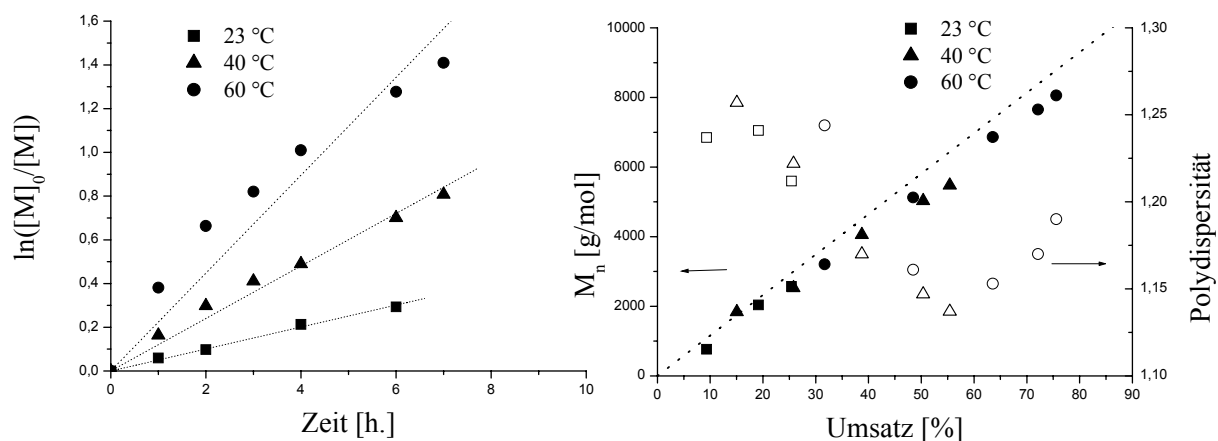


Abbildung 5.6-1: Vergleich der ATRP Reaktion bei der Verwendung eines BPED Liganden bei verschiedenen Temperaturen. $[MA]_0/[In]_0/[CuBr]_0/[CuBr_2]_0/[BPED]_0 = 150/1/1/0.05/1.05$, DMF = 90 vol.-%. (In = 2-Brompropionsäuremethylester). Links: Semilogarithmische Auftragung der Monomerkonzentration gegen die Zeit. Rechts: Auftragung der Abhängigkeit des Molekulargewichts und der Polydispersität von dem Umsatz

Bei einer Polymerisationstemperatur von 60 °C sind deutliche Abweichungen von einem kontrollierten Verlauf der Polymerisation zu beobachten. Dieses wird durch eine gekrümmte Reaktionskinetik sowie durch eine Zunahme der Polydispersität gezeigt. Hingegen verläuft die Polymerisation bei 40 °C kontrolliert. Es findet ein gleichmäßiger Monomerverbrauch statt, der in einer linearen Reaktionskinetik erster Ordnung resultiert. Daher wurde eine ATRP mit dem bereits in Kapitel 5.3 benutzten Oligopeptid-Makroinitiator der Sequenz DFGDG bei 40 °C durchgeführt. Um eine bessere Kontrolle der Reaktion zu erreichen, wurde 5% Kupfer(II)bromid bezogen auf den Initiator hinzugefügt. Die Kinetik der Reaktion ist in Abbildung 5.6-2 aufgetragen.

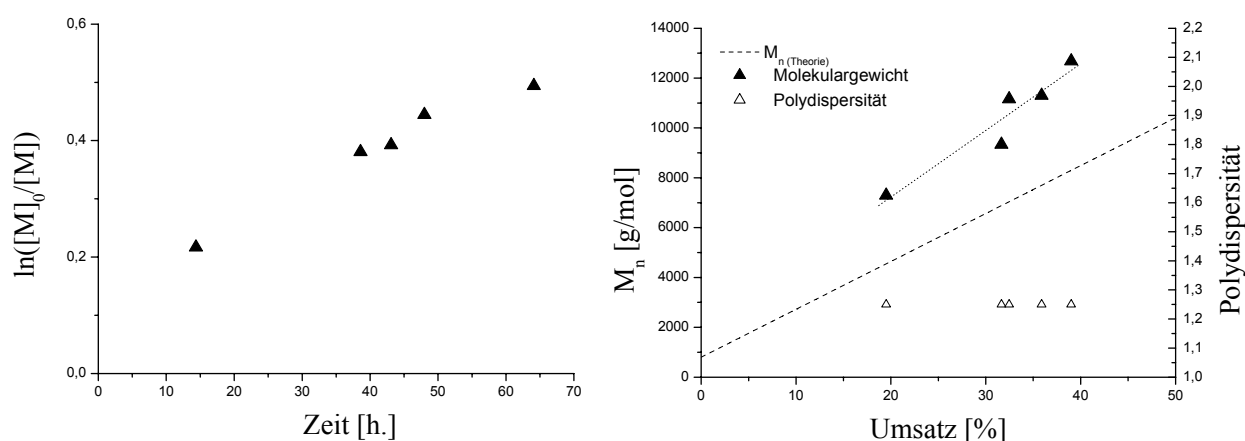


Abbildung 5.6-2: ATRP Reaktion unter Verwendung des BPED-Liganden mit einem Oligopeptid-Makroinitiator $[nBA]_0/[MI]_0/[CuBr]_0/[CuBr_2]_0/[BPED]_0 = 150/1/1/0,05/1,05$, DMF = 90 vol.-%, T = 40 °C. (MI = In-GDGF). Links: Semilogarithmische Auftragung der Monomerkonzentration gegen die Zeit. Rechts: Auftragung der Abhängigkeit des Molekulargewichts und der Polydispersität von dem Umsatz

Die Polymerisationsgeschwindigkeit mit einem Oligopeptid-Makroinitiator ist im Vergleich zur ATRP mit einem niedermolekularen Initiator sehr viel langsamer geworden. Ferner ist sie auch fast um einen Faktor 2 langsamer als die vergleichbare Polymerisation mit PMDETA als komplexbildenden Liganden; bei letzterer werden zudem geringere Polydispersitäten erreicht. Dieses läßt in dieser Polymerisation auf eine höhere Anzahl von Abbruchreaktionen schließen, welches auch durch den abweichenden Verlauf der

Molekulargewichte von der Ideallinie wiedergegeben wird. Es läßt sich eine Initiatoreffektivität von ca. 70 % berechnen. Es ist anzunehmen, dass es in der Reaktion trotz Zugabe von Cu(II) zu einer sehr schnellen Initiierung gekommen ist. Dieses führte zu Abbruchreaktionen in der frühen Phase der ATRP-Reaktion.

Der BPED-Ligand ist unter diesen Polymerisationsbedingungen eine Verschlechterung gegenüber dem PMDETA Katalysatorsystem. Es wurde noch versucht, durch eine Variation der Kupferkonzentration eine Verbesserung zu erreichen; dieses gelang jedoch nicht.

6. Bioorganisch-synthetische Konjugate über RAFT-Polymerisation unter Zusatz eines Oligopeptidüberträgers⁽¹⁾

Der wesentliche Vorteil der RAFT-Polymerisation gegenüber der ATRP ist die Abwesenheit eines auf einem Übergangsmetall basierenden Katalysators. Zusätzlich zeichnet sich die RAFT-Polymerisation durch die Toleranz einer Vielzahl von funktionellen Gruppen aus. Auch in ihrer Handhabung ist sie einfach, da die Reaktionskomponenten direkt zusammengegeben werden können und vor der Initiierung der Polymerisation lediglich entgast werden müssen. Eine Trocknung der Komponenten ist nicht notwendig. Von *Perrier et al.*⁹⁸ sind einige auf Amiden basierende Überträger in Kombination mit verschiedenen Monomeren untersucht worden. Allerdings läßt sich die von ihm angewendete Strategie nur bedingt auf die Synthese von auf Oligopeptid basierenden Überträgern anwenden, da die Aufreinigung durch Säulenchromatographie problematisch ist. Daher wurden alternative Wege zur Synthese des Überträgers an einer Festphase entwickelt, um eine Reinigung durch einfaches Waschen zu ermöglichen. Im Folgenden werden zwei Synthesestrategien zur Darstellung von Oligopeptidüberträgern diskutiert.

Eine Möglichkeit ist die Kupplung eines säurefunktionalisierten Überträgers an den N-Terminus des Festphasen gebundenen Oligopeptids (Abbildung 6-1 [A]). Die Vorgehensweise erfolgt hierbei analog zu der Funktionalisierung eines Oligopeptids mit einem ATRP Initiator. Die andere Möglichkeit ist die Umsetzung eines Festphasen gebundenen ATRP-Oligopeptidinitiators mittels nukleophiler Substitution des Halogens durch Benzoldithiosäure (Abbildung 6-1 [B]). Bei beiden Umsetzungen wurde als Träger ein Polystyrol-2-Aminoethanol-2-Chlortritylharz verwendet, um eine Abspaltung unter milden Bedingungen zu ermöglichen.

⁽¹⁾ Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde in Kooperation mit Dr. Mattijs G. J. ten Cate durchgeführt

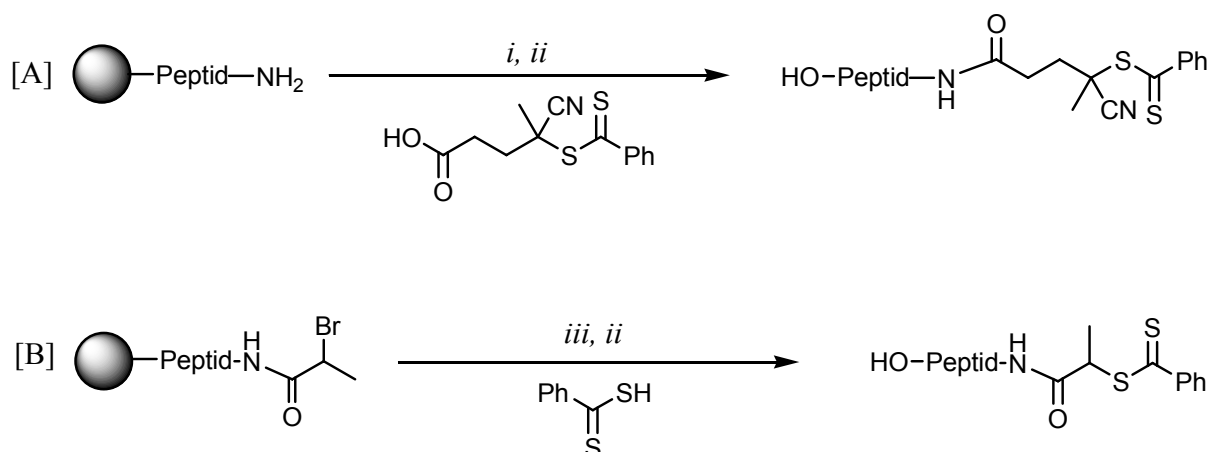
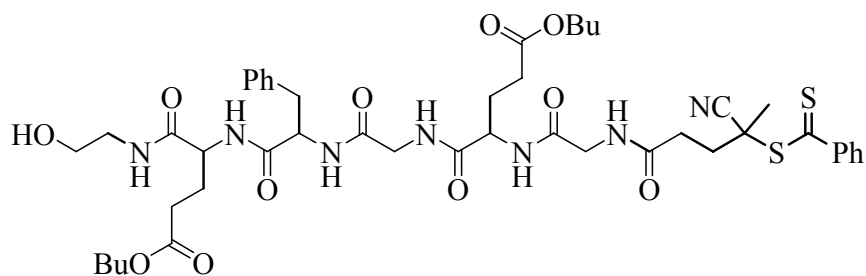


Abbildung 6-1: [A] Synthese eines Peptid-Überträgers durch Kupplung eines säurefunktionalisierten RAFT-Reagenzes an den N-Terminus eines Peptids [B] Synthese eines Peptidüberträgers durch Umsetzung eines Peptid-ATRP Initiators mit Benzoldithiosäure. Reaktionsbedingungen: *i*) DCC, NMP, 4 h, RT; *ii*) 2 % TFA/DCM, 5 min.; *iii*) THF, Pyridin, 15 h, 60 °C

Als erstes wurde die Synthese eines Peptidüberträgers durch Kupplung von 4-Cyano-4-(thiobenzyl)sulfanyl-pentansäure an eine Oligopeptidsequenz untersucht (6.1 [A]). Die Herstellung der 4-Cyano-4-(thiobenzyl)sulfanyl-pentansäure orientierte sich an literaturbekannten Synthesestrategien. Zunächst erfolgte die Synthese von Benzoldithiosäure durch Umsetzung eines Brombenzol Grignards mit Kohlenstoffdisulfid^{99,100,101}. Anschließend erfolgte die Oxidation der Dithiosäure zu dem entsprechenden Dimer^{101,102}. Eine Umsetzung des Dimers mit 4,4'-Azobis(4-cyanovalerinsäure) resultiert in dem säurefunktionalisierten Überträger, welcher zur Kupplung an den N-Terminus eines Oligopeptids eingesetzt werden soll.¹⁰³

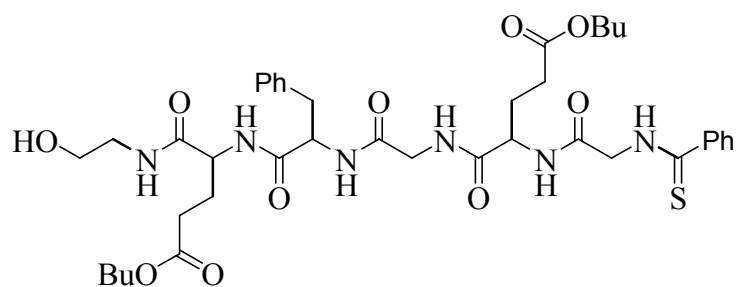
Die Kupplung erfolgte an die Modellsequenz Gly-Asp(tBu)-Gly-Phe-Asp(tBu) durch Standard DCC-Kupplungstechniken in NMP und anschließender Abspaltung des funktionalisierten Oligopeptids durch 2% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid. Das erhaltene funktionalisierte Oligopeptid ist in Abbildung 6-2 dargestellt.



HOCH₂CH₂NH - Asp(tBu) - Phe - Gly - Asp(tBu) - Gly - RAFT

Abbildung 6-2: An Festphase synthetisierter Oligopeptidüberträger

Bei der Untersuchung des Produktes wurde ein Nebenprodukt mit einem Anteil von 24% gefunden. Dieses konnte durch eine Untersuchung mittels HPLC-ESI als ein Thioamid identifiziert werden (Abbildung 6-3).



HOCH₂CH₂NH - Asp(tBu) - Phe - Gly - Asp(tBu) - Gly - thiobenzol

Abbildung 6-3: Struktur des entstandenen Thioamid Nebenprodukts bei der Synthese eines Oligopeptid-Transferreagenzes für die RAFT-Polymerisation

Während Kupplungsreaktion greift das Amin des N-Terminus der Oligopeptidkette als Nucleophil den Dithioester an, es entsteht als Nebenprodukt das Thioamid.

Da es aber nicht in der Lage ist in die RAFT-Polymerisation einzugreifen, weil es bei den gewählten Polymerisationsbedingungen inert ist, wurde auf eine Aufreinigung verzichtet, und die Polymerisationen wurden in dessen Gegenwart durchgeführt. Die Anteile des Nebenproduktes wurden bei der Berechnung der Konzentration des RAFT funktionalisierten Oligopeptids berücksichtigt.

Die Polymerisationen wurden bei einer Reaktionstemperatur von 60 °C durchgeführt. Als Radikalstarter wurde AIBN in unterschiedlichen Anteilen zugesetzt (R1-Pep: $[AIBN]_0/[RAFT-Pep]_0 = 0,1/1$; R2-Pep: $[AIBN]_0/[RAFT-Pep]_0 = 0,05/1$). Um eine gute Löslichkeit zu gewährleisten, wurde ein Monomer/Oligopeptid-Verhältnis von 1050 zu 1 gewählt, bei einem Lösungsmittelanteil von 60 vol.-% DMF. Die Reaktionstemperatur betrug 60 °C.

In Tabelle 6-1 sind die Ergebnisse der Reaktionen R1-Pep und R2-Pep aufgeführt. Die ermittelten Zahlenmittel der Molekulargewichtverteilung wurden mittels GPC in THF unter Verwendung eines Polybutylacrylat Standards bestimmt.

Tabelle 6-1: Ergebnisse der Untersuchung von Polymerproben, hergestellt durch RAFT-Polymerisation unter Verwendung des Oligopeptidüberträgers

Reaktion	Polymerisations- dauer / h	Umsatz _(¹H-NMR) / %	$M_{n(th.)}$ / g/mol	M_n / g/mol	PDI
R1-Pep	70	68	88.000	97.900	1,32
R2-Pep	41	48	61.700	70.400	1,20

Nach vielversprechenden Polymerisationsversuchen wurde anhand von Reaktion R3-Pep die Kinetik der Reaktion aufgenommen. Hierzu wurden im Laufe der Reaktion mehrere Proben genommen. Als Radikalstarter wurden 5% AIBN zugesetzt. In Abbildung 6-4 sind von dieser Reaktion die Entwicklung des Monomerverbrauches gegen die Zeit sowie die des Zahlenmittels des Molekulargewichts, bzw. der Polydispersität, gegen den Umsatz aufgetragen.

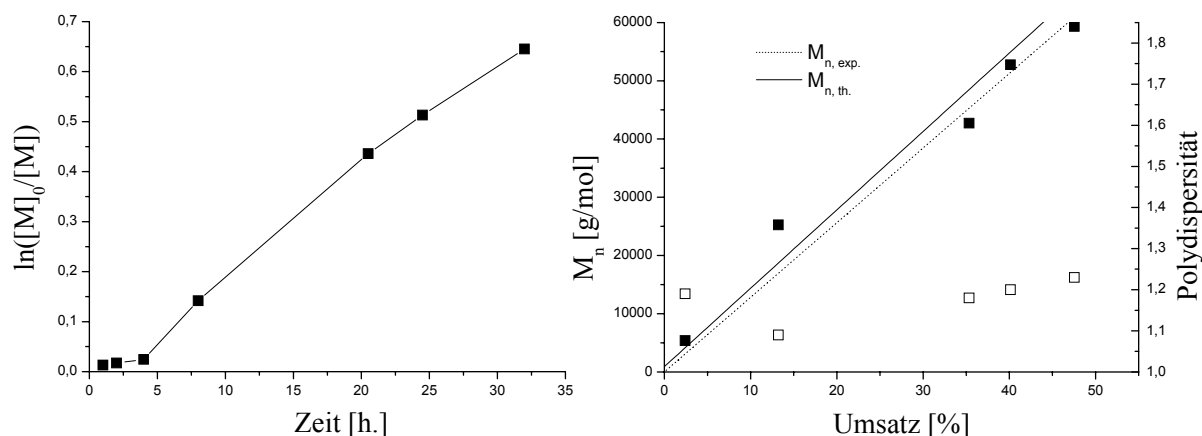


Abbildung 6-4: RAFT Polymerisation von *n*-Butylacrylat mit einem Oligopeptidüberträger bei 60 °C. Reaktionsbedingungen: $[n\text{Ba}]_0/[Überträger]_0/[AIBN]_0 = 1050/1/0,05$, DMF = 60 vol.-%. Links: Auftragung der Monomerkonzentration gegen die Zeit; Rechts: Auftragung des Molekulargewichts, bzw. der Polydispersität, gegen den Umsatz

Aus der Auftragung der Monomerkonzentration gegen die Zeit ist eine Retardierung der Initiierung von ungefähr 4 Stunden zu erkennen. Dieses Phänomen wird häufig bei RAFT Polymerisationen beobachtet. Es wird vermutet, dass zu Beginn der Reaktion eine Terminierung der freien Radikale durch Verunreinigungen in der Lösung auftritt^{104,105,106,107,108}.

Nach erfolgter Initiierung verläuft der Monomerverbrauch bei semilogarithmischer Auftragung linear nach erster Ordnung. Nach 32 Stunden wird ein Umsatz von 50% erreicht. Die Polydispersität bewegt sich dabei um 1,2 und die Molekulargewichte entwickeln sich linear in guter Übereinstimmung mit den theoretischen Werten. Dieses lässt auf eine gute Kontrolle der Reaktion schließen.

Allerdings entsteht bei dieser Syntheseroute zum Oligopeptidüberträger immer auch das Thioamid als Nebenprodukt. Daher wurde ein anderer Zugangsweg entwickelt. Dieser geht von dem bereits in Kapitel 5 diskutierten Oligopeptid-ATRP-Initiator aus. Die Umsetzung des Oligopeptid-ATRP-Initiators zum Oligopeptidüberträger für die RAFT-Polymerisation erfolgt an einer Festphase, um eine einfache Aufreinigung und Isolierung zu gewährleisten. Zunächst wurde eine nucleophile Substitution mit frisch hergestelltem

Benzylthiomagnesiumbromid versucht (Abbildung 6-5). Dessen Synthese erfolgte ausgehend von Brombenzol über eine Grignardreaktion unter anschließendem Zusatz von Kohlenstoffdisulfid.

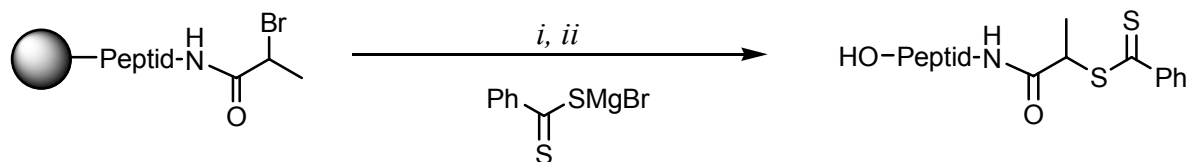
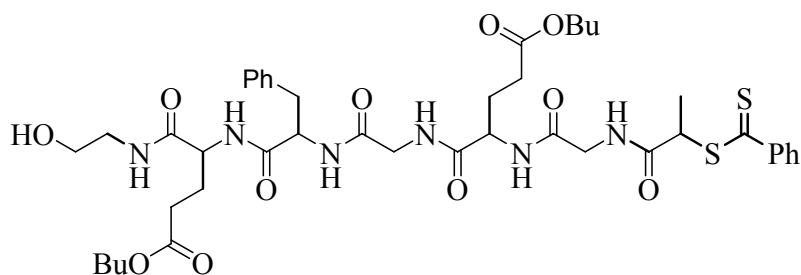


Abbildung 6-5: Umsetzung eines Festphasen gebundenen Oligopeptid-ATRP-Initiators zu einem Oligopeptidüberträger; Bedingungen: *i*) THF, 15 h, 60 °C; *ii*) 2 % TFA/DCM, 5 min.

Die Umsetzung gelang aber nur unvollständig. Wahrscheinlich lag in der Reaktionslösung noch eine geringe Menge an kolloidalem Magnesium vor, welches aufgrund der hohen Oberfläche stark aktiviert und damit sehr reaktiv ist.¹⁰⁹ Es liegt nahe, dass das überschüssige Mg^0 mit der Bromid Funktionalität des Oligopeptids eine Grignardverbindung ausbildet und so die gewünschte Reaktion verhindert. Begünstigt wird diese Nebenreaktion dadurch, dass bei der Reaktion an Festphase hohe Überschüsse eingesetzt werden, um eine vollständige Umsetzung zu erreichen.

Ein abgewandelter Ansatz ist die Umsetzung des Oligopeptid-ATRP-Initiators in einer nucleophilen Reaktion mit einer Dithiosäure (Abbildung 6-1 [B]). Nach der Synthese der Benzoldithiosäure erfolgt eine Aufreinigung, um unverbrauchtes Magnesium zu entfernen. Die Aktivierung der Dithiosäure zur Umsetzung mit dem an Festphase gebundenen Oligopeptid-ATRP-Initiator erfolgt *in situ* mit Pyridin. Als Oligopeptid wurde die Standardaminosäuresequenz (Gly-Asp(*t*Bu)-Gly-Phe-Asp(*t*Bu)) verwendet. Der nach der Abspaltung mit 2% Trifluoressigsäure in DCM erhaltene Oligopeptidüberträger ist in Abbildung 6-6 dargestellt.



HOCH₂CH₂NH - Asp(tBu) - Phe - Gly - Asp(tBu) - Gly - RAFT

Abbildung 6-6: Synthetisierter Oligopeptidüberträger ausgehend von einem ATRP-Makroinitiator

Die vollständige Umsetzung zu dem Oligopeptidüberträger konnte durch ¹H-NMR, ESI-MS, sowie HPLC bestätigt werden. Es sind keine Nebenreaktionen aufgetreten. Durch die Umsetzung und das Reinigen durch Waschen an Festphase ist eine chromatographische Aufreinigung nach der Abspaltung nicht nötig. Dieses ist bei komplexeren Peptiden ein großer präparativer Vorteil.

Die Polymerisationseigenschaften des Oligopeptidüberträgers wurden anhand einer RAFT-Polymerisation von *n*-Butylacrylat untersucht. Die Reaktion erfolgte in DMF bei 60 °C und einem Zusatz von 20 mol% AIBN als Radikalstarter. Die Auftragung der kinetischen Daten läßt auf eine gute Kontrolle der Reaktion schließen (Abbildung 6-7). Das Molekulargewicht nimmt bei einer Polydispersität von ~ 1,1 linear mit dem Umsatz zu. Die semilogarithmische Auftragung zeigt eine Verzögerung der Initiierung von 8 Stunden, anschließend entwickelt sich eine Kinetik erster Ordnung. Auch bei einer weiteren Polymerisation mit 5 mol% AIBN als Radikalstarter tritt eine Verzögerung der Initiierung von 8 Stunden auf (Abbildung 6-7). Die Steigung der Kinetik erster Ordnung ist, wie zu erwarten, um das vierfache geringer und stimmt gut mit der Polymerisationsgeschwindigkeit anhand der theoretisch gebildeten Radikale überein.

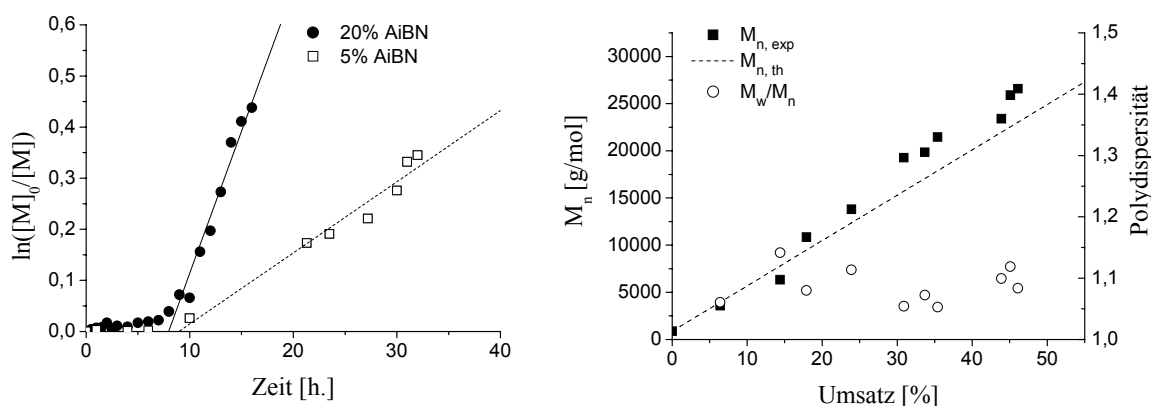


Abbildung 6-7 RAFT Polymerisation von *n*BA bei 60 °C. Reaktionsbedingungen: $[nBA]_0/[Überträger]_0/[AIBN]_0=375/1/0,2(0,05)$; DMF = 60 vol.-%. Links: Semilogarithmische Auftragung der Monomerkonzentration gegen die Reaktionszeit. Rechts: Molekulargewicht bzw. Polydispersität gegen den Umsatz.

Um den Einbau des Oligopeptidsegments in das Polymer zu zeigen, wurde ein weiteres Blockcopolymer mit geringerem Molekulargewicht hergestellt ($[nBA]_0/[Überträger]_0/[AIBN]_0 = 120/1/0,2$; DMF = 60 vol.-%). Das erhaltene Blockcopolymer wurde mehrfach in MeOH/H₂O ausgefällt und aus Acetonitril/Benzol gefriergetrocknet. Im ¹H-NMR sind neben den charakteristischen Signalen für das Poly-*n*-butylacrylat Segment auch Signale des Oligopeptidsegments vorhanden. Aus den Signalen läßt sich ein Polymerisationsgrad von ($n = 29$) ermitteln, dieses entspricht einem Zahlenmittel des Molekulargewichts von 4600 Dalton. Eine Untersuchung des Blockcopolymers mit GPC erbrachte ein enges Signal mit einer Polydispersität von 1,18 und einem Zahlenmittel des Molekulargewichts von 4100 Dalton. Dieses stimmt innerhalb des experimentellen Fehlers gut mit dem durch die ¹H-NMR Endgruppenanalyse bestimmten Molekulargewicht überein.

Das Oligopeptid-Poly-*n*-butylacrylat konnte auf diesem Weg erfolgreich hergestellt werden. Die RAFT-Polymerisation besitzt ein großes Potential zur Synthese von bioorganisch-synthetischen Blockcopolymeren, da keine Übergangsmetalle als Katalysatoren notwendig sind. Diese besitzen *in vivo* eine cytotoxische Wirkung und müßten deshalb bei einem entsprechenden Einsatz aufwendig entfernt werden.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Bioorganisch-synthetische Blockcopolymere sind sowohl für die Materialwissenschaft als auch für die Medizin hochinteressant. Diese Arbeit beschäftigte sich mit neuen Synthesewegen für die Herstellung dieser Blockcopolymere. Zunächst wurde der klassische Ansatz zur Herstellung eines Blockcopolymers über die Kupplung der beiden Segmente aufgegriffen. Hierzu wurde eine Methode zur Synthese von selektiv säureendfunktionalisierten Polyacrylaten mittels einer terminalen Benzylesterschutzgruppe vorgestellt. Sie ist erforderlich, um bei der anschließenden Verknüpfung mit dem N-Terminus der terminalen Aminosäure des Oligopeptids keine Pfropfung des Oligopeptids auf dem Polymerrückgrat als Nebenreaktion zu erhalten. Die Kupplung erfolgte an einem an eine Festphase gebundenen Oligopeptid, um das überschüssige Polymer nach der Kupplung gut abtrennen zu können. Ein Nachteil besteht in der Limitierung der Größe des zu kuppelnden Polymerblocks, da die Diffusion innerhalb des als Festphase verwendeten vernetzten Polystyrolharzes begrenzt ist, und das Zusammentreffen der Endgruppen aus sterischen Gründen immer unwahrscheinlicher wird.

Für die Herstellung von bioorganisch-synthetischen Blockcopolymeren mit einem größeren Polymersegment wurde daher ein anderer Syntheseansatz entwickelt. Dieser geht von einem funktionalisierten Oligopeptid aus, an dem durch Polymerisation das synthetische Segment aufgebaut wird. Der Aufbau erfolgte durch kontrolliert radikalische Polymerisation, um ein möglichst definiertes Segment zu erhalten. Zunächst wurde eine Synthese von Oligopeptid-Makroinitiatoren für die ATRP-Polymerisation durchgeführt. Der ATRP-Initiator wurde durch eine Kupplung von aktivierter 2-Brompropionsäure an den N-Terminus des Oligopeptids erhalten. Anschließend konnte gezeigt werden, dass in geeigneten polaren Lösungsmitteln (DMSO, DMF) eine Polymerisation mit dem ATRP-Oligopeptid-Makroinitiator erfolgreich ist. Allerdings kam es während der Polymerisation zu Wechselwirkungen zwischen dem Katalysator und dem Oligopeptid. Dieses bewirkte eine starke Verringerung der Polymerisationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit des Oligopeptid / Katalysator Verhältnisses. Versuche, den BPED-Liganden, welcher erfolgreich für die Polymerisation von Acrylamid eingesetzt wurde, an die Polymerisationsbedingungen mit einem Oligopeptid-Makroinitiator anzupassen, gelang nicht. Eine nennenswerte Beeinflussung der ersten Initiierung durch die zum Halogen α -ständige Amidgruppe konnte nicht beobachtet werden.

Die Verwendung eines Übergangsmetallkatalysators bei der ATRP ist ebenfalls ein Nachteil, da dieser bei einem Einsatz als pharmazeutische Substanz vollständig entfernt werden müßte.

Eine Alternative bietet die RAFT-Polymerisation, weil sie ohne einen Katalysator durchgeführt wird. In einem ersten Ansatz wurde ein säurefunktionalisierter RAFT-Überträger synthetisiert und nach Aktivierung an das Oligopeptid gekuppelt. Dabei zeigte sich jedoch, daß bei der Kupplung eine Nebenreaktion auftritt. Das erhaltene Nebenprodukt war allerdings gegenüber den Polymerisationsbedingungen inert, so daß sich trotzdem eine erfolgreiche Polymerisation durchführen ließ. Der Oligopeptidüberträger ist für die Synthese von bioorganisch-synthetischen Blockcopolymeren geeignet. In weiteren Versuchen gelang es, ausgehend von dem Oligopeptid-ATRP-Makroinitiator, den Überträger frei von Nebenprodukten herzustellen. Die RAFT-Polymerisation mit einem Oligopeptidüberträger stellt eine wichtige Methode für die Herstellung von bioorganisch-synthetischen Blockcopolymeren dar. Sie besitzt eine hohe Toleranz gegenüber funktionellen Gruppen. Die so hergestellten Blockcopolymere sind frei von Verunreinigungen, wie z.B. Übergangsmetallen. Dabei läßt sich das Molekulargewicht des synthetischen Blocks bei einer Polydispersität um 1,2 gut kontrollieren.

In nächsten Schritten dürften jetzt gezielt bioorganisch-synthetische Blockcopolymere hergestellt werden können, die im bioorganischen Segment eine Information tragen. Es bleibt zu untersuchen, in welchem Größenverhältnis die Segmente zueinander stehen dürfen, damit diese Information erhalten bleibt. Das Endziel ist die Entwicklung von maßgeschneiderten funktionellen Blockcopolymeren für die Materialwissenschaft und die Medizin.

8. Experimenteller Teil

8.1 Verwendete Chemikalien

2-Brompropionsäure	Aldrich, 98%, gereinigt durch Destillation
2-Brompropionsäurebromid	Aldrich, 97%, gereinigt durch Destillation
Dichlormethan	BASF, gereinigt durch Destillation über Calciumhydrid
Diisopropylethylamin	Aldrich, 99%, gereinigt durch Destillation
Dimethylformamid	Aldrich, 99%, gereinigt durch Destillation
Kupferbromid	Aldrich, 99%, zur Reinigung über Nacht in Eisessig gerührt; anschließend mit trockenem Methanol und Diethylether gewaschen und bei reduziertem Druck getrocknet
Methylacrylat	Aldrich, 99%, gereinigt durch Destillation, gelagert bei -10 °C unter Lichtausschluß
<i>n</i> -Butylacrylat	Aldrich, 99%, gereinigt durch Destillation, gelagert bei -10 °C unter Lichtausschluß
NMP	gereinigt durch Filtration über eine Säule, bestehend aus saurem, basischem und neutralem Aluminiumoxid, anschließend durch Destillation über eine Kolonne gereinigt
Piperidin	Aldrich, 99%, gereinigt durch Destillation
PMDETA	Aldrich, 99%, gereinigt durch Destillation

Alle anderen Chemikalien wurden eingesetzt wie erhalten. Der Bezug der Chemikalien, in der notwendigen Reinheit, erfolgte von gängigen Unternehmen wie zum Beispiel Aldrich, Fluka, Nova Biochem und Iris Biotech.

8.2 Analytische Methoden:

Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR, nuclear magnetic resonance) wurde an einem Bruker DPX-400 Spektrometer durchgeführt. Die Spezifizierung der Aufspaltung der Signale der NMR-Spektren erfolgte nach s (singulet), d (doublet), t (triplett), m (multiplett) und b (broad).

Als Lösungsmittel wurden CDCl_3 , DMF-d_7 und DMSO-d_6 verwendet.

Infrarotspektroskopie (IR) wurde an einem Biorad 6000 FT-IR durchgeführt. Die Intensität der Signale wurde in s (strong), w (weak) unterschieden.

Hoch auflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC, high pressure liquid chromatography) erfolgte an einer Chromatographiesäule der Firma YMC (R&D PRO C18; 150 mm x 4,6 mm; Partikelgröße μm) mit Methanol/Wasser (HPLC-Grade) als Laufmittel und einer Flußgeschwindigkeit von 0,4 mL/min.. Die Proben wurden in Methanol gelöst (1 mg/mL) und jeweils ein Volumen von 50 μL auf die HPLC-Säule gegeben. Die UV-Detektion wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm durchgeführt.

Elektrospray Massenspektrometrie (ESI-MS, electron spray ionisation mass spektroskopy) wurde an einem LC-ESI-MS – qp8000 α der Firma Shimadzu (Duisburg, Deutschland) durchgeführt. Die Detektionsspannung betrug 1,6 kV im positiven Modus mit einer Düsentemperatur von 150 °C und einer Beschleunigungsspannung von 4,5 kV.

MALDI-TOF Massenspektrometrie (matrix assisted laser desorption/ionisation –time of flight mass spektroskopy) erfolgte an einem Voyager-DE STR Biosystems, Inc. Framingham, MA, USA. Die Proben wurden in einer Konzentration von 0,1 mg/mL in THF gelöst. 1 μL der gelösten Probe wurde mit 1 μL einer Matrixlösung (z.B. α -Cyano-4-hydroxymizsäure, 10 mg/mL) gemischt. Von dieser Mischung wurde 1 μL auf eine Probenplatte aufgebracht und bei 24 °C getrocknet. Die Messung wurde bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV vorgenommen. Aus einem Mittel von 250 Laserbeschüssen auf die Probe ergab sich das jeweilige Spektrum.

Circulardichroismus (CD)-Messungen wurden an einem Spektrometer J 715 der Firma Jasco durchgeführt. Die Messung der Probe erfolgte bei Raumtemperatur in einer Quarzküvette mit einer Wandstärke von einem Millimeter.

Elementaranalysen erfolgten an einem Vario RL Elementar der Firma: Elementar Analysensysteme, Hanau, Deutschland.

Größenausschlußchromatographie (SEC, size exclusion chromatography) wurde in THF durchgeführt. Die Trennung der Proben erfolgte durch 3 μ -MZ-SDV Säulen mit Porengrößen von 10^3 , 10^5 und 10^6 Å und einer Flußgeschwindigkeit von 1 mL/min.. Die Detektion der Fraktionen erfolgte an einem RI- (Shodex RI-71) und einem UV-Detektor (TSP UV 1000; 260 nm). Zur Kalibrierung wurden Polystyrol Standards von PSS (Deutschland) verwendet.

8.3 Experimentelle Vorschriften:

8.3.1 Durchführung eines Kaisertests:

Der Kaisertest ist ein präparativer Test auf primäre Amine. Er besteht aus drei Reagenzlösungen:

1. 500 mg Ninhydrin in 10 mL 95% Ethanol
2. 5g Phenol in 1,25 mL 95% Ethanol
3. 2 mL 0,001 M KCN-Lösung (0,6512 mg/10 mL H₂O) mit destilliertem Pyridin auf 100 mL aufgefüllt.

Der Kaisertest wird an einem trockenen Harz durchgeführt. Das Harz wird jeweils mit 2 Tropfen der Reagenzlösungen versetzt und in einem Ölbad für 90 Sekunden auf 80 °C erwärmt. Anschließend werden die Harzkügelchen mit einer Lupe auf eine Blaufärbung hin untersucht. Tritt eine Blaufärbung auf, ist dies ein Hinweis auf primäre Amine. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass der Kaisertest z.B. durch Schwefelverbindungen verfälscht wird.

8.3.2 Durchführung eines Sangertests:

Ein Volumen von 400 µL Reagenzlösung (1-Fluoro-2,4-dinitrobenzen in absolutem Ethanol (1 mg/mL)) wird zu 400 µL NMP bzw. DMF hinzu gegeben. Als Blindprobe werden 400 µL absoluter Ethanol zu 400 µL Reagenzlösung zugeführt. Beide Lösungen werden für einen Zeitraum von 30 Minuten in der Dunkelheit stehen gelassen. Anschließend erfolgt eine Vermessung an einem UV-Messgerät bei 381 nm. Die Differenz der Absorption der Lösung soll kleiner als 0,1 sein.

8.3.3 Annäherung des Beladungsgrads eines Fmoc-geschützten Harzes¹¹⁰

Ist das Harz nicht mit einer Fmoc-Schutzgruppe versehen, so muß diese über einen Kupplungsschritt eingeführt werden.

In zwei UV-Küvetten wird, bezogen auf die Fmoc-Schutzgruppe, jeweils ungefähr ein μmol des Harzes eingewogen. Zu diesen und in eine Referenzküvette werden jeweils 3 mL einer frisch hergestellten Lösung von 20% Piperidin in DMF gegeben. Anschließend wird die Lösung bei gelegentlichem Rühren 10 Minuten bzw. bei einer hohen Beladung eines getrockneten Styrolharzes zwei Stunden, stehen gelassen.

An einem UV-Spektrometer wird die Absorption gegen die Referenzlösung bei 290 nm bestimmt, dabei ist darauf zu achten, dass sich das Harz am Boden der Küvette abgesetzt hat. Die Beladung kann wie folgt berechnet werden:

$$\text{Beladung}(\text{mmol} / \text{g}) = \frac{\text{Absorption}_{\text{Probe}}}{\text{Einwaage}(\text{mg}) * 1,75}$$

Der gegebenen Formel für den Beladungsgrad liegt ein Absorptionskoeffizienten von $\epsilon = 5253 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ zugrunde.

8.3.4 Synthese von N-Fmoc-Aminoethanol¹¹¹:

In einem 250 ml Stickstoffkolben wurden 30 mmol 2-Aminoethanol (1,83 g, 1,81 mL) in 80 mL Dichlormethan vorgelegt, und in einem Eisbad auf 0° C abgekühlt. 15 mmol Chlorameisensäure(-9-fluorenylmethyl)-ester (3,88 g) wurden in 60 mL Dichlormethan gelöst und innerhalb von 30 Minuten mittels eines Tropftrichters zur Reaktion getropft. Anschließend wurde die Reaktion für 90 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Der dabei ausgefallene weiße Niederschlag wurde durch Filtration entfernt. Die organische Phase wurde dreimal mit 0,05 molarer Salzsäure ausgeschüttelt und dann 12 Stunden über Natriumsulfat gerührt.

Das Natriumsulfat wurde durch Filtration entfernt und das Lösungsmittel bei reduziertem Druck verdampft.

Es wurde ein weißer Feststoff gewonnen. Die Ausbeute betrug 79% der Theorie.

Smp.: 146 °C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 7,75 (d, 2H, H_{Ar}); 7,58 (d, 2H, H_{Ar}); 7,39 (t, 2H, H_{Ar}); 7,31 (t, 2H, H_{Ar}); 5,16 (s_{br.}, 1H, NH); 4,42 (d, 2H, CHCH_2); 4,21 (t, 1H, CH); 3,70 (d, 2H, CH_2CH_2); 3,34 (d, 2H, CH_2CH_2); 1,88 (s, 1H, OH).

8.3.5 Umsetzung des Chlor-2-Chlortritylharzes zu einem 2-Aminoethanol-2-Chlortritylharz

In einem ausgeheiztem 500 mL Stickstoffkolben wurde unter Schutzgas 25,86 mmol des Chlor-2-Chlortritylharzes vorgelegt.

In einem weiteren ausgeheiztem 500 mL Stickstoffkolben wurde 38,8 mmol Fmoc-Aminoethanol (11 g) vorgelegt, in 250 mL Dioxan aufgeschlämmt und anschließend gefriergetrocknet. Er wurde in 130 mL trockenem Dichlormethan und 20 mL trockenem DMF mittels Ultraschall erneut gelöst und mit 116,4 mmol Diisopropylethylamin (15,04 g) versetzt. Die Reaktionslösung wurde unter Schutzgas zum Harz gegeben und für 7 Tage bei Raumtemperatur geschüttelt.

Die Aufreinigung erfolgte durch Waschen mit 50 mL einer Lösung aus 80% Dichlormethan, 15% Methanol und 5% Diisopropylethylamin. Anschließend wurde das Harz dreimal für jeweils fünf Minuten in jeweils 50 mL der oben genannten Lösung suspendiert. Abschließend wurde das Harz nacheinander mit je 100 mL Dichlormethan, DMF und Dichlormethan gewaschen. Nach der Trocknung im Trockenschrank konnte der Beladungsgrad des Harzes durch Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe, siehe 8.3.3, ermittelt werden.

8.3.6 Allgemein: Synthese der eingesetzten Peptide

Die Synthese der eingesetzten Oligopeptide erfolgte an einem Peptidsynthesizer der Firma Applied Biosystems 433A mit einem angeschlossenen UV-Detektor. Die Syntheseschritte wurden mit Hilfe des Programms SynthAssist V.2.0 (Apple) bzw. SynthAssist V.3.0 (Windows) durchgeführt. Die Synthese erfolgte nach Standard Fmoc-Schutzgruppentechnik. Lediglich die Kupplungszeiten wurden verlängert und die Sensitivität des UV-Detektors wurde auf 2,5% erhöht.

Die Kupplung wurde mittels einer Aktivierung der Aminosäure mit HBTU durchgeführt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte durch Piperiden. Am Ende der Reaktion wurde anstelle der Waschphase ein reiner NMP Waschzyklus verändert. Das Harz wurde vor seiner Funktionalisierung nicht getrocknet.

8.3.7 Allg. Vorschrift: Herstellung von 2-Brom-Propionsäure funktionalisierten Makroinitiatoren

Die am Harz gebundenen Oligopeptide wurden am N-Terminus durch in situ gebildete Säureanhydride an Makroinitiatoren funktionalisiert.

Die Herstellung des 2-Brompropionsäureanhydrids erfolgte kurz vor der Funktionalisierung des Oligopeptids. Für die Funktionalisierung von 1 mmol Oligopeptid wurden 5 mmol Säureanhydrid hergestellt.

In einem 100 mL Stickstoffkolben wurden in 60 mL trockenem Dichlormethan 0,9 mL 2-Brompropionsäure (1,53 g, 10 mmol) vorgelegt. In einem Erlmayerkolben wurden 1,04 g Dicyclocarbodiimid (5 mmol, 0,5 eq.) in 10 mL trockenem Dichlormethan gelöst und anschließend zur 2-Brompropionsäure hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das als weißer Niederschlag ausgefallene Harnstoffderivat abfiltriert. Das Filtrat wurde bei reduziertem Druck auf 5 mL Volumen eingengt und mit 10 mL NMP versetzt. Anschließend wurde das restliche Dichlormethan entfernt.

Zu dem in NMP vorliegenden Oligopeptid am Harz wurden 0,87 mL DIPEA (0,65 g, 5 mmol) gegeben. Dann wurde das in NMP gelöste Anhydrid über einen Filter hinzugefügt. Die Reaktion wurde für 3 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Zur Umsatzkontrolle wurde ein Kaisertest durchgeführt. Hierzu wurden mit einer Pipette einige Harzkügelchen entnommen und in ein Reagenzglas überführt. Die Harzkügelchen wurden zehnmal mit einer kleinen Menge Diethylether gewaschen, anschließend werden die Harzkügelchen getrocknet und danach ein Kaisertest durchgeführt.

War dieser positiv, so wurde das Harz in eine Glasfritte mit Porengröße 2 überführt und nacheinander fünfmal mit NMP, fünfmal mit Dichlormethan und abschließend fünfmal mit NMP gewaschen. Anschließend wurde die Kupplung wiederholt

War der Kaisertest negativ, so wurde das Harz ebenfalls in eine Glasfritte mit Porengröße 2 überführt, aber zehnmal mit NMP und zehnmal mit Dichlormethan sehr gründlich gewaschen. Anschließend wurde das Harz bei reduziertem Druck getrocknet. Die Abspaltung der Makroinitiatoren erfolgte nach einer dem Trägermaterial und den Schutzgruppen angepaßten Methode.

8.3.8 Allgemein: Abspaltung von einem 2-Aminoethanol-2-Chlortritylharz

Die Abspaltung des Oligopeptids erfolgte unter Beibehaltung der eingesetzten Schutzgruppen mit 2% Trifluoressigsäure in Dichlormethan. Zu 0,1 mmol Oligopeptid am Harz wurden 10 mL der Abspalllösung gegeben und diese für 5 Minuten suspendiert. Die Abspalllösung wurde abgesaugt, und das Harz mit 10 mL der Abspalllösung gewaschen. Die vereinigten Abspalllösungen wurden in die fünffache Menge Diethylether eingetropfelt und der ausgefallene Niederschlag wurde abzentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde abdekantiert, der Niederschlag erneut in Diethylether suspendiert und nochmals abzentrifugiert. Die Lösung wurde wieder abdekantiert und der Niederschlag bei verringertem Druck getrocknet. Das weiße Pulver wurde in Wasser/Acetonitril (1:1) aufgenommen und gefriergetrocknet.

Für eine komplette Abspaltung inklusive der Schutzgruppen wurde eine Abspalllösung von 95% TFA, 2,5% Wasser und 2,5% TES über eine Abspaltdauer von 30 Minuten verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte wie oben beschrieben.

8.3.9 Synthese von 2-Brom-Propionsäurebenzylester¹¹²

In einem ausgeheiztem 50 ml Stickstoffkolben wurden unter Schutzgas Benzylalkohol (3,31 mL, 32 mmol) und Pyridin (3,67 mL, 35 mmol) in 20 mL trockenem Dichlormethan vorgelegt. Anschließend wurde das 2-Brompropionsäurebromid (3,67 mL, 35 mmol) tropfenweise bei 0 °C hinzugegeben. Die Lösung verfärbte sich hellgelb, und es fiel ein weißer Niederschlag aus. Sie wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mL Eiswasser abgebrochen. Nach Zugabe weiterer 20 mL Dichlormethan wurde die organische Phase nacheinander mit wässriger Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen.

Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, am Rotationsverdampfer eingengt und bei reduziertem Druck erneut getrocknet. Die Reinigung erfolgte durch Umkondensation bei 70 °C im Hochvakuum ($1 \cdot 10^{-3}$ mbar).

Es wurde eine farblose Lösung gewonnen.

Ausbeute: 5,23 g (71% der Theorie)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 7,35 (s, 5H, $\text{C}_{\text{ar.}}\text{H}$); 5,19 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{C}_{\text{ar.}}$); 4,39 (q, 1H, CHBr); 1,82 (d, 3H, CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 135,1 ($\text{C}_{\text{ar.}}$); 128,6 ($\text{HC}_{\text{ar.}}$); 128,4 ($\text{HC}_{\text{ar.}}$); 128,2 ($\text{HC}_{\text{ar.}}$); 67,6 (CH_2); 40,0 (C-Br); 21,6 (CH_3)

Elementaranalyse: $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{BrO}_2$ ($M_w = 242$ g/mol)

Element.	Berechnet	Gefunden
C	49,41%	48,23%
H	4,56%	4,25%

MS (EI), $m/z = 242$ [M^+], 163 [M-Br^+], 107, 91, 77 [Ph^+]

8.3.10 Synthese von 2-Brom-Propionsäurebenzoinester

In einem ausgeheizten 100 mL Stickstoffkolben mit Tropftrichter wurden unter Argon in 60 mL trockenem CH_2Cl_2 , Benzoin (3 g, 14 mmol) und Et_3N (2,1 mL, 15 mmol) vorgelegt. Das Reaktionsgefäß wurde auf -40 °C abgekühlt und anschließend wurde 2-Brom-Propionsäurebromid in 15 mL trockenem CH_2Cl_2 zugetropft. Die Reaktion wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 16 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in THF aufgenommen und filtriert. Danach wurde das Lösungsmittel entfernt und den Rückstand in CHCl_3 aufgenommen und in CHCl_3 /Hexan zweimal umkristallisiert.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 1,88 (d, 3H, CH_3); 4,50 (dq, 1H, CHBr); 6,85 (s, 1H, $\text{H}_{\text{ar.}}$); 7,35-7,39 (m, 8H, $\text{H}_{\text{ar.}}+\text{CHO}$); 7,91 (dd, 2H, $\text{CH}_{\text{ar.}}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 21,6 (CH_3); 40,1 (CBr); 81,5 ($\underline{\text{C}}_{\text{ar.}}$); 133,3 (b, $\text{C}_{\text{ar.}}$); 134,7 ($\text{C}_{\text{ar.}}$); 169,7 (OCO); 193,5 ($\underline{\text{COC}}_{\text{ar.}}$)

MS (EI), $m/z = 347 [M]^+$, $267 [M-Br]^+$, $243 [M-Ph-CO]^+$, $195 [Ph-CO-CH-Ph]^+$, $152 [CH_3-CHBr-CO_2]^+$, $105 [Ph-CO]^+$, $77 [Ph]^+$.

Elementaranalyse: $C_{17}H_{15}Br_1O_3$ ($M_w = 347$ g/mol)

Element	Berechnet	Gefunden
C	58,81%	57,55%
H	4,35%	3,63%

Schmelzpunkt: $73,7$ °C

8.3.11 Allg. Vorschrift: ATRP Polymerisation mit niedermolekularen Initiatoren

In einem Stickstoffkolben wurden die Kupfersalze ($CuBr$, $CuBr_2$) vorgelegt. Das Gasvolumen des Kolbens wurde durch drei Wiederholungen „reduzierter Druck – Argon“ ausgetauscht.

In einem zweiten Kolben wurde der Initiator in einer kleinen Menge des Lösungsmittels ($\sim 0,5$ mL) gelöst und mittels Durchleiten von Argon über 5 Minuten entgast. Der Kolben wurde dabei in Abhängigkeit vom Lösungsmittel in einem Eisbad gekühlt.

In einem dritten Kolben wurde der Ligand in dem restlichen Lösungsmittel und dem Monomer gelöst und mittels Durchleiten von Argon entgast. Dabei wurde der Kolben in Abhängigkeit vom Lösungsmittel gekühlt.

Der Inhalt des dritten Kolbens wurde unter Schutzgas in den Kolben mit den Kupfersalzen überführt und die Kupfersalze durch Rühren und Ultraschall gelöst. Anschließend wurde der Kolben auf die Reaktionstemperatur erwärmt. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe des im Lösungsmittel entgasten Initiators unter Schutzgas.

In definierten Abständen erfolgte eine Probenentnahme unter Schutzgas. Zur Bestimmung des Umsatzes wurde ein Teil der genommenen Probe in $CDCl_3$ verdünnt und ein 1H -NMR vermessen. Der andere Teil der Probe wurde in THF verdünnt und zur Abtrennung des Katalysators über eine Säule aus Kieselgel filtriert. Anschließend wurde die Lösung über einen $2,5$ μL Filter gegeben und an der THF-GPC vermessen, um das Molekulargewicht zu bestimmen.

Die Reaktion wurde nach Abkühlen durch Luftzufuhr abgebrochen. Anschließend wurde das Eluat am Rotationsverdampfer eingengt und das viskose Öl bei reduziertem Druck getrocknet. Eine Aufreinigung des Polymers erfolgte durch erneutes Lösen in Methylenechlorid und anschließendes Ausfällen in Methanol/Wasser (80/20). Nach dem Isolieren des Polymers erfolgte die Trocknung unter reduziertem Druck.

Initiator: 2-Brom-Propionsäurebenzylester

Ansatz	Initiator	CuBr	CuBr ₂	PMDETA	nBa
Bz-S-PnBA-Test	1,12 mmol	0,56 mmol	0,02 mmol	0,58 mmol	44,5 mmol
Bz-S-PnBA-A	10 mmol	5 mmol	0,2 mmol	5,2 mmol	200 mmol
Bz-S-PnBA-B	10 mmol	5 mmol	0,2 mmol	5,2 mmol	140 mmol

Reaktionstemperatur: 60 °C; Lösungsmittel: 33 vol.-% Acetonitril

Ansatz	Polymerisationszeit	Ausbeute	M _w (g/mol)	Polydispersität
Bz-S-PnBA-Test			1400	1,14
Bz-S-PnBA-A	70 min.	17,2 g	1900	1,22
Bz-S-PnBA-B	30 min.	9,5 g	1000	1,44

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 0,91 (t, CH₃CH₂); 1,13 (CH₃CH); 1,34 (CH₃CH₂); 1,57 (CH₂CH₂CH₂ + CH₂CBr); 1,89 (CH₂CH₂CH₂ + CHBr); 2,27(CHBr); 4,01 (OCH₂); 5,08 (CH₂C_{ar.}); 7,31 (HC_{ar.})

MALDI-TOF (2 homologe Reihen):

Reihe	Zuordnung	M _{th.} [Da]	M _{exp.} [Da]
1	[M+Na] ⁺	1930	1932
2	[M+K] ⁺	1946	1948

Initiator: 2-Brompropionsäurebenzoinester

Ansatz	Initiator	CuBr	CuBr ₂	PMDETA	nBa
Bo-S-PnBA	1,44 mmol	0,72 mmol	0,04 mmol	0,76 mmol	102 mmol

Reaktionstemperatur: 60 °C; Lösungsmittel: 25 vol.-% Dimethylformamid

Ansatz	Polymerisationszeit	Ausbeute	M _w (g/mol)	Polydispersität
Bo-S-PnBA	90 min.	8,5 g	4385	1,37

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 0,91 (t, CH₂-CH₃); 1,34 (b, CH₂-CH₃); 1,57 (b, CH₂-CH₂-CH₂); 1,58 und 1,89 (2 *b, CH-CH₂); 2,26 (b, CH-CH₂); 4,00 (b, O-CH₂); 6,80 (b, CH); 7,33-7,50 (m, H_{ar.}); 7,91 (db, CO-C-CH_{ar.});

MALDI-TOF (3 homologe Reihen):

homologe Reihe	Zuordnung	M _{th.} [Da]	M _{exp.} [Da]
1	[M+Na] ⁺	5751	5751
2	[M+K] ⁺	5767	5767
3	[M+Na-Benzoin] ⁺	5556	5557

Initiator: 2-Brom-iso-buttersäure-tert-butylester

Ansatz	Initiator	CuBr	CuBr ₂	PMDETA	nBa
tB-S-PnBA	1,17 mmol	0,71 mmol	0,04 mmol	0,75 mmol	88 mmol

Reaktionstemperatur: 60 °C; Lösungsmittel: 29 vol.-% Dimethylformamid

Ansatz	Polymerisationszeit	Ausbeute	M _w (g/mol)	Polydispersität
tB-S-PnBA	15 min.	4,2 g	4500	1,11

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 0,89 (t, CH_3); 1,33 (sb, CH_2CH_3); 1,57 (sb, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1,57 und 1,88 (b, CHCH_2); 2,26 (b, CH); 4,00 (b, OCH_2)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 13,6 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 19,0 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$); 25,5 (C-CH_3); 27,8 ($\text{C-(CH}_3)_3$); 30,5 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$); 35,3 ($\text{CH}_2\text{-CH}$); 41,4 ($\text{CH}_2\text{-CH}$); 64,3 (O-CH_2); 79,2 ($\text{C-(CH}_3)_3$); 175,6 (C=O)

Initiator: 2-Brom-propionsäuremethylester (Initiatorvergleich-Kinetik)

Reaktion	Initiator	CuBr	CuBr ₂	PMDETA	nBa
IvK-A	0,1 mmol	0,1 mmol	0,005 mmol	0,105 mmol	15 mmol

Reaktionstemperatur: 60 °C; Lösungsmittel: 90 vol.-% (19,25 mL) Dimethylformamid

Initiator: 2-Brom-N-phenylpropionsäureamid (Initiatorvergleich-Kinetik)

Reaktion	Initiator	CuBr	CuBr ₂	PMDETA	nBa
IvK-B	0,1 mmol	0,1 mmol	0,005 mmol	0,105 mmol	15 mmol

Reaktionstemperatur: 60 °C; Lösungsmittel: 90 vol.-% (19,25 mL) Dimethylformamid

Initiator: 2-Brom-propionsäuremethylester (BPED-Kinetiken):

Reaktion	Initiator	CuBr	CuBr ₂	BPED	Methylacrylat	Temperatur
BPED-K-A	0,21 mmol	0,21 mmol	0,01 mmol	0,22 mmol	31,5 mmol	23 °C
BPED-K-B	0,21 mmol	0,21 mmol	0,01 mmol	0,22 mmol	31,5 mmol	40 °C
BPED-K-C	0,21 mmol	0,21 mmol	0,01 mmol	0,22 mmol	31,5 mmol	60 °C

Lösungsmittel: 90 vol.-%. (25,6 mL) Dimethylformamid

8.3.12 Entfernung der *tert*-Butylesterschutzgruppe mit Iodtrimethylsilan

1 g des *tert*-Butylester endfunktionalisierten Poly-*n*-butylacrylats wurden in 10 mL Methylenchlorid gelöst und mit 0,1 mmol (5 eq., 20 mg) Iodtrimethylsilan versetzt. Die Reaktion wurde für 40 Minuten bzw. 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Dann wurde das Polymer in 15 mL Tetrahydrofuran wieder aufgenommen und mit 1,5 mL 1M Salzsäure versetzt. Die Reaktion wurde für 10 Minuten gerührt und das Polymer durch Ausfällen in Methanol/Eis isoliert. Das Polymer wurde unter reduziertem Druck getrocknet.

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 13,3 ($\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 18,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$); 30,2 ($\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2$); 34,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}$); 41,0 ($\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$); 63,9 (O- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$); 174,0 (C=O)

MALDI-TOF (3 homologe Reihen):

homologe Reihe	Zuordnung	$M_{\text{th.}}^*$ [Da]	$M_{\text{exp.}}^*$ [Da]
1	$[\text{M} + \text{Na}]^+$	5699	5698
2	$[\text{M} + \text{Na} - \text{Bu}]^+$	5643	5642
3	$[\text{M} + \text{Na} - \text{Br}]^+$	5620	5620

*für Polymerisationsgrad 43

8.3.13 Entfernung der *tert*-Butylesterschutzgruppe durch 30% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid

0,5 g des *tert*-Butylester endfunktionalisierten Poly-*n*-butylacrylats wurden in 7 mL Methylenchlorid gelöst und 3 mL Trifluoressigsäure versetzt. Die Lösung wurde insgesamt 60 Minuten gerührt. In unterschiedlichen Abständen erfolgte die Isolierung einer geringen Menge des Polymers (~ 50 mg) durch Entfernung der flüchtigen Substanzen unter reduziertem Druck.

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 13,5 ($\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 19,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_3$); 24,7 ($\text{C-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 25,0 ($\text{C-}\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 30,4 ($\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2$); 35,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}$); 41,6 ($\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{H}$); 65,3 (O-CH_2); 175,6 (C=O)

MALDI-TOF (4 homologe Reihen):

homologe Reihe	Zuordnung	$M_{\text{th.}}^*$ [Da]	$M_{\text{exp.}}^*$ [Da]
1	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	4290	4290
2	$[\text{M}+\text{K}]^+$	4306	4306
3	$[\text{M}+\text{Na-HBr}]^+$	4209	4209
4	-		4196

* für Polymerisationsgrad 32

8.3.14 Entfernung der Benzoinchutzgruppe

Es wurden 63 mg der Polymers (Bo-S-PnBA) in 2 mL Benzol gelöst und in eine UV-Küvette überführt. Die Bestrahlung erfolgte über 200 Minuten. Zwischen der UV-Lampe und der Küvette mit der Probe wurde eine weitere mit Wasser gefüllte Küvette eingefügt. Anschließend wurde die Lösung in einen Rundkolben überführt und bei reduziertem Druck getrocknet.

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3), δ [ppm] = 0,98 (t, CH_2CH_3); 1,42 (b, CH_2CH_3); 1,66 (b, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1,66 und 2,00 (2 *b, CHCH_2); 2,35 (b, CHCH_2); 4,21 (b, OCH_2)

MALDI-TOF (3 homologe Reihen):

homologe Reihe	Zuordnung	$M_{\text{th.}}^*$ [Da]	$M_{\text{exp.}}^*$ [Da]
1	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	5302	5302
2	$[\text{M}+\text{K}]^+$	5318	5318
3	$[\text{M}+\text{Na-HBr}]^+$	5222	5222

* für Polymerisationsgrad 40

8.3.15 Entfernung der Benzylesterschutzgruppe

In einem ausgeheiztem Stickstoffkolben wurde das Polymer in absolutem Ethanol vorgelegt und im Argon Gegenstrom mit Ammoniumformiat versetzt. Im Anschluß wurde eine Spatelspitze Palladium auf Kohlenstoff (10%) hinzugegeben. Die Reaktion wurde bei 35 °C gerührt. Die Lösung wurde filtriert und das Lösungsmittel bei reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Methylenchlorid aufgenommen und nacheinander einmal mit 0,3 M Salzsäure und zweimal mit Wasser ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene viskose Öl wurde in THF aufgenommen und zur Reinigung in Methanol/Eis (2:1) ausgefällt. Der Niederschlag wurde in Methylenchlorid aufgenommen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wieder entfernt. Es wurde ein viskoses Öl erhalten.

Reaktion	Polymer	Ansatz	Ammoniumformiat	Ethanol	Zeit
S-PnBA-Test	Bz-S-PnBA-Test				
S-PnBA-1600	Bz-S-PnBA-A	5.49 mmol	2 g	150 mL	14 h
S-PnBA-1000	Bz-S-PnBA-B	7.19 mmol	3.6 g	140	14 h

Reaktion	Ausbeute	M _w (g/mol)	Polydispersität
S-PnBA-Test	0,29 g	1700	1,13
S-PnBA-1600	8 g	1600	1,21
S-PnBA-1000	6 g	1000	1,22

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃), δ [ppm] = 0,91 (t, CH₂CH₃); 1,13 (b, CH₂CH₃); 1,34 (b, CH₂CH₂CH₂); 1,57 und 1,89 (2 *b, CHCH₂); 2,27 (b, CHCH₂); 4,01 (b, OCH₂)

FT-IR, ν (cm⁻¹): 2960 – 2874 (s, C-H), 1734 (s, C=O), 1166 (w, O-H)

MALDI-TOF (4 homologe Reihen):

homologe Reihe	Zuordnung	M _{th.} * [Da]	M _{exp.} * [Da]
1	[M+Na-Br] ⁺	2018	2019
2	[M+K-Br] ⁺	2034	2035

3	$[M+Na-Br+Na]^+$	2040	2041
4	$[M+K-Br+Na]^+$	2057	2057

* für Polymerisationsgrad 15

8.3.16 Kupplung von säureendfunktionalisierten Polyacrylaten an den N-Terminus von Festphasen gebundenen Oligopeptiden

Die Kupplung erfolgte am N-Terminus eines an Festphase gebundenen Oligopeptids der Sequenz Valin-Prolin-Glycin-Valin-Glycin. Als Festphase wurde ein 2-Aminoethanol-2-Chlor-Tritylharz verwendet. Die Synthese des Oligopeptids erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift. Das Harz wurde nach der Synthese nicht getrocknet.

Zur Verifizierung des erfolgreichen Aufbaus des Oligopeptids wurde eine kleine Menge abgetrennt, gründlich mit Methylenchlorid gewaschen und nach der allgemeinen Abspaltvorschrift aufgearbeitet.

Eine Untersuchung mittels ESI-MS des gewonnen Oligopeptids bestätigte die Sequenz.

Signal (1) = $[M+H]^+$ (471 Dalton)

Signal (2) = $[M+Na]^+$ (493 Dalton)

Allg. Kupplung über DIC (oder DCC) Aktivierung der Säuren:

Es wurden 0,25 mmol Polymer und 0,25 mmol HoBt in 5 mL NMP (DMF) gelöst. Dieser Lösung wurde langsam 0,25 mmol DIC (oder DCC), gelöst in 2 mL NMP (DMF), zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung zu 0,05 mmol am Harz gebundenem Oligopeptid zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 24 bzw. 48 Stunden geschüttelt. Eine Überprüfung der Vollständigkeit des Umsatzes erfolgte mittels Kaisertest. Die Aufreinigung erfolgte durch gründliches Waschen des Harzes mit Dichlormethan.

Allg. Kupplung über PyBoP/HBTU Aktivierung der Säuren:

Es wurden 0,25 mmol Polymer, 0,25 mmol HoBt und 0,25 mmol PyBoP (oder 0,23 mmol HBTU) eingewogen und in 5 mL NMP (DMF) gelöst. Der Lösung wurden 0,5 mmol DIPEA zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde zu 0,05 mmol am Harz gebundenem Oligopeptid zugegeben und 24 bzw. 48 Stunden geschüttelt. Eine Überprüfung der

Vollständigkeit des Umsatzes erfolgte mittels Kaisertest. Die Aufreinigung erfolgte durch gründliches Waschen des Harzes mit Dichlormethan.

Optimierte Kupplungsansätze:

Es wurden 0,75 mmol Polymer (S-PnBA-1000, S-PnBA-1600), 0,75 mmol PyBoP und 0,75 mmol HoBt in 15 mL DMF gelöst. Die Lösung wurde mit 1,5 mmol DIPEA versetzt und zu 0,15 mmol Festphasen gebundenem Oligopeptid gegeben. Die Reaktion wurde 48 Stunden geschüttelt. Zur Überprüfung der Umsetzung wurde ein Kaisertest durchgeführt. Zur Aufarbeitung wurde das Harz fünfzehnmal mit 5 mL DMF und ebenso oft mit 5 mL Methylenchlorid gewaschen und anschließend getrocknet. Die Abspaltung des bioorganisch-synthetischen Blockcopolymers wurde mit 40 mL Abspalllösung nach Standardbedingungen durchgeführt. Die Abspalllösung wurde unter Zusatz von 20 mL Dioxan einrotiert und anschließend das Lösungsmittel komplett entfernt. Es wurde jeweils ein Gel gewonnen.

Ausbeuten:

Oligopeptid- S-PnBA-1600= 224 mg

Oligopeptid- S-PnBA-1000= 157 mg

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_6 -DMF) δ [ppm]: 8,02 (br, NH); 7,70 (br, NH); 4,41-4,70 (m, CH); 4,08 (br, OCH_2/Pol); 3,55 (m, CH_2/Gly); 3,35 (m, $\text{CH}_2/\text{Aminoethanol}$); 2,36 (b, CH_{Pol}); 2,20-1,93 (m/b, CH_2/Pro , CH_2/Pol); 1,63 (b, CH_2/Pol); 1,40 (b, CH_2/Pol); 1,12 (t, CH_3/In); 0,95 (b, CH_3/Pol)

MALDI-TOF (4 homologe Reihen):

homologe Reihe	Zuordnung	$M_{\text{th.}}^*$ [Da]	$M_{\text{exp.}}^*$ [Da]
1	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	2088	2086
2	$[\text{M}+\text{K}]^+$	2104	2103
3	$[\text{M}+\text{Na}-\text{Bu}]^+$	2031	2029
4	$[\text{M}+\text{K}-\text{Bu}]^+$	2047	2045

* für Polymerisationsgrad 12

FT-IR, ν (cm^{-1}): 3287 (b, NH), 2959 (m, CH), 1728 (s, C=O), 1633 (s, NH), 1294 (s, C-N),
1183 (s, C-O)

8.3.17 Synthese von BPED^{113,(2)}

In einem 1 L Dreihalskolben mit Thermometer und Tropftrichter wurde 6g (0,1 mol) Ethylendiamin in 200 mL destilliertem Ethanol gelöst und auf 65 °C erwärmt. Anschließend wurde 40 g Zinkpulver und 40 mL Eisessig hinzugegeben. Zu der Reaktionslösung wurde über einen Zeitraum von 2 Stunden mittels eines Tropftrichters 21,4 g (0,2 mol) 2-Pyridincarboxyaldehyd, gelöst in 100 mL Ethanol, gegeben. Nach Beendigung der Zugabe wurden binnen 90 Minuten insgesamt weitere 140 mL Eisessig und 140 g Zinkpulver zur Reaktion gegeben. Die Reaktion wurde 24 Stunden bei 65 °C und 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde filtriert und das Lösungsmittel bei reduziertem Druck entfernt. Es wurde ein gelbes Öl gewonnen. Nach Zugabe von 200 mL konzentrierter Natronlauge wurde das Produkt durch dreimaliges Ausschütteln mit 50 mL Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Produkt durch Vakuumdestillation (1×10^{-3} mbar, $T > 170$ °C) gereinigt. 10 g des reinen Zwischenproduktes wurden isoliert. Dies entspricht einer Ausbeute von 41%.

Das N,N'-Bis(2-pyridylmethyl)-1,2-diaminoethan 10 g (41,2 mol) wurde in 20 mL destilliertem Methanol aufgenommen und mit 14,2 g (90,8 mmol) Hexylacrylat versetzt. Die Reaktion wurde 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dabei änderte sich die Farbe von gelb nach braun-grün. Das Methanol und überschüssiges Hexylacrylat wurde bei reduziertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und mit Aktivkohle gerührt. Nach Filtration der Lösung wurde diese zur weiteren Reinigung über eine Kieselgelsäule gegeben. Das Ethylacetat wurde entfernt und das Produkt bei reduziertem Druck getrocknet.

Es wurden 18,76 g (33,9 mmol) eines viskosen Öls gewonnen. Dies entspricht einer Ausbeute von 82% der Theorie.

Die Dichte wurde mit 1,028 g/mL bestimmt.

⁽²⁾ Diese Synthese wurde von Jessica Brandt durchgeführt

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm]: 8,45 (d, 2, NCH); 7,57 (dd, 2, NCCHCH); 7,35 (d, 2, NCCCH); 7,01 (dd, 2, NCHCH); 3,99 (t, 4, OCH_2); 3,71 (s, 4, NCH_2C); 2,82 (t, 4, NCH_2); 2,61 (s, 4, NCH_2CH_2); 2,43 (t, 4, COCH_2); 1,55 (q, 4, OCH_2CH_2); 1,26 (m, 12, CH_2); 0,85 (t, 6, CH_3)

8.3.18 Durchführung von ATRP-Kinetiken unter Zusatz von gecapptem Oligopeptid

Herstellung des gecappten Oligopeptids:

Das gecappte Oligopeptid wurde am Peptidsynthesizer nach der Standardmethode hergestellt. Als Sequenz wurde Asparginsäure(tert-Butylester)-Phenylalanin-Glycin-Asparginsäure(tert-Butylester)-Glycin gewählt. Diese wurde auch in späteren Versuchen bei dem Einsatz eines Oligopeptid-Makroinitiators verwendet. Als Harz zum Oligopeptidaufbau wurde ein 2-Aminoethanol-2-Cl-Tritylharz eingesetzt. In einem letzten Kupplungsschritt wurde der N-Terminus des Oligopeptids durch eine Reaktion mit Essigsäureanhydrid blockiert. Die Abspaltung vom Harz erfolgte nach der Standardmethode.

Durchführung der ATRP-Kinetiken:

In einem als Reaktionskolben dienendem 25 mL Stickstoffkolben wurde das Oligopeptid vorgelegt und in 2,25 mL Dimethylsulfoxid gelöst. Anschließend wurden 1,4 mL *n*-Butylacrylat und 11,2 μL 2-Brompropionsäuremethylester als Initiator zugegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur durch Durchleiten von Argon über einen Zeitraum von 15 Minuten entgast.

Es wurde eine Katalysatorstammlösung erstellt, die der zehnfachen Menge der in einer Reaktion eingesetzten Katalysatormenge entspricht. In einem 25 mL Kolben wurden die Kupfersalze CuBr (143,5 mg) und CuBr_2 (11,1 mg) eingewogen und das Gasvolumen gegen Argon ausgetauscht. In einen 10 mL Kolben wurden 2,5 mL Dimethylsulfoxid, 2,5 mL *n*-Butylacrylat und 219 μL Pentamethyldiethyltriamin gegeben und durch Durchleiten von Argon über einen Zeitraum von 10 Minuten entgast. Anschließend wurde die Lösung unter Schutzgas zu den Kupfersalzen überführt und diese durch Rühren gelöst.

Der Reaktionskolben wurde auf 60 °C erwärmt und die Polymerisation durch Zugabe von 0,5 mL der Katalysatorstammlösung gestartet. In verschiedenen Abständen wurden Proben genommen, um den Umsatz und das Molekulargewicht der Probe zu bestimmen. Zur Bestimmung des Umsatzes wurde ein Teil der genommenen Probe in CDCl₃ verdünnt und ein ¹H-NMR vermessen. Der andere Teil der Probe wurde in THF verdünnt und zur Abtrennung des Katalysators über eine Säule aus Kieselgel filtriert. Anschließend wurde die Lösung über einen 2,5 µL Filter gegeben und an der THF-GPC vermessen, um das Molekulargewicht zu bestimmen.

Ansatz	Oligopeptid	Initiator	CuBr	CuBr ₂	PMDETA	<i>n</i> Ba
Pep-Kin-A*	-	0,1 mmol	0,1 mmol	0,005 mmol	0,105 mmol	11,4 mmol
Pep-Kin-B	0,02 mmol	0,1 mmol	0,1 mmol	0,005 mmol	0,105 mmol	11,4 mmol
Pep-Kin-C	0,1 mmol	0,1 mmol	0,1 mmol	0,005 mmol	0,105 mmol	11,4 mmol
Pep-Kin-D	0,2 mmol	0,1 mmol	0,1 mmol	0,005 mmol	0,105 mmol	11,4 mmol
Pep-Kin-E*	-	0,1 mmol	0,1 mmol	0,005 mmol	0,105 mmol	11,4 mmol

* Bei diesen Reaktionen gelang es nicht, die Reaktionstemperatur konstant auf 60 °C zu halten.

Lösungsmittel: Dimethylsulfoxid 60 vol.-%. (2,45 mL); Reaktionstemperatur: 60 °C

8.3.19 ATRP-Kinetiken unter Verwendung eines Oligopeptid Makroinitiators

In einem 25 mL Stickstoffkolben wurde der Oligopeptid-Makroinitiator vorgelegt und in dem Lösungsmittel abzüglich 0,25 mL gelöst. Anschließend wurde das *n*-Butylacrylat abzüglich 0,25 mL hinzugegeben. Die beiden Lösungsmittelvolumen wurden für die Katalysatorsynthese benötigt. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur (DMSO), bzw. 0 °C (DMF) mittels Durchleiten von Argon über einen Zeitraum von 15 Minuten entgast.

Es wurde eine Katalysator Stammlösung erstellt, die der zehnfachen Menge der in einer Reaktion eingesetzten Katalysatormenge entspricht. In einem 25 mL Kolben wurden die Kupfersalze CuBr (143,5 mg) und CuBr₂ (11,1 mg) eingewogen und das Gasvolumen gegen Argon ausgetauscht. In einen 10 mL Kolben wurden 2,5 mL des Lösungsmittels, 2,5 mL *n*-Butylacrylat und der Ligand (PMDETA bzw. BPED) gegeben und mittels

Durchleiten von Argon über einen Zeitraum von 10 Minuten entgast. Anschließend wurde die Lösung unter Schutzgas zu den Kupfersalzen überführt und diese durch Rühren gelöst.

Der Reaktionskolben wurde auf die Reaktionstemperatur erwärmt und die Polymerisation durch Zugabe von 0,5 mL der Katalysatorstammlösung gestartet. In verschiedenen Abständen wurden Proben genommen, um den Umsatz und das Molekulargewicht zu bestimmen. Zur Bestimmung des Umsatzes wurde ein Teil der genommenen Probe in CDCl_3 verdünnt und ein $^1\text{H-NMR}$ vermessen. Der andere Teil der Probe wurde in THF verdünnt und zur Abtrennung des Katalysators über eine Säule aus Kieselgel filtriert. Anschließend wurde die Lösung über einen 2,5 μL Filter gegeben und an der THF-GPC vermessen, um das Molekulargewicht zu bestimmen.

Reaktion	Makroinitiator	Kupfersalze		Ligand	Monomer	Lösungsmittel
		CuBr	CuBr ₂			
	In-GDGFD	CuBr	CuBr ₂	PMDETA	<i>n</i> Ba	DMSO
141B	0,1 mmol	0,1 mmol	0,05 mmol	0,105 mmol	11,4 mmol	60 Vol.%

Reaktionstemperatur: 60 °C

Reaktion	Makroinitiator	Kupfersalze		Ligand	Monomer	Lösungsmittel
		CuBr	CuBr ₂			
128	In-GGFGG	CuBr	CuBr ₂	PMDETA	<i>n</i> Ba	DMF
	0,2 mmol	0,1 mmol	0,05 mmol	0,105 mmol	22,8 mmol	60 Vol.%

Reaktionstemperatur: 60 °C

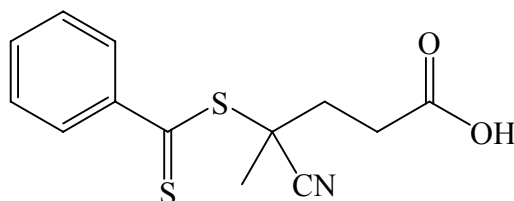
Reaktion	Makroinitiator	Kupfersalze		Ligand	Monomer	Lösungsmittel
		CuBr	CuBr ₂			
	In-GDGFD	CuBr	CuBr ₂	PMDETA	<i>n</i> Ba	DMF
209 B	0,1 mmol	0,1 mmol	0,05 mmol	0,105 mmol	15 mmol	90 Vol.%

Reaktionstemperatur: 40 °C

Reaktion	Makroinitiator	Kupfersalze		Ligand	Monomer	Lösungsmittel
		CuBr	CuBr ₂			
	In-GDGFD	CuBr	CuBr ₂	PMDETA	<i>n</i> Ba	DMF
203A	0,1 mmol	0,1 mmol	-	0,1 mmol	15 mmol	90 Vol.%
214	0,1 mmol	0,1 mmol	0,05 mmol	0,105 mmol	15 mmol	90 Vol.%
215	0,1 mmol	0,1 mmol	0,1 mmol	0,11 mmol	15 mmol	90 Vol.%

Reaktionstemperatur: 40 °C

8.3.20 Synthese von 4-cyano-4-((thiobenzyl)sulfanyl)pentansäure



In einem ausgeheizten Dreihalskolben wurde das Magnesium (100 mmol, 2,43 g) vorgelegt und durch zweimaliges Anlegen von „reduziertem Druck – Argon“ das Gasvolumen ausgetauscht. Anschließend wurden 80 mL trockenes THF zugegeben. In einem Tropftrichter wurden unter Schutzgas 40 mL trockenes THF und 100 mmol Benzylbromid (10,53 g) gemischt und über einen Zeitraum von 30 Minuten zugetropft. Bei Bedarf wurde die Reaktion in einem Eisbad gekühlt. Im Anschluß wurde die Reaktion bei Raumtemperatur eine Stunde gerührt. Die Zugabe des Kohlenstoffdisulfids erfolgte bei 0 °C, und es wurde eine weitere Stunde gerührt. Abschließend wurde bei 0 °C 100 mmol 4, 4'-azobis(4-cyanopentansäure) zugetropft. Die Reaktion wurde 14 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Das THF wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in einem geringen Volumen Methylchlorid aufgenommen. Die Reinigung erfolgte durch eine Chromatographie über eine mit Silikagel gefüllte Säule unter Verwendung von Hexan:Ethylacetat (1:1). Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde ein rotes Pulver gewonnen.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 10,62 (sb, 1, OH); 7,90 (d, 2, CCH); 7,57 (t, 1, CH_{para}); 7,40 (t, 2, CH_{meta}); 2,66 (m, 3, CH_2CH_2); 2,44 (m, 1, CH_2CH_2); 1,94 (s, 3, CH_3)

8.3.21 Synthese des Oligopeptid-transferreagenz: (Ph-C(S)-S-C(CH₃)(CN)-CH₂-CH₂-C(O)-Gly-Asp(tBu)-Gly-Phe-Asp(tBu)-NHCH₂CH₂OH)

Als Harz wurde ein 2-Aminoethanol-2-Cl-Tritylharz, beladen mit einem Oligopeptid der Sequenz DFGDG, verwendet.

In einem Kolben wurden 1,2 mmol der 4-cyano-4-((thiobenzyl)sulfanyl)-pentansäure (335 g) in 8 mL Methylenchlorid gelöst und mit 0,6 mmol Dicyclohexylcarbodiimid (124 g) in 2 mL Methylenchlorid versetzt. Die Reaktion wurde für eine Stunde gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und das Lösungsmittel eingengt. Anschließend wurden 5 mL N-Methylpyrrolidon hinzugegeben.

In einem weiteren Kolben wurde das Harz mit einer Beladung von ca. 0,2 mmol vorgelegt und unter Zusatz von 0,6 mmol Diisopropylethylamin (100 μ L) mit der Reaktionslösung versetzt. Die Reaktion wurde für 3 Stunden geschüttelt. Ein durchgeführter Kaisertest zeigte keine freien Amine mehr an. Daraufhin wurde das Harz gründlich mit N-Methylpyrrolidon und Methylenchlorid gewaschen. Die Abspaltung erfolgte nach der Standardmethode. Das Oligopeptid wurde sofort in Diethylether ausgefällt. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugation abgetrennt und die überstehende Lösung dekantiert. Der Niederschlag wurde erneut in Diethylether suspendiert und durch Zentrifugieren und Dekantieren der überstehenden Lösung erneut isoliert. Das Peptid wurde getrocknet, in Wasser/Acetonitril (1:1) aufgenommen und gefriergetrocknet. Es wurde ein rötliches Pulver gewonnen.

Das Produkt wurde mittels HPLC-ESI untersucht. Als mobile Phase wurde 30 % Wasser in Methanol verwendet und über 20 Minuten auf 100 % Methanol erhöht. Als stationäre Phase wurde eine C₁₆-Säule verwendet. Das Produkt wurde nach 17,05 Minuten in einem Anteil von 66 % erhalten.

Im ESI-MS wurden folgende Signale ermittelt:

Signal (926 Dalton) dies entspricht dem Produkt + H

Signal (948 Dalton) dies entspricht dem Produkt +Na

¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMF) δ [ppm]: 1,37 (s, tBu), 1,90 (s, CH₃), 2,5 (m, CH₂ (RAFT-Agenz/Peptidrückgrat)), 3,75 (m, CH₂ (Peptidrückgrat)), 4,54 (m, CH (Peptidrückgrat)), 7,23 (m, CH_(ar., Phenylalanin)), 7,5 (m, CH_(ar., RAFT-Agenz)), 7,9 – 8,25 (m, NH (Peptidrückgrat))

Aus dem Vergleich der Intensität der Methylgruppen der *tert*-Butylgruppen zu der der Methylgruppe an dem RAFT-Agens ergibt sich ein Umsatz von 57 % und liegt damit unter dem durch HPLC ermittelten Wert.

^{13}C -NMR (100 MHz, d_6 -DMF) δ [ppm]: 22,8 ($\text{CH}_3(\text{RAFT})$), 27,4 ($\text{CH}_3(\text{tBu})$), 30 ($\text{CH}_2\text{-CONH}(\text{RAFT})$), 32,9 (CH_2CCN), 46 ($\text{CH}(\text{Gly-Asp-Gly})$), 49,3 ($\text{CH}(\text{Asp-Phe})$), 53,8 ($\text{CH}(\text{Phe})$), 59,3 ($\text{CH}_2\text{-OH}$), 79,9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 118,4 (CN), 126-128,8 ($\text{CH}(\text{Ar.})$), 133,3 ($\text{CH-C}(\text{Ar./Phe})$), 137,3 ($\text{SC}(\text{Phe})$), 143,8 ($\text{SC}(\text{Ar.})$), 168-170 (C=O), 223,5 (C=S)

8.3.22 Durchführung einer Kinetik zu einer RAFT-Polymerisation mit einem Oligopeptid-RAFT-Reagenz

In einem 25 mL Stickstoffkolben wurde das Oligopeptid-RAFT-Reagenz vorgelegt und in 2,2 mL DMF gelöst. Anschließend wurden 1,6 mL *n*-Butylacrylat hinzugefügt. Die Reaktion wurde mittels Durchleiten von Argon durch die Lösung entgast und unter Schutzgas gesetzt. Zur Initiierung wurde 0,09 mg AIBN, gelöst in DMF, zur Reaktion gegeben und auf 60 °C erwärmt (Die Zugabe erfolgte mittels einer Stammlösung von 9 mg in 25 mL DMF). Zur Bestimmung des Monomerverbrauchs und des Molekulargewichts in Abhängigkeit zur Polymerisationsdauer wurden während der Polymerisation in verschiedenen Abständen Proben genommen.

Der Umsatz wurde durch ^1H -NMR-Spektroskopie bestimmt. Die Bestimmung des Molekulargewichts erfolgte durch THF-GPC.

8.3.23 Synthese des Oligopeptid-transferreagenz: (Ph-C(S)-S-CH(CH₃)-C(O)-Gly-Asp(*t*Bu)-Gly-Phe-Asp(*t*Bu)-NHCH₂CH₂OH)

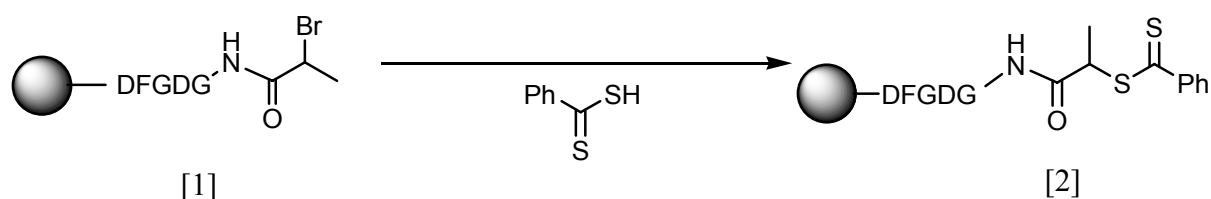


Abbildung: Umwandlung des mit 2-Br-Propionsäure funktionalisierten Oligopeptids [1] mit Phenyldithiosäure zu einem Oligopeptid – RAFT- Transferreagenz [2].

Bei der Synthese wurde als Zwischenprodukt Phenylmagnesiumbromid aus Brombenzol (1,0 mL, 9,5 mmol) und Magnesiumspäne (220 mg, 9,05 mmol) in 6 mL THF unter Schutzgas hergestellt. Dieses wurde zu wasserfreiem Kohlenstoffdisulfid (0,8 mL, 13,3 mmol) in einen

eisgekühlten Rundkolben filtriert. Die Reaktion wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 2 mL Wasser hinzugegeben und das THF bei reduziertem Druck entfernt. Es wurden weitere 20 mL Wasser und 50 mL Diethylether hinzugegeben und die wäßrige Phase mit 1M Salzsäure (15 mL) angesäuert. Das Produkt wurde zweimal mit jeweils 50 mL Diethylether aus der wäßrigen Phase extrahiert. Die vereinigten organischen Fraktionen wurden über Natriumsulfat getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel bei reduziertem Druck entfernt.

Das Ausgangsharz [1] wurde in 4 mL THF gequollen und mit der Phenylthioessigsäure (310 mg, 2,0 mmol) versetzt. Anschließend wurde die Reaktion mit Pyridin (160 μ L, 2,0 mmol) versetzt und für 15 Stunden bei 60 °C gerührt. Die Reaktion wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und das Harz gründlich mit THF, Wasser, THF und Dichlormethan gewaschen. Die Abspaltung und Isolierung des Oligopeptids vom Harz erfolgte nach der allgemeinen Prozedur für 2-Aminoethanol-2-Cl-Tritylharze.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d_6 -DMSO) δ [ppm]: 8,59 (m, 1H, NH), 8,27-8,23 (br m, 2H, NH), 8,12 (m, 1H, NH), 8,06 (d, 1H, NH), 7,92 (d, 2H, ArH_{ortho}), 7,64 (m, 1H, ArH_{meta}), 7,53 (m, 1H, NH), 7,48 (t, 2H, ArH_{meta}), 7,3-7,1 (m, 5H, ArH), 4,73 (q, 1H, CH), 4,63-4,42 (m, 3H, CH), 3,78 (m, 2H, CH₂), 3,66 (dd, 1H, CH₂), 3,61 (dd, 1H, CH₂), 3,8-3,3 (br m, H₂O), 3,37 (t, 2H, CH₂), 3,10 (m, 2H, CH₂), 3,01 (dd, 1H, CH₂), 2,77 (m, 1H, CH₂), 2,66 (m, 2H, CH₂), 2,41 (m, 2H, CH₂), 1,54 (d, 3H, CH₃), 1,37 (s, 18H, *t*Bu).

ESI-MS: m/z (%) = 761 (18) [M-2*t*Bu+H]⁺, 799 (3) [M-2*t*Bu+K]⁺, 817 (20) [M-*t*Bu+H]⁺, 873 (13) [M+H]⁺, 895 (100) [M+Na]⁺, 911 (18) [M+K]⁺, 967 (6) [M+TFA-H₂O+H]⁺.

9. Abkürzungsverzeichnis

AIBN	2,2'-Azobis-(2-methylpropionitril)
Asp(<i>t</i> Bu) [D]	Asparaginsäure- <i>tert</i> -butylester
ATRP	Atom transfer radical polymerisation
BPED	N,N',-di(pyridin-2-ylmethyl-3-hexoxo-3-oxopropyl)ethan-1,2-diamin
BPO	Dibenzoylperoxid
CD	Circulardichroismus
DA	Dalton
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Methylenchlorid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNBipy	4,4'-di-5-nonyl-2,2'-dipyridyl
EPR-Effekt	enhanced permeability and retention effect
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
Gly [G]	Glycin (L)
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunden
HBTU	(N-[(1H-benzotriazol-1-yl(dimethylamino)methylene]-N-methylmethanaminium hexafluorophosphate N-oxide
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
HPLC	High pressure liquid chromatography
MA	Acrylsäuremethylester
Maldi-TOF MS	Matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight Massenspektrometrie
Me ₆ Tren	Tri[2-(dimethylamino)ethyl]amin
min.	Minuten
M _n	Zahlenmittel des Molekulargewichts
M _w	Gewichtsmittel des Molekulargewichts
<i>n</i> BA	Acrylsäure- <i>n</i> -butylester

NMP	2-N-Methylpyrrolidon
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie
PEO	Polyethylenoxid
Ph	Phenyl
Phe [F]	Phenylalanin (L)
PMDETA	N,N,N',N'',N'''-pentamethyldiethyltriamin
Pro [P]	Prolin (L)
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxytris(pyrrolidiono)-phosphonium hexafluorophosphate
RAFT	Reversible addition-fragmentation chain-transfer polymerisation
SPPS	Solid phase peptide synthesis
^t BOC	Tert-Butoxycarbonyl
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Val [V]	Valin (L)

10. Literaturverzeichnis

-
- ¹ Homer, *The Illiad* VI, 178.
- ² H. Schlaad, M. Antonietti *Eur. Phys. J. E* **2003**, *10*, 17.
- ³ [1a] J. G. Tirrell, M. J. Fournier, T. L. Mason, D. A. Tirrell *Chem. Eng. News* **1994**, *72*, 40; [1b] D. P. Mobley, Ed. *Plastics from Microbes: Microbial Synthesis of Polymers and Polymer Precursors*; Hanser/Gardner Publications, Munich 1994; [1c] K. McGrath, D. Kaplan, Eds. *Protein-Based Materials*; Birkhauser, Boston 1997.
- ⁴ [2a] R. Duncan *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 347; [2b] Y. Younsoo Bae, S. Fukushima, A. Harada, K. Kataoka *Angew. Chem.-Int. Edit.* **2003**, *42*, 4640.
- ⁵ H.A. Klok *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **2005**, *43*, 1.
- ⁶ J.M. Harris, R.B. Chess, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 214.
- ⁷ R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 347.
- ⁸ F.F. Davis, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 457.
- ⁹ A. Abuchowski, T. van Es, N.C. Palczuk, F.F. Davis, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3578.
- ¹⁰ A. Abuchowski, J.R. McCoy, N.C. Palczuk, T. van Es, F.F. Davis, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3582.
- ¹¹ K.R.Reddy M.W.Modi S.Pedder *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 571.
- ¹² [9a] H.Maeda *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *46*, 169. [9b] H.Maeda *Adv. Enzyme Regul.* **2001**, *41*, 189.
- ¹³ G. Moad, DH. Solomon, *The chemistry of free radical polymerisation*. Oxford: Pergamon, 1995.
- ¹⁴ M. Szwarc, A. Rembaum, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1956**, *22*, 189.
- ¹⁵ M. Szwarc, M. Levy, L. Milkovich, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 2656.
- ¹⁶ M. K. Georges, R. P. N. Veregin, P. M. Kazmaier, G. K. Hamer, *Trends Polym. Sci.* **1995**, *2*, 66.
- ¹⁷ B. Keoshkerian, M. K. Georges, D. Boils-Boissiers, *Macromolecules* **1995**, *28*, 6381.
- ¹⁸ Morton, M.; Fetters, L. J. *Rubber Chem. Tech.* **1975**, *48*, 359.
- ¹⁹ Wakefield, B.J. *The Chemistry of Organolithium Compounds*, Pergamon Press, New York, 1974.
- ²⁰ M. Miyamoto, M. Sawamoto, T. Higashimura, *Macromolecules* **1984**, *17*, 265.
- ²¹ K. R. Faust, J. P. Kennedy, *Polym. Bull. (Berlin)* **1986**, *15*, 317.
- ²² H. G. Elias, *Makromoleküle*, Vol. 2 (Hüthig & Wepf Verlag, Basel, Heidelberg, New York, 1992).

-
- ²³ K. Matyjaszewski, Controlled-living radical polymerization: Progress in ATRP, NMP and RAFT, Vol. 768 (American Chemical Society, Washington, DC, 2000).
- ²⁴ J. S. Wang, K. Matyjaszewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5614.
- ²⁵ D. P. Curran, *Synthesis* **1988**, 489.
- ²⁶ J. Xia, K. Matyjaszewski, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2921.
- ²⁷ K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **1998**, *31*, 4710.
- ²⁸ K. Matyjaszewski, V. Coessens, Y. Nakagawa, J. Xia, J. Qiu, S. Gaynor, S. Coca, C. Jasieczek, *Functional Polymers. Modern Synthetic Methods and Novel Structures* Vol. 704 (ed. A. O. Patil, Schulz, D. N., Novak, B. M.) (American Chemical Society, Washington, DC, 1998).
- ²⁹ T. Nishikawa, T. Ando, M. Kamigaito, M. Sawamoto, *Macromolecules* **1997**, *30*, 2244.
- ³⁰ J.-S. Wang, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **1995**, *28*, 7901.
- ³¹ J. P. A. Heuts, R. Mallesch, T. P. Davis, *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, *200*, 1380.
- ³² D. Greszta, K. Matyjaszewski, *Polym. Prep. (Am. Chem. Soc., Polym. Div.)* **1996**, *37*(2), 569.
- ³³ D. M. Haddleton, M. C. Crossman, K. H. Hunt, *Macromolecules* **1997**, *30*, 3992.
- ³⁴ J. Xia, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **1999**, *32*, 5199.
- ³⁵ H. J. Fischer, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1999**, *37*, 1885.
- ³⁶ V. Percec, B. Barboiu, H.-J. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 305.
- ³⁷ K. Matyjaszewski, T. E. Patten, J. Xia, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 674.
- ³⁸ J.-L. Wang, T. Grimaud, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **1997**, *30*, 6507.
- ³⁹ K. Davis, H.-j. Paik, K. Matyjaszewski, *Macromolecules* **1999**, *32*, 1767.
- ⁴⁰ N. K. Singha, B. Klumperman, *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, *21*, 1116.
- ⁴¹ A. Kajiwarra, K. Matyjaszewski, M. Kamachi, *Macromolecules* **1998**, *31*, 5695.
- ⁴² K. Matyjaszewski, S. Coca, S. G. Gaynor, Y. Nakagawa, S. M. Jo (US 5789487, 1996).
- ⁴³ K. Matyjaszewski, *Macromol. Symp.* **1996**, *111*, 47.
- ⁴⁴ K. Matyjaszewski, S. Coca, S. G. Gaynor, M. Wei, B. E. Woodworth, *Macromolecules* **1997**, *30*, 7348.
- ⁴⁵ Matyjaszewski, K.; Xia, J. *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 2921.
- ⁴⁶ Brandts, J. A. M.; van de Geijn, P.; van Faassen, E. E.; Boersma, J.; van Koten, G. J. *Organomet. Chem.* **1999**, *584*, 246.
- ⁴⁷ G. Kickelbick, K. Matyjaszewski, *Macromol. Rapid Commun.* **1999**, *20*, 341.

-
- ⁴⁸ J. Xia, X. Zhang, K. Matyjaszewski, *Transition Metal Catalysis in Macromolecular Design* Vol. 760 (eds. L. S. Boffa & B. M. Novak) (American Chemical Society, Washington, DC, 2000).
- ⁴⁹ M. Destarac, J. M. Bessière, B. Boutevin, *Macromol. Rapid Commun.* **1997**, *18*, 967.
- ⁵⁰ Y. Shen, S. Zhu, F. Zeng, R. Pelton, *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, *201*, 1169.
- ⁵¹ Munakata, M.; Kitagawa, S.; Asahara, A.; Masuda, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 1927.
- ⁵² Matyjaszewski, K. *ACS Symp. Ser.* **1998**, *685*, 258.
- ⁵³ Wang, J.-L.; Grimaud, T.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **1997**, *30*, 6507.
- ⁵⁴ M. Kamigaito, A. Tsuyoshi, M. Sawamoto, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3689.
- ⁵⁵ V. Coessens, T. Pintauer, K. Matyjaszewski, *Prog. Polym. Sci.* **2001**, *26*, 337.
- ⁵⁶ Lehninger/Nelson/Cox – Prinzipien der Biochemie, 3. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001.
- ⁵⁷ M. J. Roberts, M. D. Bentley, J. M. Harris, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **2002**, *54*, 459.
- ⁵⁸ A.H. Klok, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **2005**, *43*, 1.
- ⁵⁹ A. Chilkoti, G.Chen, P.S.Stayton, A.S.Hoffman, *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 504.
- ⁶⁰ P.S.Stayton, T. Shimoboji, C. Long, A. Chilkoti, G.Chen, M.J.Harris, A.S.Hoffman, *Nature* **1995**, *378*, 472.
- ⁶¹ T. Shimoboji, Z.L.Ding, P.S.Stayton, A.S.Hoffman, *Bioconjugate Chem* **2002**, *13*, 915.
- ⁶² T. Shimoboji, E.Larenas, T.Fowler, A.S.Hoffman, P.S.Stayton, *Bioconjugate Chem* **2003**, *14*, 517.
- ⁶³ K.Velonia, A.E.Rowan,R.J.M.Nolte, *J. Am.Chem.Soc.* **2002**, *124*, 4224.
- ⁶⁴ O.Kinster,G.Molineux,M.Treuheit, D.Ladd, C.Gegg, *Adv Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 477.
- ⁶⁵ M. Köhn, R.Breinbauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3106.
- ⁶⁶ V.V.Rostovtsev, L.G.Green, V.V.Forkin, K.B.Sharpless *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- ⁶⁷ E.Saxon, C.R.Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007.
- ⁶⁸ K.L.Kiick, E.Saxon, D.A. Tirrell, C.R.Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 19.
- ⁶⁹ A.J.Link, D.A.Tirrell, *J.Am.Chem.Soc.* **2003**, *125*, 11164.
- ⁷⁰ Y.A.Lu, A.M.Felix *Pept. Res.* **1993**, *6*, 140.
- ⁷¹ T.S:Burkoth, T.L.S. Benzinger, D.N.M.Lones, K. Hallenga, S.C. Meredith, D.G. Lynn, *J. AM. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7655.

-
- ⁷² A.Rösler, H.A.Klok, I.W.Hamley, V.Castelleto, O.O.Mykhylyk, *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 859.
- ⁷³ J.H.Collier, P.B.Messersmith, *Adv. Mater.* **2004**, *11*, 907.
- ⁷⁴ C.K Smith G. Liu *Macromolecules* **1996**, *29*, 2060.
- ⁷⁵ J.E.T. Corrie, D.R.Reid, M.B.Trentham, A.M.Mazid, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1992**, *1*, 1015.
- ⁷⁶ S.R.Adams, R.Y.Tsien, *Ann. Rev. Phiosol.* **1993**, *55*, 755.
- ⁷⁷ K.R.Gee, L.W.Kueper, J.Barnes, G.Dudley, R.S.Gives, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1228.
- ⁷⁸ A.Harada,K.Kataoka, *Macromolecules* **1995**, *28*, 5294.
- ⁷⁹ R.A.W.Johnstone, A.H.Wilby, I.D.Entwistle, *Chem.Rev.* **1985**, *85*,129.
- ⁸⁰ J.Z.Yang, S.Antoun, R.M. Ottenbrite, S.J..Milstein, *J.Bioactive and Compatible Polym.* **1996**, *11*, 219.
- ⁸¹ G.M.Anantharamaiah, K.M.Sivanandaiah, *J.Chem.Soc.Perkin Trans.* **1977**, *1*, 490.
- ⁸² M.K.Anwer, A.F.Spatola, *Synthesis*, **1980**, 929.
- ⁸³ H.Reiersen, A.R.Clarke, A.R.Rees, *J.Mol.Biol.* **1998**, *283*, 255.
- ⁸⁴ M. L. Becker, J. Q. Liu, K. L. Wooley *Chem. Commun.* **2003**, 180.
- ⁸⁵ Y. Mei, K. L. Beers, H. C. M. Byrd, D. L. Vander Hart, N. R. Washburn *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3472.
- ⁸⁶ L. Ayres, M. R. J. Vos, P. Adams, I. O. Shklyarevskiy, J. C. M. van Hest *Macromolecules* **2003**, *36*, 5967.
- ⁸⁷ M.Senoo, Y.Kotani, M.Kamigaito, M.Swamamoto *Macromolecules* **1999**, *32*, 8005.
- ⁸⁸ I.C.Reynhout, R.M.Naval, D.W.P.M.Löwik, L.C.M.van Hest, J.J.L.M.Cornelissen, R.J.M.Nolte, JUPAK Abstrakt, Paris 2004.
- ⁸⁹ M. Teodorescu, K. Matyjaszewski *Macromolecules* **1999**, *32*, 4826.
- ⁹⁰ D. Neugebauer, K. Matyjaszewski *Macromolecules* **2003**, *36*, 2598.
- ⁹¹ M. Teodorescu, K. Matyjaszewski *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, *21*, 190.
- ⁹² J.G.Chen, M.Logman, S.G.Weber, *Electroanalysis* **1999**, *11*, 331.
- ⁹³ M.Teodorescu, K.Matyjaszewski, *Macromolecules* **1999**, *32*, 4826.
- ⁹⁴ D.Neugebauer, K.Matyjaszewski, *Macromolecules* **2003**, *36*, 2598.
- ⁹⁵ M.Teodorescu, K.Matyjaszewski, *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, *21*, 190.
- ⁹⁶ S.Ding, Y.Shen, M.Radosz, *J.Polym. Sci. Part A: Polym Chem.* **2004**, *42*, 3553.
- ⁹⁷ S.Ding, M.Radosz, Y.Shen, *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25*, 632.
- ⁹⁸ P.Takolpuckdee, C.A.Mars, S.Perrier,S.L.Archibald, *Macromolekules* **2005**, *38*, 1057.

-
- ⁹⁹ J.Meijer, P.Vermeer, L.Brandsma, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas-J. Roy. Neth. Chem. Soc.* **1973**, *92*, 601.
- ¹⁰⁰ R.W.Bost, W.J.Mattox, *J. Am. Chem.Soc.* **1930**, *52*, 332.
- ¹⁰¹ J.Houben, *J. Dtsch. Chem. Ges.* **1906**, *39*, 1736.
- ¹⁰² K.A.Latif, M.Y.Ali, *Tetrahedron* **1970**, *26*, 4247.
- ¹⁰³ S.H.Thang, B.Y.K.Chong, R.T.A.Mayadunne, G.Moad, E.Rizzardo, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2435.
- ¹⁰⁴ A.Feldermann, M.L.Coote, M.H.Stenzel, T.P.Davis, C.Barner-Kowollik, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15915.
- ¹⁰⁵ Y.Kwak, A.Goto, K.Komatsu, Y.Sugiura, T.Fukuda, *Macromolecules* **2004**, *37*, 4434.
- ¹⁰⁶ J.B.McLeary, F.M.Calitz, J.M.McKenzie, M.P.Tonge, R.D.Sanderson, B.Klumperman, *Macromolecules* **2004**, *37*, 2383.
- ¹⁰⁷ M.J.Monteiro, H.de Brouwer, *Macromolecules* **2001**, *34*, 349.
- ¹⁰⁸ R.Venkatesh, B.B.P.Staal, B.Klumperman, M.J.Monteiro, *Macromolecules* **2004**, *37*, 7906.
- ¹⁰⁹ P.W.Clark, B.J.Mulraney, *J.Organomet. Chem.* **1981**, *217*, 51.
- ¹¹⁰ Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, W.C.Chan, P.D.White, PAS Oxford univ. Press 2000.
- ¹¹¹ D.Jönsson, A.Unden, *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 3125.
- ¹¹² Gil et al.; *Bioorg. Med.Chem.* **1999**, *7*, 901.
- ¹¹³ S. Ding, M. Radosz, Y.Shen, *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25*, 632.