„Stealth“-Technologie: Darstellung und Charakterisierung von funktionellen Polyethylenglykol-Derivaten

DIPLOMARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades
MAGISTRA RERUM NATURALIUM
an
der Fakultät für Chemie
der Universität Wien

eingereicht von
KERSTIN RUMPELMAYR
WIEN, Juni 2006

ausgeführt an den Departments für
Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
&
Biochemie

Ich möchte meinem Betreuer Ao. Univ. Prof. Dr. Fritz Pittner meinen aufrichtigen und verbundenen Dank für seine umfassende Betreuung und Unterstützung aussprechen.

Besonderer Dank gilt Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Franz Gabor für seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft, durch die mir in jeder Phase meiner Arbeit hilfreicher Rat zuteil wurde.

Weiters möchte ich mich herzlichst bei meiner Familie, besonders meinen Eltern, Gertraud und Josef, durch deren Hilfe und Unterstützung mir das Studium der Chemie erst ermöglicht wurde, bedanken.

Auch meinem Freund, Nicolas, der mir in dieser Zeit verständnis- und liebevoll zur Seite stand, bin ich in größter Dankbarkeit verbunden.

Und nicht zuletzt möchte ich all meine Kollegen und Freunde dankend erwähnen, deren Hilfsbereitschaft und Kollegialität mich stets durch das Studium begleitet haben.

1 ZUSAMMENFASSUNG 4

2 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG 7

3 GRUNDLAGEN 9

3.1 PEGylierung 9
3.1.1 Polyethylenglykol 9
3.1.2 Das Schicksal von Nanopartikeln im Körper 10
3.1.3 Stealth-Partikel 11
3.2 NHS-Ester 14
3.3 Carbodiimide 15
3.4 Die Carbobenzoxy-Schutzgruppe (CBZ) 19
3.5 Fluorescein als Fluoreszenzmarker 20

4 METHODEN, INSTRUMENTIERUNG UND REAGENZIEN 23

4.1 Dünnschichtchromatographie (DC) 23
4.2 Anfärbereagenzien für die DC 25
4.3 Spektroskopische Methoden 27
4.3.1 IR-Spektroskopie 27
4.3.2 UV-VIS-Spektroskopie 30
4.4 Spot-Tests 32
4.4.1 Nachweis von Carbonsäuren (-COOH-Gruppe) 32
4.4.2 Stickstoffnachweis mittels pyrolytischer Oxidation 33
4.4.3 Nachweis von Ethylen-Derivaten (CH_2-CH_2-Gruppe) 34
4.5 TNBS-Test zur Quantifizierung primärer Amine 35
4.6 Besondere Reagenzien 37

5 ERGEBNISSE 38

5.1 Vorversuche hinsichtlich Löslichkeiten der Reagenzien 38
5.1.1 Poly-(ethylenglykol)methylether (mPEG) 39
5.1.2 Poly-e-carbobenzoxy-L-lysin (e-CBZ-PLL) 40
5.1.3 N,N`-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) 40
5.1.4 N-Hydroxysuccinimid (NHS) 40
5.2 Succinyl-PEG 41
5.2.1 Durchführung der Synthese 42
5.2.2 Entwicklung der Synthese 42
5.2.3 Analytische Charakterisierung und Diskussion 43
5.2.3.1 Untersuchung mittels IR-Spektroskopie 43
5.2.3.2 Abschließende Bemerkungen 44
5.3 Carboxyl-PEG 45
5.3.1 Durchführung der Synthese 46
5.3.2 Entwicklung der Synthese 46
5.3.3 Analytische Untersuchungen und Diskussion 48
5.3.3.1 Dünnschichtchromatographie 48
5.3.3.2 Detektion von Triethylaminhydrochlorid 55
5.3.3.3 Nachweis der Carboxylfunktion 58
5.3.3.4 Infrarot-Spektroskopie 58
5.3.3.5 Abschließende Bemerkungen und Ausblick 60
5.4 PLL-PEG 61
5.4.1 Durchführung der Synthese 62

5.4.2 ENTWICKLUNG DER SYNTHESE ... 63
ANALYTISCHE CHARAKTERISIERUNG UND DISKUSSION ... 66
5.4.2.1 UV-VIS-Spektroskopie ... 66
5.4.2.2 IR-Spektroskopie ... 68
5.4.2.3 Nachweis der PEG-Struktur ... 70
5.4.2.4 Nachweis von Aminen mittels Ninhydrin ... 71
5.4.2.5 Fluoreszenzlöschung durch die CBZ-Gruppen ... 72
5.4.2.6 Abschließende Bemerkungen und Ausblick ... 72
5.5 AMINO-PEG ... 74
5.5.1 DURCHFÜHRUNG DER SYNTHESE ... 75
5.5.2 ENTWICKLUNG DER SYNTHESE ... 75
5.5.3 ANALYTISCHE CHARAKTERISIERUNG UND DISKUSSION ... 77
5.5.3.1 UV-VIS-Spektroskopie ... 78
5.5.3.2 IR-Spektroskopie ... 78
5.5.3.3 Nachweis von Aminen mittels Ninhydrin ... 80
5.5.3.4 TNBS-Test zur Quantifizierung von primären Aminen ... 80
5.5.3.5 Abschließende Bemerkungen und Ausblick ... 84
5.6 F-PLGA DURCH KOPPLUNG MIT FLUORESCEINISOTHIOCYANAT ... 86
5.6.1 DURCHFÜHRUNG DER SYNTHESE ... 87
5.6.2 ENTWICKLUNG DER SYNTHESE ... 88
5.6.3 ANALYTISCHE CHARAKTERISIERUNG UND DISKUSSION ... 89
5.6.3.1 IR-Spektroskopie ... 89
5.6.3.2 Visuelle Untersuchung ... 90
5.6.3.3 Abschließende Bemerkungen und Ausblick ... 91

6 ANHANG ... 92

6.1 LITERATURVERZEICHNIS ... 92
6.2 ABKÜRZUNGEN ... 96
6.3 CURRICULUM VITAE ... 98
6.4 SPEKTREN ... 99

1 Zusammenfassung

Bereits in den 1960er Jahren wurde das Konzept vorgestellt, einen pharmazeutischen Wirkstoff in partikuläre Arzneistoffträger aus Polymeren oder makromolekularen Stoffen einzubringen. Es besteht jedoch bis jetzt ein ungemindertes Interesse an der Entwicklung solcher Drug-Delivery-Systeme, da sie entscheidende Vorteile mit sich bringen. Empfindliche Arzneistoffe, wie zum Beispiel Peptide oder Proteine, können durch Einschließen in Transportvehikel vor der proteolytischen Zersetzung im Körper, vorzeitiger Ausscheidung durch die Nieren und Inaktivierung durch das Immunsystem beschützt werden. Eine vielversprechende Entwicklung auf diesem Gebiet sind Mikro- und Nanopartikel aus dem biokompatiblen und biologisch abbaubaren Copolymer Poly(lactid-*co*-glycolid) kurz PLGA. Allerdings sehen sich auch derartige Arzneistoffträger mit den Abwehrmechanismen des Körpers konfrontiert. In der Regel werden sie rasch durch Zellen des Retikuloendothelialen Systems aus dem Körper entfernt. Unter den zahlreichen Ansätzen diesen Vorgang zu umgehen, sticht besonders die Oberflächenmodifikation mit dem hydrophilen, nichtionischen Polymer Polyethylenglykol (PEG) hervor. Es konnte gezeigt werden, dass eine Modifikation mit PEG das Ausmaß der Phagozytose durch RES-Zellen reduzieren kann und somit auf diese Weise langlebige Nano- und Mikropartikel hergestellt werden können.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollten Materialien zur Oberflächenmodifikation von PLGA-Nanopartikeln mit Polyethylenglykol synthetisiert werden. Die Modifikation selbst kann einerseits durch kovalente Bindung von PEG-Ketten an funktionelle Gruppen des Partikel-Materials PLGA oder durch Nutzung elektrostatischer Anziehungskräfte erfolgen. Die Partikeloberfläche ist durch Anwesenheit von zahlreichen Carboxylfunktionen negativ geladen und es ist bereits bekannt, dass kationische Di-Blockcopolymere aus PEG und Poly-L-Lysin (PLL) mit dem positiv geladenen PLL-Teil an die Partikel adsorbieren, während sich die PEG-Ketten nach außen hin orientieren. Ein solches Copolymer sollte hier durch Konjugation von PEG 2000 mit ε-CBZ-PLL (M ~ 1000 Da), bei dem sämtliche primäre Aminogruppen bis auf eine einzige α-Aminogruppe durch Carbobenzoxy-Schutzgruppen blockiert sind, hergestellt werden. PEG wurde durch das Einführen einer endständigen

Carboxylfunktion für die Konjugation aktiviert. Dazu wurde die Hydroxylgruppe von Polyethylenglykolmethylether 2000 (mPEG) durch Umsetzung mit Chloressigsäure in eine Carboxylfunktion transformiert. Das dadurch erzeugte Carboxyl-PEG wurde mittels einer Kombination aus N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) zu einem reaktiven NHS-Ester umgesetzt, welcher wiederum mit der primären Aminogruppe des CBZ-PLLs weiterreagieren und eine kovalente Amidbindung zwischen PEG und PLL ausbilden kann. Um die CBZ-Schutzgruppen von den Aminogruppen abzuspalten, welche dann erst die positive Ladung von PLL bewirken, wurde die Methode der katalytischen Transferhydrierung mit 1,4-Cyclohexadien als Wasserstoffdonor gewählt.
Für die kovalente Modifikation von PLGA mit PEG, wurde aus dem zuvor hergestellten Carboxyl-PEG durch Aktivierung mit DCC/NHS und anschließende Kopplung mit Ethylendiamin das Amino-Derivat von mPEG synthetisiert. Die so eingeführte primäre Aminogruppe kann weiters zur Konjugation mit Carboxylgruppen des PLGA eingesetzt werden.
Weiters wurde fluoreszenzmarkiertes PLGA durch Umsetzung von Amino-PLGA mit Fluoresceinisothiocyanat hergestellt. Amino-PLGA erhielt man dabei auf die gleiche Art und Weise wie schon Amino-PEG erzeugt wurde, kurz, durch Aktivierung der Carboxylfunktionen mittels DCC/NHS und anschließende Reaktion mit Ethylendiamin.

Das Carboxyl-Derivat von PEG konnte in guten Ausbeuten hergestellt und die Anwesenheit von Carboxylgruppen im Produkt mittels Infrarotspektroskopie bestätigt werden.
Im Gegensatz dazu wurde die Bildung des PLL-PEG-Konjugates nicht beobachtet, das Endprodukt enthielt keinerlei PEG, was unter anderem mittels Infrarotspektroskopie festgestellt wurde. Möglicherweise war die Kopplung von Carboxyl-PEG an die einzige freie α-Aminogruppe des CBZ-PLLs aus sterischen Gründen nicht erfolgreich.
Amino-PEG wurde in zufriedenstellenden Ausbeuten erhalten. Durch Behandlung mit Ninhydrin konnten Aminogruppen im Produkt nachgewiesen werden. Eine Quantifizierung der vorhandenen primären Aminogruppen erfolgte mittels TNBS-Test, wodurch festgestellt wurde, dass circa jedes dritte mPEG-Molekül eine Aminogruppe besitzt.

Ziel bei der Herstellung von F-PLGA war es, ohne Verwendung von DMSO auszukommen, welches sich bei der späteren Produktion von Nanopartikeln destabilisierend auswirken würde. Das Lösungsmittel DMSO konnte erfolgreich durch Aceton ersetzt werden. Mit dem so erhaltenen F-PLGA wurden stabile, fluoreszenzmarkierte Nanopartikel hergestellt.

2 Einleitung und Problemstellung

Angeregt durch die rapide Weiterentwicklung der Gen- und Biotechnologie in den letzten Jahrzehnten, welche eine Vielzahl an neuartigen Biopharmazeutika hervorbrachte, entstand ein enormes Interesse an der Entwicklung von adäquaten Drug-Delivery-Systemen. Denn derartige Arzneistoffe, wie zum Beispiel Protein- oder Peptidwirkstoffe, bringen eine Reihe von Mängeln mit sich, die ihre Einsatzmöglichkeiten limitieren. Sollen etwa Peptide oder Proteine als Wirkstoffe in Medikamenten eingesetzt werden, muss man sich dessen bewusst sein, dass diese komplexen Biomoleküle im Körper schnell dezimiert werden. Verantwortlich für diesen Vorgang sind vorrangig der Abbau durch proteolytische Enzyme, Ausscheidung über die Nieren und Inaktivierung durch das Immunsystem. Um diese Probleme zu umgehen, wurden in der Forschung bereits viele Wege eingeschlagen. Einer von ihnen ist, die Wirkstoffe in Transportvehikel, wie zum Beispiel Nanopartikel, einzubringen. Nanopartikel sind kolloidale Partikel mit einer Größe im Nanometer-Bereich, die für den Einsatz als Arzneistoffträger meist aus natürlichen Polymeren, wie Polysacchariden, oder synthetischen, bioabbaubaren Polymeren, wie Polylactiden oder Polyglycoliden, erzeugt werden. Der Wirkstoff ist dabei entweder in die Polymermatrix eingebettet oder wird von einer Polymerschicht umhüllt. Die Partikel als Arzneistoffträger schirmen also den Wirkstoff von der Körperumgebung ab, bis er mit einer zeitlichen Verzögerung durch Diffusion und Biodegradation des Polymers [1] wieder freigesetzt wird.

Jedoch auch Nanopartikel sind vor Angriffen des Immunsystems nicht sicher und werden in der Regel rasch vom Retikuloendothelialen System (RES) beseitigt [2-4], wodurch es gar nicht erst zur Freisetzung des enthaltenen Wirkstoffes kommt. Es wurden deshalb eine Vielzahl von Versuchen unternommen, „Stealth“-Partikel, also vor dem Immunsystem „getarnte“ Nanopartikel, zu entwickeln. Beispielsweise wurden hierfür die Oberflächen von Nanosphären mit nichtionischen, oberflächenaktiven Stoffen, wie Pluronic oder Tetronic [5], oder mit polymeren Makromolekülen modifiziert, welche die Wechselwirkungen mit Komponenten des Immunsystems herabsetzen sollten. Einer der erfolgreichsten Ansätze darunter ist die Oberflächenmodifikation von Partikeln mit dem hydrophilen, nichtionischen Polymer Polyethylenglykol (PEG). Es konnte gezeigt werden, dass PEG-modifizierte

Nanopartikel aus Polylactid-*co*-glycolid (PLGA) bei intravenöser Administration im Vergleich zu reinen PLGA-Partikeln eine wesentlich erhöhte Plasmaverweilzeit aufweisen [6], wodurch erst die eigentliche Aufgabe der Partikel, nämlich die Abgabe des transportierten Arzneistoffes im Körper, erreicht werden kann.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollten Materialien zur Oberflächenmodifikation von PLGA-Nanosphären mit Polyethylenglykol (PEGylierung) synthetisiert werden. PEG kann beispielsweise kovalent an PLGA gebunden werden. Zu diesem Zweck sollte ein PEG-Derivat mit endständiger Aminogruppe („Amino-PEG“) für die Kopplung mit Carboxylfunktionen von PLGA hergestellt werden. Mit dem so erzeugten PEG-PLGA-Copolymer können in weiterer Folge PEGylierte Nanopartikel produziert werden.
Die Oberflächenmodifikation kann aber auch durch gezieltes Nutzen von elektrostatischen Wechselwirkungen erfolgen. PLGA besitzt aufgrund seiner zahlreichen Carboxylfunktionen eine negative Ladung, wodurch positiv geladene Moleküle an der Oberfläche von Partikeln aus PLGA adsorbieren können. Es wurde bereits gezeigt, dass kationische Copolymere aus Poly-L-Lysin und PEG aufgrund ihrer positiven Ladung stark an den negativ geladenen PLGA-Partikeln adsorbieren [7, 8]. Nach diesem Vorbild sollte in der vorliegenden Arbeit Polyethylenglykol durch das Einführen einer endständigen Carboxylgruppe („Carboxyl-PEG“) für die Konjugation mit Poly-L-Lysin (PLL) aktiviert und die Kopplungsreaktion durchgeführt werden. Anschließend sollten notwendige analytische Methoden für die Verfolgung der Reaktionen und Charakterisierung sämtlicher Produkte etabliert werden. Vergleichbare PEG-Derivate mit endständigen Carboxyl- oder Aminogruppen sind zwar bereits kommerziell erhältlich, jedoch würde die selbsttätige Synthese aus den preisgünstigen Ausgangsverbindungen eine wesentliche Kostenersparnis bedeuten.

Eine weitere Aufgabe bestand darin, ein von Kim *et al*. übernommenes Verfahren zur Fluoreszenzmarkierung von PLGA mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) [8] zu optimieren. Auch hier spielte der Kostenfaktor eine entscheidende Rolle, da die Markierung mittels FITC im Vergleich zur bereits etablierten Methode der Fluorescein-Cadaverin-Kopplung eine deutliche Reduktion der Kosten mit sich brächte.

3 Grundlagen

3.1 PEGylierung

Der Vorgang, bei dem Polyethylenglykol-Ketten an anderen Materialien wie zum Beispiel Proteinen, Peptiden oder modifizierten Metalloberflächen angebracht werden, wird PEGylierung genannt.

3.1.1 Polyethylenglykol

Die Struktur von PEG, in *Abb. 1* dargestellt, besteht aus sich wiederholenden Einheiten von Ethylenoxid, wobei die Polymerkette an beiden Seiten in Hydroxidgruppen endet.

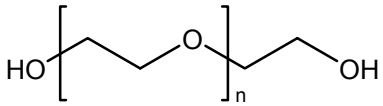


Abb. 1: Polyethylenglykol (PEG)

Hergestellt wird es durch anionische Polymerisation von Ethylenoxid, was je nach Polymerisationsbedingungen zur Bildung von Polymersträngen mit verschiedenen Molekulargewichten führt. Bei Molekülen mit einem Gewicht von 200 bis 35000 Da hat sich die Bezeichnung Polyethylenglykole eingebürgert, größere Produkte werden als Polyethylenoxide bezeichnet. Häufig findet man die Abkürzung PEG zusammen mit einem Zahlenwert, der das mittlere Molekulargewicht angibt.
Je nach Kettenlänge weisen Polyethylenglykole unterschiedliche Konsistenzen auf. Bis zu einem mittleren Molekulargewicht von 400 Da sind sie bei Raumtemperatur nichtflüchtige Flüssigkeiten, PEG 600 ist eine pastenartige Substanz, während PEG 2000 ein wachsartiger Feststoff ist.
Polyethylenglykole zeigen eine ausgesprochen gute Wasserlöslichkeit, wobei sie gleichzeitig in vielen organischen Lösungsmitteln löslich sind (*siehe Abschnitt 5.1*). Ab einem mittleren Molekulargewicht von 1000 Da weisen sie eine äußerst geringe

Toxizität und Immunogenität auf [9, 10], weswegen sie eine breite Anwendung in der Lebensmittel-, Kosmetik- und pharmazeutischen Industrie finden.

3.1.2 Das Schicksal von Nanopartikeln im Körper

Je nach dem, ob Nanopartikel dem Körper intravenös oder über oralem Wege zugeführt werden, kommen sie sofort in direkten Kontakt mit dem Blut und seinen Bestandteilen oder müssen erst die Barriere des gastrointestinalen Traktes passieren. Nach ihrer Resorption finden sich auch die peroral verabreichten Partikel im Blut oder in der Lymphe wieder [11] und sehen sich mit den Abwehrmechanismen des Körpers konfrontiert. Ihre Zirkulation im Körper ist somit nicht von langer Dauer, da die Zellen des Retikuloendothelialen Systems sie rasch (oft innerhalb von Minuten) via Phagozytose beseitigen [12, 3]. Zum größten Teil geschieht dies durch in der Leber lokalisierte Makrophagen, die so genannten Kupffer-Sternzellen [5] und die Makrophagen der Milz [6]. Ein mit diesem Vorgang eng verbundener Prozess ist die Opsonisierung, worunter man die Förderung der Phagozytose durch das Einwirken bestimmter Substanzen so genannter Opsonine versteht. Opsonine sind entweder Antikörper oder Komplementfaktoren (Proteine des Komplementsystems), die durch Anlagerung an Fremdkörper, in diesem Fall die Nanopartikel, die Erkennung und anschließende Vernichtung durch Phagozyten begünstigen.
Es konnte gezeigt werden, dass Komplementfaktor C3 und Immunglobulin G an die Oberfläche von PLA-Nanosphären adsorbieren. Weiters wurden Fibrinogen, Albumin und zahlreiche Apolipoproteine an Nanosphären-Oberflächen gefunden [1].
Generell kann gesagt werden, dass Proteine vergleichsweise stärker an hydrophobe und wesentlich schwächer an hydrophile Oberflächen adsorbieren [13]. Dies gilt als Erklärung für die verstärkte Aufnahme von hydrophoben Partikeln durch Phagozyten [3].
Ein weiteres Kriterium für das Schicksal von Nanopartikeln ist ihre Größe. Partikel über einer Größe von ungefähr 200 nm werden vermehrt durch Leber und Milz ausgefiltert und abgesondert [14, 15]. Andererseits sammeln sich auch Partikel unter 70 nm in der Leber an [3] und mitunter können sehr kleine Partikel über den renalen Weg ausgeschieden werden.

3.1.3 Stealth-Partikel

Van Oss zeigte 1978, dass viele pathogene Bakterien eine Oberfläche besitzen, die aus einer hydrophilen, hydratisierten Schicht von Proteinen, Polysacchariden und Glycoproteinen besteht. Diese hydrophile Schicht reduziert nachweisliche die Wechselwirkungen der Bakterienoberfläche mit Blutkomponenten und unterdrückt Phagozytose durch Zellen des RES [16]. Man könnte nun meinen, dass jeglicher hydrophiler, hydratisierter Überzug für Nanopartikel denselben Effekt erzielen sollte. Ein Überziehen von Partikeln mit Gelatine konnte das Ausmaß der Phagozytose jedoch nicht vermindern [17], genauso wenig wie die Modifikation mit dem stark hydrophilen Polymer Dextran dies vermochte [18].
Durch Untersuchungen von Abuchowski *et al.* war bereits 1977 bekannt, dass das Koppeln von Proteinen mit Polyethylenglykol die Immunogenität der Proteine deutlich vermindert und erhöhte Serumhalbwertszeiten induziert [19]. Wenig später verwendeten Illum *et al.* eine Reihe von polyethylenoxid-hältigen Blockcopolymeren, um die Oberfläche von Modellpartikeln zu modifizieren, was zu einer signifikanten Erhöhung der Zirkulationszeit im Blutkreislauf führte [20-22].
In der folgenden Zeit gab es eine Reihe von Versuchen, bei denen die Oberflächen von partikulären Arzneistoffträgern unterschiedlicher Zusammensetzung mit PEG-Ketten modifiziert wurden und es konnte bestätigt werden, dass mit dieser Art von Modifikation die Blutzirkulationszeit der Partikel erhöht werden kann [23-25, 6]. Die Anreicherung mit PEG-Ketten an der Oberfläche kann dabei entweder schon beim Produktionsprozess der Nanopartikel durch Verwendung von Pfropfcopolymeren (graft copolymers) wie zum Beispiel PLGA-PEG, durch physikalische Adsorption (Nutzung elektrostatischer oder Van-der-Waals-Anziehung) oder durch kovalente Kopplung mit funktionellen Gruppen an der Partikeloberfläche geschehen [3,12]. Beispielsweise stellten Li *et al.* PEGylierte PLGA-Nanopartikel aus einem PLGA-PEG 5000-Pfropfcopolymer her. Mit dieser Methode konnten sie die Serumhalbwertszeit von puren PLGA-Partikeln in Ratten von 13,6 Minuten auf das annähernd 20-fache erhöhen [6].
Faraasen *et al.* hingegen verwendeten ein Pfropfcopolymer aus Poly-L-Lysin (20 kDa) und PEG 2000, welches aufgrund der stark positiven Ladung des PLLs spontan an die negativ geladene Oberfläche von PLGA-Mikrosphären adsorbierte, wodurch ein bürstenartiger „PEG-Teppich“ auf den Partikeln entstand. Anhand dieses

Überzugs konnte das Ausmaß der Phagozytose durch Makrophagen und dendritische Zellen aus menschlichem Blut auf 10%, verglichen mit dem Wert für unmodifizierte PLGA-Mikrosphären, reduziert werden [7].

Nun bleibt jedoch die Frage, warum eine Modifikation mit PEG eine Erhöhung der Serumhalbwertszeit bewirkt. Was sind die Mechanismen, die zu einer Reduktion der Phagozytose führen?
Studien von PEG in Lösung zeigten, dass jede Ethylenglycol-Einheit zwei oder drei Wassermoleküle bindet, deswegen verhält sich PEG als wäre es fünf bis zehn Mal größer als ein korrespondierendes Protein gleicher Molekularmasse [26, 9]. PEG erzeugt dadurch eine Oberfläche, die sich in einem flüssigkeitsähnlichen Zustand befindet, wobei das angelagerte Wasser hydrophobe Wechselwirkungen minimiert. Gleichzeitig weisen die PEG-Ketten eine außerordentlich hohe Flexibilität und Mobilität auf. Es wurde vorgeschlagen, dass sich nähernde Proteine durch die PEG-Ketten abgestoßen werden, weil durch deren starke Mobilität keine ausreichende Kontaktzeit, die für eine Adsorption notwendig wäre, vorhanden ist [3].
Anders ausgedrückt, kommt es bei der Annäherung der beiden Moleküle zu einem Entropie-Verlust aufgrund einer Verringerung des zur Verfügung stehenden Volumens für jedes Molekül. Dies führt zu einem Anstieg der freien Mischungsenthalpie, was folglich die Trennung der Moleküle bewirkt. Weiters entwickelt sich auch eine abstoßende osmotische Kraft, wenn die Polymerketten durch ein sich näherndes Protein komprimiert werden. Es kommt hierdurch zu einer Erhöhung der Polymerkonzentration im Vergleich zu unkomprimierten Stellen am Partikel, was das verstärkte Einströmen von Wasser in das komprimierte Gebiet nach sich zieht. Dies treibt wiederum Protein und Polymer auseinander [12].
PEG zeigt also aufgrund seiner Tendenz Wasser zu binden und seiner hohen Flexibilität und Mobilität eine proteinabstoßende Wirkung, was im Folgenden Auswirkungen auf die Opsonisierung hat, da Opsonine im allgemeinen Proteinstruktur aufweisen.
Es wird generell angenommen, dass die verstärkte Phagozytose-Resistenz von PEG-modifizierten Partikeln auf der Inhibierung der Opsonisierung durch Serum- oder Plasmaproteine beruht [27].
Dabei hängt die optimale Protektion von der PEG-Kettenlänge und der Oberflächendichte der an den Partikeln angebrachten PEG-Ketten ab.

Gref *et al.* untersuchten PEG-modifizierte PLA-Nanopartikel (aus PEG-PLA-Propfcopolymer hergestellt) und fanden minimale Proteinadsorption für PEG 5000-Ketten und einen PEG-Gehalt von 2-5%, wobei die Oberflächendichte der PEG-Ketten aus dem PEG-Gehalt resultiert [28]. Andere Studien zeigten, dass eine optimale Protein-Resistenz bei PEG-Molekulargewichten zwischen 1500 und 3500 Da gegeben ist und ein Überschreiten dieses Gewichtes keine weitere Reduktion der Proteinadsorption bewirkt. Allgemein kann jedoch gesagt werden, dass für die Oberflächenmodifikation von partikulären Arzneistoffträgern PEG-Ketten mit einem Molekulargewicht von mindestens 2000 Da eingesetzt werden sollten [3].
Bezüglich der Oberflächendichte wurde beobachtet, dass nur bei ausreichender Bedeckung der Partikeloberfläche durch PEG-Ketten Phagozytose inhibiert wird. Besonders langlebig waren Partikel deren PEG-Überzug eine so genannte „Brush-Konfiguration“ (*siehe Abb. 2*) aufwiesen, in der dicht gesäte PEG-Ketten bürstenartig von der Oberfläche abstehen. Hingegen konnten PEG-Oberflächen in der „Mushroom-Konfiguration“ die Aktivierung des Komplementsystems und anschließende Phagozytose nicht verringern [12].

Abb. 2: (aus [12]) schematische Darstellung der PEG-Konfiguration auf der Oberfläche von Nanopartikeln;
(a) Aufgrund niedriger PEG-Konzentration an der Oberfläche nehmen die Ketten eine pilzartige „Mushroom-Konfiguration“ ein.
(b) Dicht gedrängte PEG-Ketten nehmen eine bürstenartige „Brush-Konfiguration“ ein.

3.2 NHS-Ester

N-Hydroxysuccinimid-Ester sind häufig eingesetzte Acylierungsreagenzien, die mit Nukleophilen unter Abspaltung von NHS als Abgangsgruppe und Bildung des acylierten Produktes reagieren. Reaktionen mit primären und sekundären Aminen erzeugen kovalente Amidbindungen zwischen den miteinander reagierenden Molekülen, wogegen durch Reaktionen mit anderen Nukleophilen wie Sulfhydryl- oder Hydroxylgruppen keine stabilen Konjugate entstehen.

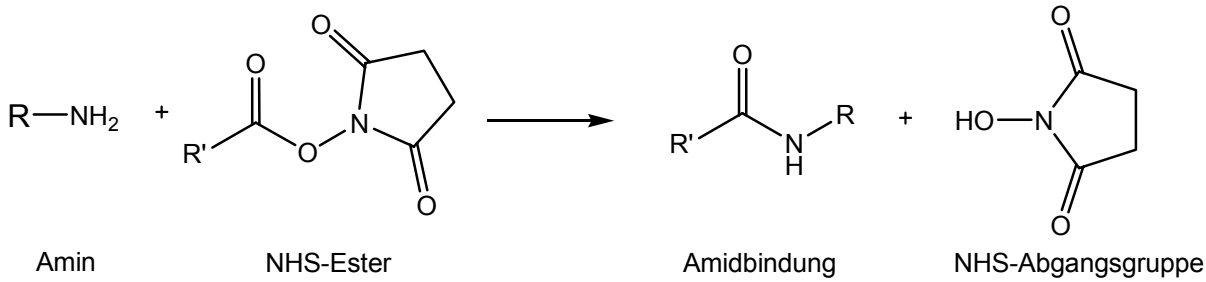


Abb. 3: Reaktion von N-Hydroxisuccinimid mit einem primären Amin

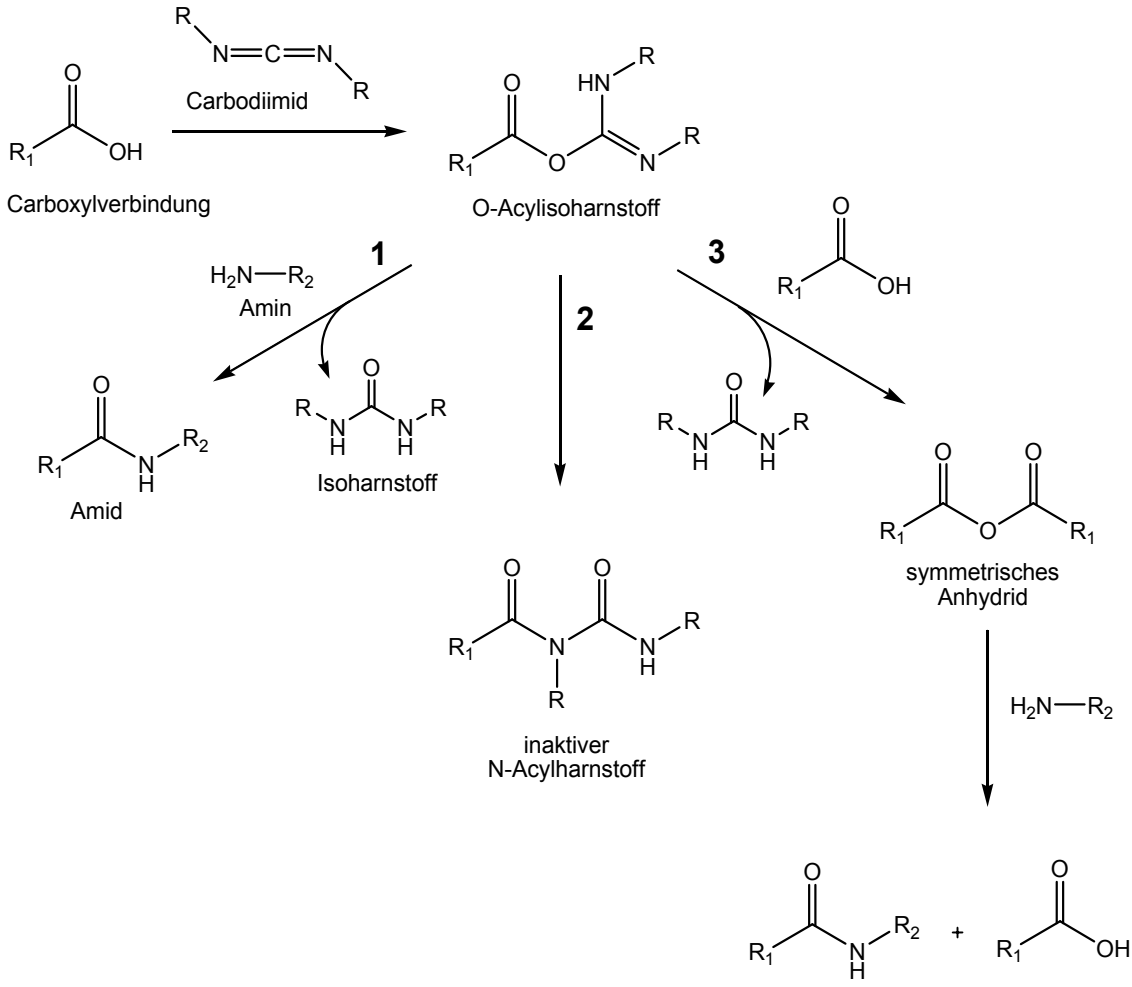
Lässt man NHS mit einer Carboxylverbindung in der Gegenwart eines Carbodiimids reagieren, so kann man unter wasserfreien Bedingungen stabile NHS-Ester erzeugen. Man kann selbige aber auch in situ herstellen, um sie direkt mit dem Zielmolekül weiterreagieren zu lassen. Dies ist sowohl in wässrigen Medien, unter Verwendung des wasserlöslichen Carbodiimids EDAC, als auch in organischen Lösungsmitteln in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid denkbar.
In der Gegenwart von Wasser sind NHS-Ester jedoch hydrolyseanfällig, ihre Halbwertszeit beträgt größenordnungsmäßig einige Stunden. Durch Ausweichen in organische Lösungsmittel, umgeht man das Problem der Hydrolyse, vorausgesetzt alle Reaktanden sind in solch einer Umgebung löslich.

3.3 Carbodiimide

Ein Carbodiimid besitzt als funktionelle Gruppe eine N=C=N-Gruppierung. N-substituierte Carbodiimide können mit Carboxylverbindungen zu extrem kurzlebigen *O*-Acylisoharnstoff-Derivaten reagieren, welche wiederum mit einem Nukleophil, wie zum Beispiel einem primären Amin, stabile Amidbindungen ausbilden können, wobei ein Isoharnstoff-Derivat als Nebenprodukt entsteht (Reaktionsweg **1** in *Abb. 4*). Bei dieser Reaktion werden keine zusätzlichen chemischen Strukturen zwischen die gekoppelten Moleküle eingebracht. Die hierbei möglichen Nebenreaktionen sind ebenfalls in *Abb. 4* dargestellt. Reaktionsweg **2** führt zum inaktiven N-Acylharnstoff, auf diesem Wege kommt es zu keiner Kopplungsreaktion. Wird hingegen Reaktionsweg **3** beschritten, so entsteht aus dem aktiven O-Acylisoharnstoff und einer weiteren Carboxylverbindung ein symmetrisches Anhydrid. Dieses Anhydrid ist zur Amidbildung mit einem primären Amin befähigt, wodurch letztendlich das gewünschte Produkt, lediglich über einen Umweg, erhalten wird.

Weitere mit Carbodiimiden reaktive Nukleophile sind zum Beispiel Sulfhydrylgruppen, Hydrazide oder Sauerstoffatome, etwa die des Wassers. In wässrigen Lösungen ist demnach Hydrolyse die wichtigste Konkurrenzreaktion. Außerdem können Carbodiimide auch Phosphatgruppen aktivieren. Als reaktives Zwischenprodukt erhält man einen Phosphatester, welcher in der Gegenwart von Aminen stabile Phosphoramidatbindungen ausbildet.

In der synthetischen organischen Chemie verwendet man also Carbodiimide, um kovalente Amid- oder Phosphoramidatbindungen zwischen Carboxylverbindungen und Aminen beziehungsweise zwischen Phosphaten und Aminen zu vermitteln [29].



<u>Abb. 4:</u> allgemeine Haupt- und Nebenwege bei der Kopplung von Carboxylverbindungen und primären Aminen mittels Carbodiimiden;
1… Bildung des gewünschten Amides
2 … Umlagerung zum inaktiven N-Acylharnstoff
3 … Reaktion mit einer weiteren Carboxylverbindung zum symmetrischen Anhydrid, welches zur Amidbildung mit einem primären Amin befähigt ist

Es gibt eine Reihe von verschiedenen Carbodiimid-Systemen, die je nach gewünschten Anwendungen und Reaktionsbedingungen, beispielsweise Ablauf der Reaktion im wässrigen Milieu oder in einem organischen Lösungsmittel, eingesetzt werden. Die wichtigsten Vertreter sind:

EDAC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)Carbodiimid-Hydrochlorid):
EDAC (oder EDC) ist das wahrscheinlich am häufigsten eingesetzte Carbodiimid für die Konjugation von biologischen Substanzen. Ein möglicher Grund dafür ist seine Wasserlöslichkeit, da auch die meisten biologischen Makromoleküle in wässrigen Pufferlösungen löslich sind.

Nachteilig auf die Effizienz der Kopplungsreaktion wirkt sich jedoch die Anfälligkeit von EDC für Hydrolyse in Gegenwart von Wasser aus.

CMC (1-Cyclohexyl-3-(2-Morpholinoethyl)-Carbodiimid):
CMC ist genauso wie EDAC wasserlöslich und wird häufig für die Konjugation von Molekülen biologischen Ursprungs eingesetzt.
Unerwünschte Nebenreaktionen sind Hydrolyse des aktiven Esters in wässrigen Lösungen, nukleophile Reaktionen mit Phenolen und Alkoholen, welche eine weitere Kopplungsreaktion unterbinden, und die Reaktion mit Sulfhydrylgruppen, die zur Ausbildung einer stabilen kovalenten Bindung führt.

DIC (N,N´-Diisopropylcarbodiimid):
DIC ist ein wasser-unlösliches bei Raumtemperatur flüssiges Carbodiimid und ist bezüglich seiner Reaktionen mit DCC vergleichbar.

DCC (N,N´-Dicyclohexylcarbodiimid):
Besonders in der organischen Synthese ist DCC eines der am häufigsten eingesetzten Kopplungsreagenzien. Es ist in den meisten organischen Lösungsmitteln löslich und weist eine außerordentlich hohe Kopplungseffizienz auf, vor allem unter wasserfreien Bedingungen, wo Hydrolyse als Konkurrenzreaktion keine Rolle spielt.
Da DCC eine stark gesundheitsgefährdende Substanz und ein potentielle Allergen ist, muss die Inhalation von Dämpfen, Kontakt mit der Haut oder Verschlucken absolut vermieden werden. Bei der Handhabung gilt demnach besondere Vorsicht.
Reagiert DCC mit einer Carboxylverbindung (*siehe Abb. 5*) kommt es zur Ausbildung des entsprechenden *O*-Acylisoharnstoff-Derivates. Hierbei handelt es sich um ein instabiles Zwischenprodukt, welches mit Nukleophilen wie zum Beispiel primären Aminen weiterreagieren kann. Das Nukleophil greift am Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe an, wodurch es zur Bildung einer kovalenten Amidbindung kommt. Dicylclohexylharnstoff wird dabei als Abgangsgruppe aus dem Molekül verdrängt. Dieses Nebenprodukt ist in den meisten Lösungsmitteln unlöslich und muss daher durch Filtration entfernt werden, was allerdings nur schwer vollständig gelingt, da es nach und nach immer wieder ausfällt.

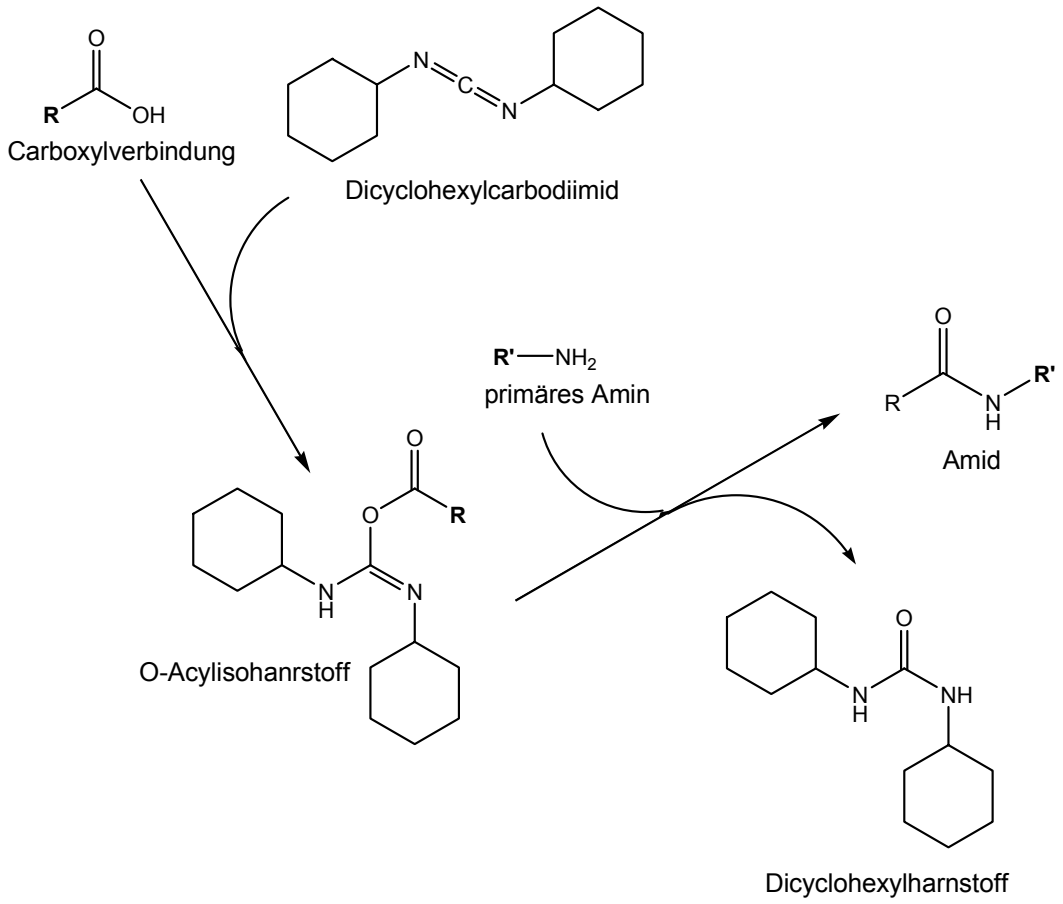


Abb. 5: Kopplung einer Carboxylverbindung mit einem primären Amin mittels DCC

Auch bei Kopplungsreaktionen mittels DCC können unerwünschte Nebenreaktionen stattfinden. Besonders in aprotischen, organischen Lösungsmitteln wie DMF kann es zu spontanen Umlagerungen des *O*-Acylisoharnstoffes zum inaktiven N-Acylharnstoff kommen (*siehe Abb. 4*).

Weiters kann eine DCC-aktivierte Carboxylverbindung mit einer Aminosäure ein Azlacton bilden, welches zwar mit einem Amin eine kovalente Amidbindung eingehen kann, aber dabei zwischen die beiden konjugierten Moleküle weitere Atome einführt. Um Nebenreaktionen zu vermindern und die Ausbeute zu erhöhen, kann DCC mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) kombiniert werden. Der Vorteil hierbei ist die größere Stabilität des aktiven Zwischenproduktes, welches letztendlich mit dem Amin weiterreagiert. Außerdem wird eine mögliche inaktivierende Umlagerung des *O*-Acylisoharnstoffes umgangen.

3.4 Die Carbobenzoxy-Schutzgruppe (CBZ)

Wenn bei organischen Synthesen das Substrat mehrere reaktive Zentren besitzt, können neben dem Zielprodukt eines oder mehrere Nebenprodukte in nennenswerten Mengen entstehen. Dies vermindert einerseits die Ausbeute an gewünschtem Produkt und andererseits sind diese Nebenprodukte oft nur schwierig und aufwendig vom Hauptprodukt abzutrennen. Um also diese in hohem Maße unerwünschte Bildung von Nebenprodukten zu vermeiden, können die ablaufenden Nebenreaktionen durch Blockieren der dazugehörigen reaktiven Zentren unterbunden werden. Für diesen Zweck werden Schutzgruppen eingesetzt, die funktionelle Gruppen „maskieren“, indem sie sie in weniger reaktive Derivate überführen.

Für die verschiedenen funktionellen Gruppen gibt es eine Reihe spezieller Schutzgruppen, die in der Literatur ausführlich beschrieben sind [30, 31]. In dieser Arbeit ist jedoch ausschließlich eine Schutzgruppe, die Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe für Amine, auch Benzylcarbamat-, Carbobenzoxy-, CBZ- oder Z-Gruppe genannt, von Relevanz. Entwickelt wurde sie bereits 1932 von Bergman und Zervas für die Peptidsynthese [32] und bis heute wird sie vielfach eingesetzt.

Für die Einführung einer CBZ-Gruppe in ein Molekül gibt es zahlreiche Methoden, als Beispiel sei nur die Umsetzung der entsprechenden Aminkomponente mit CBZ-N-Hydroxysuccinimid genannt, wodurch eine Ausbeute > 70% erreicht wird [33].

Ebenso kann die Deblockierung (Entfernen der Schutzgruppen) auf verschiedenen Wegen erreicht werden, es sollen hier nur einige Beispiele genannt werden. Bergman und Zervas entfernten beispielsweise die CBZ-Gruppen durch katalytische Hydrierung mit Palladium-Katalysator auf Aktivkohle (*siehe Abb. 6*). Als Wasserstoffdonor anstelle des H_2-Gases kann unter anderem 1,4-Cyclohexadien eingesetzt werden [34]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Säurehydrolyse der CBZ-Gruppen, was sowohl mit protischen Säuren als auch mit Lewis-Säuren erreicht werden kann.

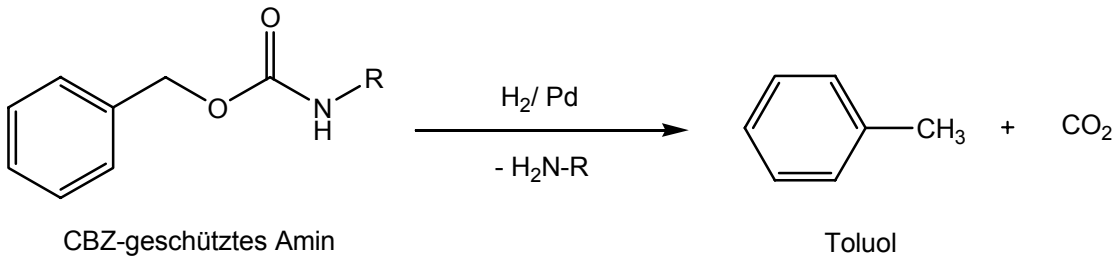


Abb. 6: Abspalten der CBZ-Schutzgruppen mittels katalytischer Hydrierung

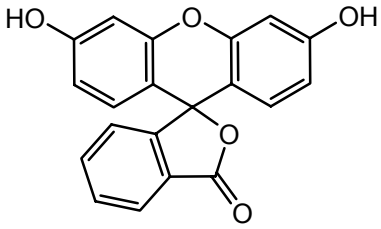
3.5 Fluorescein als Fluoreszenzmarker

Fluorescein ist ein fluoreszierender Farbstoff aus der Gruppe der Phtalsäurefarbstoffe. Bei Anregung mit blauem Licht, das Absorptionsmaximum liegt bei 488-495 nm, emittiert Fluorescein grünes Fluoreszenzlicht in einem Wellenlängenbreich von 518 bis 525 nm. Genau diese Eigenschaft macht man sich bei der Anwendung als Fluoreszenzlabel zunutze. Durch Kopplung von Fluorescein mit nicht fluoreszierenden Molekülen, etwa mit Proteinen oder Nukleinsäuren, werden diese indirekt detektierbar. Das Fluorescein ist somit ihr Etikett (Label), wodurch sie für analytische Zwecke wie zum Beispiel Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusscytometrie erfassbar werden.

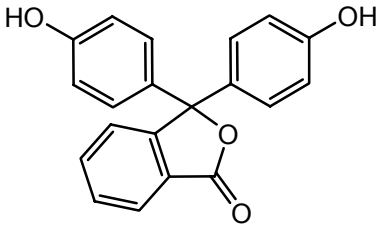
Neben Fluorescein, dem wohl populärsten aller Fluoreszenzmarker, werden noch eine Reihe anderer Fluorophore wie Rhodamin- oder Coumarinderivate als Labels eingesetzt. Unter normierten Bedingungen wird jeder einzelne Fluorophor durch seinen Extinktionskoeffizienten und die Quantenausbeute charakterisiert. Die Quantenausbeute definiert sich als der Quotient aus totaler Photonenemission und totaler Photonenabsorption, je näher ihr Zahlenwert zu Eins ist, desto stärker ist die auftretende Fluoreszenz. So weist Fluorescein eine Quantenausbeute von etwa 0,75 auf, Rhodamin hingegen nur circa 0,25. Allerdings klingt die Fluoreszenzintensität von Fluorescein mit der Zeit ab, wenn es in Puffern gelöst, Licht ausgesetzt oder länger gelagert wird.

Die meisten als Fluoreszenzmarker eingesetzten Moleküle beinhalten in ihrer Struktur ein aromatisches Ringsystem. Wichtig hierbei ist, dass die einzelnen Ringe in derselben Ebene, sozusagen planar, vorliegen. Denn Fluorophore verdanken dieser planaren Struktur ihre Lumineszenzeigenschaft. So unterscheiden sich

beispielsweise die Strukturen des nichtfluoreszierenden Farbstoffes Phenolphthalein und Fluorescein einzig und allein in der Sauerstoffbrücke zwischen den oberen Phenylringen, was in *Abb. 7* deutlich wird. Diese Sauerstoffbrücke erzwingt die annähernd planare Anordnung des Moleküls, worauf die Fluoreszenzeigenschaft von Fluorescein beruht.



Fluorescein



Phenolphthalein

<u>Abb. 7:</u> Fluorescein besitzt im Gegensatz zu Phenolphthalein ein planares aromatisches Ringsystem, welches ihm seine Fluoreszenzeigenschaft verleiht.

Allen fluoreszierenden Verbindungen ist gemeinsam, dass sie empfindlich auf Veränderungen ihrer chemischen Umgebung reagieren. So können Schwankungen im pH-Wert, die Lösungsmittelpolarität oder gelöster Sauerstoff die Quantenausbeute beeinflussen. Bei einem pH-Wert unter sieben wird zum Beispiel die Quantenausbeute bei Fluorescein deutlich gequencht. Außerdem können Quench-Vorgänge auch bei hohen Fluorophorkonzentrationen auftreten, eine Überbelegung der markierten Moleküle mit Fluoreszenzlabeln ist deswegen unerwünscht.

Fluoresceinisothiocyanat (FITC):

Es gibt eine Reihe von Fluoresceinderivaten, welche direkt für eine Kopplung mit diversen Substratmolekülen eingesetzt werden können. Fluoresceinisothiocyanat ist wohl das populärste dieser Derivate. Wie in *Abb. 8* dargestellt, besitzt es an seinem untersten Phenylring eine Isothiocyanatgruppe. Bei der Darstellung von FITC fallen zwei Isomere an, bei denen die Isothiocyanatgruppe entweder an Kohlenstoff 5 oder 6 des Phenylringes sitzt. Die spektralen Eigenschaften beider Isomere sind jedoch identisch.

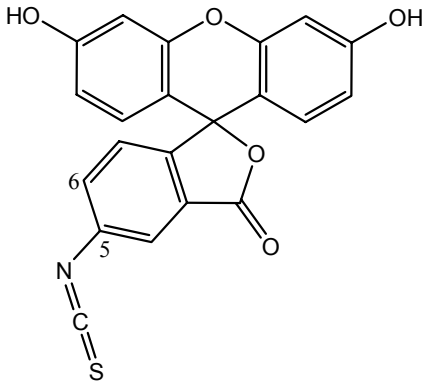


Abb. 8: Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC)

FITC reagiert sehr selektiv mit primären Aminen unter Ausbildung einer stabilen Thioharnstoffbindung [35, 36]. Es wird deshalb häufig als Fluoreszenzmarker für Proteine eingesetzt.

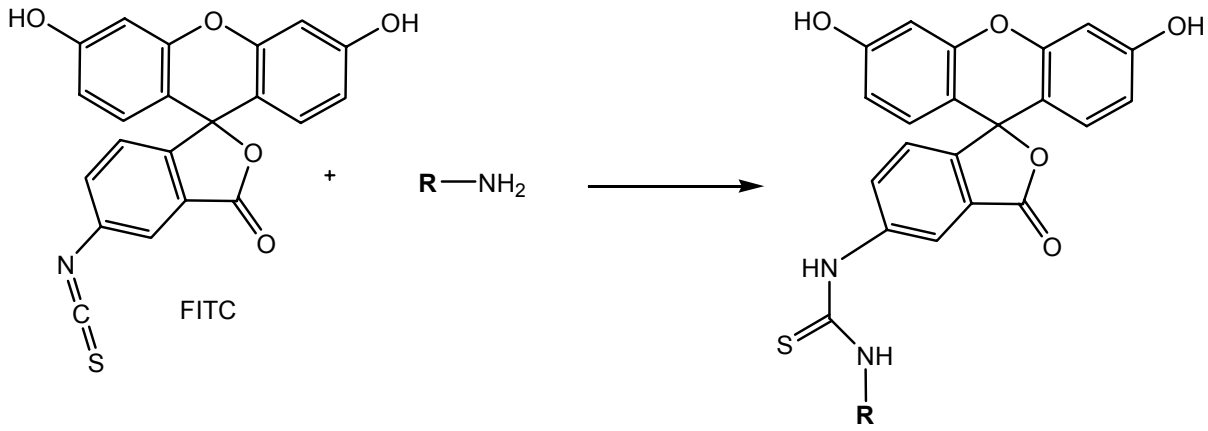


Abb. 9: Reaktion von Fluoresceinisothiocyanat mit einem Amin

4 Methoden, Instrumentierung und Reagenzien

4.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Chromatographisches Prinzip:

Das Prinzip der Chromatographie beruht auf der Verteilung der zu trennenden Komponenten zwischen einer ruhenden (stationären) und einer sich bewegenden (mobilen) Phase, wobei die beiden Phasen nicht miteinander mischbar sind. Dabei wird die Probe in der mobilen Phase, die eine Flüssigkeit oder ein Gas sein kann, gelöst und über die stationäre Phase bewegt, die sich entweder in einer Säule oder auf einem Flachbett befindet.

Die beiden wichtigsten Trennprinzipien bei der Chromatographie sind einerseits die Adsorption und andererseits die Verteilung. Die Adsorptionschromatographie basiert auf der direkten Wechselwirkung des Analyten mit der festen, stationären Phase und die Verteilungschromatographie auf dem Lösungsvorgang in zwei miteinander nicht mischbaren flüssigen Phasen, wobei eine der Phasen immobilisiert, also stationär, vorliegt. Diese beiden Trennprinzipien können jedoch in verschiedenem Maße auch gemeinsam wirksam werden.

Stationäre Phase:

Bei der DC wird die stationäre Phase in einer dünnen Schicht, üblicherweise 0,25 bis 0,5 Millimeter, auf einen Träger wie z.B.: Glas- oder Aluminiumplatten aufgebracht. Als stationäre Phasen kommen hauptsächlich polare Sorbentien wie z.B.: Kieselgel, Cellulose oder Aluminiumoxid zum Einsatz.

Mobile Phase:

Die Wahl der mobilen Phase, auch als Laufmittel oder Eluens bezeichnet, hat entscheidenden Einfluss auf die Trennung. Das Laufmittel löst die zu trennenden Stoffe vom Sorbens und transportiert sie weiter. Je stärker es selbst vom Sorbens adsorbiert wird, desto stärker ist seine Elutionskraft (Verdrängungskraft). Hat die Substanz mehr Affinität zum Laufmittel als zum Sorbens, so wird sie nahe zur Laufmittelfront eluiert.

Je nach Polarität des zu trennenden Analysengemisches ergibt sich laut des in *Abb. 10* gezeigten Dreieckschemas die Polarität des zu verwendenden Eluens.

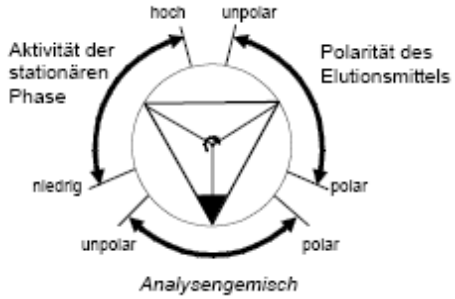


Abb. 10: Dreieckschema nach E.Stahl

Als Orientierungshilfe dient dabei auch die so genannte eluotrope Reihe, in welcher die verschiedenen Lösungsmittel nach ihrer Polarität angeordnet sind.
Oft werden Lösungsmittelgemische als Laufmittel verwendet, da durch Variation in der Zusammensetzung die Polarität nahezu beliebig eingestellt werden kann.

Praktische Durchführung einer DC:

Ein kleines Volumen (~ 0,5-5 µL) der Probelösung wird mit Hilfe einer Kapillare punkt- oder bandförmig im Abstand von ein bis zwei Zentimetern vom Plattenrand aufgetragen, das Lösungsmittel lässt man vollständig verdampfen.
Das Entwickeln des Chromatogramms erfolgt in einer verschließbaren Trennkammer, in die ca. 0,5 cm hoch die mobile Phase gefüllt wurde und deren Gasphase mit Laufmittel gesättigt ist. Die DC-Platte wird in die Trennkammer gestellt und taucht somit in das Laufmittel ein. Durch Kapillarkräfte wird das Eluens die Platte hoch gesaugt und es kommt zum Trennprozess *(siehe Abb. 11)*.

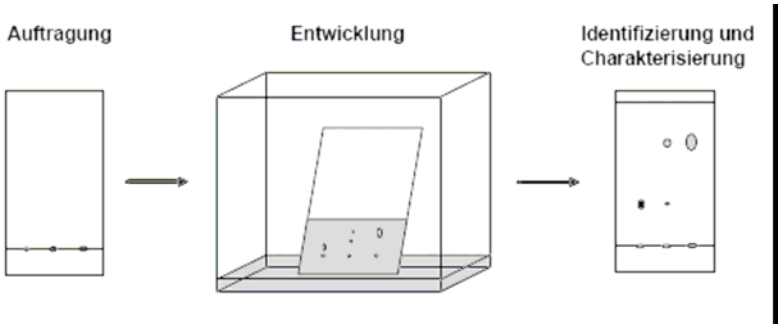


Abb. 11: Schematischer Ablauf einer DC

Detektion:

Um die Substanzflecken nach dem Entwickeln sichtbar zu machen, kann man vorhandene Lumineszenzeigenschaften der Probe ausnutzen oder mit einem fluoreszierenden Indikatorstoff imprägnierte Platten verwenden. Viele Stoffe wirken als Fluoreszenzlöscher und die Substanzflecken erscheinen dann bei Auswertung unter UV-Licht als nicht fluoreszierende Flecken.

Weiters findet man in der Literatur eine Reihe von mehr oder weniger substanzspezifischen Anfärbereagenzien.

4.2 Anfärbereagenzien für die DC

Sämtliche Anfärbereagenzien wurden aus [37] entnommen.

Jod als allgemeines Nachweisreagenz:

Das Chromatogramm wird in ein geschlossenes Gefäß gebracht, auf dessen Boden sich einige Jodkristalle befinden. Durch leichtes Erwärmen des Gefäßes wird die Entwicklung der Joddämpfe beschleunigt. Viele organische Verbindungen erscheinen als braune Flecken.

Jod-Kaliumjodid neutral für organische Verbindungen:

Für eine Sprühlösung werden 100 mg Jod und 200 mg Kaliumjodid in 50 mL destilliertem Wasser gelöst. Viele organische Verbindungen erscheinen nach dem Besprühen des Chromatogramms als braune Flecken.

Glucose-Anilin (Schweppes Reagenz) für Säuren:

1 g Glucose wird in 10 mL Wasser und 2 mL Anilin werden in 10 mL Ethanol gelöst. Beide Lösungen werden zusammen in einem Messkolben mit 1-Butanol auf 50 mL aufgefüllt. Nach dem Besprühen des Chromatogramms mit dieser Lösung muss auf ca. 125°C erwärmt werden, wobei sich tiefbraune Flecken entwickeln.

Salpetersäure für Alkaloide und Amine:

Für eine Sprühlösung werden 50 mL Ethanol mit ca. 25 Tropfen Salpetersäure (65%) versetzt. Die Auswertung erfolgt im UV-Licht, wobei Fluoreszenzflecken oft erst nach längerem Erhitzen auf 120°C erscheinen.

Detektion von Aminen mittels Ninhydrin:

Wenn man Lösungen von Aminosäuren oder primären oder sekundären Aminen mit Ninhydrin (Triketohydrinden-Hydrat) erhitzt, so entwickelt sich eine kräftige blau-violette Farbe. Die Chemie dieser Farbreaktion ist aufgrund der vielen ablaufenden Teilreaktionen kompliziert. Für die Farbgebung ist ein Gemisch aus mehreren gefärbten Verbindungen verantwortlich.

Ninhydrin-Sprühlösung für die Dünnschichtchromatographie (Merck) ist als gebrauchsfertiges Anfärbereagenz kommerziell verfügbar. Nach dem Besprühen muss das Chromatogramm auf ca. 110°C erwärmt werden bis eine optimale Farbentwicklung erreicht ist.

Kobalt(II)-thiocyanat für Alkaloide und Amine:

3 g Ammoniumthiocyanat und 1 g Kobalt(II)-chlorid werden in 20 mL Wasser gelöst. Durch Besprühen mit dieser Lösung erscheinen Alkaloide und Amine als intensiv blaue Flecken, die jedoch schnell wieder verblassen. Durch Nachsprühen mit Wasser kann das Chromatogramm wieder sichtbar gemacht werden.

4.3 Spektroskopische Methoden

Unter dem Begriff Spektroskopie fasst man alle Methoden zusammen, bei denen Wechselwirkungen elektromagnetischer Strahlung mit Materie ausgenutzt werden. Elektromagnetische Strahlung tritt in Form von Licht, Wärmestrahlung, ultravioletter Strahlung, Mikro- und Radiowellen sowie Gamma- und Röntgenstrahlung in Erscheinung. Durch die Absorption dieser elektromagnetischen Strahlung werden die Probenmoleküle von ihrem Grundzustand in einen energetisch höher gelegenen angeregten Zustand überführt, wobei die möglichen Energieniveaus nach der Quantentheorie diskret sind. Kehren die angeregten Moleküle wieder in den Grundzustand zurück, so kann dies strahlungslos, zum Beispiel durch Relaxation von Schwingungen oder thermische Equilibrierung, oder unter Emission von Strahlung, beispielsweise in Form von Fluoreszenzlicht, erfolgen. Die strahlungslosen Übergänge stellen dabei eher die Regel dar.
Je nachdem, ob nun die emittierte Strahlung infolge des Übergangs in den Grundzustand oder die Energieabsorption während des Anregungsprozesses gemessen wird, unterscheidet man Emissionsspektroskopie und Absorptionsspektroskopie. Bei den im Folgenden beschriebenen Methoden der IR- und UV-VIS-Spektroskopie handelt es sich in allen Fällen um Absorptionstechniken.
Um ein Spektrum einer Probensubstanz aufzunehmen, wird diese mit annähernd monochromatischer Strahlung, deren Frequenz über einen gewissen Bereich variiert wird, bestrahlt, und in weiterer Folge können aus den Wellenlängen der erhaltenen Spektrallinien die entsprechenden Energieniveaus und damit Informationen über die Molekülstruktur ermittelt werden.

4.3.1 IR-Spektroskopie

Durch Absorption von Strahlung im infraroten Bereich des elektromagnetischen Spektrums werden Molekül-Schwingungen und -Rotationen angeregt. Der Spektralbereich der infraroten Strahlung liegt bei den Wellenzahlen 4000 bis 400 cm^{-1}, was dem Wellenlängenbereich 800 bis 500 000 nm entspricht. Die Angabe in Wellenzahlen hat sich heute jedoch weitgehend durchgesetzt, ihr Zahlenwert gibt an, wie viele Sinuswellen auf den Bereich von einem Zentimeter passen.

Wellenzahl: $\nu = \frac{1}{\lambda}$ cm^{-1}

Viele funktionelle Gruppen von organischen Molekülen zeigen nun charakteristische Schwingungen, denen Absorptionsbanden in definierten Bereichen des Infrarot-Spektrums entsprechen, wodurch viele dieser Gruppen identifiziert werden können. Die Anregung einer Schwingung kann man sich anschaulich so vorstellen, dass das Molekül von einem Schwingungszustand unter Absorption eines Lichtquants in einen höheren Schwingungszustand übergeht. Die Energie des absorbierten Lichtquants muss dabei der Energiedifferenz zwischen den beiden Zuständen entsprechen. Man kann hierbei folgende Schwingungsformen unterscheiden:
Valenzschwingungen, bei denen sich der Bindungsabstand ändert und *Deformationsschwingungen*, bei denen der Bindungsabstand konstant bleibt, wogegen der Bindungswinkel veränderlich ist. Jedoch sind nur solche Schwingungen infrarotaktiv, die eine Änderung des Dipolmomentes mit sich ziehen.

Instrumentierung:
Ein konventionelles Infrarot-Spektrometer besteht aus einer Strahlungsquelle, dem Probenraum, einem Monochromator, einem Detektor sowie der Registrier- und Auswerteeinheit.
Als Strahlungsquelle im Infrarot-Bereich verwendet man thermische Strahler in Form von glühenden Festkörpern, typischerweise den Nernst-Stift, ein Stäbchen aus Y- und Zr-Oxid, der durch eine elektrische Widerstandsheizung betrieben wird.
Gasförmige Proben werden mit Hilfe von speziellen evakuierbaren Küvetten in den Probenraum eingebracht. Für Flüssigkeiten verwendet man üblicherweise Küvetten aus Alkalihalogeniden, da diese im gesamten IR-Bereich strahlungsdurchlässig sind. Wasser und Alkohole kommen demzufolge nicht als Lösungsmittel in Frage, da diese das Küvettenmaterial zersetzen würden. Für Feststoffe wird meist die KBr-Technik angewandt, dabei werden ein bis zwei Milligramm der Probensubstanz mit circa 200 Milligramm wasserfreiem Kaliumbromid in einer Achat-Reibschale fein verrieben und anschließend in einer hydraulischen Presse unter hohem Druck zu einer einkristallähnlichen Tablette verpresst. In einer speziellen Halterung wird diese in den Probenraum eingebracht.
Für Monochromatoren im IR-Bereich ist der Einsatz von Prismen sowie Gittern als

dispergierendes Element gleichermaßen möglich, in modernen IR-Spektrometern dominieren jedoch die Gitter.
Zur Detektion der infraroten Strahlung kommen zum Beispiel Thermoelemente oder Bolometer in Frage.
Für Fourier-Transform-Spektrometer benötigt man eine andere Instrumentierung. Es handelt sich hierbei im Wesentlichen um Zweistrahl-Interferometrie mit einem Michelson-Interferometer. Im Gegensatz zum wellenlängendispersiven Spektrometer liefert ein FT-Spektrometer die gesamte Information zum Spektrum in Form eines Interferogramms, dessen Fouriertransformierte das Spektrum repräsentiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Messungen mit einem Fourier-Transform-Infrarot-Spektrometer (Perkin-Elmer 1600 Series FTIR) durchgeführt. Da es sich bei den zu untersuchenden Proben ausschließlich um Feststoffe handelte, kam die KBr- Technik zum Einsatz.

Darstellung des IR-Spektrums und Interpretation:
In einem IR-Spektrum wird die Transmission in Prozent (%T) als Ordinatenmaßstab angegeben. Das entspricht dem prozentualen Strahlungsanteil der von der Probe bei der jeweiligen Wellenlänge durchgelassen wird. Die Abszisse ist in cm^{-1} (Wellenzahl) kalibriert.
Für die Spektreninterpretation sind vor allem solche Schwingungen nützlich, die sich näherungsweise auf Einzelbindungen oder funktionelle Gruppen eines Moleküls beschränken, das heißt die lokalisierten Schwingungen, welche dann zur Identifizierung von funktionellen Gruppen herangezogen werden. Die Gerüstschwingungen eines Moleküls verursachen Absorptionsbanden bei relativ niedriger Energie (unterhalb 1500 cm^{-1}). Solche Banden erschweren die Zuordnung von lokalisierten Schwingungen in diesem Bereich, da es häufig zu Überschneidungen kommt. Ein IR-Spektrum besteht demnach aus zwei großen Bereichen: oberhalb 1500 cm^{-1} befinden sich Absorptionsbanden, die funktionellen Gruppen zugeordnet werden können, während der Bereich unterhalb 1500 cm^{-1} viele sich überschneidende Banden enthält, welche das Molekül als ganzes charakterisieren. Diese Region des Spektrums wird deswegen als „Fingerprint-Bereich“ bezeichnet.
Um die erhaltenen Absorptionsbanden im Spektrum auch zuordnen zu können,

stehen heute in der Literatur ausführliche Tabellen mit den charakteristischen Absorptionen der verschiedenen funktionellen Gruppierungen zur Verfügung.

4.3.2 UV-VIS-Spektroskopie

Durch Einwirkung von elektromagnetischer Strahlung im Bereich des ultravioletten und des sichtbaren Lichtes auf Moleküle kommt es zur Anregung der Valenzelektronen. Der ultraviolette Bereich umfasst dabei die Wellenlängen von 190 bis 400 nm und das sichtbare Licht erstreckt sich ungefähr von 400 bis 800 nm.
Die Absorption von Molekülen im UV-VIS-Bereich kann auf die Anregung verschiedener Arten von Valenzelektronen zurückgeführt werden: die n-, σ- und π-Elektronen, wie sie typischerweise in organischen Verbindungen vorkommen, die d- oder f-Elektronen von Metallionen sowie Ladungsübertragungs-Elektronen in Komplexverbindungen. Die für die UV-VIS-Spektroskopie wichtigsten Elektronenübergänge, die prinzipiell nur bei Erfüllung mehrerer Auswahlregeln stattfinden können, sind jene eines Elektrons aus einem nichtbindenden Molekülorbital in ein antibindendes π^* -Orbital, kurz als $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang bezeichnet, und jene aus einem bindenden π-Orbital in ein antibindendes π^*-Orbital ($\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang). Bei den meisten Chromophoren beobachtet man solche Übergänge.

Apparatives:
Die Strahlungsquelle ist im UV-Bereich am häufigsten eine Deuteriumlampe und im sichtbaren Bereich die Wolframbandlampe. Als lichtdispergierendes Medium dominiert wiederum das Gitter. Üblicherweise werden UV-VIS-Spektren in Absorption an Flüssigkeiten gemessen, wofür Quarzküvetten herangezogen werden müssen, da Glas im UV-Bereich selbst absorbiert. Als Empfängereinheit kommt vorwiegend der Sekundärelektronenvervielfacher, kurz SEV, zum Einsatz.

Für sämtliche UV-VIS-Messungen in der vorliegenden Diplomarbeit wurde ein Hitachi U-3000 Spektrophotometer verwendet.

Quantitative Analyse:

Bei der Absorptionsmessung betrachtet man die Schwächung eines Lichtstrahls beim Durchgang durch das Probenmedium. Die Anteile an Streulicht, Reflexion und Absorption durch das Küvettenmaterial und das Lösungsmittel korrigiert man durch Vergleichsmessung einer Küvette, die nur das entsprechende Lösungsmittel enthält. Messgröße ist entweder die Transmission T oder die Extinktion E, oft auch als Absorbance A bezeichnet.

Transmission: $T = \frac{I}{I_0}$ Extinktion: $E = \lg\frac{1}{T} = \lg\frac{I_0}{I}$

I_0 … Intensität des Lichtstrahles vor dem Durchgang durch die Probe
I … Intensität des Lichtstrahles nach dem Durchgang durch die Probe

Das Lambert-Beersche Gesetz bringt die Extinktion in Zusammenhang mit der molaren Konzentration des Analyten:

$$E = \varepsilon(\lambda) \cdot d \cdot c$$

$\varepsilon(\lambda)$ … molarer dekadischer Extinktionskoeffizient in L mol^{-1} cm^{-1}
d … Schichtdicke der Küvette in cm
c … Konzentration in mol L^{-1}

Bei der praktischen Durchführung von quantitativen Analysen mittels UV-VIS-Spektroskopie erfolgt die Kalibrierung durch das Bestimmen der Extinktion von eigens hergestellten Eichlösungen mit bekannter Konzentration des Analyten.

4.4 Spot-Tests

Sämtliche Spot-Tests wurden aus [38] entnommen.

4.4.1 Nachweis von Carbonsäuren (-COOH-Gruppe)

Carbonsäuren und ihre Ester, Amide und Anhydride können anhand unterschiedlicher Prozeduren in Hydroxamsäuren, RCO(NHOH) umgewandelt werden. Die Vorgangsweise ist dabei von der jeweiligen Substanzklasse abhängig. Sämtliche Hydroxamsäuren ergeben in saurem Milieu mit Eisen(III)-chlorid eine rote bis violette Färbung. Diese Farbreaktion wird als Test für Carbonsäuren und ihre Derivate verwendet.

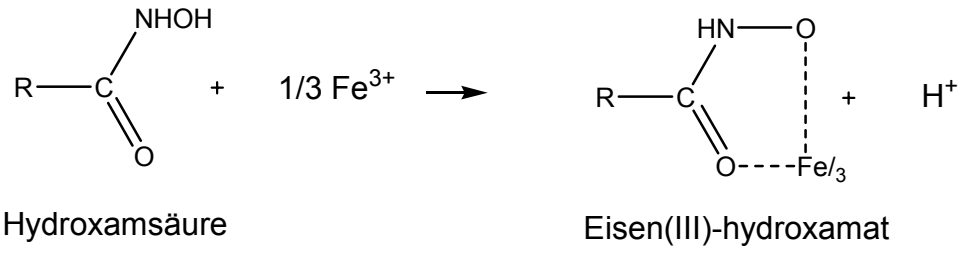


Abb. 12: Reaktion von Hydroxamsäuren mit Eisen(III)-Kationen

Um eine Carboxylverbindung in die entsprechende Hydroxamsäure umzuwandeln, wird durch Umsetzung mit Thionylchlorid das Säurechlorid erzeugt, welches dann mit Hydroxylamin unter basischen Bedingungen das Alkali-Salz der Hydroxamsäure bildet. Durch Ansäuern mit Salzsäure erhält man die Hydroxamsäure, welche letztendlich mit Fe^{3+} einen gefärbten Komplex bildet (*siehe Abb. 13*).

$$RCOOH + SOCl_2 \longrightarrow RCOCL + SO_2 + HCL$$

$$RCOCL + NH_2OH + 2\,NaOH \longrightarrow RCO(NHONa) + NaCl + 2\,H_2O$$

$$RCO(NHONa) + HCl \longrightarrow RCO(NHOH) + NaCL$$

$$3\,RCO(NHOH) + FeCl_3 \longrightarrow 3\,HCl + Fe[RCO(NHO)]_3$$

Abb. 13: Reaktionen beim Nachweis von Carbonsäuren

Reagenzien:

- Thionylchlorid
- gesättigte alkoholische Lösung von Hydroxylaminhydrochlorid
- alkoholische Natriumhydroxid-Lösung
- 0,5 N Salzsäure
- 1%ige wässrige Lösung von Eisen(III)-chlorid

Durchführung:

In einem kleinen Reagenzglas werden einige Milligramm des zu untersuchenden Feststoffes mit einigen Tropfen Thionylchlorid versetzt. Auf einer Heizplatte wird anschließend fast zur Trockene gedampft. Einige Tropfen gesättigte alkoholische Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung werden zugegeben, sodass die Reaktionslösung basisch wird. Es wird abermals erhitzt, wobei sich das Alkalisalz der Hydroxamsäure bildet. Die Mischung wird mit einigen Tropfen Salzsäure angesäuert und mit ein paar Tropfen Eisen(III)-chlorid-Lösung versetzt. Eine braunrote bis dunkelviolette Färbung indiziert die Anwesenheit von Carboxylgruppen in der Probe.

4.4.2 Stickstoffnachweis mittels pyrolytischer Oxidation

Wenn stickstoffhältige organische Verbindungen mit einem Überschuss an Braunstein MnO_2 stark erhitzt werden, so bilden sich Stickoxide, welche in der Gasphase durch die Griess-Reaktion nachgewiesen werden können. Bei dieser Reaktion wird durch Diazotierung von Sulfanilsäure eine Diazoniumverbindung gebildet, welche anschließend mit α-Naphtylamin koppelt, wodurch ein wasserlöslicher Azofarbstoff entsteht (*siehe Abb. 14*).

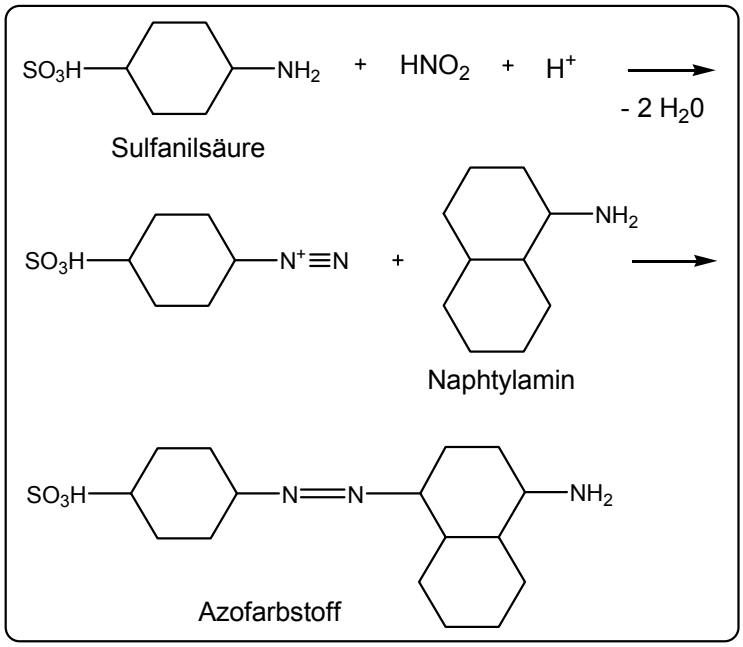


Abb. 14: Griess-Reaktion

Reagenzien:

- Lösung A: 1%ige Sulfanilsäure in 30%iger Essigsäure
- Lösung B: 0,1%ige Lösung von 1-Naphtylamin in 30%iger Essigsäure
- Griess-Reagenz: Unmittelbar vor der Anwendung werden gleiche Volumina von Lösung A und Lösung B miteinander gemischt.
- Mangandioxid (Braunstein)

Durchführung:

Etwa 0,2 g Braunstein werden mit wenigen Milligramm der festen Probesubstanz in einer Eprouvette vermischt, welche durch ein mit Griess-Reagenz getränktes Filterpapier abgedeckt wird. Nun wird der Boden der Eprouvette über dem Bunsenbrenner erhitzt. Das Erscheinen eines rosafarbenen bis roten Fleckes auf dem Filterpapier zeigt die Anwesenheit von Stickstoff in der Probe an.

4.4.3 Nachweis von Ethylen-Derivaten (CH_2-CH_2-Gruppe)

Erhitzt man Verbindungen, welche –CH_2-CH_2-Gruppen verbunden durch O-, N-, S-, oder Halogen-Atome beinhalten, mit 95% Zinkchlorid auf 230-250°C, so entsteht Acetaldehyd, welcher in der Gasphase nachgewiesen werden kann. Zinkchlorid

agiert als Wasserdonor bei der pyrohydrolytischen Spaltung von Ethylen-Derivaten zu Glykol und als Wasserakzeptor bei der Dehydrierung des Glykols (*siehe Abb. 15*). Die Detektion von Acetaldehyd erfolgt durch Reaktion mit Natriumnitroprussid und Morpholin, wodurch eine blaue Färbung entsteht.

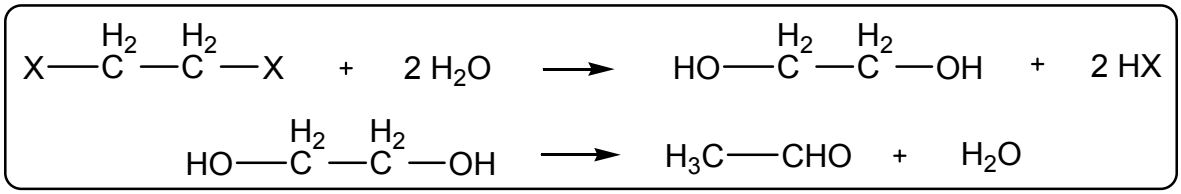


Abb. 15: Bildung von Acetaldehyd aus Ethylen-Derivaten, X = OR; SH; SR, Hal; etc.

Reagenzien:

- wasserfreies Zinkchlorid
- Die Reagenzlösung wird durch Mischen von gleichen Volumina folgender Lösungen immer frisch zubereitet:
  a) 20%ige wässrige Lösung von Morpholin
  b) 5%ige wässrige Lösung von Natriumnitroprussid

Durchführung:

In einer Eprouvette werden einige Zentigramm Zinkchlorid mit einer kleinen Menge (wenige Milligramm) an Probensubstanz vermischt. Die Öffnung des Röhrchens wird mit Filterpapier bedeckt, welches mit der Reagenzlösung befeuchtet wird. Nun erhitzt man über dem Bunsenbrenner. Der Test ist als positiv zu werten, sobald ein blauer Fleck auf dem Filterpapier erscheint.

4.5 TNBS-Test zur Quantifizierung primärer Amine

TNBS (2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure) bildet mit primären Aminen oder Hydrazidgruppen hoch chromogene Derivate, welche photometrisch detektierbar sind. Diese Reaktion kann dafür herangezogen werden, den Gehalt an freien Aminogruppen in einer Probensubstanz zu bestimmen. Wenn jedoch bei der Quantifizierung von primären Aminen Sulfhydrylgruppen in größerer Menge vorhanden sind, so kann dies zu Interferenzen führen.

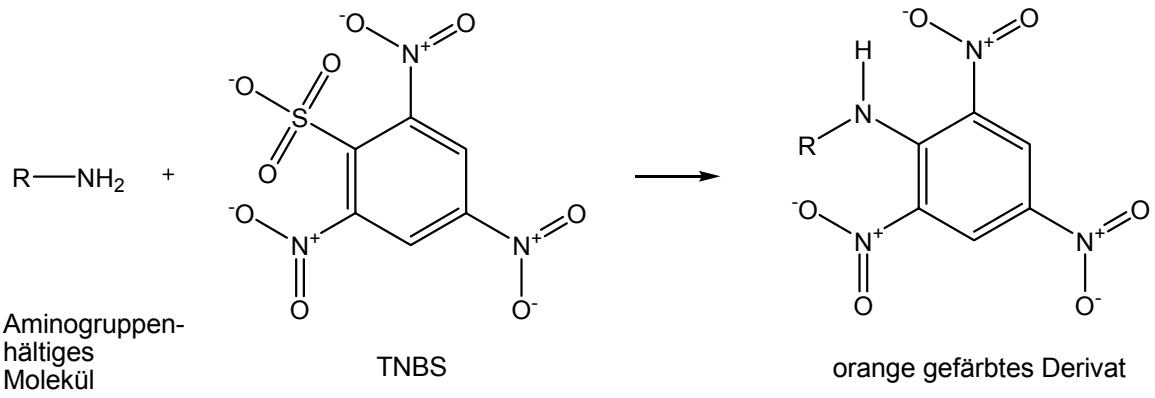


Abb. 16: Reaktion von TNBS mit einem primären Amin

Allgemeines Protokoll für die Quantifizierung von löslichen primären Aminen aus [39]:

Reagenzien:

- 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Puffer pH 8,5
- 0,01%ige (w/v) TNBS-Lösung in 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Puffer pH 8,5
- 10%ige SDS-Lösung
- 1M HCl

Durchführung:

(1) Die zu untersuchende Substanz wird in 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Puffer pH 8,5 gelöst (bei großen Molekülen wie Proteinen in einem Konzentrationsbereich zwischen 20-200 µg/mL, bei kleinen Molekülen 2-20 µg/mL).

(2) Die 0,01%ige (w/v) TNBS-Lösung in 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Puffer pH 8,5 muss für jede Untersuchung frisch hergestellt werden.

(3) 0,5 mL TNBS-Lösung werden zu je 1 mL Probelösung gegeben und es wird gut durchmischt.

(4) Man inkubiert zwei Stunden bei 37°C.

(5) 0,5 mL 10%ige SDS-Lösung und 0,25 mL 1M HCl werden zu jeder Probe gegeben.

(6) Die Extinktion der Proben wird bei 335 nm gemessen. Die quantitative Bestimmung von Aminogruppen in einer bestimmten Probe kann durch

Zuhilfenahme einer Kalibrierfunktion, welche für eine aminogruppen-hältige Substanz unter identischen Test-Bedingungen aufgestellt wurde, geschehen.

4.6 Besondere Reagenzien

- Poly(ethylenglykol)methylether 2'000: Aldrich, 202509
- Methoxypolyethylenglykol 5,000-essigsäure: Fluka, 70718
- O-(2-Aminoethyl-O'-methyl-polyethylenglykol 2'000: Fluka, 06676
- Poly-ε-CBZ-L-lysin: M ~ 1000 g/mol, Sigma, P4510
- Fluoresceinisothiocyanat Isomer I: Sigma, F7250
- Poly(D,L-lactid-co-glycolid): Böhringer Ingelheim, Resomer® RG 503 H
- Picrylsulfonsäurelösung (2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure) 5% (w/v) in H_2O: Sigma, P2297

5 Ergebnisse

5.1 Vorversuche hinsichtlich Löslichkeiten der Reagenzien

Im Vorfeld zur synthetischen Arbeit wurde die Löslichkeit der verwendeten Reagenzien in diversen gängigen Lösungsmitteln und in weiterer Folge, die Möglichkeit, selbige Reagenzien durch Zugabe von Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität aus der Lösung wieder auszufällen, untersucht. Anhand dieser Daten wurde entschieden in welchen Lösungsmitteln die Synthese ausgeführt wird und ob Trennungsschritte durch Fällungsreaktionen durchführbar sind.

Durchführung:

In einer Eprouvette wird ungefähr eine Spatelspitze der zu untersuchenden Substanz zu 2-3 mL des jeweiligen Lösungsmittels gegeben und es wird so lange immer wieder umgeschwenkt bis eine Aussage über die Löslichkeit getroffen werden kann. Die dabei erhaltenen Lösungen werden wiederum mit Lösungsmitteln versetzt, in denen die zu untersuchende Substanz nicht löslich ist, soweit die verschiedenen Lösungsmittel miteinander mischbar sind. Es wird beobachtet ob und nach Zugabe welcher Menge ein Niederschlag auftritt.

Die Ergebnisse für die Löslichkeitsversuche sind in *Tabelle 1* zusammengefasst.

	Löslichkeit			
Lösungsmittel	mPEG	ε-CBZ-PLL	DCC	NHS
H_2O	+	-	/	/
DMSO	+	/	+	+
DMF	+	+	+	+
ACN	+	-	+	+
Aceton	/	-	/	/
Ethanol	+	-	/	/
Ethylacetat	-	/	+	+
THF	+	-	+	+
Chloroform	+	-	+	-
Dichlormethan	+	-	+	±
Diethylether	-	/	+	-
n-Hexan	-	/	+	-

Tabelle 1: Löslichkeit von mPEG, PLL, DCC und NHS in diversen Lösungsmitteln

+ … löslich
- … nicht löslich
± … begrenzt löslich
/ … nicht getestet

5.1.1 Poly-(ethylenglykol)methylether (mPEG)

Es konnte festgestellt werden, dass mPEG aus einer Lösung in THF durch Zugabe eines ungefähr zweifachen Überschusses an n-Hexan annähernd quantitativ ausgefällt werden kann. Die Fällung kann auch durch Zugabe von Diethylether erfolgen, allerdings ist hierfür ein wesentlich größerer Überschuss an Lösungsmittel notwendig. Weiters kann mPEG durch Zugabe eines circa vierfachen Überschusses an Hexan sowohl aus Chloroform und auch aus Dichlormethan gefällt werden. Eine Fällung mit Diethylether war aus einer Lösung in DMF erfolgreich, wenn auch ein großer Überschuss (~ sechsfach) dafür nötig war. Eine effizientere Fällung erreicht man durch Verwenden einer Mischung aus Diethylether und n-Hexan in einem Verhältnis von circa 1:1. Der Anteil an Hexan sollte jedoch nicht weiter erhöht

werden, da sonst Phasentrennung eintritt. Mittels Ethylacetat konnte mPEG aus keinem der in *Tabelle 1* angeführten Lösungsmittel ausgefällt werden.
Die erhaltenen Daten lassen sich folgendermaßen erklären:
Das polare mPEG löst sich nur in relativ polaren Lösungsmitteln vollständig. Durch Zugabe des apolaren n-Hexans wird die Polarität des Lösungsmittelgemisches soweit verändert, dass mPEG nicht mehr löslich ist und somit ausfällt. Da Diethylether etwas polarer als n-Hexan ist, muss eine dementsprechend größere Menge bis zum Ausfallen des mPEGs zugegeben werden.

5.1.2 Poly-ε-carbobenzoxy-L-lysin (ε-CBZ-PLL)

ε-CBZ-PLL löst sich ausschließlich in DMF und fällt nach Zugabe eines circa sechsfachen Überschusses an Diethylether wieder aus.

5.1.3 N,N`-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)

DCC ist in allen getesteten Lösungsmitteln, einschließlich Hexan, leicht löslich und lässt sich aus keiner der Lösungen wieder ausfällen.

5.1.4 N-Hydroxysuccinimid (NHS)

NHS löst sich gut in den polaren Lösungsmitteln ACN, THF, DMF, DMSO, Ethylacetat und in geringen Konzentrationen auch in Dichlormethan. Es bleibt bei Zugabe von Diethylether oder n-Hexan in Lösung.

5.2 Succinyl-PEG

Dieses Produkt wurde hergestellt, um ein PEG-Derivat mit einer kopplungsfähigen Carboxylgruppe zu erhalten, welche in weiterer Folge zur Konjugation mit einer primären Aminogruppe von Poly-L-Lysin herangezogen werden kann.

Synthesestrategie:

Li und Kao modifizierten mPEG, indem sie durch Kopplung mit Glutarsäureanhydrid eine endständige Carboxylgruppe in das Molekül einführten [40]. In der vorliegenden Arbeit wird an Stelle von Glutarsäureanhydrid Bernsteinsäureanhydrid verwendet. Die Kopplung des Anhydrids mit mPEG verläuft über einen nukleophilen Additions-Eliminierungs-Mechanismus, wobei es zur Ringöffnung des zyklischen Anhydrids kommt (*siehe Abb. 17*). mPEG fungiert dabei als Nukleophil und greift am elektrophilen Kohlenstoffatom einer der Carbonylgruppen des Anhydrids an, wodurch es zum Bindungsbruch zwischen dem attackierten C-Atom und dem benachbarten Sauerstoff kommt. Folglich entsteht zwischen den miteinander reagierenden Molekülen eine Esterbindung, an welche zwei Methylengruppen und eine endständige Carboxylgruppe anschließen. Die so erzeugte Carboxylfunktion kann für Konjugationen mit Molekülen, welche eine oder mehrere Aminogruppen beinhalten, herangezogen werden. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass die Esterbindung zwischen mPEG und dem Succinylrest hydrolyseempfindlich ist.

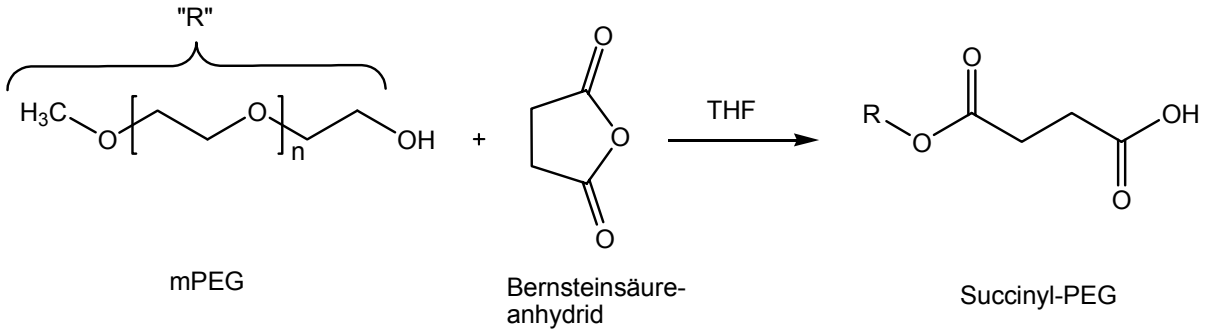


Abb. 17: Synthesestrategie für Succinyl-PEG

5.2.1 Durchführung der Synthese

Ansatz:

- mPEG: 509 mg = 2,55 x 10^{-4} mol
- Bernsteinsäureanhydrid: 126 mg = 12,59 x 10^{-4} mol

509 mg mPEG werden in 4 mL absolutem THF unter Rühren und Erwärmen auf ungefähr 40°C im Wasserbad gelöst. Zu dieser Lösung werden langsam 126 mg Bernsteinsäureanhydrid gegeben. Es wird über Nacht bei 40°C gerührt.
Die Reaktionsmischung wird in weiterer Folge über Nacht bei 4°C aufbewahrt, wobei ein weißer, flockiger Niederschlag ausfällt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit wenig kaltem THF gewaschen.
Nach Trocknen im Vakuum-Exsikkator erhält man 190 mg (35% der Theorie) eines wachsigen weißen Feststoffes, welcher bei -20°C gelagert wird.

5.2.2 Entwicklung der Synthese

Die anspruchsvollste Aufgabe bei diesem Syntheseweg war die Isolation des Succinyl-PEGs aus der Reaktionsmischung. Der naheliegendste Lösungsansatz für dieses Problem, schien zunächst die Fällung des mPEG-Derivates mittels n-Hexan zu sein. Diese Methode konnte jedoch nicht angewendet werden, da hierbei auch das im Überschuss zugegebene Edukt Bernsteinsäureanhydrid ausfallen würde. Dies wurde bei einem einfachen Test festgestellt, bei dem die Edukte mPEG und Bernsteinsäureanhydrid (laut Mengenangaben der Synthesevorschrift) in jeweils vier Milliliter THF gelöst und anschließend mittels n-Hexan wieder ausgefällt wurden. Für die Fällung des mPEGs wurden acht Milliliter Hexan benötigt. Bei Zugabe der gleichen Menge Hexan zur Bernsteinsäureanhydrid-Lösung entstand ein weißer, voluminöser Niederschlag.
Da das Succinyl-PEG sehr gut wasserlöslich ist, Bernsteinsäureanhydrid jedoch nicht, wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Wasser zur Trennung der beiden Substanzen in Erwägung gezogen. Diese Vorgehensweise ist jedoch aufgrund des bei der Reaktion verwendeten Lösungsmittels THF, welches sich ausgezeichnet mit Wasser mischt, nicht möglich.

Eine bekannte Eigenschaft von Polyethylenglykol ist, dass es sich in der Kälte in gewissen Lösungsmitteln nur sehr schlecht beziehungsweise begrenzt löst. Basierend auf diesem Wissen, wurde versucht, das PEG-Derivat durch eine Reduktion der Temperatur aus der Lösung auszufällen. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei 4°C gelagert, was tatsächlich die Löslichkeit des Produktes soweit herabsetzte, dass es aus der Lösung ausfiel und dadurch isoliert werden konnte.

Die molaren Verhältnisse der Reaktanden, sowie Reaktions-Dauer und -Temperatur wurden aus dem von Li und Kao entwickelten Protokoll für die Synthese von Glutaryl-PEG übernommen [40].

5.2.3 Analytische Charakterisierung und Diskussion

5.2.3.1 Untersuchung mittels IR-Spektroskopie

Von dem zuvor hergestellten Succinyl-PEG wurde folgendes Spektrum aufgenommen (*siehe auch Anhang*):
IR (KBr): ν = 3420 cm^{-1} (br, O-H), 2888 (s, C-H), 1967 (w), 1733 (m, C=O)

Ebenso wurde ein Spektrum von Polyethylenglykolmethylether (M ~ 2000 Da, Aldrich) aufgenommen:
IR (KBr): ν = 3433 cm^{-1} (br, O-H), 2888 (s, C-H), 1967 (w)

In beiden Spektren findet man gleichermaßen die typisch breite Absorptionsbande der Hydroxylgruppen. Das Auftreten dieser Bande zwischen 3600 und 3200 cm^{-1}, deutet darauf hin, dass die OH-Gruppen untereinander Wasserstoffbrücken gebildet haben, die Moleküle also intermolekular assoziiert vorliegen. Die Absorptionsbande bei 2888 cm^{-1} rührt von den C-H-Valenzschwingungen her und ist ebenfalls bei beiden Verbindungen zu beobachten, genauso wie eine weitere schwache Bande bei 1967 cm^{-1}. Succinyl-PEG weist jedoch ein Signal bei 1733 cm^{-1} auf, das bei mPEG nicht vorhanden ist. Es handelt sich hierbei um die Absorptionsbande der

Bersteinsäure-Carbonylgruppen. Das Auftreten dieser Bande bestätigt die Anwesenheit des Succinylrestes im Produkt.

5.2.3.2 Abschließende Bemerkungen

Obwohl Succinyl-PEG auf einfache Art und Weise synthetisiert, und das Vorhandensein der Carboxylfunktion im Molekül mittels IR-Spektroskopie bestätigt werden konnte, wurde es nicht für die weitere Kopplungen mit PLL eingesetzt. Dies begründet sich dadurch, dass die bei der Konjugation von mPEG und Bernsteinsäureanhydrid gebildete Esterbindung empfindlich gegenüber Hydrolyse und somit für den weiteren Verwendungszweck, die PEGylierung von Nanopartikeln, nicht stabil genug wäre. Als Alternative hierfür wurde im Folgenden ein Syntheseweg für das stabilere Carboxyl-PEG entwickelt.

5.3 Carboxyl-PEG

Carboxyl-PEG wurde als Alternative zum hydrolyseempfindlichen Succinyl-PEG synthetisiert, der Verwendungszweck bleibt dabei der gleiche. Es soll in weiterer Folge mit PLL gekoppelt und so als Material zur Oberflächenmodifikation von PLGA-Nanosphären dienen.

Synthesestrategie:

Chloressigsäure kann dazu verwendet werden, eine relativ unreaktive Hydroxylgruppe in eine Carboxylfuntkion, welche dann für Konjugationen mit weiteren Molekülen nutzbar ist, zu transformieren [41]. Dabei fungiert mPEG als Nukleophil und greift die Chloressigsäure in Alpha-Stellung zur Carboxylgruppe an, wodurch in einem konzertierten Prozess die gute Abgangsgruppe Chlor als Anion aus dem Molekül austritt. Durch diese nukleophile Substitutionsreaktion, welche von der Lewis-Base Triethylamin katalysiert wird, entsteht eine stabile Etherbindung zwischen dem mPEG und dem Säurerest.

Das als Triethylaminsalz vorliegende Reaktionsprodukt wird anschließend mit Salzsäure behandelt, um die freie Carboxylfunktion zu erhalten.

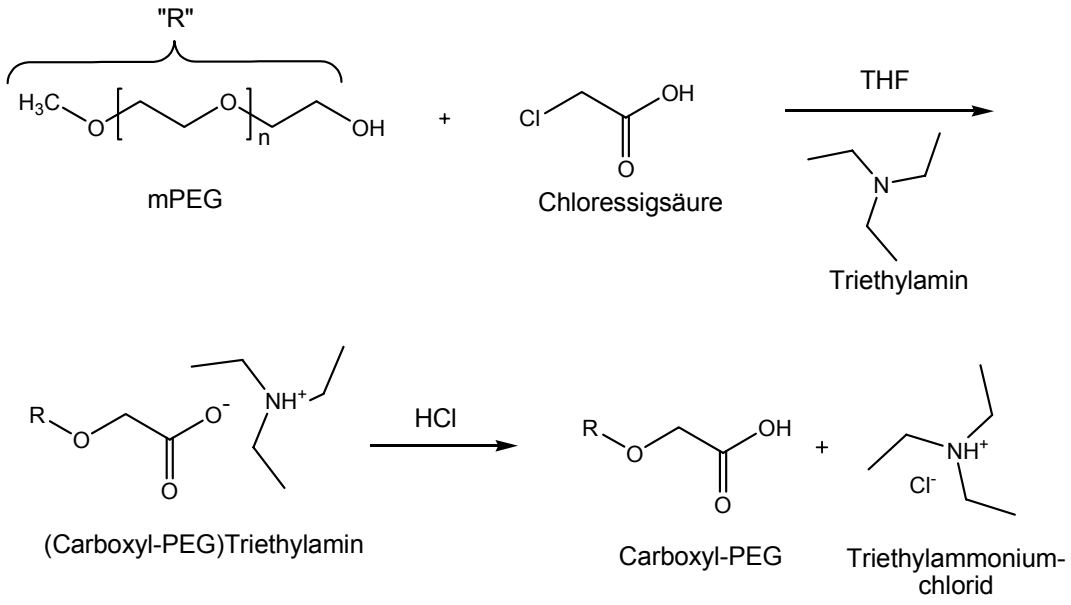


Abb. 18: Synthesestrategie für Carboxyl-PEG

5.3.1 Durchführung der Synthese

Ansatz:

- mPEG: 20 g = 0,01 mol
- Chloressigsäure: 2,86 g = 0,03 mol
- Triethylamin: 7 mL = 0,05 mol

20 g mPEG werden in ungefähr 50 mL absolutem THF gelöst. Danach werden 2,86 g Chloressigsäure und 7 mL Triethylamin (TEA) zugegeben. Nun wird ein mit Calciumchlorid gefülltes Trockenrohr aufgesetzt und vier Stunden bei 40°C im Wasserbad gerührt. Danach wird das Reaktionsprodukt mit 100 mL kaltem Hexan ausgefällt. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit kaltem Hexan gewaschen. Nach Trocknung im Vakuum erhält man 22,52 g eines weißen Pulvers, welches in 120 mL destilliertem Wasser gelöst wird. Man gibt 10 mL konzentrierte Salzsäure hinzu und lässt einige Minuten rühren.
Nun schüttelt man drei Mal mit je 20 mL Chloroform und trocknet die vereinigten organischen Phasen mit Natriumsulfat. Nachdem das Natriumsulfat abfiltriert wurde, entfernt man das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer.
Das Produkt wird im Vakuum-Exsikkator getrocknet und man erhält 17,68 g (86% der Theorie) einer wachsartigen, milchig trüben Substanz. Das Produkt wird bei -20°C gelagert.

5.3.2 Entwicklung der Synthese

In der Literatur werden Umsetzungen mit Chloressigsäure üblicherweise in wässrigen Lösungen unter basischen Bedingungen durchgeführt [41, 42]. Die Produktreinigung kann anschließend durch Dialyse gegen destilliertes Wasser erfolgen.
Für eine effiziente Dialyse sollte die Ausschlussgrenze der Dialysenmembran circa die Hälfte des Molekulargewichtes des zu reinigenden Produktes betragen und das Molekulargewicht des zurückzuhaltenden Moleküls sollte mindestens 25 Mal so groß wie das des abzutrennenden Moleküls sein. In dieser Arbeit wird mPEG mit einem mittleren Molekulargewicht von 2000 Dalton eingesetzt, das Molekulargewicht von Chloressigsäure beträgt 94,494 Dalton. Das Verhältnis der Molekulargewichte von

eingesetztem mPEG und Chloressigsäure von rund 21 liegt somit unter dem Mindestwert, was Ausbeute und Dauer der Dialyse negativ beeinflussen würde. Weiters sind Dialysenmembranen mit einer Ausschlussgrenze von 1000 Dalton zwar kommerziell verfügbar, jedoch muss bei so kleinen Ausschlussgrenzen mit erheblichem Zeitaufwand und schlechten Ausbeuten gerechnet werden. Um diesen Nachteil zu umgehen, wurde die Durchführung der Reaktion vom wässrigen Milieu in ein organisches Lösungsmittel verlegt. Das Lösungsmittel der Wahl war in diesem Fall Tetrahydrofuran, da in ihm alle beteiligten Reaktanden löslich sind und PEG-Derivate aus ihm relativ leicht durch Zugabe von n-Hexan ausgefällt werden können. Die überschüssige Chloressigsäure und das bei der Reaktion entstehende Triethylaminhydrochlorid bleiben dabei in Lösung. Somit stand eine einfach durchzuführende, wenig zeitaufwendige Reinigungsoperation, welche gute Ausbeuten erzielt, zur Verfügung.

Wie schon zuvor erwähnt, benötigt man für den Ablauf der Reaktion basische Bedingungen. Als Ersatz für das im wässrigen Milieu überlicherweise eingesetzte Natriumhydroxid wurde die Lewis-Base Triethylamin gewählt.

Nach erfolgter Reaktion wurde eine Fällungsoperation mit n-Hexan durchgeführt, wobei das Zwischenprodukt (Carboxyl-PEG)Triethylamin ausfiel. Das wasserlösliche Salz wurde anschließend mit Salzsäure behandelt, wodurch man erst die freie Carboxylfunktion (mPEG-COOH) erhielt. Bei diesem Vorgang entsteht Triethylaminhydrochlorid, welches in einem weiteren Schritt durch Flüssig-Flüssig-Extraktion abgetrennt werden muss. Die wässrige Lösung wurde dafür mit Chloroform ausgeschüttelt, in welchem sich Carboxyl-PEG bevorzugt löst, wogegen Triethylaminhydrochlorid in der wässrigen Phase verbleibt.

Es wurde ebenfalls eine Synthesevariante mit einem weiteren Reinigungsschritt durchgeführt, um eventuell beim Schüttelvorgang mitgeschlepptes Triethylaminhydrochlorid zu entfernen. Dabei wurde das Carboxyl-PEG nach dem Ausschütteln mit Chloroform abermals mit n-Hexan aus der organischen Phase ausgefällt, wobei das Triethylaminhydrochlorid in Lösung bleibt. Da sich Polyethylenglykol und seine Derivate aus Chloroform jedoch nur durch Zugabe eines erheblichen Überschusses an n-Hexan ausfällen lassen, ist diese Fällungsoperation

mit einem bedeutenden Ausbeuteverlust verbunden. Weiters konnte anhand der Infrarotspektren beider Produkte, welche jeweils mit oder ohne zusätzliche Fällung mit Hexan erzeugt worden waren, keinerlei Verunreinigung durch Triethylaminhydrochlorid festgestellt werden (*siehe Abschnitt 5.3.3.4*). Durch eine weitere Fällung kann also kein zusätzlicher Reinigungseffekt erzielt werden, weswegen folglich davon abgesehen wurde.

Da Chloressigsäure ein sehr reaktives Molekül ist, kann mit relativ geringen Überschüssen und kurzen Reaktionszeiten gearbeitet werden. Mit einer Reaktionsdauer von vier Stunden und einem dreifachen molaren Überschuss gegenüber mPEG konnten zufriedenstellende Ergebnisse erreicht werden.

5.3.3 Analytische Untersuchungen und Diskussion

5.3.3.1 Dünnschichtchromatographie

Es sollte untersucht werden, ob die Edukte Chloressigsäure und mPEG vom Produkt Carboxyl-PEG mittels DC voneinander unterscheidbar sind. Dazu mussten erst geeignete Methoden für die Detektion der Substanzen auf den DC-Platten gefunden werden (*siehe Abschnitt 4.2 Anfärbereagenzien für die DC*):

Fluoreszenzlöschung:

Zuerst wurde getestet, ob die einzelnen Substanzen nach Auftragen auf eine F_{254}-Kieselgelplatte Fluoreszenzlöschung verursachen. Die an der Startlinie aufgetragenen Substanzen erschienen unter Betrachtung im UV-Licht als sehr blasse, rosarote Flecken, welche aber nach dem Entwickeln der DC-Platte in einem Laufmittel nicht mehr auszumachen waren, somit kam Fluoreszenzlöschung als Detektionsmethode nicht in Frage.

Jod:

Polyethylenglykol und seine Derivate reagierten auf die Behandlung mit Jod und wurden als gelb bis braun gefärbte Flecken auf der Platte sichtbar. Substanzflecken der Chloressigsäure konnten mit dieser Methode jedoch nicht gefärbt werden.

Jod-Kaliumjodid neutral:

Durch Besprühen der DC-Platte mit dieser Lösung konnten PEG-Derivate als braune Flecken sichtbar gemacht werden. Chloressigsäure reagierte nicht auf dieses Reagenz.

Schwefelsäure:

Die auf der DC-Platte aufgetragenen Substanzen wurden mit 47%iger Schwefelsäure besprüht, danach wurde auf 150°C erhitzt. Weder Chloressigsäure, noch PEG-Verbindungen konnte man nach dieser Behandlung deutlich erkennen. Teilweise waren grau-schwarze Produktflecken zu sehen, welche jedoch von einer DC zur nächsten nicht reproduzierbar waren. Somit schied auch Schwefelsäure als mögliche Detektionsmethode aus.

Glucose-Anilin:

Chloressigsäure reagierte mit Glucose-Anilin unter Bildung tiefbrauner Flecken auf orangem Hintergrund. PEG-Derivate wurden nach Behandlung mit dieser Sprühlösung indirekt sichtbar. Sie erschienen als weiße Flecken, die sich von der orangen Platte gut abhoben. Da mittels Glucose-Anilin-Behandlung sowohl das Edukt Chloressigsäure als auch sämtliche PEG-Derivate detektierbar sind, ist dieses Verfahren für sämtliche DC-Versuche in der vorliegenden Arbeit die Detektionsmethode der Wahl.

Versuchsreihe 1:

In den ersten Versuchen wurden Polyethylenglykolmethylether (M ~ 2000 Da, Aldrich), Chloressigsäure (Fluka) und Triethylammonium-Carboxyl-PEG, welches als Zwischenprodukt bei der Synthese anfällt, untersucht. Mit einer Kapillare wurden die

entsprechenden Substanzlösungen auf mehrere Kieselgelplatten aufgetragen, welche dann in zwei verschiedenen Laufmittelgemischen entwickelt wurden:

Chloroform : Methanol : Wasser = 10 : 10 : 2 mL

Nach dem Entwickeln wurde die Platte mit Glukose-Anilin behandelt. Chloressigsäure erschien als länglicher brauner Fleck, während die beiden PEG-Derivate als weiße Aussparungen sichtbar wurden. Das Ergebnis der DC ist in *Abb. 19* schematisch dargestellt.

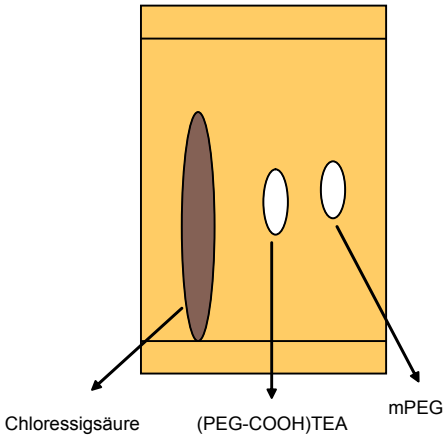


Abb. 19: DC-Skizze: Chloressigsäure, Triethylammonium-Carboxyl-PEG und mPEG auf Kieselgel; entwickelt in Chloroform : MeOH : Wasser = 10 : 10 : 2

Die Bande der Chloressigsäure zeigt sehr starkes Peak-Tailing, was ein Hinweis auf Überladen der DC-Platte sein kann. Demgegenüber sind die Substanzflecken der beiden PEG-Derivate schärfer begrenzt, allerdings gibt es zwischen den Laufstrecken von mPEG und (Carboxyl-PEG)Triethylamin keinen signifikanten Unterschied. Dermaßen geringe Unterschiede können auch durch die verschiedene Massenbelegung der Platte mit Analytmolekülen hervorgerufen werden, es wurden nämlich Probelösungen unterschiedlicher Konzentrationen eingesetzt, da man hierbei rein qualitative Ergebnisse erhalten wollte. Nichtsdestotrotz kann man durch diesen Versuch einen Hinweis auf die Reinheit des Produktes erhalten, denn eventuelle Spuren von Chloressigsäure im Produkt, wurden mit dieser Methode nicht festgestellt.

In demselben Laufmittel wurde außerdem eine Celluloseplatte entwickelt, wobei man jedoch nur stark verschwommene Flecken, die mit der Laufmittelfront wanderten, beobachten konnte. Für dieses spezielle Trennproblem können Celluloseplatten folglich nicht eingesetzt werden.

Aceton : Wasser = 17 : 3 mL

Die Detektion erfolgte ebenfalls mit Glukose-Anilin, wodurch das in *Abb. 20* dargestellte Ergebnis erhalten wurde.

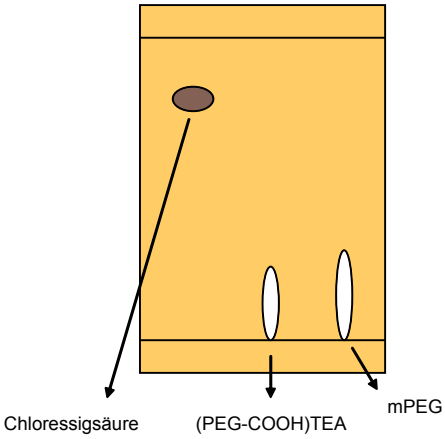


Abb. 20: DC-Skizze: Chloressigsäure, (PEG-COOH)TEA und mPEG auf Kieselgel; entwickelt in Aceton : Wasser = 17 : 3 mL

Der Chloressigsäure-Fleck ist jetzt scharf begrenzt und zieht keinen langen Schweif mehr hinter sich her. Auch hier erkennt man keine Verschmutzung durch Chloressigsäure im Produkt. Bei diesem Lauf sind jedoch mPEG und das Triethylaminsalz vom Peak-Tailing betroffen. Beide Substanzflecken sind in die Länge gezogen und reichen bis zur Startlinie. Das mPEG ist wie beim vorherigen Versuch etwas weiter gewandert als das Salz, es gilt jedoch noch zu klären, ob dies lediglich auf Konzentrationsunterschiede oder wirklich auf unterschiedliche Retention aufgrund von Strukturunterschieden zurückzuführen ist.

Versuchsreihe 2:

In einer weiteren Versuchsreihe wurden zusätzlich zu mPEG, dem (PEG-COOH)TEA und Chloressigsäure noch zwei andere Proben untersucht: Bei der Synthese des Carboxyl-PEGs wurde das Endprodukt durch Flüssig-Flüssig-Extraktion gereinigt. Die dabei erhaltene organische Phase, welche das Produkt beinhaltet, und die wässrige Phase, die Triethylaminhydrochlorid enthält, wurden ebenfalls auf die DC-Platten aufgetragen. Es wurde in einer Reihe von verschiedenen Laufmitteln entwickelt und anschließend mit Glukose-Anilin behandelt:

Aceton : Wasser = 17 : 3 mL

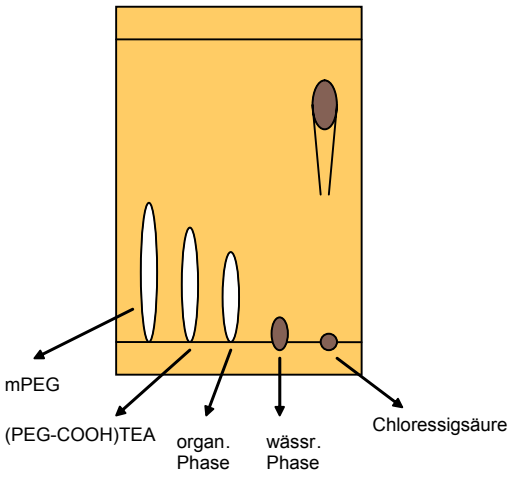


Abb. 21: DC-Skizze: mPEG, (PEG-COOH)TEA, wässrige und organische Phase auf Kieselgel; entwickelt in Aceton : Wasser = 17 : 3 mL

Die Chloressigsäure wanderte am weitesten und es war abermals Peak-Tailing zu Beobachten. Die wässrige Phase wurde an der Startlinie retardiert und reagierte erwartungsgemäß auf das Schweppes-Reagenz, welches zur spezifischen Detektion von Säuren verwendet wird. Alle drei PEG-Derivate waren von Peak-Tailing betroffen. Am weitesten wanderte mPEG, gefolgt von (PEG-COOH)TEA und der organischen Phase, die mit Carboxyl-PEG angereichert ist.

Bei Entwicklung im Laufmittel **Chloroform : Methanol : Wasser = 16 : 2 : 0,2 mL** kehrte sich die Reihenfolge der PEG-Derivate im Vergleich zum vorangegangenen Versuch um. Am weitesten wanderte hier die organische Phase und die kürzeste

Laufstrecke gehört diese Mal zu mPEG. Alle drei Substanzflecken sind nicht so scharf abgegrenzt wie bei den vorigen Versuchen, sie sind vielmehr von unregelmäßiger Form. Die Chloressigsäure findet man als kompakten Fleck mit scharfen Grenzen in etwa auf gleicher Höhe mit dem Triethylaminsalz. Die wässrige Phase blieb abermals an der Startlinie zurück.

Ein ähnliches Ergebnis erhielt man für das Laufmittel **Chloroform : Methanol : Wasser = 70 : 22 : 3,5 mL**, mit dem einzigen Unterschied, dass alle drei PEG-Derivate gleich weit wanderten.

Bei **Chloroform : Methanol : Wasser = 60 : 40 : 10** und **65 : 30 : 6** wanderten ebenfalls alle PEG-Derivate annähernd gleich weit. Die Substanzflecken sind hier etwas länglicher und die Chloressigsäure zieht wieder einen langen Schweif hinter sich her. Ein Ansäuern des Wasseranteils im zuletzt genannten Laufmittel mit Essigsäure, hatte zur Folge, dass alle Substanzen weiter wanderten und die PEG-Derivate an der Laufmittelfront anzutreffen sind.

Chloroform : Methanol : Wasser = 75 : 15 : 2

Sämtliche Substanzflecken sind scharf abgegrenzt und weisen kein Peak-Tailing auf. mPEG und das (PEG-COOH)TEA liefen gleich weit, während Carboxyl-PEG etwas weiter lief. Die Chloressigsäure befindet sich in etwa auf gleicher Höhe mit mPEG. Die wässrige Phase blieb am Start zurück.

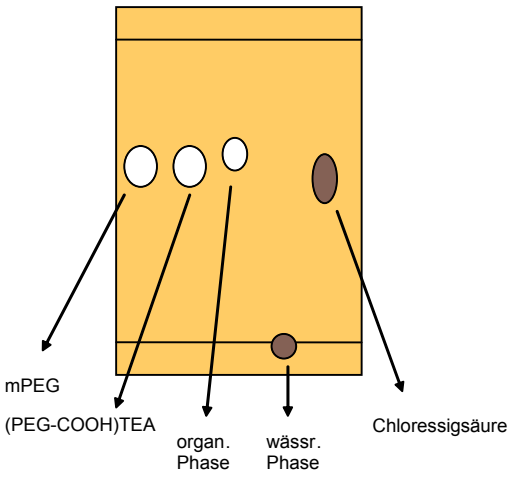


Abb. 22: DC-Skizze: mPEG, (PEG-COOH)TEA, organ. Phase, wässr. Phase und Chloressigsäure auf Kieselgel; entwickelt in Chloroform : Methanol : Wasser = 75 : 15 : 2

Aceton : Ethylacetat : Wasser = 10 : 5 : 1 und **Aceton : Chloroform = 14 : 6** erzielten fast identische Ergebnisse. Alle Substanzen bis auf Chloressigsäure wurden stark am Start zurückgehalten und wandern somit kaum.

Die Resultate bei einem Lauf mit **Methanol : Wasser = 18 : 2** und **Methanol : Aceton : Wasser = 10 : 8 : 2** sind ebenfalls miteinander vergleichbar. Im ersteren Fall lief die Chloressigsäure am weitesten, die drei PEG-Derivate liegen nahe beieinander. (PEG-COOH)TEA wanderte eine Spur weiter als mPEG, welches wiederum etwas weiter als Carboxyl-PEG lief. Die wässrige Phase wurde an der Startlinie retardiert. Im zweiten Fall besteht der einzige Unterschied darin, dass mPEG und (PEG-COOH)TEA gleich weit wanderten.
Für den Fall, dass der Wasseranteil bei Methanol : Aceton : Wasser = 10 : 8 : 2 mit Essigsäure angesäuert wird, ist das Ergebnis schematisch in *Abb. 23* dargestellt.

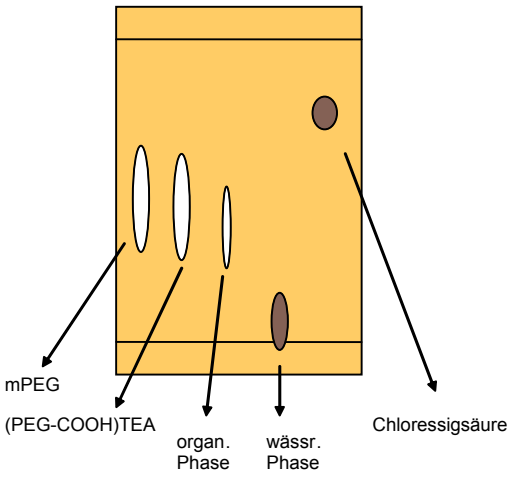


Abb. 23: DC-Skizze: mPEG, (PEG-COOH)TEA, organ. Phase, wässr. Phase und Chloressigsäure auf Kieselgel; entwickelt in Methanol : Aceton : Wasser (angesäuert) = 10 : 8 : 2

Zusammenfassend kann für alle DC-Experimente gesagt werden, dass Chloressigsäure sowohl durch ihre meist unterschiedlichen Laufstrecken als auch durch die selektive Farbreaktion mit Schweppes-Reagenz gut von den PEG-Derivaten unterschieden werden konnte. Somit konnten größere Verunreinigungen der Produkte (Carboxyl-PEG)TEA und Carboxyl-PEG mit diesem Reagenz mittels DC ausgeschlossen werden.

Die Unterscheidung der einzelnen PEG-Derivate ist insofern schwieriger, da sie alle dasselbe Strukturgerüst gemeinsam haben und nur an einem Ende des Moleküls verschiedene funktionelle Gruppen aufweisen. Es ist fraglich, ob diese geringen Unterschiede zu einem signifikant voneinander abweichenden Migrationsverhalten bei der DC führen können. Auch wenn bei den DC-Versuchen unterschiedliche Migrationsstrecken für die einzelnen Derivate erhalten wurden, könnte dies auch auf Konzentrationseffekte zurückgeführt werden. Ob diese Vermutung zutrifft, könnte durch das Auftragen äquimolarer Mengen bei gleichzeitiger Vermeidung von Überladung der DC-Platten überprüft werden.

5.3.3.2 Detektion von Triethylaminhydrochlorid

Im Laufe der Carboxyl-PEG-Synthese, einerseits im Zuge der nukleophilen Substitutionsreaktion zwischen mPEG und Chloressigsäure und andererseits bei der Behandlung des Zwischenproduktes Triethylammonium-Carboxyl-PEG mit Salzsäure, entsteht als Nebenprodukt Triethylammoniumchlorid, welches in weiterer Folge vom Reaktionsprodukt abgetrennt werden sollte. Dies geschah praktisch durch die Ausfällung des Zwischenproduktes mit Hexan und weiters durch die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Chloroform.
Es war nun von Interesse, eine Methode zu finden das Triethylaminhydrochlorid qualitativ zu detektieren, um festzustellen, ob es im Produkt beziehungsweise im davon abgetrennten Filtrat nach der Fällung enthalten ist oder in welcher der Phasen bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion es sich befindet. Für diesen Zweck wurden verschiedene Methoden eingesetzt:

- Reaktion mit Ninhydrin:

  Ninhydrin wird standardmäßig für den Nachweis von Aminosäuren verwendet. Da es aber auch mit anderen Aminen reagiert, wurde versucht Triethylamin und Triethylammoniumchlorid damit zu detektieren. Lösungen der folgenden Substanzen wurden auf Filterpapier und Kieselgelplatten aufgetragen:

  – Triethylamin
  – Triethylaminhydrochlorid
  – Salzsäure

- organische und
- wässrige Phase nach der Flüssig-Flüssig-Extraktion
- mPEG
- Carboxyl-PEG
- (Carboxyl-PEG)Triethylamin

a) Filterpapier:

Das Papier wurde mit Ninhydrin-Sprühlösung behandelt und auf ca. 110°C erhitz. An den Stellen wo Salzsäure und Triethylaminhydrochlorid aufgetragen waren kam es zur Verkohlung des Papiers. Dennoch rief Triethylaminhydrochlorid einen schwach erkennbaren Violettstich hervor, der genauso bei der wässrigen Phase, mPEG, Carboxyl-PEG und (Carboxyl-PEG)Triethylamin auftrat. Die organische Phase und Triethylamin zeigten keinerlei Farbveränderungen. Da auch pures mPEG diese leichte Violettfärbung aufwies, kann das schwach positive Ergebnis nicht aufgrund der Anwesenheit eines Amins zustande gekommen sein. Sämtliche Substanzen, die solch ein schwach positives Testergebnis erzielten, waren in destilliertem Wasser gelöst. Da es sich hierbei um eine äußerst sensitive Testmethode handelt, ist die positive Reaktion möglicherweise auf den im Wasser gelösten Stickstoff zurückzuführen. Anhand dieses Versuches kann also keine Aussage über die Anwesenheit von Triethylamin oder Triethylammoniumchlorid in einer der Proben gemacht werden.

b) Kieselgel:

Die Kieselgelplatte wurde gleichermaßen wie das Filterpapier mit Ninhydrin behandelt, wobei von dem vorherigen Ergebnis abweichende Beobachtungen gemacht wurden. Bis auf Triethylamin, welches eine tief violette Färbung ergab, verursachte keine der getesteten Substanzen eine Farbreaktion. Obwohl auch hier dieselben wässrigen Lösungen eingesetzt wurden, zeigten diese auf Kieselgel ein anderes Verhalten als auf Papier. Triethylamin erzeugte hier ein eindeutig positives Ergebnis, wogegen es auf Papier in keiner Weise mit Ninhydrin reagiert hatte. Dieser Versuch deutet darauf hin, dass in keiner der getesteten Proben Triethylamin vorhanden ist, über Triethylammoniumchlorid kann keine Aussage gemacht werden.

- Stickstoff-Nachweis mittels pyrolytischer Oxidation:

  Mit Hilfe dieses Tests werden sämtliche stickstoffhältige organische Verbindungen detektiert (*siehe Abschnitt 4.4.2*). Da aber Triethylamin bei dieser Synthese der einzige Reaktand ist, welcher Stickstoff beinhaltet, kann in diesem Fall nur sein Folgeprodukt Triethylammoniumchlorid ein mögliches positives Testergebnis hervorrufen. Denn während der Behandlung mit Salzsäure im Zuge der Synthese, bildete sämtliches Triethylamin in der Reaktionslösung mit der Säure das Salz Triethylammoniumchlorid. Getestet wurden Proben von Carboxyl-PEG, Triethylammonium-Carboxyl-PEG, mPEG und eine Blindprobe, die nur Braunstein enthielt. Sämtliche Proben inklusive Blindprobe ergaben ein positives Testergebnis. Die Ursache dafür könnte sein, dass kommerzieller Braunstein und gebräuchliche Glaseprouvetten meist nicht frei von Stickstoff sind. Um eine Beeinflussung des Testes dadurch auszuschließen, müssten Reagenzgläser aus Pyrex-Glas und stickstoff-freier Braunstein verwendet werden, die jedoch für diese Arbeit nicht zur Verfügung standen.

  Das Ergebnis dieses Tests bleibt folglich ohne Aussagekraft.

- Detektion von Aminen mit Salpetersäure:

  Salpetersäure wird in der Dünnschichtchromatographie eingesetzt um Alkaloide und Amine zu detektieren. Das einzige bei der Carboxyl-PEG-Synthese anwesende Amin ist Triethylamin beziehungsweise sein Salz Triethylaminhydrochlorid. Um auszutesten, ob Salpetersäure geeignet ist, das tertiäre Amin und sein Salz sichtbar zu machen, wurden sowohl Triethylamin als auch Triethylaminhydrochlorid auf eine Cellulose-Platte aufgetragen, welche anschließend mit einer Salpetersäure-Sprühlösung (*siehe Abschnitt 4.2*) behandelt wurde. Es konnte jedoch selbst nach längerem Erhitzen der Platte keinerlei Fluoreszenz unter Betrachtung im UV-Licht beobachtet werden. Weder Triethylamin noch sein Salz Triethylaminhydrochlorid reagierten auf eine Behandlung mit Salpetersäure.

- Detektion von Aminen mittels Kobalt(II)-thiocyanat:
  Genauso wie Salpetersäure findet Kobalt(II)-thiocyanat in der Dünnschichtchromatographie zur Detektion von Alkaloiden und Aminen Anwendung (*siehe Abschnitt 4.2*). Da jedoch beobachtet wurde, dass PEG und seine Derivate auch positiv darauf reagieren, kann es zur Verfolgung des Triethylaminhydrochlorids nicht eingesetzt werden.

- Verfolgung von Triethylammoniumchlorid mittels IR-Spektroskopie:
  Anhand des Infrarotspektrums von Carboxyl-PEG scheint das Produkt keine Verunreinigungen mit Triethylaminhydrochlorid aufzuweisen (*siehe auch Abschnitt 5.3.3.4 und Anhang*).

5.3.3.3 Nachweis der Carboxylfunktion

Mit Hilfe des in Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Tests sollte qualitativ nachgewiesen werden, ob in dem synthetisierten Produkt Carboxylfunktionen vorhanden sind. Die Durchführung erfolgte laut Angaben in Abschnitt 3.4.1. Getestet wurde eine Probe des synthetisierten Carboxyl-PEGs und als Vergleichsprobe mPEG (Aldrich). Die Vergleichsprobe zeigte bei dem Test keinerlei farbliche Veränderungen, wogegen Carboxyl-PEG nach Zugabe der $FeCl_3$-Lösung eine braunrote Färbung entwickelte.
Somit ist das Testergebnis für Carboxyl-PEG als positiv zu bewerten.

5.3.3.4 Infrarot-Spektroskopie

Folgende Spektren (*siehe auch Anhang*) wurden aufgenommen:

Vergleichssubstanzen:

- mPEG (Polyethylenglykolmethylether, M ~ 2000, Aldrich):
  IR (KBr): ν = 3433 cm^{-1} (br, O-H), 2888 (s, C-H), 1967 (w)
- Chloressigsäure (Fluka):
  IR (KBr): ν = 3059 cm^{-1} (br, O-H), 1733 (s, C=O)

- Triethylaminhydrochlorid (Fluka):
  IR (KBr): ν = 3437 cm^{-1} (br, N-H), 2976 (s, C-H), 2940 (s, C-H), 2675 (s, N-H), 2602 (s, N-H)
- mPEG-Essigsäure (Methoxypolyethylenglykol 5,000-essigsäure, Fluka):
  IR (KBr): ν = 3417 cm^{-1} (br, O-H), 2884 (s, C-H), 1967 (w), 1751 (w, C=O)

Proben:

- (Carboxyl-PEG)Triethylamin:
  IR (KBr): ν = 3447 cm^{-1} (br, O-H), 2886 (s, C-H), 1958 (w)
- Carboxyl-PEG:
  IR (KBr): ν = 3423 cm^{-1} (br, O-H), 2881 (s, C-H), 1967 (w), 1750 (m, C=O)

Die Analyse der spektralen Daten verläuft analog wie in Abschnitt 5.2.3.1 für Succinyl-PEG. Betrachtet man das Spektrum von Carboxyl-PEG so findet man drei der vier Banden auch im Spektrum von reinem mPEG wieder. Es handelt sich hierbei um die breite O-H-Bande, das Signal der C-H-Valenzschwingungen und eine schwache Bande bei 1967 cm^{-1}. Sämtliche dieser Signale treten auch im Vergleichsspektrum von mPEG-Essigsäure (Fluka) auf. Es gibt in diesem Spektrum genauso wie in dem von Carboxyl-PEG aber noch eine weiter Bande um 1750 cm^{-1}, welche der Carbonylgruppe der Säurefunktion zugeordnet werden kann. Diese Bande und ihre Lage ist der entscheidende Hinweis für die Anwesenheit von Carboxylgruppen in der untersuchten Probe. Besagte Bande kann man jedoch nur bei Carboxyl-PEG und mPEG-Essigsäure (Fluka), jedoch nicht bei dem Salz (Carboxyl-PEG)Triethylamin beobachten, dessen Spektrum jenem von reinem mPEG gleicht.

Bei Carbonsäuren ist das Signal der Carbonylgruppe üblicherweise eine ausgeprägte, starke Bande. Im Spektrum von Carboxyl-PEG ist diese Bande jedoch nur schwach bis mittelstark vorhanden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es sich bei Carboxyl-PEG um eine hochpolymere Substanz handelt, bei der auf ein Polyethylengerüst mit einem mittleren Molekulargewicht von 2000 Dalton nur eine einzige Carboxylfunktion pro Molekül kommt. Der PEG-Charakter des Moleküls überwiegt also stark den Säurecharakter, was durch das Infrarotspektrum widergespiegelt wird.

Die Spektren von Chloressigsäure und Triethylaminhydrochlorid wurden aufgenommen, um eventuelle Kontaminationen mit diesen Substanzen im Produkt feststellen zu können. Im Spektrum von Carboxyl-PEG sind jedoch keine Hinweise auf Verunreinigungen dieser Art sichtbar. Weder die stark ausgeprägten N-H-Valenz- und Oberschwingungen des Triethylammoniumchlorids bei 2675 und 2602 cm^{-1}, noch die charakteristisch breite und intensive O-H-Bande der Chloressigsäure bei 3059 cm^{-1} kommen im Carboxyl-PEG-Spektrum vor.
Zusätzlich entsprechen sich die Spektren des in dieser Arbeit synthetisierten Carboxyl-PEGs und der industriell gefertigten Vergleichssubstanz mPEG-Essigsäure (Fluka) fast gänzlich. Im Spektrum der Probe (Carboxyl-PEG) gibt es keine Banden, die im Vergleichspektrum nicht vorkommen. Soweit es also mit Hilfe der Infrarotspektroskopie beurteilt werden kann, ist das Produkt Carboxyl-PEG frei von Verunreinigungen.

5.3.3.5 Abschließende Bemerkungen und Ausblick

Die wichtigste analytische Methode zur Charakterisierung von Carboxyl-PEG war in dieser Arbeit die Infrarot-Spektroskopie. Mit ihrer Hilfe konnte bestätigt werden, dass das Ziel dieser Derivatisierung, nämlich das Einbauen von Carboxylfunktionen in ein PEG-Grundgerüst, erreicht werden konnte. Dieses Ergebnis wurde zusätzlich von einer Nachweismethode für Carbonsäuren untermauert. Allerdings können durch keine der beiden Methoden quantitative Daten erhalten werden, welche jedoch auch im Sinne einer weiteren Verwendung des Produktes durchaus von Interesse wären. Eine Quantifizierung der im Produkt enthaltenen Carboxylgruppen könnte anhand von Säure-Basen-Titration vorgenommen werden.
Größere Verunreinigungen mit dem Ausgangsprodukt Chloressigsäure und dem Nebenprodukt Triethylammoniumchlorid konnten ebenfalls mittels IR-Spektroskopie ausgeschlossen werden.

5.4 PLL-PEG

Sinn und Zweck für die Herstellung dieses Produktes war die Oberflächenmodifikation von PLGA-Nanosphären. Faraasen *et al.* zeigten bereits, dass Konjugate aus Poly-L-lysin und PEG aufgrund der positiv geladenen primären Aminogruppen des PLLs fest an die negativ geladenen Oberflächen von PLGA-Partikeln adsorbieren, während sich die PEG-Ketten nach außen hin orientieren. So erzeugte, bürstenartige PEG-Überzüge führen anhand einer Verringerung der Phagozytose durch Zellen des RES zu erhöhten Serumhalbwertszeiten [7]. Es sollte im Rahmen dieser Diplomarbeit ein Konjugat aus PEG 2000 und Poly(ε-carbobenzoxy-L-lysin) nach dem Vorbild einer Arbeit von Kim *et. al* hergestellt werden, in der PEG-COOH 3400 mit der einzigen freien α-Aminogruppe von ε-CBZ-PLL gekoppelt wurde. Nach dem Entfernen der CBZ-Schutzgruppen erhielt man ein kationisches Di-Blockcopolymer, welches über seinen positiv geladenen PLL-Teil an negativ geladene PLGA-Nanopartikel adsorbieren kann [8].

Synthesestrategie:

Carboxyl-PEG besitzt pro Molekül eine Carboxylfunktion, welche für die darauf folgende Kopplung mit ε-CBZ-PLL mittels einer Kombination von N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid und N-Hydroxysuccinimid aktiviert wird. Das bedeutet DCC reagiert mit Carboxyl-PEG zum entsprechenden *O*-Acylisoharnstoff-Intermediat, welches wiederum unter Abspaltung von Dicyclohexylharnstoff mit NHS einen reaktiven Ester bildet.

Poly-ε-carbobenzoxy-L-lysin hat pro Molekül eine einzige freie Aminogruppe in α-Position, sämtliche Aminogruppen der Lysin-Seitenketten sind mit CBZ-Schutzgruppen blockiert. Die primäre Aminogruppe kann nun den NHS-Ester am Kohlenstoff der Carbonylfunktion attackieren. NHS verlässt als Abgangsgruppe das Molekül, während zwischen PEG-Derivat und PLL eine kovalente Bindung entstehen kann.

Weiters müssen die CBZ-Schutzgruppen von den ε-Aminogruppen entfernt werden. Dies kann mittels katalytischer Transfer-Hydrierung mit 1,4-Cyclohexadien als Wasserstoffdonor geschehen [35].

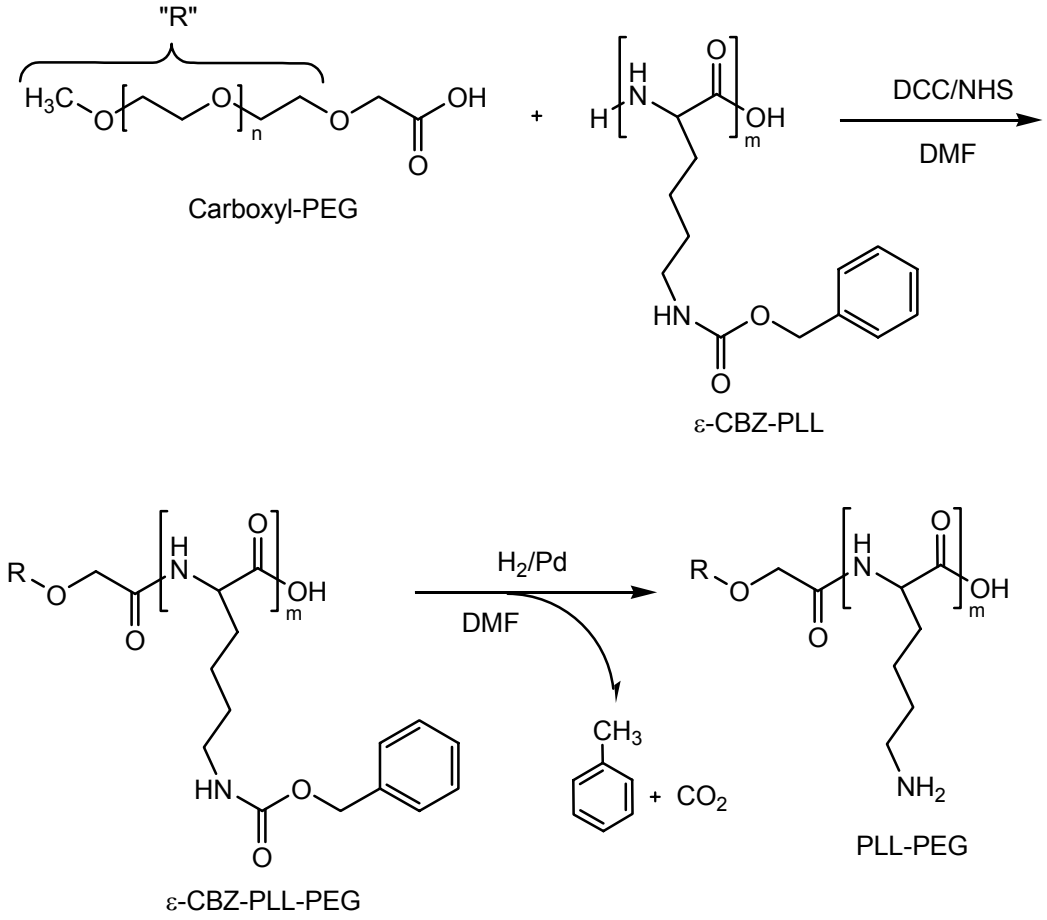


Abb. 24: Synthesestrategie für PLL-PEG

5.4.1 Durchführung der Synthese

Ansatz:

- Carboxyl-PEG: 4,14 g = 2,01 x 10^{-3} mol
- ε-CBZ-PLL: 1,0 g = 1,0 x 10^{-3} mol
- NHS: 692 mg = 6,01 x 10^{-3} mol
- DCC: 1,24 g = 6,0 x 10^{-3} mol

(1) Aktivierung:

4,14 g Carboxyl-PEG werden unter Erwärmen im Wasserbad auf ~ 50°C in ungefähr 8 mL DMF gelöst. Zu dieser Lösung gibt man 692 mg NHS und 1,24 g DCC hinzu und rührt vier Stunden bei 50°C. Danach wird der entstandene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und mit 2 mL DMF gewaschen.

(2) Kopplung:
Zum Filtrat fügt man 1 g ε-CBZ-PLL hinzu und lässt bei 50°C über Nacht rühren. Der abermals ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird wieder abgesaugt und aus dem Filtrat wird das Reaktionsprodukt mit 70 mL Diethylether und 30 mL n-Hexan ausgefällt. Die Mischung lässt man ungefähr eine Stunde bei 4°C stehen, danach dekantiert man das Lösungsmittel ab und wäscht den Niederschlag mit n-Hexan. Das restliche Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und man erhält eine gelb gefärbte, wachsartige Substanz.

(3) Reinigung:
Das erhaltene wachsartige Produkt wird mit 20 mL destilliertem Wasser versetzt und 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der nicht lösliche Anteil wird abgesaugt und im Vakuum-Exsikkator über Kieselgel getrocknet. Danach erhält man 1,12 g (37% der Theorie) eines gelben Pulvers.

(4) Entfernen der Schutzgruppen (Deblockierung):
Das Substrat (1,12 g) wird unter Rühren in 3 mL DMF gelöst und mit Hilfe eines Wasserbades auf 30°C temperiert. Zu der Lösung werden nacheinander 500 mg Palladium auf Aktivkohle (10% Pd) und 3,5 mL 1,4-Cyclohexadien zugegeben. Ein Trockenrohr gefüllt mit Calciumchlorid wird aufgesetzt, die Reaktion erfolgt über Nacht.
Um den Katalysator zu entfernen, wird die Reaktionsmischung zweimal je 30 Minuten mit 14 000 rpm zentrifugiert, dazwischen wird das Pellet mit 2 mL DMF gewaschen. Aus dem Überstand wird das Produkt mit 25 mL kaltem Diethylether gefällt. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit etwas Diethylether gewaschen und kurz trocken gesaugt. Der ockerfarbene Filterkuchen wird im Vakuum-Exsikkator getrocknet und man erhält 451 mg (72% der Theorie, bezogen auf 1,12 g Substrat) eines zusammengebackenen, braunen Pulvers. Das Produkt wird bei -20°C gelagert.

5.4.2 Entwicklung der Synthese

Um die beiden Polymere mPEG und PLL miteinander konjugieren zu können, wurde zuvor mit Hilfe von Chloressigsäure eine freie Carboxylfunktion in das mPEG

eingeführt (*siehe 5.3. Carboxyl-PEG*), welche in weiterer Folge für die Kopplung mit einer primären Aminogruppe des PLL herangezogen werden kann. Als Kopplungsreagenz wurde das Carbodiimid DCC in Kombination mit N-Hydroxysuccinimid eingesetzt, da dieses System für gewöhnlich eine hohe Kopplungseffizienz und daher gute Ausbeuten erzielt.

Als Medium für die Durchführung der Synthese wurde aus mehreren Gründen das organische Lösungsmittel Dimethylformamid gewählt:
Kim et al. synthetisierten ein Konjugat aus Polyethylenglykol und Poly-L-Lysin mittels DCC/NHS-Kopplung in DMSO [8]. Überschüssige Reagenzien wurden mittels Dialyse gegen destilliertes Wasser entfernt. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch eine Reinigung mittels Dialyse nicht in Erwägung gezogen, da das Konjugat aus mPEG und ε-CBZ-PLL mit einem mittleren Molekulargewicht von 3000 Dalton und überschüssiges mPEG und ε-CBZ-PLL mit mittleren Molekulargewichten von 2000 beziehungsweise 1000 Dalton eine zu geringe Größendifferenz für eine effiziente Dialyse aufweisen (*siehe auch 5.3.2*). Weiters sollte die Ausschlussgrenze der Dialysenmembran circa die Hälfte des zurückzuhaltenden Moleküls betragen, um Verluste zu minimieren. In diesem Fall müsste also eine Membran mit einem MWCO = 1500 Da gewählt werden. Davon würde jedoch schon eine bedeutende Menge an unkonjugiertem mPEG ebenfalls zurückgehalten werden. Als Alternative hierzu wird die Reaktion in einem organischen Lösungsmittel mit geringerer Polarität als DMSO durchgeführt und man kann somit auf Fällungen von mPEG durch Zugabe von apolaren Lösungsmitteln wie zum Beispiel Diethylether zurückgreifen (*siehe auch Abschnitt 5.1*).

Besonders leicht lässt sich mPEG mit n-Hexan aus einer Lösung in THF ausfällen, auch aus Dichlormethan und Chloroform ist eine Fällung mittels Hexan möglich. Da jedoch ε-CBZ-PLL in all diesen Lösungsmitteln unlöslich ist, muss auf DMF ausgewichen werden, welches allein sämtliche eingesetzten Reaktanden zu lösen vermag.

Carboxyl-PEG wurde bei der Reaktion im Überschuss eingesetzt, weswegen nach erfolgter Kopplungsreaktion unkonjugiertes, aktiviertes Carboxyl-PEG in der Reaktionslösung vorliegen muss. Da es seinerseits von primären Aminogruppen

angegriffen werden kann, wurde Hexylamin zugegeben, um alle aktivierten Carboxylgruppen ausreagieren zu lassen. Durch überschüssiges Hexylamin gelangt jedoch eine weitere unerwünschte Verunreinigung in der Reaktionsmischung. Außerdem soll das unreagierte, aktivierte Carboxyl-PEG ohnehin in einem späteren Schritt abgetrennt werden. Aus diesem Grund wurde das Ausreagieren mit Hexylamin letztendlich weggelassen.

Nach der Kopplungsreaktion lässt sich das Konjugat aus mPEG und ε-CBZ-PLL und das überschüssige mPEG mit einer Mischung aus Diethylether und n-Hexan aus DMF ausfällen, wobei unverbrauchtes DCC und NHS in Lösung bleiben.

Das so gewonnene Produktgemisch sollte anschließend mittels Fest-Flüssig-Extraktion (Laugung) in ungekoppeltes mPEG und mPEG-PLL-Konjugat aufgetrennt werden. Dafür musste ein Lösungsmittel gefunden werden, in dem eine der beiden Komponenten löslich, die andere jedoch unlöslich ist. Da sich mPEG im Gegensatz zu ε-CBZ-PLL hervorragend in Chloroform löst, wurde dieses Lösungsmittel als erstes für diesen Zweck getestet. Es kam jedoch zur vollständigen Auflösung des eingesetzten Produktes. Weitere Versuche wurden mit THF, Ethanol und Wasser durchgeführt. In THF war das Produkt ebenfalls zur Gänze löslich, in Ethanol blieb ein sehr geringer Rückstand zurück, in Wasser hingegen blieb ein bedeutender Anteil unlöslich.
Es wurde nun angenommen, dass sich unkonjugiertes mPEG in Wasser löst und Konjugate mit ε-CBZ-PLL nicht in Lösung gehen, da ε-CBZ-PLL gänzlich wasserunlöslich ist. Durch Abfiltrieren des Rückstandes würde man also lediglich jene Komponenten gewinnen, die ε-CBZ-PLL enthalten.

In weiterer Folge sollten die CBZ-Schutzgruppen von den Lysin-Seitenketten abgespalten werden. Dafür wurde die katalytische Transfer-Hydrierung mit 1,4-Cyclohexadien gewählt, da es sich hierbei um eine bequeme und zugleich effiziente Methode mit geringem apparativem Aufwand handelt [34].
Nach erfolgter Deblockierung musste der Katalysator (Palladium auf Aktivkohle) von der Reaktionsmischung abgetrennt werden. Dies ließ sich jedoch nicht durch Abfiltrieren mit handelsüblichen Filterpapieren erreichen, da selbst die feinporigsten Filterpapiere für die extrem kleinen Partikel der Aktivkohle durchlässig waren. Es

zeigte sich jedoch, dass sich der Katalysator durch längeres Zentrifugieren (circa eine Stunde) mit 14 000 Umdrehungen pro Minute vollständig entfernen lässt.

5.4.3 Analytische Charakterisierung und Diskussion

5.4.3.1 UV-VIS-Spektroskopie

Es wurden von den Ausgangsverbindungen der Synthese Carboxyl-PEG beziehungsweise mPEG und ε-CBZ-PLL Spektren in DMF bei einem Wellenlängenbereich von 1100-200 nm aufgenommen (Konzentrationsbereich der Lösungen: ~ 10^{-3} mol/L). Weiters wurden im Zuge der Syntheseversuche Proben von sämtlichen Zwischenprodukten genommen, von denen ebenfalls Spektren angefertigt wurden (*siehe Anhang*). Diese Proben werden von nun an wie folgt bezeichnet:

Proben-Bezeichnung	***Zeitpunkt der Probenahme im Syntheseverlauf***	***vermutlich enthaltene Substanzen***
A	nach erfolgter Kopplung (getrocknet)	Carboxyl-PEG*/ ε-CBZ-PLL-PEG
B	nach Abtrennung des Carboxyl-PEG* durch Laugung in Wasser (getrocknet)	ε-CBZ-PLL-PEG
b’	Im Filtrat der Laugung enthaltene Substanz (getrocknet)	Carboxyl-PEG*
C	nach Entfernen der Schutzgruppen (getrocknetes Endprodukt)	PLL-PEG
c’	Substanz im Filtrat nach Deblockierung	?

Tabelle 2: während der PLL-PEG-Synthese genommene Proben; Carboxyl-PEG* … „aktiviertes“ Carboxyl-PEG

Die *Proben A, B* und *C* sind die aufgrund des Synthese-Ablaufes gewonnenen Zwischen- beziehungsweise Endprodukte. Die zusätzlichen Proben b’ und c’ sind Abfallprodukte, die im Laufe der Prozedur abgetrennt, jedoch hier zu Untersuchungszwecken rückgewonnen wurden.

Auf folgende Weise wurde *Probe b’* gewonnen: Nach erfolgter Kopplung zwischen Carboxyl-PEG und CBZ-PLL wurde das Zwischenprodukt A vom aktivierten Carboxyl-PEG durch Fest-Flüssig-Extraktion mit Wasser gereinigt. Der feste Rückstand wurde abgesaugt und weiterverarbeitet, das dabei erhaltene Filtrat wurde

lyophilisiert, wodurch man eine weiße, schaumartige Substanz erhielt, die weiters unter der Bezeichnung Probe b' untersucht wurde.
Die Gewinnung von *Probe c'* erfolgte nach dem Entfernen der Schutzgruppen durch katalytische Transferhydrierung. Das Endprodukt wurde mittels Diethylether gefällt und abgesaugt. Im dabei erhaltenen Filtrat fiel nach einigen Tagen Aufbewahrung bei 4°C ein weißer, pulvriger Feststoff aus, welcher ebenso abgesaugt und getrocknet wurde. Bezüglich der Zusammensetzung von Probe c' gab es zu diesem Zeitpunkt keine Vermutung.

Für mPEG und Carboxyl-PEG konnten trotz des Heranziehens konzentrierter Lösungen für die Messung keine ausgeprägten Absorptionen im UV-VIS-Bereich festgestellt werden. ε-CBZ-PLL hingegen weist eine scharfe, einzelne Bande bei 266,5 nm in seinem Spektrum auf (*siehe Anhang*). Findet sich dieselbe Bande in den Spektren der während der Synthese genommenen Proben wieder, so würde dies auf die Anwesenheit von ε-CBZ-PLL in derjenigen Probe hindeuten.

In allen Spektren der Zwischenprodukte A und B, sowie des Endproduktes C wurde die Absorptionsbande des ε-CBZ-PLLs gefunden, bei Probe B und C in sehr hoher Intensität bei Probe A deutlich schwächer. Probe c' weist bei 266,5 ebenfalls eine schwache Absorptionsbande auf, bei Probe b' ist besagte Bande nur äußerst schwach zu erkennen (*siehe auch Tabelle 3*). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass jene Proben, welche in ihren Spektren eine intensive Bande bei 266,5 nm aufweisen, zu einem hohen Anteil aus CBZ-PLL bestehen. Andererseits darf eine solche Aussage nur mit Vorsicht gemacht werden, da es sich hierbei um keine quantitative Analyse handelt. Vielmehr kann lediglich die Anwesenheit von ε-CBZ-PLL in den untersuchten Produkten bestätigt werden. Das somit erhaltene Ergebnis widerspricht nicht den in *Tabelle 2* aufgestellten Vermutungen bezüglich Zusammensetzung der einzelnen Proben. Denn die schwach vorhandene CBZ-PLL-Bande bei Produkt b' (Carboxyl-PEG*) erklärt sich dadurch, dass bei der Laugung ein geringer Anteil an CBZ-PLL-hältigem Produkt mit in Lösung gegangen ist, was nicht weiter verwunderlich ist. Über die Zusammensetzung von Probe c' lässt sich aussagen, dass ε-CBZ-PLL zumindest in Spuren enthalten ist.

5.4.3.2 IR-Spektroskopie

Von den schon mittels UV-Spektroskopie untersuchten Proben wurden folgende Infrarot-Spektren (*siehe Anhang*) aufgenommen:

Vergleichsspektren:

- ε-CBZ-PLL (Sigma):
  IR (KBr): ν = 3297 cm^{-1} (s, O-H), 3063 (w), 2936 (m, C-H), 1688 (s, C=O), 1628 (m), 1536 (s)
- mPEG 2000 (Polyethylenglykolmethylether, Aldrich):
  IR (KBr): ν = 3433 cm^{-1} (br, O-H), 2888 (s, C-H), 1967 (w)
- Dicyclohexylharnstoff:
  IR (KBr): ν = 3324 cm^{-1} (s, N-H), 2930 (s, C-H), 2848 (s, C-H), 1620 (s, C=O), 1576 (s, N-H)

Proben:

- **A**: IR (KBr): ν = 3284 cm^{-1} (s, O-H), 2887 (s, C-H), 1958 (w), 1717 (s, C=O), 1623 (m), 1538 (m)
- **B**: IR (KBr): ν = 3289 cm^{-1} (s, O-H), 3061 (w), 2936 (s, C-H), 1698 (s, C=O), 1625 (m), 1537(s)
- **C**: IR (KBr): ν = 3292 cm-1 (s, O-H), 3063 (w), 2936 (s, C-H), 1699 (s, C=O), 1652 (m), 1538 (s)
- **c'**: IR (KBr): ν = 3289 cm-1 (s, O-H), 3064 (w), 2886 (s, C-H), 1966 (w), 1699 (m, C=O), 1626 (m), 1538 (m)
- **b'**: IR (KBr): ν = 3428 cm^{-1} (br, O-H), 2888 (s, C-H), 1958 (w), 1717 (s, C=O)

Proben A und c':

Durch Untersuchung des Spektrums von Probe A und der Vergleichsspektren von mPEG und CBZ-PLL wird deutlich, dass in besagter Probe sowohl CBZ-PLL als auch eine mPEG-Komponente vorhanden ist. Ob diese in gekoppelter oder freier Form als aktiviertes Carboxyl-PEG vorliegt, kann hier jedoch nicht bestimmt werden.

Das Zustandekommen dieses Befundes erklärt sich dadurch, dass in dem der Probe A zugehörigen Spektrum sämtliche charakteristischen Peaks des CBZ-PLL-Spektrums gleichermaßen vorkommen. Somit muss CBZ-PLL in der Probe vorhanden sein.

Da sich die Banden der O-H- und C-H-Valenzschwingungen von mPEG, sowie die Carbonylbande von Carboxyl-PEG mit jenen von CBZ-PLL überlagern, können diese nicht für die Bestimmung von mPEG oder Carboxyl-PEG neben CBZ-PLL herangezogen werden. Es gibt jedoch einen charakteristischen Peak, der nur im mPEG-Spektrum jedoch nicht in jenem von CBZ-PLL vorkommt. Es handelt sich hierbei um die schwache Bande im Bereich zwischen 1958-1967 cm^{-1}, die bei sämtlichen PEG-Derivaten vorhanden ist. Da jener mPEG-typische Peak im Spektrum von Probe A deutlich zu erkennen ist, kann auf das Vorhandensein von mPEG in dieser Probe geschlossen werden. Abgesehen davon können auch im Fingerprint-Bereich Banden ausgemacht werden, die charakteristisch für mPEG sind (*vgl. Spektren im Anhang*). Auf diese Art kann jedoch nur auf die Anwesenheit von mPEG in der Probe geschlossen werden, ob dieses mPEG in Form eines NHS-Esters, als freies Carboxyl-PEG oder gekoppelt vorliegt, kann nicht ausgesagt werden.

Zum gleichen Ergebnis wie für Probe A gelangt man bei Probe c', das heißt sowohl CBZ-PLL und PEG sind in dieser Probe vorhanden. Anhand des UV-VIS-Spektrums konnte bereits festgestellt werden, dass in der Probe CBZ-PLL enthalten ist. Der IR-Befund kann dieses Ergebnis bestätigen und zusätzlich dazu auf vorhandenes mPEG hindeuten

Proben B und C:

Die IR-Spektren der Proben B und C weisen ausnahmslos alle Banden des CBZ-PLL-Spektrums auf, sie sind sozusagen mit dem Vergleichsspektrum deckungsgleich. Es können keinerlei Hinweise auf mPEG, weder der typische Peak um 1958-1967 cm^{-1} noch charakteristische Banden im Fingerprint-Bereich, gefunden werden. Dieses Ergebnis widerspricht also erstmals den angestellten Vermutungen bezüglich der Probenzusammensetzungen. Dem Versuchsablauf zur Folge sollte Probe B dem Konjugat aus ε-CBZ-PLL und Carboxyl-PEG entsprechen und Probe C, als Endprodukt der Synthese, sollte nur noch PLL-PEG enthalten. Da beide Proben laut dieses IR-Befundes jedoch keinerlei mPEG enthalten, muss angenommen werden, dass der Versuch, ein PLL-PEG-Konjugat zu synthetisieren, nicht erfolgreich war.

Probe b':

Bei dieser Substanz handelt es sich vermutlich um überschüssiges aktiviertes Carboxyl-PEG, welches nach der Kopplung vom Produkt abgetrennt wurde. Das zugehörige IR-Spektrum bestätigt durchaus diese Annahme. Alle Banden des mPEG-Spektrums sind deutlich zu erkennen und zusätzlich erhält man eine im Vergleich zu Carboxyl-PEG stärker ausgeprägte Carbonylbande, was auf die zwei weiteren Carbonylgruppen von NHS zurückgeführt werden kann. Da diese beiden Gruppen jedoch Ketonfunktionen sind, erscheinen sie im Vergleich zu Carbonylbanden einer Säure bei etwas niedrigeren Wellenzahlen.

5.4.3.3 Nachweis der PEG-Struktur

Anhand des in Abschnitt 4.4.3. erläuterten Tests für Ethylenderivate sollte bestimmt werden in welchen, der bereits mittels UV-VIS- und IR-Spektroskopie untersuchten Proben, die Ethylenstruktur von Polyethylenglykol beziehungsweise seiner entsprechenden Derivate nachgewiesen werden kann.

CBZ-PLL wurde wie erwartet negativ getestet, genauso wie eine Blindprobe, die nur Zinkchlorid enthielt. Die Überprüfung von mPEG (Aldrich) ergab eine intensiv blaue Färbung und somit ein positives Testresultat. Die Ergebnisse für die Proben A bis c' sind in *Tabelle 3* angeführt. Positiv wurden die Proben A, b' und c' getestet, jedoch die Proben B und C erhielten ein negatives Ergebnis, was wiederum exakt dem IR-Befund entspricht. Das ungereinigte erste Zwischenprodukt der Synthese, Probe A, und das während der nachfolgenden Reinigung abgetrennte Carboxyl-PEG*, Probe b', enthalten somit laut Testresultat die PEG-Struktur, genauso wie die Probe c'. In Probe B und dem Endprodukt C kann, wie schon bei der IR-Spektroskopie, kein PEG nachgewiesen werden.

Probe	*vermutlich enthaltene Substanzen*	*Bande bei 266,5 nm (UV-Bereich)*	*laut IR-Befund vorhandene Substanzen*	*-CH_2-CH_2-Test*
A	Carboxyl-PEG*/ ε-CBZ-PLL-PEG	w	CBZ-PLL + MPEG	positiv
B	ε-CBZ-PLL-PEG	s	CBZ-PLL	negativ
b'	Carboxyl-PEG*	w	Carboxyl-PEG*	positiv
C	PLL-PEG	s	CBZ-PLL	negativ
c'	?	w	CBZ-PLL + MPEG	positiv

Tabelle 3: Analytische Charakterisierung der im Zuge der PLL-PEG-Synthese entstandenen Produkte; w…weak; s…strong

5.4.3.4 Nachweis von Aminen mittels Ninhydrin

Mit Hilfe dieser Untersuchung sollte qualitativ festgestellt werden, ob nach der katalytischen Transferhydrierung wesentlich mehr freie Aminogruppen als zuvor im Produkt vorhanden sind. Da ε-CBZ-PLL pro Molekül bereits eine freie Aminogruppe in α-Position aufweist, wurde eine schwache Reaktion mit Ninhydrin erwartet. Jedoch wurde angenommen, dass eine deutliche Vermehrung der primären Aminogruppen nach der Entfernung der Schutzgruppen trotzdem feststellbar ist.

Es wurden also Lösungen von mPEG, CBZ-PLL und PLL-HBr (Aldrich), dessen Aminogruppen nicht blockiert sind, und Lösungen der Proben A, B, C, b' und c' auf eine Kieselgelplatte aufgetragen, mit Ninhydrin-Lösung besprüht und anschließend erhitzt.

mPEG zeigte keinerlei Farbveränderung nach der Behandlung, wogegen PLL-HBr einen tief violett gefärbten Fleck hervorrief. CBZ-PLL ergab wie erwartet eine blass-violette Färbung, die Proben B und c' reagierten auf dieselbe Weise. Für Probe C wurde ein eindeutig positives Ergebnis erhalten, die Färbung war jedoch weniger intensiv als bei PLL-HBr. Eine interessante Reaktion wurde bei Probe b' beobachtet, welche sich nach Behandlung mit Ninhydrin intensiv blau färbte. In dieser Probe können jedoch keine primären Aminogruppen enthalten sein, möglicherweise kam es zu einer Reaktion des Ninhydrins mit dem im NHS-Ester enthaltenen Stickstoff, was die blaue Farbe hervorrief.

Anhand dieser Ergebnisse kann nun lediglich ausgesagt werden, dass nach der katalytischen Transferhydrierung primäre Aminogruppen vorhanden sind, vermutlich auch in größerer Menge als zuvor. Um jedoch eine eindeutige Aussage machen zu können, müsste eine quantitative Analyse vorgenommen werden. Eine Quantifizierung der Aminogruppen mittels TNBS-Test, wie sie für das Produkt Amino-PEG durchgeführt wurde, konnte aber in diesem Fall nicht angewendet werden, da die meisten Proben nicht wasserlöslich waren.

5.4.3.5 Fluoreszenzlöschung durch die CBZ-Gruppen

Eine Eigenschaft von ε-CBZ-PLL ist, dass es, auf eine F_{254} Kieselgelplatte aufgetragen, Fluoreszenzlöschung bewirkt. Es kann somit im UV-Licht als dunkler Fleck auf der grünlich leuchtenden Platte erkannt werden. Da PLL-HBr diese Eigenschaft nicht aufweist, ist sie vermutlich auf die CBZ-Gruppen zurückzuführen. Weil auch mPEG keine Fluoreszenzlöschung hervorruft, wurde angenommen, dass während der PLL-PEG-Synthese genommene Proben, welche diese Eigenschaft besitzen, CBZ-Gruppen beinhalten.
Getestet wurden die Probe B, deren Aminogruppen auf jeden Fall noch geschützt vorliegen, und das Endprodukt C nach durchgeführter katalytischer Transferhydrierung. Probe C bewirkte gleichermaßen wie Probe B das Quenchen (Auslöschen) von Fluoreszenzlicht, was wiederum bedeutet, dass im Endprodukt auf jeden Fall noch CBZ-Schutzgruppen vorhanden sind. Mittels katalytischer Transferhydrierung konnten demnach die Schutzgruppen nicht quantitativ entfernt werden.

5.4.3.6 Abschließende Bemerkungen und Ausblick

Betrachtet man die Ergebnisse der einzelnen analytischen Untersuchungen in kombinierter Weise, so gelangt man zu folgenden Schlussfolgerungen:

- UV-VIS-, IR-Spektroskopie und der Test zum Nachweis von Ethylenderivaten zeigen, dass in dem Endprodukt der PLL-PEG-Synthese sehr wohl CBZ-PLL

aber kein mPEG vorhanden ist. Da auch schon in dem gereinigten Zwischenprodukt nach der Kopplung (Probe B) kein mPEG und in dem vom Produkt abgetrennten Carboxyl-PEG* (Probe b') kein CBZ-PLL vorhanden war, muss vermutet werden, dass die Kopplung zwischen CBZ-PLL und Carboxyl-PEG nicht erfolgreich war. Dies liegt möglicherweise daran, dass pro CBZ-PLL (M ~ 1000 Da) nur eine einzige Aminogruppe für die Kopplung zur Verfügung steht und diese eventuell aus sterischen Gründen für das Carboxyl-PEG schlecht zugänglich ist. Um dieses Problem zu vermeiden könnten PLL-PEG-Konjugate auch in Anlehnung an eine Arbeit von Kenausis et. al synthetisiert werden. Hierbei wird ohne Schutzgruppen gearbeitet, wodurch sämtliche Aminogruppen des PLLs für die Kopplung zur Verfügung stehen. Durch das Einsetzen eines Unterschusses an PEG wird sichergestellt, dass noch genügend freie Aminogruppen vorhanden sind, die somit für eine positive Ladung des Propfcopolymers sorgen können [43].

- In Probe c', welche nach der Entfernung der Schutzgruppen gewonnen wurde, konnte überraschenderweise eine PEG-Struktur nachgewiesen werden. Es gilt noch zu klären, auf welchem Wege das Produkt in dieser Probe entstanden ist und ob es sich hierbei um das gewünschte PLL-PEG-Konjugat handelt. Fraglich ist vor allem, wie eine mPEG-Komponente in diese Probe gelangen konnte, da zu einem früheren Zeitpunkt der Synthese bereits kein mPEG im Zwischenprodukt (Probe B) mehr nachgewiesen werden konnte.

- Die beobachtete fluoreszenz-quenchende Eigenschaft des Endproduktes C ist höchstwahrscheinlich auf noch vorhandene CBZ-Gruppen zurückzuführen, da weder reines PLL noch mPEG diese Eigenschaft aufweisen, CBZ-PLL hingegen schon. Das Entfernen der CBZ-Gruppen mittels katalytischer Transferhydrierung ist demnach nicht vollständig geschehen.

5.5 Amino-PEG

Dieses PEG-Derivat wurde für die kovalente Oberflächenmodifizierung von PLGA-Nanosphären synthetisiert. Es kann über seine primäre Aminogruppe an carbodiimid-aktivierte Carboxylgruppen des Polylactid-*co*-glycolids gebunden werden und somit zur PEGylierung von PLGA-Nanopartikeln herangezogen werden.

Synthesestrategie:

Ein Möglicher Syntheseweg für die Erzeugung des Amino-Derivates von mPEG verläuft über das in Abschnitt 5.3 hergestellte Carboxyl-PEG. Kurz wiedergegeben, reagiert die Hydroxylgruppe des mPEGs mit Chloressigsäure, wodurch man eine endständige Carboxylfunktion erhält. Diese Carboxylgruppe kann wiederum durch DCC und NHS aktiviert werden und in weiterer Folge mit einer primären Aminogruppe von Ethylendiamin reagieren. Da Ethylendiamin zwei endständige Aminogruppen besitzt, bleibt eine von beiden bei der Kopplung frei und man hat somit eine primäre Aminogruppe in das mPEG-Molekül eingeführt (*siehe Abb. 25*).

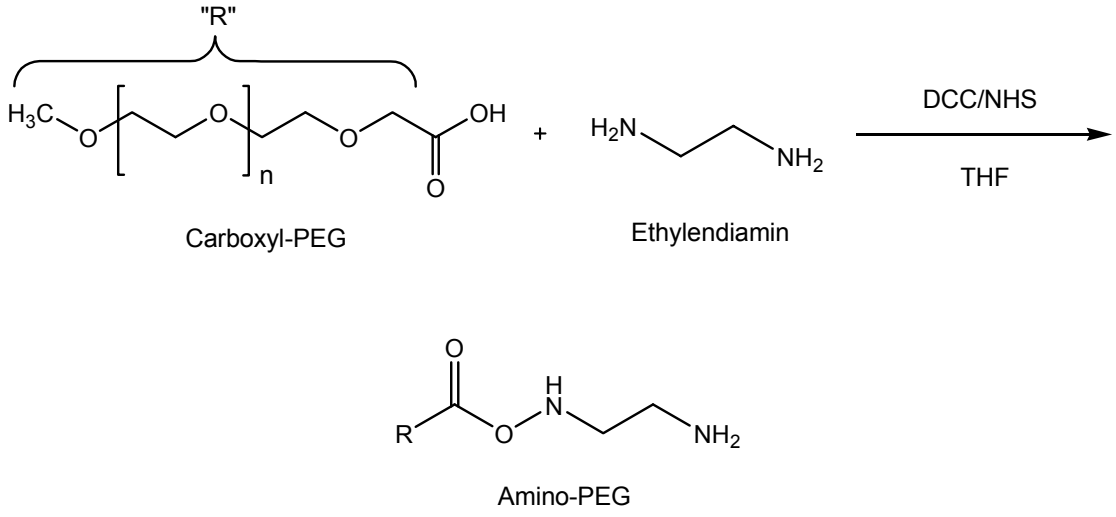


Abb. 25: Synthesestrategie für Amino-PEG

5.5.1 Durchführung der Synthese

Ansatz:

- Carboxyl-PEG: 505 mg = 2,45 x 10^{-4} mol
- DCC: 152 mg = 7,37 x 10^{-4} mol
- NHS: 85 mg= 1,39 x 10^{-4} mol
- Ethylendiamin: 163 µL = 24,33 x 10^{-4} mol

(1) Aktivierung:
505 mg Carboxyl-PEG werden in 4 mL THF gelöst und mit 85 mg NHS und 152 mg DCC versetzt. Nachdem ein Calciumchloridrohr aufgesetzt wurde, rührt man vier Stunden bei 50°C im Wasserbad. Der dabei ausfallende Dicyclohexylharnstoff wird abgesaugt.

(2) Kopplung:
In einem separaten Rundkolben, der ebenfalls in ein 50°C-warmes Wasserbad eintaucht, werden 163 µL Ethylendiamin und 837 µL THF vorgelegt und gerührt. Dazu tropft man langsam die Lösung mit dem zuvor aktivierten Carboxyl-PEG. Man lässt nun über Nacht rühren.

(3) Reinigung:
Das Produkt wird mit 10 mL kaltem n-Hexan gefällt. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit n-Hexan gewaschen und trocken gesaugt. Nach Trocknen im Vakuum-Exsikkator erhält man 282 mg (54% der Theorie) eines weißen Pulvers.

5.5.2 Entwicklung der Synthese

Ethylendiamin ist nicht die einzige Verbindung, welche für die Modifizierung von Carboxylfunktionen verwendet werden kann. Es gibt eine Reihe weiterer Diamine, die für diesen Zweck in Frage kommen, wie zum Beispiel 1,3-Diaminopropan oder 1,6-Diaminohexan. Dennoch ist Ethylendiamin die populärste Wahl, da seine kurze Kettenlänge für minimale sterische Effekte und hydrophobe Wechselwirkungen sorgt und somit die Eigenschaften des Substratmoleküls am wenigsten verändert.

Als konjugationsvermittelnde Reagenzien kommen abermals DCC und NHS aus den schon in Abschnitt 5.4.2 erwähnten Gründen zum Einsatz.

Tetrahydrofuran als Reaktionsmedium hat sich schon bei der Synthese von Carboxyl-PEG bewährt, da es eine rasche und annähernd quantitative Fällung des entsprechenden PEG-Derivates durch Zugabe von n-Hexan erlaubt. Außerdem sind alle verwendeten Reagenzien gut in THF löslich.

Um zu gewährleisten, dass nur jeweils eine Aminogruppe des Ethylendiamins mit einer Carboxylgruppe koppelt, muss ein signifikanter Überschuss an Ethylendiamin gegenüber Carboxyl-PEG eingesetzt werden. Andernfalls würde auch die zweite Aminogruppe mit einem weiteren Carboxyl-PEG reagieren und es würde zu Quervernetzungen kommen. Bezüglich dieses Gesichtspunktes wurden mehrere Syntheseversuche mit verschiedenen Mengen an Ethylendiamin durchgeführt:

I) Zu Beginn wurde mit einem dreifachen molaren Überschuss an Ethylendiamin gearbeitet, welcher nach der Aktivierung direkt zur Reaktionsmischung pipettiert wurde. Unmittelbar nach der Zugabe kam es zu massiver Niederschlagsbildung, was als Zeichen für das Auftreten von Quervernetzungen angesehen werden kann und in hohem Masse unerwünscht ist. Dieser Syntheseweg wurde deshalb nicht weiterverfolgt.

II) Als nächstes wurde ein 100-facher Überschuss eingesetzt, welcher, in etwas THF gelöst, in einem Rundkolben vorgelegt wurde. Zu dieser Lösung wurde dann die Reaktionsmischung mit dem aktivierten Carboxyl-PEG zugetropft. Bei diesem Versuch trat kein Niederschlag auf, allerdings bewirkte die Zugabe einer solch großen Menge an Ethylendiamin, dass die Reaktionslösung nicht mehr mit n-Hexan mischbar war. Die Fällung des Produktes konnte auch nicht mit Diethylether durchgeführt werden, da dieser ebenfalls mit der Lösung nicht mischbar war. Demzufolge musste das Ethylendiamin am Rotationsverdampfer entfernt werden. Hierbei entstand ein Rückstand, welcher sich aus einer weißen pulvrigen Substanz und einer braunen Paste, vermutlich in der Hitze entstandene Reaktionsprodukte des Ethylendiamins,

zusammensetzte. Der Rückstand wurde mit THF versetzt, wobei sich das weiße Pulver vollständig löste, wogegen die braune Substanz größtenteils unlöslich blieb. Die Lösung wurde vom Rückstand abdekantiert, erst dann konnte eine Fällung mit Hexan durchgeführt werden.

III) Letztendlich wurde auch ein Versuch mit einem zehnfachen Überschuss an Ethylendiamin durchgeführt. Hierbei kam es zwar auch zu einer schwachen Niederschlagsbildung, die Reaktionslösung konnte jedoch leicht von diesem abdekantiert werden. Eine Fällung des Reaktionsproduktes mit Hexan konnte ohne jegliche Phasentrennung erfolgreich durchgeführt werden, wobei man ein weißes, pulvriges Produkt erhielt.

Weiters wurde während dieser Versuche auch eine Auswirkung der Erhöhung der DCC- und NHS-Menge auf die Produktausbeute untersucht. Statt der zuvor verwendeten drei Moläquivalente wurden nun je fünf Moläquivalente DCC und NHS eingesetzt. Es konnte jedoch keine Erhöhung der Ausbeute beobachtet werden.

5.5.3 Analytische Charakterisierung und Diskussion

Untersucht wurden drei verschiedene Chargen Amino-PEG, die laut zuvor in Abschnitt 5.5.1 angegebener Synthesevorschrift, jedoch mit folgenden Variationen hergestellt wurden:

- Charge I: dreifacher molarer Überschuss an Ethylendiamin bezüglich Carboxyl-PEG; direkte Zugabe von Ethylendiamin zur Reaktionsmischung

- Charge II: 100-facher molarer Überschuss an Ethylendiamin bezüglich Carboxyl-PEG

- Charge III: Herstellung laut angegebener Synthesevorschrift

5.5.3.1 UV-VIS-Spektroskopie

Es wurden UV-VIS-Spektren von allen drei Chargen in destilliertem Wasser (Konzentrationsbereich der Lösungen: ~ 10^{-3} mol/L) aufgenommen. Jedoch schon wie zuvor bei mPEG und Carboxyl-PEG konnte man auch hier in einem Wellenlängenbereich zwischen 1100 und 200 nm keine Absorptionsbanden beobachten.

5.5.3.2 IR-Spektroskopie

Infrarot-Spektren wurden von Amino-PEG der Chargen I und II aufgenommen, weiters wurde auch der Niederschlag, welcher nach der Zugabe von Ethylendiamin bei der Synthese von Charge III entstand, untersucht. Als Vergleichssubstanz wurde O-(2-Aminoethyl)-O'-methyl-polyethylenglykol 2'000 der Firma Fluka herangezogen, außerdem wurden sämtliche Spektren dem schon zuvor aufgenommenem Spektrum von Polyethylenglykolmethylether gegenübergestellt.

<u>Vergleichssubstanzen:</u>

- O-(2-Aminoethyl)-O'-methyl-polyethylenglykol 2'000 (Fluka):
  IR (KBr): ν = 3424 cm^{-1} (br), 2880 (s, C-H), 1966 (w)
- mPEG 2000 (Polyethylenglykolmethylether, Aldrich):
  IR (KBr): ν = 3433 cm^{-1} (br, O-H), 2888 (s, C-H), 1967 (w)

<u>Proben:</u>

- Amino-PEG, Charge I:
  IR (KBr): ν = 3325 cm^{-1} (m, N-H), 2884 (s, C-H), 1965 (w), 1627 (s, N-H), 1575 (s, N-H)
- Amino-PEG, Charge II:
  IR (KBr): ν = 3411 cm^{-1} (br), 2886 (s, C-H), 1966 (w)
- Niederschlag, Charge III:
  IR (KBr): ν = 3290 cm-1 (s, N-H), 3081 (m), 2934 (m, C-H), 1636 (s, N-H), 1559 (s, N-H)

<u>Amino-PEG, Charge II:</u>

Beim Vergleich der Spektren von mPEG und des Amino-PEG-Derivates der Firma Fluka wird sofort deutlich, dass sie sich gänzlich entsprechen. Das Amino-PEG-Derivat weist exakt die gleichen Schwingungsbanden wie mPEG auf, was darauf zurückzuführen ist, dass die hochpolymere Polyethylenglykol-Struktur das Spektrum gegenüber der Aminogruppe absolut dominiert. Die Schwingungen der im Vergleich geradezu winzigen Aminogruppe von 16 Dalton gehen neben jenen des 2000 Dalton „schweren" PEG-Gerüstes schlichtweg unter. Anders ausgedrückt, die Aminogruppen sind im Vergleich zur PEG-Struktur so stark im Unterschuss, dass sie mittels IR-Spektroskopie nicht mehr nachgewiesen werden können. Diese Aussage trifft genau auf das Spektrum des Amino-PEGs aus Charge II zu. Man findet in diesem Spektrum die gleichen drei Banden wie auch in den Spektren der beiden Vergleichssubstanzen, auch die hier nicht angeführten Banden im Fingerprint-Bereich können eindeutig mPEG zugeordnet werden.
Die Anwesenheit von Aminogruppen im Amino-PEG-Derivat kann folglich mittels Infrarot-Spektroskopie nicht nachgewiesen werden.

Amino-PEG, Charge I:

Im Spektrum dieser Substanz sind zusätzlich zu den im mPEG-Spektrum vorkommenden Banden noch drei weitere zu sehen. Es handelt sich dabei um die Signale der N-H-Valenzschwingungen bei 3325 cm^{-1} und der $N\text{-}H_2$-Deformationsschwingungen bei 1627 und 1575 cm^{-1}. Diese Schwingungen sind jedoch bei reinem Amino-PEG (Fluka) nicht zu sehen sind. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten besagter Schwingungsbanden wäre eine Verunreinigung von Charge I mit Ethylendiamin.

Niederschlag, Charge III:

In diesem Spektrum findet man die eben für Charge I beschriebenen Banden der N-H-Valenz- und $N\text{-}H_2$-Deformationsschwingungen besonders stark ausgeprägt wieder. Der Fingerprint-Bereich weist sämtliche charakteristischen Schwingungen von mPEG, jedoch in geringer Intensität, auf. Es wird also angenommen, dass in dem untersuchten Niederschlag mPEG neben größeren Mengen an Ethylendiamin vorliegt.

5.5.3.3 Nachweis von Aminen mittels Ninhydrin

Anhand dieses Tests sollte qualitativ das Vorhandensein von Aminogruppen in dem synthetisierten Produkt Amino-PEG nachgewiesen werden. Dazu wurden Lösungen von Amino-PEG aus den Chargen I, II und III, als Vergleichssubstanzen mPEG (Aldrich), O-(2-Aminoethyl)-O'-methyl-polyethylenglykol 2'000 (Fluka) und Ethylendiamin auf eine Kieselgelplatte aufgetragen und diese mit Ninhydrin-Lösung behandelt (*zur Vorgehensweise siehe Abschnitt 4.2*).
mPEG zeigte nach der Behandlung keinerlei Farbveränderungen, Ethylendiamin verfärbte sich hingegen gelb. Die Amino-PEG-Derivate aus allen drei Chargen und die entsprechende Vergleichssubstanz von Fluka wiesen alle die charakteristisch violette Farbe auf, welche typischerweise durch die Reaktion eines Amins mit Ninhydrin hervorgerufen wird. Es kann also durch diesen Test bestätigt werden, dass in allen drei Amino-PEG-Chargen Aminogruppen vorhanden sind.

5.5.3.4 TNBS-Test zur Quantifizierung von primären Aminen

Mit Hilfe dieses Tests wurde die quantitative Bestimmung der im Produkt Amino-PEG vorhandenen primären Aminogruppen durchgeführt. Die praktische Ausführung erfolgte laut Angaben in Abschnitt 3.5, die Mengen und Konzentrationen der einzelnen Reagenzlösungen wurden jedoch an die vorliegenden experimentellen Gegebenheiten angepasst.
Die Bestimmung wurde für Proben der Chargen I, II und III und die Vergleichssubstanz O-(2-Aminoethyl)-O'-methyl-polyethylenglykol 2'000 (Fluka) durchgeführt.

Folgende Reagenzien kamen zum Einsatz:

- 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Puffer pH 8,5: Der pH wurde mit 2 M Natronlauge eingestellt.
- 1%ige (w/v) TNBS-Lösung in 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Puffer pH 8,5: Die 5%ige Stammlösung (Sigma) wurde entsprechend mit Puffer verdünnt.
- 10%ige SDS-Lösung

- 1M HCl

Durchführung des Assay:

(1) Es werden Lösungen der einzelnen Probesubstanzen in 0,1 M Natriumhydrogencarbonat-Puffer pH 8,5 hergestellt.
(2) 25 µL TNBS-Lösung werden zu je 500 µL Probelösung gegeben und es wird gut durchmischt (Vortex).
(3) Man inkubiert zwei Stunden bei 37°C im Trockenschrank.
(4) 1250 µL 10%ige SDS-Lösung und 626 µL 1M HCl werden zu jedem Ansatz gegeben, es wird abermals durchmischt.
(5) Die Extinktion der Proben wird bei 343,5 nm gemessen.

Um eine quantitative Bestimmung der Aminogruppen durchführen zu können, wurde eine Kalibrierfunktion mit ε-Aminocapronsäure, einem kettenförmigen Molekül mit einer einzigen endständigen Aminogruppe, aufgestellt.

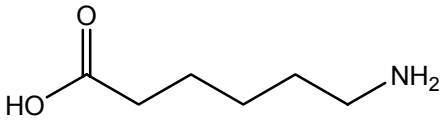


Abb. 26: 6-Aminocapronsäure

Dazu wurden fünf Lösungen von ε-Aminocapronsäure in einem Konzentrationsbereich zwischen 6,22 x 10^{-7} und 1,244 x 10^{-7} mol/mL in Natriumhydrogencarbonat-Puffer hergestellt. Da Aminocapronsäure pro Molekül genau eine Aminogruppe aufweist, sind die Konzentrationen dieser Lösungen mit der Aminogruppenkonzentration gleichzusetzen. Die Kalibrierstandards wurden gemeinsam mit sämtlichen Probelösungen laut Assay-Vorschrift behandelt. Von jeder Lösung wurden jeweils drei Testansätze untersucht. Weiters erstellte man einen Blank-Wert, indem an Stelle der Probelösung die entsprechende Menge an Puffer zum Testansatz zugegeben wurde. Da für die Messung ein Zweistrahl-Photometer zum Einsatz kam, wurde der Blank bei der Messung automatisch vom Messwert abgezogen.
Um das Absorptionsmaximum zu bestimmen, wurde ein UV-VIS-Spektrum eines Testansatzes aufgenommen (*siehe Anhang*). Anschließend wurden die

Extinktionswerte sämtlicher Lösungen im Absorptionsmaximum bei 343,5 nm gemessen.

Auswertung:

Kalibrier-standard	c [mol/mL]	Extinktion (343.5 nm)	Mittelwert	σ
1A	1,244E-07	0,323	0,326	0,005
1B		0,332		
1C		0,323		
2A	2,073E-07	0,493	0,502	0,010
2B		0,500		
2C		0,513		
3A	3,110E-07	0,724	0,722	0,004
3B		0,718		
3C		0,725		
4A	4,665E-07	0,970	0,958	0,010
4B		0,950		
4C		0,955		
5A	6,220E-07	1,206	1,199	0,019
5B		1,178		
5C		1,214		

Tabelle 4: Messwerte der Kalibrierstandards für den TNBS-Test

Um eine Kalibrierfunktion aufzustellen wurden die Konzentrationen der Kalibrierlösungen auf der Abszisse und die dazugehörigen Extinktionen (Mittelwerte aus jeweils drei Bestimmungen) als Ordinatenwerte aufgetragen. Die Funktionsgleichung wurde mittels linearer Regression erstellt.

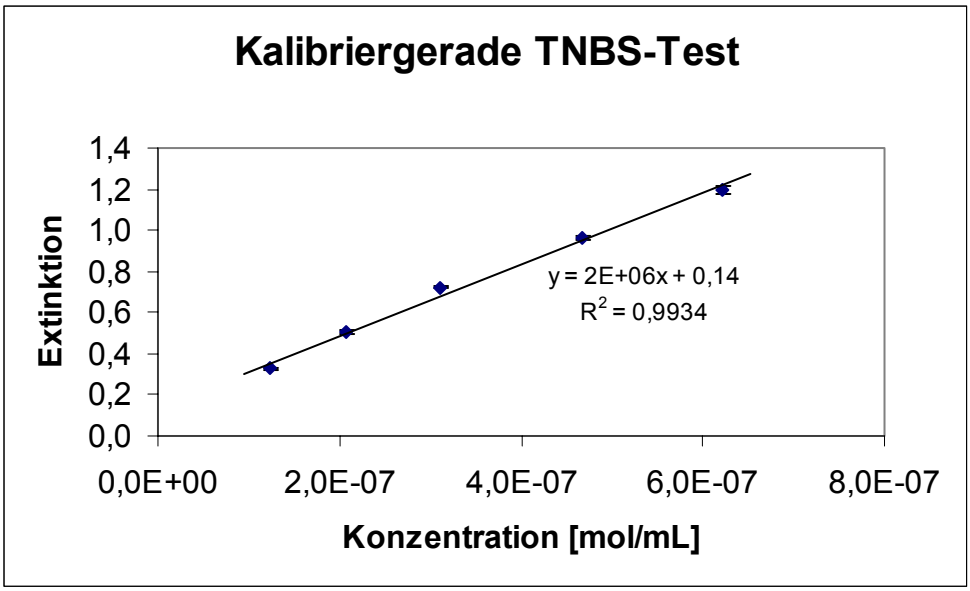


Abb. 27: Kalibrierfunktion für den TNBS-Test

Die gemessenen Extinktionswerte der einzelnen Probelösungen wurden sodann als y-Werte in die Geradengleichung eingesetzt, danach wurde nach dem x-Wert aufgelöst, welcher die zur entsprechenden Extinktion zugehörige Konzentration an Aminogruppen in mol/mL Probelösung angibt (*siehe Tabelle 5*).

Probe	Extinktion (343.5 nm)	c(-NH_2) [mol/mL]	c(Probe) [mg/mL]	c(Probe) [mol/mL] *	c(-NH_2) [mol/g Proben-substanz]	MITTELWERT c(-NH_2) [mol/g Proben-substanz]	σ
IA	0,475	1,675E-07	1,01	4,773E-07	1,658E-04	1,649E-04	3,570E-06
IB	0,465	1,625E-07			1,609E-04		
IC	0,479	1,695E-07			1,678E-04		
IIA	0,662	2,610E-07	2,02	9,546E-07	1,292E-04	1,306E-04	1,363E-06
IIB	0,673	2,665E-07			1,319E-04		
IIC	0,668	2,640E-07			1,307E-04		
IIIA	0,503	1,815E-07	1,02	4,820E-07	1,779E-04	1,703E-04	7,177E-06
IIIB	0,485	1,725E-07			1,691E-04		
IIIC	0,474	1,670E-07			1,637E-04		
V1	0,376	1,180E-07	0,52	2,457E-07	2,269E-04	2,257E-04	3,191E-06
V2	0,375	1,175E-07			2,282E-04		
V3	0,371	1,155E-07			2,221E-04		

Tabelle 5: Ergebnisse TNBS-Test: Messwerte der Probelösungen; Gehalt an NH_2-Gruppen in der Probensubstanz;
(*… Es handelt sich hier um einen ungefähren Zahlenwert, denn als Berechnungsgrundlage diente das mittlere Molekulargewicht des eingesetzten Polymers.)

In weiterer Folge wurde die so berechnete Konzentration an Aminogruppen auf die Konzentration an Probensubstanz (Amino-PEG) in der Probelösung bezogen. Die Angabe des Aminogruppengehaltes in der Probe erfolgt in [mol NH_2-Gruppen/ g Probensubstanz]. Diese Maßeinheit wurde gewählt, da eine Angabe in [mol NH_2-Gruppen/ mol mPEG] nur eine grobe wäre. Denn mPEG weist als polydisperses Polymer eine Molmassenverteilung auf, die es nur erlaubt mittlere Molekulargewichte anzugeben. Eine exakte Stoffmengenangabe für das Polymer ist demnach nicht möglich. Um irreführende Angaben zu vermeiden, wurde die in den Proben bestimmte Stoffmengenkonzentration an Aminogruppen auf die Massekonzentration an mPEG bezogen, wodurch sich als Maßeinheit [Stoffmenge/ Masseeinheit] ergibt.
Trotzdem kann anhand der erhaltenen Ergebnisse ausgesagt werden, dass bei der Vergleichssubstanz von Fluka im Schnitt auf zwei mPEG-Moleküle eine Aminogruppe kommt. Bei den drei synthetisierten Amino-PEG-Chargen besitzt in etwa jedes dritte mPEG-Molekül eine Aminogruppe.

5.5.3.5 Abschließende Bemerkungen und Ausblick

- Im Hinblick auf die Synthesevorschrift gilt es anzumerken, dass derzeit fraglich bleibt, ob das Vorgehen bei Charge III gegenüber demjenigen bei Charge II vorzuziehen ist. Beide Synthesewege scheinen ihre Vor- und Nachteile zu haben. Bei Charge II treten während der Synthese keinerlei Niederschläge auf, jedoch muss der große Überschuss an Ethylendiamin am Rotationsverdampfer entfernt werden. Die Hitzeeinwirkung bei diesem Vorgang könnte sich erstens negativ auf die Stabilität des Produktes auswirken und zweitens könnte sich ein Gemisch aus Reaktionsprodukten von Ethylendiamin bilden, welches wiederum in Spuren das Produkt verschmutzen würde. Es gilt aber noch zu klären, ob derartige Verschmutzungen durch eine Umfällung entfernt werden könnten.
  Bei Charge III fällt das Erhitzen am Rotationsverdampfer weg, allerdings gibt es während der Synthese eine schwache Niederschlagsbildung. Dieser Niederschlag konnte jedoch leicht durch Abdekantieren vom restlichen Produkt abgetrennt werden. Trotzdem stellt sich die Frage, ob in diesem

Produkt möglicherweise quervernetzte Moleküle vorhanden sind. Bevor also eindeutig für einen der beiden Synthesewege Standpunkt bezogen werden kann, müssen erst die aufgeworfenen Fragen abgeklärt werden.

- Bezüglich einer möglichen Verunreinigung der Produkte mit Ethylendiamin liefert die Infrarot-Spektroskopie wichtige Anhaltspunkte. Es scheint, als würde bei Charge I eine ebensolche Verunreinigung vorliegen, die Chargen II und III, scheinen jedoch laut IR-Befund rein zu sein. Dies kann so allerdings auch nicht ganz stimmen, da alleine die gelbliche Farbe von Charge II, im Gegensatz zu den beiden anderen schneeweißen Produkten, auf eine Verunreinigung hindeutet.

- Bei der Suche nach Untersuchungsmethoden, die eine Anwesenheit von Aminogruppen im synthetisierten Amino-PEG nachweisen könnten, wurde auf das schon zuvor verwendete Amin-Reagenz Ninhydrin zurückgegriffen. Hiermit gelang es, einen ersten Hinweis auf Aminogruppen in den Produkten zu erhalten. Da Ninhydrin aber nicht nur mit primären Aminen reagiert und auf diese Weise auch keine Quantifizierung erfolgen konnte, kam es zum Einsatz des selektiveren Reagens TNBS, das aufgrund seiner stöchiometrisch ablaufenden Farbreaktion mit primären Aminen auch eine Quantifizierung mittels UV-Spektroskopie erlaubt. Anhand der erhaltenen Testergebnisse konnten die im Zuge dieser Arbeit synthetisierten Aminoderivate mit einer entsprechenden Vergleichssubstanz der Firma Fluka verglichen werden. Dabei wurde deutlich, dass die im Labor synthetisierten Amino-PEG-Derivate, zwar eine signifikante Menge an Aminogruppen enthalten, jedoch nicht ganz die Qualität eines industriell gefertigten Produktes erreichen. Dieses Ergebnis entspricht jedoch durchaus den Erwartungen.

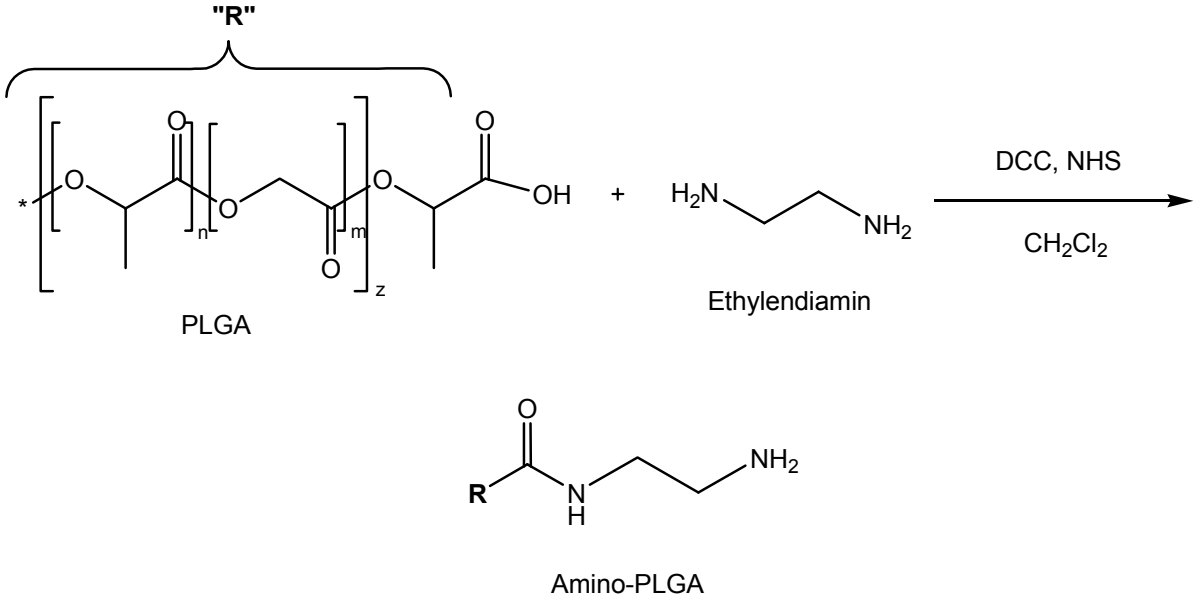
5.6 F-PLGA durch Kopplung mit Fluoresceinisothiocyanat

Fluorescein-PLGA kann für die Herstellung von fluoreszenzmarkierten PLGA-Partikeln verwendet werden, wodurch diese beispielsweise für Versuche mit Zellkulturen detektierbar und quantifizierbar werden (*siehe auch Abschnitt 3.5*). Eine kovalente Bindung des Fluoreszenzlabels an PLGA hat gegenüber in der Partikelmatrix eingebettetem Fluorescein den Vorteil, dass es nicht durch Ausdiffundieren verloren gehen kann. Die Kopplung von Fluoresceinisothiocyanat an PLGA ist nicht die einzige Methode kovalent fluoreszenzmarkiertes PLGA herzustellen, jedoch ist sie im Vergleich zur Verwendung von Fluorescein-Cadaverin wesentlich kostengünstiger.

Synthesestrategie:

PLGA, Poly(D,L-lactid-*co*-glycolid), weist als Copolymer aus Milch- und Glykolsäure zahlreiche Carboxylfunktionen auf. Diese Carboxylgruppen können, wie schon bei der Amino-PEG-Synthese beschrieben, durch Reaktion mit DCC und NHS aktiviert und anschließend mit Ethylendiamin modifiziert werden, sodass man endständige Aminogruppen erhält. Diese primären Aminogruppen können nun mit der Isothiocyanat-Funktion von Fluoresceinisothiocyanat unter Bildung einer kovalenten Thioharnstoffbindung reagieren.

NH_2-PLGA-Synthese:



Kopplung von NH_2-PLGA mit FITC:

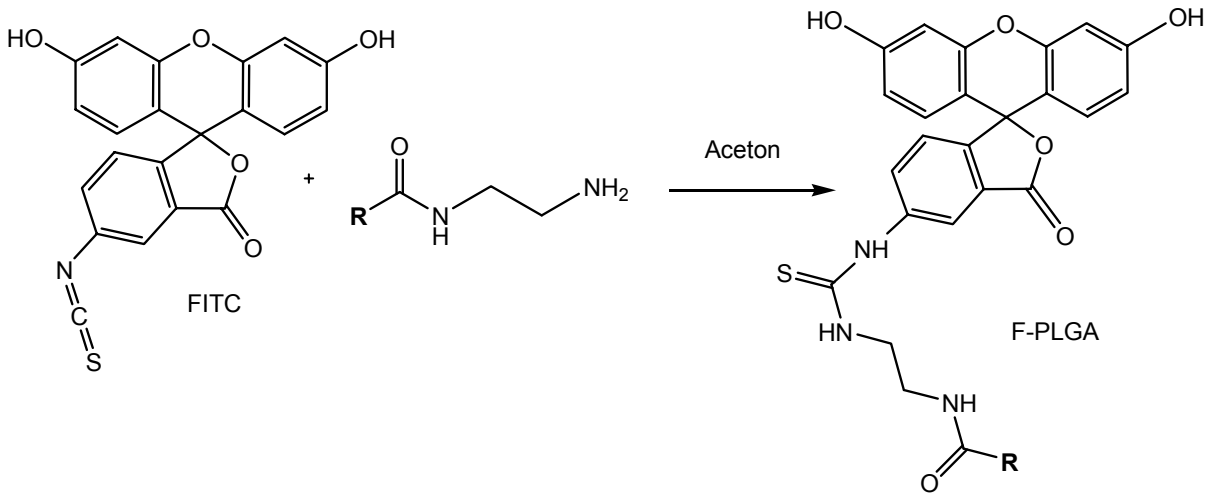


Abb. 28: Synthesestrategie für F-PLGA

5.6.1 Durchführung der Synthese

Ansatz:

- PLGA: 303 mg = 8,10 x 10^{-6} mol
- DCC: 4,97 mg = 2,41 x 10^{-5} mol
- NHS: 2,77 mg = 2,41 x 10^{-5} mol
- Ethylendiamin: 6 µL = 8,96 x 10^{-5} mol
- FITC: 15,5 mg = 3,98 x 10^{-5} mol

(1) Synthese von NH_2-PLGA:

303 mg PLGA werden in 10 mL absolutem Dichlormethan gelöst. 2,8 mg NHS und 5 mg DCC werden hinzugefügt, ein Calciumchloridrohr wird aufgesetzt und es wird drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

6 µL Ethylendiamin und 5 mL Dichlormethan legt man in einem Rundkolben vor und unter Rühren wird nun die Reaktionslösung mit dem aktivierten PLGA hinzugetropft. Es wird wiederum ein Calciumchloridrohr aufgesetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Das Reaktionsprodukt wird mit 80 mL kaltem Diethylether gefällt, die Mischung wird circa drei Stunden bei 4°C stehen gelassen. Danach wird das Lösungsmittelgemisch

abdekantiert, der Niederschlag mit wenig Diethylether gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Man erhält 277 mg (92% der Theorie) eines weißen, schaumartigen Feststoffes.

(2) Synthese von F-PLGA:
Alle Arbeiten mit FITC werden unter Lichtschutz durchgeführt.
Das erhaltene NH_2-PLGA und 15,5 mg FITC werden getrennt in jeweils 8 bzw. 4 mL Aceton gelöst und die beiden Lösungen daraufhin vereinigt. Man rührt nun über Nacht bei Raumtemperatur.
Überschüssiges FITC wird durch Zugabe von 50 µL Ethanolamin verbraucht, anschließend wird das Aceton am Rotationsverdampfer entfernt. Den Rückstand nimmt man in 10 mL Dichlormethan auf und schüttelt mit je 10 mL destilliertem H_2O, dessen pH mit 0,1 N NaOH auf 8,5 eingestellt wurde, bis die wässrige Phase farblos beziehungsweise nur noch schwach gefärbt ist. Volumenverluste der organischen Phase werden durch Zugabe von Dichlormethan kompensiert.
Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt man am Rotationsverdampfer. Nachdem das Produkt unter Vakuum getrocknet wurde, erhält man 157 mg (51% der Theorie) einer orangen, zähen Paste.

5.6.2 Entwicklung der Synthese

Ziel dieses Versuches war es, eine Variation einer bereits bestehenden Synthesevorschrift für F-PLGA von Kim *et al.* [8] auf Durchführbarkeit zu untersuchen. Das gewünschte Produkt war von Kim *et al.* durch Modifikation von PLGA mit Ethylendiamin in Dichlormethan und anschließende Konjugation mit Fluoresceinisothiocyanat in DMSO hergestellt worden. Überschüssiges FITC wurde durch Dialyse gegen deionisiertes Wasser entfernt. Da jedoch schon geringe Spuren von DMSO bei der weiteren Verwendung von F-PLGA bei der Herstellung von Nanopartikeln erheblich stören würden, sollte in dieser Arbeit die Konjugation von FITC und PLGA in Aceton als alternativem Lösungsmittel durchgeführt werden.

Da alle eingesetzten Reagenzien gut in Aceton löslich sind, lässt sich die Konjugationsreaktion ohne Probleme in diesem Medium durchführen. Lediglich das üblicherweise durchgeführte Ausreagieren von überschüssigem

Fluoresceinisothiocyanat mit Glycin, musste nun alternativ mit Ethanolamin durchgeführt werden, weil Glycin in Aceton unlöslich ist.

Die weitere Reinigung des Produktes wurde nicht durch Dialyse, sondern mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde das Produktgemisch nach der Kopplung in Chloroform überführt und gegen destilliertes Wasser ausgeschüttelt, welches das unkonjugierte FITC aufnehmen sollte. Für eine effizientere Extraktion des sauren FITC-Moleküls wurde in der wässrigen Phase ein leicht basischer pH-Wert eingestellt.
Das Ausschütteln bereitete jedoch einige Schwierigkeiten:
Da PLGA in Wasser nicht löslich ist, fiel es während des Schüttelns im Scheidetrichter aus. Je mehr Wasser eingesetzt wurde, desto stärker war die Niederschlagsbildung, welche folglich keine saubere Phasentrennung zuließ. Man musste also das Volumen der wässrigen Phase gering halten, was aber wiederum zur Folge hatte, dass nur eine geringe Menge FITC pro Durchgang extrahiert werden konnte. Um wirklich sämtliches überschüssiges FITC zu entfernen, müsste sehr oft geschüttelt werden, was allerdings einen erheblichen Verlust an Produkt mit sich ziehen würde. Außerdem ging bei jedem Schüttelvorgang organische Phase verloren, da sich diese zu einem geringen Grad in der wässrigen Phase löste. Diese Lösungsmittelverluste mussten immer wieder durch Zugabe von Dichlormethan ausgeglichen werden.

5.6.3 Analytische Charakterisierung und Diskussion

5.6.3.1 IR-Spektroskopie

Von den Ausgangsverbindungen PLGA und FITC und vom Endprodukt der Synthese F-PLGA wurden Infrarot-Spektren aufgenommen:

- PLGA (Böhringer Ingelheim):
  IR (KBr): ν = 3444 cm^{-1} (br,O-H), 3002 (w, C-H), 2957 (w, C-H), 1757 (s, C=O)

- FITC (Sigma):
  IR (KBr): ν = 3416 cm^{-1} (br, O-H), 3071 (Ar-H), 2030 (N=C=S), 1733 (C=O), 1601 (C=C)
- F-PLGA:
  IR (KBr): ν = 3418 cm^{-1} (br, O-H), 2995 (w, C-H), 1761 (s, C=O)

Im Spektrum der Probe (F-PLGA) sind deutlich die typischen Banden von PLGA, die Breite O-H-Bande, die C-H-Valenzschwingungen, sowie eine starke Carbonylbande, erkennbar. Es wäre wünschenswert gewesen, im Spektrum der Probe auch Hinweise auf die Struktur von Fluorescein zu finden. Die charakteristische Isothiocyanat-Bande von FITC bei 2030 cm^{-1} konnte hierfür jedoch nicht herangezogen werden, da die Kopplungsreaktion mit Amino-PLGA an genau dieser funktionellen Gruppe stattfindet. Beim Endprodukt kann die entsprechende Bande somit nicht mehr vorhanden sein. Eine weitere Möglichkeit wäre, Signale des aromatischen Gerüstes von Fluorescein zu suchen. FITC weist in seinem IR-Spektrum eine Bande bei 1601 cm^{-1} auf, die von den Schwingungen der aromatischen C=C-Gruppierungen herrührt. Im Endprodukt konnte jedoch dieses Signal unter den zahlreichen Banden des anschließenden Fingerprint-Bereiches nicht eindeutig ausgemacht werden. Es gelang also nicht, anhand der IR-Spektren Fluorescein im Endprodukt nachzuweisen.

5.6.3.2 Visuelle Untersuchung

Fluorescein und seine Derivate besitzen eine sehr kräftige gelb-orange Farbe. Da reines PLGA, ebenso wie Amino-PLGA weiße Pulver sind und das synthetisierte Produkt F-PLGA eine deutlich orange Färbung aufweist, reicht schon eine visuelle Begutachtung des Produktes aus, um das Vorhandensein von Fluorescein zu bestätigen.

5.6.3.3 Abschließende Bemerkungen und Ausblick

- Mittels Infrarot-Spektroskopie gelang es im Fall von F-PLGA nicht, einen Nachweis für die Anwesenheit von Fluorescein im Produkt zu erhalten. Jedoch alleine aufgrund der orangen Färbung des Endproduktes steht außer Frage, dass Fluorescein in ihm enthalten ist. Was es allerdings noch zu klären gilt, ist, wie viel des vorhandenen Fluoresceins tatsächlich kovalent gebunden vorliegt und wie viel an überschüssigem FITC, welches möglicherweise nicht ausreichend entfernt werden konnte, noch im Produkt enthalten ist.

- Das eigentliche Ziel bei dieser Synthese war es, F-PLGA ohne zu Hilfenahme des Lösungsmittels DMSO herzustellen. Denn sind nur geringe Spuren von DMSO im Produkt vorhanden, können damit keine stabilen Nanopartikel hergestellt werden. Als alternatives Lösungsmittel wurde Aceton gewählt, da es aufgrund seines niedrigen Siedepunktes besonders leicht am Rotationsverdampfer entfernbar ist und somit keine Rückstände davon im Produkt verbleiben. Das so hergestellte F-PLGA wurde anschließend für die Produktion von Nanopartikeln verwendet und es konnten damit hinreichend stabile, fluoreszenzmarkierte PLGA-Nanopartikel hergestellt werden.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

[1] K.S. Soppimath, T.M. Aminabhavi, A.R. Kulkarni, W.E. Rudzinski, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release* **70**, 1-20 (2001)

[2] F.X. Lacasse, M.C. Filion, N.C. Phillips, E. Escher, J.N. McMullen, P. Hildgen, Influence of surface properties at biodegradable microsphere surfaces: effects on plasma protein absorption and phagocytosis. *Pharm. Res.* **15**, 312-317 (1998)

[3] S. Stolnik, L. Illum, S.S. Davis, Long circulating microparticulate drug carriers. *Adv. Drug Del. Rev.* **16**, 195-214 (1995)

[4] C.L. Wells, M.A. Maddaus, S.L. Erlandsen, R.L. Simmons, Evidence for the phagocytic transfer of intestinal particles in dogs and rats. *Infect. Immun.* **56**, 278-282 (1988)

[5] S.M. Moghimi, Mechanisms regulating body distribution of nanospheres conditioned with pluronic and tetronic block co-polymers. *Adv. Drug Del. Rev.* **16**, 183-193 (1995)

[6] Y.P. Li, Y.Y. Pei, X.Y. Zhang, Z.H. Gu, Z.H. Zhou, W.F. Yuan, J.J. Zhou, J.H. Zhu, X.J. Gao, PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J. Control. Release* **71**, 203-211 (2001)

[7] S. Faraasen, J. Vörös, G. Csúcs, M. Textor, H.P. Merkle, E. Walter, Ligand-specific targeting of microspheres to phagocytes by surface modification with poly(L-lysine)-grafted poly(ethylene glycol) conjugate. *Pharm. Res.* **20**, 237-246 (2002)

[8] S.H. Kim, J.H. Jeong, K.W. Chun, T.G. Park, Target specific cellular uptake of PLGA nanoparticles coated with poly(L-lysine)-poly(ethylene glycol)-folate conjugate. *Langmuir* **21**, 8852-8857 (2005)

[9] M.J. Roberts, M.D. Bentley, J.M. Harris, Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Del. Rev.* **54**, 459-476 (2002)

[10] P.K. Working, M.S. Newman, J. Johnson, J.B. Cornacoff, Safety of poly(ethylene glycol) and poly(ethylene glycol) derivatives. *ACS Symposium Series* **680** (Poly(Ethylene Glycol)), 45-57 (1997)

[11] F. Delie, M.J. Blanco-Príeto, Polymeric particulates to improve oral bioavailability of peptide drugs. *Molecules* **10**, 65-80 (2005)

[12] S.M. Moghimi, J. Szebeni, Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog. Lipid. Res.* **42**, 463-478 (2003)

[13] F. MacRitchie, The adsorption of proteins at the solid/liquid interface. *Colloid Interface Sci.* **38**, 484-488 (1972)

[14] C.J. Porter, S.M. Moghimi, L. Illum, S.S. Davis, The polyoxyethylene/polyoxypropylene block co-polymer poloxamer 407 selectively redirects intravenously injected microspheres to sinusoidal endothelial cells of rabbit bone marrow. *FEBS Lett.* **305**, 62-66 (1992)

[15] S.M. Moghimi, H. Hedeman, I.S. Muir, L. Illum, S.S. Davis, An investigation of the filtration capacity and the fate of large filtered sterically-stabilized microspheres in rat spleen. Biochim. Biophys. Acta 1157, 233-240 (1993)

[16] C.J. Van Oss, Phagocytosis as a surface phenomenon. *Annu. Rev. Microbiology* **32**, 19-39 (1978)

[17] Y. Tabata, Y. Ikada, Protein precoating of polylactide microspheres containing a lipophilic immunopotentiator for enhancement of macrophage phagocytosis and activation. *Pharm. Res.* **6**, 296-301 (1989)

[18] S.J. Douglas, S.S. Davis, L. Illum, Biodistribution of poly(butyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles in rabbits. *Int. J. Pharm.* **34**, 145-152 (1986)

[19] A. Abuchowski, T. Van Es, N.C. Palczuk, F.F. Davis, Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *J. Biol. Chem.* **252**, 3578-3581 (1977)

[20] L. Illum, S.S Davis, Effect of nonionic surfactant poloxamer 338 on the fate and deposition of polystyrene micropheres following intravenous adminitration. *J. Pharm. Sci.* **72**, 1086-1090 (1983)

[21] L. Illum, S.S. Davis, The organ uptake of intravenously administered colloidal particles can be altered using nonionic surfactant (poloxamer 338). *FEBS Lett.* **167**, 79-82 (1984)

[22] L. Illum, S.S. Davis, The effect of hydrophilic coatings on the uptake of colloidal particles with mouse peritoneal macrophages. *Int. J. Pharm.* **29**, 53 (1986)

[23] G.R. Harper, M.C. Davies, S.S. Davis, Th.F. Tadros, D.C. Taylor, M.P. Irving, J.A. Waters, Steric stabilization of microspheres with grafted polyethylene oxide

reduces phagocytosis by rat kupffer cells in vitro. *Biomaterials* **12**, 695-699 (1991)

[24] R. Gref, Y. Minamitake, M.T. Peracchia, V. Trubetskoy, A. Milshteyn, J. Sinkule, V. Torchilin, R. Langer, Biodegradable PEG-coated stealth nanospheres. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **20**, 131-132 (1993)

[25] S.M. Moghimi, A.C. Hunter, J.C. Murray, Long circulating and target-specific nanoparticules: Theory to practice. *Pharm. Rev.* **53**, 283-318 (2001)

[26] J.M. Harris, R.B. Chess, Effect of PEGylation on Pharmaceuticals. *Nature Reviews* **2**, 214-221 (2003)

[27] S.M. Moghimi, I.S. Muir, L. Illum, S.S. Davis, V. Kolb-Bachofen, Coating particles with a block copolymer (poloxamine-908) suppresses opsonization but permits the activity of dysopsonines in the serum. *Biochim. Biophys. Acta* **1179**, 157-165 (1993)

[28] R. Gref, M. Lück, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk, R.H. Müller, Stealth corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surfaces B* **18**, 301-313 (2000)

[29] D.G. Hoare, D.E. Koshland, A procedure for the selective modification of carboxyl groups in proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 2057-2058 (1966)

[30] T.W. Greene, P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd edition, Wiley, New York [u.a.], 1981

[31] P.J. Kocienski, Protecting Groups, Thieme, Stuttgart [u.a.], 1994

[32] M. Bergman, L. Zervas, A general procedure for the synthesis of peptides. *Ber.* **65**, 1192-1201 (1932)

[33] A. Paquet, Introduction of 9-fluorenylmethyloxycarbonyl, trichloroethoxycarbonyl and benzyloxycarbonyl amine protecting groups into o-unprotected amino acids using succinimidyl carbodiimides. *Can. J. Chem.* **60**, 976 (1982)

[34] A.M. Felix, E.P. Heimer, T.J. Lambros, C. Tzougraki, J. Meienhofer, Rapid removal of protecting groups from peptides by catalytic transfer hydrogenation with 1,4-cyclohexadiene. *J.Org.Chem.* **43**, 4194-4196 (1978)

[35] D. Podhradsky, L. Drobnica, P.Kristian, Reactions of cysteine, ist derivatives, glutathione, coenzyme A and dihydrolipoic acid with isothiocyanates. *Experientia* **35**, 154-155, 1979

[36] A. Jobbagy, T. Kiraly, Chemical characterization of fluorescein isothiocyanate-protein conjugates. *Biochem. Biphys. Acta* **124**, 166-175, 1966

[37] E. Merck, Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie, Darmstadt, 1970

[38] F. Feigl, Spot Tests in Organic Analysis, 6th enlarged and revised English Edition, Elsevier Publishing Company, Amsterdam [u.a.], 1960

[39] G.T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego [u.a.], 1996

[40] J. Li, W.J. Kao, Synthesis of polyethylene glycol (PEG) derivatives and PEGylated - peptide biopolymer conjugates. *Biomacromolecules* **4**, 1055-1067 (2003)

[41] J.K. Inman, Thymus-independent antigens: the preparation of covalent, hapten-ficoll conjugates. *J. Immunol.* **114**, 704-709 (1975)

[42] P.H. Plotz, A. Rifai, Stable, soluble, model immune complexes made with a versatile multivalent affinity-labeling antigen. *Biochemistry* **21**, 301-308 (1982)

[43] G.L. Kenausis, J. Vörös, D.L. Elbert, N. Huang, R. Hofer, L. Ruiz-Taylor, M. Textor, J. A. Hubbell, N.D. Spencer, Poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) layers on metal oxide surfaces: Attachement mechanism and effects of polymer architecture on resistence to protein adsorption. *J. Phys. Chem. B* **104**, 3298-3309 (2000)

6.2 Abkürzungen

Abb. ... Abbildung

ACN … Acetonitril

ε-CBZ-PLL … Poly-ε-Carbobenzoxy-L-Lysin

CMC ... 1-Cyclohexyl-3-(2-Morpholinoethyl)-Carbodiimid

DC … Dünnschichtchromatographie

DCC … N,N´-Dicyclohexylcarbodiimid

DIC ... N,N´-Diisopropylcarbodiimid

DMF … Dimethylformamid

DMSO … Dimethylsulfoxid

EDAC … 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)Carbodiimid-Hydrochlorid

FITC ... Fluoresceinisothiocyanat

F-PLGA ... Fluorescein-Poly(D,L-lactid-*co*-glycolid)

FT … fourier-transform

HCl ... Salzsäure

IR … infrarot

M ... Molekulargewicht

MeOH ... Methanol

mPEG … Polyethylenglykolmethylether

MWCO … Molecular Weight Cut Off

NHS … N-Hydroxysuccinimid

PEG … Polyethylenglykol

PEG-COOH ... Carboxyl-Polyethylenglykol

(PEG-COOH)TEA ... (Carboxyl-Polyethylenglykol)Triethylamin

PEG-NH_2 ... Amino-Polyethylenglykol

PLA ... Poly(lactic acid)

PLGA ... Poly(D,L-lactid-*co*-glycolid)

PLL ... Poly-L-Lysin

RES ... Retikuloendotheliales System

SDS ... Sodiumdodecylsulfat

SEV … Sekundärelektronenvervielfacher

TEA …Triethylamin

THF … Tetrahydrofuran

TNBS ... 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonat

UV … ultraviolett

VIS … visible

6.3 Curriculum Vitae

Kerstin Rumpelmayr

wohnhaft in	Wehlistrasse 165/4/1/3 A-1020 Wien
geboren	am 19. Dezember 1981 in Wels

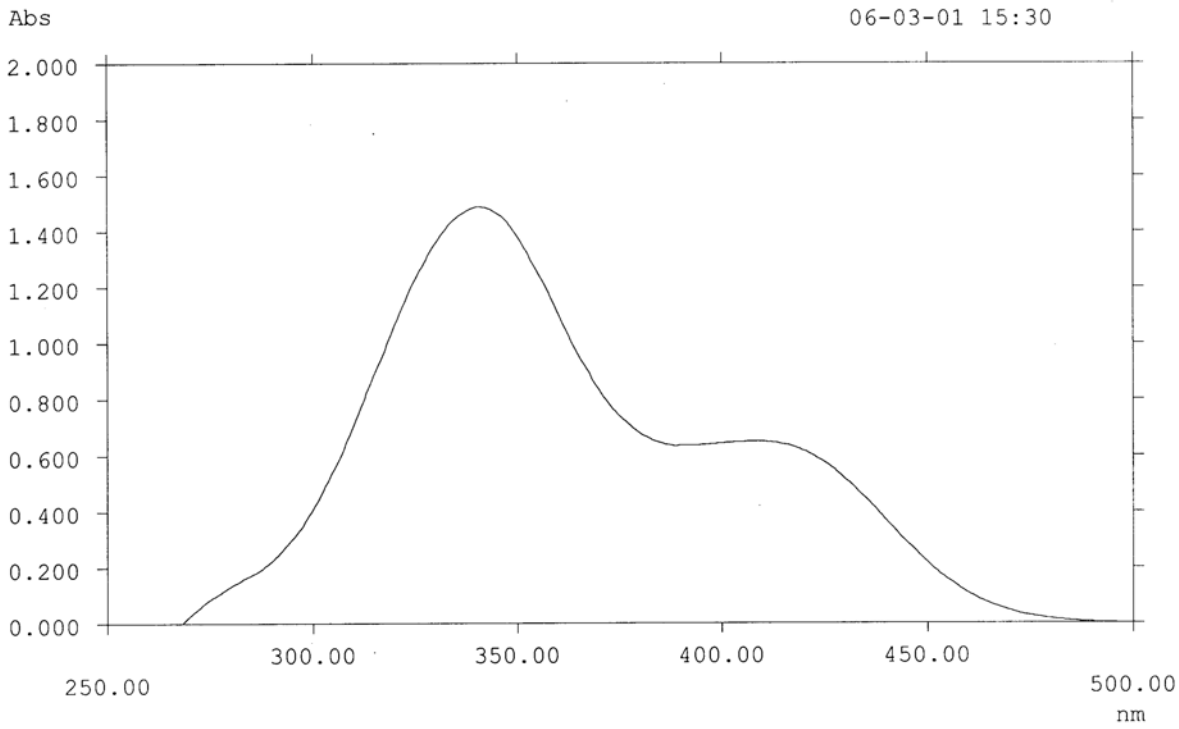
Ausbildung:

1992 – 1996:	Bundesrealgymnasium Traun
1996 – 2000:	Adalbert Stifter Gymnasium, Privatgymnasium der Diözese Linz
20. Juni 2000:	Ablegung der Reifeprüfung mit ausgezeichnetem Erfolg
01. Oktober 2000:	Beginn des Diplomstudiums Chemie an der Universität Wien
04. März 2004:	Absolvierung der ersten Diplomprüfung
seit September 2005:	Diplomarbeit im Studienfach Biochemie im Rahmen einer Zusammenarbeit der Departments für Biochemie und Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie

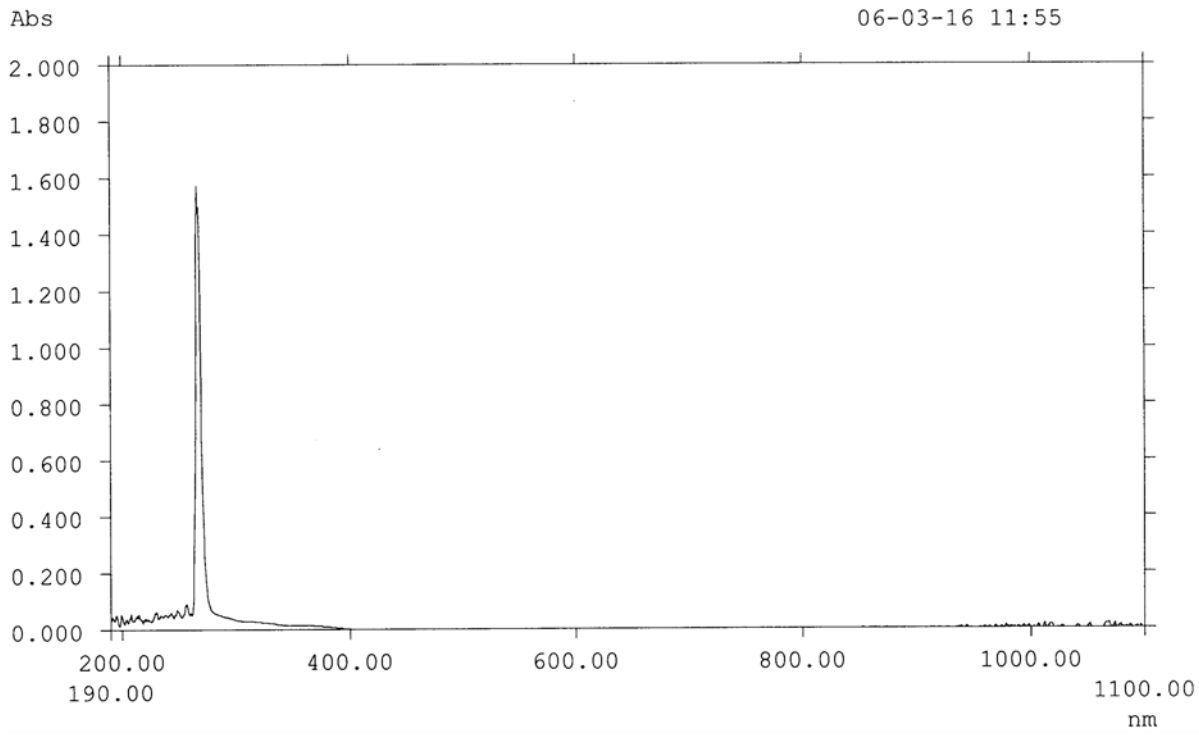
6.4 Spektren

UV-VIS-Spektren:

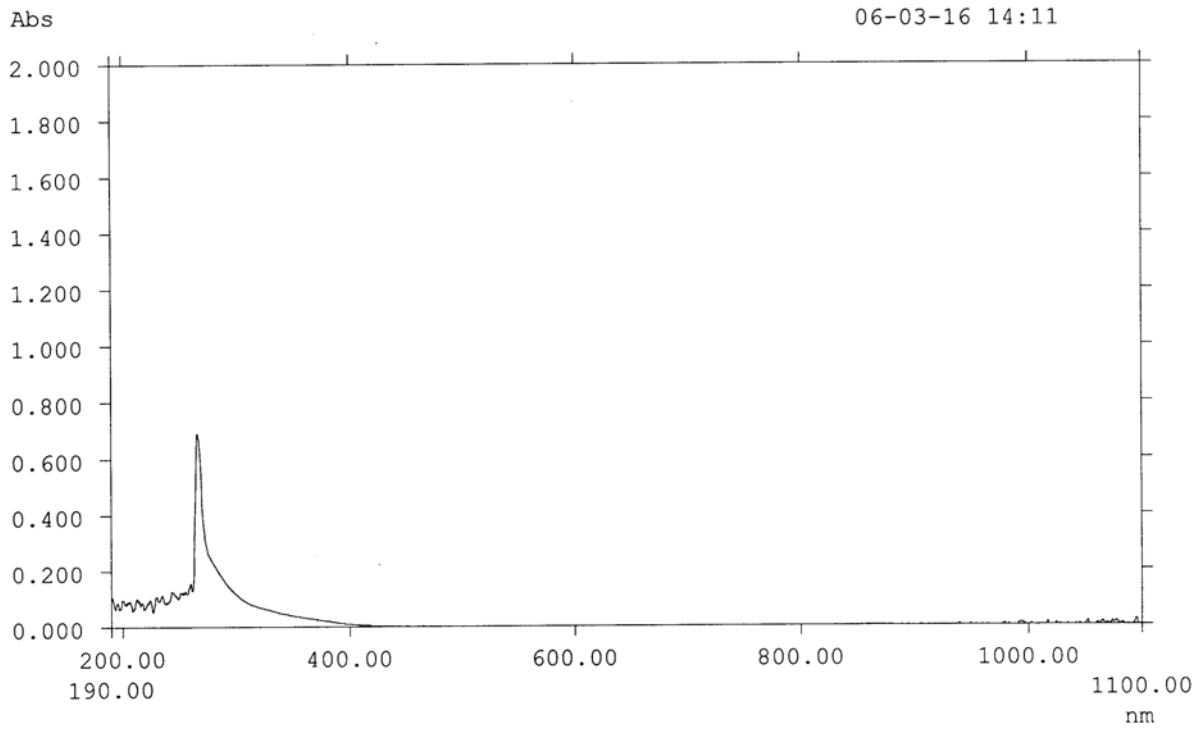
TNBS-Test: Amino-PEG Charge III



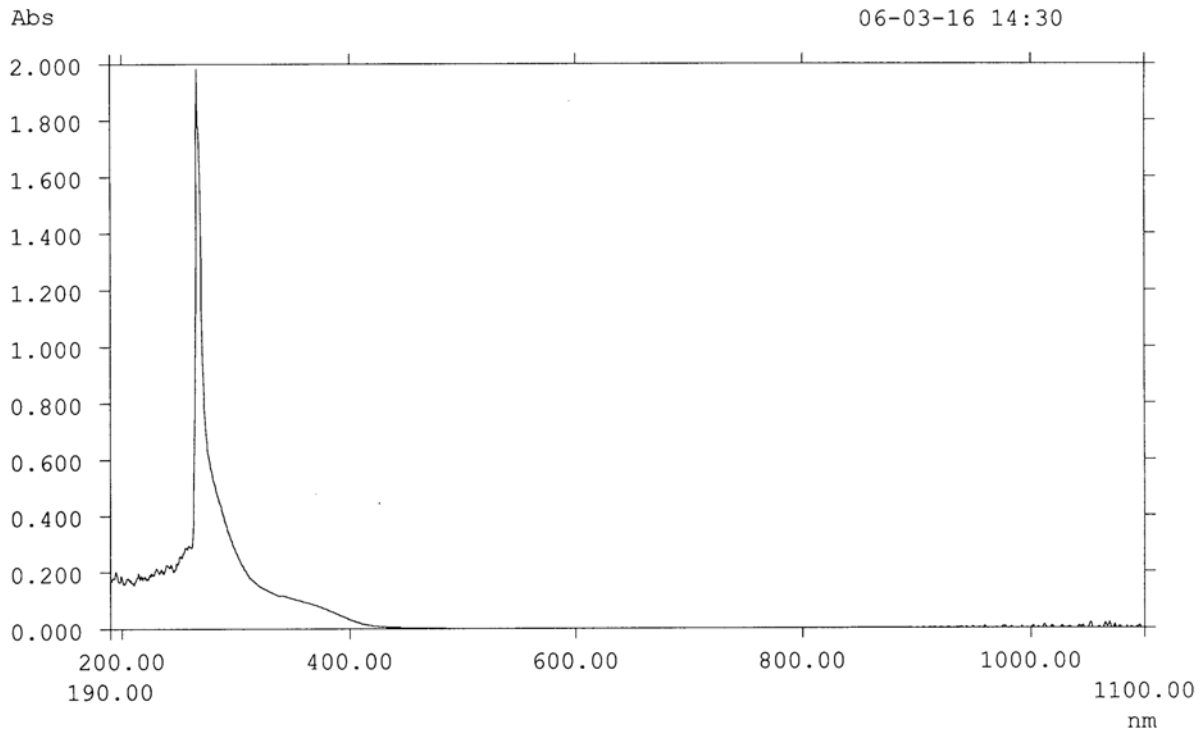
ε-CBZ-PLL (Sigma)



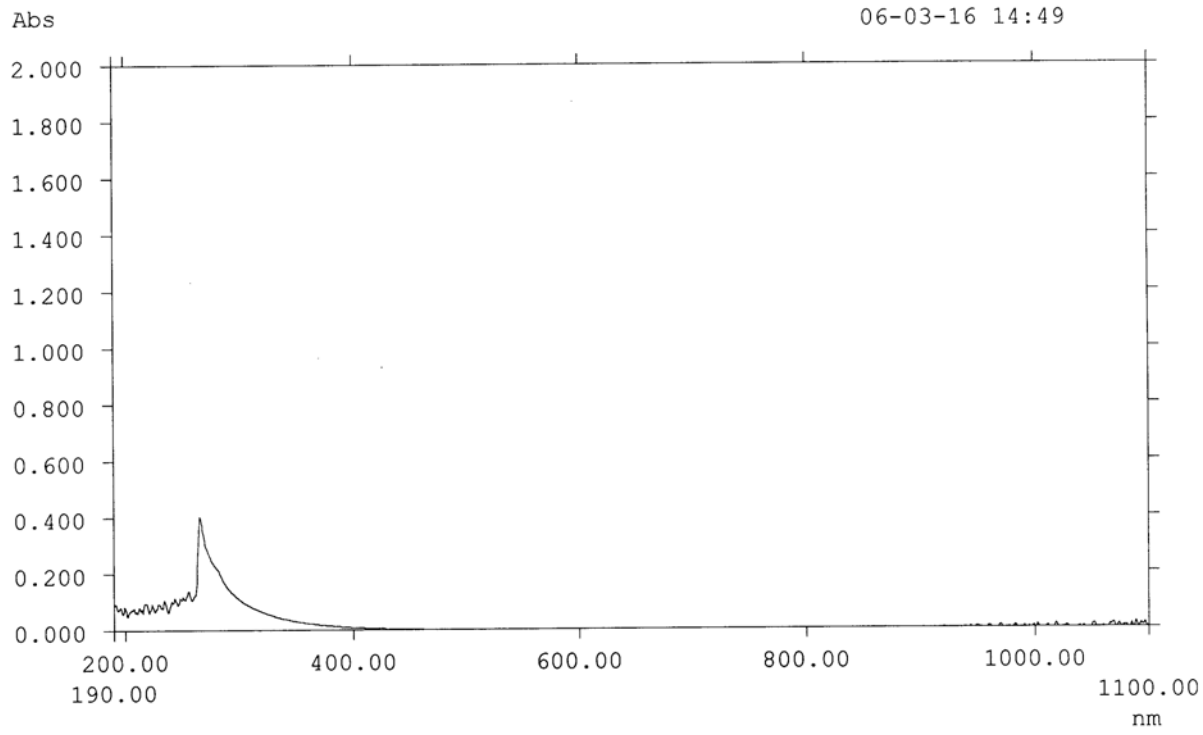
PLL-PEG-Synthese: Probe A



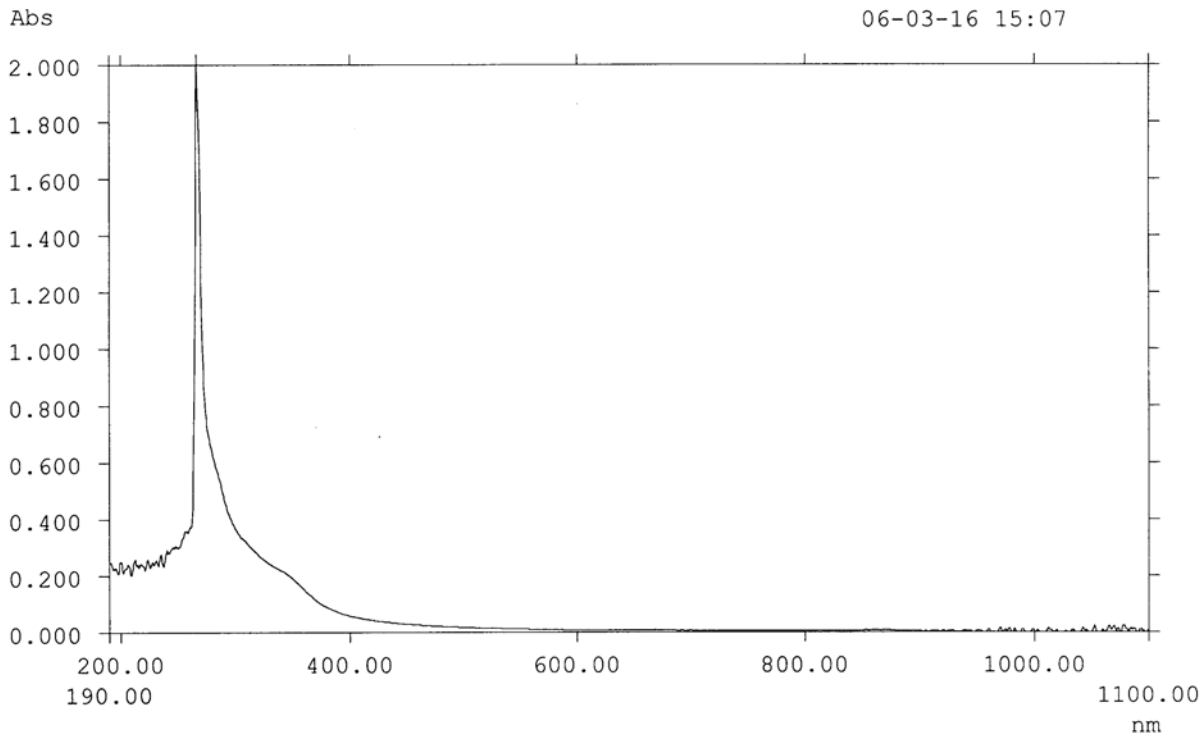
PLL-PEG-Synthese: Probe B



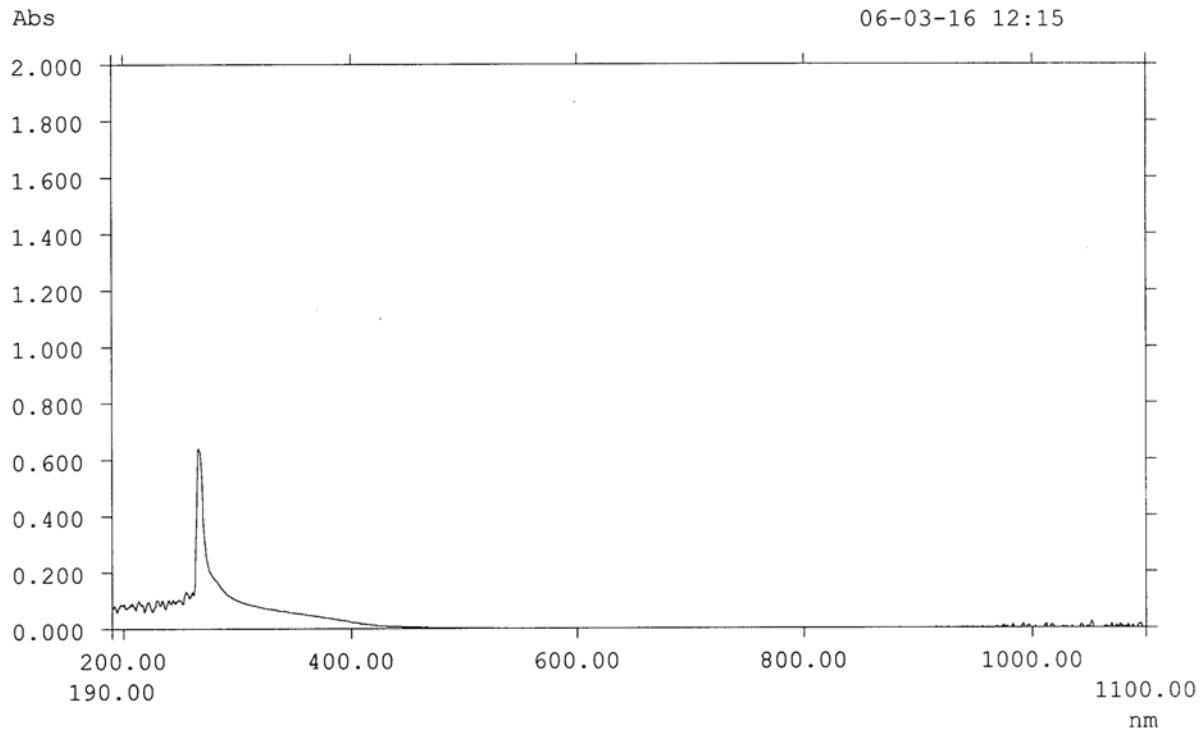
PLL-PEG-Synthese: Probe b'



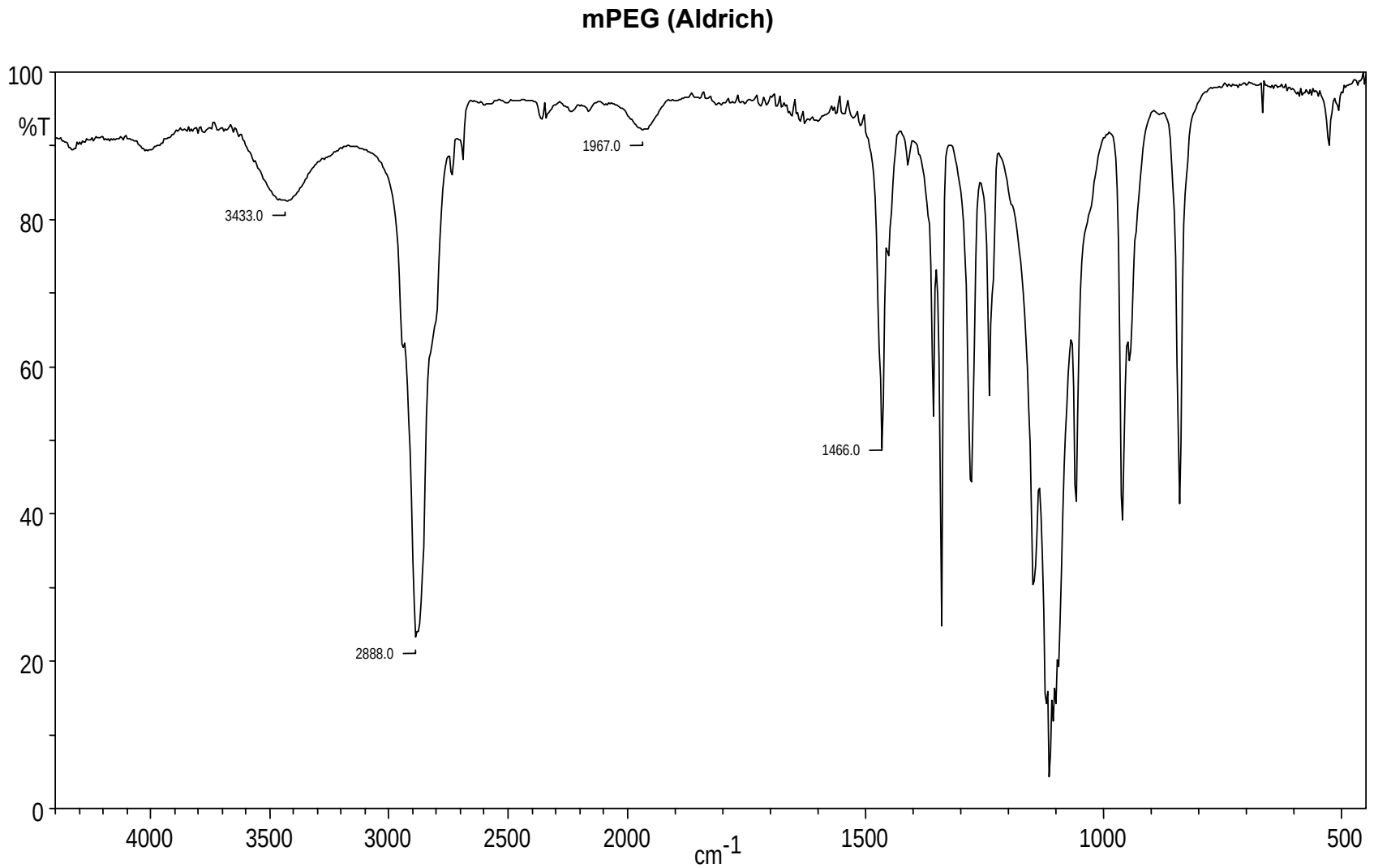
PLL-PEG-Synthese: Probe C



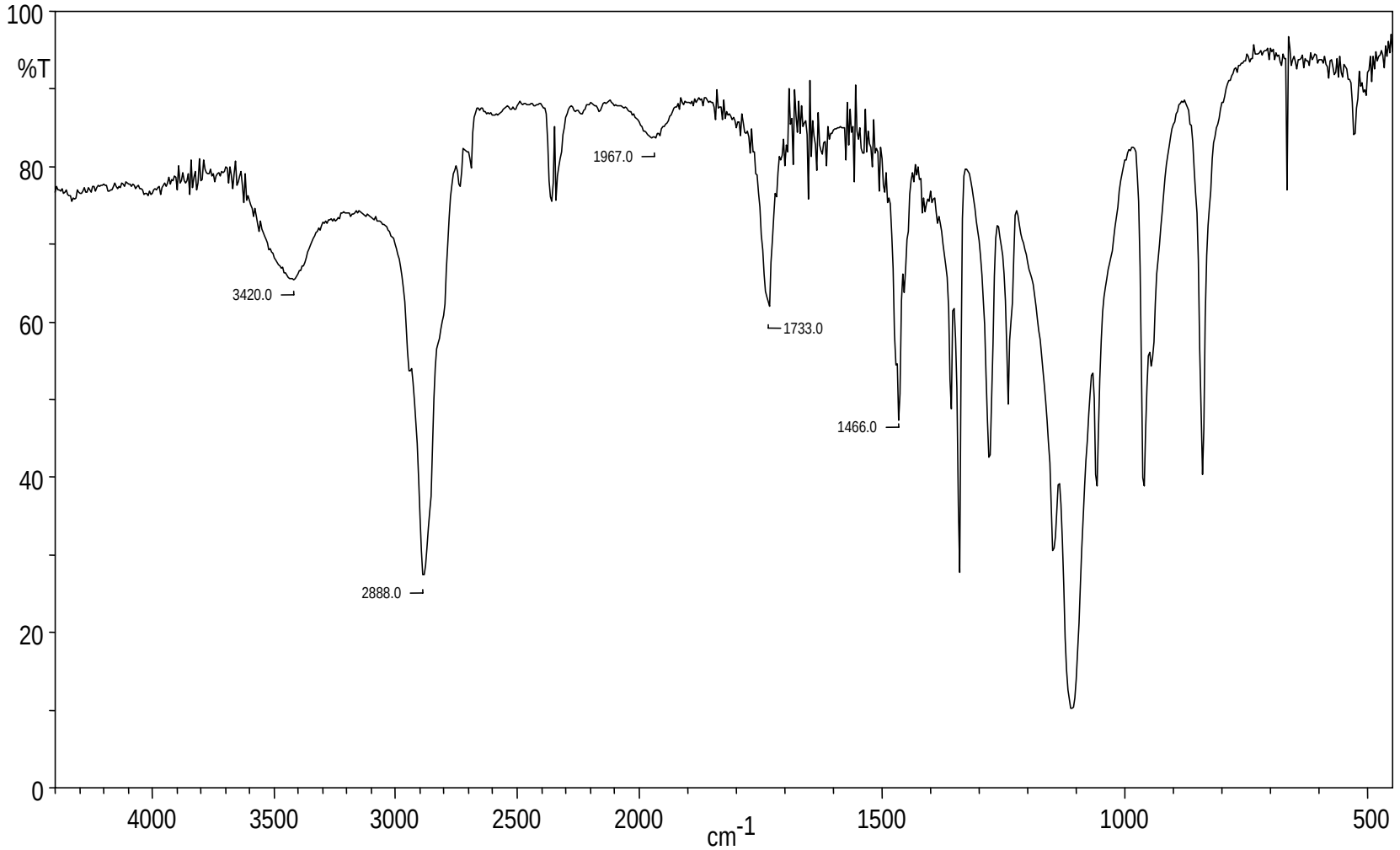
PLL-PEG-Synthese: Probe c'



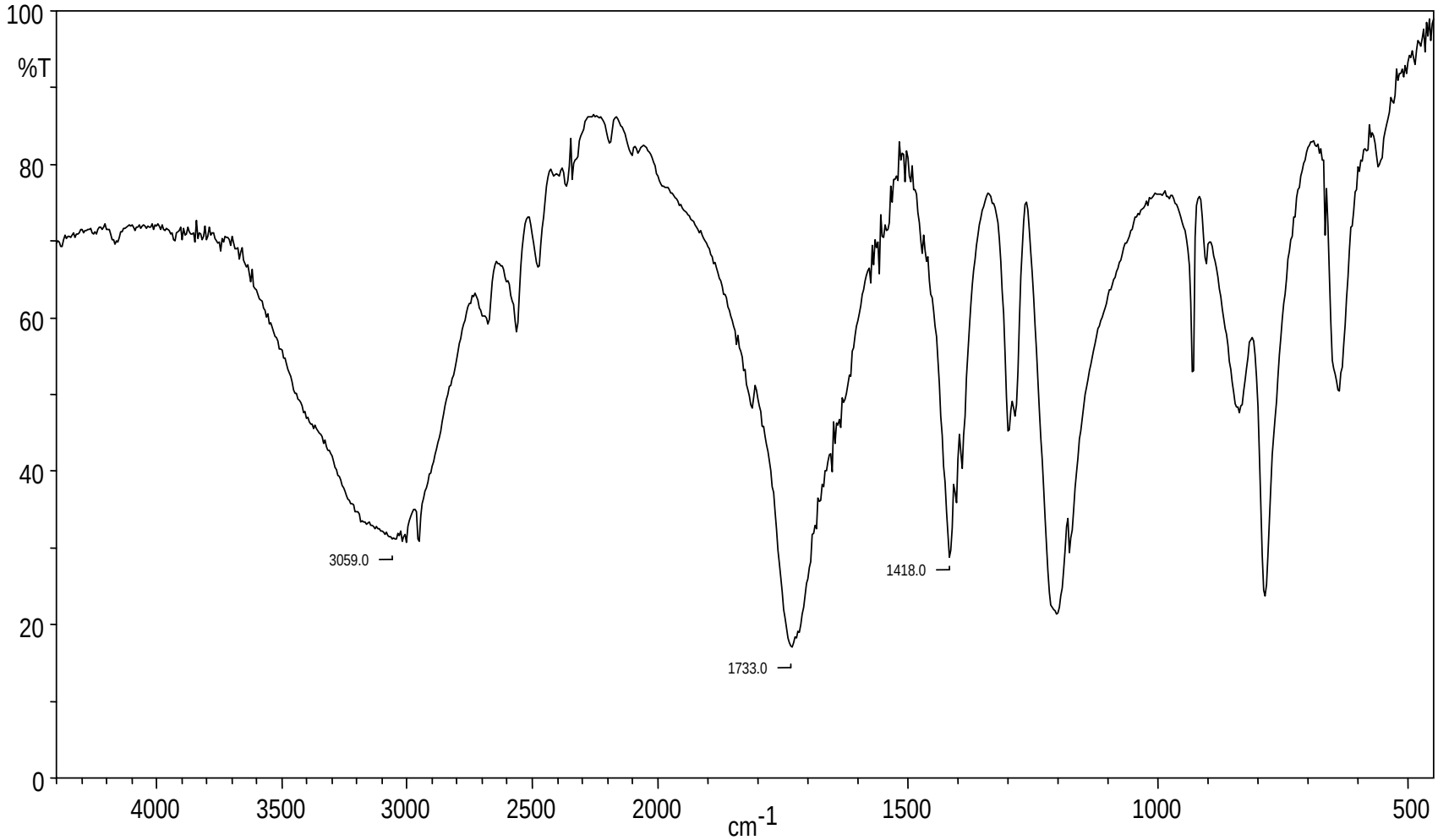
IR-Spektren:


mPEG (Aldrich)
100
%T
80
60
40
20
0
3433.0
2888.0
1967.0
1466.0
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
cm-1

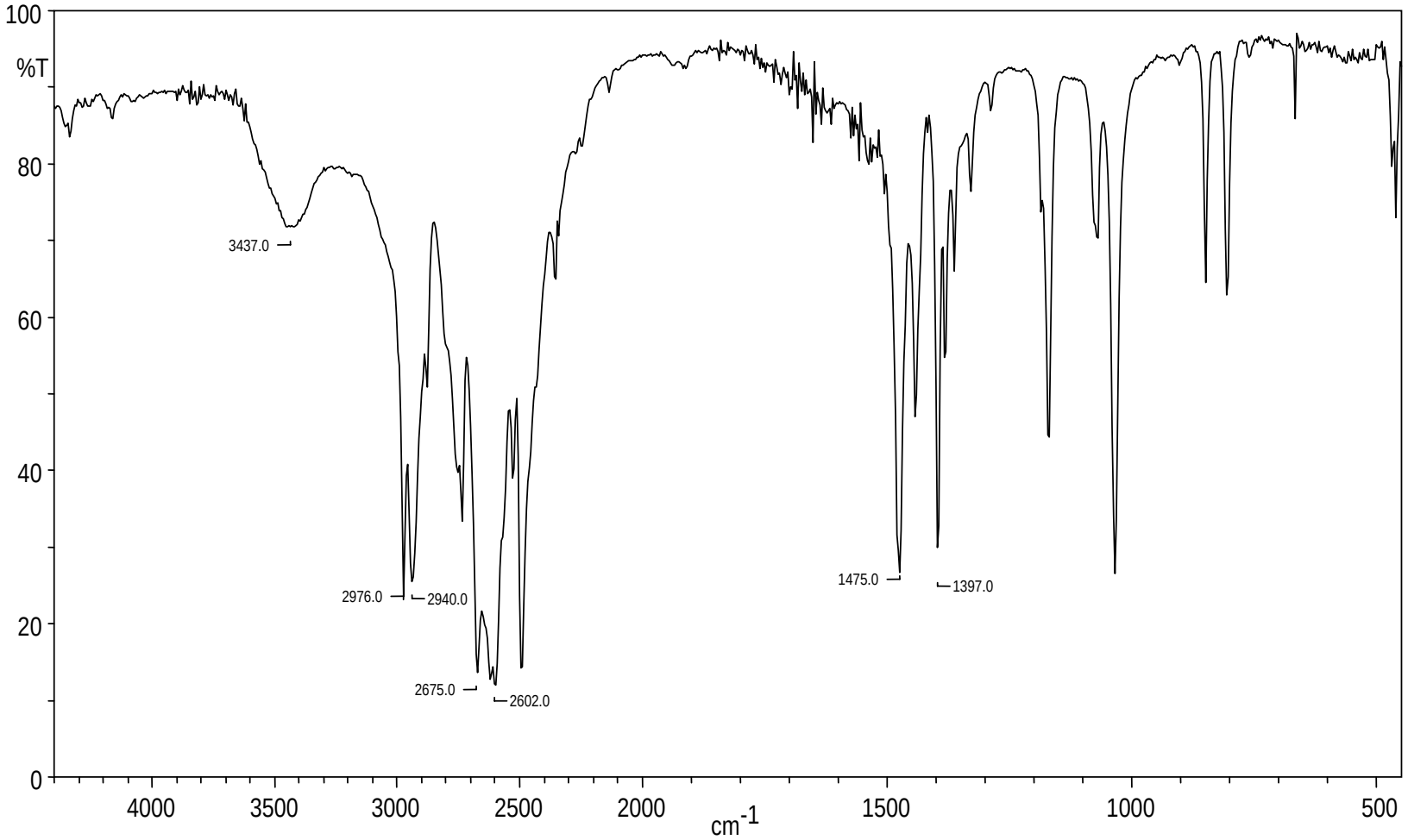
Succinyl-PEG



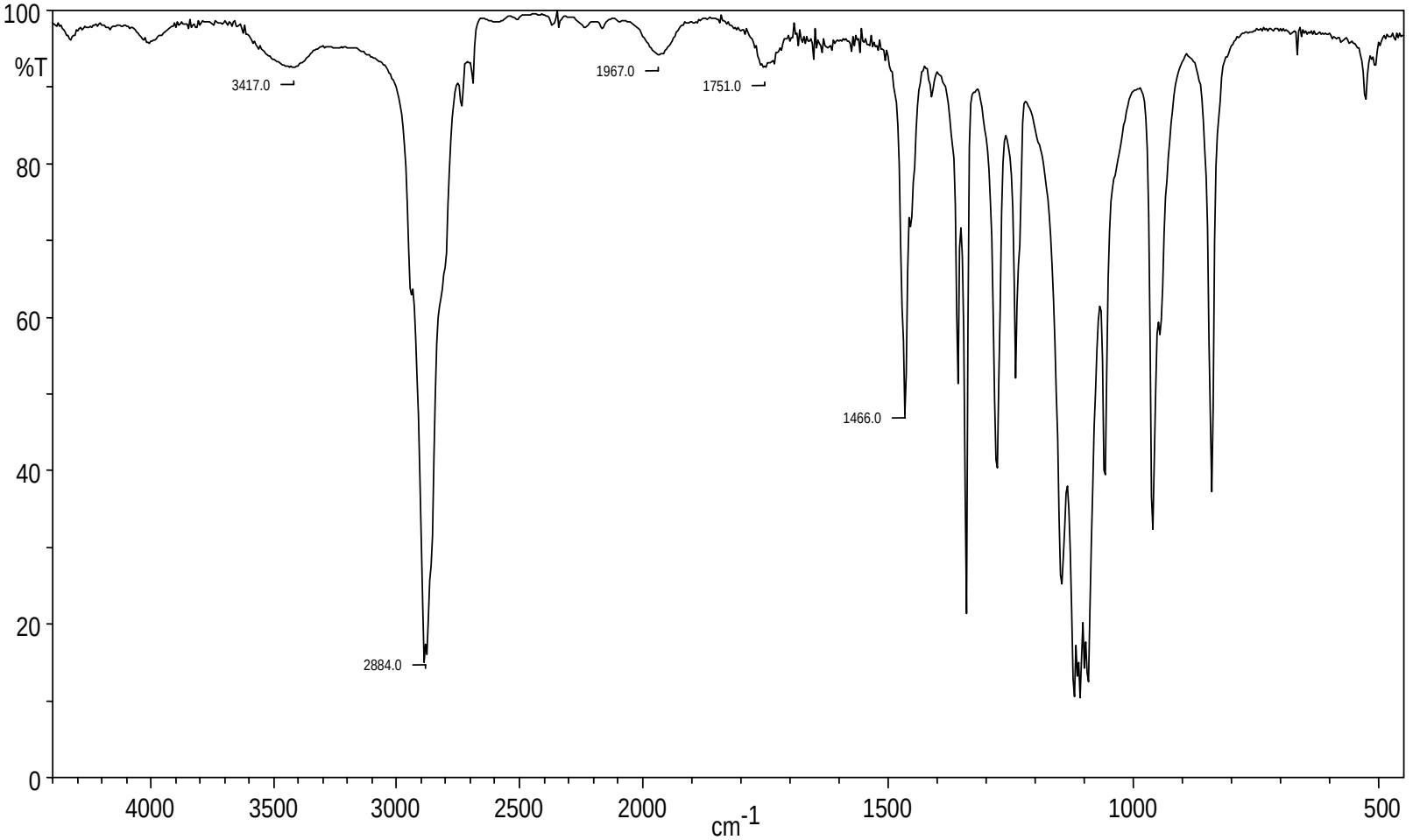
Chloressigsäure (Fluka)



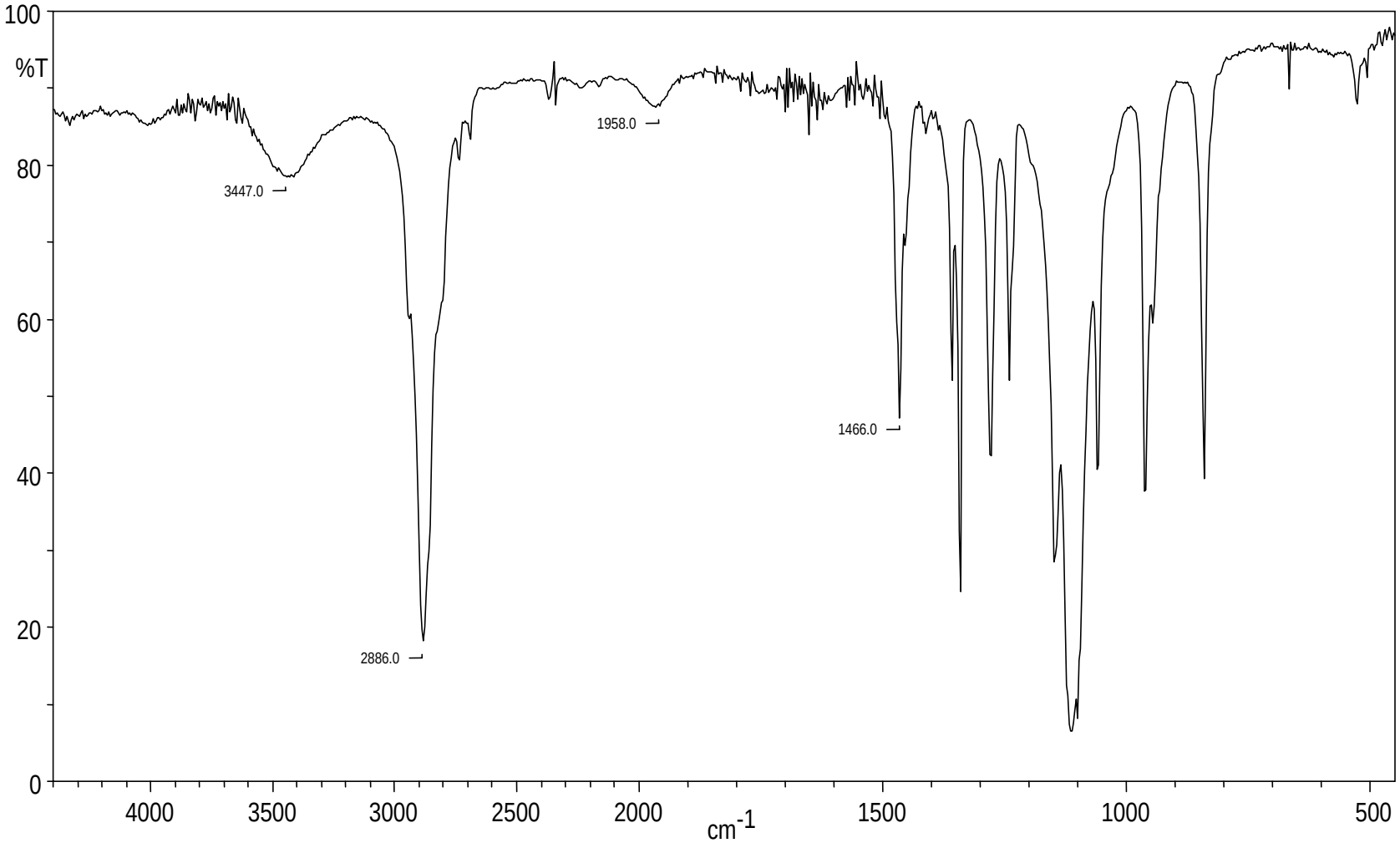
Triethylaminhydrochlorid (Fluka)

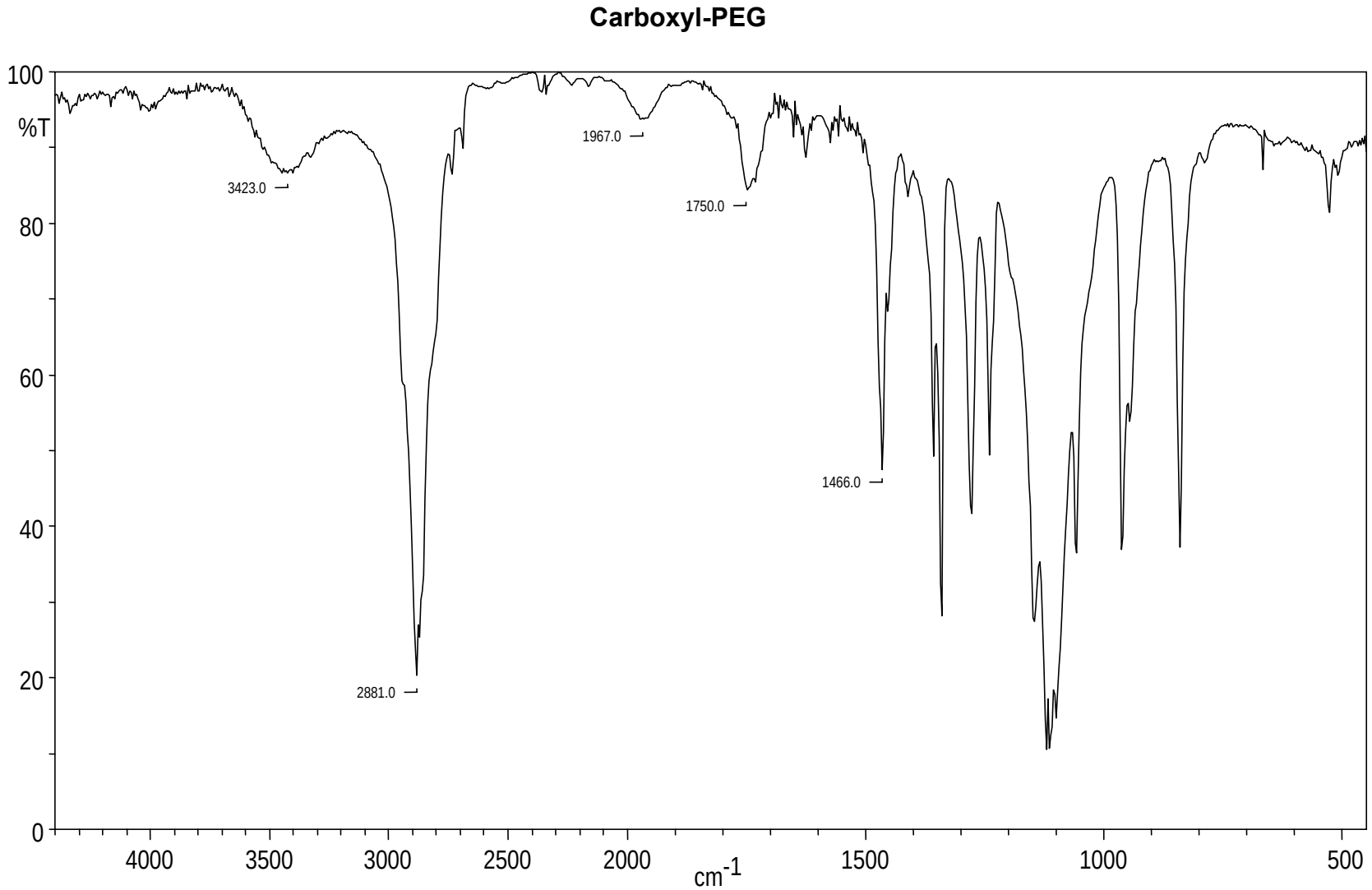


mPEG-Essigsäure (Fluka)

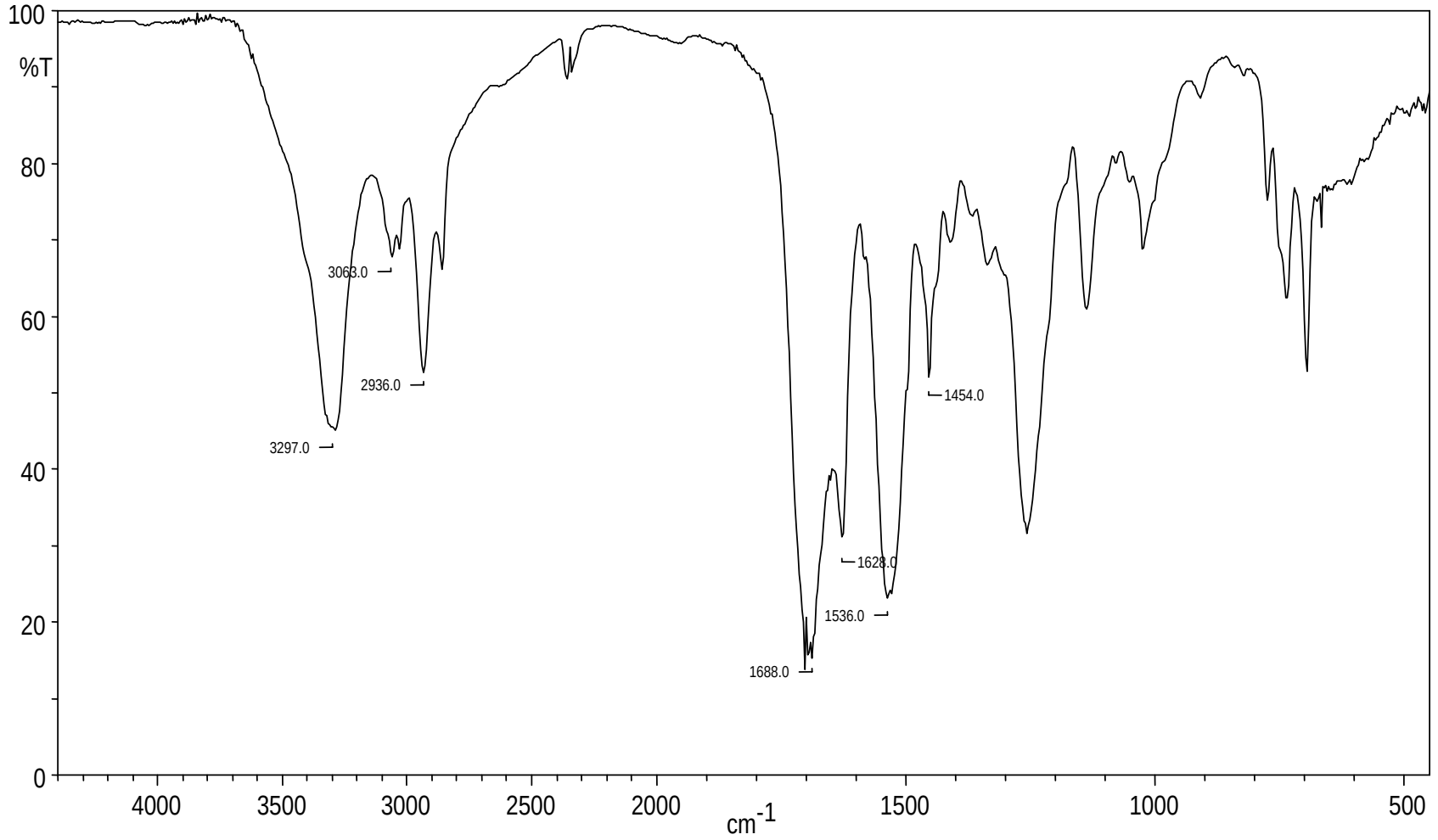


(Carboxyl-PEG)Triethylamin

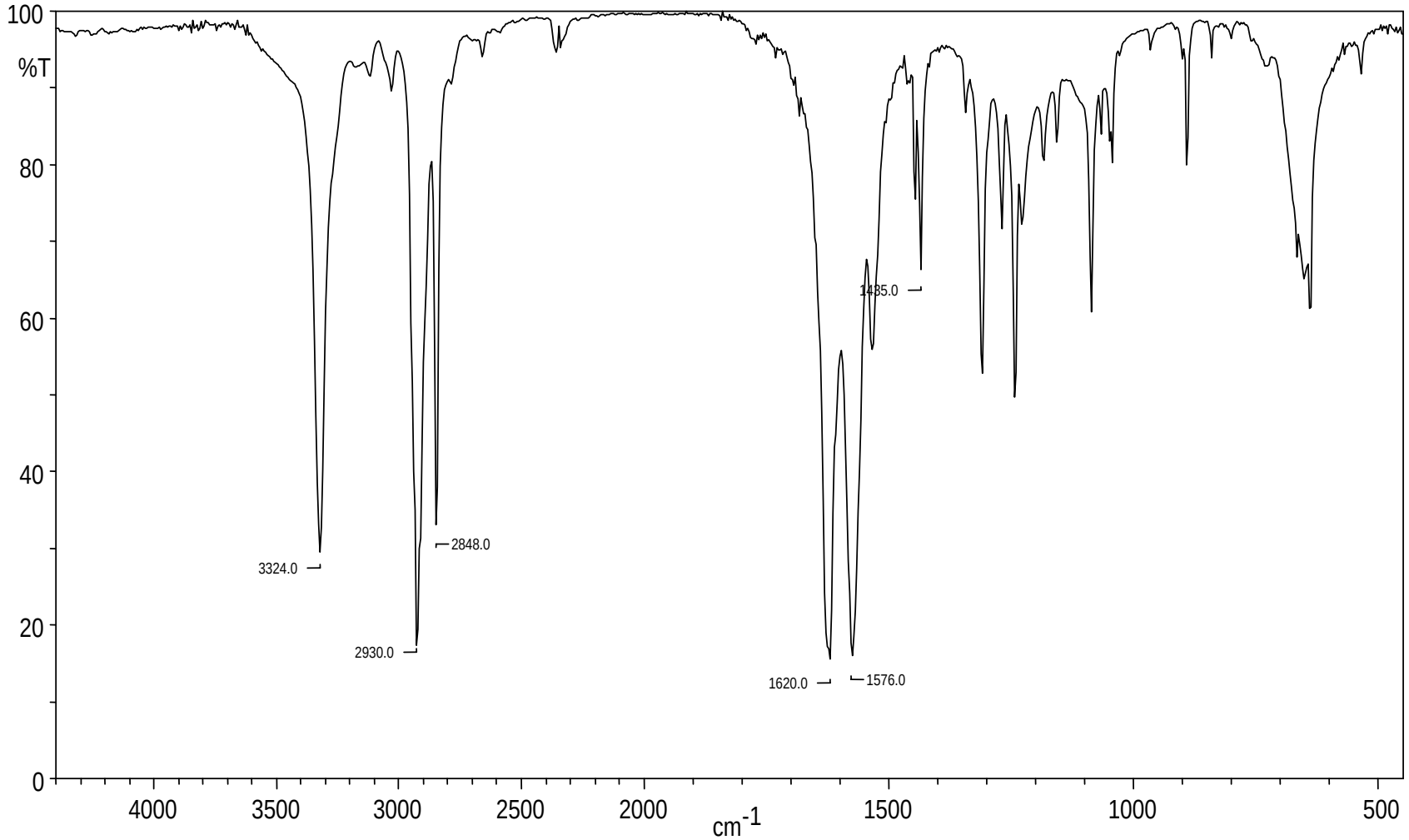



Carboxyl-PEG
100
%T
80
60
40
20
0
3423.0
2881.0
1967.0
1750.0
1466.0
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
cm-1

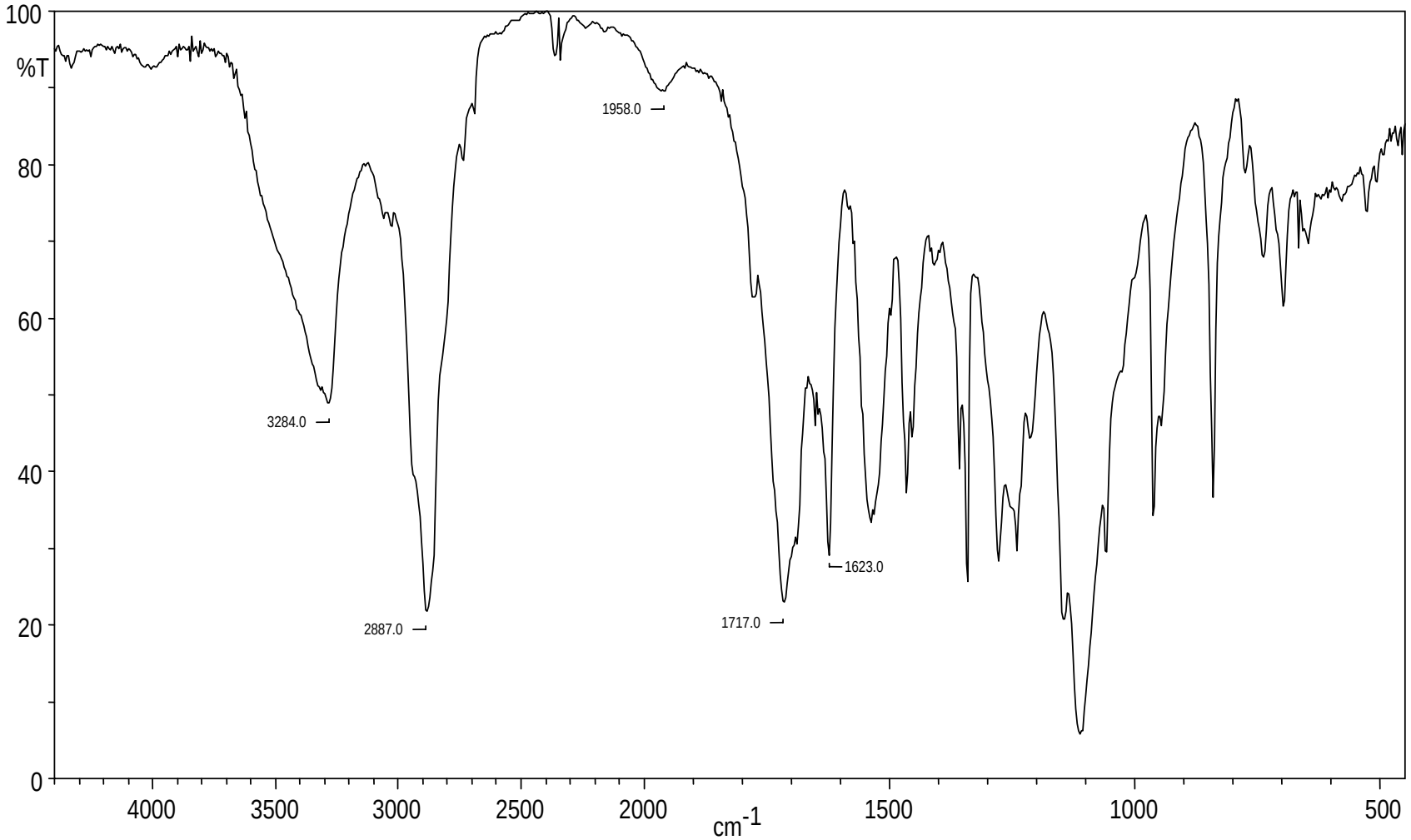
ε-CBZ-PLL (Sigma)



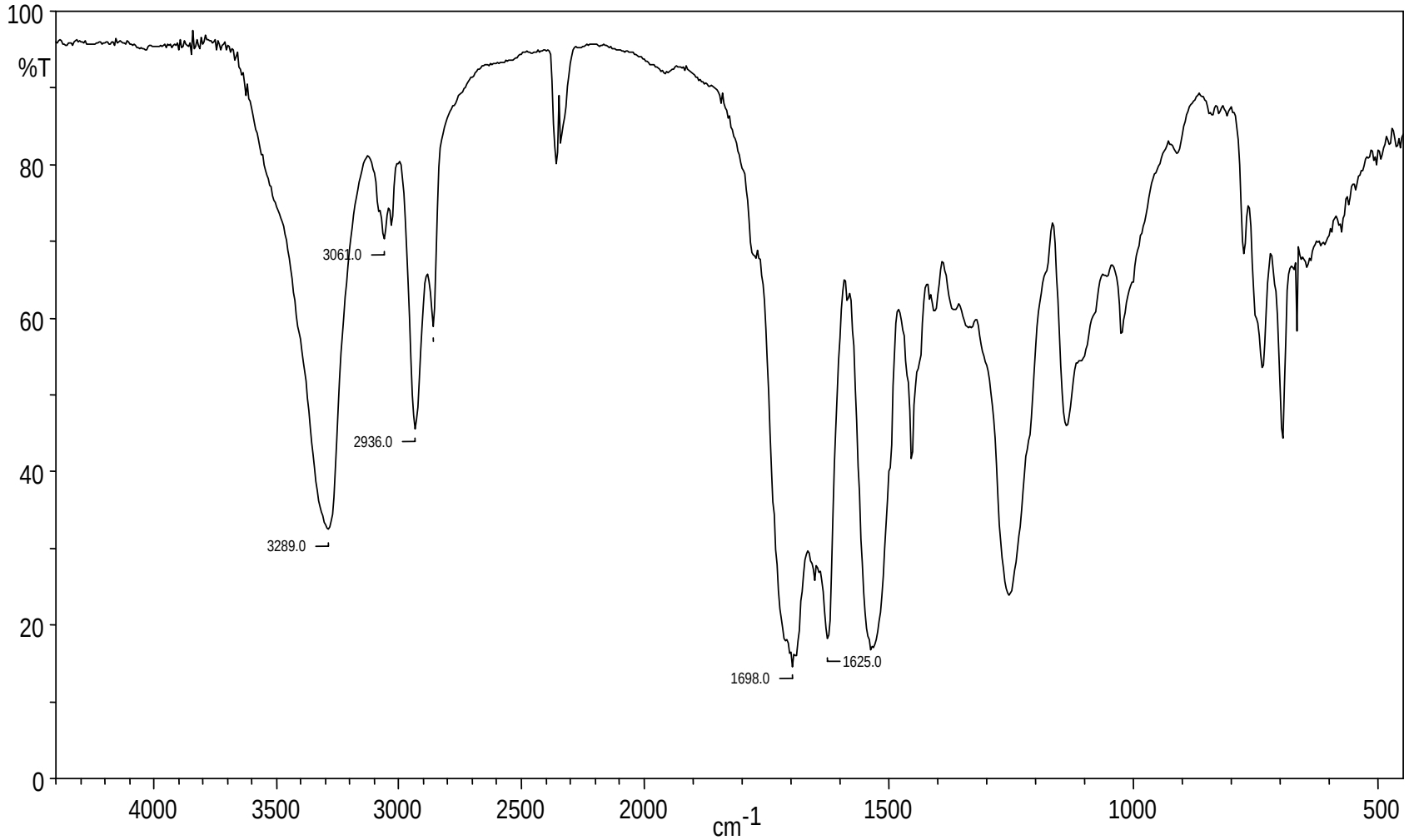
Dicyclohexylharnstoff



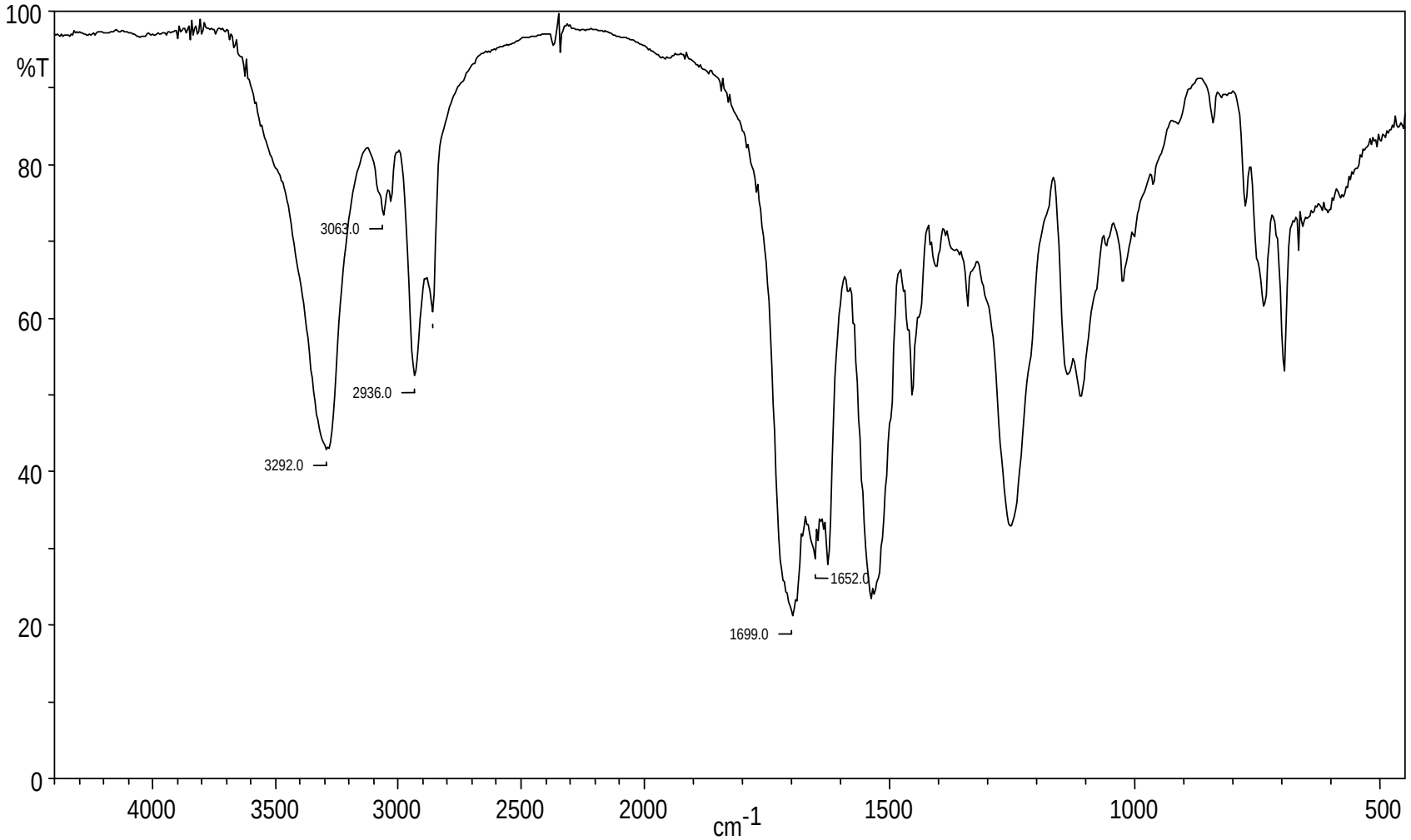
PLL-PEG-Synthese: Probe A



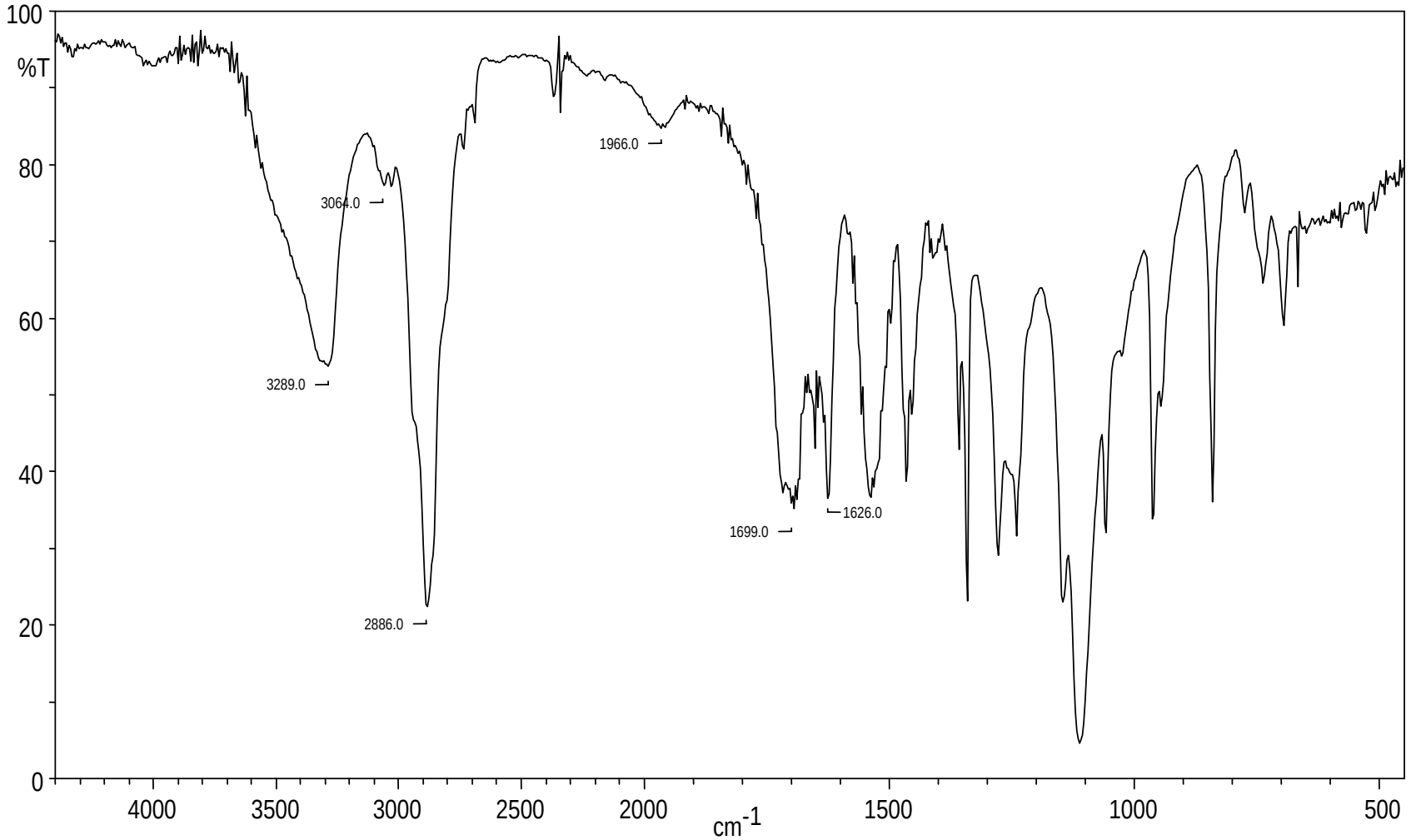
PLL-PEG-Synthese: Probe B

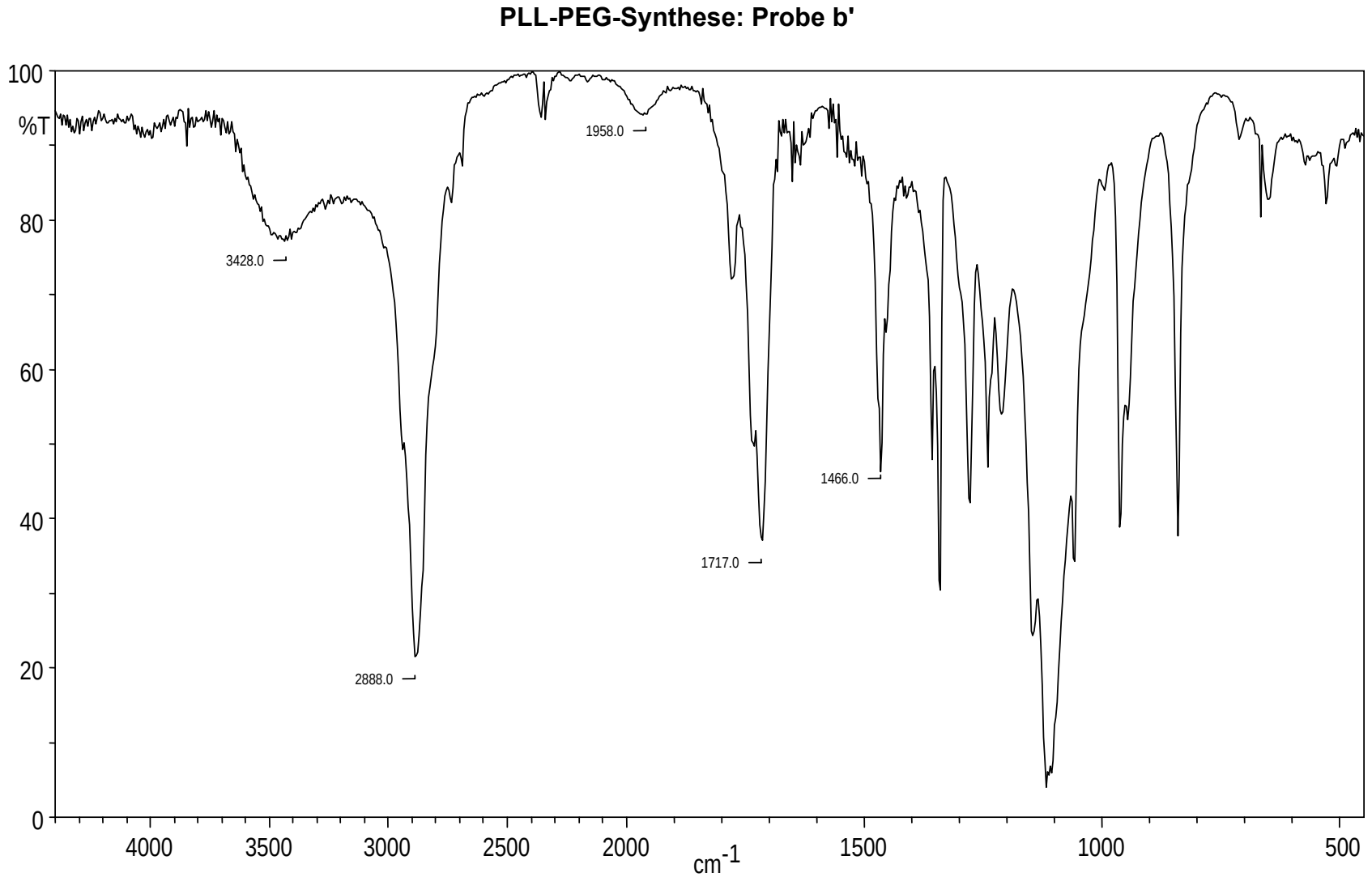


PLL-PEG-Synthese: Probe C

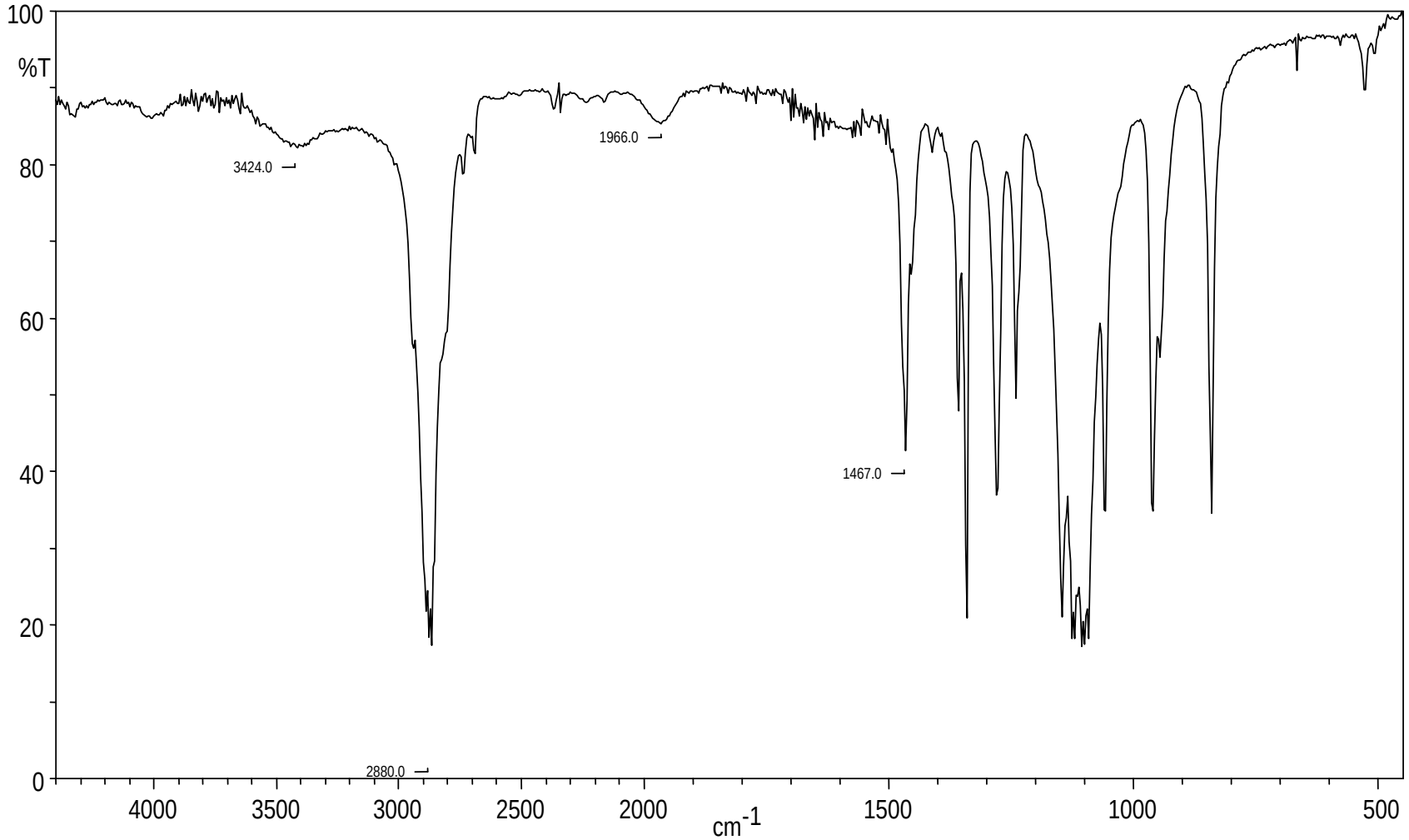


PLL-PEG-Synthese: Probe c'

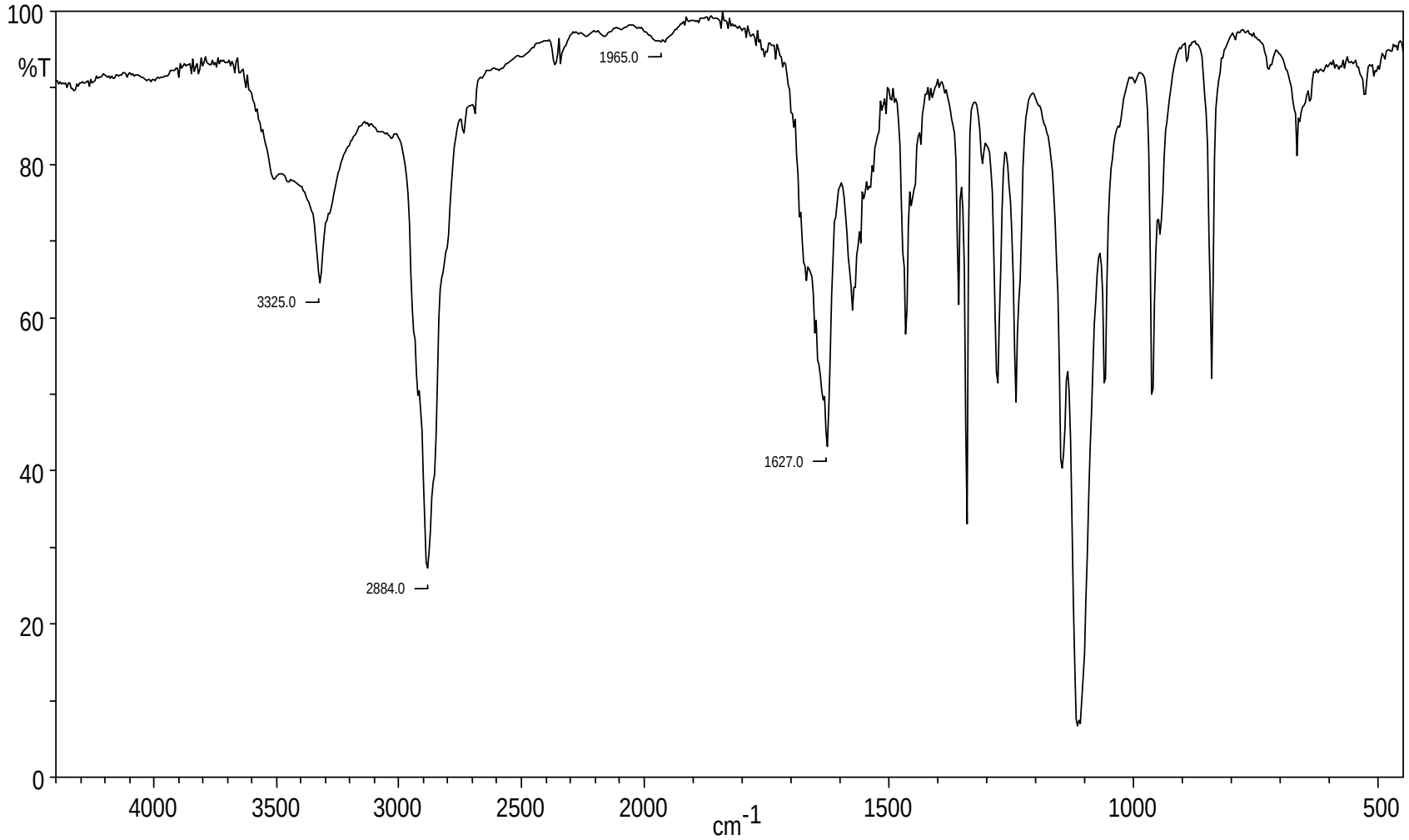



PLL-PEG-Synthese: Probe b'
100
%T
80
60
40
20
0
3428.0
2888.0
1958.0
1717.0
1466.0
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
cm-1

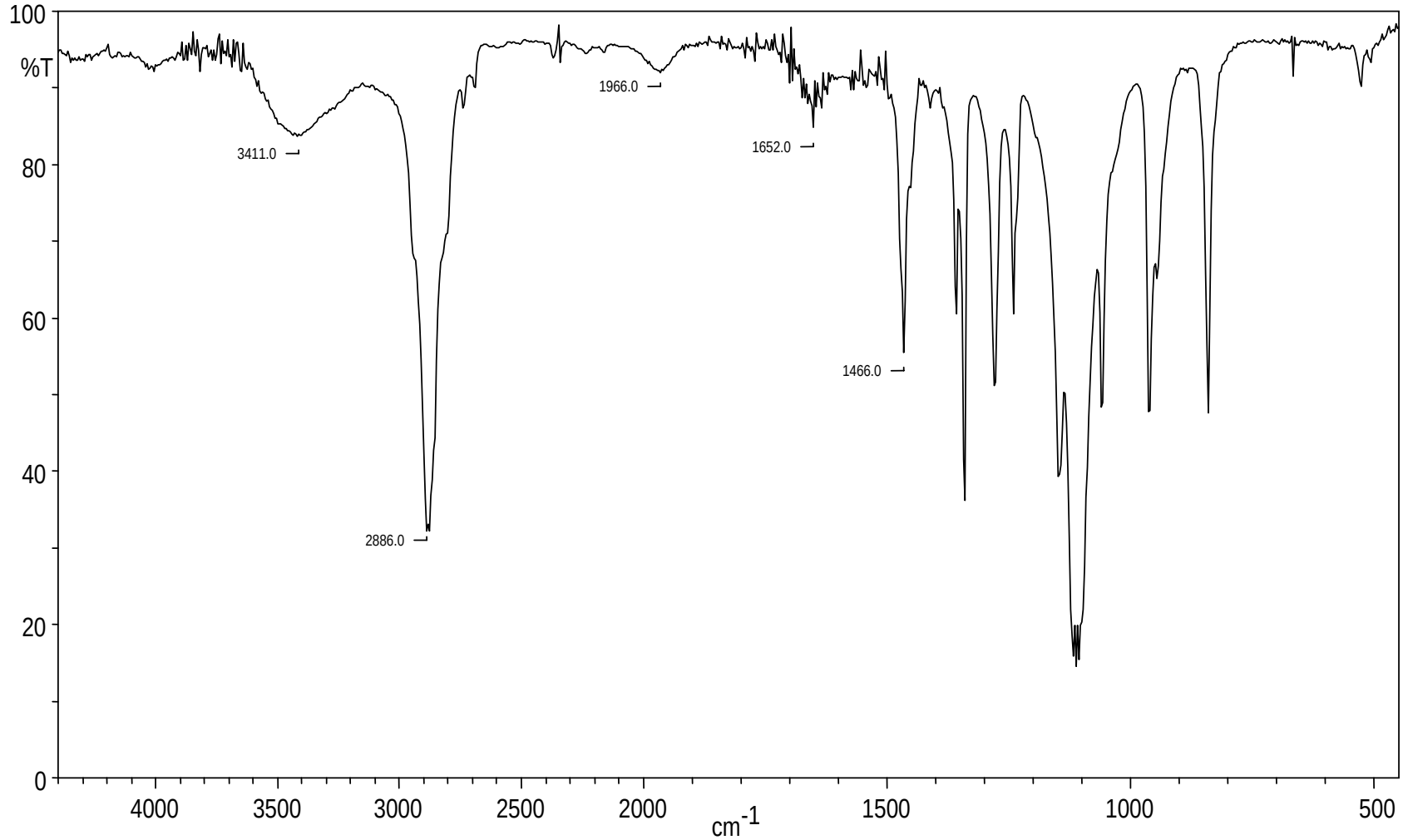
Amino-PEG 2000 (Fluka)



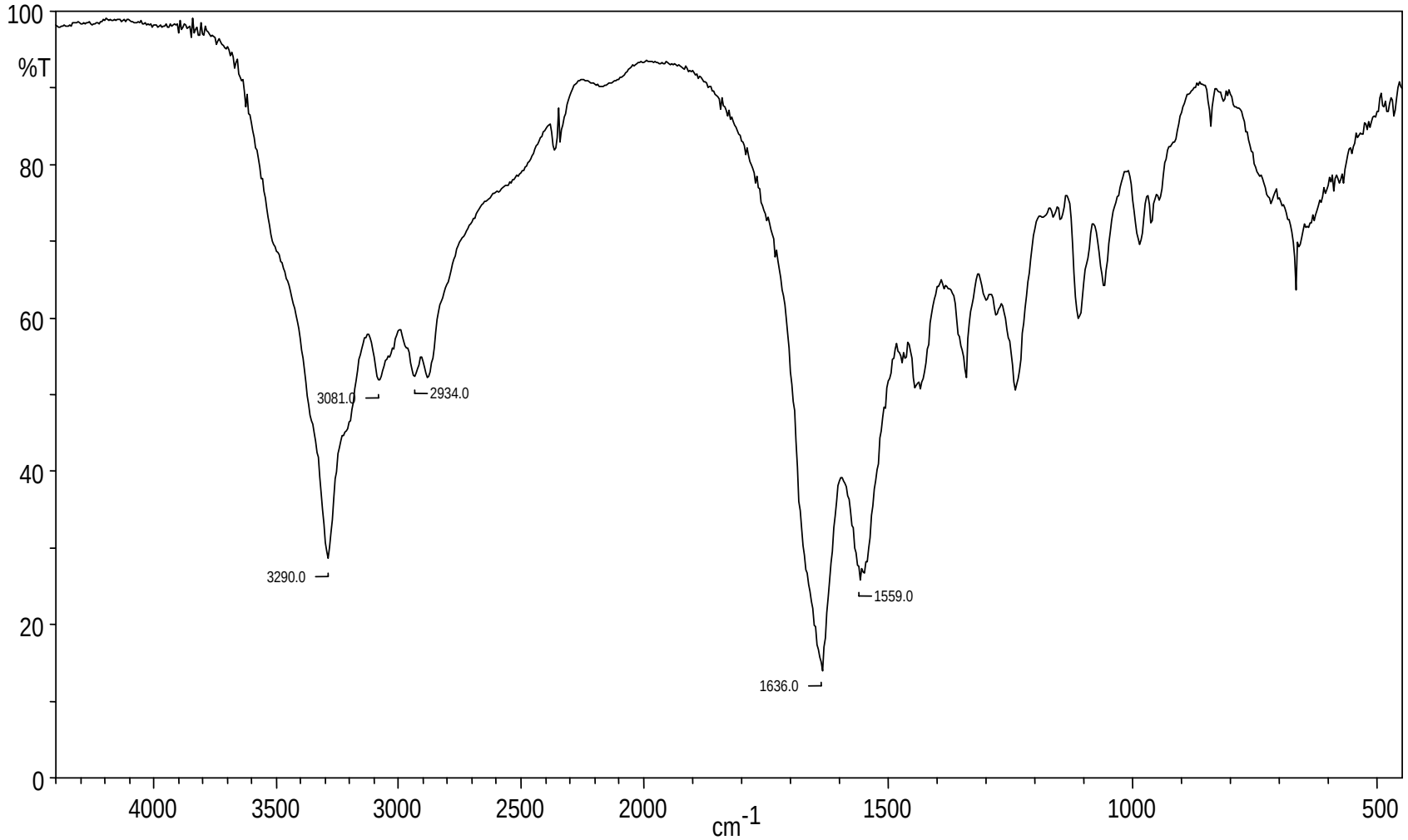
Amino-PEG Charge I



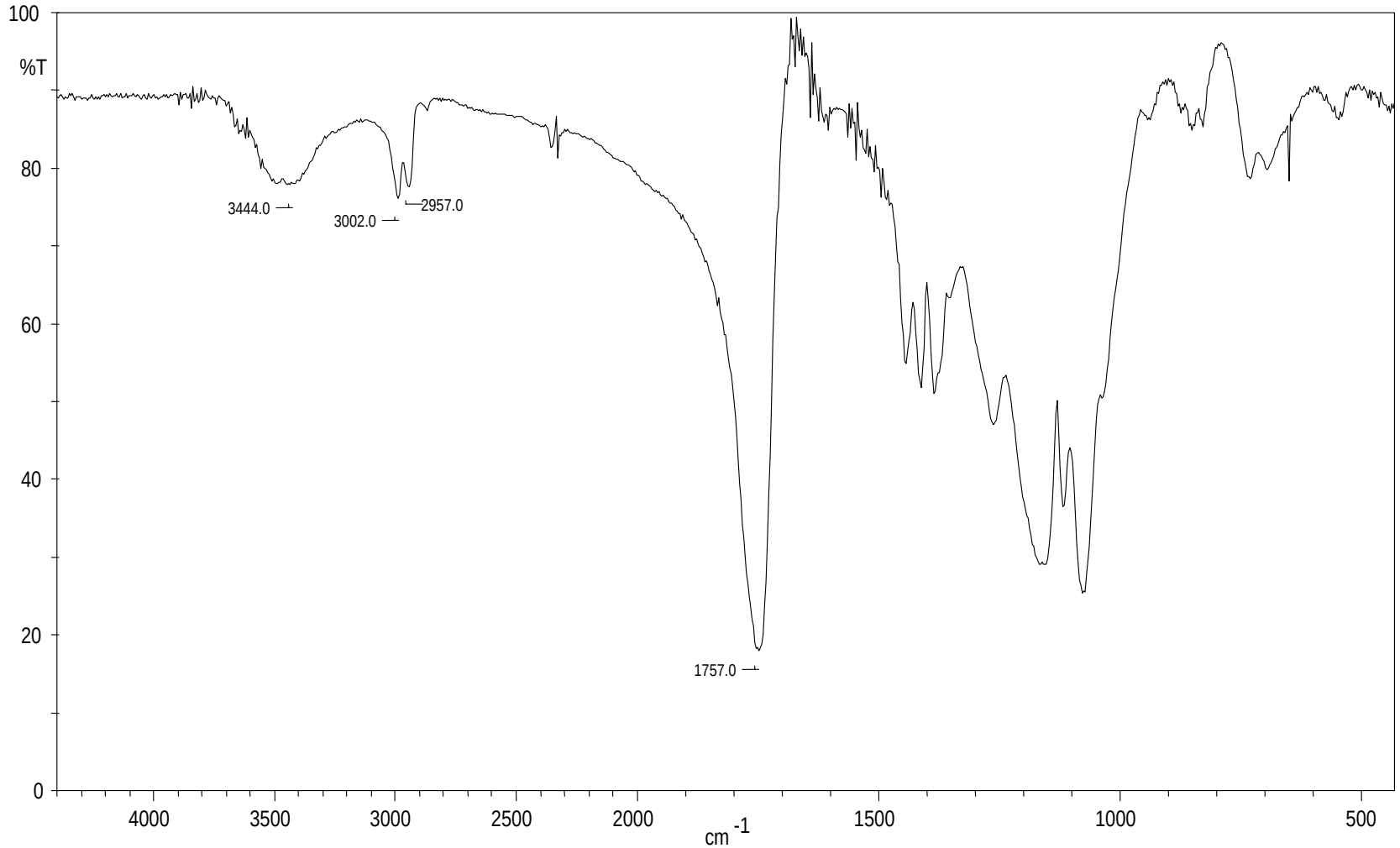
Amino-PEG Charge II



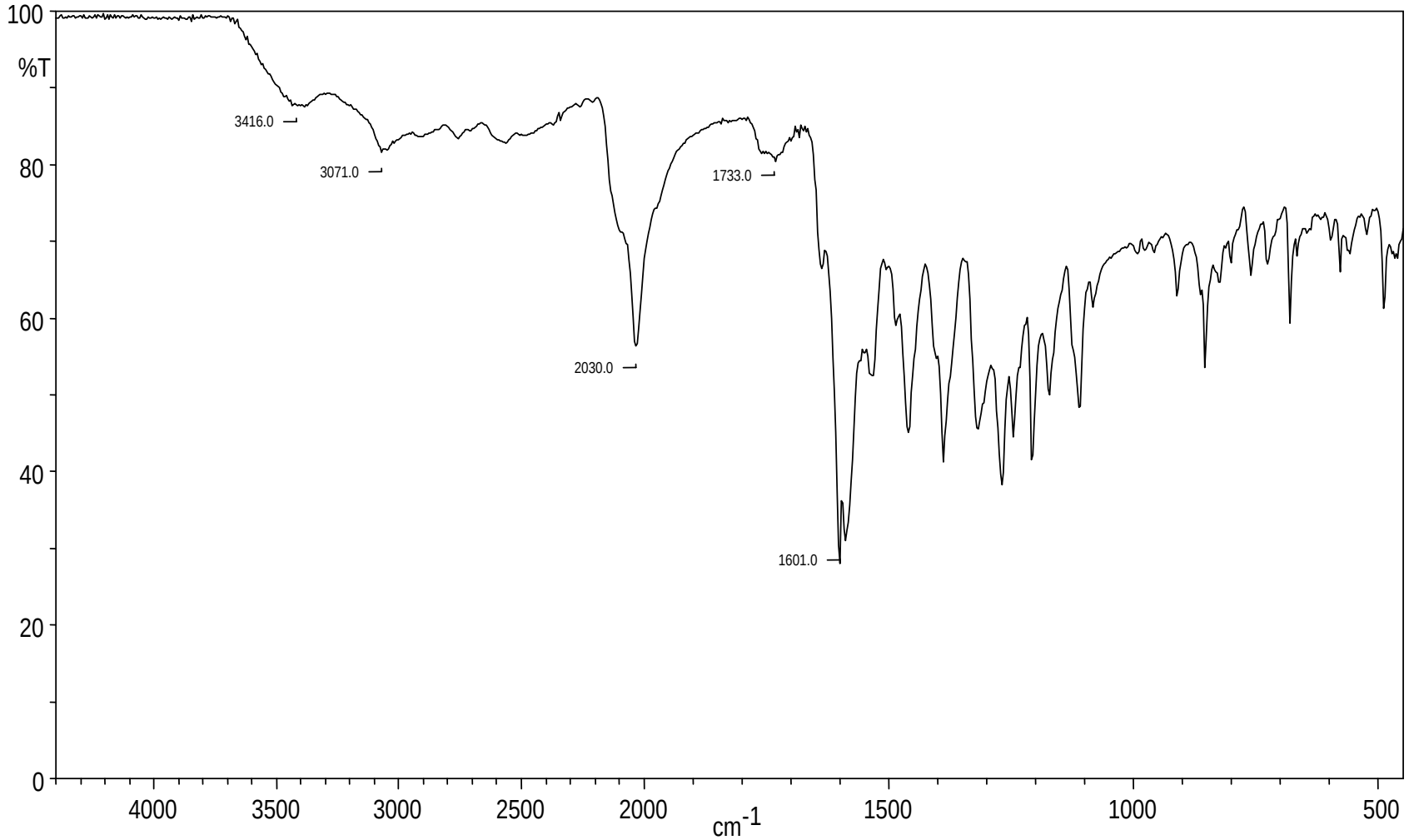
Niederschlag Charge III



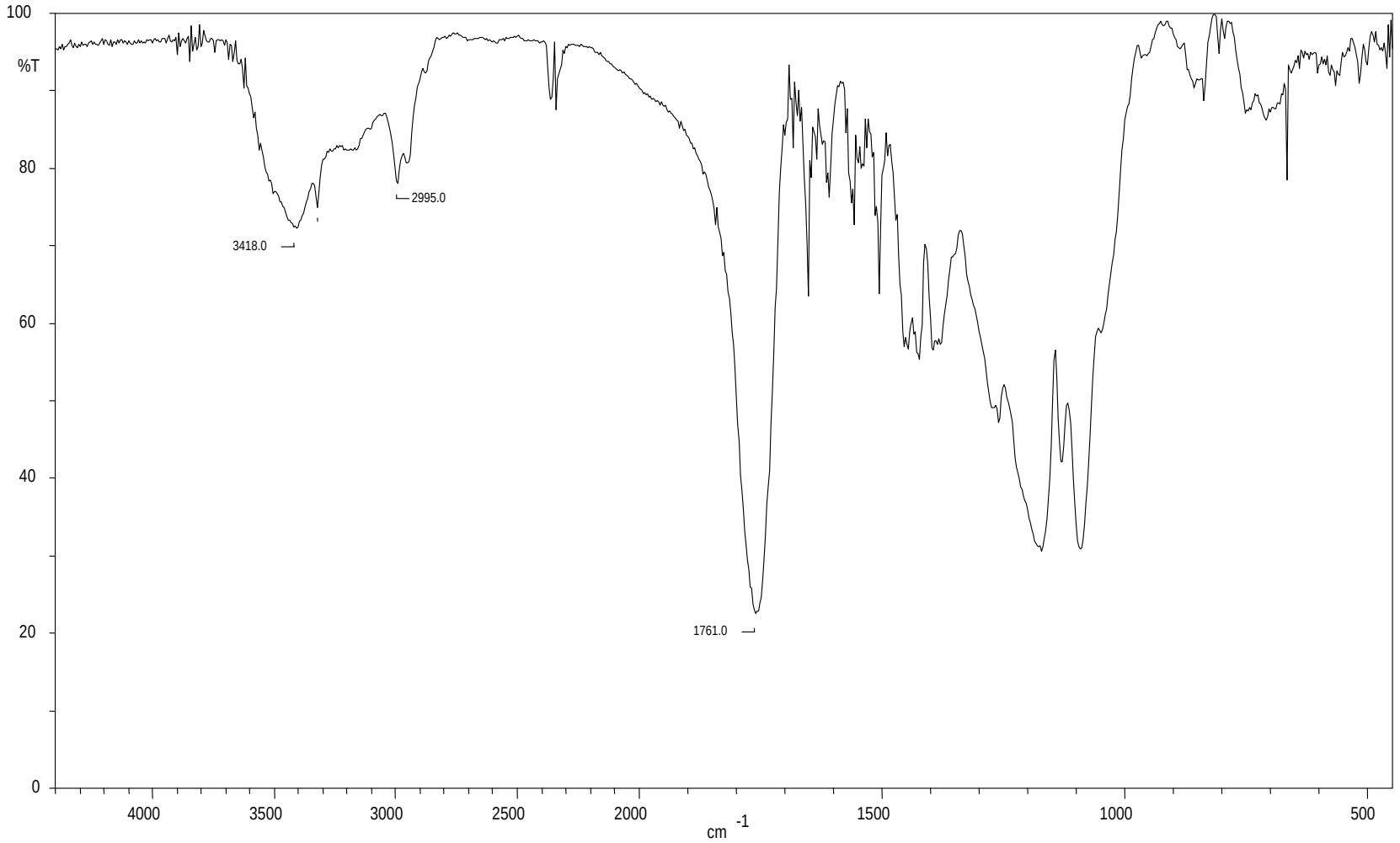
PLGA (RG 503 H, Böhringer Ingelheim)



FITC (Sigma)


100
%T
80
60
40
20
0
3416.0
3071.0
2030.0
1733.0
1601.0
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
cm-1

F-PLGA


100
%T
80
60
40
20
0
3418.0
2995.0
1761.0
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
cm -1