

Kationische Polycarbonat-basierte Nanogele zum Transport von immunstimulatorischen Oligonucleotiden

Bachelorarbeit

vorgelegt zur Erlangung des akademischen Grades “Bachelor of Science”
am Fachbereich für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Alexander Fuchs

geboren am 26. Februar 1998
in Frankfurt am Main

1. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Zentel
2. Gutachter: Dr. Lutz Nuhn

Mainz
November 2019

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von August bis November 2019 unter Aufsicht von Dr. L. Nuhn in der Gruppe von Prof. Dr. R. Zentel am Institut für Organische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz verfasst.

Ich, Alexander Fuchs, Matrikelnummer 2730333 versichere, dass ich meine Bachelorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen schriftlichen und elektronischen Quellen sowie andere Hilfsmittel benutzt habe. Alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, habe ich kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Einen großen Dank richte ich an Dr. Lutz Nuhn für die gute Betreuung, das Gutachten der Arbeit sowie für das interessante und ergiebige Thema.

Mein Dank gilt zudem Prof. Dr. Rudolf Zentel für die Übernahme des Gutachtens sowie die Bereitstellung seiner Laborräume. Auch Prof. Dr. Tanja Weil danke ich für die Bereitstellung ihrer Laborräume.

Weiterhin danke ich vor allem Christian Czysch für die Betreuung im Labor sowie die zahlreichen Ratschläge und auch den anderen Mitgliedern der Gruppen von Dr. Lutz Nuhn, PD. Dr. Matthias Barz und Prof. Dr. Rudolf Zentel für die fachliche Unterstützung und die schöne Zeit.

Zusammenfassung

In dieser Bachelorarbeit wurden kationische, kernvernetzte, Polycarbonat-basierte Nanogele synthetisiert und deren Beladung mit Poly-I:C (engl. *polyinosinic-polycytidylic acid*) untersucht. Poly-I:C ist eine synthetische doppelsträngige RNA (engl. *ribonucleic acid*), welche virale RNA imitiert und somit als Agonist am Toll-like-Rezeptor(TLR)3 immunstimulierend wirkt. Therapeutika, die Poly-I:C enthalten, zeigen Anwendungspotential als Impfungen gegen Krebstumore. Nanogele dienen als Transportsysteme, welche die Bioverfügbarkeit sowie die Aktivität der RNA am Wirkort erhöhen. Zusätzlich wird, auch durch die Abbaubarkeit des aliphatischen Polycarbonat-Rückgrates, die Toxizität gesenkt.

Diblockcopolymeren mit hydrophilem Poly(ethylenglycol)methylether(mPEG)-Block und hydrophobem Polycarbonat-Block wurden durch kationische, ringöffnende Polymerisation (ROP) von zyklischen Carbonat-Monomeren erhalten. Hierbei diente mPEG als Initiator und die Reaktion wurde durch Trifluormethansulfonsäure (TFMSA) katalysiert. Die sechsgliedrigen Carbonat-Monomere wurden in einer simplen einstufigen Synthese hergestellt, in der es durch Bis(pentafluorphenyl)carbonat in einer Reaktion zum Ringschluss und zur Funktionalisierung des Monomers mit einem Pentafluorphenyl-(PFP)-Reaktivester kam. Aus den Blockcopolymeren wurden in Ethanol durch Selbstassemblierung Mizellen hergestellt. Die Größe der Mizellen wurde mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt (*z-average* 39.4 nm, PDI 0.11). Durch Reaktion des Polyamins Spermin mit den PFP-Reaktivestern des Carbonat-Blocks wurden die Mizellen kernvernetzt und anschließend per DLS charakterisiert (*z-average* 75.7 nm, PDI 0.18). Die übrigen kationischen Amine des Spermins konnten mit den anionischen Phosphatgruppen der RNA Poly-I:C wechselwirken und ermöglichten somit eine Beladung. Ein maximales N:P(Amin zu Phosphat)-Beladungsverhältnis des Nanogels von 40:1 wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Die durch DLS bestimmte Größe des Nanogels nahm durch die Beladung mit dem relativ großen Poly-I:C (0.2-1kb) zu (*z-average* 227.5 nm, PDI 0.19). Die Abbaubarkeit des Carbonat-Nanogels im Basischen konnte zudem gezeigt werden.

Es handelt sich bei dem in dieser Arbeit synthetisierten Nanogel um ein geeignetes System für den Transport von kurzen Oligonucleotidketten. Ein Cotransport mit weiteren Immunstimulanzien oder Antigenen ermöglicht vielfältige Anwendungen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	RNA als Immuntherapeutika	1
1.2	Polycarbonate	4
2	Zielsetzung	7
3	Ergebnisse und Diskussion	8
3.1	Monomersynthese	8
3.2	Blockcopolymersynthese	11
3.2.1	Reaktionskontrolle und Umsatzbestimmung per NMR	14
3.2.2	Blocklängenbestimmung per NMR	15
3.2.3	Nebenreaktion Homopolymer	17
3.3	Synthese von Nanogelen zum Transport von RNA	18
3.3.1	Selbstassemblierung zu Mizellen	18
3.3.2	Kernvernetzung durch Reaktivesterchemie	19
3.3.3	Beladung des Nanogels	25
3.3.4	Abbau des Nanogels	32
4	Ausblick	34
5	Experimentalteil	35
5.1	Allgemeines und Analytik	35
5.2	Synthese	36
5.2.1	Monomersynthese	36
5.2.2	Blockcopolymersynthese	38
5.2.3	Nanogelsynthese	40
	Abkürzungsverzeichnis	44
	Abbildungsverzeichnis	47
	Literaturverzeichnis	48
	Anhang	50

1 Einleitung

1.1 RNA als Immuntherapeutika

Das Biopolymer Ribonucleinsäure (engl. *ribonucleic acid* (RNA)) wird im Zellkern durch Transkription synthetisiert und spielt in vielen essentiellen Prozessen wie der Proteinbiosynthese und der Genregulation eine Rolle. RNA ist aus einem Ribose-Phosphat-Rückgrat aufgebaut, an welches die Stickstoffbasen Adenin, Cytosin, Guanin und Uracil gebunden sind (siehe Abbildung 1).^[1]

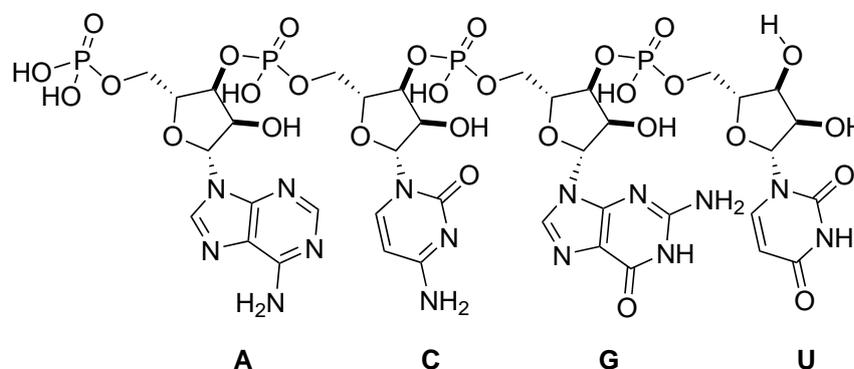


Abbildung 1: Ein Beispiel der Struktur von RNA mit den vier Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Uracil (U).

Verschiedene Typen von RNA zeigen Potential für eine medizinisch-therapeutische Anwendung, zum Beispiel in Form von Impfungen gegen Krebstumore.^[2,3] Unter solchen Immuntherapeutika, die aktuell klinische Studien durchlaufen, kommt auch *polyinosinic-polycytidylic acid stabilized with poly-L-lysine and carboxymethylcellulose* (Poly-ICLC) zum Einsatz, welches den Markennamen Hiltonol[®] trägt.^[4]

Tiere verfügen über ein angeborenes und ein adaptives Immunsystem, um sich gegen Bakterien, Viren und Parasiten zu schützen.^[1] Von zentraler Bedeutung für die angeborene Immunantwort ist die Rezeptorklasse der Toll-like-Rezeptoren (TLR). RNA-basierte Medikamente können als Immunstimulanzien für das angeborene Immunsystem wirken, indem sie an einen TLR binden und diesen aktivieren. Die TLRs dienen in Säugetieren als Sensoren für unerwünschte mikrobielle und virale Bestandteile und lösen über Signalwege Immunantworten aus.^[5,6]

Die in Poly-ICLC enthaltene RNA *polyinosinic-polycytidylic acid* (Poly-I:C) ist ein TLR3-Agonist. Der TLR3 erkennt virale Bestandteile wie doppelsträngige Ribonucleinsäuren (engl. *double-stranded ribonucleic acid* (dsRNA)) und leitet eine vermehrte Bildung von Interferonen, einer Klasse von Cytokinen, die antitumoral sowie antiviral wirken, ein. Das Poly-I:C ist eine synthetische doppelsträngige RNA, welche strukturelle Ähnlichkeit zur viralen RNA aufweist. Ein Strang besteht hierbei aus Inosin-Nucleotiden und der komplementäre Strang aus Cytidin-Nucleotiden.^[5,6]

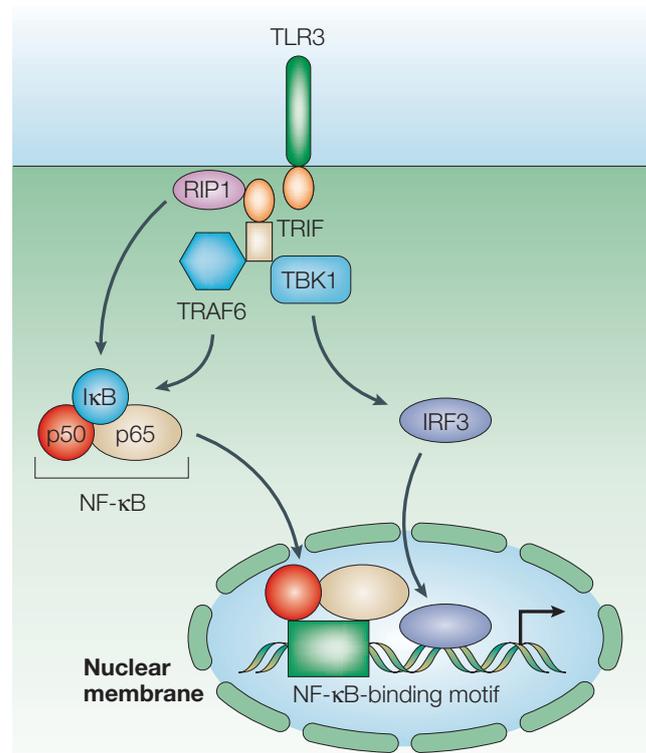


Abbildung 2: Schema von einem Signalweg des angeborenen Immunsystems, der durch Aktivierung von TLR3 ausgelöst wird und bei dem es zur Aktivierung von Interferon-Genen kommt.^[7]

Bindet ein Agonist wie Poly-I:C an den Transmembranrezeptor TLR3, so wird dieser aktiviert und es kommt zu einer Signalkaskade (siehe Abbildung 2). Diese beinhaltet die beiden Transkriptionsfaktoren NF- κ B und IRF3, welche durch die Kernporen in den Zellkern gelangen und dort an die DNA binden. Dadurch kommt es zur vermehrten Transkription von Genen, die zum Beispiel für Interferone kodieren und somit zu einer Immunantwort führen.^[7]

Eine Problematik von TLR-Agonisten ist deren systemische Aktivität, die zu unerwünschter Toxizität und Entzündungen führt. Es gilt somit, bei solchen Medikamenten die allgemeine systemische Aktivität zu unterdrücken und eine möglichst hohe lokale Aktivität am Wirkort zu erzeugen. Dies konnte bereits mit Imidazochinolin (IMDQ), einem TLR7/8-Agonisten, durchgeführt werden. Dieser wurde in ein Polymethacrylat-Nanogel eingebunden und die *in vivo* Aktivität allein auf die Lymphknoten beschränkt, während die systemische Entzündung unterbunden wurde. Durch Einbindung in Nanogele lässt sich somit die Problematik der systemischen Aktivität der RNA geschickt lösen und auf die Lymphknoten beschränken.^[2,8,9]

Des Weiteren ist die niedrige Stabilität von freier RNA problematisch. Mit polymeren Nanogelen kann die Stabilität der RNA im Organismus und die Membrangängigkeit erhöht werden.^[10] Die durch das Trägersystem gesteigerte Bioverfügbarkeit resultiert dann in einem wirksameren Therapeutikum. Es konnten schon polyanionische RNA-Stränge mit in diesem Fall kationischen Trägersystemen transportiert werden. Für *small interfering ribonucleic acid* (siRNA) und *messenger ribonucleic acid* (mRNA) wurde dies mit kationischen Polymethacrylat-Nanogelen gezeigt.^[11,12] DNA lässt sich auf die gleiche Weise in das Trägersystem einbinden. Mit CpG(Cytidin-Phosphat-Guanosine)-Oligonucleotiden, einer einzelsträngigen DNA (ssDNA), die Agonist am TLR9 ist, wurden kationische Nanogele erfolgreich beladen.^[2]

Bei der Synthese dieser Nanogele werden Pentafluorphenol (PFP)-Ester auf Polymere eingeführt. Dies geschieht in Form von Blockcopolymeren, welche dann durch Selbstassemblierung in Lösungsmitteln wie Ethanol oder Dimethylsulfoxid (DMSO) zu Blockcopolymer-Mizellen umgesetzt werden. Definierte Nanostrukturen können somit gebildet werden. Die Aktivester können zur Funktionalisierung und zur Bildung von kernvernetzten Nanogelen genutzt werden. Das Polyamin Spermin ist hierfür ein geeignetes Beispiel. Über zwei Amide wird das Nanogel kernvernetzt. Zudem bleiben zwei kationische Amine bestehen, die mit den anionischen Phosphatgruppen der zu transportierenden RNA wechselwirken können.^[11,12]

Eine Schwachstelle dieser Polymethacrylat-basierten Nanogele ist, dass sie nicht biologisch abbaubar sind und sich somit im Organismus akkumulieren können. Aliphatische Polycarbonate bieten sich deshalb als alternatives, abbaubares Material an.^[13,14,15]

1.2 Polycarbonate

Polycarbonatkunststoffe, die ein aromatisches Rückgrat aufweisen, haben vielfältige Anwendungen und werden oft durch Polykondensation von Diolen wie Bisphenol A mit Kohlensäure-Derivaten wie Phosgen erhalten (siehe Abbildung 3). Polycarbonate zeichnen sich durch ihre Stabilität, Hitzebeständigkeit, elektrische Isolierfähigkeit und Transparenz aus.^[16]

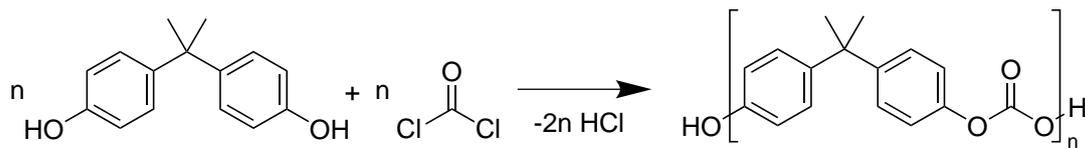


Abbildung 3: Synthese eines aromatischen Polycarbonats aus Bisphenol A und Phosgen durch Polykondensation unter Freisetzung von Chlorwasserstoff.^[16]

Aliphatische Polycarbonate, also Polycarbonate ohne aromatische Gruppen zwischen den Carbonaten, wurden erstmal 1930 beschrieben.^[17] Sie weisen im Gegensatz zu den aromatischen Polycarbonaten niedrige Schmelzpunkte, niedrige Glasübergangstemperaturen und hohe Elastizität auf. Das macht sie zusammen mit ihrer Abbaubarkeit attraktiv für biomedizinische Anwendungen.^[18] Aliphatische Polycarbonate können im Gegensatz zu anderen Materialien wie Polymethacrylaten enzymatisch sowie hydrolytisch gespalten werden und akkumulieren nicht weiter im Organismus. Dies sollte zu geringen Toxizitäten führen.^[13,14]

Als Monomer für die in dieser Arbeit verwendeten aliphatischen Polycarbonate wurde ein sechsgliedriges cyclisches Carbonat, das einen reaktiven PFP-Ester trägt, gewählt. Dieses lässt sich in einer simplen einstufigen Synthese aus 2,2-Bis(hydroxymethyl)propionsäure (bis-MPA) und Bis(pentafluorphenyl)carbonat mit Caesiumfluorid als Katalysator herstellen.^[19] Das cyclische Monomer lässt sich dann über die ringöffnende Polymerisation (ROP) polymerisieren.^[20,21] Bei der ROP von cyclischen Carbonaten gibt es anionische (basenkatalysierte), kationische (säurekatalysierte) und Übergangsmetallkatalysierte Varianten. Mit dem PFP-Ester ist die kationische ROP (siehe Abbildung 4) zu bevorzugen, da ein basischer Katalysator den Ester nukleophil angreifen kann. Das hierbei freiwerdende saure PFP kann dann den Katalysator inaktivieren. Toxische und schwer aus dem synthetisierten Polymer zu entfernende Übergangsmetalle als Katalysatoren sind für biologische Anwendungen ebenfalls ausgeschlossen.^[22]

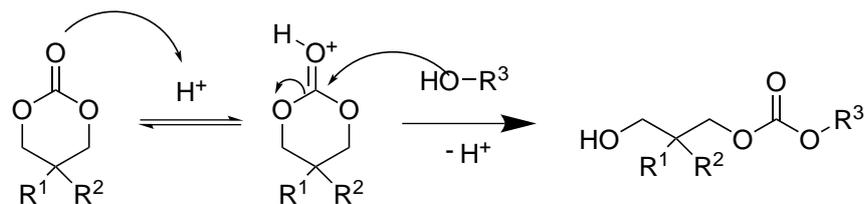


Abbildung 4: Die kationische ROP ist dargestellt. Ein Alkohol fungiert als Initiator und greift das durch die Säure aktivierte cyclische Carbonat-Monomer an. Dabei entsteht eine Alkohol-Gruppe, die das nächste Monomer angreifen kann und somit die Polymerisation fortführt.^[21]

Unter Säurekatalyse kann ein Monomer aktiviert werden und in einer Nebenreaktion auch mit einem zweiten Monomer reagieren (siehe Abbildung 5). Nach Abspaltung von Kohlenstoffdioxid kann der entstehende Alkohol analog zu einem anderen Alkohol wie bei Poly(ethylenglycol)methylether (mPEG) als Initiator zur Polymerisation dienen (siehe Abbildung 4). Zudem ist auch das andere Ende des Moleküls reaktiv, kann von weiteren Monomeren angegriffen werden und somit ebenfalls die Polymerisation initiieren. Dieses bidirektionale Polymerwachstum führt in einer Nebenreaktion zu einem unerwünschten, schnellen Kettenwachstum der Homopolymere.^[20]

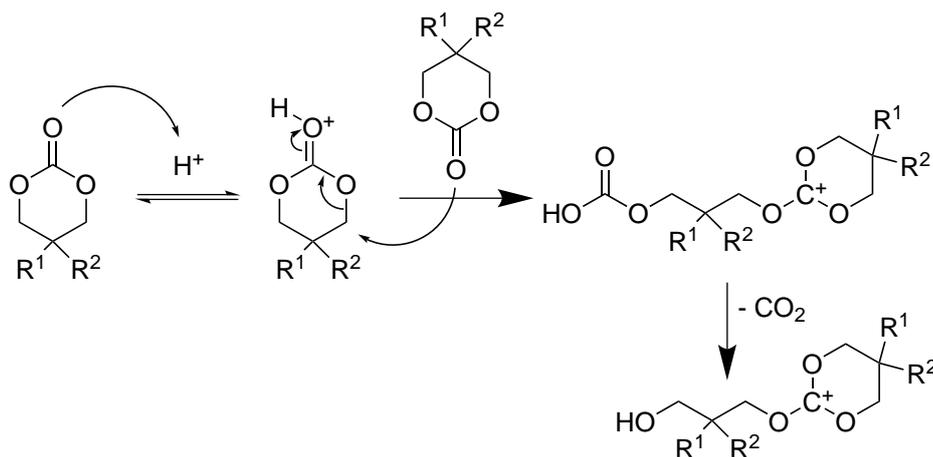


Abbildung 5: Zwei Monomere können miteinander reagieren und somit selbst die Polymerisation initiieren. In der Folge kommt es zur Bildung von Homopolymeren.^[20]

PFP-Ester ermöglichen eine einfache Funktionalisierung der Polymere. Über eine Aminolyse (siehe Abbildung 6) können Farbstoffe sowie Wirkstoffe angebunden werden und auch kernvernetzte Nanogele aus Polycarbonat-Blockcopolymeren hergestellt werden.^[23] Die Umsetzung mit Aminen beeinflusst hierbei das Polymerrückgrat nicht signifikant. Durch die Kernvernetzung werden jeweils zwei Polymerketten innerhalb einer Mizelle mit einander kovalent verbunden. Dies soll die Stabilität des Nanogels erhöhen und eine feste Größe erhalten. Auch kationische Polycarbonate konnten so bereits erhalten werden. Diese eignen sich, um polyanionische Moleküle wie RNA zu transportieren.^[22,24]

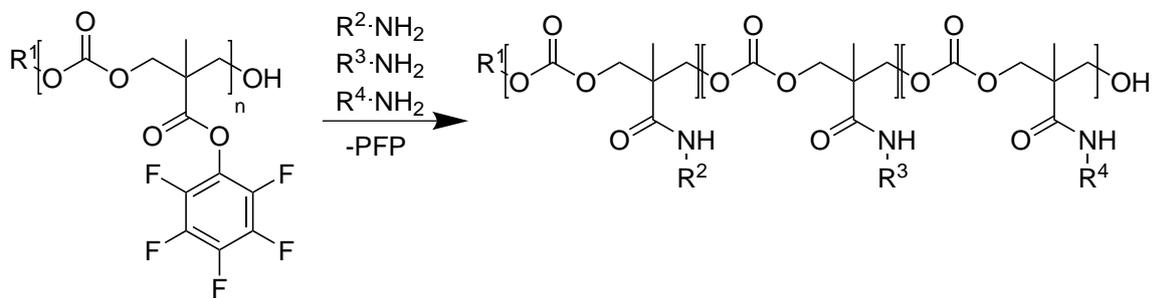


Abbildung 6: Die Umsetzung der PFP-Reaktivester mit Aminen zur Funktionalisierung des Polymers ist dargestellt.

2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, kationisch modifizierte Polycarbonate und Polycarbonat-Nanogele miteinander zu kombinieren und somit kationische Polycarbonat-basierte Nanogele zu erhalten (siehe Abbildung 7). Diese Nanogele sollen hergestellt und mit polyanionischen, immunstimulatorischen Oligonucleotiden wie Poly-I:C beladen werden. Somit wird ein abbaubares Trägersystem erhalten, welches die Effizienz von RNA-basierten Medikamenten erhöht und deren Toxizität senkt.

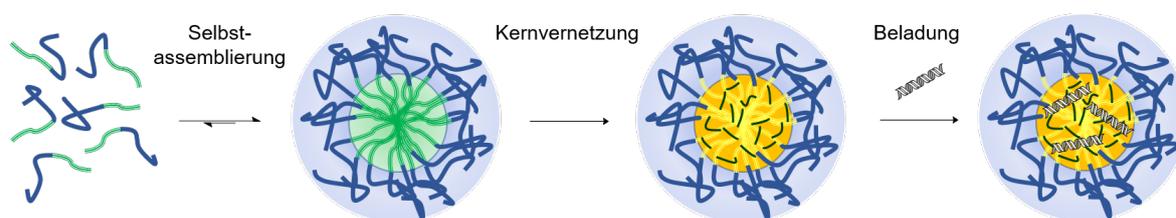


Abbildung 7: Schema der Synthese beladener Nanogele. Zunächst werden die amphiphilen Blockcopolymeren mit hydrophilem mPEG- (blau) und hydrophobem Polycarbonat-Block (grün) hergestellt. Es folgt die Selbstassemblierung in Ethanol zu Mizellen. Diese werden mit Spermin kernvernetzt und funktionalisiert. Der letzte Schritt ist die Beladung des Nanogels mit Poly-I:C. Abbildung und weitere Ausschnitte daraus zur Verfügung gestellt von Christian Czysch.

3 Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Arbeit dargestellt und diskutiert. Zunächst wird die Synthese des Monomers und die kationische ROP dieser Monomere zu Blockcopolymeren beschrieben. Dann wird die Selbstassemblierung der Blockcopolymere zu Mizellen und die darauf folgende Nanogelsynthese gezeigt. Es folgt die Beladung des Nanogels mit der RNA Poly-I:C und die Abbaubarkeit des Nanogelträgers.

3.1 Monomersynthese

Das cyclische Carbonat-Monomer 5-Methyl-5-pentafluorphenyloxycarbonyl-1,3-dioxan-2-on (MTC-PFP) wurde in einer einstufigen Synthese aus bis-MPA und Bis(pentafluorphenyl)carbonat hergestellt:^[19]

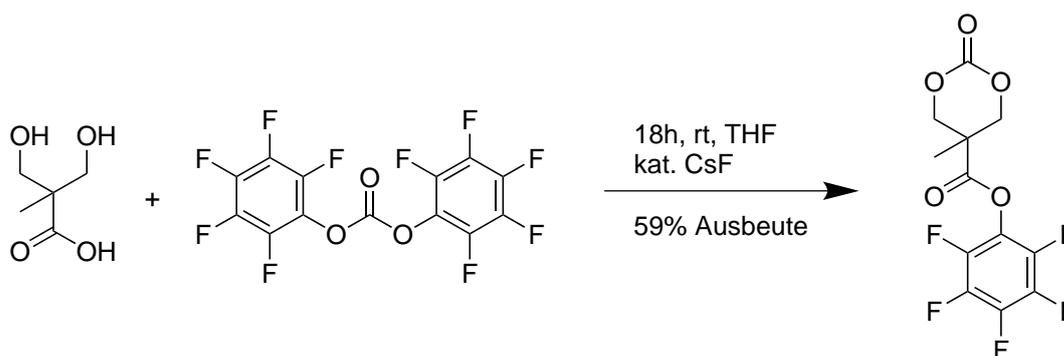


Abbildung 8: Synthese von 5-Methyl-5-pentafluorphenyloxycarbonyl-1,3-dioxan-2-on MTC-PFP. Bis-MPA wurde in einer einstufigen Synthese mit Bis(pentafluorphenyl)carbonat für 18 Stunden bei Raumtemperatur in THF unter CsF-Katalyse umgesetzt um das cyclische Carbonat-Monomer zu erhalten.

Bei dieser Synthese kommt es durch Bis(pentafluorphenyl)carbonat zum Ringschluss des 1,3-Diols und zur Veresterung der Carboxygruppe zu einem reaktiven PFP-Ester. Caesiumfluorid wird als Katalysator verwendet, um die Cyclisierung zu ermöglichen und zudem die Veresterung zu katalysieren.^[19] Die Edukte sind kommerziell erhältlich, die Reaktionsführung sowie Aufarbeitung simpel und das Produkt gut lagerbar. Das Monomer kann mittels Aminolyse des PFP-Esters auch zur Polymerisation leicht verschiedener Derivate verwendet werden.

In diesem Fall wurden die reaktiven Ester jedoch später bei der Synthese des Nanogels genutzt. Nach Umkristallisation aus Essigsäureethylester und Hexan war das Produkt frei von organischen Verunreinigungen, wie dem bei der Reaktion entstehendem PFP (Abbildungen 10 und 11).

Bei der Synthese werden die Edukte nicht im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Von dem Bis(pentafluorphenyl)carbonat werden 2.5 Äquivalente im Bezug auf 1 Äquivalent bis-MPA verwendet. Dies begründet sich darin, dass für den Ringschluss und die Veresterung jeweils ein Molekül Bis(pentafluorphenyl)carbonat notwendig ist. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte der Reaktion grob dargestellt:

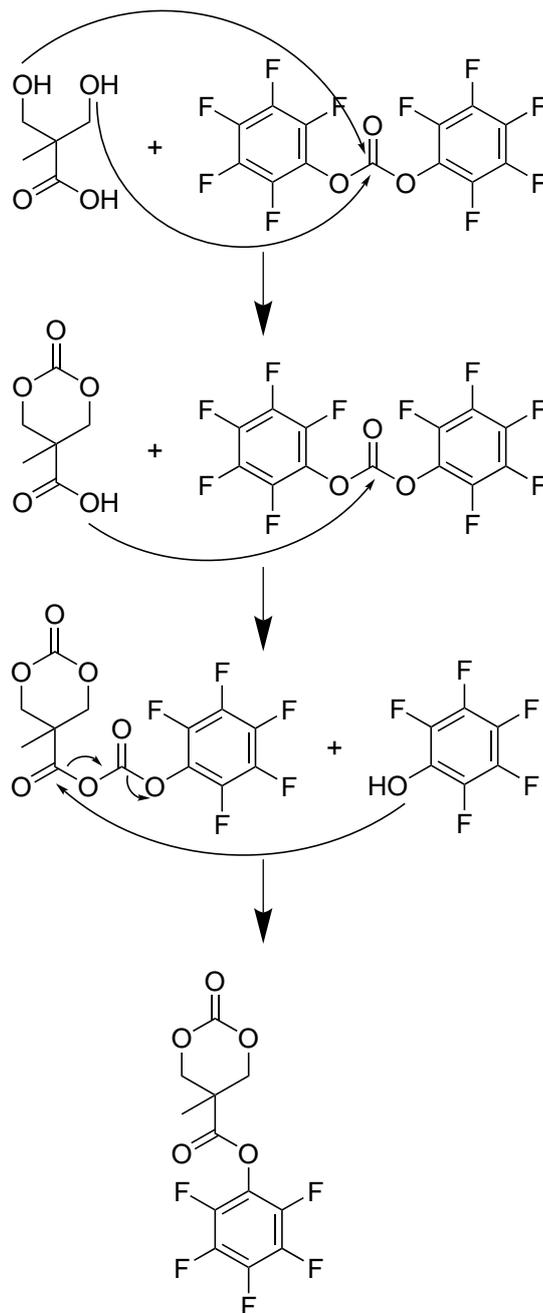


Abbildung 9: Schema der Cyclisierung und Veresterung des bis-MPA mit Bis(pentafluorphenyl)carbonat zum cyclischen Carbonat-Monomer MTC-PFP. In beiden Schritten wird jeweils ein Molekül Bis(pentafluorphenyl)carbonat umgesetzt.

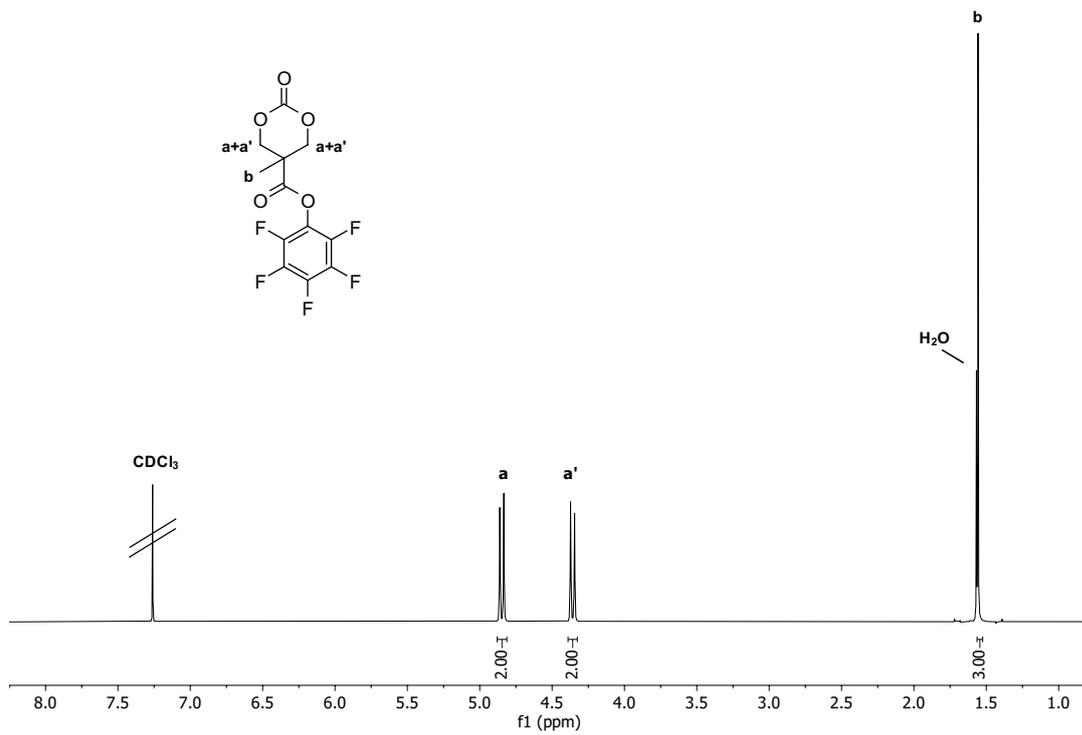


Abbildung 10: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) von 5-Methyl-5-pentafluorphenyloxycarbonyl-1,3-dioxan-2-on in CDCl_3 .

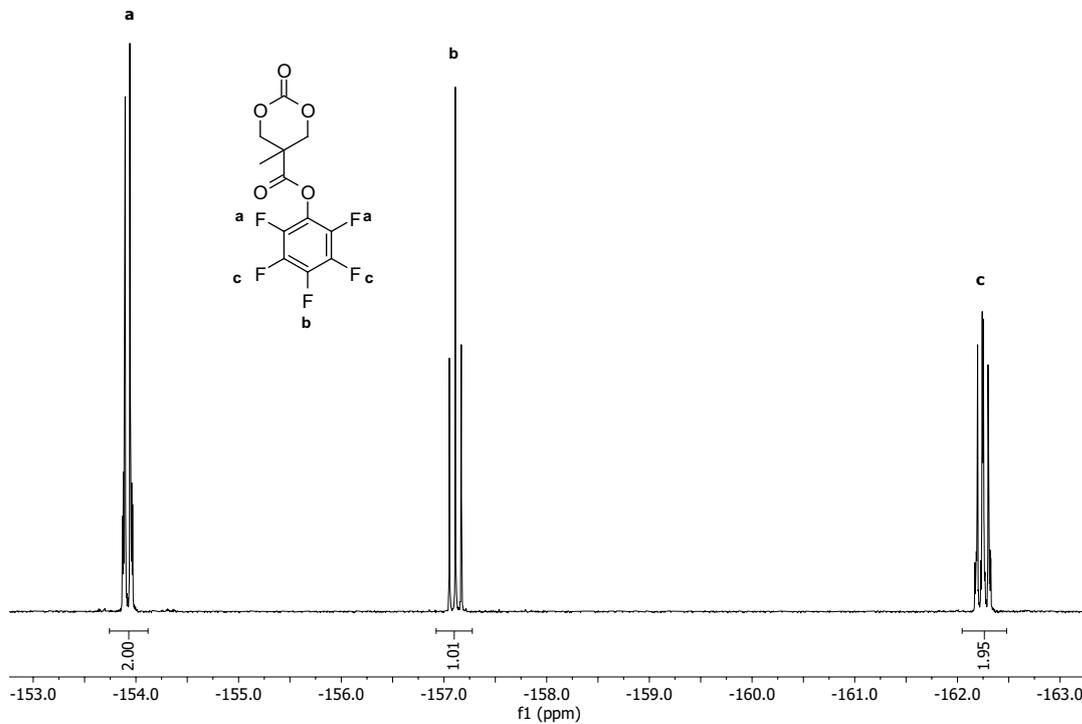


Abbildung 11: $^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz) von 5-Methyl-5-pentafluorphenyloxycarbonyl-1,3-dioxan-2-on in CDCl_3 .

3.2 Blockcopolymersynthese

Ausgehend von mPEG-5k (Molekulargewicht 5000 g mol^{-1} , 114 Wiederholungseinheiten) wurden Synthesen für Carbonat-Blocklängen von 30, 35 und 40 Wiederholungseinheiten angesetzt:

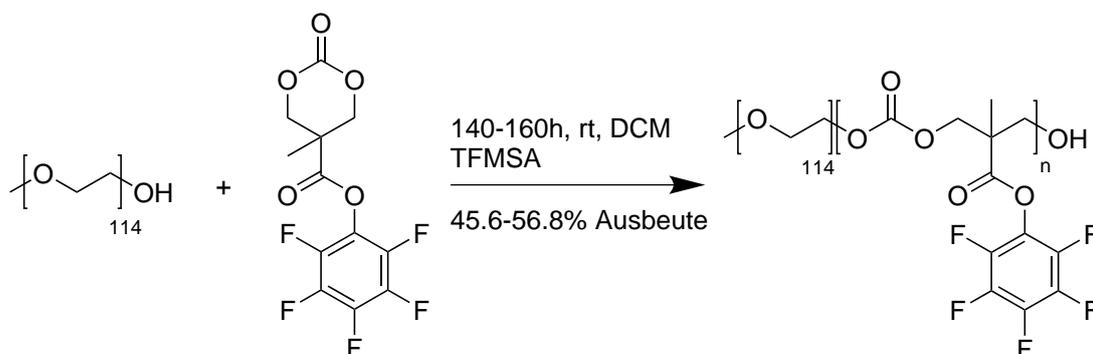


Abbildung 12: Synthese von mPEG₁₁₄-*b*-Poly(MTC-PFP). 30, 35 und 40 Äquivalente des Carbonat-Monomer wurden für 140-160 Stunden bei Raumtemperatur in DCM durch kationische ROP umgesetzt. Die Polymerisation wurde durch mPEG-5k initiiert und durch TFMSA katalysiert.

Die ROP erfolgte unter kationischer Katalyse in Dichlormethan (DCM) bei Raumtemperatur für 140 bis 160 Stunden. Als saurer Katalysator wurde Trifluormethylsulfonsäure (TFMSA) verwendet. Die Reaktionen wurden trocken und unter Inertgas in der Glovebox durchgeführt. Zur Aufreinigung wurden die Blockcopolymere in kaltem Diethylether mehrfach gefällt. Die NMR-Spektren der aufgereinigten Blockcopolymere sind in Abbildungen 13 und 14 gezeigt. In folgender Tabelle sind Eigenschaften der Blockcopolymere zusammengefasst:

Tabelle 1: Eigenschaften der synthetisierten Blockcopolymere. X_n^{theo} ist die theoretische Blocklänge, die sich aus dem angesetzten Verhältnis zwischen Initiator und Monomer ergibt. X_n^{Umsatz} ist die Blocklänge, die sich aus dem Umsatz ergibt. X_n^{real} ist die reale Blocklänge, die aus dem NMR des aufgereinigten Produktes bestimmt wurde und M_n^{real} die hieraus berechnete molare Masse. Die Dispersität \bar{D} wurde per GPC bestimmt.

Polymer	X_n^{theo}	Umsatz (NMR)	X_n^{Umsatz}	X_n^{real} (NMR)	M_n^{real} /g mol ⁻¹	\bar{D} (GPC)
mPEG ₁₁₄					5000	1.09
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -Poly(MTC-PFP) ₂₆	30	93.9%	28	26	13481	1.19
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -Poly(MTC-PFP) ₂₈	35	91.9%	32	28	14133	1.17
mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -Poly(MTC-PFP) ₂₉	40	84.2%	34	29	14459	1.16

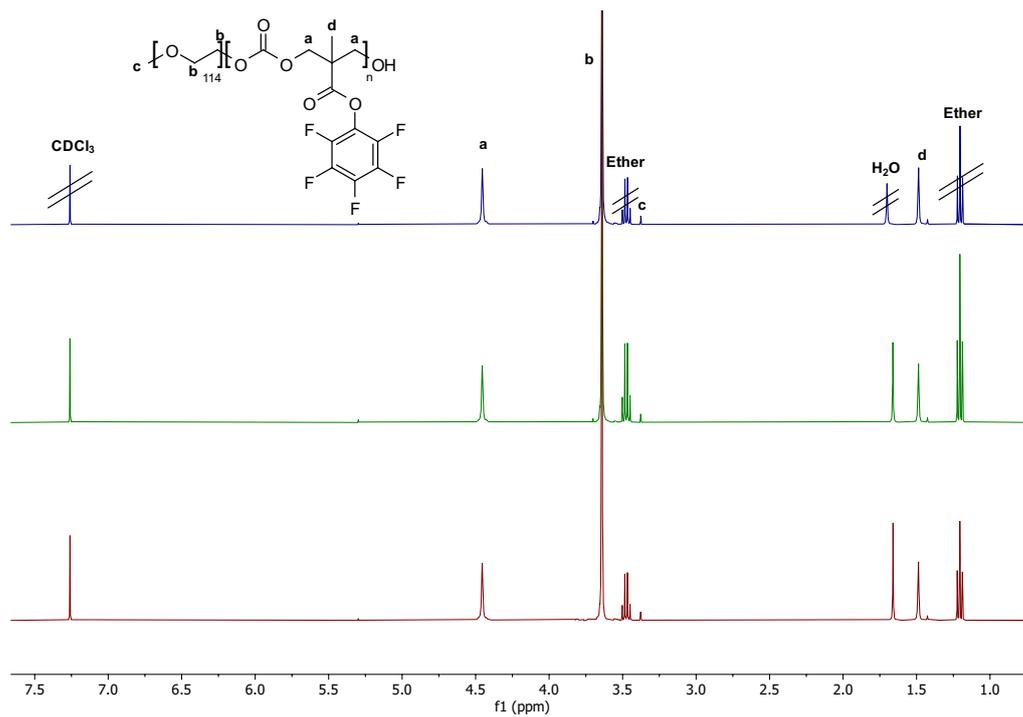


Abbildung 13: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) von $m\text{PEG}_{114}\text{-}b\text{-Poly(MTC-PFP)}$ in CDCl_3 . In blau ist der Ansatz mit 30, in grün der Ansatz mit 35 und in rot der Ansatz mit 40 Äquivalenten an eingesetztem Carbonat-Monomer zu sehen.

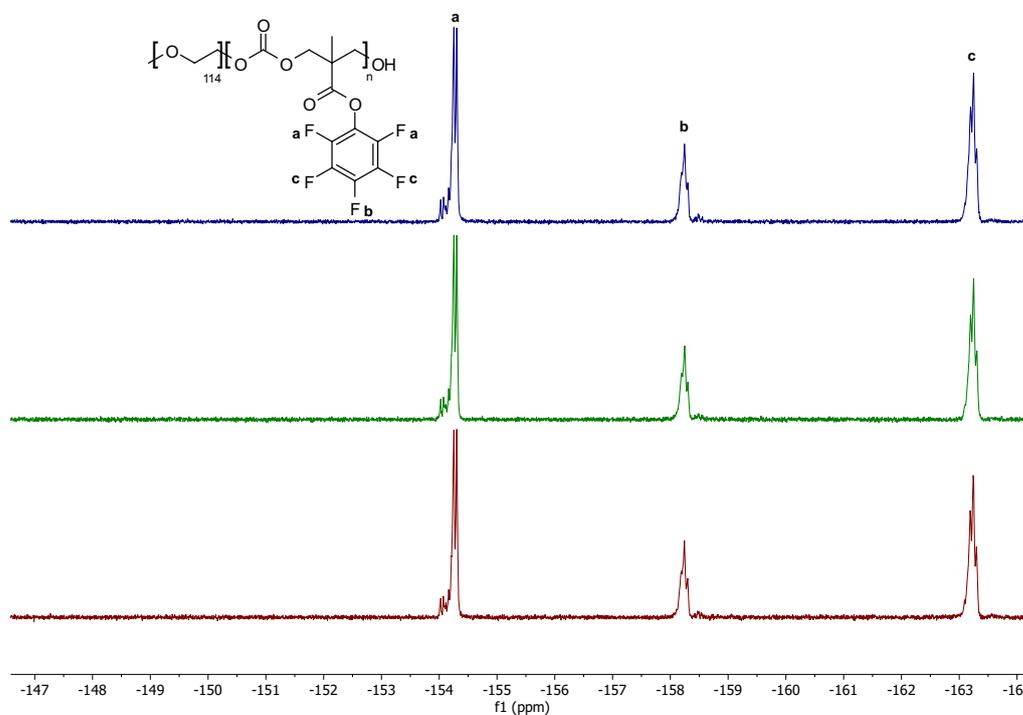


Abbildung 14: $^{19}\text{F-NMR}$ (376 MHz) von $m\text{PEG}_{114}\text{-}b\text{-Poly(MTC-PFP)}$ in CDCl_3 . In blau ist der Ansatz mit 30, in grün der Ansatz mit 35 und in rot der Ansatz mit 40 Äquivalenten an eingesetztem Carbonat-Monomer zu sehen.

Von den aufgereinigten Blockcopolymeren wurden Gelpermeationschromatographie (GPC)-Messungen durchgeführt:

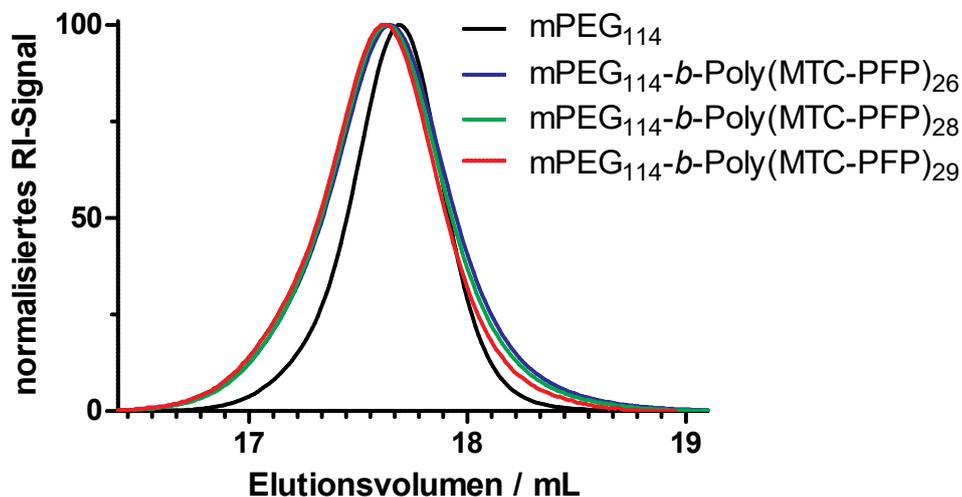


Abbildung 15: GPC-Messungen der gefällten Blockcopolymeren mit 26, 28 und 29 Carbonat-Wiederholungseinheiten sowie des mPEG₁₁₄ als Referenz sind dargestellt. Die Signale stammen vom RI-Detektor (Brechungsindex).

Die GPC-Messungen der Blockcopolymeren zeigen monomodale Verteilungen. Die Dispersitäten D sind in Tabelle 1 festgehalten. Alle Kurven zeigen gegenüber der mPEG₁₁₄-Referenz einen Shift nach links also zu höheren Massen. Dabei sind die Kurven der Blockcopolymeren mit mehr Carbonat-Wiederholungseinheiten weiter nach links verschoben.

3.2.1 Reaktionskontrolle und Umsatzbestimmung per NMR

Zur Reaktionskontrolle der Polymerisationsansätze wurden NMR-Messungen verwendet. Dazu wurden kleine Mengen der Polymerisationslösung entnommen, mit Deuteriochloroform verdünnt und dann darin vermessen. Im Verlauf der Reaktion lässt sich beobachten, dass die Signale des Monomers (siehe Abbildung 10, Signale **a** und **a'**) abnehmen und die Signale des Polymer-Rückgrats (siehe Abbildung 13, Signal **a**) zunehmen:

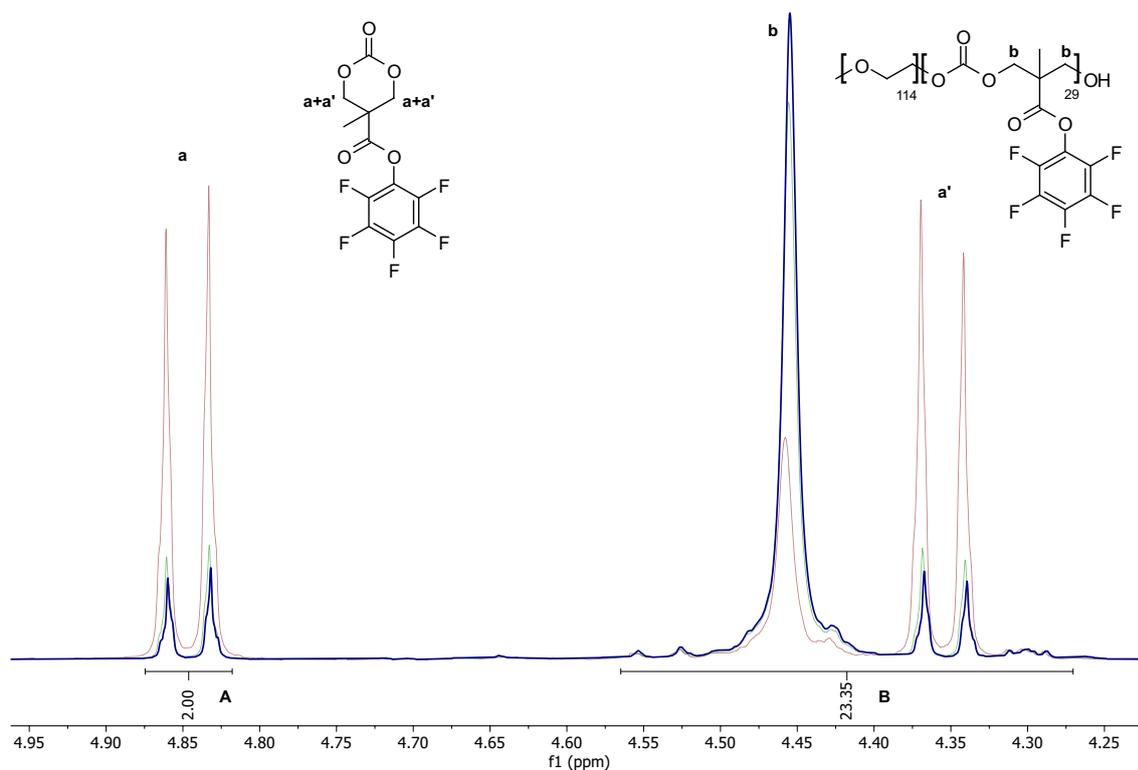


Abbildung 16: ¹H-NMR (400 MHz) von einem mPEG₁₁₄-*b*-Poly(MTC-PFP) Reaktionsansatz in CDCl₃. Es sind drei Reaktionskontrollen nach circa 50 Stunden (rot), nach circa 130 Stunden (grün) und nach circa 160 Stunden (blau) dargestellt. Die blauen Signale wurden integriert.

Aus den Integralen lässt sich der Umsatz der Reaktion berechnen (Tabelle 1). Hierzu wird das Monomer-Signal bei 4.85 ppm (**a**, 2H) integriert (Integral **A**). Zudem wird das Monomer-Signal bei 4.35 ppm (**a'**, 2H) zusammen mit dem Polymer-Signal bei 4.45 ppm (**b**, 4H) integriert (Integral **B**), da diese sich teilweise überlagern. Nun kann das Integral **A** von dem Integral **B** subtrahiert werden, um den alleinigen Wert für das Polymer-Integral zu erhalten. Das Verhältnis von Polymer-Integral ($\int \mathbf{B} - \int \mathbf{A}$) zu Gesamt-Integral ($\int \mathbf{B} + \int \mathbf{A}$) entspricht dem Umsatz.

Dies ist hier am Beispiel des Ansatzes mit 40 Äquivalenten Carbonat-Monomer nach 160 Stunden (siehe Abbildung 16, blaue Kurve) gezeigt:

$$\text{Umsatz} = \frac{\int \mathbf{B} - \int \mathbf{A}}{\int \mathbf{B} + \int \mathbf{A}} = \frac{23.35 - 2}{23.35 + 2} = \frac{21.35}{25.35} = 0.8422 = 84.22\% \quad (1)$$

3.2.2 Blocklängenbestimmung per NMR

Aus den NMR-Spektren der aufgereinigten Polymere können die Blocklängen des Carbonat-Blocks bestimmt werden (Tabelle 1). Indem das Integral **c** der Methoxygruppe am Ende des mPEG-Initiators normiert wird (3 Protonen) und dann das Integral **a** (4 Protonen) oder das Integral **d** (3 Protonen) des Carbonat-Rückgrats durch die Anzahl der Protonen pro Wiederholungseinheit geteilt wird, lässt sich die Länge des Carbonat-Blocks berechnen. Im Falle des Ansatzes mit 40 Äquivalenten Monomer (siehe Abbildung 17) ergibt sich eine Blocklänge von 29 Wiederholungseinheiten.

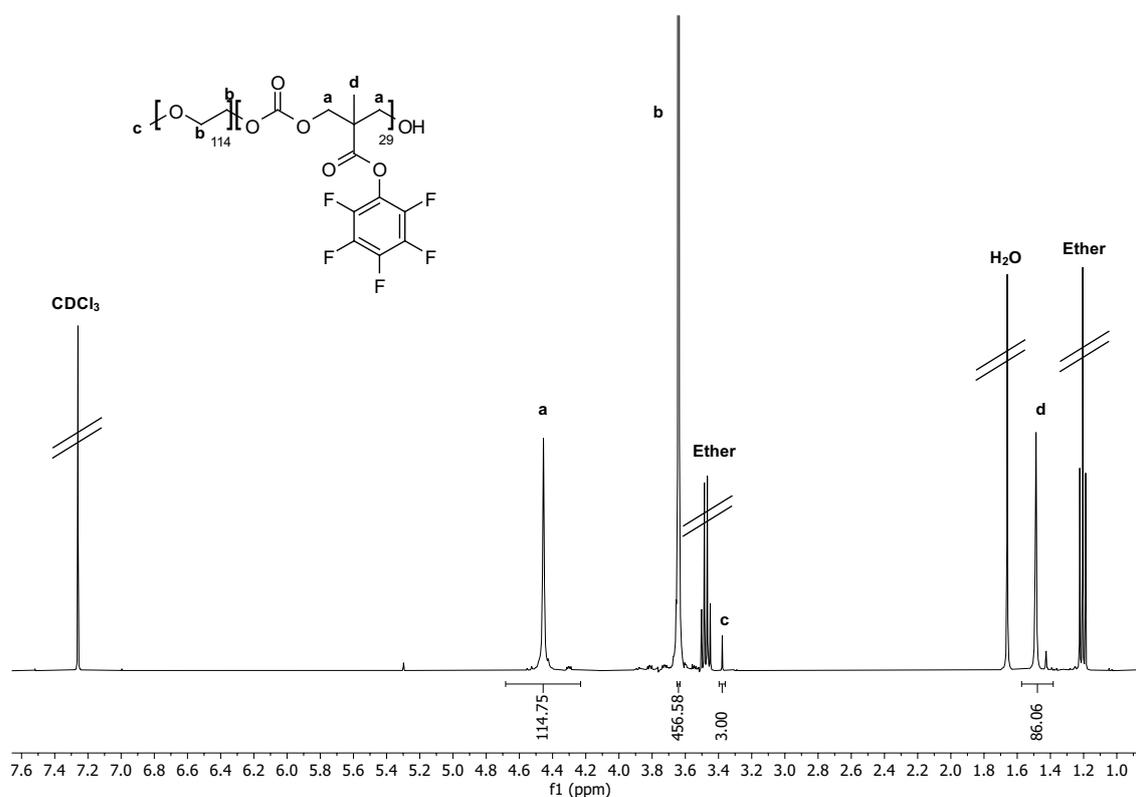


Abbildung 17: ¹H-NMR (400 MHz) von mPEG₁₁₄-b-Poly(MTC-PFP)₂₉ in CDCl₃.

$$\text{Blocklänge: } 114.75 : 4 \approx 29 \quad (2)$$

$$86.06 : 3 \approx 29 \quad (3)$$

Der Ansatz mit 30 Äquivalenten Carbonat-Monomer lieferte Blockcopolymere mit 26 Wiederholungseinheiten, der 35 Äquivalente Ansatz 28 Wiederholungseinheiten und der 40 Äquivalente Ansatz 29 Wiederholungseinheiten. Es fällt auf, dass die Differenz zwischen der aus dem Umsatz bestimmten Blocklänge und der erhaltenen Blocklänge bei größeren Mengen an eingesetztem Monomer zunimmt (siehe Tabelle 1). Bei dem Ansatz mit 30 Äquivalenten beträgt diese Differenz nur 2 Einheiten, doch bei dem Ansatz mit 35 Äquivalenten 4 und bei dem Ansatz mit 40 Äquivalenten 5 Einheiten.

Zugrunde liegt hier eine konkurrierende Nebenreaktion, in der es nicht zur gewünschten Initiation durch mPEG-5k und somit zur Bildung von Blockcopolymeren, sondern zur Initiation durch ein Monomer selbst und dadurch zur Entstehung von Carbonat-Homopolymeren kommt (siehe Abbildung 5). Diese entstehenden Homopolymere werden aufgrund ihrer besseren Löslichkeit durch das mehrfache Fällen in kaltem Ether von dem gewünschten Blockcopolymer-Produkt getrennt.^[13] Das Auftreten einer Homopolymer-Nebenreaktion wurde bereits in anderen Arbeit beobachtet und beschrieben.^[20,23]

3.2.3 Nebenreaktion Homopolymer

Es ist bekannt, dass MTC-PFP-Homopolymere in Hexan ausfallen und in Diethylether löslich sind.^[13] Die Reaktionskontrollen der Polymerisation wurden in Hexan und das fertige Blockcopolymer zur Aufreinigung in Diethylether gefällt und dann mittels GPC charakterisiert. Folglich entspricht die bei den Fällungen in Hexan auftretende zweite Elutionsfraktion (siehe Abbildung 18) höchstwahrscheinlich dem MTC-PFP-Homopolymer, welches durch die in der Einleitung angesprochene Nebenreaktion (siehe Abbildung 5) entsteht.

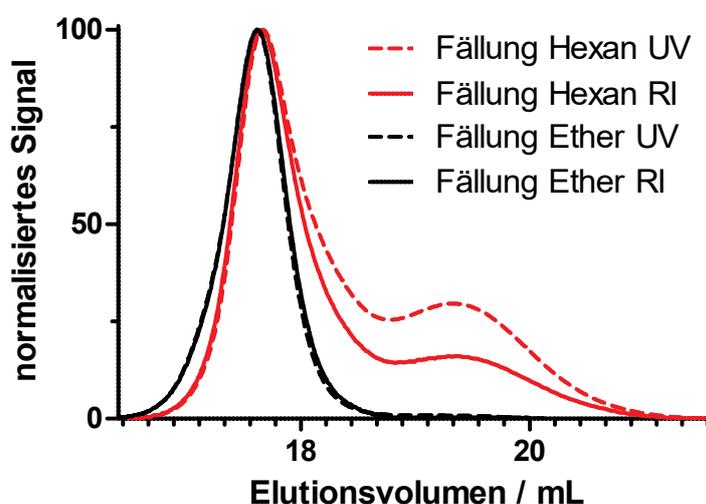


Abbildung 18: Es sind GPC-Messungen des in Diethylether gefällten Blockcopolymers mit 29 Carbonatwiederholungseinheiten (schwarz) und der zugehörigen in Hexan gefällten Reaktionskontrolle nach 160 Stunden (rot) zu sehen.

In den Kurven der Reaktionskontrolle (rot) ist sehr deutlich eine zweite Elutionsfraktion zu sehen. Bei der rechten Fraktion handelt es sich um Carbonat-Homopolymere, die ein niedrigeres Molekulargewicht als die Blockcopolymere aufweisen und somit später eluieren. Das UV-Detektor-Signal der Homopolymere ist vergleichsweise stärker ausgeprägt als das der Blockcopolymere, da die Homopolymere ausschließlich Carbonate mit aromatischen PFP-Gruppen, welche sehr gut im UV detektierbar sind, und keine schlecht UV-detektierbaren PEG-Einheiten beinhalten. An den Kurven lässt sich erkennen, dass durch das Fällen in Diethylether die Homopolymerverunreinigung fast vollständig entfernt werden konnte.

Das Auftreten einer Nebenreaktion, bei der es zur Bildung von Homopolymer kommt, ist nicht optimal. Allerdings lässt sich das gewünschte Blockcopolymer-Material gut isolieren und somit damit weiter arbeiten.

3.3 Synthese von Nanogelen zum Transport von RNA

3.3.1 Selbstassemblierung zu Mizellen

Als erster Schritt der Nanogelsynthese wurde zunächst das Blockcopolymer mPEG₁₁₄-*b*-Poly(MTC-PFP)₂₉ in Ethanol durch Beschallen und Erwärmen (40 °C) im Ultraschallbad zu Mizellen assembliert. Hierbei zeigt der solvophile mPEG-Block nach außen und der solvophobe Carbonat-Block nach innen.

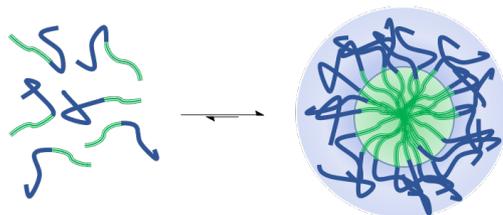


Abbildung 19: Hier ist der erste Schritt der Nanogelsynthese dargestellt, in dem die Blockcopolymere zu Mizellen assembliert werden.

Die Selbstassemblierung musste bei 40 °C durchgeführt werden, da unterhalb dieser Temperatur die definierte Größe der Mizellen verloren ging und die Lösung sich trübte, die Polymerketten also ausfielen. Bei dieser Temperatur handelt es sich um die *upper critical solution temperature* (UCST), welche auch bei anderen Blockcopolymeren mit PEG-Block beobachtet wird.^[25] Die erhaltenen Mizellen wurden durch dynamische Lichtstreuung (DLS), ebenfalls bei 40 °C, charakterisiert (*z-average* 39.4 nm, PDI 0.11):

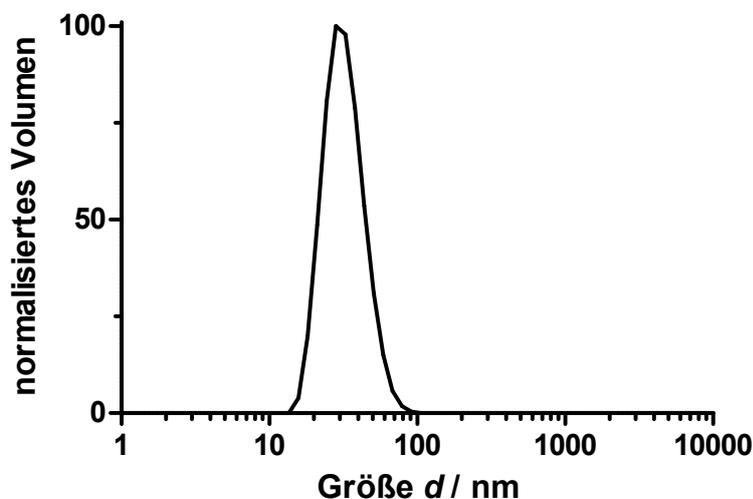


Abbildung 20: Selbstassemblierung von mPEG₁₁₄-*b*-Poly(MTC-PFP)₂₉ zu Mizellen in EtOH bei 40 °C.

3.3.2 Kernvernetzung durch Reaktivesterchemie

Die durch Selbstassemblierung der Blockcopolymere erhaltenen Mizellen wurden mittels Reaktivesterchemie zu kernvernetzten Nanogelen umgesetzt. Zur Kernvernetzung werden hierbei Bisamine verwendet, die durch intermolekulare Reaktion kovalente Vernetzungspunkte zwischen den Polymerketten der Mizelle liefern.

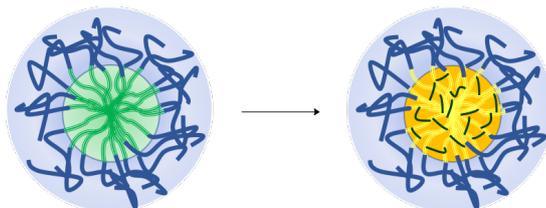


Abbildung 21: Hier ist der zweite Schritt der Nanogelsynthese dargestellt, bei dem die Mizellen kernvernetzt und zugleich kationisch modifiziert werden.

Neben der Umsetzung mit dem Polyamin-Vernetzer Spermin **II**, der zu den gewünschten Nanogelen kationischer Ladung führt, wurde auch der hydrophile Vernetzer 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan **I** als Positivkontrolle verwendet (siehe Abbildung 22). Mit diesem Vernetzer konnten Mizellen dieser Art bereits erfolgreich kernvernetzt werden.^[23] Zudem wurde ein Ansatz ohne Vernetzer **III** als Negativkontrolle verwendet.

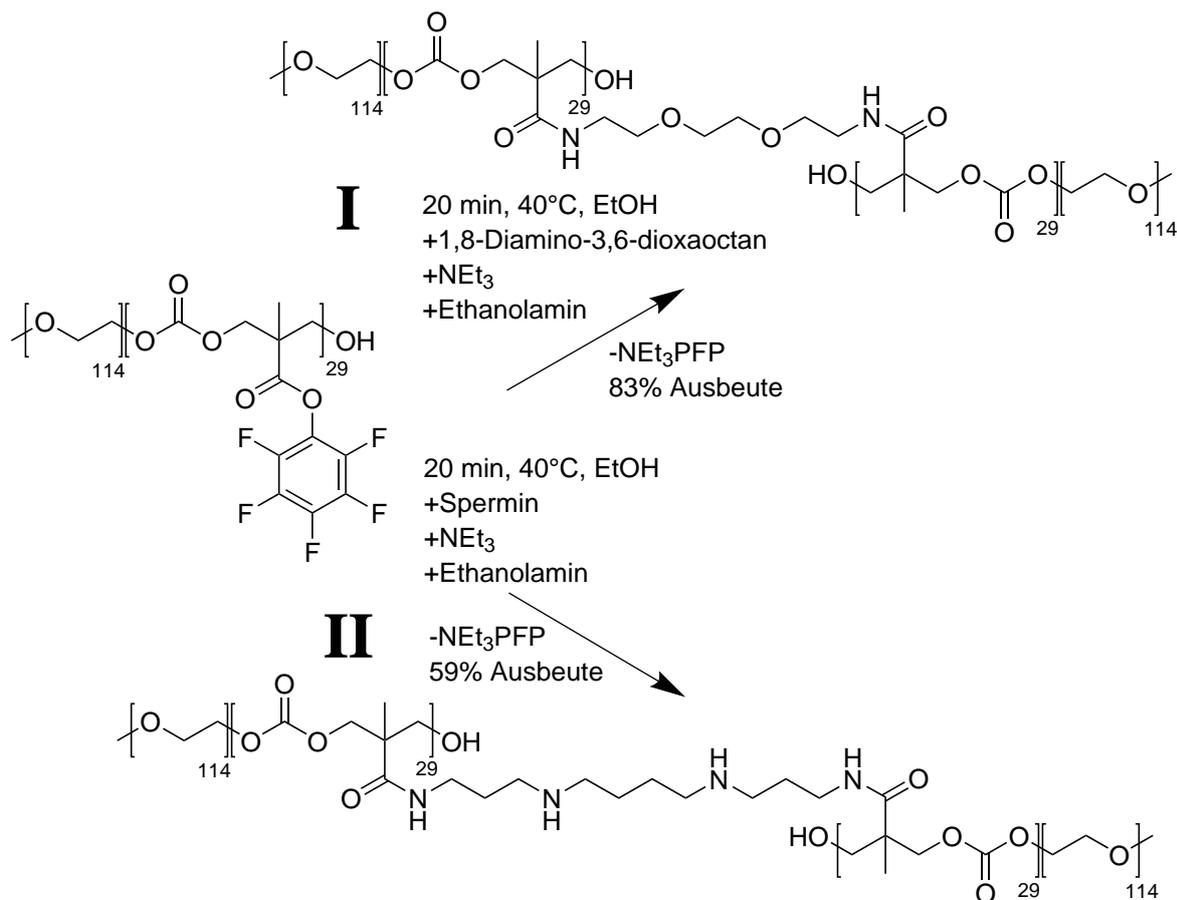


Abbildung 22: Synthese von kernvernetzten Nanogelen (mit 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan **I** und Spermin **II**) basierend auf Mizellen aus mPEG₁₁₄-*b*-Poly(MTC-PFP)₂₉ Blockcopolymeren. Die Umsetzung erfolgte für insgesamt 20 Minuten in Ethanol bei 40 °C. Neben dem Vernetzer wurde Triethylamin zugesetzt, um das frei werdende, saure PFP zu neutralisieren und Ethanolamin zum Quenchen verwendet.

Zu den Mizellen in Ethanol wurde ein halbes Äquivalent Vernetzer in Bezug auf die Anzahl der PFP-Ester gegeben. Somit lag für zwei PFP-Ester jeweils ein Molekül an Vernetzer vor. Ein Äquivalent Triethylamin diente dazu, das frei werdende, saure PFP zu neutralisieren, um somit die Vernetzer als freie Basen reaktiv zu halten. Am Ende der Vernetzungsreaktion wurde Ethanolamin (1.2 Äquivalente) hinzugegeben, um eventuell noch vorhandene PFP-Ester umzusetzen. Durch Eintropfen der Reaktionslösung in einmolare Salzsäure wurde die Reaktion beendet und das Nanogel durch Dialyse gegen verdünnte salzsaure Lösung (*pH*4) und anschließendes Gefriertrocknen aufgereinigt.

Die Reaktion wurde bei 40 °C durchgeführt, um die Mizellen in definierter Form sowie Größe in Lösung zu halten und ein Ausfallen zu verhindern. Die Reaktionsdauer konnte aufgrund der hohen Reaktivität der PFP-Ester im Vergleich zu vorherigen Synthesen stark verkürzt werden. Der Umsatz war nach 20 Minuten Reaktion vollständig (siehe ^{19}F -NMR, Abbildung 23). Bei der Negativkontrolle ohne Vernetzer **III** wurde nach 20 Minuten keine nennenswerte Umsetzung der PFP-Ester im ^{19}F -NMR festgestellt und keine Nebenreaktion beobachtet:

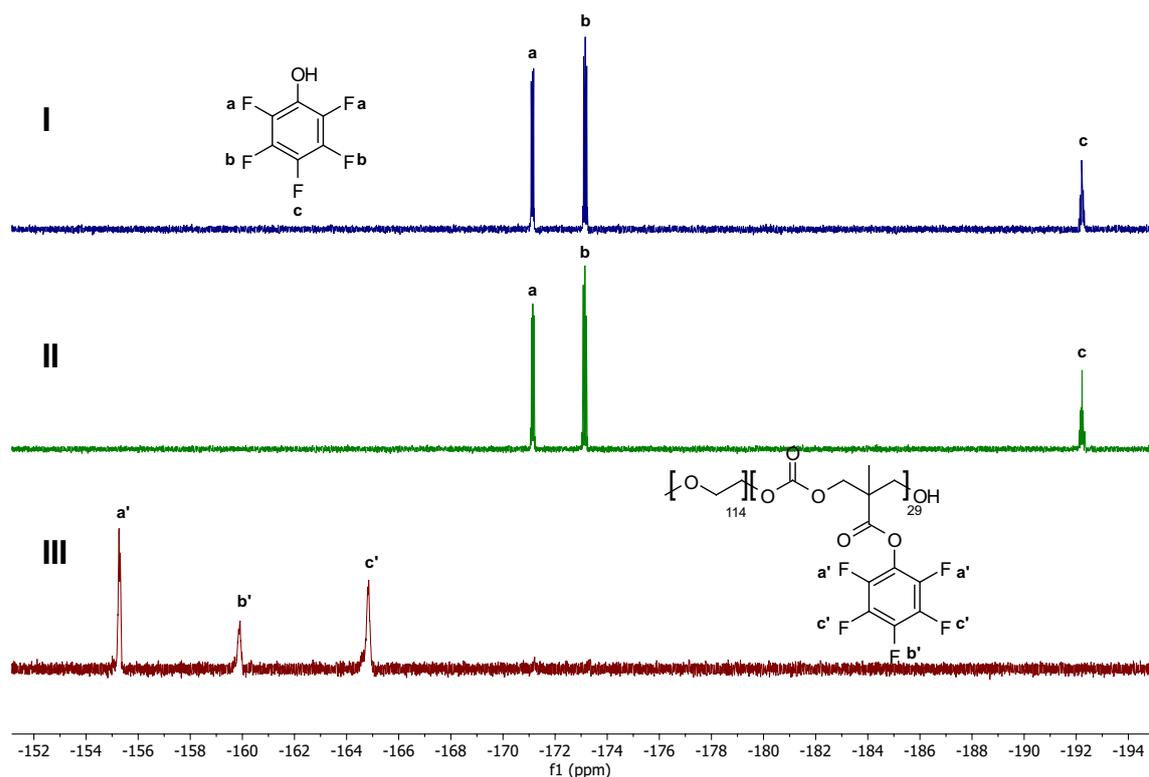


Abbildung 23: ^{19}F -NMR (376 MHz) der Reaktionsansätze mit 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan **I** (blau), Spermin **II** (grün) und ohne Vernetzer **III** (rot) in $\text{DMSO}-d_6$. Bei den Ansätzen **I** und **II** wurden alle PFP-Ester umgesetzt und es liegt nur noch freies PFP vor. Bei Ansatz **III** wurden die PFP-Ester nicht umgesetzt.

Das mit Spermin kernvernetzte Nanogel **II** (59% Ausbeute) wurde nach dem Gefrier-trocknen in physiologischem ($c(\text{NaCl}) = 9 \text{ g l}^{-1}$) Wasser gelöst, mit Ultraschall be-handelt und per DLS vermessen. Es lag eine monomodale Verteilung vor (*z-average* 75.7 nm, PDI 0.18):

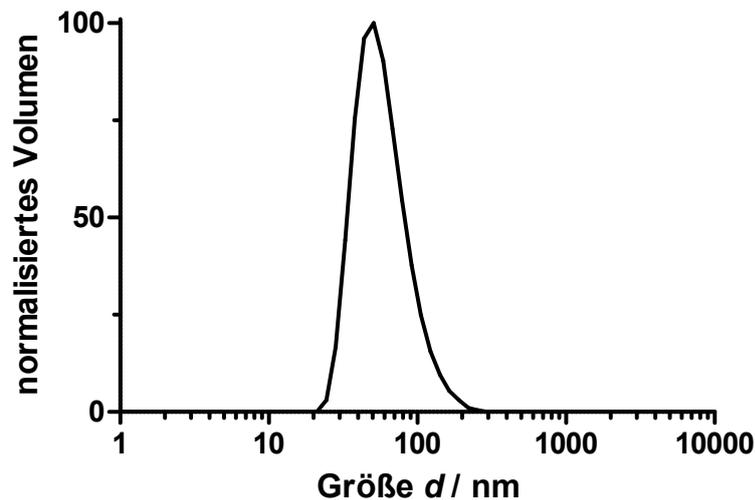


Abbildung 24: DLS Messung des resuspendierten Carbonat-Spermin-Nanogels **II** in Wasser nach Gefriertrocknen.

Ebenso wurde auch das mit dem Kontrollvernetzer 1,8-Diamino-3,6-dioxaoc-tan umge-setzte Nanogel **I** (83% Ausbeute) mit Ultraschall behandelt und vermessen:

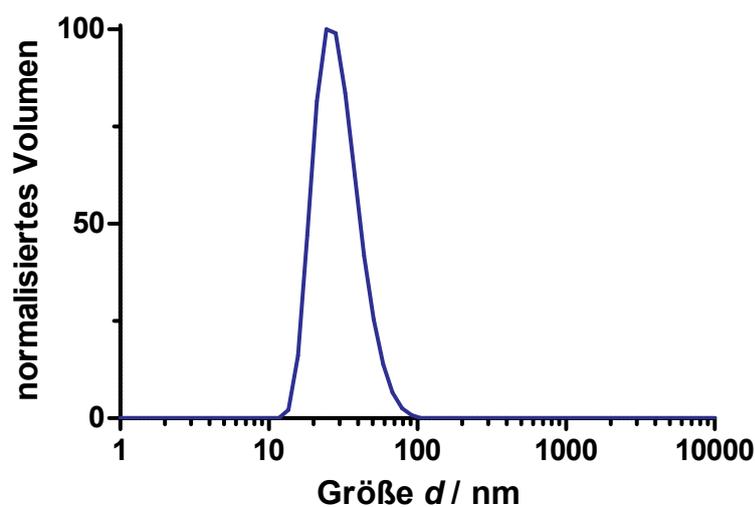


Abbildung 25: DLS Messung des resuspendierten Carbonat-(1,8-Diamino-3,6-dioxaoc-tan)-Nanogels **I** in Wasser nach Gefriertrocknen.

Auch hier lag eine monomodale Verteilung (*z-average* 37.5 nm, PDI 0.14) vor. Das Nanogel wies jedoch ein nur halb so großes *z-average* und eine etwas engere Verteilung auf. Die kleinere Größe des Nanogels erklärt sich möglicherweise durch die kürzere Länge und die fehlenden Ladungen des Vernetzers. Bei dem Carbonat-Spermin-Nanogels **II** kommt es hingegen zu ausgeprägter Quellung des Nanogels. Die Vernetzung ist durch den längeren Vernetzer Spermin größer. Auch durch die Ladungen des Vernetzers und die daraus folgende Abstoßung der Kernelemente kommt es zur Bildung von größeren Räumen in dem Nanogel, die von Lösungsmittel gefüllt werden können.

Die Negativkontrolle **III** (83% Ausbeute) wurde analog zu den anderen Ansätzen per Dialyse aufgereinigt und dann gefriergetrocknet. Es konnte nicht per DLS vermessen werden, da das nicht umgesetzte Blockcopolymer in Wasser nicht löslich war.

Als Vergleichsmaterial bezüglich Eigenschaften und Beladung des Nanogels mit RNA wurde zudem ein von Dr. Lutz Nuhn bereitgestelltes Nanogel auf Polymethacrylat-Basis verwendet, welches ebenfalls mit Spermin kernvernetzt und kationisch modifiziert worden war. Das darin enthaltene Blockcopolymer Poly(mTEG-MA)₁₂-*b*-Poly(PFP-MA)₄₀ (Abbildung 26) wurde durch RAFT-Polymerisation erhalten. Der hydrophile Block ist hier nicht mPEG₁₁₄, sondern das mit mTEG modifizierte Polymethacrylat. Der hydrophobe Block ist ebenfalls ein Polymethacrylat, welches analog zu dem Carbonat-Blockcopolymer PFP-Ester trägt. Die PFP-Ester wurden auch hier zur Umsetzung mit Spermin und zur Bildung des Nanogels verwendet.

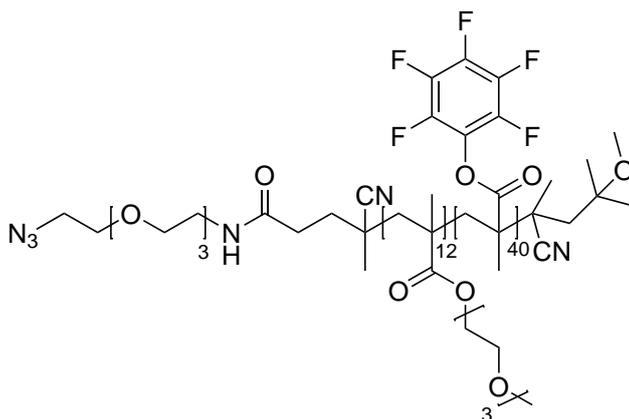


Abbildung 26: Blockcopolymer Poly(mTEG-MA)₁₂-*b*-Poly(PFP-MA)₄₀

Dieses Nanogel lag gefriergetrocknet vor und wurde durch Ultraschall in Wasser resuspendiert. Dann wurde es zunächst auch unbeladen per DLS vermessen (*z-average* 38.2 nm, PDI 0.16) (siehe Abbildung 27). Es war circa halb so groß und etwas enger verteilt als das Carbonat-Spermin-Nanogel.

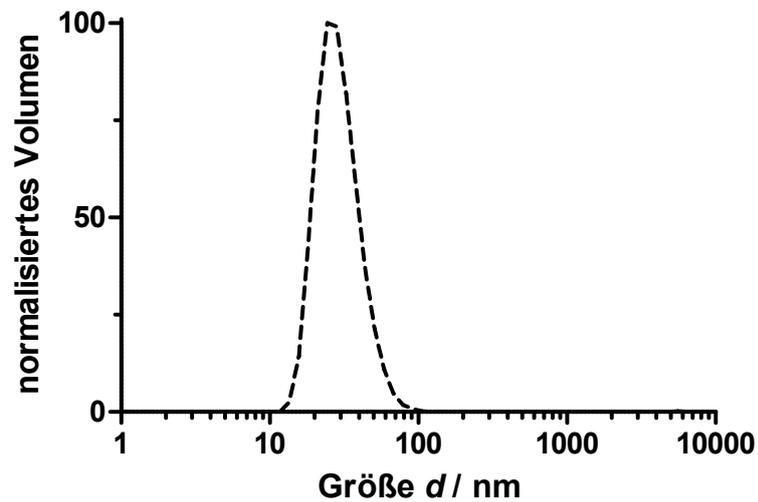


Abbildung 27: DLS Messung des Referenz-Methacrylat-Spermin-Nanogels in Wasser nach Gefriertrocknen.

3.3.3 Beladung des Nanogels

Die kationischen Nanogele können mit polyanionische Moleküle wie RNA beladen werden. So kann zum Beispiel die RNA Poly-I:C in die Nanogele eingebracht werden, welche als Agonist am TLR3 eine Immunreaktion auslöst und Anwendung in der Krebstherapie finden kann.^[2,3,4,5,6]

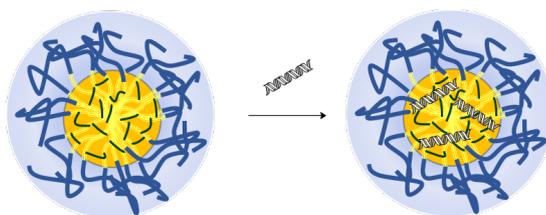


Abbildung 28: Hier ist der dritte Schritt der Nanogelsynthese dargestellt, bei dem das kernvernetzte kationische Nanogel mit der RNA Poly-I:C beladen wird.

Um die Beladungskapazität zu untersuchen, wurde die synthetische RNA Poly-I:C verwendet. Es handelt sich hierbei um eine doppelsträngige RNA, bei der ein Strang aus Polyinosin und der andere aus Polycytidin besteht.

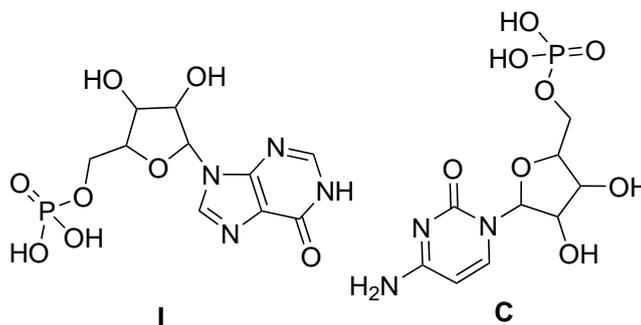


Abbildung 29: Darstellung der zwei Nucleotide Inosin (I) und Cytidin (C), welche die Bausteine des Poly-I:C sind. Im Gegensatz zu der Paarung Cytidin und Guanosenin werden hier nur zwei statt drei Wasserstoffbrücken ausgebildet.

Mithilfe von Agarose-Gelen wurde nun untersucht, wieviel Poly-I:C in den Nanogelen gebunden werden kann. Das Verhältnis N zu P (N:P), also kationische Amine (N) zu anionischen Phosphaten (P), wurde zur Quantifizierung genutzt. Um die Ansätze in den verschiedenen Verhältnissen präparieren zu können, wurde jeweils die mittlere molare Masse einer amin- beziehungsweise phosphat-haltigen Einheit bestimmt (siehe Anhang Abbildungen 43, 44 und 45):

$$\text{Poly-I:C:} \quad M(\text{P}) = 317.69 \text{ g mol}^{-1} \quad (4)$$

$$\text{Carbonat-Spermin-Nanogel:} \quad M(\text{N}) = 415.69 \text{ g mol}^{-1} \quad (5)$$

$$\text{Methacrylat-Spermin-Nanogel:} \quad M(\text{N}) = 250.60 \text{ g mol}^{-1} \quad (6)$$

Es wurden mehrere Ansätze mit unterschiedlichen N:P-Verhältnissen 45 Minuten lang inkubiert. Dann wurden diese auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Das N:P-Verhältnis, bei dem kein Poly-I:C mehr frei vorlag, gab das maximale Beladungsverhältnis an. Zunächst ist das Agarose-Gel mit dem Carbonat-Spermin-Nanogel als Träger für das Poly-I:C gezeigt:

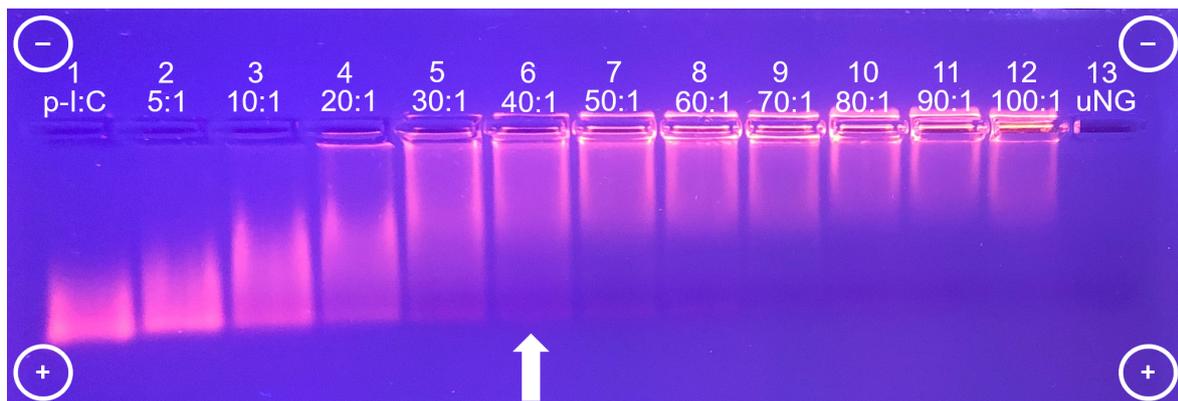


Abbildung 30: 1%-ige Agarose-Gelelektrophorese des Carbonat-Spermin-Nanogels beladen mit Poly-I:C in unterschiedlichen N:P-Verhältnissen (über den Spuren angegeben). In Spur 1 ist als Kontrolle nur Poly-I:C und in Spur 13 zur Kontrolle das unbeladene Nanogel aufgetragen. Das Gel lief bei 140 V für 30 Minuten. Die RNA wurde mit Gel-Red unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Hier ist das Agarose-Gel mit dem Referenz-Methacrylat-Spermin-Nanogel als Träger für das Poly-I:C gezeigt:

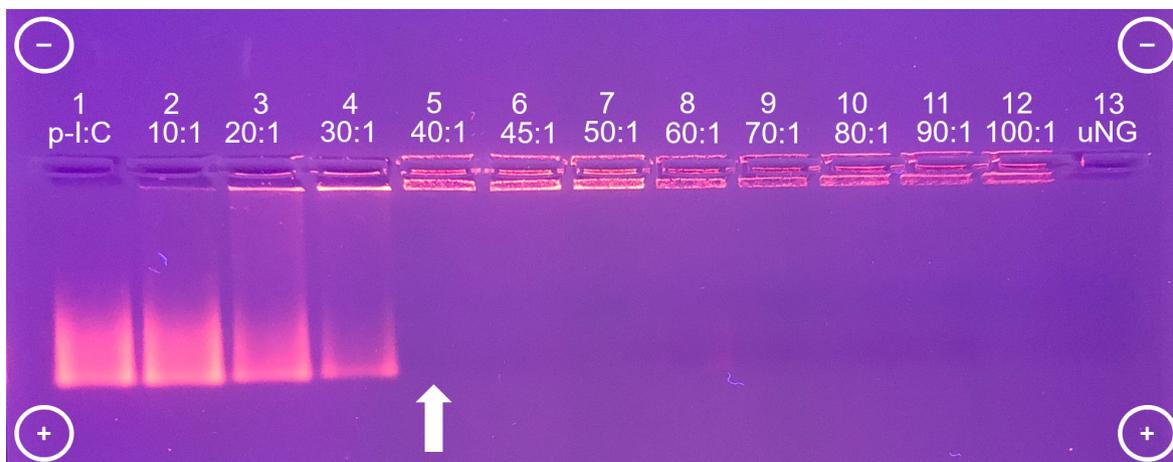


Abbildung 31: 1%-ige Agarose-Gelelektrophorese des Referenz-Methacrylat-Spermin-Nanogels beladen mit Poly-I:C in unterschiedlichen N:P-Verhältnissen (über den Spuren angegeben). In Spur 1 ist als Kontrolle nur Poly-I:C und in Spur 13 zur Kontrolle das unbeladene Nanogel aufgetragen. Das Gel lief bei 140 V für 30 Minuten. Die RNA wurde mit Gel-Red unter UV-Licht sichtbar gemacht.

In beiden Gelen ist die freie RNA als Banden am unteren Rand des Bildes zu sehen. Die RNA des Poly-I:C zeigt aufgrund der variierenden Größe des Polynucleotids (0.2 bis 1 kb) keine scharfen Banden. Bei beiden Nanogelen ist bei einem N:P-Verhältnis von 40 zu 1 keine oder kaum noch freies Poly-I:C zu sehen. Dieses Verhältnis gibt also die maximale Beladung der Nanogele an. Bei dem Carbonat-Spermin-Nanogel ist zudem etwas RNA unterhalb der Geltaschen sichtbar. Vermutlich ist dies RNA die teilweise und langsam wieder aus dem Nanogel austritt. Vielleicht handelt es sich hier aber auch um RNA, die an Bruchstücke des Nanogels oder nicht vollständig kernvernetzte Blockcopolymere gebunden ist.

Zur Untersuchung der beladenen Nanogele per DLS wurden folglich Ansätze im N:P-Verhältnis von 40 zu 1 vermessen. Zunächst ist die DLS-Messung des beladenen Carbonat-Spermin-Nanogels gezeigt:

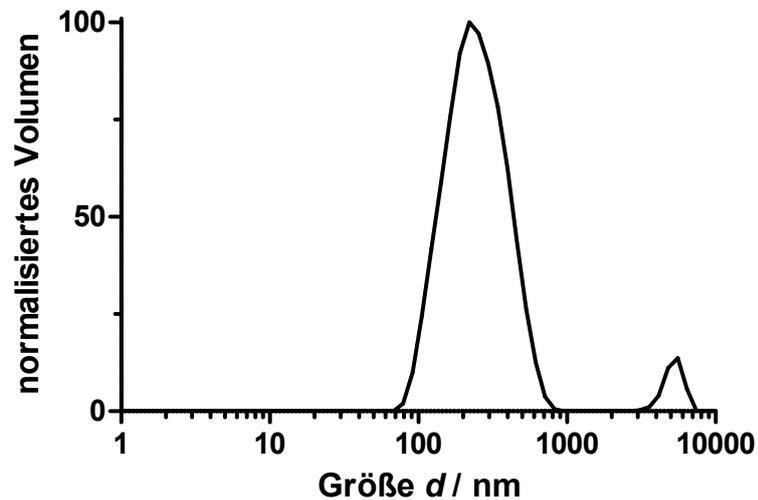


Abbildung 32: DLS Messung des mit Poly-I:C im N:P-Verhältnis 40:1 beladenen Carbonat-Spermin-Nanogels in Wasser.

Das Carbonat-Spermin-Nanogel (*z-average* 227.5 nm, PDI 0.19) nahm durch die Beladung deutlich an Größe zu, blieb aber relativ eng verteilt. Eine zweite kleine Population war bei circa 5000 nm zu sehen. Hier handelt es sich vermutlich um Staub, der eine hohe Affinität zu dem geladenen Nanogel aufweist. Auch in anderen Arbeiten mit dem Nanogel wurde eine starke Elektrostatik des Materials beobachtet.

Hier ist die DLS-Messung des beladenen Referenz-Methacrylat-Spermin-Nanogels dargestellt:

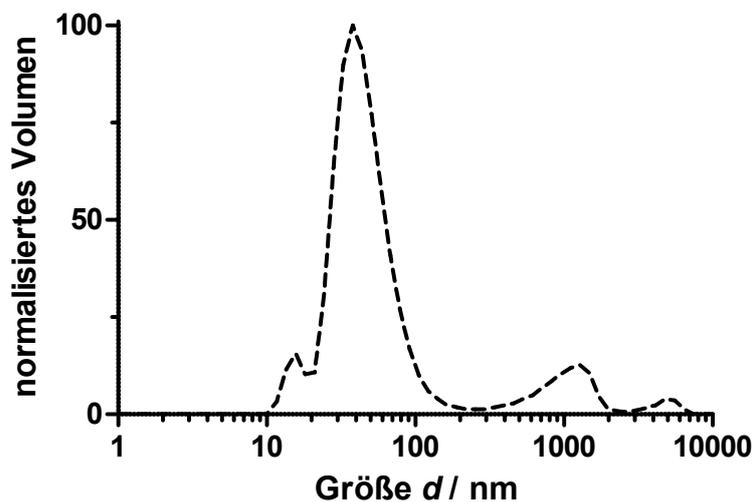


Abbildung 33: DLS Messung des mit Poly-I:C im N:P-Verhältnis 40:1 beladenen Referenz-Methacrylat-Spermin-Nanogels in Wasser.

Bei der Beladung des Referenz-Methacrylat-Spermin-Nanogels wurde der Ansatz trüb und es setzte sich etwas Niederschlag am Boden ab. Um das Nanogel in Lösung zu bringen, wurde es länger (2h) mit Ultraschall behandelt. Dennoch wurde eine sehr breite Größenverteilung mit verschiedenen Populationen beobachtet (*z-average* 96.3 nm, PDI 0.52).

Das Carbonat-Spermin-Nanogel scheint besser geeignet zu sein, um die relativ große Fracht Poly-I:C zu transportieren. Möglicherweise ist es wegen seiner Größe von 75.7 nm dem kleineren Referenz-Methacrylat-Spermin-Nanogel (38.2 nm) überlegen. Das Methacrylat-Nanogel fällt womöglich aus, da es zur Verbrückung von mehreren Nanogelen am Poly-I:C und somit zur Bildung von größeren Aggregaten kommt. Bei dem Carbonat-Nanogel ist dies aufgrund der stärkeren Quellung nicht der Fall. Die größeren Maschen im Inneren des Nanogels bieten den langen RNA-Strängen mehr Raum, um als Fracht in das Nanogel einzudringen. Somit kann das Nanogel die RNA besser umschließen, nimmt hierbei etwas an Größe zu und bleibt löslich. Dieses Verhalten ermöglicht der RNA auch teilweise aus dem Nanogel wieder auszutreten und kann die unter den Geltaschen in Abbildung 30 sichtbare RNA erklären.

Es wurden Zeta-Potential Messungen der unbeladenen sowie beladenen Nanogele durchgeführt. Das Zeta-Potential ist der Potentialunterschied zwischen der Lösungsmittelschicht, die das Nanogel umhüllt, und dem restlichen Lösungsmittel. Hierbei wird die Ladung der Nanogele quantifiziert.^[26] Es ist also zu erwarten, dass die Ladung der unbeladenen Nanogele aufgrund der Amine positiv ist und durch das erfolgreiche Beladen mit Poly-I:C und der Ladungskompensation durch die Phosphate negativer wird.

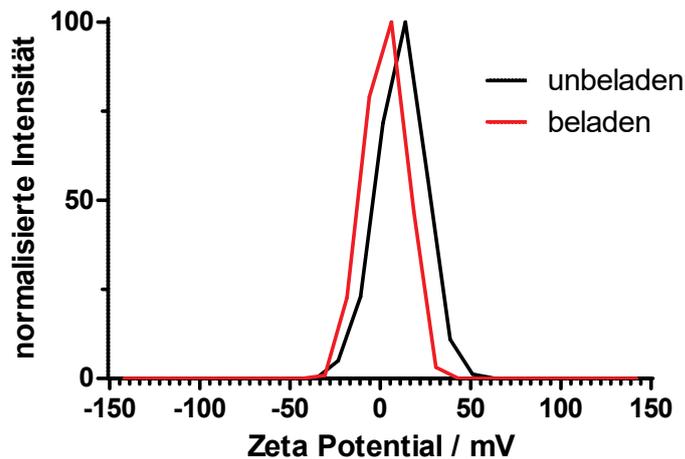


Abbildung 34: Zeta-Potential Messung des unbeladenen und mit Poly-I:C im N:P-Verhältnis 40:1 beladenen Carbonat-Spermin-Nanogels in Wasser.

Unbeladen weist das Carbonat-Spermin-Nanogel (Abbildung 34) ein Zeta-Potential von (11.6 ± 12.7) mV auf. Mit Poly-I:C beladen ist das Zeta-Potential mit (2.54 ± 11.17) mV deutlich negativer. Das Carbonat-Spermin-Nanogel verhält sich also wie erwartet. Diese Messwerte sprechen für eine erfolgreiche Beladung des Nanogels mit Poly-I:C.

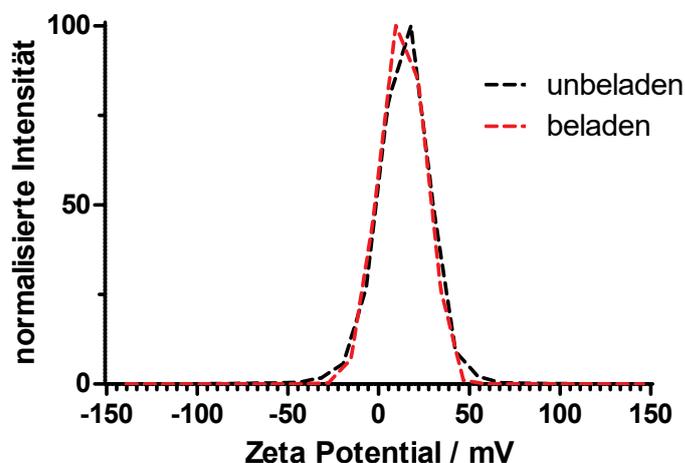


Abbildung 35: Zeta-Potential Messung des unbeladenen und mit Poly-I:C im N:P-Verhältnis 40:1 beladenen Referenz-Methacrylat-Spermin-Nanogels in Wasser.

Das Referenz-Methacrylat-Spermin-Nanogel (Abbildung 35) hat unbeladen zwar ein ähnliches Zeta-Potential ((13.1 ± 16.6) mV), doch beladen mit Poly-I:C bleibt das Potential annähernd gleich ((13.2 ± 12.0) mV) und wird nicht negativer. Dies erklärt sich womöglich dadurch, dass das beladene Referenz-Methacrylat-Spermin-Nanogel ausfiel und somit Ultraschall nötig war, um das Nanogel für die Zeta-Potential Messung wieder in Lösung zu bringen. Bei dieser längeren Ultraschallbehandlung wurde vermutlich das Poly-I:C beschädigt und somit kein aussagekräftiger Messwert erhalten. Eine Abnahme der Intensität und somit wahrscheinlich ein Abbau ließ sich auch bei Behandlung von Poly-I:C mit Ultraschall außerhalb des Nanogels beobachten:

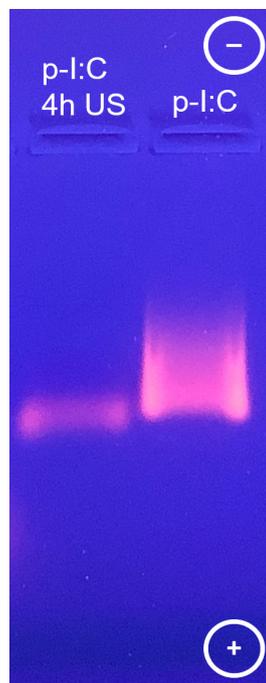


Abbildung 36: 1%-ige Agarose-Gelelektrophorese von Poly-I:C, das für 4 Stunden mit Ultraschall behandelt wurde, und unbehandeltem Poly-I:C zur Kontrolle. Das Gel lief bei 140 V für 30 Minuten. Die RNA wurde mit Gel-Red unter UV-Licht sichtbar gemacht.

3.3.4 Abbau des Nanogels

Ein Vorteil von Polycarbonaten als Trägersystem ist die Abbaubarkeit. Dieser Abbau kann unter basischen Bedingungen erfolgen.^[13,14] Um die Abbaubarkeit der Nanogele zu überprüfen, wurden Lösungen der Nanogele mit einem Zehntel des Volumens an einmolarer Natronlauge versetzt. Es wurden direkt nach Zugabe, einen Tag nach Zugabe und zwei Tage nach Zugabe DLS-Messungen durchgeführt:

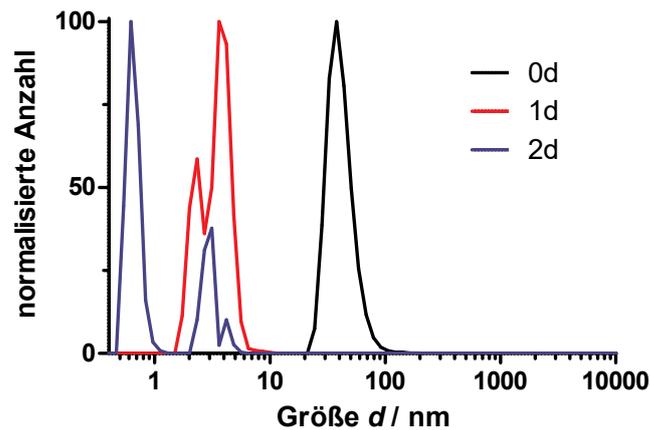


Abbildung 37: DLS Messung des Carbonat-Spermin-Nanogels in Wasser, dem einmolare Natronlauge hinzugefügt wurde ($V:V$, 10:1).

Bei dem Carbonat-Spermin-Nanogel (Abbildung 37) ist ein deutlicher Abbauprozess sichtbar. Nach einem Tag sind die Fragmente kleiner als 10 nm und nach zwei Tagen zu einem großen Anteil kleiner als 1 nm. Auch die *derived countrate*, welche mit Anzahl und Größe der Partikel korreliert, nimmt zwischen den drei Messungen deutlich ab (0d: 732.4 kcps, 1d: 220.4 kcps, 2d: 142.8 kcps).

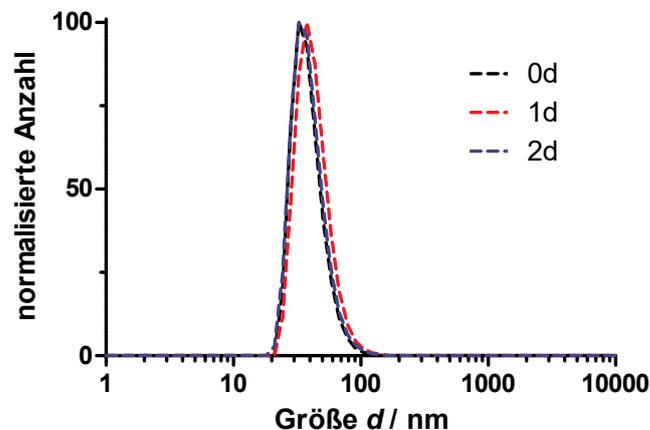


Abbildung 38: DLS Messung des Referenz-Methacrylat-Spermin-Nanogels in Wasser, dem einmolare Natronlauge hinzugefügt wurde ($V:V$, 10:1).

Bei dem Referenz-Methacrylat-Spermin-Nanogel (Abbildung 38) bleibt die Größe relativ konstant und es ist wie erwartet kein Abbau zu beobachten.

Trotz der Abbaubarkeit ist das Carbonat-Spermin-Nanogel ein stabiles Transportsystem. Unter den Pufferbedingungen des Agarosegels wurde das Poly-I:C auch nach circa einem Tag (17 h, währenddessen kein Strom angelegt) noch in den Auftragstaschen zurückgehalten und es erfolgte kaum eine weitere Freisetzung der RNA aus den Geltaschen und somit dem Nanogel.

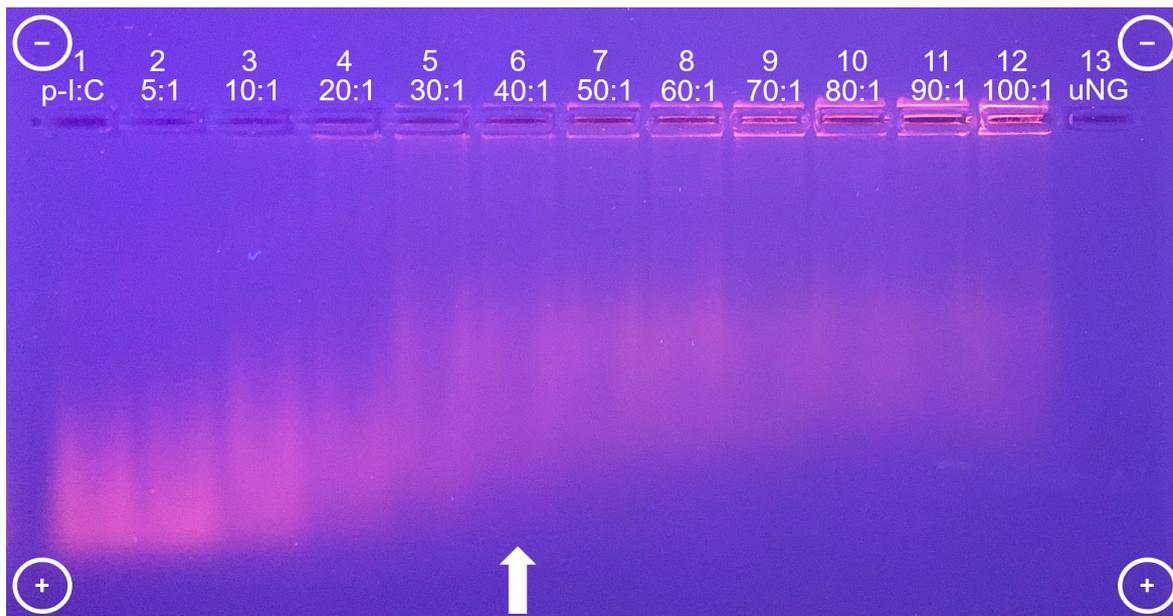


Abbildung 39: 1%-ige Agarose-Gelelektrophorese des Carbonat-Spermin-Nanogels beladen mit Poly-I:C in unterschiedlichen N:P-Verhältnissen (über den Spuren angegeben). In Spur 1 ist als Kontrolle nur Poly-I:C und in Spur 13 zur Kontrolle das unbeladene Nanogel aufgetragen. Das Gel lief zunächst bei 140 V für 30 Minuten (siehe Abbildung 30). Dann wurde nach 17 Stunden erneut ein Gellauf bei 140 V für 30 Minuten durchgeführt. Die RNA wurde mit Gel-Red unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass das selbstassemblierte Material erfolgreich kernvernetzt und dann mit Poly-I:C beladen werden konnte. Zudem wurde die Abbaubarkeit des Materials im Basischen im Vergleich zum etablierten Methacrylat-basierten System bestätigt.

4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte der immunstimulatorische TLR3-Agonist Poly-I:C erfolgreich in abbaubare, kationische, kernvernetzte, Polycarbonat-basierte Nanogelee eingebunden werden. Um die Anwendbarkeit als Therapeutikum zu überprüfen, sollten *in vitro* Zelltests durchgeführt werden, um Aufnahme der RNA-haltigen Nanogelee, Wirkung und mögliche Toxizität zu untersuchen. Auch Versuche zum enzymatischen Abbau des Nanogels und zum Abbau des Nanogels in Zellen bieten sich an.

Die erhaltenen Nanogelee sollten auch mit anderen polyanionischen Molekülen wie CpG und siRNA beladen werden, um hier das Verhalten vor allem bezüglich Beladungsfähigkeit und Größe der Nanogelee zu untersuchen. siRNA ist deutlich kleiner als das verwendete Poly-I:C, wodurch es bei der siRNA möglicherweise nicht zu der bei dem Methacrylat-Nanogel beobachteten Aggregation kommen würde und auch das Carbonat-Nanogel eine kleinere mittlere Größe annehmen würde.

5 Experimentalteil

5.1 Allgemeines und Analytik

Lösungsmittel und Chemikalien wurden, sofern nicht explizit anders erwähnt, von Sigma Aldrich erworben. Hexafluorisopropanol (HFIP) wurde bei Fluorochem und Bis(pentafluorphenyl)carbonat (bis-PFPC) bei Fisher Scientific gekauft. Deuterierte Lösungsmittel wurden bei Deutero erworben. Millipore Wasser wurde aus einem MILLI-Q R Reference A+ System erhalten. Wasser mit einem spezifischen Widerstand von 18.2 M Ω cm und einem organischen Anteil von < 5 ppm wurde verwendet.

^1H - und ^{19}F -NMR Spektren wurden auf einem Bruker Avance II 400 (^1H -NMR: 400 MHz, ^{19}F -NMR: 376 MHz) bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Spektren wurden mit MestReNova 14.1.0 von Mestrelab Research ausgewertet. Analytische GPC-Messungen wurde bei einer Temperatur von 40 °C durchgeführt. Als Eluent wurde HFIP mit 3 g L $^{-1}$ Kaliumtrifluoracetat bei einer Flussrate von 0.8 mL min $^{-1}$ verwendet. Die Säulen bestanden aus modifiziertem Silicagel (PFG-Säulen, Partikelgröße 7 μm , Porosität 100 Å + 1000 Å) und wurden bei PSS Polymer Standards Service GmbH gekauft. Als Detektoren wurden ein UV-Detektor (JASCO UV-2075+) bei einer Wellenlänge von 230 nm und ein RI-Detektor (JASCO RI-2031) genutzt. Toluol wurde den Proben als interner Standard zugesetzt.

DLS und Zeta-Potential Messungen wurden an einem ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) mit einem He-Ne-Laser ($\lambda = 622$ nm) durchgeführt. Sofern nicht explizit anders angegeben, wurden die Messungen bei 25 °C durchgeführt.

Es wurde Poly-I:C-LMW (*low molecular weight*) der Firma Invivogen verwendet mit einer Größe von 0.2-1 kb. Bei allen Arbeiten mit Poly-I:C wurde das mitgelieferte sterile physiologische Wasser ($c(\text{NaCl}) = 9$ g l $^{-1}$) verwendet.

Die einprozentigen Agarosegele wurden aus 1.6 g Agarose in 160 mL TBE-Puffer gegossen. Zum Färben der RNA wurden dem Gel vor dem Gießen 30 μL GelRed[®] (10000x) hinzugefügt. Die Gelläufe wurden bei einer Spannung von 140 V für 30 Minuten in TBE-Puffer durchgeführt. Die Ansätze für die Geltaschen wurden jeweils mit 1 μL Auftragspuffer versehen und vor dem Auftragen für 45 Minuten inkubiert.

5.2 Synthese

5.2.1 Monomersynthese

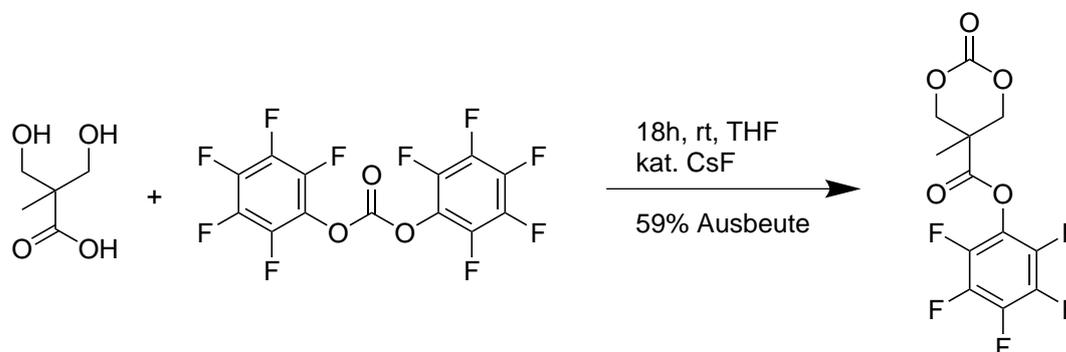
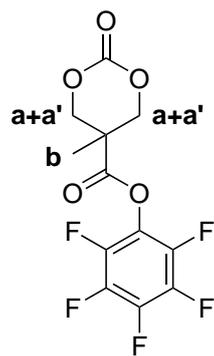
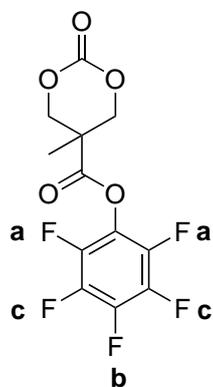


Abbildung 40: Synthese von 5-Methyl-5-pentafluorphenyloxycarbonyl-1,3-dioxan-2-on

Die Synthese von 5-Methyl-5-pentafluorphenyloxycarbonyl-1,3-dioxan-2-on wurde leicht verändert nach Literatur durchgeführt.^[19] In einen 250 mL Dreihalskolben wurden unter Inertgasatmosphäre 3.41 g (25.4 mmol, 1.00 eq.) 2,2-Bis(hydroxymethyl)propionsäure (bis-MPA) und 0.77 g (5.07 mmol, 0.20 eq.) Cäsiumfluorid gegeben. Es wurden 40 mL trockenes Tetrahydrofuran und unter Rühren 25.0 g (63.4 mmol, 2.50 eq.) bis-PFPC hinzugefügt. Weitere 40 mL trockenes Tetrahydrofuran wurden hinzugegeben und nach 5 Minuten wurde die zunächst trübe Lösung klar. Die Lösung wurde für 18 Stunden unter Inertgasatmosphäre gerührt. Es konnte ein farbloser Niederschlag beobachtet werden. Die Lösung wurde im Vakuum eingengt und 100 mL Dichlormethan hinzugegeben. Die Lösung wurde mit 50 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und drei mal mit 50 mL Wasser gewaschen. Es wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der farblose Feststoff wurde aus einem Gemisch von Essigsäureethylester (90 mL) und Hexan (50 mL) umkristallisiert. Die Mutterlauge wurde im Vakuum eingengt, Hexan (40 mL) hinzugegeben und der farblose Niederschlag ebenfalls umkristallisiert. Der Feststoff wurde im Vakuum getrocknet, um insgesamt 4.93 g (15.1 mmol, 59% Ausbeute) des Produktes als farblose Kristalle zu erhalten.

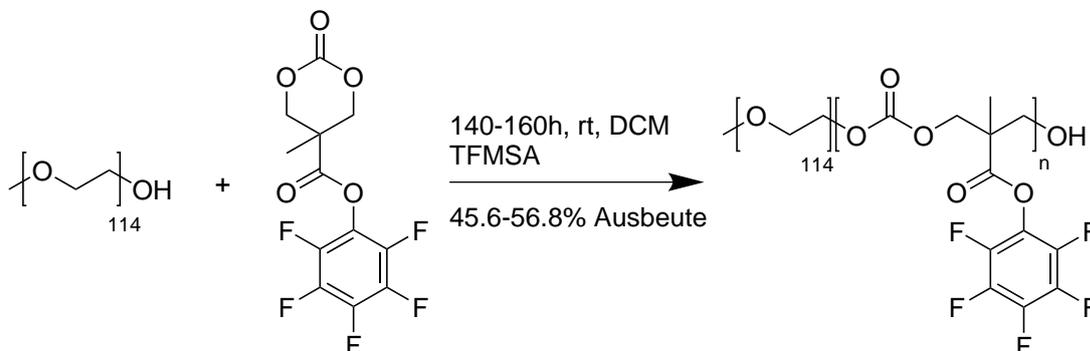


$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, CDCl_3 ; δ [ppm] = 4.85 (d, 2H, **a**), 4.36 (d, 2H, **a'**), 1.55 (s, 1H, **b**).

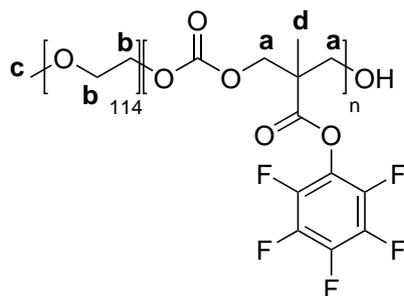


$^{19}\text{F-NMR}$: 376 MHz, CDCl_3 ; δ [ppm] = -153.92 (m, 2F, **a**), -157.11 (m, 1H, **b**), -162.25 (m, 2H, **c**).

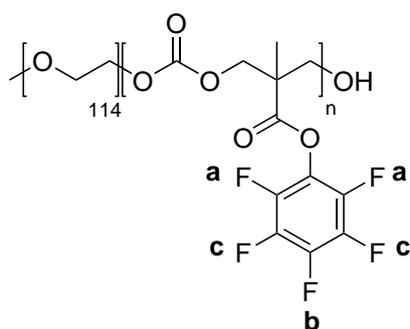
5.2.2 Blockcopolymersynthese

Abbildung 41: Synthese von mPEG₁₁₄-*b*-Poly(MTC-PFP).

Die Synthese von mPEG₁₁₄-*b*-Poly(MTC-PFP) wurde leicht verändert nach Literatur durchgeführt.^[22] 0.100 g (0.020 mmol, 1.00 eq.) mPEG₁₁₄ und 0.196 g (0.600 mmol, 30.0 eq.) MTC-PFP wurden unter Inertgasatmosphäre getrennt von einander in je ein ausgeheiztes 10 mL Schlenkrohr gegeben und mit circa 2 mL Benzol durch azeotrope Destillation im Vakuum getrocknet. Die evakuierten Schlenkrohre wurden in der Glovebox mit Stickstoff belüftet. Das mPEG wurde in 1.2 mL trockenem Dichlormethan gelöst und zu dem MTC-PFP gegeben. 1.76 μL (0.003 g, 0.020 mmol, 1.00 eq.) Trifluormethylsulfonsäure wurden hinzugefügt und das Schlenkrohr verschlossen. Die Polymerisation erfolgte in der Glovebox unter Rühren bei Raumtemperatur. Zunächst lag noch ungelöstes MTC-PFP vor, das im Verlauf der Reaktion in Lösung ging. Nach 140 Stunden wurde die leicht gelbliche Reaktionslösung in circa 45 mL kaltem (-20°C) Diethylether gefällt und zentrifugiert (4000 rpm, 10 min, 4°C). Es wurde dekantiert und der farblose Niederschlag in circa 2 mL Dichlormethan gelöst. Auf diese Art wurde noch zwei Mal in Diethylether gefällt und dann im Vakuum getrocknet. Schließlich wurden 0.130 g (45.8% Ausbeute nach Gewicht im Bezug auf einen Umsatz von 93.9% nach NMR) des Produktes als farbloser Feststoff erhalten. Die Synthese wurde analog auch mit 35 und 40 Äquivalenten MTC-PFP durchgeführt. Hier wurden bei den 35 Äquivalenten nach einer Reaktionszeit von 140 Stunden 0.141 g (45.6% Ausbeute nach Masse im Bezug auf einen Umsatz von 91.9% nach NMR) des Produktes und bei den 40 Äquivalenten nach einer Reaktionszeit von 160 Stunden 0.122 g (56.8% Ausbeutenach Gewicht im Bezug auf einen Umsatz von 84.2% nach NMR) des Produktes erhalten.



¹H-NMR: 400 MHz, CDCl₃; δ [ppm] = 4.45 (s, 4H, **a**), 3.64 (s, 4H, **b**), 3.37 (s, 3H, **c**), 1.49 (s, 3H, **d**).



¹⁹F-NMR: 376 MHz, CDCl₃; δ [ppm] = -154.28 (m, 2F, **a**), -158.25 (m, 1H, **b**), -163.25 (m, 2H, **c**).

5.2.3 Nanogelsynthese

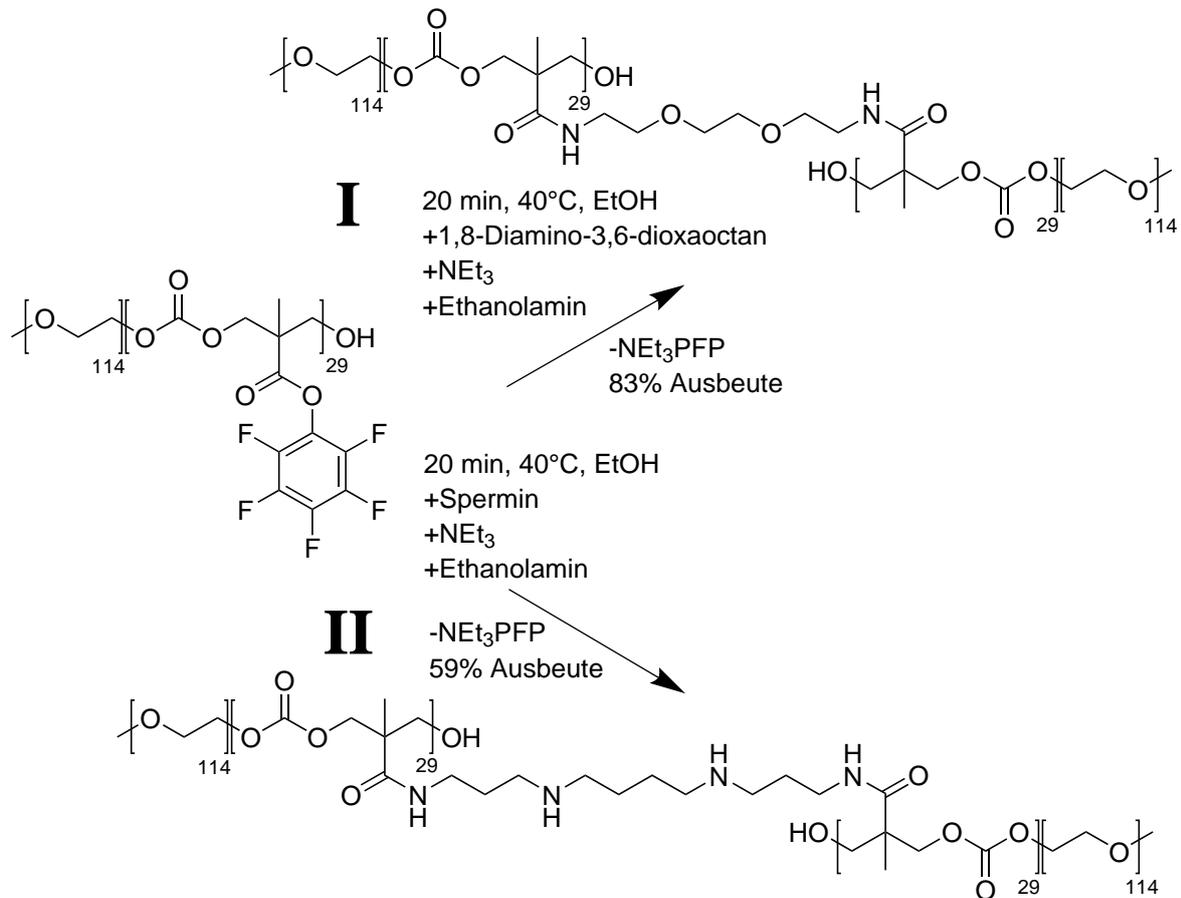


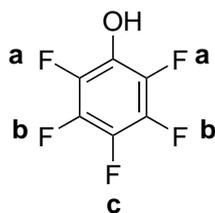
Abbildung 42: Synthese von kernvernetzten Nanogelen (mit 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan **I** und Spermin **II**) basierend auf Mizellen aus mPEG₁₁₄-*b*-Poly(MTC-PFP)₂₉ Blockcopolymeren.

Aus mPEG₁₁₄-*b*-Poly(MTC-PFP)₂₉ wurden durch Selbstassemblierung in Ethanol Mizellen gebildet. Dazu wurden 30 mg des Blockcopolymeren für 30 Minuten im Ultraschallbad bei 40 °C in 3 mL trockenem Ethanol gelöst. Die DLS zeigte eine monomodale Verteilung der Mizellengrößen. Dann wurde in drei Gefäße jeweils 1 mL der Lösung (10 mg, 0.692 μmol Polymer mit 20.1 μmol PFP-Ester-Einheiten, 29 pro Kette) gegeben. Folgende Reagenzien wurden den Gefäßen **I**, **II** und **III** hinzugefügt:

- I** 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan (1.45 μL, 1.47 mg, 9.92 μmol, 0.49 eq)
und Triethylamin (2.88 μL, 2.10 mg, 20.8 μmol, 1.03 eq)
II Spermin (2.00 mg, 9.88 μmol, 0.49 eq)
und Triethylamin (2.88 μL, 2.10 mg, 20.8 μmol, 1.03 eq)
III Triethylamin (2.88 μL, 2.10 mg, 20.8 μmol, 1.03 eq)

Die Reaktionsansätze wurden für 15 Minuten bei 40 °C gerührt und dann zu den Ansätzen **I** und **II** 1.44 µL Ethanolin (1.45 mg, 23.7 µmol, 1.18 eq) zum Spalten von eventuell noch vorhandenen PFP-Estern hinzugegeben. Nach weiteren 5 Minuten Reaktionszeit wurden die Reaktionslösungen zum Quenchen jeweils in 1 mL Salzsäure ($c = 1 \text{ mol L}^{-1}$) getropft. Dann wurde für 18 Stunden gegen verdünnte salzsaure Lösung ($pH 4$) dialysiert (Dialyseschlauch mit 1 kDa Ausschlussgröße, fünfmaliger Wechsel der salzsauren Lösung), um übrige Reagenzien und Salze zu entfernen. Dann wurden die Lösungen (jeweils circa 6 mL) für 96 Stunden gefriergetrocknet und die Produkte als farblose Feststoffe (**I** 6.5 mg (83% Ausbeute), **II** 4.9 mg (59% Ausbeute), **III** 8.3 mg (83% Ausbeute)) erhalten.

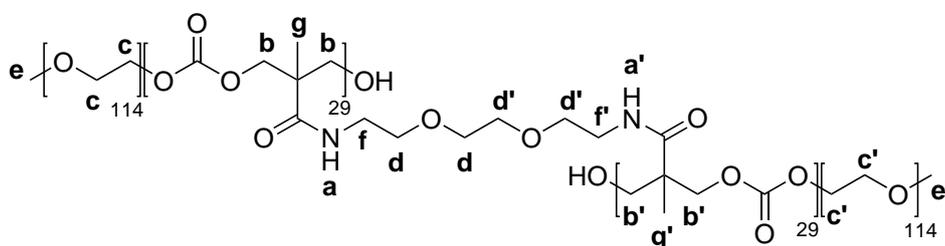
I NMR Reaktionskontrolle:



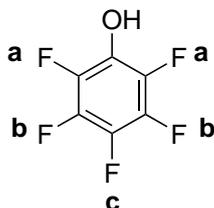
$^{19}\text{F-NMR}$: 376 MHz, $\text{DMSO}-d_6$; δ [ppm] = -171.13 (m, 2F, **a**), -173.15 (m, 2F, **b**), -192.22 (m, 1F, **c**). Da keine weiteren Signale auftraten, war die Umsetzung der PFP-Ester quantitativ.

I NMR Produkt:

$^{19}\text{F-NMR}$: 376 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ Es wurden keine Signale beobachtet.



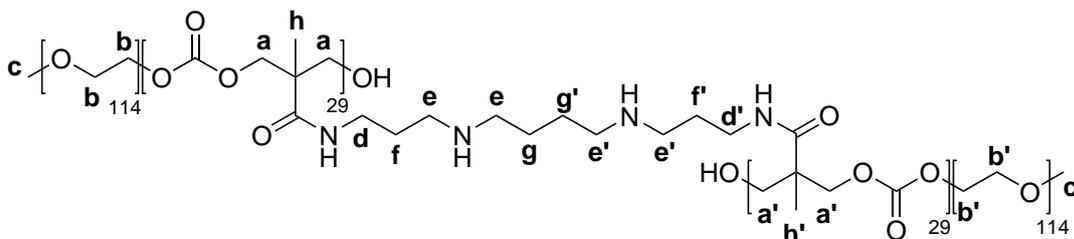
$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$; δ [ppm] = 7.84 (m, 2H, **a+a'**), 4.15 (m, 8H, **b+b'**), 3.48 (s, 8H, **c+c'**), 3.44 (m, 8H, **d+d'**), 3.21 (s, 6H, **e+e'**), 3.17 (m, 4H, **f+f'**), 1.11 (s, 6H, **g+g'**). (siehe Anhang Abbildung 46)

II NMR Reaktionskontrolle:

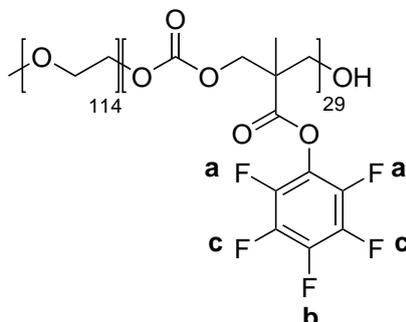
$^{19}\text{F-NMR}$: 376 MHz, $\text{DMSO}-d_6$; δ [ppm] = -171.15 (m, 2F, **a**), -173.10 (m, 2F, **b**), -192.22 (m, 1F, **c**). Da keine weiteren Signale auftraten, war die Umsetzung der PFP-Ester quantitativ.

II NMR Produkt:

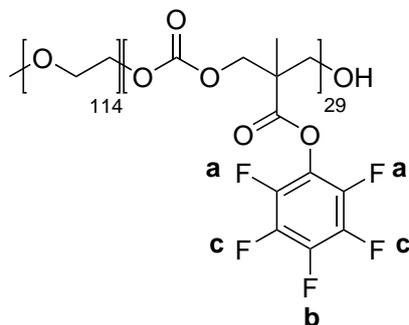
$^{19}\text{F-NMR}$: 376 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ Es wurden keine Signale beobachtet.



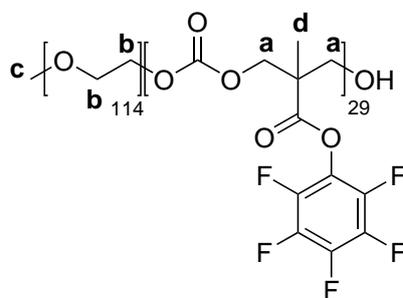
$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$; δ [ppm] = 4.17 (m, 8H, **a+a'**), 3.48 (s, 8H, **b+b'**), 3.21 (s, 6H, **c+c'**), 3.13 (m, 4H, **d+d'**), 2.84 (m, 8H, **e+e'**), 1.66 (m, 4H, **f+f'**), 1.18 (m, 4H, **g+g'**), 1.04 (s, 6H, **h+h'**). (siehe Anhang Abbildung 47)

III NMR Reaktionskontrolle:

$^{19}\text{F-NMR}$: 376 MHz, $\text{DMSO}-d_6$; δ [ppm] = -155.27 (m, 2F, **a**), -159.92 (m, 1F, **b**), -164.84 (m, 2F, **c**). Keine weiteren Signalen wurden beobachtet. Es kam zu keinem Umsatz der PFP-Ester.

III NMR Produkt:

^{19}F -NMR: 376 MHz, $\text{DMSO}-d_6$; δ [ppm] = -155.07 (m, 2F, **a**), -159.05 (m, 1F, **b**), -164.18 (m, 2F, **c**).



^1H -NMR: 400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$; δ [ppm] = 4.40 (dd, 4H, **a**), 3.48 (s, 4H, **b**), 3.20 (s, 3H, **c**), 1.37 (s, 3H, **d**). (siehe Anhang Abbildung 48)

Das Nanogel aus Ansatz **II**, also die mit Spermin kernvernetzten Mizellen aus mPEG_{114} - b -Poly(MTC-PFP) $_{29}$, wurden für die Beladung mit Poly-I:C verwendet. Dazu wurde das Nanogel und das Poly-I:C gelöst in sterilem physiologischem Wasser ($c(\text{NaCl}) = 9 \text{ g l}^{-1}$) zusammengegeben und für 45 Minuten inkubiert.

Abkürzungsverzeichnis

bis-MPA	2,2-Bis(hydroxymethyl)propionsäure
bis-PFPC	Bis(pentafluorphenyl)carbonat
DCM	Dichlormethan
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsRNA	<i>double-stranded ribonucleic acid</i>
eq	Äquivalente
GPC	Gelpermeationschromatographie
HFIP	Hexafluorisopropanol
IMDQ	Imidazochinolin
MA	Methacrylat
mPEG	Poly(ethylenglycol)methylether
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MTC-PFP	5-Methyl-5-pentafluorphenyloxycarbonyl-1,3-dioxan-2-on
mTEG	Tri(ethylenglycol)methylether
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
PDI	Polydispersitätsindex
PFP	Pentafluorphenol
Poly-I:C	<i>polyinosinic-polycytidylic acid</i>
Poly-ICLC	<i>polyinosinic-polycytidylic acid stabilized with poly-L-lysine and carboxymethylcellulose</i>
RAFT	<i>reversible addition-fragmentation chain transfer</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROP	ringöffnende Polymerisation
ri	<i>refractive index</i>
rt	Raumtemperatur
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
TFMSA	Trifluormethylsulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran
TLR	Toll-like-Rezeptoren
UCST	<i>upper critical solution temperature</i>

Abbildungsverzeichnis

1	Ein Beispiel der Struktur von RNA mit den vier Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Uracil (U).	1
2	Schema von einem Signalweg des angeborenen Immunsystems, der durch Aktivierung von TLR3 ausgelöst wird und bei dem es zur Aktivierung von Interferon-Genen kommt. ^[7]	2
3	Synthese eines aromatischen Polycarbonats aus Bisphenol A und Phosgen durch Polykondensation unter Freisetzung von Chlorwasserstoff. ^[16]	4
4	Die kationische ROP ist dargestellt. Ein Alkohol fungiert als Initiator und greift das durch die Säure aktivierte cyclische Carbonat-Monomer an. Dabei entsteht eine Alkohol-Gruppe, die das nächste Monomer angreifen kann und somit die Polymerisation fortführt. ^[21]	5
5	Zwei Monomere können miteinander reagieren und somit selbst die Polymerisation initiieren. In der Folge kommt es zur Bildung von Homopolymeren. ^[20]	5
6	Die Umsetzung der PFP-Reaktivester mit Aminen zur Funktionalisierung des Polymers ist dargestellt.	6
7	Schema der Synthese beladener Nanogele. Zunächst werden die amphiphilen Blockcopolymere mit hydrophilem mPEG- (blau) und hydrophobem Polycarbonat-Block (grün) hergestellt. Es folgt die Selbstassemblierung in Ethanol zu Mizellen. Diese werden mit Spermin kernvernetzt und funktionalisiert. Der letzte Schritt ist die Beladung des Nanogels mit Poly-I:C. Abbildung und weitere Ausschnitte daraus zur Verfügung gestellt von Christian Czysch.	7
8	Synthese von 5-Methyl-5-pentafluorphenyloxycarbonyl-1,3-dioxan-2-on MTC-PFP. Bis-MPA wurde in einer einstufigen Synthese mit Bis(pentafluorphenyl)carbonat für 18 Stunden bei Raumtemperatur in THF unter CsF-Katalyse umgesetzt um das cyclische Carbonat-Monomer zu erhalten.	8
9	Schema der Cyclisierung und Veresterung des bis-MPA mit Bis(pentafluorphenyl)carbonat zum cyclischen Carbonat-Monomer MTC-PFP. In beiden Schritten wird jeweils ein Molekül Bis(pentafluorphenyl)carbonat umgesetzt.	9
10	¹ H-NMR (400 MHz) von 5-Methyl-5-pentafluorphenyloxycarbonyl-1,3-dioxan-2-on in CDCl ₃	10
11	¹⁹ F-NMR (376 MHz) von 5-Methyl-5-pentafluorphenyloxycarbonyl-1,3-dioxan-2-on in CDCl ₃	10
12	Synthese von mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -Poly(MTC-PFP). 30, 35 und 40 Äquivalente des Carbonat-Monomer wurden für 140-160 Stunden bei Raumtemperatur in DCM durch kationische ROP umgesetzt. Die Polymerisation wurde durch mPEG-5k initiiert und durch TFMSA katalysiert.	11
13	¹ H-NMR (400 MHz) von mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -Poly(MTC-PFP) in CDCl ₃ . In blau ist der Ansatz mit 30, in grün der Ansatz mit 35 und in rot der Ansatz mit 40 Äquivalenten an eingesetztem Carbonat-Monomer zu sehen.	12
14	¹⁹ F-NMR (376 MHz) von mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -Poly(MTC-PFP) in CDCl ₃ . In blau ist der Ansatz mit 30, in grün der Ansatz mit 35 und in rot der Ansatz mit 40 Äquivalenten an eingesetztem Carbonat-Monomer zu sehen.	12

15	GPC-Messungen der gefällten Blockcopolymere mit 26, 28 und 29 Carbonat-Wiederholungseinheiten sowie des mPEG ₁₁₄ als Referenz sind dargestellt. Die Signale stammen vom RI-Detektor (Brechungsindex).	13
16	¹ H-NMR (400 MHz) von einem mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -Poly(MTC-PFP) Reaktionsansatz in CDCl ₃ . Es sind drei Reaktionskontrollen nach circa 50 Stunden (rot), nach circa 130 Stunden (grün) und nach circa 160 Stunden (blau) dargestellt. Die blauen Signale wurden integriert.	14
17	¹ H-NMR (400 MHz) von mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -Poly(MTC-PFP) ₂₉ in CDCl ₃	15
18	Es sind GPC-Messungen des in Diethylether gefällten Blockcopolymeren mit 29 Carbonatwiederholungseinheiten (schwarz) und der zugehörigen in Hexan gefällten Reaktionskontrolle nach 160 Stunden (rot) zu sehen.	17
19	Hier ist der erste Schritt der Nanogelsynthese dargestellt, in dem die Blockcopolymere zu Mizellen assembliert werden.	18
20	Selbstassemblierung von mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -Poly(MTC-PFP) ₂₉ zu Mizellen in EtOH bei 40 °C.	18
21	Hier ist der zweite Schritt der Nanogelsynthese dargestellt, bei dem die Mizellen kernvernetzt und zugleich kationisch modifiziert werden.	19
22	Synthese von kernvernetzten Nanogelen (mit 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan I und Spermin II) basierend auf Mizellen aus mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -Poly(MTC-PFP) ₂₉ Blockcopolymeren. Die Umsetzung erfolgte für insgesamt 20 Minuten in Ethanol bei 40 °C. Neben dem Vernetzer wurde Triethylamin zugesetzt, um das frei werdende, saure PFP zu neutralisieren und Ethanolamin zum Quenchen verwendet.	20
23	¹⁹ F-NMR (376 MHz) der Reaktionsansätze mit 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan I (blau), Spermin II (grün) und ohne Vernetzer III (rot) in DMSO- <i>d</i> ₆ . Bei den Ansätzen I und II wurden alle PFP-Ester umgesetzt und es liegt nur noch freies PFP vor. Bei Ansatz III wurden die PFP-Ester nicht umgesetzt.	21
24	DLS Messung des resuspendierten Carbonat-Spermin-Nanogels II in Wasser nach Gefriertrocknen.	22
25	DLS Messung des resuspendierten Carbonat-(1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan)-Nanogels I in Wasser nach Gefriertrocknen.	22
26	Blockcopolymer Poly(mTEG-MA) ₁₂ - <i>b</i> -Poly(PFP-MA) ₄₀	23
27	DLS Messung des Referenz-Methacrylat-Spermin-Nanogels in Wasser nach Gefriertrocknen.	24
28	Hier ist der dritte Schritt der Nanogelsynthese dargestellt, bei dem das kernvernetzte kationische Nanogel mit der RNA Poly-I:C beladen wird.	25
29	Darstellung der zwei Nucleotide Inosin (I) und Cytidin (C), welche die Bausteine des Poly-I:C sind. Im Gegensatz zu der Paarung Cytidin und Guanosin werden hier nur zwei statt drei Wasserstoffbrücken ausgebildet.	25
30	1%-ige Agarose-Gelelektrophorese des Carbonat-Spermin-Nanogels beladen mit Poly-I:C in unterschiedlichen N:P-Verhältnissen (über den Spuren angegeben). In Spur 1 ist als Kontrolle nur Poly-I:C und in Spur 13 zur Kontrolle das unbeladene Nanogel aufgetragen. Das Gel lief bei 140 V für 30 Minuten. Die RNA wurde mit Gel-Red unter UV-Licht sichtbar gemacht.	26

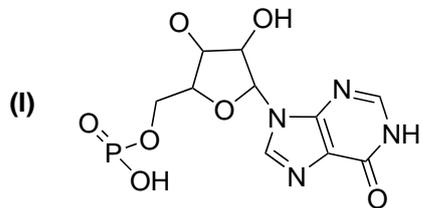
31	1%-ige Agarose-Gelelektrophorese des Referenz-Methacrylat-Spermin-Nanogels beladen mit Poly-I:C in unterschiedlichen N:P-Verhältnissen (über den Spuren angegeben). In Spur 1 ist als Kontrolle nur Poly-I:C und in Spur 13 zur Kontrolle das unbeladene Nanogel aufgetragen. Das Gel lief bei 140 V für 30 Minuten. Die RNA wurde mit Gel-Red unter UV-Licht sichtbar gemacht.	27
32	DLS Messung des mit Poly-I:C im N:P-Verhältnis 40:1 beladenen Carbonat-Spermin-Nanogels in Wasser.	28
33	DLS Messung des mit Poly-I:C im N:P-Verhältnis 40:1 beladenen Referenz-Methacrylat-Spermin-Nanogels in Wasser.	29
34	Zeta-Potential Messung des unbeladenen und mit Poly-I:C im N:P-Verhältnis 40:1 beladenen Carbonat-Spermin-Nanogels in Wasser.	30
35	Zeta-Potential Messung des unbeladenen und mit Poly-I:C im N:P-Verhältnis 40:1 beladenen Referenz-Methacrylat-Spermin-Nanogels in Wasser.	30
36	1%-ige Agarose-Gelelektrophorese von Poly-I:C, das für 4 Stunden mit Ultraschall behandelt wurde, und unbehandeltem Poly-I:C zur Kontrolle. Das Gel lief bei 140 V für 30 Minuten. Die RNA wurde mit Gel-Red unter UV-Licht sichtbar gemacht.	31
37	DLS Messung des Carbonat-Spermin-Nanogels in Wasser, dem einmolare Natronlauge hinzugefügt wurde ($V:V$, 10:1).	32
38	DLS Messung des Referenz-Methacrylat-Spermin-Nanogels in Wasser, dem einmolare Natronlauge hinzugefügt wurde ($V:V$, 10:1).	32
39	1%-ige Agarose-Gelelektrophorese des Carbonat-Spermin-Nanogels beladen mit Poly-I:C in unterschiedlichen N:P-Verhältnissen (über den Spuren angegeben). In Spur 1 ist als Kontrolle nur Poly-I:C und in Spur 13 zur Kontrolle das unbeladene Nanogel aufgetragen. Das Gel lief zunächst bei 140 V für 30 Minuten (siehe Abbildung 30). Dann wurde nach 17 Stunden erneut ein Gellauf bei 140 V für 30 Minuten durchgeführt. Die RNA wurde mit Gel-Red unter UV-Licht sichtbar gemacht.	33
40	Synthese von 5-Methyl-5-pentafluorphenyloxycarbonyl-1,3-dioxan-2-on .	36
41	Synthese von mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -Poly(MTC-PFP).	38
42	Synthese von kernvernetzten Nanogelen (mit 1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan I und Spermin II) basierend auf Mizellen aus mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -Poly(MTC-PFP) ₂₉ Blockcopolymeren.	40
43	Die Rechnung zur Bestimmung der mittleren molaren Masse einer phosphathaltigen Einheit des Poly-I:C ist dargestellt.	50
44	Die Rechnung zur Bestimmung der mittleren molaren Masse einer aminhaltigen Einheit des Carbonat-Spermin-Nanogels ist dargestellt.	51
45	Die Rechnung zur Bestimmung der mittleren molaren Masse einer aminhaltigen Einheit des Methacrylat-Spermin-Nanogels ist dargestellt.	52
46	¹ H-NMR (400 MHz) des Carbonat-(1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan)-Nanogels I in DMSO- <i>d</i> ₆	53
47	¹ H-NMR (400 MHz) des Carbonat-Spermin-Nanogels I in DMSO- <i>d</i> ₆	54
48	¹ H-NMR (400 MHz) des Kontrollansatzes ohne Vernetzer III (mPEG ₁₁₄ - <i>b</i> -Poly(MTC-PFP) ₂₉) in DMSO- <i>d</i> ₆	55

Literaturverzeichnis

- [1] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Stryer Biochemie*, Springer Spektrum, 7th ed., **2013**, pp. 110–141, 993–1024.
- [2] S. Hartmann, L. Nuhn, B. Palitzsch, M. Glaffig, N. Stergiou, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, R. Zentel, *Advanced Healthcare Materials* **2015**, *4*, 522–527.
- [3] L. Hammerich, T. U. Marron, R. Upadhyay, J. Svensson-Arvelund, M. Dhainaut, S. Hussein, Y. Zhan, D. Ostrowski, M. Yellin, H. Marsh, A. M. Salazar, A. H. Rahman, B. D. Brown, M. Merad, J. D. Brody, *Nature Medicine* **2019**, *25*, 814–824.
- [4] M. Smith, E. García-Martínez, M. R. Pitter, J. Fucikova, R. Spisek, L. Zitvogel, G. Kroemer, L. Galluzzi, *OncoImmunology* **2018**, *7*, 1–15.
- [5] X. Zhu, F. Nishimura, K. Sasaki, M. Fujita, J. E. Dusak, J. Eguchi, W. Fellows-Mayle, W. J. Storkus, P. R. Walker, A. M. Salazar, H. Okada, *Journal of Translational Medicine* **2007**, *5*, 1–15.
- [6] A. J. Sadler, B. R. Williams, *Nature Reviews Immunology* **2008**, *8*, 559–568.
- [7] S. Akira, K. Takeda, *Nature Reviews Immunology* **2004**, *4*, 499–511.
- [8] L. Nuhn, N. Vanparijs, A. De Beuckelaer, L. Lybaert, G. Verstraete, K. Deswarte, S. Lienenklaus, N. M. Shukla, A. C. D. Salyer, B. N. Lambrecht, J. Grooten, S. A. David, S. De Koker, B. G. De Geest, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2016**, *113*, 8098–8103.
- [9] L. Nuhn, L. Braun, I. Overhoff, A. Kelsch, D. Schaeffel, K. Koynov, R. Zentel, *Macromolecular Rapid Communications* **2014**, *35*, 2057–2064.
- [10] K. Raemdonck, B. Naeye, K. Buyens, R. E. Vandenbroucke, A. Høgset, J. De-meester, S. C. D. Smedt, *Advanced Functional Materials* **2009**, *19*, 1406–1415.
- [11] L. Nuhn, M. Hirsch, B. Krieg, K. Koynov, K. Fischer, M. Schmidt, M. Helm, R. Zentel, *ACS Nano* **2012**, *6*, 2198–2214.
- [12] L. Nuhn, L. Kaps, M. Diken, D. Schuppan, R. Zentel, *Macromolecular Rapid Communications* **2016**, *37*, 924–933.
- [13] A. C. Engler, X. Ke, S. Gao, J. M. Chan, D. J. Coady, R. J. Ono, R. Lubbers, A. Nelson, Y. Y. Yang, J. L. Hedrick, *Macromolecules* **2015**, *48*, 1673–1678.
- [14] Y. Haramiishi, N. Chanthaset, K. Kan, M. Akashi, H. Ajiro, *Polymer Degradation and Stability* **2016**, *130*, 78–82.

-
- [15] R. C. Pratt, F. Nederberg, R. M. Waymouth, J. L. Hedrick, *Chem. Commun.* **2008**, *2*, 114–116.
- [16] D. Kyriacos in *Brydson's Plastics Materials: Eighth Edition*, Butterworth-Heinemann, **2016**, pp. 457–485.
- [17] W. H. Carothers, F. J. Van Natta, *Journal of the American Chemical Society* **1930**, *52*, 314–326.
- [18] J. Xu, E. Feng, J. Song, *Journal of Applied Polymer Science* **2014**, *131*, 39822.
- [19] D. P. Sanders, K. Fukushima, D. J. Coady, A. Nelson, M. Fujiwara, M. Yasumoto, J. L. Hedrick, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 14724–14726.
- [20] L. Mespouille, O. Coulembier, M. Kawalec, A. P. Dove, P. Dubois, *Progress in Polymer Science* **2014**, *39*, 1144–1164.
- [21] J. Matsuo, S. Nakano, F. Sanda, T. Endo, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1998**, *36*, 2463–2471.
- [22] A. C. Engler, J. M. W. Chan, D. J. Coady, J. M. O'Brien, H. Sardon, A. Nelson, D. P. Sanders, Y. Y. Yang, J. L. Hedrick, *Macromolecules* **2013**, *46*, 1283–1290.
- [23] C. Czysch, *Functional Polycarbonate Polymers for Drug Delivery (MSc Thesis)*, **2018**.
- [24] Y. Dai, X. Zhang, *Polymer Chemistry* **2019**, *10*, 296–305.
- [25] F. Käfer, F. Liu, U. Stahlschmidt, V. Jérôme, R. Freitag, M. Karg, S. Agarwal, *Langmuir* **2015**, *31*, 8940–8946.
- [26] S. Bhattacharjee, *Journal of Controlled Release* **2016**, *235*, 337–351.

Anhang



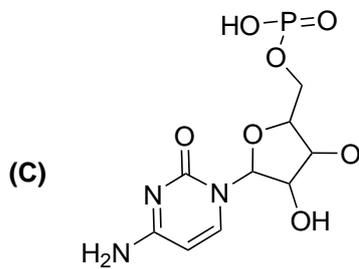
molare Masse: 330.19 g/mol

Addition der molaren Massen der Bestandteile des Polymers:

$$\begin{aligned} &330.19 \text{ g/mol} \cdot 1 \\ &+305.18 \text{ g/mol} \cdot 1 \\ &=635.37 \text{ g/mol} \end{aligned}$$

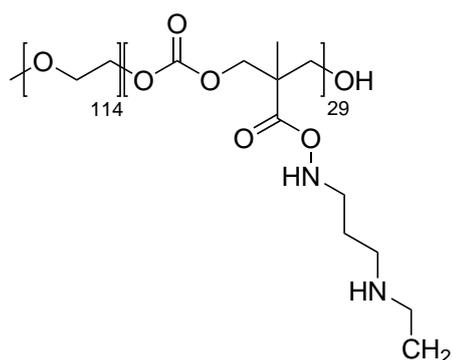
Division durch die Anzahl der Phosphate:

$$\begin{aligned} &635.37 \text{ g/mol} / 2 \\ &=317.69 \text{ g/mol} \end{aligned}$$



molare Masse: 305.18 g/mol

Abbildung 43: Die Rechnung zur Bestimmung der mittleren molaren Masse einer phosphathaltigen Einheit des Poly-I:C ist dargestellt.

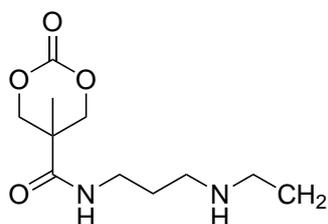


Addition der molaren Massen der Bestandteile des Polymers:

$$\begin{aligned}
 &5000 \text{ g/mol} * 1 \\
 &+243.28 \text{ g/mol} * 29 \\
 &=12055.12 \text{ g/mol}
 \end{aligned}$$

Division durch die Anzahl der Amine:

$$\begin{aligned}
 &12055.12 \text{ g/mol} / 29 \\
 &=415.69 \text{ g/mol}
 \end{aligned}$$



molare Masse: 243.28 g/mol

mPEG-5k

molare Masse: 5000 g/mol

Abbildung 44: Die Rechnung zur Bestimmung der mittleren molaren Masse einer aminhaltigen Einheit des Carbonat-Spermin-Nanogels ist dargestellt.

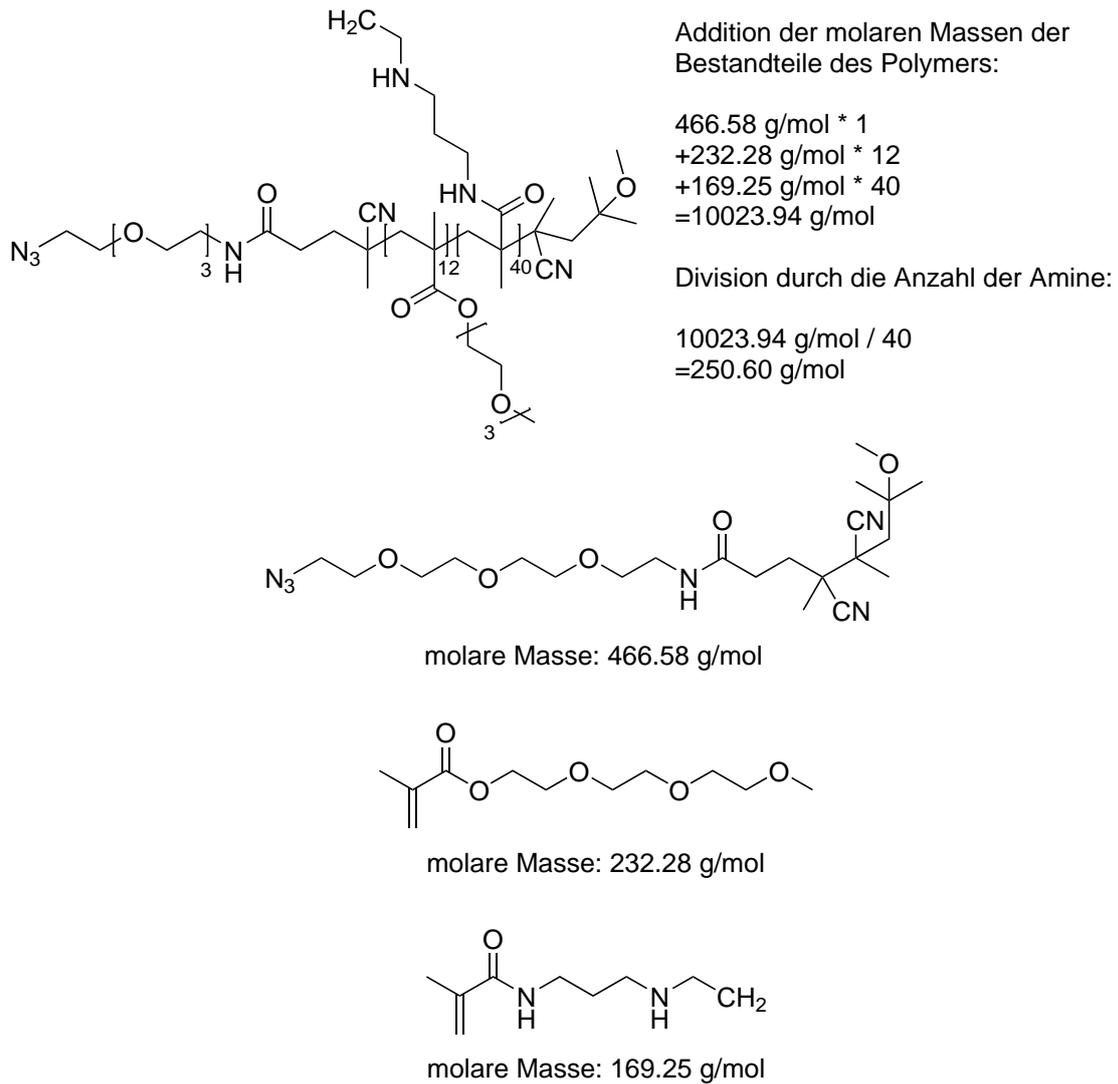


Abbildung 45: Die Rechnung zur Bestimmung der mittleren molaren Masse einer aminhaltigen Einheit des Methacrylat-Spermin-Nanogels ist dargestellt.

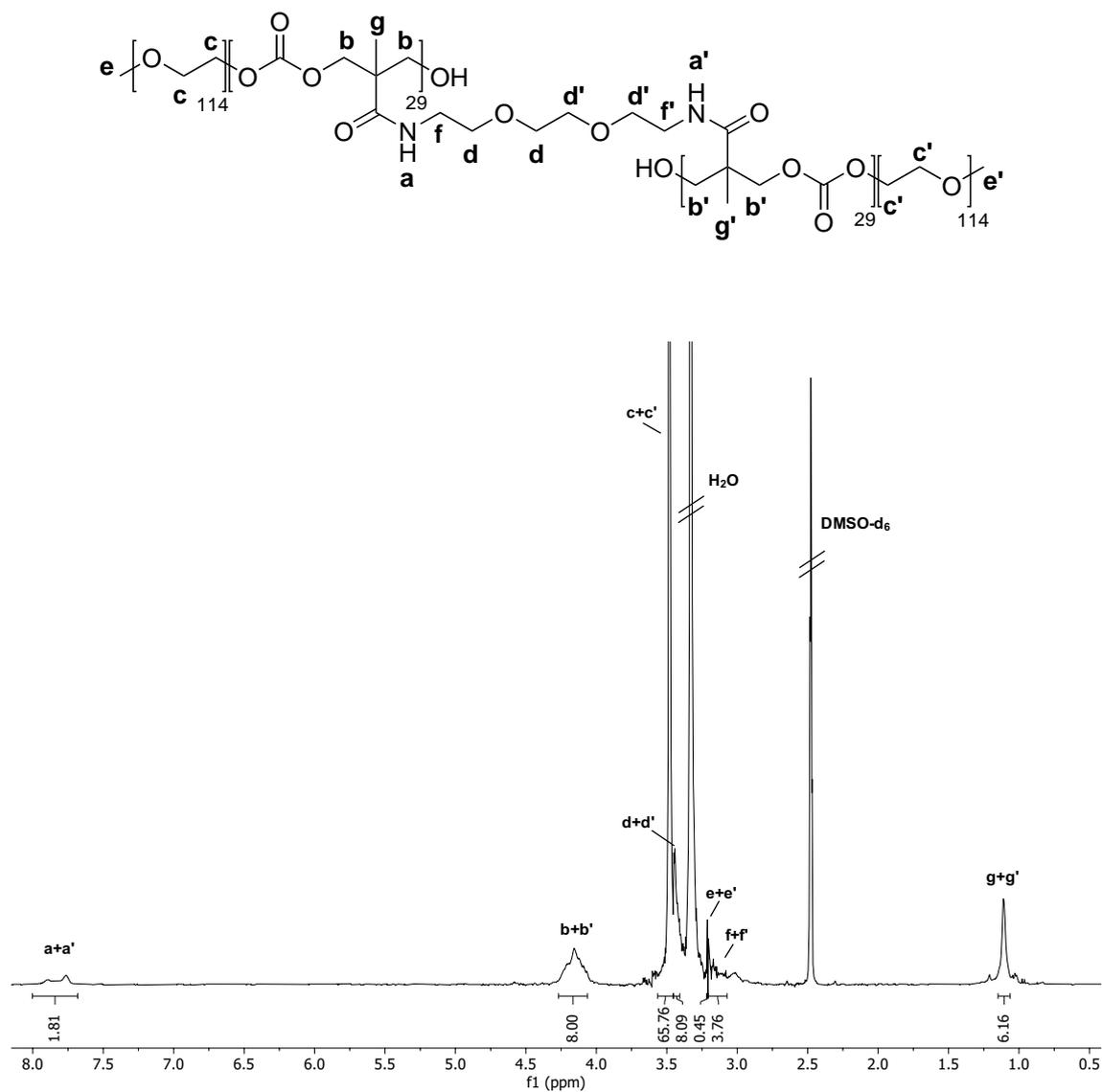


Abbildung 46: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) des Carbonat-(1,8-Diamino-3,6-dioxaoctan)-Nanogels I in $\text{DMSO-}d_6$.

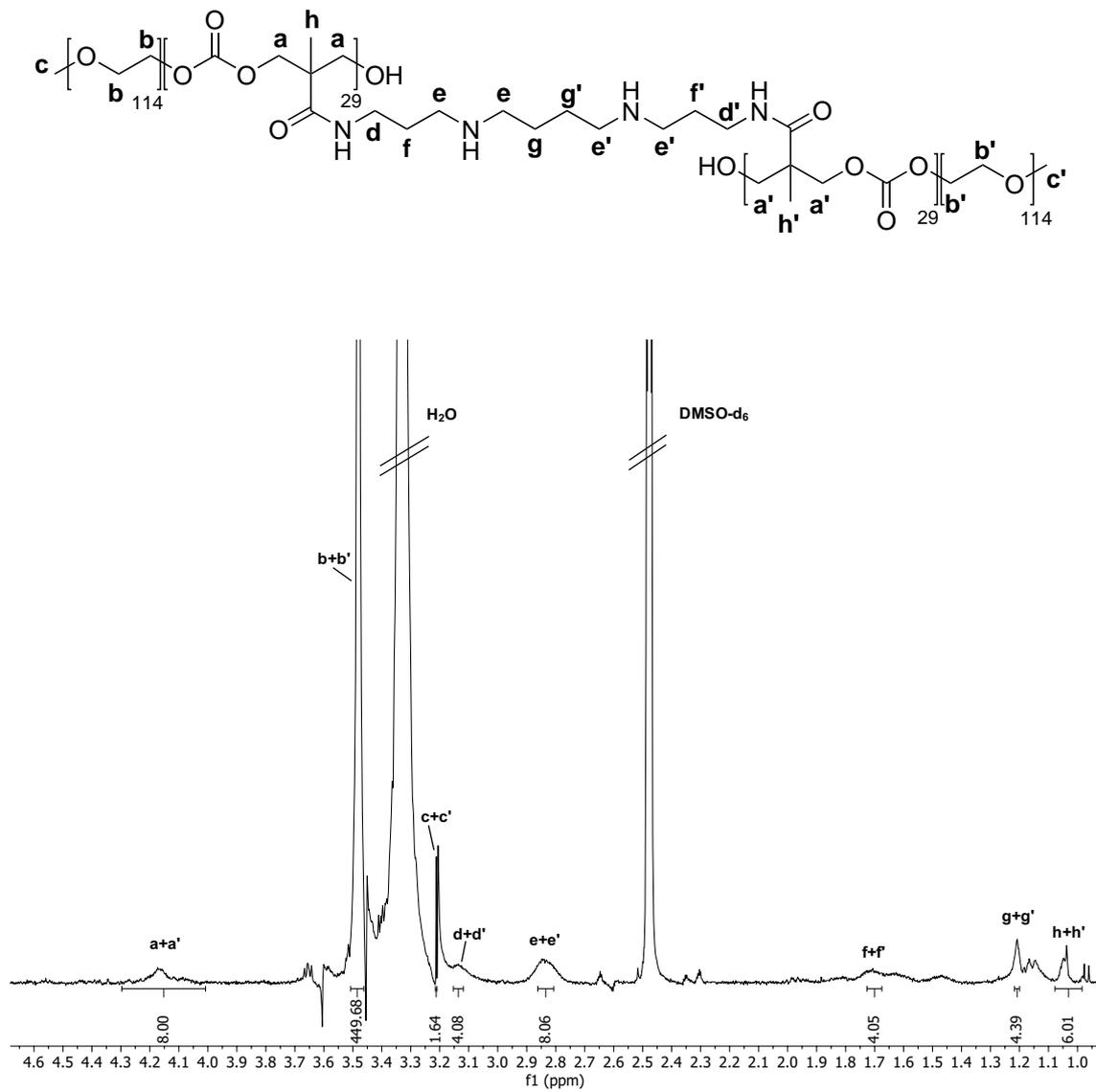


Abbildung 47: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) des Carbonat-Spermin-Nanogels I in DMSO-d_6 .

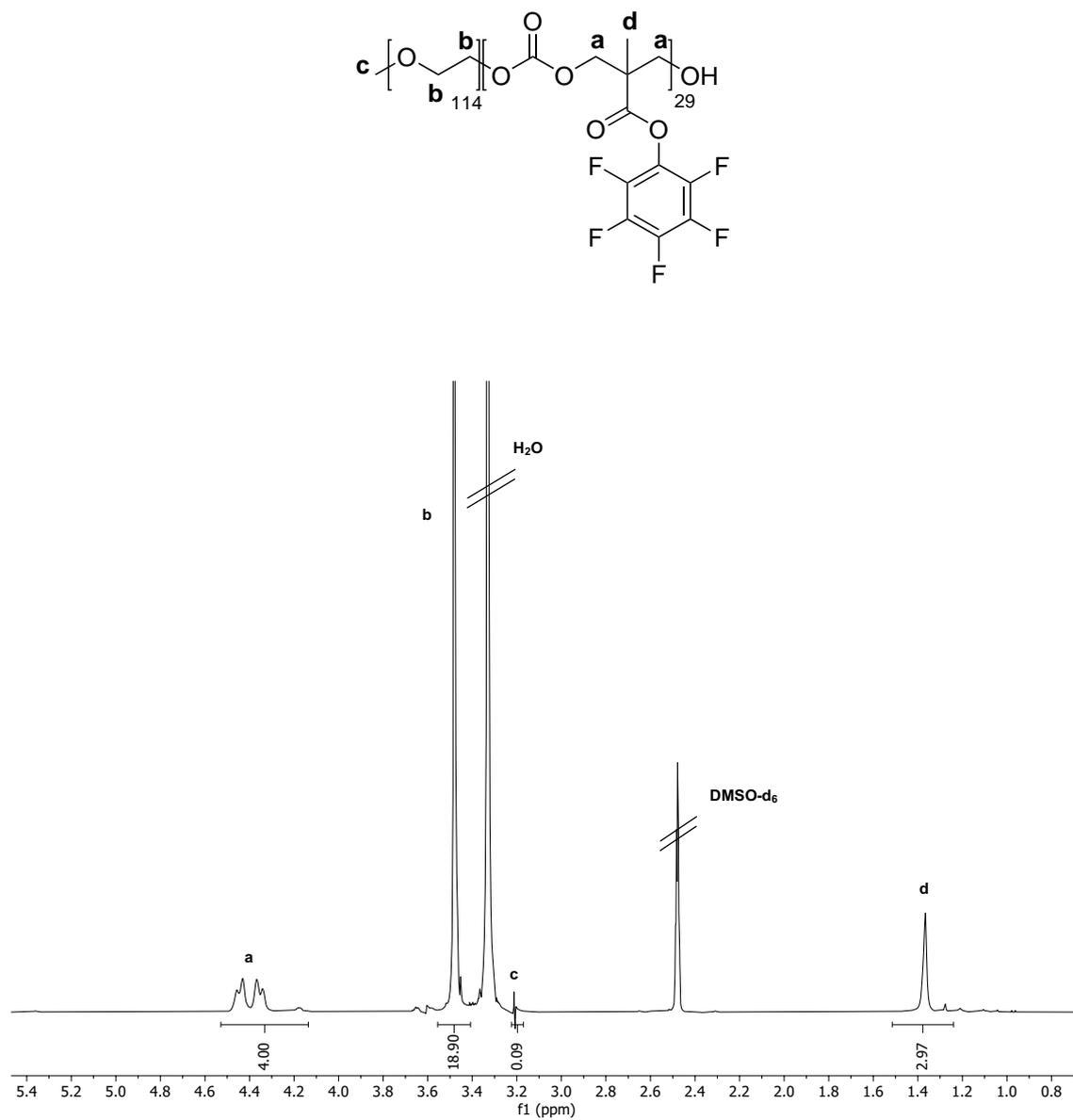


Abbildung 48: $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz) des Kontrollansatzes ohne Vernetzer **III** ($m\text{PEG}_{114}\text{-}b\text{-Poly}(\text{MTC-PFP})_{29}$) in $\text{DMSO-}d_6$.