

Technische Universität München
Lehrstuhl für Makromolekulare Stoffe

Posttranslationale chemische Modifizierungen eines Elastin-mimetischen Proteins für medizinische Anwendungen

Doris Kaufmann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Klaus Köhler
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Oskar Nuyken, i. R.
2. Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauff

Die Dissertation wurde am 04. Mai 2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 21. Juni 2006 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2003 bis April 2006 am Lehrstuhl für Makromolekulare Stoffe im Institut für Technische Chemie der Technischen Universität München unter Leitung von *Prof.-Ing. O. Nuyken* angefertigt.

Bei *Prof. Dr.-Ing. Oskar Nuyken* möchte ich mich sehr herzlich für die Aufnahme an seinem Lehrstuhl und die Betreuung meiner Dissertation bedanken. Insbesondere möchte ich mich bei ihm für das mir stets entgegengebrachte große Vertrauen, die Bereitstellung aller nötigen Mittel sowie die große Freiheit bei der Bearbeitung meines Themas bedanken.

Mein besonderer Dank gilt vor allem *Dr. Ralf Weberskirch* für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die vielen hilfreichen Gespräche und für seine vielseitige Unterstützung. Außerdem möchte ich mich dafür bedanken, dass ich aktiv an zwei Internationalen Konferenzen teilnehmen durfte.

Großer Dank gilt Frau *Dr.-Ing. Heidi Samarian*, die nicht nur die guten Arbeitsbedingungen am Lehrstuhl ermöglicht, sondern mir auch in allen Notlagen stets hilfsbereit zur Seite stand.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn *Prof. Dr. Johannes Buchner* und *Dr. Thomas Scheibel* vom Lehrstuhl für Biotechnologie der Technischen Universität München. Ein großer Teil dieser Arbeit entstand in ihrem Laboratorium, dem „*Fiberlab*“.

Für die Durchführung der Zelladhäsionstests gebührt Frau *Gabi Chmel* ein außerordentlicher Dank, des weitem danke ich Herrn *Dr. Jörg Auernheimer* für die Bereitstellung des Zyκλο-RGDs.

Meiner Freundin und Ex-Kollegin Frau *Annalisa Giró* danke ich von ganzem Herzen für die „Versüßung“ jeder Stunde am Lehrstuhl, für ein offenes Ohr in allen Belangen und das „*Bella Italia*“-feeling.

Meinen Laborkollegen Herrn *Dr. Erwin Bacher* und Herrn *Dr. Udo Anders* gebührt auch ein herzlicher Dank, für die gute Einführung in die „Laborgeheimnisse“ und so manch unterhaltsamen Plausch.

Weiterhin danke ich allen Mitgliedern der „Biofutzi“-Crew: *Dr. Andreas Junger*, *Anne Fiedler*, *Dr. Jurgen Smeenk* und *Annalisa Giró* für die stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Für die Dienstleistungen aus dem Bereich Analytik danke ich Herrn *Cordes* (ESI-MS), Herrn *Krause* (MALDI-TOF) und natürlich unserer NMR-Crew.

Für den Beistand in allen bürokratischen Belangen möchte ich mich herzlich bei Frau *Brebeck*, Frau *Schindler* und Frau *Bauer* bedanken.

Bei meinen Praktikanten *Georg Simson*, *Saskia Stegmeier* und *Andreas Kastenmüller* möchte ich mich für das große Engagement bedanken.

Ich danke von ganzem Herzen allen Makros für die gute Zusammenarbeit auch außerhalb des Uni-Lebens. Dank Euch hab ich so manch öden Fernsehfilm verpasst...Namentlich möchte ich mich bedanken bei: *Marin Steenackers* (Geschäftsleitung PC), *Dr. Martin Mayershofer & Benjamin Roßbach* (Urlaub auf Türkisch), *Robert Luxenhofer* (der „Kugel-Blitz“), *Dr. Steffen Jungermann* (Kletter-Max 1), *Dr. Martin Bortenschlager* (die „Aktuelle“), *Dr. Andreas Junger* (die „Schnecke“) *Julia Müller* (Kletter-Max 2) und *Stephan Huber* (sprachlicher Beistand).

Schließlich möchte ich meiner Familie danken für jegliche Unterstützung während meiner 22-jährigen Ausbildungsphase. Und natürlich das Allerwichtigste:

Danke Spatzl !

Meinen Lieben

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	10
2	GRUNDLAGEN	14
2.1	ELASTIN UND ELASTIN LIKE POLYMERS	14
2.1.1	<i>Natürliches Elastin</i>	14
2.1.2	<i>ELPs für medizinische Anwendungen</i>	16
2.2	POLYMERE ALS WIRKSTOFFTRÄGER	18
2.2.1	<i>Das therapeutische Konzept polymerer Wirkstoffträger</i>	18
2.2.2	<i>Polymere Krebstherapeutika</i>	22
2.3	POLYMERE ALS GRUNDGERÜSTE FÜR DIE GEWEBEZÜCHTUNG.....	26
2.3.1	<i>Die Extrazelluläre Matrix</i>	26
2.3.2	<i>Integrine und die RGD-Sequenz</i>	28
2.3.3	<i>Polymere als Biomaterialien für die Gewebezüchtung</i>	30
3	ZIELSETZUNG	36
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	39
4.1	BIOCHEMISCHE ARBEITEN.....	39
4.1.1	<i>Punktmutagenese innerhalb eines DNA-Abschnitts</i>	39
4.1.2	<i>Punktmutagenese innerhalb des DNA-Abschnitts von His₆-[EMM]₇</i>	40
4.1.3	<i>Expression von His₆-[EMM]₇ (E1) und His₆-Cys-[EMM]₇ (E2)</i>	42
4.1.4	<i>Bromcyano-Spaltungen von His₆-[EMM]₇ (E1) und His₆-Cys-[EMM]₇ (E2)</i>	45
4.1.5	<i>Analytische Daten von [EMM]₇ (E3)</i>	47
4.1.6	<i>Analytische Daten von Cys-[EMM]₇ (E4)</i>	51
4.2	CHARAKTERISIERUNG UND SYNTHESE POLYMERER WIRKSTOFFTRÄGER AUF DER BASIS.. VON [EMM] ₇	55
4.2.1	<i>Die Prinzipien der Peptidsynthese</i>	55
4.2.2	<i>Synthesestrategie für ein neuartiges Polymer-Doxorubicin-Konjugat auf der..... Basis von [EMM]₇</i>	59
4.2.3	<i>Synthese und Charakterisierung des enzymatisch abbaubaren GFLG-Linkers</i> . 61	
4.2.4	<i>Synthese und Charakterisierung des RBITC-GFLG-Linkers</i>	61
4.2.5	<i>Synthese und Charakterisierung des Dox-GFLG-Linkers</i>	63

4.2.6	<i>Testung der Reaktivität ausgewählter Kupplungsreagenzien</i>	65
4.2.7	<i>Synthese und Charakterisierung der Endverbindung RBITC-GFLG-[EMM]₇</i> ..	68
4.2.8	<i>Synthese und Charakterisierung der Endverbindung Dox-GFLG-[EMM]₇</i>	69
4.3	SYNTHESE, CHARAKTERISIERUNG UND BIOLOGISCHE EVALUATION ZELLADHÄSIVER.....	
	[EMM] ₇ -HYDROGELE	74
4.3.1	<i>Synthesestrategie zur Darstellung der 1-1 Konjugate auf Basis von Cys-[EMM]₇</i>	74
4.3.2	<i>Zwei unterschiedliche Synthesestrategien zur Darstellung von bioaktiven</i>	
	<i>[EMM]₇ Hydrogelen</i>	78
4.3.3	<i>Synthese der geschützten bioaktiven Liganden an der Festphase</i>	79
4.3.4	<i>Fmoc- und Boc- Schützungen von [EMM]₇</i>	80
4.3.5	<i>Synthese der biologisch aktiven Hydrogele auf der Basis von Syntheseweg A</i> ..	84
4.3.6	<i>Synthese der biologisch aktiven Hydrogele auf der Basis von Syntheseweg B</i> ..	85
4.3.7	<i>Variante der Syntheseroute B zur Darstellung von bioaktiven Hydrogelen</i>	89
4.4	BIOLOGISCHE EVALUIERUNG BIOAKTIVER [EMM] ₇ -HYDROGELE	91
4.4.1	<i>Bestimmung der Zahl adhärenter Zellen</i>	91
4.4.2	<i>Biologische Evaluierung der Hydrogele V1, V2, V3 und V4</i>	91
4.4.3	<i>Biologische Evaluierung der Hydrogele V1, V5, V6, V7 und V8</i>	93
5	ZUSAMMENFASSUNG	95
6	EXPERIMENTELLER TEIL	99
6.1	MATERIAL UND METHODEN	99
6.1.1	<i>Biochemischer Teil</i>	99
6.1.2	<i>Chemischer Teil</i>	100
6.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITSTECHNIKEN	101
6.2.1	<i>Anzucht und Aufbewahrung von E. coli</i>	101
6.2.2	<i>Transformation von E. coli</i>	102
6.2.3	<i>Präparation, Reinigung und Sequenzierung von DNA</i>	103
6.2.4	<i>Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese</i>	103
6.2.5	<i>Enzymatische Modifikation von DNA</i>	104
6.2.6	<i>Punktmutagenese innerhalb eines DNA Abschnitts (QuickChange®)</i>	104
6.3	EXPRESSION UND REINIGUNG.....	106
6.3.1	<i>Anzucht, Induktion und Ernte der Bakterien</i>	106
6.3.2	<i>Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie mit Ni-NTA</i>	107

6.3.3	<i>Ergänzender Reinigungsschritt durch Proteinpräzipitation</i>	107
6.3.4	<i>Veränderung der Pufferzusammensetzung (Dialyse)</i>	108
6.3.5	<i>Standardreinigung His₆-getagter Proteine</i>	108
6.4	PROTEINANALYTIK.....	110
6.4.1	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	110
6.4.2	<i>Färbung nach Fairbanks</i>	111
6.5	ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN	111
6.6	SYNTHESE DER DOXORUBICIN-WIRKSTOFFTRÄGERKONJUGATE	115
6.6.1	<i>Bromcyano-Spaltungen</i>	115
6.6.2	<i>Synthese enzymatisch abbaubarer Peptidlinker</i>	116
6.6.3	<i>Testung der Kupplungsreagenzien</i>	120
6.6.4	<i>Synthese der Endverbindung Rhodamin-GFLG-[EMM]₇ E8</i>	123
6.6.5	<i>Synthese der Endverbindung Dox-GFLG-[EMM]₇ E9</i>	124
6.7	SYNTHESE DER BIOLOGISCH AKTIVEN HYDROGELE.....	125
6.7.1	<i>Synthese der 1-1 Konjugate mit Cys-[EMM]₇ (E4)</i>	125
6.7.2	<i>Schützungen von [EMM]₇ (E3)</i>	128
6.7.3	<i>Synthese der linearen RGDs</i>	130
6.7.4	<i>Synthese der bioaktiven [EMM]₇-Konjugate</i>	132
6.7.5	<i>Vernetzungen der bioaktiven [EMM]₇-Proteinen zu Hydrogelen</i>	141
6.8	ZELLADHÄSIONSTESTS MIT MC3T3-E1-MAUSOSTEOBLASTEN.....	142
7	ANHANG	144
7.1	VERSUCHSDATEN	144
7.2	ZUSAMMENSTELLUNG DER UNTERSUCHTEN PEPTIDE	145
7.3	ZUSAMMENSTELLUNG DER UNTERSUCHTEN ELASTINE	146
7.4	ZUSAMMENSTELLUNG DER UNTERSUCHTEN HYDROGELE	148
7.5	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	148
8	LITERATURVERZEICHNIS	149

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Alanin
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Ahx	6-Aminohexansäure
Ala	Alanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Äq.	Stoffmengenäquivalent(e)
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asp	Asparaginsäure
Boc	<i>t</i> -Butyloxycarbonyl
bp	<i>base pairs</i>
BS ₃	Bis(Sulphosuccinimidyl)Suberat
^t Bu	tertiäres-Butyl
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein
ca.	zirka
CDI	Carbonyldiimidazol
Cys	Cystein
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan

DIEA	Diethylamin
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
Dox	Doxorubicin
DTNB	5,5' Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (Ellmans Reagenz)
dTNP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escheria Coli</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethlendiamintetraessigsäure
ELP	<i>Elastin like polymer</i>
EMM	Elastin-mimetisches Monomer (bzw. <i>elastin mimetic monomer</i>)
[EMM] ₇	Elastin-mimetisches Monomer mit 7 Wiederholungseinheiten
engl.	englisch
EPR	<i>enhanced permeability and retention</i>
ESI-MS	<i>electro spray ionisation</i> -Massenspektrometrie
F	Phenylalanin
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung

G	Glycin
Gly	Glycin
h	Stunde
H	Histidin
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-uroniumhexafluorophosphat
HBTU	<i>O</i> -Benzotriazole- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-uronium-hexafluorophosphat
His	Histidin
His ₆	Histidin-tag
HFIP	Hexafluorisopropanol
HOAc	Essigsäure
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOObt	3-Hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-on
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
HPMA	<i>N</i> -(2-Hydroxypropyl)-methacrylamid
I	Isoleucin
K	Lysin
Kana	Kanamycin
kb	<i>kilo base(s)</i>
kDa	Kilodalton
L	Leucin
LB-Medium	<i>Luria-Bertani</i> -Medium
Leu	Leucin

LMW	<i>low molecular weight</i>
M	Methionin
MALDI-TOF-MS	<i>matrix assisted laser desorptions ionisation-time of flight</i> Massenspektrometrie
Met	Methionin
MHz	Megahertz
min	Minute
mL	Milliliter
MWCO	<i>molecular weight cut of</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
P	Prolin
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
Pfu	<i>plaque forming units</i>
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
Phe	Phenylalanin
ppm	<i>parts per million</i>
Pro	Prolin
prot. L.	<i>protected Ligand</i>

PyBOP	Benzotriazol-1-yloxy-tris-pyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
Q	Glutamin
QSCDM	<i>Quick change site-directed mutagenesis</i>
R	Arginin
RBITC	Rhodamin B Isothiocyanat
Rhod	Rhodamin
RP-HPLC	<i>reverse phase high pressure liquid chromatography</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
T	Threonin
TAE-Puffer	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
TCP-Harz	Tritylchloridpolystyrol-Harz
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> - Tetramethylethylendiamin
<i>tert</i>	tertiär
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TIPS	Triisopropylsilan
TMS	Trimethylsilan
TOCSY	<i>total correlated spectroscopy</i>
tr.	trocken
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Trt	Triphenylmethyl
SG	Schutzgruppe
U	<i>unit</i>
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Valin
Val	Valin
vgl.	vergleiche
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den von Chemical Abstracts (Chemical Abstracts, 'Index Guide', 77, 210.) und der IUPAC-IUB-Kommission empfohlenen Richtlinien (*Eur. J. Biochem.* **1984**, 138, 9-37). Fachausdrücke, die aus anderen Sprachen übernommen wurden und Namen sind kursiv geschrieben. Die Nummerierung der Endverbindungen erfolgt nach einem kombinierten Buchstaben-Ziffern-System:

- P für Peptide
- E für Elastine
- V für vernetzte Hydrogele.

Die Ziffer ist eine fortlaufende Nummer innerhalb einer Gruppe – beginnend mit 1. Ein Stern „*“ kennzeichnet Peptide mit Schutzgruppen.

1 Einleitung

Der Traum *Hermann Staudingers*, Chemie und Biologie als Einheit anzusehen, hätte eigentlich in der „Sternstunde der Wissenschaft“ 1953 erfüllt werden können, da dieses Jahr ganz im Zeichen der biologischen und synthetischen Makromoleküle stand.



Abbildung 1-1 Uhrenvergleich der Augenblick kurz vor der Verleihung der Nobelpreise 1953 – eine Sternstunde der Wissenschaft. Von links nach rechts: *F. Lipmann*, *H. Krebs*, *H. Staudinger* und *F. Zernike*.

Staudinger erhielt den Nobelpreis für seinen großen Beitrag zum Verständnis der Polymere, *Krebs* und *Lipmann* trugen auf derselben Nobelpreisfeier über Enzyme und Coenzyme als wichtige biologische Makromoleküle vor und auch der Beginn der

Molekularbiologie zeichnete sich durch die *Nature*-Arbeit von *J. D. Watson* und *F. H. Crick* im Jahr 1953 ab.^[1]

Jetzt, über 50 Jahre nach diesem Meilenstein in den Materialwissenschaften, beginnt die Biologie neben der klassischen Chemie und Physik nachhaltigen Einfluss auf die Entwicklung neuer Materialien zu nehmen. Natürliche Biopolymere sind beeindruckende Beispiele zur Steuerung der Eigenschaften durch die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Monomere und der genauen Abfolge (Primärstruktur), wie diese Monomere in das Biopolymer eingebaut werden. Doch um die Natur nachzuahmen, reichen die klassischen Synthesemöglichkeiten nicht aus. Durch statistische Gesetze werden selbst einfache synthetische Polymere polydispers bezüglich der Molekulargewichte, und bereits zwei verschiedene Monomere werden „*random like*“ in die Polymerkette eingebaut. Im Gegensatz hierzu lässt sich mit Hilfe der Proteinbiosynthese die Kettenlänge, die Monomer(Aminosäure)sequenz, die Stereochemie und sogar die räumliche Anordnung eines Biopolymers exakt kontrollieren.^[2]

Ein Beispiel derartiger Biopolymere sind „**Elastin like polymers**“ (**ELPs**). Diese sind in hohen Ausbeuten zugänglich im Prozess der Proteinbiosynthese, auf Grund des inversen Temperaturübergangs leicht zu reinigen, sowie außergewöhnlich biokompatibel.^[3] Daraus ergibt sich, dass ELPs besonders geeignete Proteine für biomedizinische Anwendungen sind.^[2] ELPs werden bereits auf dem Gebiet der Geweberegeneration^[4-15], dem sogenannten *tissue engineering*¹ und als polymere Wirkstoffträger^[16-21] („*drug carrier*“) eingesetzt.

Zu den polymeren Wirkstoffträgern gehören die polymeren Therapeutika. Nach *H. Ringsdorf* und *R. Duncan* umfassen diese Polymer-Protein-Konjugate und Wirkstoff-Polymer-Konjugate bis hin zu supramolekularen Wirkstofftransportsystemen.^[22] Problematisch gestaltet sich hier das Design der polymeren Konjugate.

¹ „Tissue Engineering ist die Anwendung der Prinzipien und Methoden der Ingenieur- und Lebenswissenschaften für das grundlegende Verständnis der Wechselwirkung von Struktur und Funktion normalen und kranken Gewebes sowie zur Entwicklung von biologischem Gewebe-Ersatz zur Rekonstruktion, dem Erhalt oder der Verbesserung der Gewebefunktionen“ (Zitat aus: Skalak, R. (1988). *Tissue Engineering, Proceedings for a Workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26-29, 1988*. New York).

Idealerweise sollten diese weder toxisch, noch immunogen, monodispers und biologisch eliminierbar sein. Genau aus diesem Grund wird neuerdings in Forschungsarbeiten von *Chilkoti et al.* auf rekombinant hergestellte ELPs zurückgegriffen.^[18]

Auf dem Gebiet des *tissue engineering* gibt es derzeit zahlreiche Bemühungen, polymere Materialien auf der Basis von Proteinen oder Polysacchariden als Grundgerüst der Zellansiedlung zu entwickeln. Die Vorteile, nämlich eine hohe Biokompatibilität und die Abbaubarkeit durch den Organismus, liegen auf der Hand. Insbesondere die rasanten Entwicklungen der Molekularbiologie, Gentechnik und Biotechnologie ermöglichen uns heute, künstliche Proteine mit definierter Zusammensetzung und Molmasse herzustellen. Aus dieser Motivation heraus wurden viele Biomaterialien auf der Basis von Proteinen entwickelt, die z.B. gute Gelbildungseigenschaften^[32] besitzen oder körpereigene Proteine imitieren.^[8] Zu dieser Klasse der im Körper vorkommenden Proteine zählen auch die ELPs. Sie besitzen die Sequenz, Struktur und Eigenschaften des in der extrazellulären Matrix (**ECM** vom engl. *extracellular matrix*) vorkommenden Elastins.

Mit Hilfe der Biosynthese gewonnene Proteine stellen somit viel versprechende Biomaterialien für beide Einsatzgebiete, den polymeren Therapeutika und dem *tissue engineering*, dar. Die Protein-Polymere bestehen aus Wiederholungseinheiten von Strukturmotiven natürlicher Proteine und besitzen äußerst interessante mechanische, chemische und biologische Eigenschaften. Biopolymere können zudem durch den normalen Metabolismus im Körper degradiert werden. Die ungiftigen Abbauprodukte werden entweder ausgeschieden oder für physiologische Prozesse weiterverwendet. Die Aminosäuresequenz und das Molekulargewicht der Protein-Polymere haben einen wesentlichen Einfluss auf die physikochemischen Eigenschaften, die Pharmakokinetik, Zelltransport-Phänomene, biologische Aktivität und die Bioabbaubarkeit. Durch die Errungenschaften der Gentechnologie, nämlich natürliche Organismen gezielt zu „programmieren“, scheint die Tür offen zur Entwicklung maßgeschneiderter Polypeptide für spezifische *in vivo* Anwendungen.

Im folgenden Kapitel werden natürliches Elastin, ELPs und ihre Anwendungen beschrieben. Später wird auf den biologischen Hintergrund der bereits angesprochenen biomedizinischen Gebiete, polymere Therapeutika und *tissue engineering* eingegangen.

2 Grundlagen

2.1 Elastin und Elastin like polymers

2.1.1 Natürliches Elastin

Elastin ist ein Skleroprotein, welches die Mehrzahl der elastischen Fasern in Wirbeltieren bildet. In großer Anzahl befindet es sich im Nackenband, der gelben Bauchhaut, netzartig in den Wandungen von Blutgefäßen sowie in geringeren Mengen unter anderem in Faszien^{II}, der Lunge und der Haut wieder. Es besteht aus Polypeptid-Untereinheiten, aufgebaut aus den folgenden Aminosäuren: Glycin (26–30 %), Alanin (19–25 %), Valin (11–21%), Prolin (9–16 %), im Gegensatz zum Kollagen enthält es jedoch nur wenig 4-Hydroxyprolin (1.5–1.9 %).^[23] Elastin kommt im Körper zusammen mit anderen Strukturproteinen der extrazellulären Matrix (ECM), wie z.B.

^{II} kleine gebündelte Muskel- oder Nervenfasern

Kollagen, vor. Verbünde aus Kollagen und Elastin werden gleichzeitig elastisch und reißfest, da sich die Eigenschaften der beiden Strukturproteine ergänzen. In Analogie zu anderen strukturgebenden Proteinen ist Elastin aus wasserlöslichen Bausteinen, dem Tropoelastin aufgebaut. Tropoelastin wird von den Zellen in löslicher Form sekretiert und anschließend durch das Enzym Lysiloxidase zu einer stabilen polymeren Struktur vernetzt. Dieses Markomolekül ähnelt durch die weitmaschige Vernetzung einem Elastomer. Verformungen, ausgelöst durch Zug- und Druckbelastungen, sind reversibel, das heißt, Elastin kann nicht dauerhaft plastisch verformt werden.^[24]

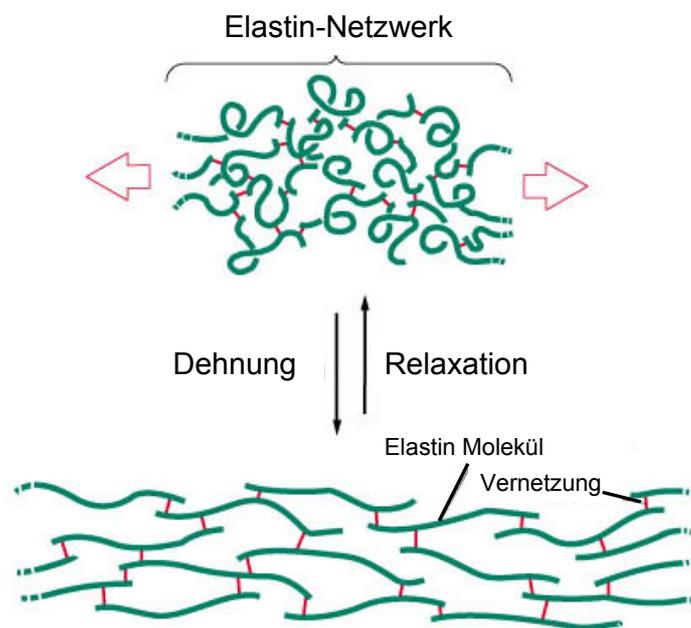


Abbildung 2-1 Dehnen und Zusammenziehen eines elastischen Netzwerkes.

Tropoelastin besteht aus verschiedenen, sich wiederholenden Peptidsequenzen, wobei das Pentapeptid (VPGVG) (siehe Abbildung 2-2) die Wichtigste ist.^[25] Das Elastizitätsverhalten und die Eigenschaften der Peptide, welche unterschiedliche $(VPGVP)_x$ Sequenzen enthalten, wurden von der Arbeitsgruppe *Urry et al.* intensiv untersucht.^[26-29]

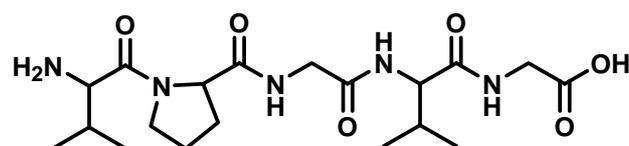


Abbildung 2-2 Die VPGVG (V = Valin, P = Prolin, G = Glycin)-Sequenz.

2.1.2 ELPs für medizinische Anwendungen

Ein neuer, viel versprechender Ansatz der Gentechnik besteht darin, natürliche Polypeptide nachzuahmen, da diese besser als konventionelle Polymere in der Lage sind, die natürlich vorkommenden Gewebestrukturen in der chemischen Zusammensetzung, ihren physikalischen und mechanischen Eigenschaften, sowie in ihrem Langzeitverhalten zu imitieren.^[30-32]

Als besonders interessant erwiesen sich hier die Proteine der Extrazellulären Matrix (ECM), zu denen auch die Klasse der ELPs zählen.^[8,9] Diese besitzen viele Eigenschaften des natürlichen Elastins, unterscheiden sich jedoch in ihrem Aufbau und ihrer Aminosäuresequenz durch eine wesentlich einfachere Zusammensetzung, wodurch alle Struktur-Eigenschaftsbeziehungen leichter zu charakterisieren sind.

Mögliche Anwendungen von Elastin ergeben sich zum Beispiel bei Bypass- oder Darmoperationen. Bei der Bypass-Operation werden Blutgefäße transplantiert, um verschlossene Gefäßabschnitte zu überbrücken. Bisher wurden dafür zahlreiche künstliche Materialien wie Gore-Tex[®], Dacron[®] und Silikon als perikardiale^{III} Ersatzstoffe eingesetzt. Problematisch ist jedoch häufig die Abkapselung dieser künstlichen Materialien und die damit verbundenen Nebenwirkungen (z.B. Abstoßungsreaktionen). Deshalb wird diskutiert, ob eine Ummantelung dieser Materialien mit Elastin oder Elastin-ähnlichen Biopolymeren diese Abkapselung verhindern könnte.^[4]

Ähnliche Probleme treten häufig bei Darmoperationen auf. Nach Entfernen von Darmabschnitten werden die Darmenden aneinander genäht, wobei sich häufig im Bereich der Anastomose^{IV} Verwachsungen und Narben entwickeln, die bis zum Darmverschluss führen können und erneut operiert werden müssen. Um die Bildung von Narben und Verwachsungen zu unterbinden, wird seit vielen Jahren nach neuen Materialien gesucht, die diese Sekundärerkrankungen nach Operationen verhindern.^[33]

^{III} in Umgebung des Herzens

^{IV} Verbindung von Gefäßen, Nerven oder Hohlorganen

Elastin könnte ein geeigneter Werkstoff sein, da die Elastizität an der Anastomose erhalten bliebe und die Verwendung eines körpereigenen („humanen“) Polymers die Gefahr der Narbenbildung vermindern könnte.

Elastin spielt zudem in der kosmetischen Industrie eine große Rolle, auch wenn das Molekül hier in wissenschaftlich fragwürdiger Art eingesetzt wird. In vielen Anti-Falten-Cremes („Retention Plus“), Masken („Kollagen Elastin“, „Kollagen Elastin Creme Maske“) und Shampoos („spring-i-ness“) wird Elastin eingearbeitet und als Vitalisierer und Falten glätter verkauft. In der Schönheitschirurgie, die mit Elastin-Unterspritzungen Falten ausgleicht und Lippenpartien vergrößert, ist es ähnlich.

Auf dem Gebiet des „Drug Delivery“ kommen Elastin-ähnliche Polymere bereits zum Einsatz. Gerade in der Krebstherapie fokussiert sich die Forschung auf neuartige Wirkstofftransportsysteme, wodurch eine Erhöhung des therapeutischen Index^V erreicht wird und die Nebenwirkungen reduziert werden können.^[34,22] Der bekannteste Vertreter der Polymerklasse ist ein *N*-(2-Hydroxy-propyl)-methacrylamid-Doxorubicin-Konjugat, welches sich bereits in der klinischen Evaluierung befindet.^[35] Ein weiteres Beispiel aus dem Bereich der Biopolymere, ein ELP-Doxorubicin-Konjugat, wird bereits in der Literatur beschrieben.^[18] Durch eine erhöhte Verweilzeit der Polymer-Wirkstoffkonjugate im Blut kann die Spezifität der Wirkstoffe erheblich gesteigert werden.

Wie bereits erwähnt ist das sogenannte *tissue engineering* ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet für Elastine und ELPs. Medizinisch ist man in der Lage, Gelenke, Blutgefäße und andere Körperbestandteile durch künstliche Nachbildungen zu ersetzen. Die Erfahrungen zeigen jedoch, dass diese Implantate häufig zu unerwünschten Nebenwirkungen führen, die zum Teil erst nach vielen Jahren in Erscheinung treten. Selbst Metalle wie Titan oder hochwertige inerte Kunststoffe führen bei Patienten oft zu drastischen Langzeitschädigungen oder verursachen Allergien, so dass der Wunsch nach organischen Ersatzmaterialien immer zwingender

^V Der therapeutische Index eines Wirkstoffes ist als Verhältnis der therapeutischen Dosis zur toxischen Dosis definiert.

wird. Mittlerweile ist es möglich, Haut- und Knorpelgewebe *in vitro* herzustellen und erfolgreich zu transplantieren. Durch die Verwendung von personenspezifischen Zellen unterbleibt jede Art von Abstoßungsreaktion und anderen Nebenwirkungen, da das Transplantat vom Körper als Eigen erkannt wird. Die fernen Ziele sind durch diese Entwicklung hoch gesteckt worden. Es sollen ganze Organe in Zellkulturen hergestellt werden und funktionsfähig für Transplantationen zur Verfügung stehen. Bis zur Verwirklichung solcher Ideen werden aber sicherlich noch viele Jahre vergehen. Bioelastische Polymere wie Elastin könnten jedoch bereits heute als Grundgerüst genutzt werden, um bestimmte Zelltypen anzuziehen und auf diese Weise die momentan verwendeten synthetischen Materialien zu ersetzen. Die so hergestellten Gewebe unterliegen aufgrund der langen Haltbarkeit von Elastin einer sehr langsamen Degradation und sind völlig biokompatibel, da sie humanen Ursprungs sind.^[36]

2.2 Polymere als Wirkstoffträger

Im folgenden Kapitel wird näher auf eine Anwendungsmöglichkeit von *Elastin like polymers*, nämlich auf das Konzept der polymeren Wirkstoffträger eingegangen. Zunächst werden die Hintergründe des therapeutischen Konzeptes erklärt, anschließend bereits bekannte Beispiele aufgelistet.

2.2.1 Das therapeutische Konzept polymerer Wirkstoffträger

2.2.1.1 Der EPR („*Enhanced Permeability and Retention*“^{VI})-Effekt

Den Grundstein für einen neuen Ansatz in der Krebstherapie, Makromoleküle als Träger für niedermolekulare zytostatische Wirkstoffe zu verwenden^[37,38], legten die Gruppen von *Maeda et al.*^[39,40] und *Jain et al.*^[41,42] bereits vor 20 Jahren. Sie entdeckten das, bedingt durch unterschiedliche biochemische und physiologische Eigenschaften des Normal- und Tumorgewebes, eine passive Anreicherung von Makromolekülen im Tumor erfolgt.

^{VI} „Enhanced permeability and Retention“ aus dem Englischen und wird übersetzt mit „erhöhter Permeabilität und Retention“.

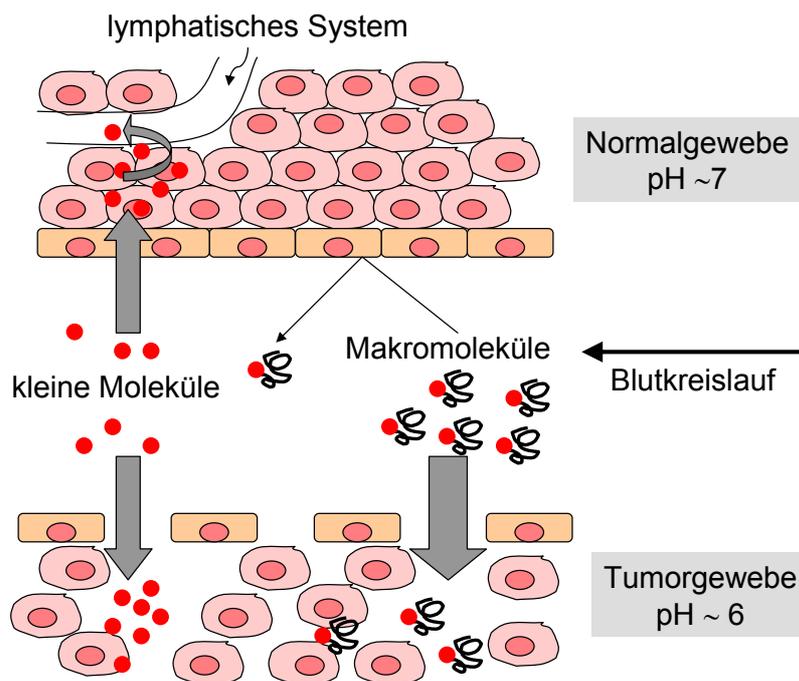


Abbildung 2-3 Schematische Darstellung der anatomischen und physiologischen Eigenschaften von Tumor- und Normalgewebe bezüglich des EPR-Effektes.

Wie in Abbildung 2-3 schematisch dargestellt, beruht der EPR-Effekt auf dem Phänomen, dass Blutgefäße, welche durch Angiogenese^{VII} in der Nähe eines Tumors neu gebildet werden, große strukturelle Lücken aufweisen. Allgemein sind solche Gefäße weniger fest und durchlässiger für Makromoleküle als Gefäße, die normales „gesundes“ Gewebe versorgen. Die poröse Struktur dient dazu, den schnell wachsenden Tumorzellen genügend Sauerstoff und Nährstoffe zur Verfügung zu stellen. Sie bewirkt aber auch gleichzeitig, dass große Makromoleküle die Gefäßwände passieren und in das umliegende cancerogene Gewebe diffundieren können. Dies führt zu einer Anreicherung von Makromolekülen in der Nähe von Tumoren. Darüber hinaus verhindert eine verminderte lymphatische Drainage im cancerogenen Gewebe, dass Makromoleküle wieder abgeführt werden. Das Normalgewebe hingegen besteht aus einem wohlgeordneten Zellverband, das in der Regel von Lymph-Kapillargefäßen durchzogen und gegenüber der Blutbahn durch eine lückenlose, dicht gepackte Endothelzellenschicht begrenzt wird. Kleine Moleküle wie Nährstoffe, Salze,

^{VII} Neubildung von Blutgefäßen an bereits bestehende Gefäßstrukturen

Botenstoffe oder niedermolekulare Pharmaka sind in der Lage, durch diese Endothelzellenschicht zu diffundieren, nicht jedoch Makromoleküle. Somit bietet der eben beschriebene EPR-Effekt die Möglichkeit einer passiven Zielsteuerung von makromolekularen Wirkstoffträger-Systemen zum Tumorgewebe, womit sich potentiell die Nebenwirkungen für den Organismus reduzieren lassen. Die Größe des Makromoleküls spielt demnach eine entscheidende Rolle für die Aufnahme in den Tumor und sollte sich in einem Bereich von 20-200 kDa bewegen.^[40,43]

2.2.1.2 Zellulärer Aufnahmemechanismus polymerer Wirkstoffträger

Ein wichtiger Parameter bei der Planung eines effizienten Wirkstoffträgersystems ist die Art der chemischen Kopplung zwischen Träger und Zytostatikum. Im Wesentlichen können Makromoleküle durch drei verschiedene Wege, der rezeptorvermittelten, der adsorptiven oder der Flüssigphasen-Endozytose von der Tumorzelle aufgenommen werden. Wie auch in Abbildung 2-4 dargestellt kommt es zu einer Einstülpung der Zellmembran, die zur Bildung eines Membranbläschens (Endosom) führt.

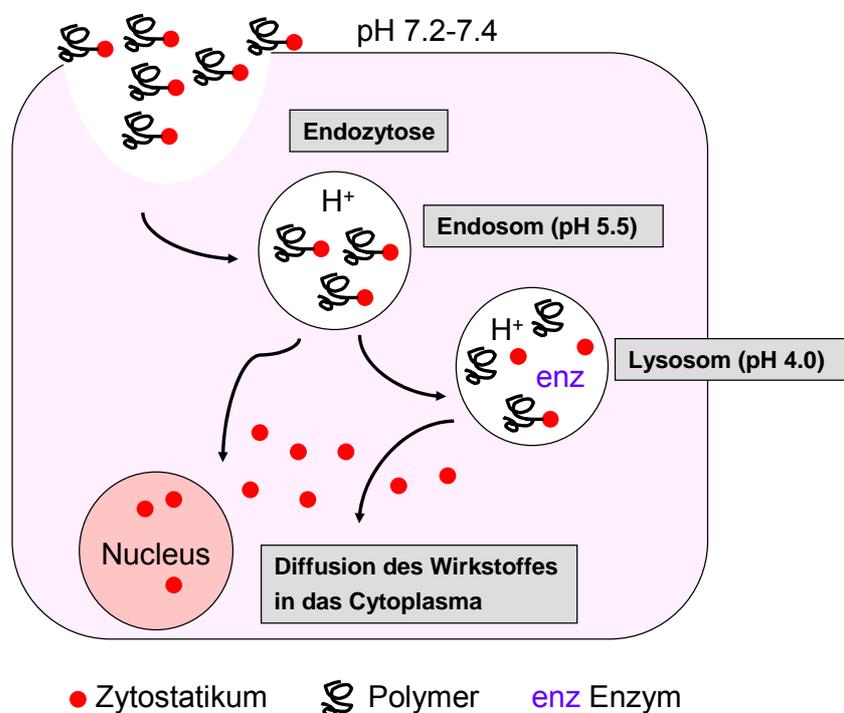


Abbildung 2-4 Schematische Darstellung der endozytischen Aufnahme von Polymer-Wirkstoffkonjugaten.

Im Endosom wird der ursprüngliche pH-Wert von pH 7.4 durch eine intrazelluläre Protonenpumpe auf etwa pH 5.5-5.0 gesenkt. Ein Teil der Endosomen kann mit primären Lysosomen (pH 4.0) verschmelzen, in denen der enzymatische oder hydrolytische Abbau des Makromoleküls erfolgt.^[44]

Während der letzten 10 Jahre konzentrierten sich die Untersuchungen zur Wirkstofffreisetzung auf zwei Kopplungsvarianten, wobei die Verknüpfung so fest wie nötig und so labil wie möglich gestaltet werden muss. Zum einen eignet sich hierfür eine säurelabilen Bindung zwischen Wirkstoff und Polymer, zum anderen die enzymatisch spaltbare Peptidsequenz Gly-Phe-Leu-Gly (Gly = Glycin, Phe = Phenylalanin, Leu = Leucin).

Im ersten Fall der pH-abhängigen Wirkstofffreisetzung lässt sich die pH-Wert-Änderung im Lysosom für eine gezielte Freisetzung eines am Polymer gebundenen Wirkstoffes ausnutzen. Verwendet man Spacermoleküle, die auf eine Absenkung des pH-Wertes nach Aufnahme des Polymerkonjugates in die Zelle ansprechen, kann auf diese Weise eine Abspaltung des Wirkstoffs vom Konjugat erreicht werden. Solche maßgeschneiderten Spacermoleküle sind z.B. Maleinimido- oder *N*-Hydroxysuccinimidoester-Verbindungen, die je nach funktioneller Gruppe des Zytostatikums zu säurelabilen Imin-, Hydrazon- oder Carboxylhydrazon-Derivaten umgesetzt werden können.^[45]

Bei der zweiten Variante wird eine Peptidbindung zwischen Zytostatikum und makromolekularen Träger durch lysosomale Enzyme gespalten. Beispiele für Polymer-Zytostatika-Konjugate mit integrierten Peptidspacermolekülen gehen zurück auf Arbeiten von *Trouet et al.* in den achtziger Jahren. Hier wurde das Zytostatikum Daunorubicin an Succinyl-aktiviertes Albumin über verschiedene Peptidspacermoleküle gekoppelt.^[46] Neuere Arbeiten von *Seymour et al.* beschäftigen sich mit der Synthese von HPMA-Copolymer-Konjugaten mit Doxorubicin, welche über verschiedene Peptidseitengruppen an das Polymergerüst gekoppelt werden konnten.^[47] Diese Konjugate wurden so maßgeschneidert, dass der Wirkstoff durch lysosomale Cystein-Proteasen vom Polymer-Gerüst freigesetzt werden konnte. Das Konzept

konnte durch eine hohe antitumorale Wirksamkeit in soliden Tumormodellen bestätigt werden.^[48]

2.2.2 Polymere Krebstherapeutika

Das Konzept der steuerbaren, makromolekularen Wirkstoffträgersysteme wurde erstmalig 1975 von *H. Ringsdorf*^[49] beschrieben und seitdem intensiv verbessert und weiterentwickelt.^[50-52]

Die Makromoleküle zur Herstellung von Polymer-Wirkstoffkonjugaten sollten idealerweise folgende Eigenschaften^[53] besitzen:

- Wasserlöslichkeit
- Keine Toxizität
- Keine Immunogenität
- Abbaubarkeit bzw. Eliminierung durch den Organismus.

Ist ein geeignetes Polymer gefunden, gilt es jedoch bei der Entwicklung des Polymer-Wirkstoffkonjugates weitere Punkte^[54] zu beachten:

- Linker zwischen Wirkstoff und Polymer darf die Eigenschaften beider nicht beeinflussen
- Möglichkeit eines hohen Beladungsfaktors mit Wirkstoff
- Zielgerichteter Transport des Wirkstoffs zum Wirkungsort (z.B. Tumor)
- Freisetzung des Wirkstoffs im Tumorgewebe.

Die bis *dato* am umfangreichsten untersuchte Gruppe makromolekularer Trägermoleküle zum gerichteten Transport von Zytostatika ist zweifelsohne die Gruppe der *N*-(2-Hydroxypropyl)-methacrylamid (HPMA)-Copolymere.^[55] Hierbei handelt es sich um wasserlösliche, biokompatible^[56] und nicht immunogene^[57] Polymere, von denen einige Konjugate sich bereits in der klinischen Phase I und II befinden.^[58,59] Die Bandbreite der Untersuchungen umfasst HPMA, Polyethylenglycol (PEG), und Polyglutaminsäure-Träger, ausgestattet mit unterschiedlichsten Zytostatika

sowie bestimmten „*targeting*^{VIII}“-Sequenzen zur Zielsteuerung auf Krebszellen (Übersicht siehe Tabelle 2-1).

Der viel versprechende Kandidat PK1 mit einem Molekulargewicht von ca. 28 kDa enthält 8.5 % Doxorubicin. Das HPMA-Rückgrat wird hier über einen enzymatisch spaltbaren Tetrapeptidlinker (Gly-Phe-Leu-Gly) an den Aminozucker des Doxorubicins gebunden.^[35] Ähnlich aufgebaut ist PK2, wobei dies zusätzlich Galaktosamin als *targeting*-Gruppe enthält und hierdurch eine besonders hohe Affinität zum Asialglykoproteinrezeptor, welcher von Lebertumoren exprimiert wird, aufweist (Abbildung 2-5).^[60] In beiden Fällen wird das Zytostatikum Doxorubicin über einen Peptid-Spacer an das Polymer gebunden, welches nach endozytotischer Aufnahme in den Krebszellen mittels Spaltung durch lysosomale Cysteinproteasen freigesetzt werden kann.

Weiterhin wurde von der Arbeitsgruppe *Duncan* gezeigt, dass auch zytostatisch aktive Platinkomplexe an HPMA-Copolymere gebunden werden können. Hier erfolgte die Anbindung der Platinkomplexe an das Polymerrückgrat entweder über einen proteolytisch spaltbaren Peptidspacer oder über eine in Lysosomen sauer hydrolysierbare Verbindungssequenz.^[61]

^{VIII} „target“ stammt aus dem Englischen und bedeutet „Ziel“. Bei einem „target“ kann es sich beispielsweise um ein Enzym, einen Rezeptor oder einen Ionenkanal handeln.

Tabelle 2-1 Wirkstoff-Polymer-Konjugate in klinischer Prüfung.^[62]

Verbindung	Linker	MW [kDa]	Entwicklungs- stand
PK1, Doxorubicin-(HPMA-Copolymer)	Gly-Phe-Leu-Gly	30	Phase II
PK2, galactosaminiertes Doxorubicin-(HPMA-Copolymer)	Gly-Phe-Leu-Gly	30	In Phase I abgebrochen
PNU-166945, Taxol-(HPMA-Copolymer)	Ester	40	Phase I beendet
MAG-CPT, Camptothecin-(HPMA-copolymer)	Gly-6-Amino- hexanoyl-Gly	30	Phase I beendet
AP5280, Diamminplatin(II)-(HPMA-Copolymer)	Gly-Phe-Leu-Gly	25	Phase I beendet
AP5286, Diaminocyclohexanplatin(II)-(HPMA-Copolymer)	Gly-Phe-Leu-Gly	25	Phase I
Prothecan, Camptothecin-Polyglutamat-Konjugat	Alaninester	40	Phase II
CT-2103, Taxol-Polyglutamat-Konjugat	Ester	40	Phase II/III
CT-2106, Camptothecin-Polyglutamat-Konjugat	Glycinester	50	Phase I
MTX-HSA, Methotrexat-Albumin-Konjugat	-	67	Phase II
DOXO-EMCH, 6-Maleinimodcaproylhydrazon-Derivat von Doxorubicin	säurelabiles Hydrazon	67	Phase I beendet

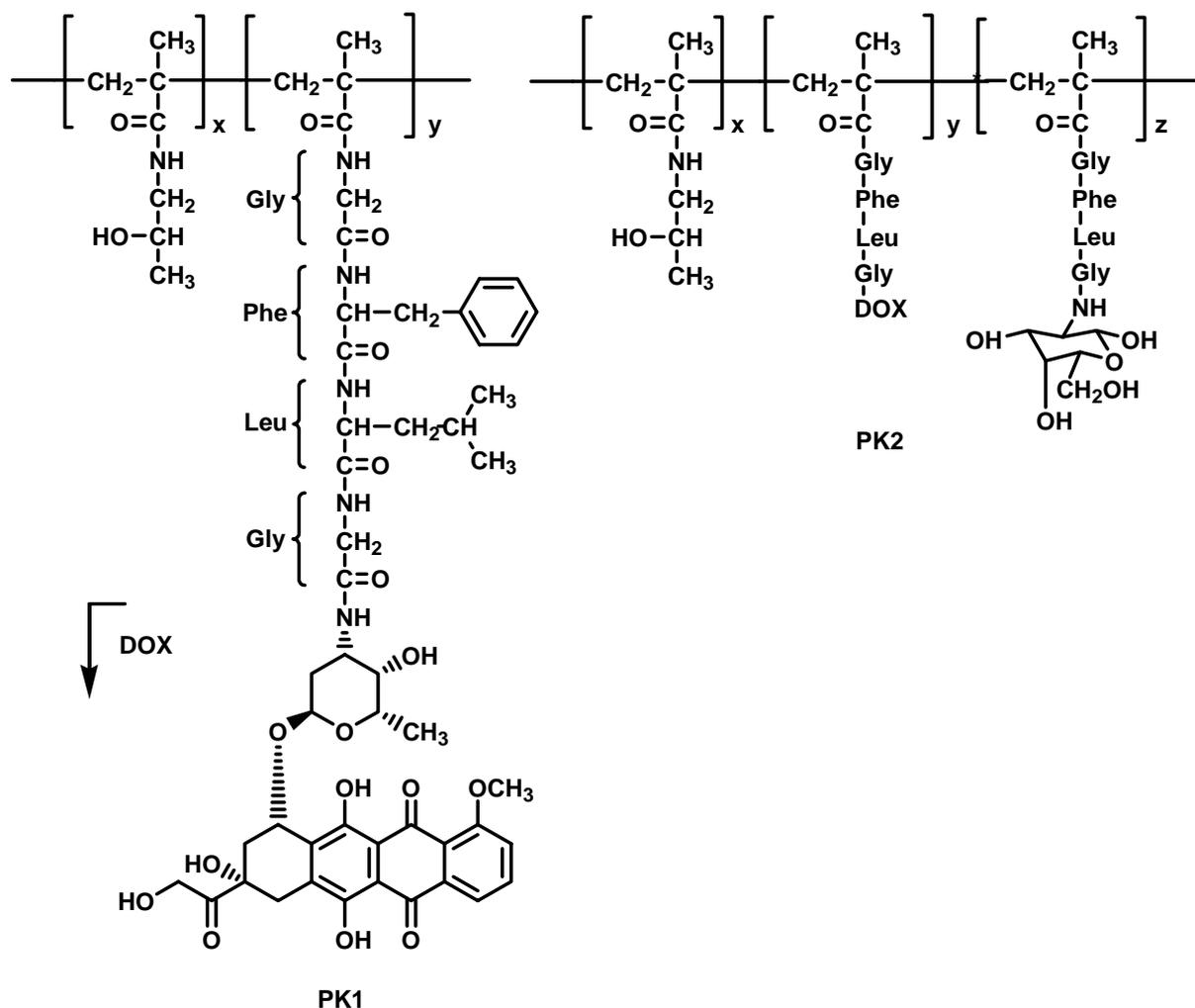


Abbildung 2-5 Chemische Strukturen der ersten zwei klinisch erprobten polymeren Krebstherapeutika, PK1 und PK2.

Die größten Nachteile der HPMA-Copolymere, wie auch der meisten anderen synthetischen Polymere für biomedizinische Anwendungen, sind sowohl die fehlende biologische Abbaubarkeit des Polymerrückgrats als auch die Schwierigkeiten bei der Synthese von Polymeren mit niedriger Polydispersität.^[63,64] Im Idealfall sollte ein industriell hergestelltes Medikament homogen sein und lediglich eine genau definierte Verbindung enthalten.

Eine Möglichkeit monodisperse polymere Träger zu realisieren basiert auf der Verwendung von Dendrimeren, deren Synthese und Verwendung sich aber sehr arbeitsaufwendig gestaltet.^[65,22] Eine zweite Variante exakt definierte, monodisperse Trägermaterialien aufzubauen, beruht auf gentechnologisch hergestellten

Biopolymeren. Dieser Ansatz soll im weiteren Verlauf der Arbeit genauer untersucht und diskutiert werden.

2.3 Polymere als Grundgerüste für die Gewebezüchtung

2.3.1 Die Extrazelluläre Matrix

Höhere Organismen sind aus einer Vielzahl verschiedener und zum Teil hoch spezialisierter Zellen aufgebaut. Diese Zellen sind in Organen bzw. Gewebeverbänden organisiert, wobei biologisches Gewebe nicht nur aus Zellen besteht. Einen erheblichen Teil des Gewebevolumentums nimmt der Extrazellularraum ein. Dieser wird von einem komplexen Makromolekülgeflecht, der sogenannten extrazellulären Matrix (ECM), ausgefüllt.

Die extrazelluläre Matrix besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher Polysaccharide und Proteine, die von dafür spezialisierten Zellen (z.B. die Chondroblasten im Knorpelgewebe oder die Osteoblasten im Knochen^[66]) gebildet und sezerniert^{IX} werden und sich zu einem strukturierten Maschenwerk zusammenlagern (siehe Abbildung 2-6).^[67,68]

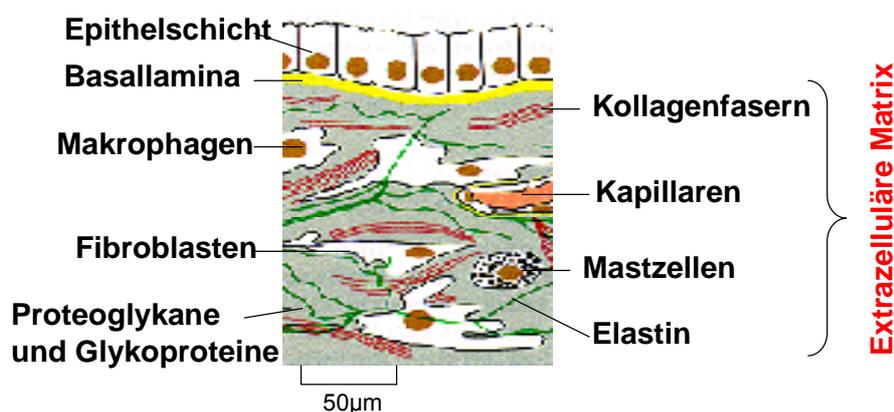


Abbildung 2-6 Schematischer Aufbau der Extrazellulären Matrix.^[69]

^{IX} Sezernieren bezeichnet den Vorgang, bei dem eine Zelle Stoffe aus ihrem Inneren (Cytoplasma) nach außen abgibt. Die Zelle produziert, je nach Typ, unterschiedliche zu sezernierende Produkte, wie z.B. Proteine, Zellmembranbausteine oder Neurotransmitter.

Im Bindegewebe, welches bei Wirbeltieren das Strukturgerüst des Körpers bildet, nimmt die extrazelluläre Matrix oftmals mehr Raum ein als die Zellen, die sie von allen Seiten umgeben^[70] und bestimmt damit die physikalischen Eigenschaften des jeweiligen Gewebes. Der Anteil des Bindegewebes am Gesamtgewebe variiert je nach Organtyp sehr stark: Knochen und Haut bestehen fast ausschließlich aus Bindegewebe, das Gehirn weist dagegen nur sehr wenig dieses Strukturgewebes auf.^[71,72]

Auch die zum Aufbau der extrazellulären Matrix verwendeten Makromolekültypen variieren bezüglich ihrer Zusammensetzung und Strukturierung je nach Gewebetyp enorm. Insgesamt finden sich in der extrazellulären Matrix weit über 100 verschiedene Makromolekültypen, die eine sehr große funktionelle Varianz ermöglichen.^[73] So gibt es zum Beispiel die durch Kalzifizierung sehr harten Matrixstrukturen von Knochen und Zähnen, die durchsichtige Matrix der vorderen Augenhornhaut oder die zugfesten seilartigen Sehnenstrukturen.^[74]

Die extrazelluläre Matrix besteht aus Makromolekülen, die sich in zwei Hauptklassen einteilen lassen: Glycosaminoglykane und Faserproteine. Glycosaminoglykane sind Polysaccharide, die meist gekoppelt an Proteine, also als Proteoglykane, vorliegen. Sie bilden aufgrund ihrer Ladungseigenschaften eine stark wasserhaltige, gelartige Grundsubstanz, in der die Faserproteine eingebettet sind und durch die Ionen, Nährstoffe, Metabolite und Botenstoffe diffundieren können.^[75]

Die Klasse der Faserproteine lässt sich nochmals in Strukturproteine, wie z.B. Kollagen und Elastin einerseits und in Adhäsionsmoleküle, wie z.B. Fibronectin und Laminin andererseits, unterteilen: Kollagenfasern, die den Hauptproteinbestandteil der extrazellulären Matrix darstellen, tragen zur Struktur und Widerstandsfähigkeit, Elastinfasern dagegen zur Elastizität bei (vgl. Abbildung 2-1 auf Seite 6). Die Adhäsionsmoleküle vermitteln den Kontakt zwischen der extrazellulären Matrix und den in sie eingebetteten bzw. den sie umgebenden Zellen.^[76]

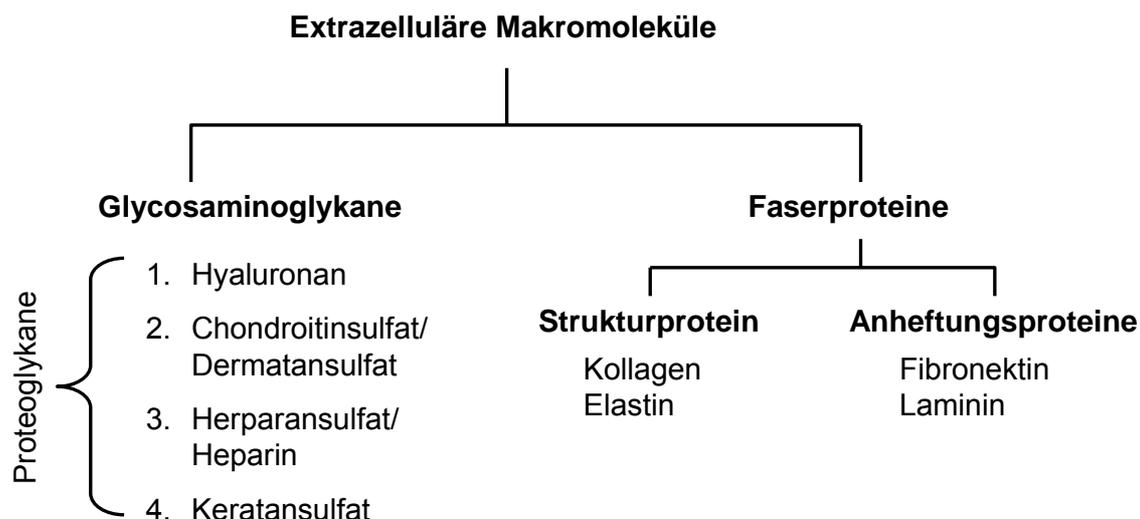


Abbildung 2-7 Komponenten der Extrazellulären Matrix.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Aufrechterhaltung der Integrität der extrazellulären Matrix für die Struktur und Funktion eines lebenden Organismus absolut nötig ist.

2.3.2 Integrine und die RGD-Sequenz

Integrine sind die wichtigsten Proteine, mit deren Hilfe Zellen an die extrazelluläre Matrix binden können. Sie vermitteln als sogenannte Zelladhäsionsproteine die Zell-Zell- als auch die Zell-Matrix-Wechselwirkungen. Hierdurch steuern sie eine Vielzahl an physiologischen Prozessen. Neben ihrer Rolle der Verankerung der Zelle übernehmen sie die Aufgabe der Signaltransduktion in beiden Richtungen durch die Zellwand.^[77-84] Durch Bindung eines Liganden der ECM an ein Integrin wird ein Signal in die Zelle übertragen (*outside-in signaling*), was zu einer Umorientierung des Zytoskeletts führt. Dieser Prozess kann die Veränderung der Zellform, die Migration oder die verankerungsabhängige Proliferation sowie die Gewebeorganisation steuern.^[85,86] Der umgekehrte Weg der Signaltransduktion vom Zellinneren nach außen wird als *inside-out signaling* bezeichnet, wobei Faktoren in der Zelle die Integrine aus einem passiven, schwach adhäsiven in einen aktiven, adhäsiven Zustand umschalten.^[87]

Mit insgesamt 18 α -Untereinheiten und 8 β -Untereinheiten bilden die Transmembranglykoproteine mindestens 25 verschiedene Integrinheterodimere (siehe

Abbildung 2-8). Sie verbinden das Aktinzytoskelett mit der extrazellulären Matrix und geben der Zelle auf diese Weise diverse Informationen über deren Lokalisation im Körper und ihr näheres zelluläres Umfeld.^[88]

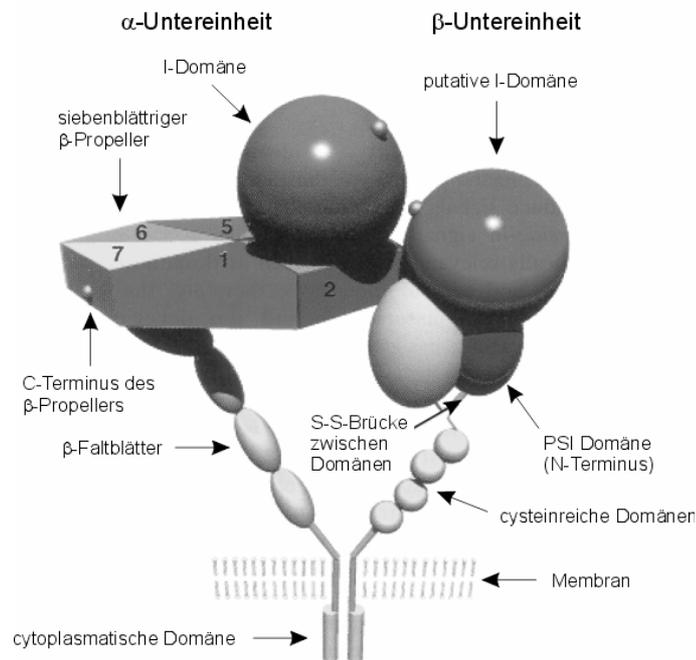


Abbildung 2-8 Schematische Darstellung des Aufbaus der Integrine.^[94] Die Kopfgruppe der α -Untereinheit besteht aus einem siebenblättrigen β -Propeller. Einige α -Untereinheiten weisen zwischen dem zweiten und dritten Propellerblatt eine zusätzliche, eingeschobene Domäne (α I-Domäne) auf.

Integrine binden mit Hilfe von Kation- π -Wechselwirkungen viele Matrix- und Plasmaproteine. Die Anbindung von Gewebezellen an die ECM wird z.B. bei Fibronectin auf die Wechselwirkung von Domänen, die bestimmte Aminosäuresequenzen enthalten, zurückgeführt. Im Falle des Fibronectins spielt das Tripeptid Arg-Gly-Asp (RGD) (Arg = R = Arginin, Asp = D = Asparaginsäure), 1984 von *Pierschbacher* und *Ruoslahti* entdeckt, eine entscheidende Rolle als minimale essenzielle Erkennungssequenz für Integrine (siehe Abbildung 2-9).^[89,90]

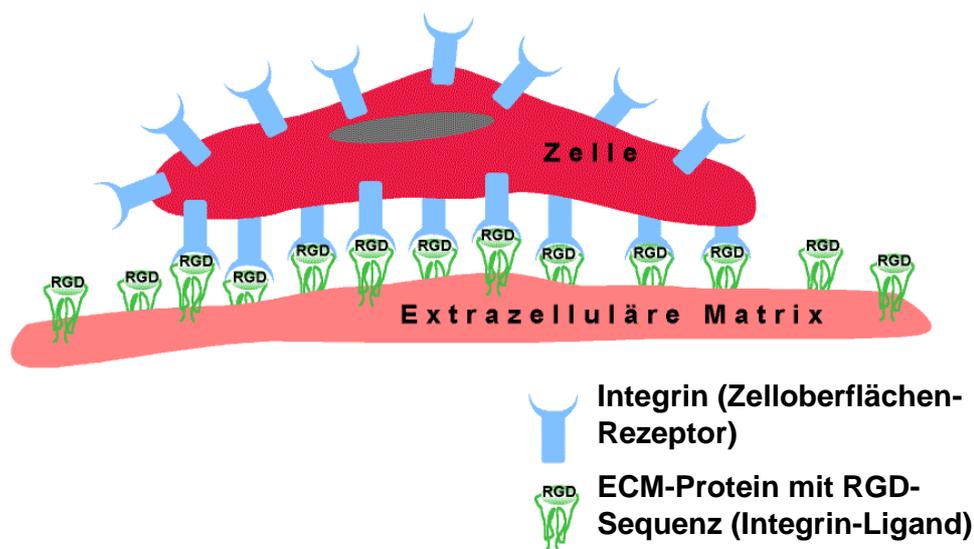


Abbildung 2-9 Schematische Darstellung der Adhäsion von Zellen an die ECM (Extrazelluläre Matrix).

Es konnte gezeigt werden, dass lösliche RGD-Peptide antagonistisch zur ECM adhärenzte Zellen ablösen, während immobilisierte RGD-Peptide ähnlich wie ECM-Proteine integrinvermittelte Zelladhäsion bewirken.^[89] Somit bietet sich die Möglichkeit, über RGD funktionalisierte Oberflächen gezielt Interaktionen mit Zelloberflächen zu steuern. Bis *dato* wurden zahlreiche lineare und zyklische RGD-Peptide^[91] entwickelt und z.B. auf Polyethylenoxid-Filmen immobilisiert.^[92] Dabei konnte gezeigt werden, dass das Tripeptid die Anhaftung und Ausbreitung von Endothelzellen, nicht aber von glatten Muskelzellen oder Thrombozyten, auf künstlichen Oberflächen fördert.^[93,94]

2.3.3 Polymere als Biomaterialien für die Gewebezüchtung

Mit dem Hintergrund der vorherigen Kapitel lässt sich erahnen, dass gerade die RGD-Peptide im Bereich des *tissue engineering* eine große Rolle spielen. In der regenerativen Medizin wird körpereigenes Gewebe in einer Biopsie entnommen, *in vitro* auf einem Träger kultiviert, um es dann zu implantieren (siehe Abbildung 2-10).^[95]

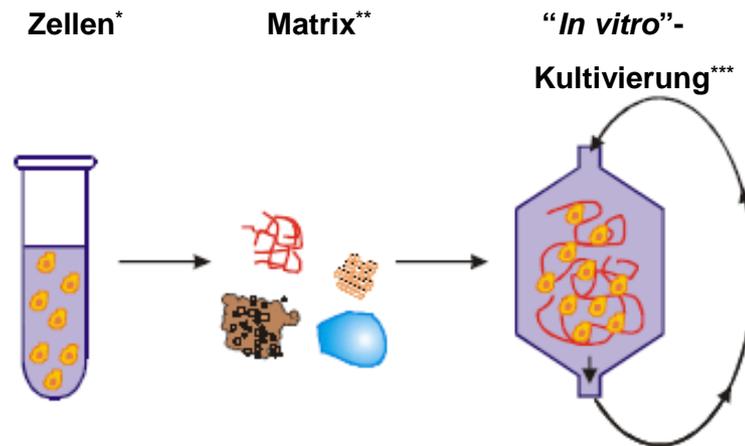


Abbildung 2-10 Prinzip des *tissue engineering*, * Gewebezellen, Stammzellen oder embryonale Stammzellen, ** Natürlich, synthetisch oder xenogenisch (Fasern, Hydrogel, Kapseln), *** statisch, unter Rühren oder dynamische Fließbedingungen.

Die größte Schwierigkeit hierbei ist, den Zellen eine möglichst natürliche Umgebung zu bieten, welche man teilweise mit RGD-Peptiden imitieren kann.

Die Anforderungen an ein geeignetes Material für die Gewebezüchtung sind vielschichtig. In folgender Aufzählung werden die wichtigsten Aspekte^[36] dargestellt:

- Mechanische Festigkeit bei gleichzeitiger Elastizität
- Vernetzbarkeit des Materials
- Kontrollierte Bioabbaubarkeit des Grundkörpers
- Möglichkeit eines hohen Beladungsfaktors mit adhäsiven Proteinen (z.B. RGD) bzw. Proteindomänen.

Zu Beginn stellt sich die Frage des Grundgerüsts für eine Anwendung im Bereich des *tissue engineering*. Hier spielen vor allem natürliche und synthetische bioabbaubare Materialien eine große Rolle (siehe Tabelle 2-2).

Tabelle 2-2 Biomaterialien im *tissue engineering*.^[96] Die heute verfügbaren Trägermaterialien lassen sich in natürliche und synthetische, sowie in biodegradierbare und nicht biodegradierbare Biomaterialien einteilen.

Biodegrad. Natürlich	Biodegrad. Synthetisch	Nicht biodegrad. Natürlich	Nicht biodegrad. Synthetisch
Kollagen I, IV	Poly-milchsäure	Alginat	Silikon
Fibrin	Poly-glykolsäure	Chitin, Chitosan	Teflon
Albumin	Poly- <i>ortho</i> -ester	Hydroxyapatit	Latex
Fibronectin	Poly-aminosäuren		Polyethylen
Laminin 1,5	Poly- ϵ -caprolacton		
Elastin	Tri-methylen-carbonat		
	Poly- <i>p</i> -dioxanon		
	Poly-hydroxy-alkanoate (PHAs)		
	Dracon		

Die ersten Modifizierungen von Biomaterialien wurden mit Proteinen der ECM wie Fibronectin, Vitronectin, und Laminin durchgeführt.^[97] Aber schon bald wurde erkannt, dass es sich wesentlich einfacher gestaltet, nur die „selektive Peptidsequenz“ zu verwenden (Überblick siehe Tabelle 2-3).^[98]

Die RGD-Oberflächenfunktionalisierung zählt zur bekanntesten Methode. Die Anbindung erfolgt in den meisten Fällen über eine stabile Peptidbindung. Eine aktivierte Carbonsäuregruppe am polymeren Träger reagiert mit dem nukleophilen *N*-Terminus des Peptids. Hierbei kann die Carbonsäuregruppe mit **EDC** (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid), **DCC** (Dicyclohexylcarbodiimid) oder **CDI** (Carbonyldiimidazol) aktiviert werden. Bei dieser Variante treten jedoch zwei Probleme auf: Zum einen besitzt die RGD-Sequenz weitere reaktive Gruppen (die Carboxylgruppe am C-Terminus und in der Seitenkette der Asparaginsäure, sowie die

nukleophile Guanidino-Gruppe der Arginin-Seitenkette (siehe Abbildung 2-11)). Zum anderen können die Kupplungsreagenzien und die aktivierte Carbonsäure schnell hydrolysieren.

Tabelle 2-3 Einige ausgewählte selektive Peptidsequenzen, welche beim *tissue engineering* eingesetzt werden.^[98] *Neurit = Axon. Als Axon wird der lange Fortsatz der Nervenzellen bezeichnet, welcher der Weiterleitung von elektrischen Impulsen dient.

selektive AS-Sequenz	Ursprung	Funktion
RGD	Fibronectin, Vitronectin	Zelladhäsion
KQAGDV		Muskelzellenadhäsion
IKVAV	Laminin	Neurit* Extension
YIGSR	Laminin B1	Zelladhäsion
VPGIG	Elastin	Elastische Komponente der ECM
REDV	Fibronectin	Endothelzellenadhäsion
KRSR	Bindungsdomäne Heparin	Osteoblastenadhäsion

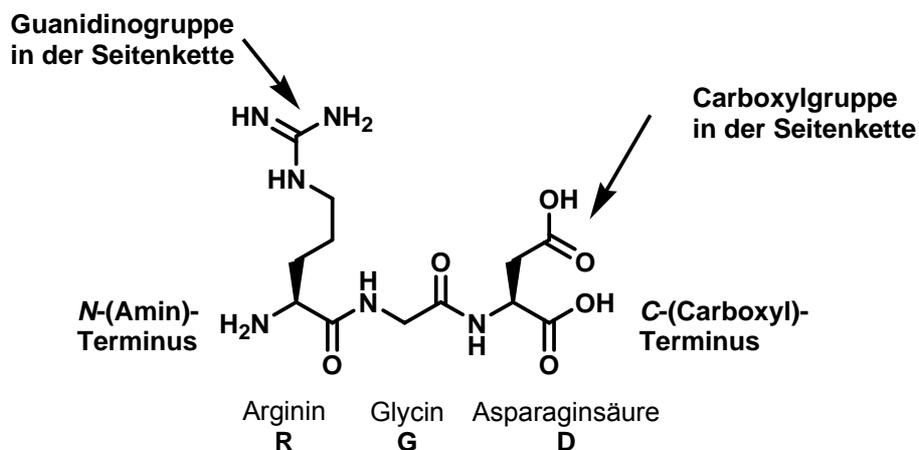


Abbildung 2-11 Die RGD-Sequenz.

Sollen diese Schwierigkeiten umgangen werden, kann man Schutzgruppen in die Seitenketten einführen und organische Lösemittel anstatt Wasser verwenden. Mit dieser Methode konnten bereits geschützte RGD-Peptide in Polymere eingeführt werden (siehe Abbildung 2-12).^[99-101]

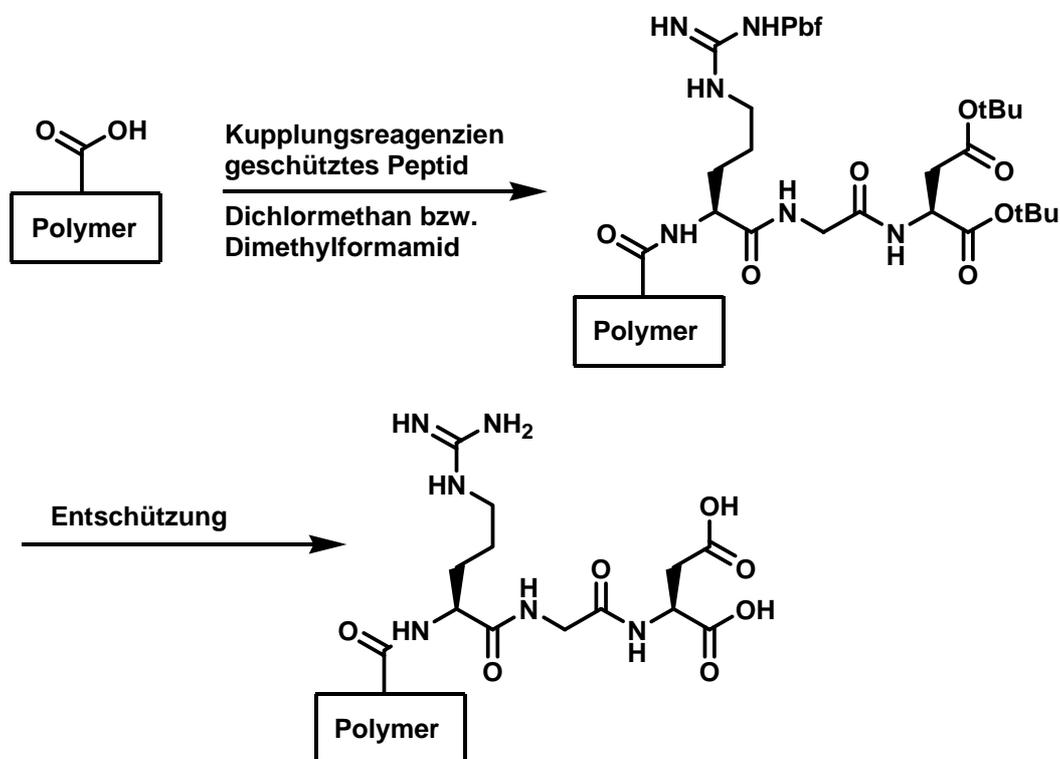


Abbildung 2-12 Kopplung eines geschützten RGD-Peptids via *N*-Terminus an ein Carbonsäure-modifiziertes Polymer mit anschließender Entschützung. Pbf: 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl, *t*Bu: *tert*-Butyl.

Bei der Verwendung von gentechnologisch hergestellten Proteinen als Matrix für die Gewebezüchtung wird oft eine weitere Strategie der Funktionalisierung verfolgt. Die zelladhäsive Peptidsequenz und vernetzbare Gruppen wie Lysine können direkt in die Polymerkette mit eingebaut werden. Die ersten ELPs wurden um die biologische aktiven Sequenzen RGD bzw. REDV erweitert und zeigten eine Zelladhäsion, ähnlich der von Fibronectin.^[6] Nach diesen ersten erfolgreichen Versuchen wurden verschiedenste ELPs als Grundgerüste getestet. Später wurden auch die Regionen um die kurzen zelladhäsiven Liganden mit zusätzlichen Aminosäuren erweitert. Die Gruppe *Panitch et al.* konnte zeigen, dass durch Einführung der längeren Peptidsequenz CS5, welche im Zentrum die REDV-Sequenz enthält, die Zelladhäsion stärker stimuliert werden konnte, als durch das REDV-Peptid alleine.^[8]

Welsh et al. zeigte, dass die Kontrolle über die mechanischen Eigenschaften ein wesentlicher Faktor bei dem Design eines polymeren Grundgerüsts für die Geweberegeneration ist. Durch die Einführung von terminalen Lysinen gelang es, die Vernetzungsdichte und somit die mechanischen Eigenschaften der vernetzten Hydrogele über das Molekulargewicht zu steuern.^[9]

Neuere Beispiele von biosynthetisch gewonnenen ELPs zeigen wie vielfältig die Ansatzmöglichkeiten sind. *Girrotti et al.* entwickelte ein Biopolymer mit vier verschiedenen funktionellen Domänen.^[14] Zur Nachahmung der ECM wurde die erste Domäne mit der Peptidsequenz (VPGIG)_n ausgestattet. Der zweite Block innerhalb des Grundgerüsts unterscheidet sich vom ersten Block nur durch eine Lysin-Gruppe, welche zur Vernetzung verwendet werden kann. Die dritte Domäne enthält die CS5-Sequenz des menschlichen Fibronectins und somit die zelladhäsive Einheit REDV. Im letzten Block wurde die natürliche VPVAPG-Sequenz, als Target für Proteasen der natürlichen ECM eingeführt (siehe Abbildung 2-13).

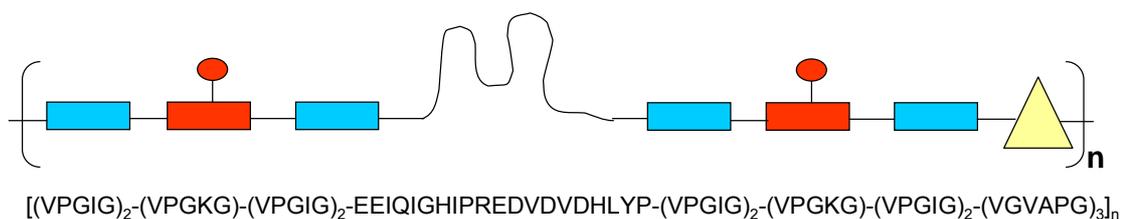


Abbildung 2-13 Schematische Darstellung der Wiederholungseinheit eines neu entwickelten ELPs. Zu erkennen sind vier verschiedene Domänen im Grundgerüst.

In dieser Arbeit sollten nun die unterschiedlichen Strategien zur Funktionalisierung polymerer Träger geschickt verknüpft werden. Einerseits sollte als Grundgerüst ein rekombinantes ELP mit vernetzbaren Gruppen verwendet werden und andererseits sollte die Zahl und Art der bioaktiven Liganden durch eine nachträgliche chemische Modifizierung variabel gestaltet werden. Insbesondere die Variabilität ist einer der Vorteile der chemischen Anbindung von Liganden an das funktionalisierbare Trägermaterial.

3 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit galt es zu zeigen, dass das von *Junger* exprimierte Elastin [EMM]₇ (**EMM** = **E**lastin **m**imetisches **M**onomer) posttranslational chemisch modifizierbar ist. Die Primärstruktur ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt:

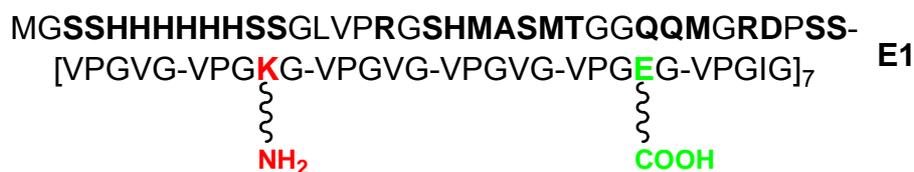


Abbildung 3-1 Die Aminosäuresequenz des von *Junger* klonierten His₆-[EMM]₇ (**E1**), wobei alle modifizierbaren Aminosäuren im Histidin-tag **fett** dargestellt sind. Dieses ELP besitzt in der Wiederholungseinheit zwei modifizierbare Aminosäuren (K = Lysin, E = Glutaminsäure).

Auf Basis dieser Sequenz soll dargelegt werden, dass [EMM]₇ ein geeignetes Biomaterial zur Darstellung von polymeren Wirkstoffträgern und der Herstellung von Matrizen für die Gewebezüchtung ist.

Als erster Schritt zur Herstellung eines neuartigen Biomaterials musste eine Methode zur Abspaltung des so genannten Histidin-*tags*^X gefunden werden, da dieser viele Aminosäuren mit funktionalisierbaren Seitenketten enthält, die Anlass zu Nebenreaktionen geben könnten (siehe Abbildung 3-1).

Im zweiten Schritt sollte versucht werden durch eine Punktmutation der DNA-Sequenz eine chemisch leicht zugängliche Gruppe (z.B. Thiol) einzuführen, damit auch [EMM]₇-Verbindungen mit nur einer Modifizierung, so genannte 1-1 Konjugate, dargestellt werden können.

Die posttranslationale chemische Modifizierung des ELPs [EMM]₇ lässt sich in die zwei Bereiche (polymere Wirkstoffträger und Herstellung von Matrizen für die Gewebezüchtung) der medizinischen Anwendung untergliedern. Im Folgenden wird auf polymere Wirkstoffträger auf der Basis von [EMM]₇ eingegangen. Hierbei soll die Carboxylgruppe der Glutaminsäure die Wasserlöslichkeit des Biopolymers gewährleisten, die Amino-Funktion dient zur chemischen Modifizierung des polymeren Rückgrats. Die Zielverbindungen dieses Projekts lassen sich nach dem Vorbild von *Duncan et al.* darstellen (vgl. Abbildung 2-5 auf Seite 25).

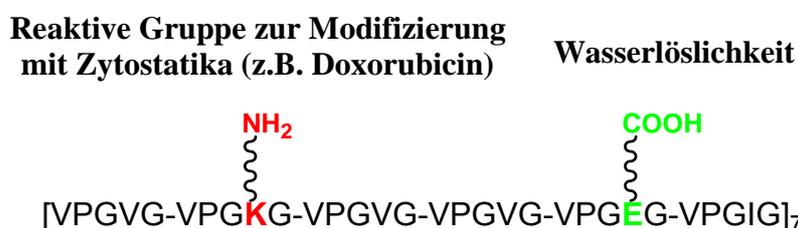


Abbildung 3-2 Die Aminosäuresequenz von [EMM]₇, wobei die Lysinseitenkette zur Modifizierung mit Zytostatika genutzt werden kann. Die Carboxylgruppe der Glutaminsäure soll die Wasserlöslichkeit des ELPs gewährleisten.

Zur Verwendung von [EMM]₇ als Grundgerüst der Gewebezüchtung galt es, neben der Modifizierung von Elastin mit zelladhäsiven Liganden (z.B. RGD), ein bioaktives Hydrogel durch Vernetzung darzustellen (siehe Abbildung 3-3).

^X Das Wort „tag“ aus dem Englischen übersetzt bedeutet „Schild“, „Etikett“ oder „Markierung“. Ein „tag“ dient in der Biochemie sowohl der Aufreinigung als auch dem Nachweis eines Proteins.

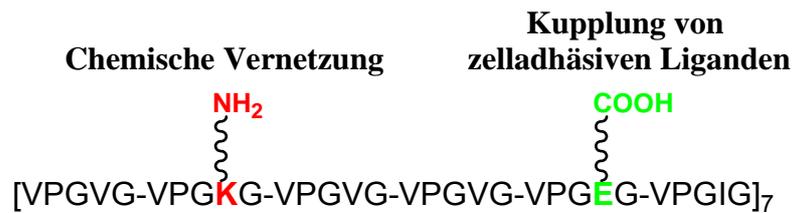


Abbildung 3-3 Die Aminosäuresequenz von [EMM]₇, wobei die Carboxylgruppe zur Modifizierung mit zelladhäsiven Liganden und die Aminogruppe der Lysinseitenkette zur Vernetzung zum Hydrogel genutzt werden kann.

Hierbei soll die Carboxylgruppe der Glutaminsäure zur chemischen Modifizierung mit bioaktiven Liganden dienen, die Amino-Funktion der Lysinseitenkette kann mit Hilfe geeigneter Vernetzer bioaktive Hydrogele ausbilden.

Neben der Charakterisierung der Zielverbindungen durch NMR und MALDI-TOF sollte auch ein Testsystem zur biologischen Evaluierung der modifizierten Hydrogele gefunden werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Biochemische Arbeiten

4.1.1 Punktmutagenese innerhalb eines DNA-Abschnitts

Mit der Technik der *Quick change site-directed mutagenesis* (QCSDM) können Mutationen in DNA-Konstrukte eingeführt werden. Hierzu werden zwei komplementäre Primer entworfen, welche genau auf der Mutation liegen, ca. 35-40 Basenpaare lang sind, und bei denen das ursprünglich vorhandene Basenpaar durch das mutierte ersetzt wird. Die komplementären Primer binden an den Vektor und bei der *Polymerase-Chain-Reaction* (PCR^{XI}) wird eine Kopie des gesamten Vektors erstellt, welcher die gewünschte Mutation enthält. Die ursprüngliche DNA, die noch

^{XI} Bezeichnung für eine in der Gentechnik angewandte Methode zur gezielten Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Fragments.

die alte Stelle enthält und deshalb nicht erwünscht ist, wird durch das Enzym (DpnI) nach der PCR in sehr kleine, wenige Basenpaare lange Stücke abgebaut.

Bei der PCR selbst wird der Vektor nicht geschlossen. Erst während der Klonierung werden diese sogenannten „nicks^{XII}“ von Bakterien erkannt und vom Metabolismus repariert und geschlossen (vgl. Abbildung 4-1).

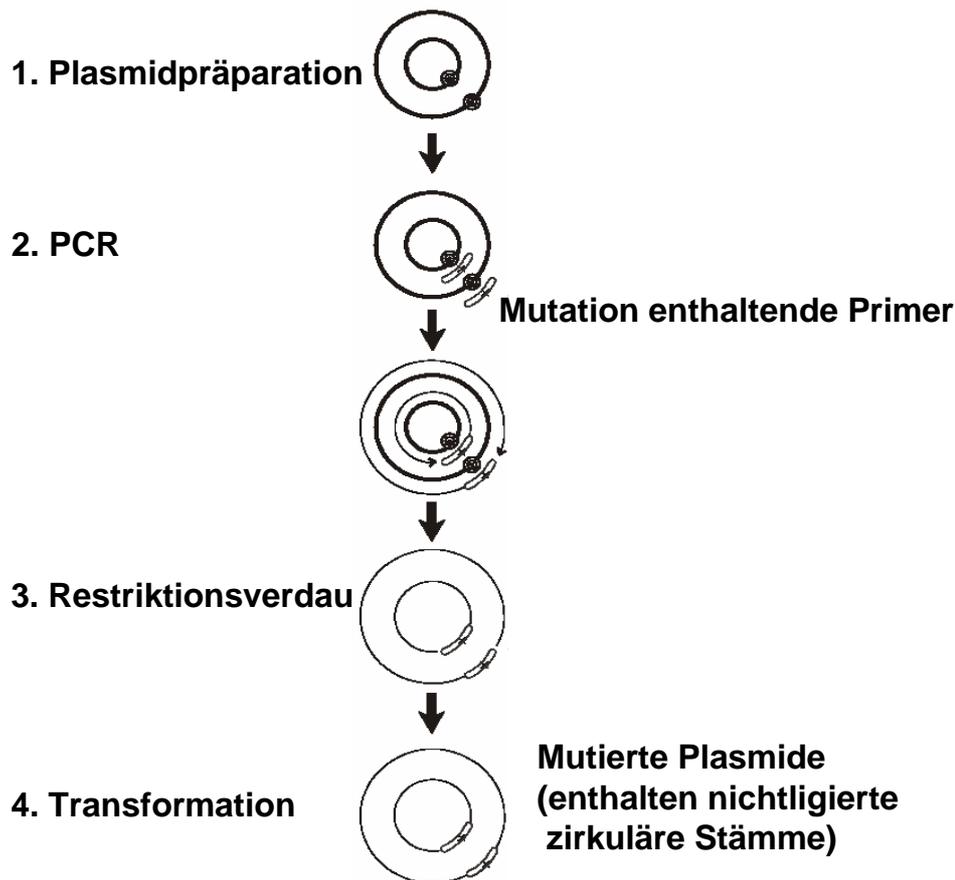


Abbildung 4-1 Überblick über die „Quick change site-directed mutagenesis“ Methode (Stratagene).

4.1.2 Punktmutagenese innerhalb des DNA-Abschnitts von His₆-[EMM]₇

Für die Herstellung von so genannten 1-1 Konjugaten, d.h. pro [EMM]₇ Polypeptid soll nur ein bioaktiver Ligand gebunden werden, wurde über eine Punktmutation in der DNA-Sequenz ein Cystein eingeführt. Aufgrund der höheren

^{XII} Das Wort „nick“ aus dem Englischen übersetzt bedeutet „Kerbe“ und bezeichnet in der Biochemie eine Bruchstelle eines DNA-Stranges.

Reaktivität der Thiolgruppe (siehe Abbildung 4-2) kann hier über die Methode der Chemischen Ligation selektiv die Aminosäure Cystein zur Reaktion gebracht werden.



Abbildung 4-2 Reaktive Seitenkettengruppen in Proteinen. Die Nukleophilie nimmt von links nach rechts ab.

Zur Durchführung der Punktmutation galt es vorerst ein komplementäres Primerpaar zu entwerfen und dann über einen QSCDM-Kit von *Stratagene* das neue DNA-Stück einzuführen.

Zum Austausch der Aminosäure Serin gegen Cystein an AS-Position 35 wurde ein Primerpaar entworfen, das direkt auf der Mutation sitzt und rechts und links der Mutation ca. 20 Basen besitzt. Nach Durchführung der PCR Reaktion wurden zahlreiche positive Klone erhalten. Von diesen wurden 20 Kolonien gepickt und in 4 mL LB_{Kana} über Nacht bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe eines *DNA-Purification-Kit* isoliert und mit dem Enzym Eam1104 verdaut.

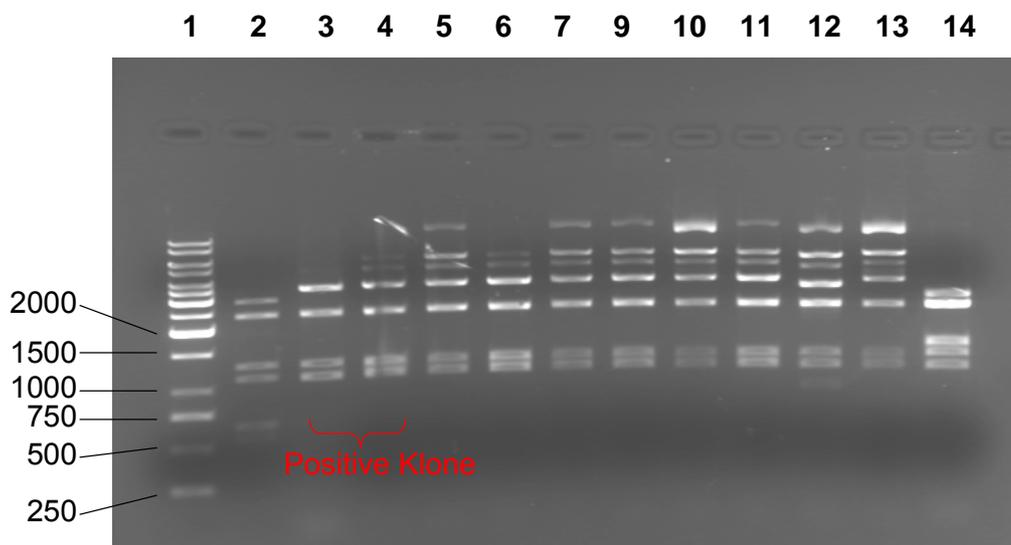


Abbildung 4-3 Agarosegel der mit Eam1104 verdauten Klone, 1 = Marker (DNA-Leiter), 2 = Kontrolle, 3-14 = Proben der verschiedenen Klone.

Demzufolge sollten alle positiven Klone vier Banden (1183 Da, 2367 Da, 1131 Da, 1315 Da) im Agarosegel aufweisen, die negativen Klone fünf Banden (630 Da, 553 Da, 2367 Da, 1131 Da, 1315 Da) bzw. mehr (siehe Abbildung 4-3).

Nach diesem ersten positiven Ergebnis konnte durch einen Doppel-Enzymverdau der Proben 3 und 4 mit Bam H1 und Not 1 ein Unterschied in der Größe der geschnittenen Vektoren 3 und 4 gefunden werden (siehe Abbildung 4-4).

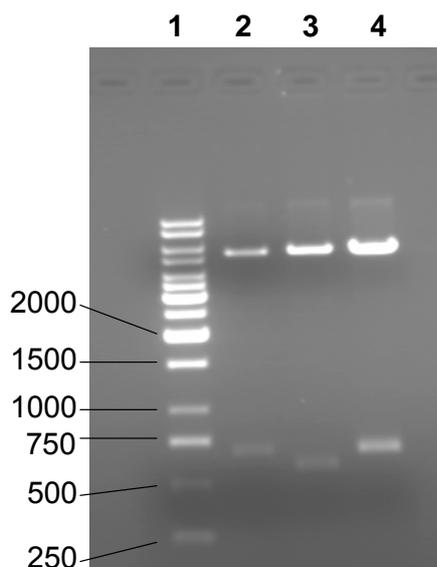


Abbildung 4-4 Agarosegel der mit Bam H1 und Eam 1104 verdauten Klone, 1 = Marker (DNA-Leiter), 2 = Kontrolle, 3-4 = Proben der verschiedenen Klone.

Durch eine anschließend durchgeführte Sequenzierung stellte sich heraus, dass Probe 3 zwar die Punktmutation enthielt, jedoch nur sechs Wiederholungseinheiten von [EMM] vorwies, Probe 4 hingegen wie gewünscht, sieben [EMM]-Wiederholungseinheiten plus der Aminosäure Cystein an Position 35 beinhaltet.

Als nächster Schritt wurde der neue Klonierungsvektor in den kompetenten Expressionsstamm BLR(DE3)-Zellen transferiert. Die resultierende Mutante von His₆-[EMM]₇ wird in nachfolgendem Abschnitt mit His₆-Cys-[EMM]₇ (**E2**) bezeichnet.

4.1.3 Expression von His₆-[EMM]₇ (**E1**) und His₆-Cys-[EMM]₇ (**E2**)

Aufgrund der Klonierungsstrategie von *Junger* ist die Gesamtsequenz von **E1** und **E2** wesentlich länger als der Teil, der sich ausschließlich auf das Elastin bezieht. Dieses so genannte His₆-[EMM]₇ **E1** bzw. His₆-Cys-[EMM]₇ **E2** besitzt ein

Molekulargewicht von 21514 Da bzw. 21530 Da (siehe Abbildung 4-5). Die vorgelagerte Sequenz, der Histidin-tag, dient der Aufreinigung durch die Affinitätschromatographie.

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRDPSS-
[VPGVG-VPGKG-VPGVG-VPGVG-VPGEG-VPGIG]₇ E1

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRDPCS-
[VPGVG-VPGKG-VPGVG-VPGVG-VPGEG-VPGIG]₇ E2

Abbildung 4-5 Die Gesamtsequenz von **E1** und **E2**, wobei der Histidin-Tag und der Unterschied zwischen His₆-[EMM]₇ und der Mutante His₆-Cys-[EMM]₇ fett und rot dargestellt wurde.

Die Expression von **E1** und **E2** wurde nach einem Standardprotokoll von *Junger* im *E. coli*-Stamm BLR(DE3) durchgeführt.^[102] Es werden dabei die folgenden Grundschrirte durchgeführt:

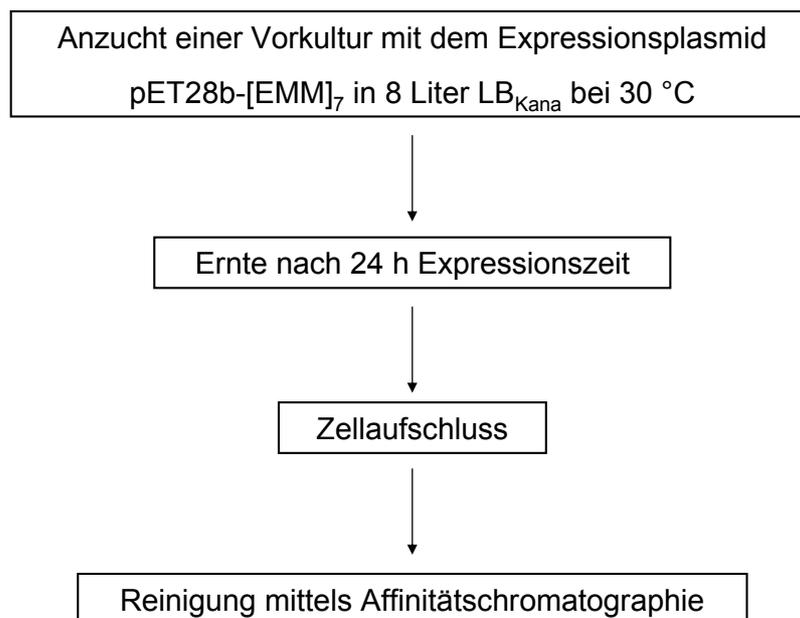


Abbildung 4-6 Grundschrirte der Proteinexpression. Kana = Kanamycin.

Nach Anzucht der Expressionskultur erfolgte die Ernte der *E. coli*-Bakterien durch Zentrifugation. Durch den Zellaufschluss wurden die löslichen Zellbestandteile gewonnen und mittels Zentrifugation von intakten Zellen, Membran- und Zellwandtrümmern, sowie unlöslichen Proteinen abgetrennt. Anschließend wurden die

überexprimierten Proteine aus dem Zelllysate unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) durch Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Nach erfolgter Aufreinigung konnte die Reinheit und das Molekulargewicht des Proteins durch SDS-PAGE (engl. *sodium* = Natrium, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) überprüft werden. Die SDS-PAGE-Analyse der Eluatfraktionen (Abbildung 4-7) zeigt das Elutionsmuster eines typischen Chromatographielaufes. In diesem Falle wurden die Fraktionen 9 bis 12 vereinigt.

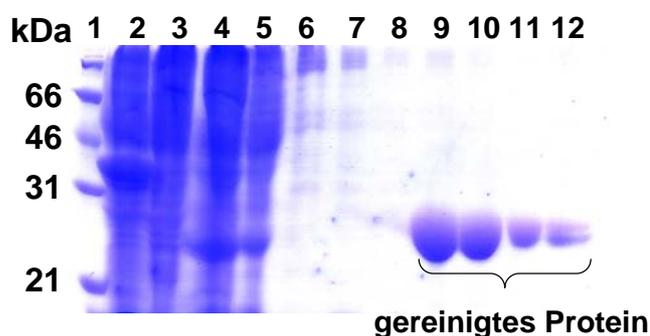


Abbildung 4-7 SDS-PAGE (gefärbt nach *Fairbanks*) nach Affinitätschromatographie exemplarisch von His₆-[EMM]₇ (**E1**). Bahn 1: LMW-Marker, 2: Zelllysate, 3: Probenauftrag mit Puffer A (Durchlauf), 4-8: Waschfraktionen, 9-12: gereinigte Proteinproben.

Bei Fraktionen, welche der SDS-Gel-Analytik zufolge noch Verunreinigungen aufwiesen, wurde ein zusätzlicher Hitzereinigungsverfahren durchgeführt. Hierbei wird die reversible Aggregation von **E1** bzw. **E2** bei hohen Temperaturen, im Gegensatz zum Verhalten der meisten anderen Proteine unter derartigen Bedingungen, ausgenutzt. His₆-[EMM]₇ bzw. His₆-Cys-[EMM]₇ fällt bei hohen Temperaturen in Abhängigkeit von der Molmasse, der Konzentration, der Ionenstärke und dem pH-Wert aus, geht bei Abkühlung jedoch wieder in Lösung und kann somit nach Zentrifugation aus dem Überstand erneut gewonnen werden. Die reinigende Wirkung dieses Hitzeschritts konnte durch weitere SDS-PAGE Untersuchungen bestätigt werden.

4.1.4 Bromcyano-Spaltungen von His₆-[EMM]₇ (E1) und His₆-Cys-[EMM]₇ (E2)

Mit dem Ziel **E1** und **E2** selektiv und reproduzierbar zu modifizieren, galt es eine Methode zur Spaltung spezifischer Aminosäuresequenzen, im Milligramm-Maßstab durchführbar, zu finden. Durch die Ansatzgröße konnte eine enzymatische Spaltung ausgeschlossen werden, da diese zu kostspielig ist. Aus diesem Grund wurde die in der Literatur bekannte Bromcyan-Spaltung^[103] auf unser System übertragen und optimiert. Hier erfolgt eine chemische Spaltung nach jedem Methionin.

In Anbetracht der Gesamtsequenz von **E1** und **E2** gestaltet sich eine Fragmentierung der Primärstruktur nach jedem Methionin als sinnvoll. Der gesamte His₆-tag kann mittels dieser Methode abgespalten werden und es bleiben nur wenige zusätzliche Aminosäuren vor der eigentlichen Elastin-ähnlichen Sequenz [EMM]₇ zurück (siehe Abbildung 4-8). Im Falle des His₆-Cys-[EMM]₇ kann das neu eingeführte Cystein in dem *N*-terminalen sechs Aminosäureüberhang erhalten bleiben.

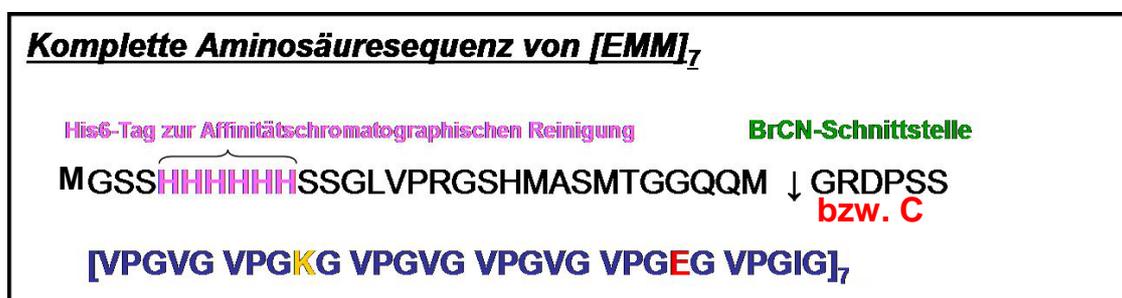


Abbildung 4-8 Komplette Aminosäuresequenz von His₆-[EMM]₇ (**E1**) bzw. His₆-Cys-[EMM]₇ (**E2**) (der Unterschied ist das rot gekennzeichnete C = Cystein) mit der Schnittstelle der Bromcyano-Spaltung.

Der Mechanismus der BrCN-Spaltung wird im nachfolgenden Schema beschrieben:

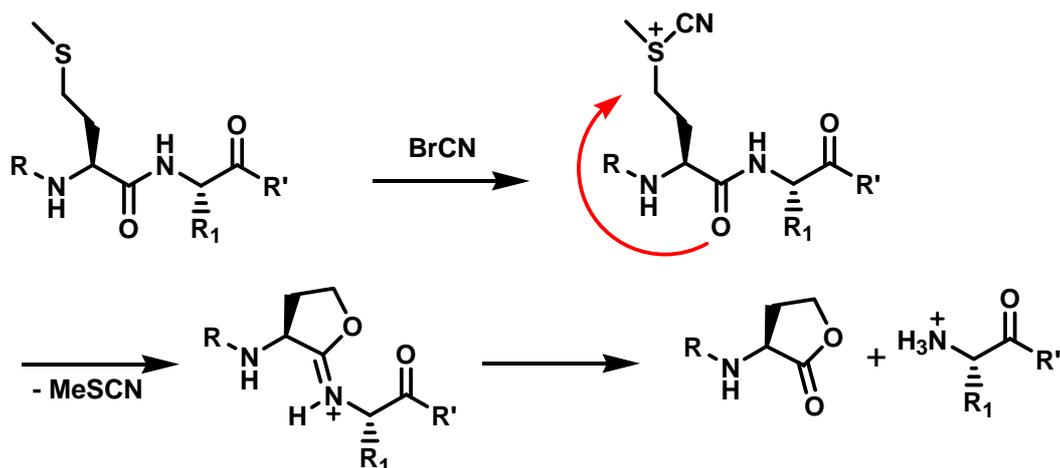


Abbildung 4-9 Vorgeschlagener Mechanismus der Spaltung von Aminosäuresequenzen mit Methionin unter Einwirkung von BrCN.

Zur Optimierung der BrCN-Spaltung wurden unterschiedliche Reaktionsbedingungen getestet. Die Spaltung von **E1** wurde sowohl in 88 %iger Ameisensäure, als auch in 70 % TFA-Lösung durchgeführt, wobei alle weiteren Parameter konstant gehalten wurden. Nach einer Reinigung der Produkte über Dialyse gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$, konnten die Produkte mit Hilfe von MALDI-TOF analysiert werden (siehe Abbildung 4-10).

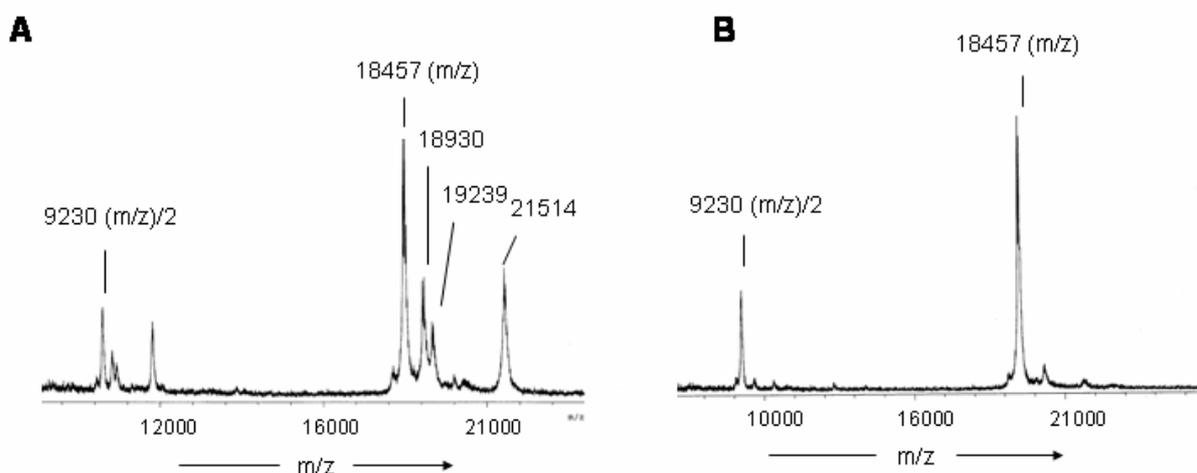


Abbildung 4-10 MALDI-TOF-Spektren (Reflektor-Modus, Matrix: α -Cyano-Hydroxy-Zimtsäure). **A:** BrCN-Spaltung von **E1** in 70 %iger TFA. **B:** BrCN-Spaltung von **E2** in 88 %iger Ameisensäure.

Wie aus den Spektren ersichtlich ist, konnte bei der Verwendung von TFA als Säure die Methionin-Aminosäure-Spaltung nicht komplett ablaufen. Die BrCN-Spaltung verlief unvollständig. Im Gegensatz hierzu gelang in Ameisensäure die

Abspaltung des Histidin-*tags* fast vollständig. Ameisensäure wurde deshalb für alle weiteren BrCN-Spaltungen als Lösemittel verwendet.

In einem typischen Ansatz zur Spaltung des Histidin-*tags* konnten bei einem 100-fachen Überschuss an Bromcyan 91 % von [EMM]₇ (**E3**) bzw. Cys-[EMM]₇ (**E4**) isoliert werden.

4.1.5 Analytische Daten von [EMM]₇ (**E3**)

4.1.5.1 MALDI-TOF-MS von His₆-[EMM]₇ (**E1**) und [EMM]₇ (**E3**)

Von den Proteinen His₆-[EMM]₇ (**E1**) und [EMM]₇ (**E3**) konnte ein MALDI-TOF-Spektrum aufgenommen werden. Die molare Masse von His₆-[EMM]₇ (**E1**) beträgt nach Berechnungen 21514 Da und stimmt gut mit der erhaltenen Masse von 21528 Da im Spektrum überein (vgl. Abbildung 4-11).

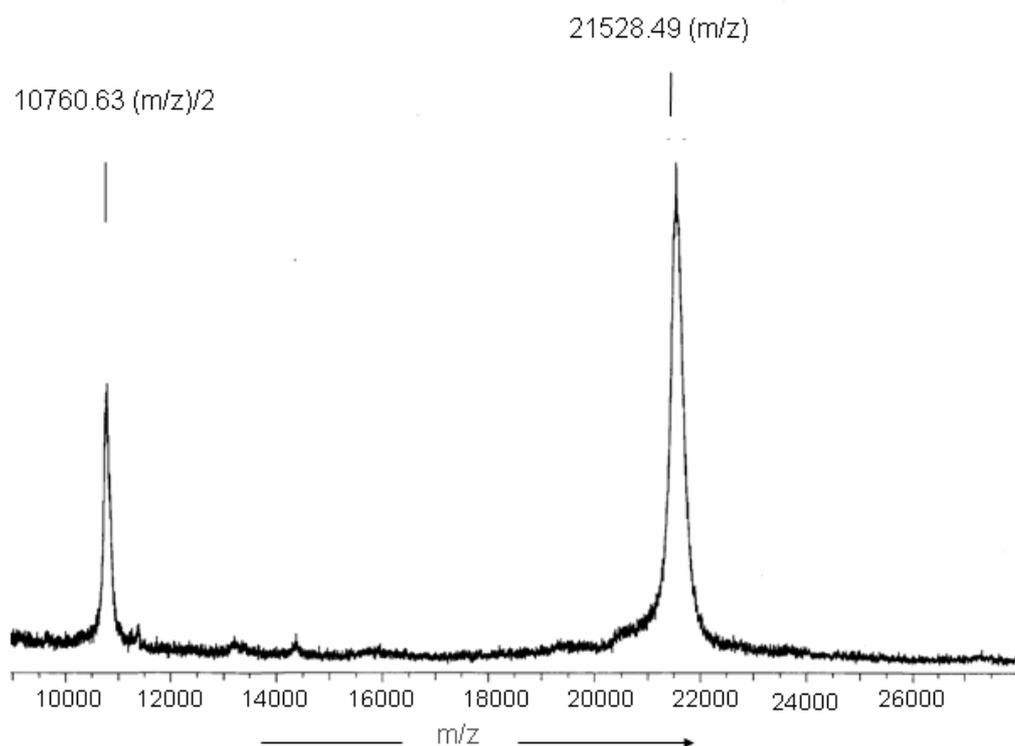


Abbildung 4-11 MALDI-TOF-Spektrum von His₆-[EMM]₇ (**E1**) im Reflektormodus. (Matrix: α -Cyano-Hydroxy-Zimtsäure). Zu sehen sind die Signale für m/z und $(m/z)/2$.

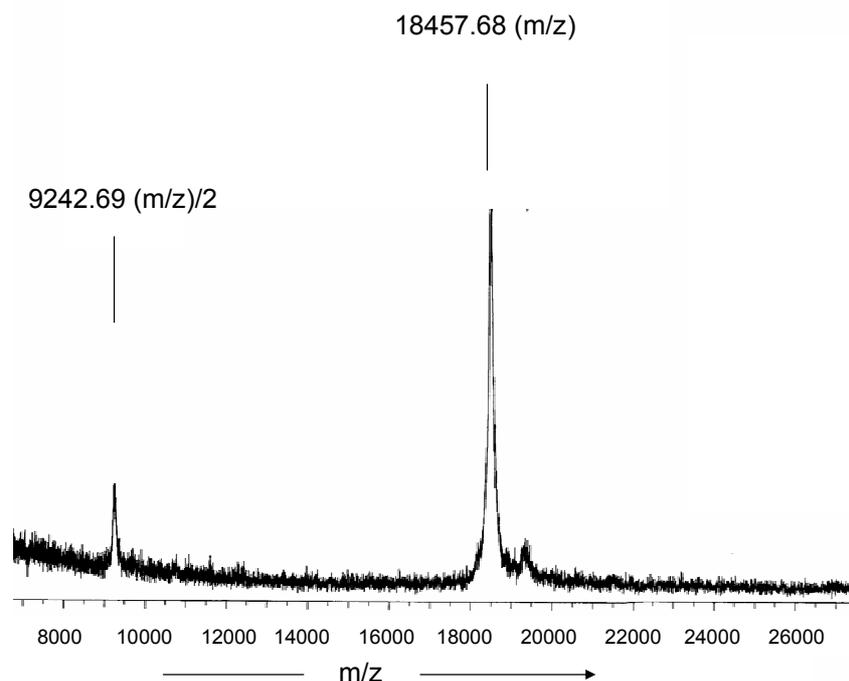


Abbildung 4-12 MALDI-TOF-Spektrum von $[EMM]_7$ (**E3**) im Reflektormodus. (Matrix: α -Cyano-Hydroxy-Zimtsäure). Zu sehen sind die Signale für m/z und $(m/z)/2$. Der Histidin-tag wurde chemisch mit Bromcyan abgespalten.

Die erfolgreiche Umsetzung mit Bromcyan von $His_6-[EMM]_7$ konnte ebenfalls über MALDI-TOF bestätigt werden. Die theoretisch berechnete Masse von **E3** betrug 18426 Da und passte genau zu der im Spektrum ermittelten Masse von 18457 Da (siehe Abbildung 4-12).

4.1.5.2 NMR Analyse von $[EMM]_7$ (**E3**)

Die Primärstruktur von $[EMM]_7$ (**E3**) wurde mit 1H -NMR und 2D-TOCSY von *A. Junger* analysiert.^[102] Das 1H -NMR Spektrum von $[EMM]_7$ wurde in D_2O/H_2O bei einer Temperatur von 20 °C aufgenommen, wobei als Referenz H_2O verwendet wurde. In Übereinstimmung mit der Literatur konnten viele Signale zugeordnet werden (siehe Abbildung 4-13).^[104-107]

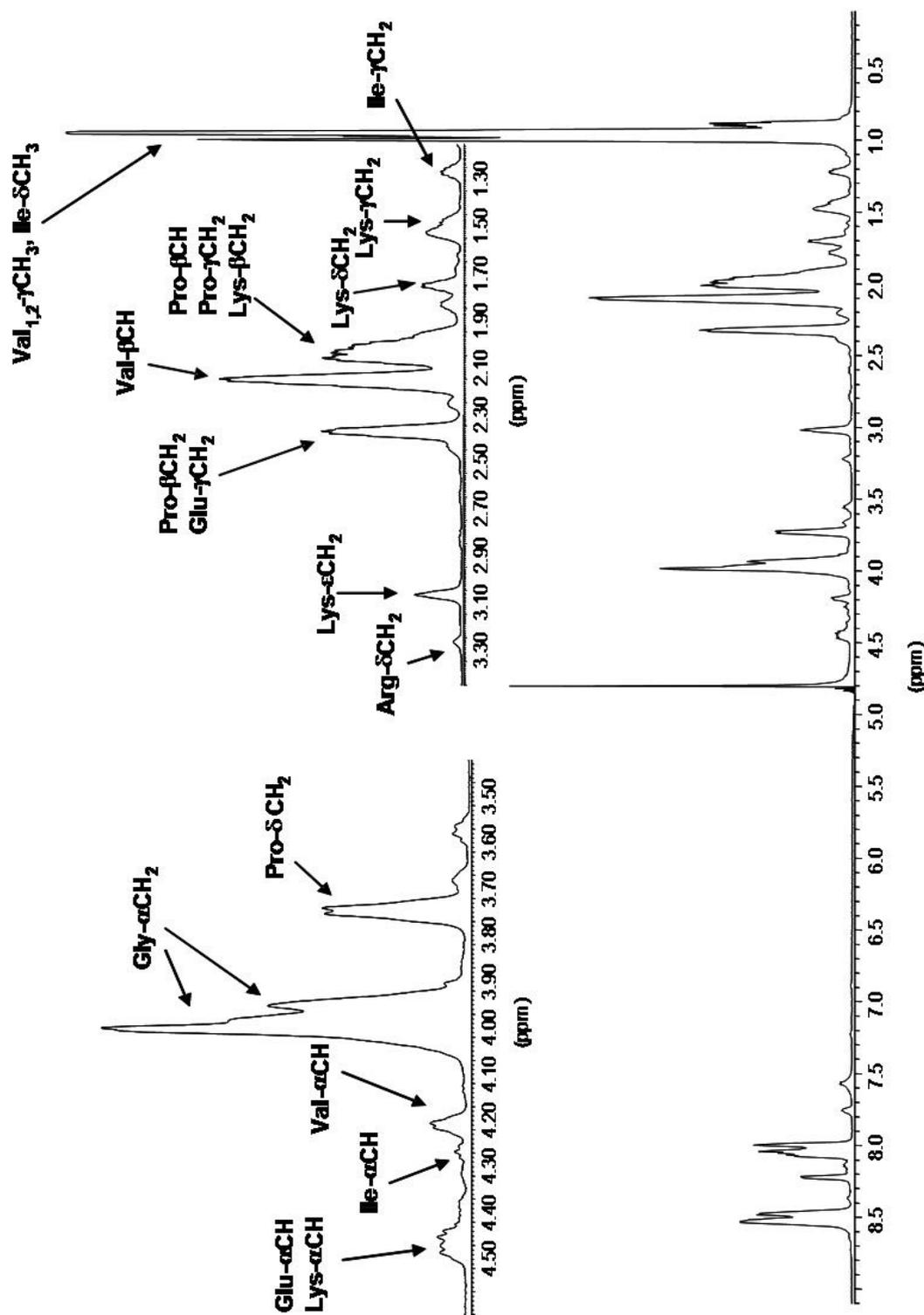


Abbildung 4-13 ¹H-NMR-Spektrum von [EMM]₇ (E3) aufgenommen in D₂O/H₂O 1:9 (v/v), 600 MHz bei 20 °C mit ausgewählten Signalzuordnungen. Das Spektrum ist um 90° gedreht.

Zusätzlich konnte noch ein 2D TOCSY aufgenommen werden, welches die Zuordnung der restlichen Signale ermöglichte (siehe Abbildung 4-14 bzw. Tabelle 4-1).

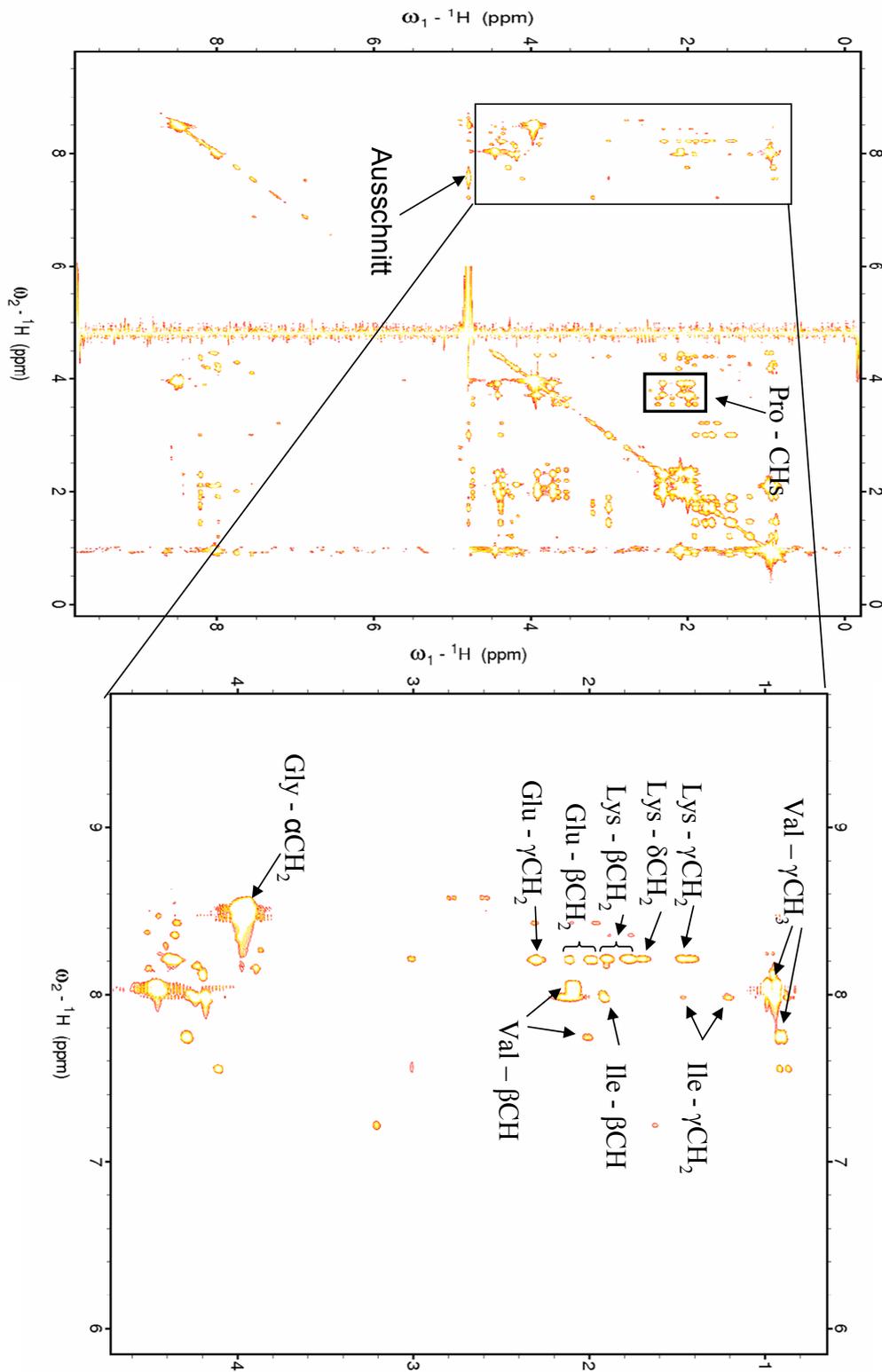


Abbildung 4-14 2D-TOCSY-NMR von $[EMM]_7$ (**E3**) aufgenommen in D_2O/H_2O 1:9 (v/v), 600 MHz bei 20 °C mit ausgewählten Signalzuordnungen. Das Spektrum ist um 90° gedreht.

Tabelle 4-1 Zuordnung der chemischen Verschiebung des $^1\text{H-NMR}$ bzw. 2D-TOCSY-Spektrums von **E3** ([EMM]₇) in ppm.

Aminosäure	NH	$\alpha\text{-H}$	$\beta\text{-H}$	weitere Hs
Val ₁	8.05	4.18	2.10	0.95, 1.00
Pro	-	4.20	2.10, 2.20	γCH_2 1.95, 2.00; δCH_2 3.90, 4.00
Gly	8.50	4.00	-	-
Val ₂	7.70	4.30	2.00	0.90, 0.95
Lys	8.20	4.35	1.80, 1.90	γCH_2 1.45; δCH_2 1.70; ϵCH_2 3.00; NH_2 7.22
Glu	8.21	4.40	2.00, 2.10	γCH_2 2.30
Ile	7.98	4.25	1.95	γCH_2 1.20, 1.50; γCH_3 0.95; δCH_3 0.90

Die häufig vorkommenden Signale der Aminosäuren Valin, Prolin und Glycin können bereits im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum gut zugeordnet werden. Zusätzlich findet man im 2D-TOCSY-Spektrum die Peaks für Lysin und Glutaminsäure. Somit konnte sichergestellt werden, dass die reaktiven Seitenketten (Lysin: primäres Amin und Glutaminsäure: Carboxylgruppe) für die posttranslationale Modifizierung vorhanden sind.

4.1.6 Analytische Daten von Cys-[EMM]₇ (E4)

4.1.6.1 Der Ellman-Assay

Der Nachweis freier Thiolgruppen in Proteinen mit Cysteinresten kann durch die Umsetzung mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (**DTNB**; Ellmans Reagenz) detektiert und quantifiziert werden.^[108] Dabei reagiert das Reagenz mit reduzierten Thiolresten unter Ausbildung eines gemischten Disulfids, gleichzeitig wird im stöchiometrischem Verhältnis das 2-Nitro-5-thiobenzoat (**NTB**) freigesetzt, welches ein Absorptionsmaximum bei 412 nm besitzt.

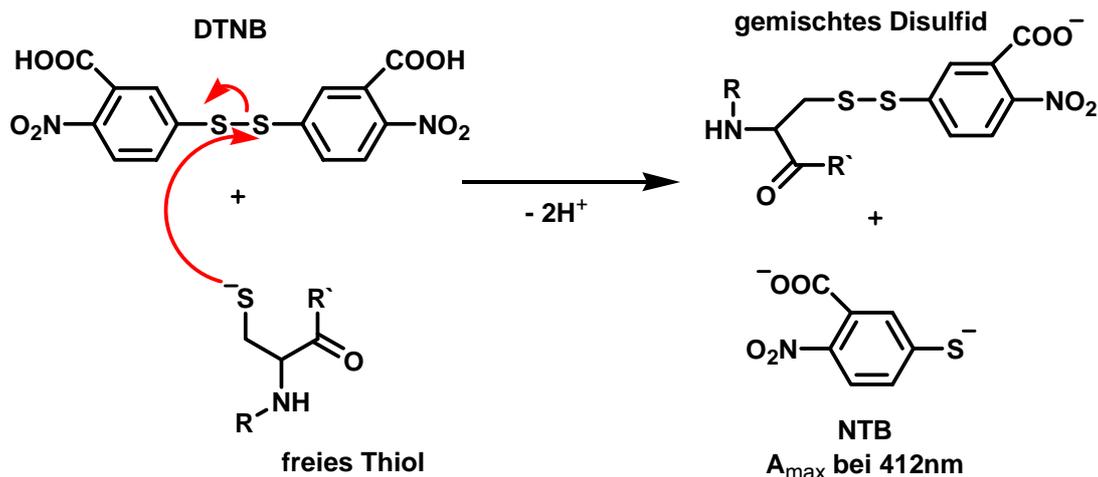


Abbildung 4-15 Vorgeschlagener Mechanismus zum Nachweis freier Thiolgruppen mit DNTB (Ellmans Reagenz). DTNB = 5,5' Dithiobis-2-nitrobenzoesäure

Die Konzentration von reduziert vorliegenden SH-Gruppen kann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (Formel 4-1) bestimmt werden (Absorptionskoeffizient von NTB: $\epsilon_{412\text{nm}} = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (\text{Formel 4-1})$$

A	Absorption
ϵ	Absorptionskoeffizient [L/(mol*cm)]
c	Konzentration des absorbierenden Stoffes [mol/L]
d	Schichtdicke [cm]

Zunächst wurde eine Eichgerade erstellt. Hierzu wurden 1,4-Dithiothreit-Eichlösungen mit **DTT**-Konzentrationen im Bereich von $1 \cdot 10^{-5} \text{ M} - 4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ hergestellt. Gemäß experimenteller Angaben wurde die DTNB Lösung im Überschuss zugegeben. Die Absorptionsspektren wurden jeweils im Bereich von 350 nm bis 500 nm aufgenommen und die Maxima bei 412 nm bestimmt (Spektrum hier nicht gezeigt). Der im Experiment ermittelte Wert stimmte gut mit dem theoretisch berechneten Absorptionskoeffizient von NTB: $\epsilon_{412\text{nm}} = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ überein.

4.1.6.2 Quantifizierung freier Thiolgruppen in Cys-[EMM]₇ (E4)

Zur Quantifizierung der freien Thiolgruppen in Cys-[EMM]₇ (E4) mussten diese mit **DTT** (1,4-Dithiothreit) reduziert werden, da unbehandelte Proben bei 412 nm kein Absorptionsmaximum aufwiesen.^[109]

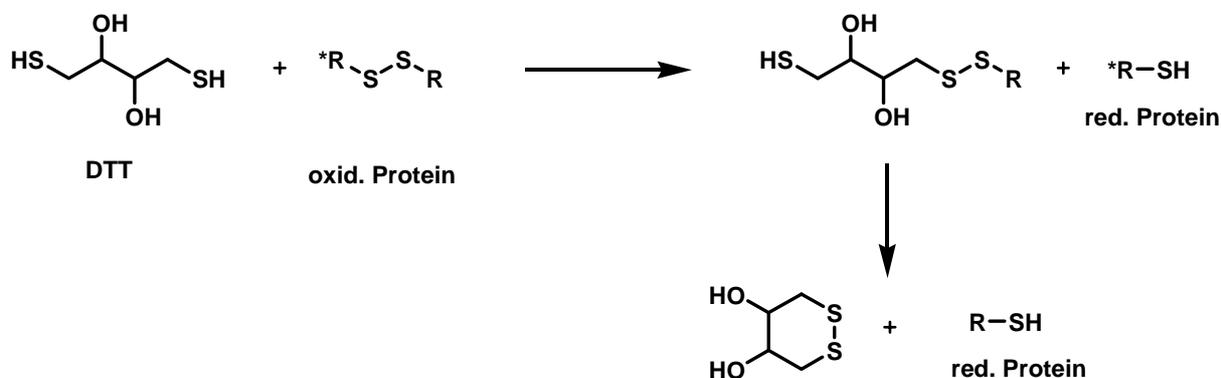


Abbildung 4-16 Reduktion oxidierter Cystein-haltiger Proteine mit DTT, DTT = 1,4-Dithiothreit.

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte unter Ausnutzung des sogenannten „inversen Temperaturübergangs“ (**ITT** von engl. *inverse temperature transition*), der in der Literatur auch als **T_t** (*transition temperature*) abgekürzt wird. Unterhalb der Temperatur T_t bleiben die Polymerketten durch Hydratation in wässriger Lösung ungeordnet. Im Gegensatz hierzu faltet und assembliert sich die Polymerkette oberhalb von T_t. Es wird der phasenseparierte Zustand, in dem die Ketten eine reguläre Struktur ausbilden, erreicht. In diesem gefalteten und assoziierten Zustand verliert die Kette ihren gesamten Wasseranteil, die Kette dehydratisiert und das Polymer fällt aus.^[110,111]

Das ITT-Verhalten von His₆-[EMM]₇ (E1) wurde von *Junger* untersucht.^[102] Es zeigt eine starke Abhängigkeit von der Konzentration des Polymers sowie der Salzkonzentration. Eine Fällung des Proteins unter Ausnutzung des ITT-Verhaltens allein durch Erhöhung der Temperatur (bei geringer Salzkonzentration) ist jedoch präparativ schwierig, da das Protein wieder in Lösung gehen kann, wenn bei niedrigerer Temperatur zentrifugiert wird. Aus diesem Grund wurde versucht das Protein durch Aussalzen zu fällen. Die Fällung durch Erhöhung der Salzkonzentration beruht im Wesentlichen auf der Konkurrenz von Protein und Salzionen um die solvatisierenden Wassermoleküle. Bei hoher Ionenkonzentration stehen nicht mehr genügend Wassermoleküle zur Solvatisierung der Proteine zur Verfügung. Die

Wechselwirkungen zwischen den Proteinen werden stärker als die Interaktion mit dem Lösemittel, was letztlich dazu führt, dass die Proteine aggregieren und ausfallen.

Zur Fällung von Cys-[EMM]₇ (**E4**) wurde nach der Reduktion mit DTT durch Zugabe von NaCl die Salzkonzentration erhöht. Dieser Schritt wurde dreimal in Folge ausgeführt. Die Quantifizierung der freien Thiolgruppen nach Reduktion und Fällung mittels Ellman Assay ergab für Cys-[EMM]₇ 69 % freie -SH, jeweils bezogen auf die Einwaage an Cys-Elastin. Diese Ergebnisse könnten entweder auf unvollständige Reduktion oder auf Verluste bei Fällung und Waschen bzw. der Oxidation an Luft zum Disulfid zurückgeführt werden. Die Fällung wurde mittels SDS-Gel-Analytik überprüft und es konnte nachgewiesen werden, dass in den Waschlösungen kein Protein mehr vorhanden war.

4.1.6.3 MALDI-TOF von His₆-Cys-[EMM]₇ (**E2**) und Cys-[EMM]₇(**E4**)

Von den Mutanten des His₆-[EMM]₇ konnten auch jeweils MALDI-TOF-Spektren aufgenommen werden. Wie in Abbildung 4-17 gezeigt, konnte der theoretisch erwartete Wert von 21530 Da bzw. 18442 Da von His₆-Cys-[EMM]₇ (**E2**) bzw. Cys-[EMM]₇ (**E4**) bestätigt werden.

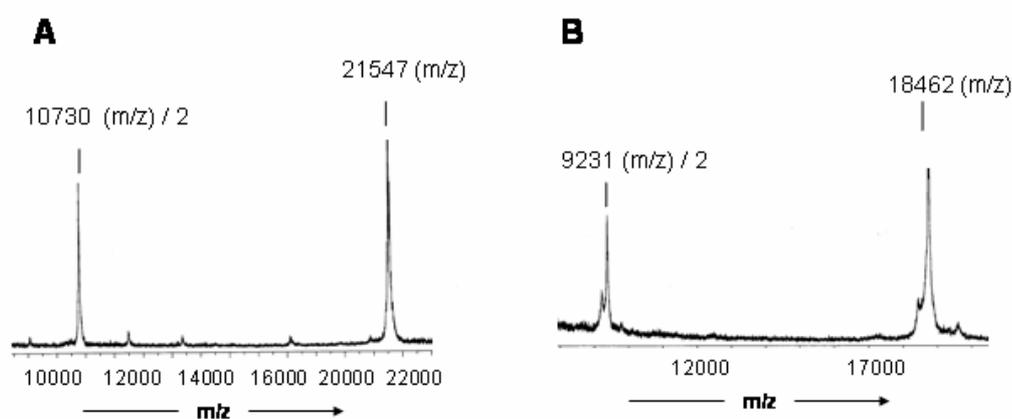


Abbildung 4-17 MALDI-TOF-Spektren (Reflektor-Modus, Matrix: α -Cyano-Hydroxy-Zimtsäure).
A: His₆-Cys-[EMM]₇ (**E2**) B: BrCN-gespaltenes Cys-[EMM]₇ (**E4**).

4.2 Charakterisierung und Synthese polymerer Wirkstoffträger auf der Basis von [EMM]₇

Zum Aufbau des enzymatisch spaltbaren Tetrapeptidlinkers Gly-Phe-Leu-Gly wurde das Prinzip der Peptidsynthese am Harz zu Hilfe genommen. Nach einer kurzen Einführung in die Grundlagen der Festphasensynthese wird im nächsten Kapitel auf die konkrete, maßgeschneiderte Synthesestrategie polymerer Wirkstoffträger eingegangen.

4.2.1 Die Prinzipien der Peptidsynthese

Für die Synthese der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Peptide wird die von *Merrifield* entwickelte Strategie der Festphasenpeptidsynthese (**SPPS** = solid phase peptide synthesis) verwendet.^[112,113] Die lineare Peptidkette wurde nach der von *Carpino et al.* entwickelten orthogonalen Fmoc/*tert*-Butyl-Schutzgruppenstrategie^[114-116] (Abbildung 4-18) schrittweise vom C- zum N-Terminus an einem festen Träger aufgebaut, indem eine N-terminal geschützte Aminosäure an eine N-terminal entschützte, festphasengebundene Aminosäure gekuppelt wurde. Die Vorteile dieser Methode bestehen im Wesentlichen darin, dass durch hohe Reagenzienüberschüsse die Kupplungsreaktion fast quantitativ verläuft und die überschüssigen Reagenzien von dem jeweiligen harzgebundenen Molekül durch einfache Filtration entfernt werden können.

Im ersten Schritt wird eine partiell geschützte Aminosäure über einen zu den Kupplungsbedingungen orthogonalen Linker an den polymeren Träger gebunden. Als polymere Träger werden Polystyrol-Harz und TentaGel-Harz (Polystyrol-Harz mit 36 zusätzlichen PEG-Linkern) eingesetzt. Die Art des Linkers entscheidet, wie die synthetisierte Verbindung wieder von dem polymeren Träger entfernt werden kann. In dieser Arbeit wurde der Trityl-Linker (siehe Abbildung 4-18) verwendet, von welchem das Peptid unter Erhalt der permanenten Schutzgruppen abgespalten werden kann.

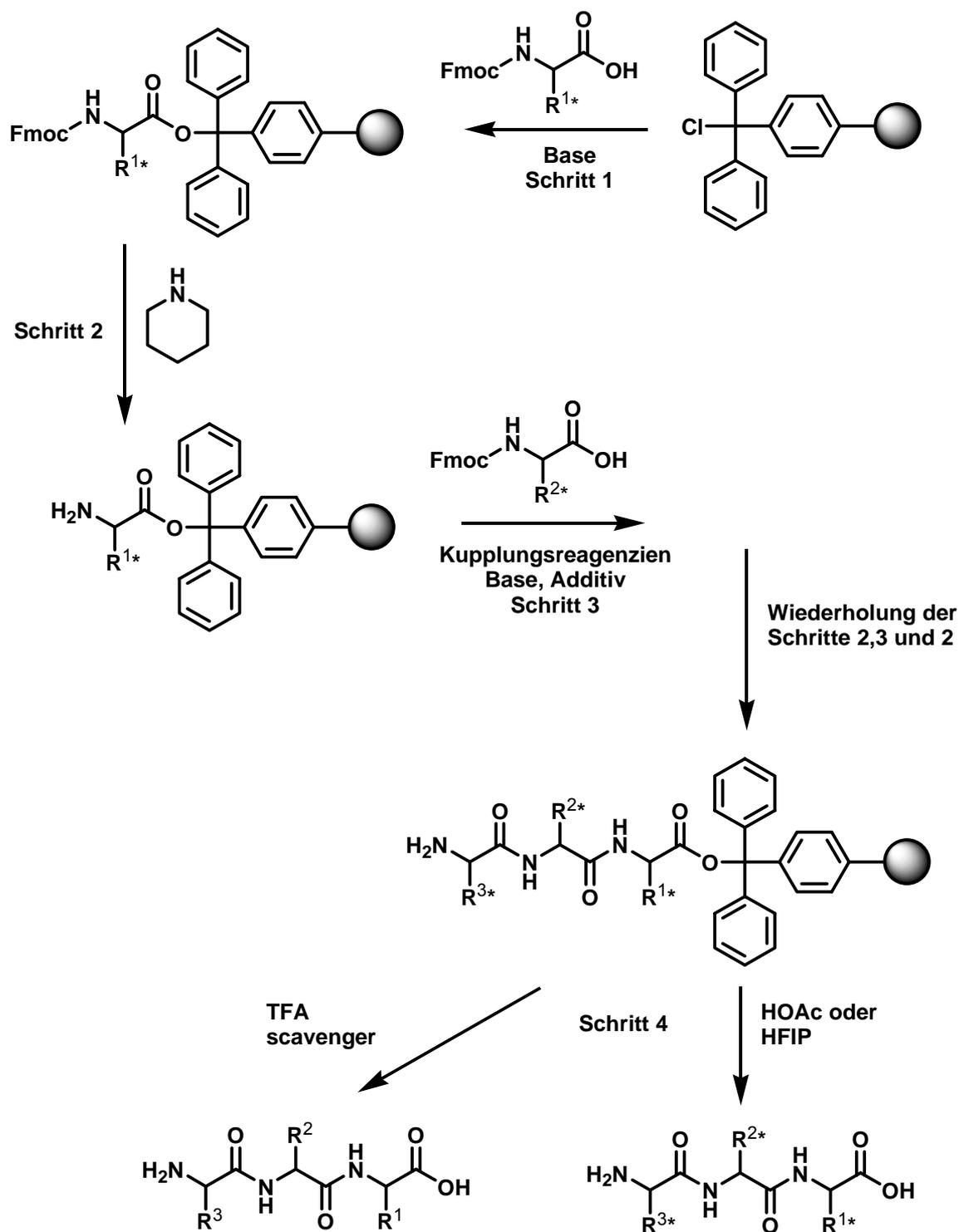


Abbildung 4-18 Darstellung der Synthesestrategie von Peptiden an fester Phase nach *Merrifield* und *Carpino* unter Verwendung des Trityllinkers. Die Abspaltung des Peptids vom festen Träger in Schritt 4 erfolgt entweder unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen (*) unter schwach sauren Bedingungen (z.B. HOAc oder HFIP) oder durch simultane Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen mittels TFA .

Für die Kupplungsreaktion (3. Schritt) muss die Carboxylgruppe der Fmoc-Aminosäure aktiviert werden. Dies kann entweder durch den Einsatz bereits voraktivierter Aminosäurederivate, wie z.B. symmetrische Anhydride, *N*-Carboxyanhydride bzw. Säurehalogenide^[115,117,118], oder durch Zugabe von Aktivierungsreagenzien^[119-121] (Abbildung 4-19) erfolgen.

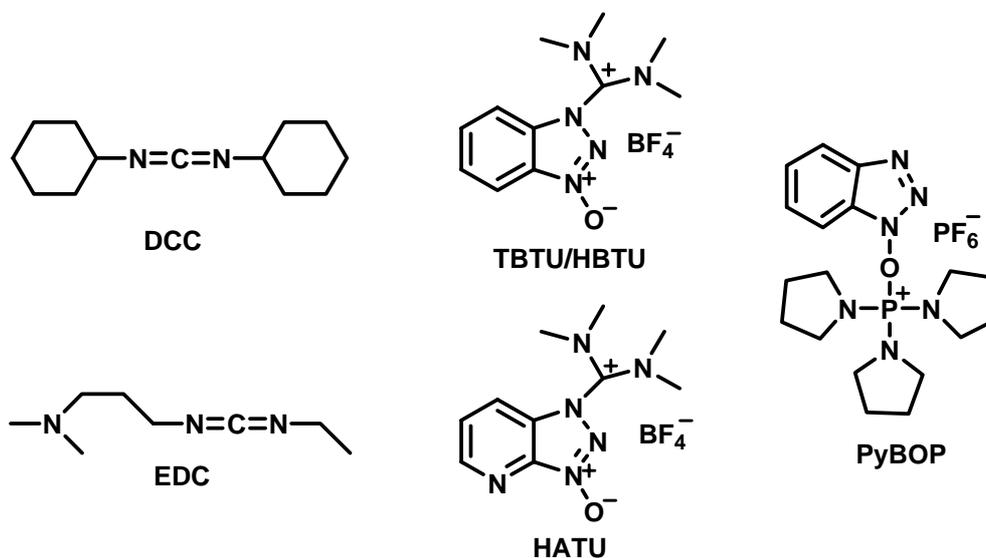


Abbildung 4-19 Kupplungsreagenzien für die *in situ*-Aktivierung von Aminosäuren. (Review siehe^[122])

Diese Aktivierungsreagenzien erzeugen *in situ* hochreaktive Acyluronium oder Acylphosphonium-Spezies, welche im nachfolgenden Schritt durch den nukleophilen Angriff von dem gebildeten Bromid, HOBt (1-Hydroxybenzotriazol) oder HOAt (1-Hydroxy-7-azabenzotriazol) in das Säurehalogenid bzw. in den Aktivester umgewandelt werden. Dieser reagiert letztendlich mit dem freien *N*-Terminus des harzgebundenen Peptids zum Amid. Die größte Reaktivität weisen OAt-Aktivester, symmetrische Anhydride und Aminosäurehalogenide auf. Die in den ersten Schritten der Aktivierungsreaktion gebildeten Acyl-Onium-Verbindungen racemisieren leicht, weshalb man durch den Zusatz von Additiven (Abbildung 4-20) das Reaktionsgleichgewicht zum Aktivester verschiebt.

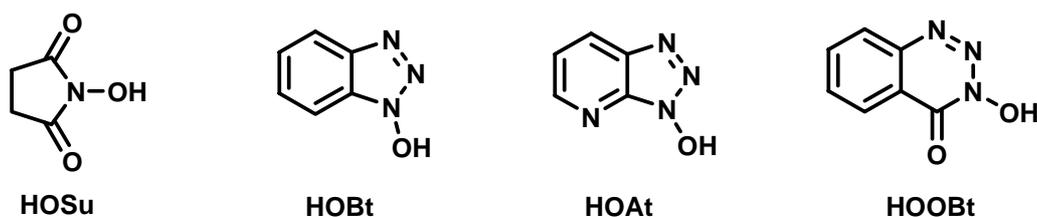


Abbildung 4-20 Gebräuchliche Additive für die Kupplung von *in situ* aktivierten Aminosäurederivaten. Die Effizienz in der Unterdrückung der Racemisierung nimmt von links nach rechts zu.

Zur Vermeidung von Nebenreaktionen mit den funktionellen Gruppen der Seitenketten werden für diese permanente TFA-labile Schutzgruppen verwendet:

Tabelle 4-2 Seitenkettenschutzgruppen für Aminosäuren.

Aminosäure	Schutzgruppe
Serin	<i>tert</i> -Butylether (^t Bu)
Aspartat, Glutamat	<i>tert</i> -Butylester (O ^t Bu)
Lysin	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl (Boc)
Arginin	<i>N</i> ^α -(2,2,4,6,7)-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf) ^[123]

Die Peptidabspaltung vom Harz (Schritt 4 in Abbildung 4-18) erfolgt im Fall des Trityllinkers durch Behandlung mit schwach sauer reagierenden Reagenzien wie **Hexafluorisopropanol**^[124] (**HFIP**) oder Essigsäure/Trifluorethanol in Dichlormethan unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen. Soll die Harzabspaltung unter gleichzeitiger, vollständiger Entschützung des Peptids erfolgen, verwendet man TFA. Hierbei entstehen Carbokationen, die mittels geeigneter *scavenger* abgefangen werden müssen, um die irreversible Alkylierung nukleophiler Aminosäureseitenketten zu unterdrücken. Hierbei kommen Wasser, Thioanisol, Ethandithiol oder Phenol zum Einsatz.^[125] In neuerer Zeit hat sich das geruchlose und sehr effektive **Triisopropylsilan (TIPS)** zusammen mit geringen Mengen an Wasser in TFA als Abspaltmischung etabliert.^[126]

4.2.2 Synthesestrategie für ein neuartiges Polymer–Doxorubicin–Konjugat auf der Basis von [EMM]₇

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit sollten nach dem Konzept von *Duncan et al.* neue makromolekulare Trägersysteme für das Zytostatikum Doxorubicin (Dox) auf der Basis von ELPs synthetisiert werden.

Die Entwicklung dieser neuartigen monodispersen [EMM]₇-GFLG-Dox-Konjugate erfolgte in drei Schritten:

- Schritt 1:** Synthese des enzymatisch abbaubaren Tetrapeptidlinkers Glycin-Phenylalanin-Leucin-Glycin (GFLG)
- Schritt 2:** Konjugation des Linkers mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin bzw. dem Farbstoff **RBITC** (**R**hodamin **B** Isothiocyanat)
- Schritt 3:** Kopplung des zytostatisch aktiven GFLG-Dox-Linkers (bzw. GFLG-RBITC) mit den Aminogruppen der Lysin-Seitenketten des Polypeptidrückgrats von [EMM]₇

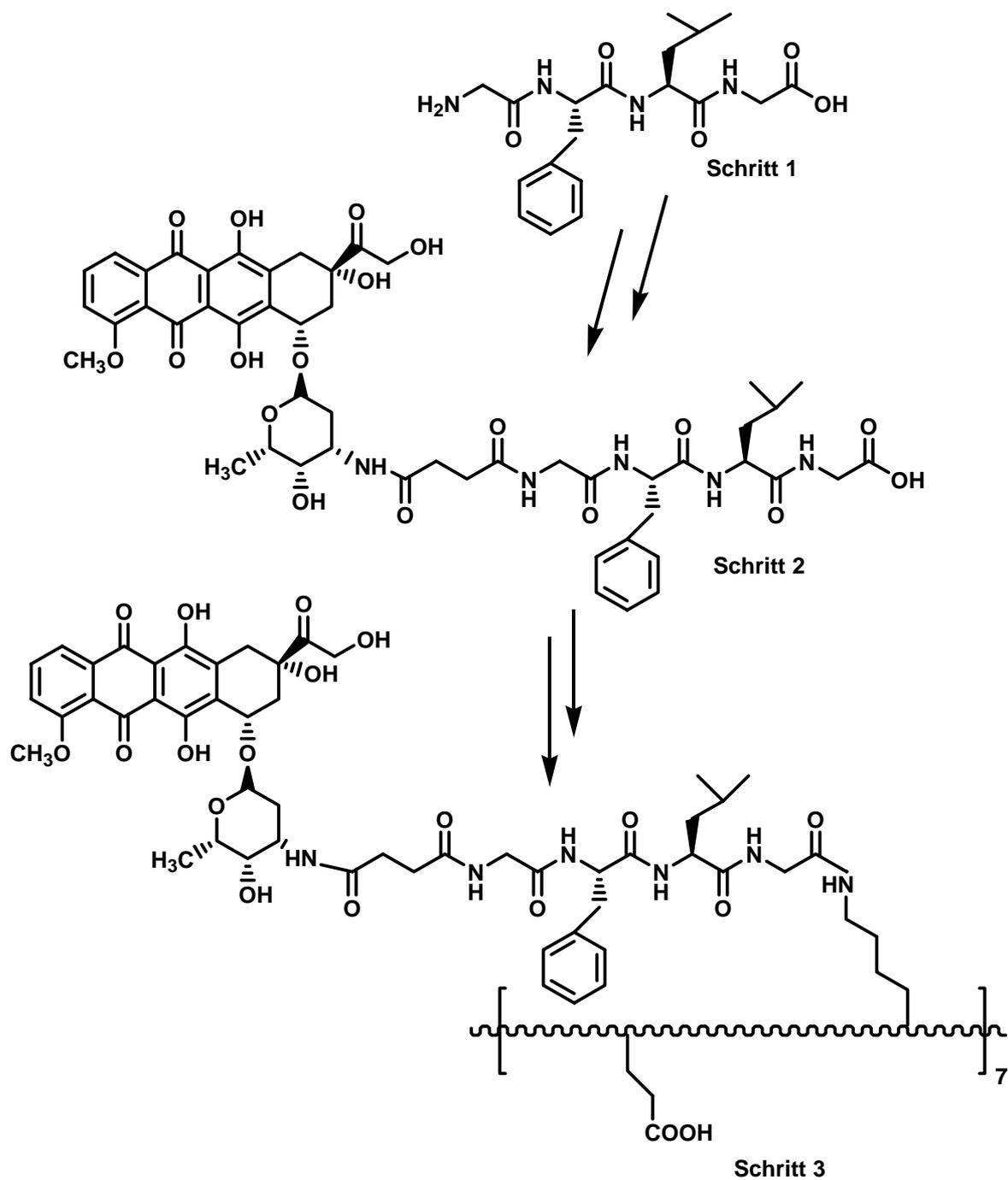


Abbildung 4-21 Schematische Darstellung der Synthesestrategie polymerer Wirkstoffträger auf der Basis von [EMM]₇.

4.2.3 Synthese und Charakterisierung des enzymatisch abbaubaren GFLG-Linkers

Der Aufbau des Peptids GFLG erfolgte an der festen Phase, am TCP-Harz (Tritylchloridpolystyrol-Harz). Wie im Kapitel 4.1 beschrieben, erfolgte die Synthese nach der orthogonalen Fmoc/*tert*-Butyl-Schutzgruppenstrategie von *Carpino*. Das lineare Peptid wurde unter Zusatz von TBTU^[127,128], HOBT^[129,130] und DIPEA aufgebaut.

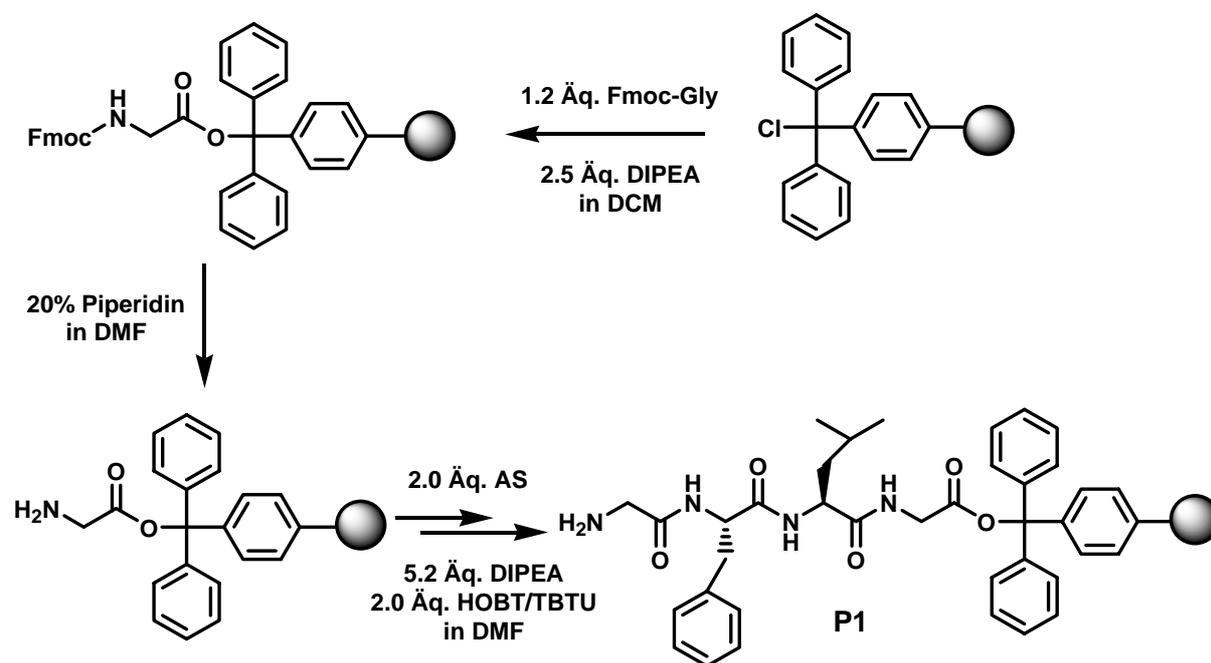


Abbildung 4-22 Synthese des enzymatisch abbaubaren Linkers an der festen Phase. Im dritten Schritt wird als AS (Aminosäure), Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH und Fmoc-Gly-OH eingeführt.

Das Produkt **P1** konnte mit ESI-MS charakterisiert werden.

4.2.4 Synthese und Charakterisierung des RBITC-GFLG-Linkers

Zur Synthese des Fluoreszenzfarbstoff-GFLG-Linkers wurde der kommerziell erhältliche Rhodamin-Farbstoff RBITC ausgewählt. Dieser enthält als funktionalisierbare Gruppe ein Isothiocyanat, welches unter basischen Bedingungen mit dem freien harzgebundenen Amin unter Ausbildung einer stabilen Thioharnstoffbindung ans Harz konjugiert werden kann.

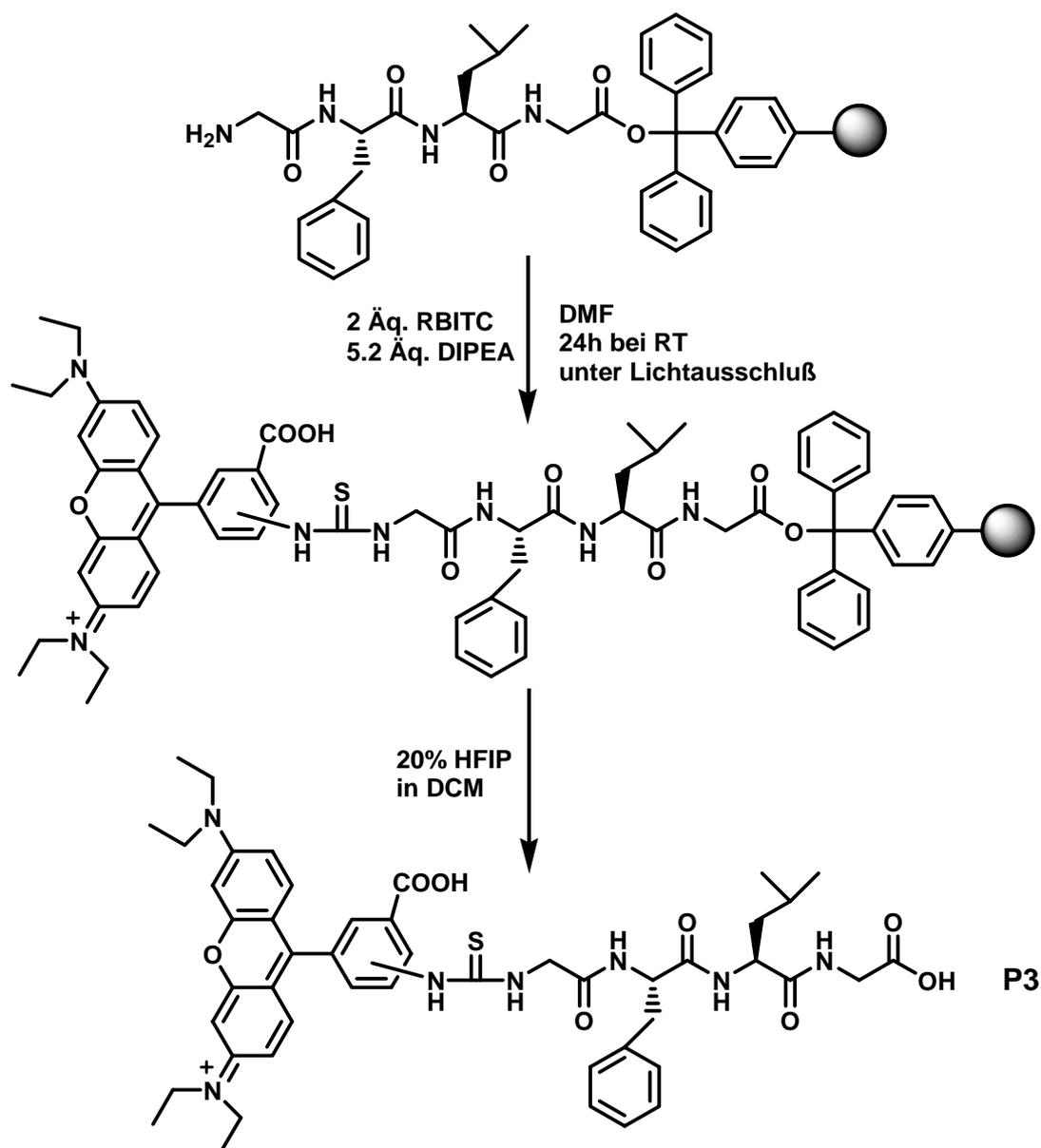


Abbildung 4-23 Syntheschema des fluoreszenz-gelabelten enzymatisch abbaubaren RBITC-GFLG-Linkers **P3**, RBITC = Rhodamin B Isothiocyanat

Nach der Reinigung von überschüssigem RBITC durch einfache Filtration des Harzes konnte mittels HFIP das Produkt vom Harz abgespalten werden. Anschließend wurde **P3** (RBITC-GFLG) HPLC gereinigt und mit ESI-MS charakterisiert. Das TFA-Salz von **P3** konnte mit einer Ausbeute von 68 % isoliert werden.

4.2.5 Synthese und Charakterisierung des Dox-GFLG-Linkers

Im zweiten Schritt mussten nun geeignete Bedingungen zur Konjugation von zytostatisch aktiven Doxorubicin und dem Tetrapeptid gefunden werden. Mittels einer Umsetzung von Bernsteinsäureanhydrid und der terminalen NH_2 -Gruppe des festphasengebundenen GFLG-Peptids, konnte eine Carboxylgruppe eingeführt werden. Hierzu wurde Bernsteinsäureanhydrid ebenfalls an der festen Phase zur Reaktion mit dem freien *N*-Terminus von **P1** gebracht. Es wurden zwei Äquivalente an Bernsteinsäureanhydrid in einer 1:1 Mischung aus Pyridin und DMF zum NH_2 -GFLG-Harz gegeben. Nach erfolgter Aufreinigung konnte man direkt an der festen Phase Doxorubicin über die Amino-Gruppe der Zuckereinheit an das Tetrapeptid konjugieren. Hierzu erfolgte eine Voraktivierung des freien OH-Terminus des Bernsteinsäure-GFLG-Harz Konjugats mit 1.1 Äquivalenten PyBOP/HOBT und 2.6 Äquivalenten an DIPEA in trockenem DMF. Anschließend wurde Doxorubicin*HCl im zweifachen Überschuss mit 2.6 Äquivalenten an DIPEA in DMF unter Lichtausschluss zugegeben. Das Produkt konnte nach 24 Stunden Reaktionszeit vom Harz mittels HFIP abgespalten werden. Anschließend wurde **P4** (Dox-GFLG) chromatographisch gereinigt und mit ESI-MS charakterisiert. Das TFA-Salz von **P4** konnte mit einer Ausbeute von 54 % isoliert werden.

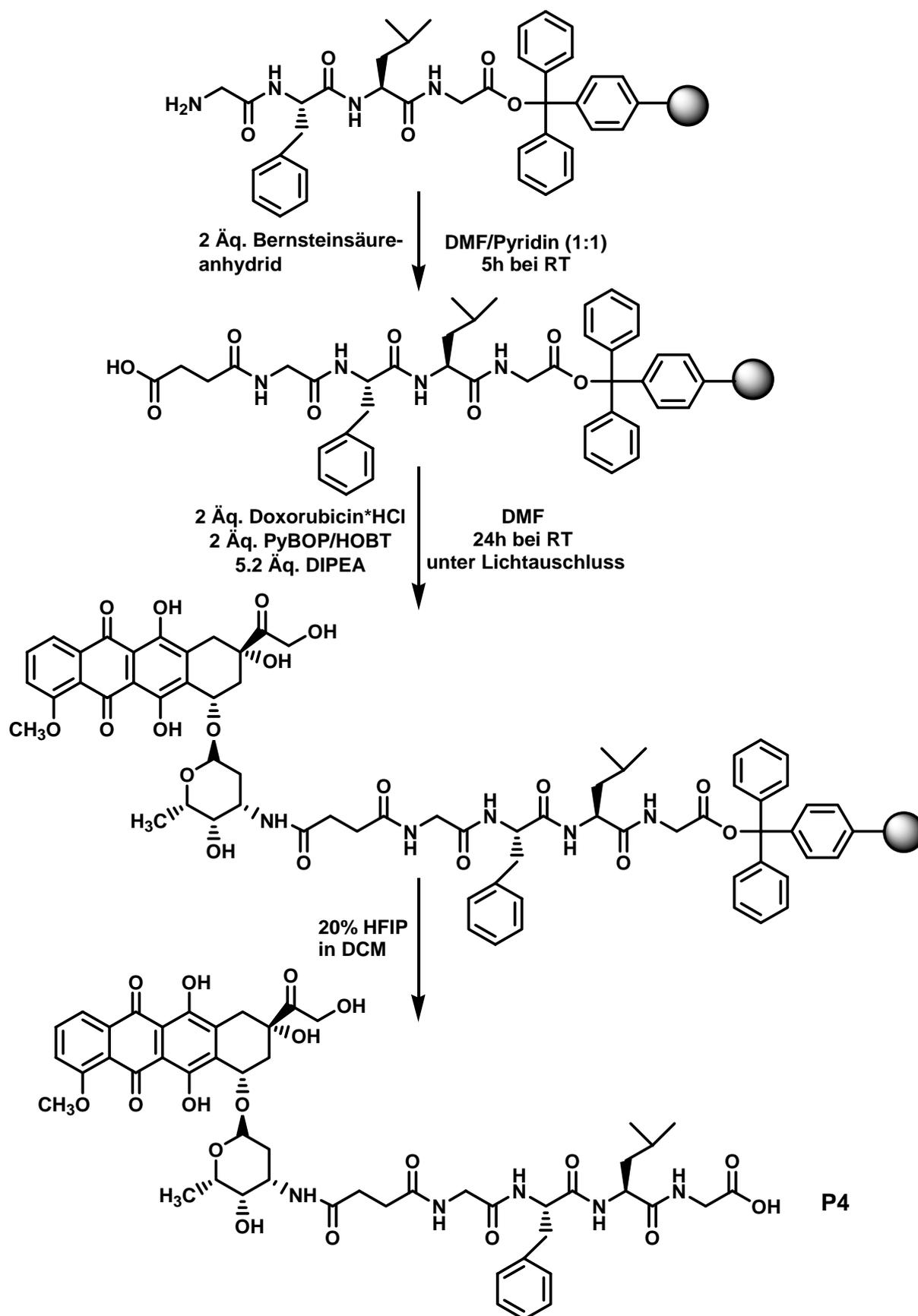


Abbildung 4-24 Syntheschema des zytostatisch aktiven Dox-GFLG-Linkers **P4**.

4.2.6 Testung der Reaktivität ausgewählter Kupplungsreagenzien

Bevor im letzten Schritt der Synthese die Endverbindung Dox-GFLG-[EMM]₇ erhalten werden soll, wurde mittels der Testverbindung **P1**^{*} (Fmoc-NH-GFLG-OH) die Reaktivität ausgewählter Kupplungsreagenzien in Lösung (siehe Abbildung 4-25) geprüft. Die Auswahl der Reagenzien geschah auf Grundlage eines Übersichtsartikels über Kupplungsreagenzien.^[122] Hierbei wurden die drei folgenden Klassen an Kupplungsreagenzien ausgewählt:

- Carbodiimid-Klasse (EDC)
- Uronium-Klasse (HOAT)
- Phosponium-Klasse (PyBOP)

Das Peptid Fmoc-NH-GFLG-OH (**P1**) schien auf Grund der Ähnlichkeit zu **P4** als Testsystem geeignet. **P1**^{*}, EDC und die sterisch gehinderten Base 2,4,6 Collidin wurden in Wasser voraktiviert und anschließend zum Protein [EMM]₇ (**E3**) gegeben. Die beiden weiteren Testreaktionen mit HATU/HOBT bzw. PyBOP/HOBT wurden analog, im trockenen Lösemittel DMF durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte jeweils durch Dialyse (MWCO 3000 g/mol) im wässrigen basischen Medium bei pH=10. Wegen des basischen Mediums wurde während der Aufreinigung die Fmoc-Schutzgruppe am *N*-Terminus abgespalten. Nach Lyophilisation konnten die Produkte mit MALDI-TOF-MS charakterisiert werden (siehe Abbildung 4-25).

Mit Hilfe der Aktivierung der Carboxylgruppe von [EMM]₇ mit EDC in Lösung erfolgte laut MALDI-TOF keine Umsetzung mit dem Testpeptid Fmoc-NH-GFLG-OH. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in der Hydrolyse des instabilen *O*-Acylisoharnstoffderivats (siehe Abbildung 4-26).

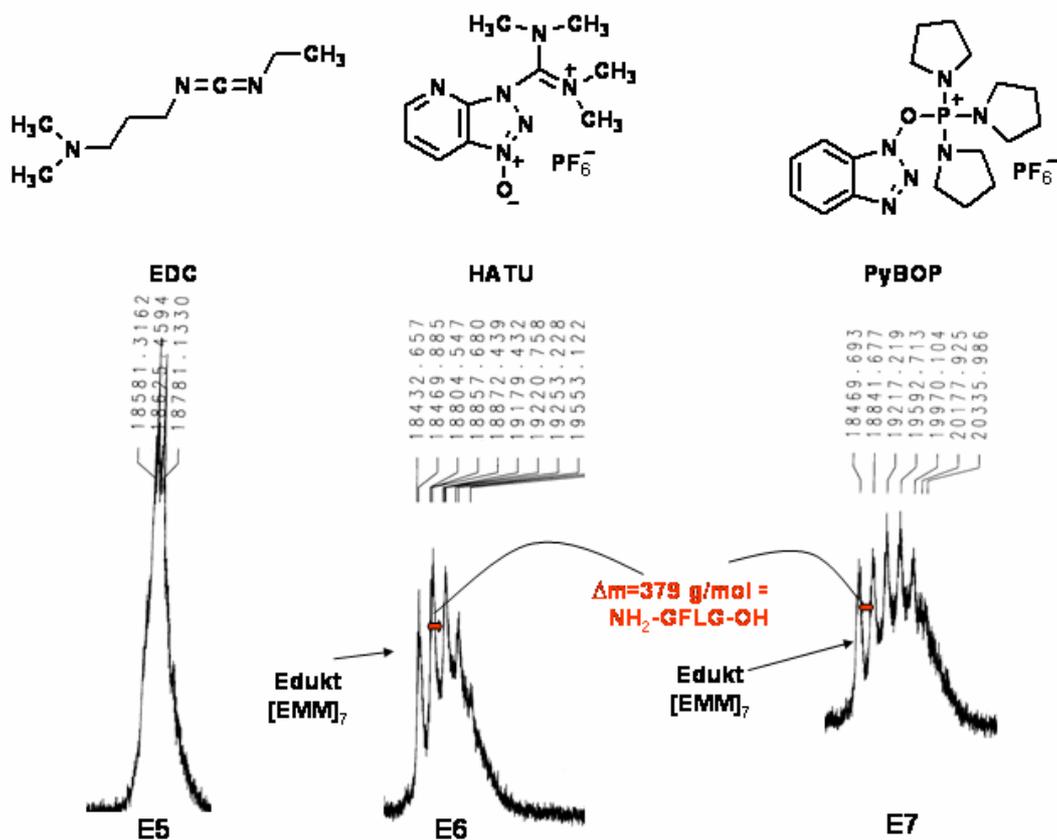


Abbildung 4-25 Ausschnitte aus den MALDI-TOF-Spektren im Reflektormodus der Testendverbindungen **E5-E7** (Matrix = α -Cyano-Hydroxy-Zimtsäure). Das jeweilig verwendete Kupplungsreagenz ist direkt oberhalb der MALDI-TOF-Spektren abgebildet.

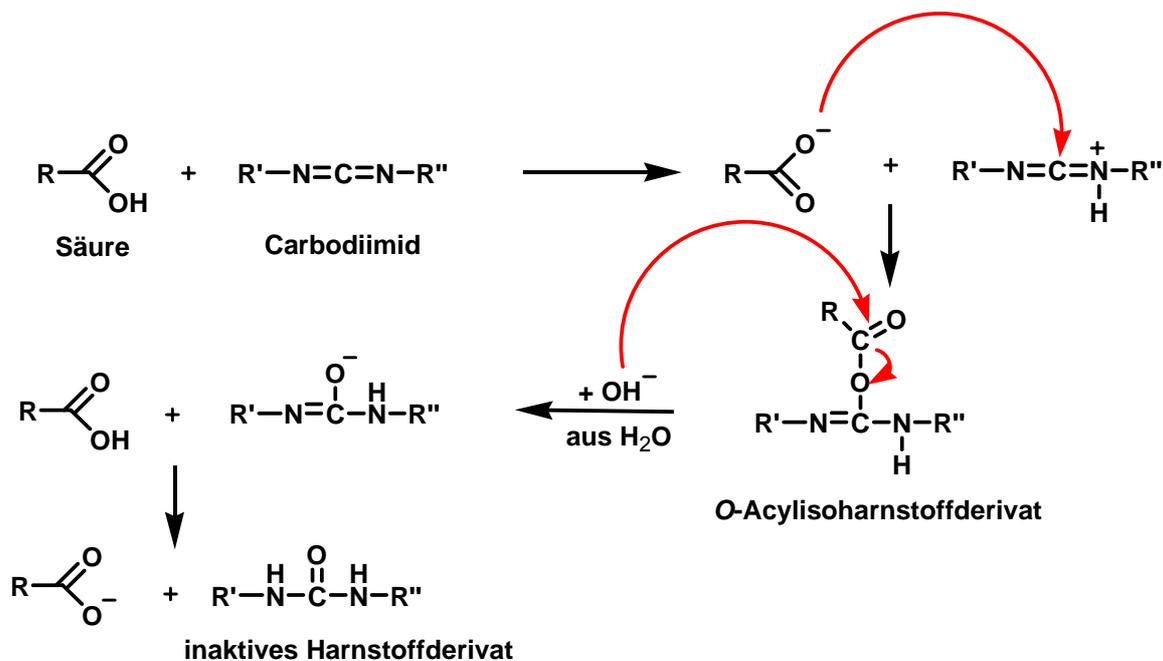


Abbildung 4-26 Vorgeschlagener Mechanismus der Hydrolyse von EDC in Wasser bei der Aktivierung einer Carboxylgruppe.

Die Aktivierung der Carboxylgruppen von [EMM]₇ mit HATU bzw. PyBOP und je HOBT verlief erfolgreich, laut MALDI-TOF-Analyse konnte eine Modifizierung der Glutaminsäure bestätigt werden. Die Vorteile dieser Kupplungsreagenzien liegen vor allem in der schnelleren Generierung (im Vergleich zu EDC) hochreaktiver Aktivester, die sich *in situ* bei kurzen Kupplungszeiten weiter umsetzen lassen. Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus, hier am Beispiel von PyBOP, führt über ein hochreaktives *O*-Acylphosphoniumderivat **C**, das sofort mit der Aminkomponente **E** unter Ausbildung der Amidbindung zum Säureamid **F** weiterreagiert (Abbildung 4-27).

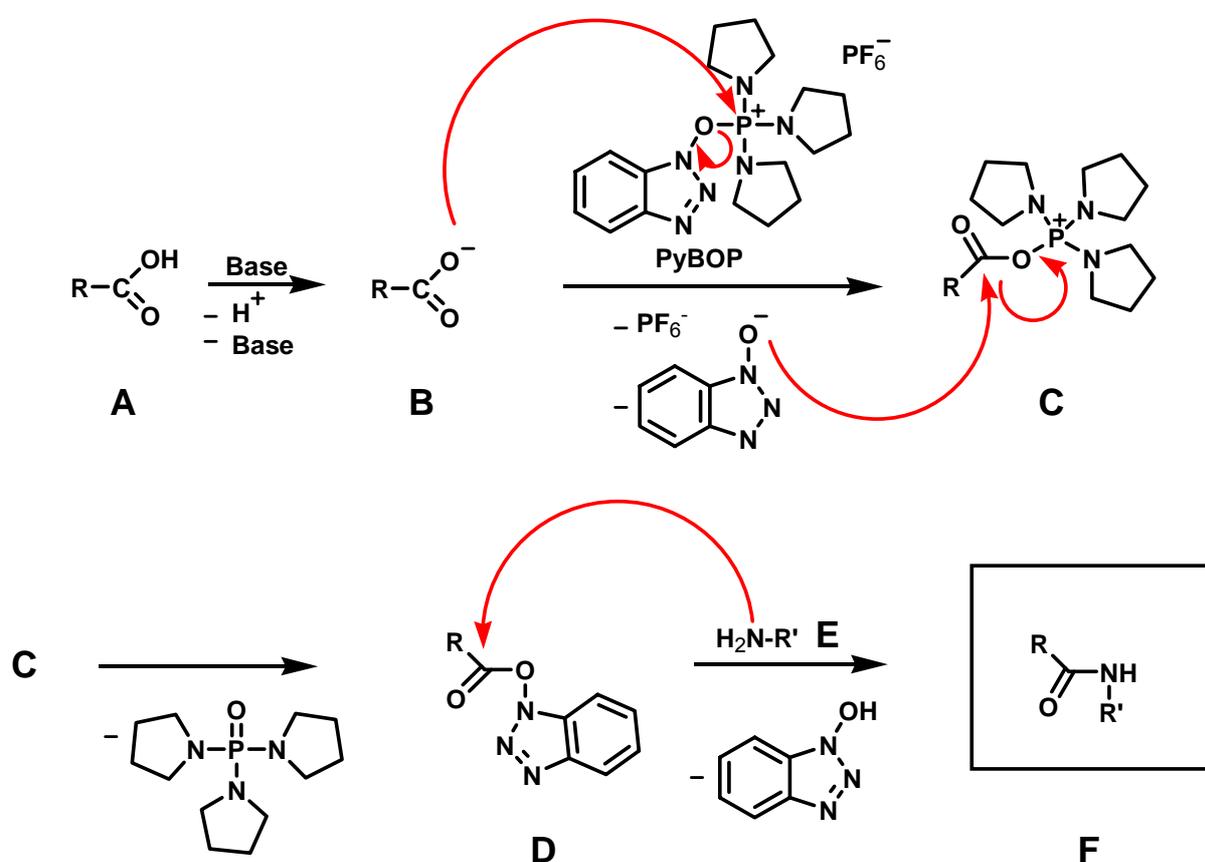


Abbildung 4-27 Vorgeschlagener Mechanismus der Carbonsäureaktivierung durch PyBOP: (A) Säurekomponente; (B) durch nicht nukleophile Base deprotonierte Säurekomponente; (C) reaktives *O*-Acylphosphoniumderivat; (D) Aktivester; (E) Aminkomponente, (F) Säureamid (Zielprodukt).

Die besten Kupplungserfolge konnten mit PyBOP/HOBT erzielt werden. Hier lassen sich bis zu fünf NH-GFLG-OH Testpeptide **P1** an das polymere Rückgrat von [EMM]₇ binden. Aus diesem Grund wurden in den nachfolgenden Kupplungen in

Lösung mit $[EMM]_7$ ausschließlich die Kupplungsreagenzien PyBOP/HOBT verwendet.

4.2.7 Synthese und Charakterisierung der Endverbindung RBITC-GFLG- $[EMM]_7$ (E8)

Zur Darstellung von RBITC-GFLG- $[EMM]_7$ (E8) konnten die Bedingungen der Testreaktion übernommen werden. Die Verbindung **P2** wurde mit PyBOP/HOBT und der schwachen Base Collidin in tr. DMF vorgelegt. Zur Bildung des Aktivesters wurde eine halbe Stunde gerührt, dann $[EMM]_7$ (E3) und der Rest an Collidin zugegeben. Die Reaktion benötigte 24 h und wurde unter Lichtausschluss durchgeführt (siehe Abbildung 4-28).

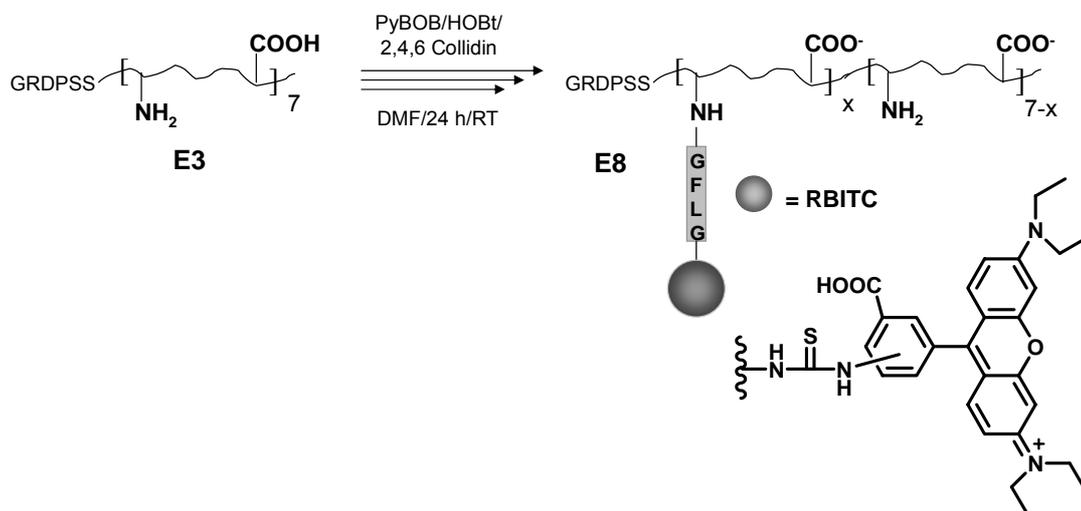


Abbildung 4-28 Schematische Darstellung der Synthese der Endverbindung: RBITC-GFLG- $[EMM]_7$ **E8**.

Die erfolgreiche Umsetzung zu RBITC-GFLG- $[EMM]_7$ konnte mit Hilfe von 1H -NMR bestätigt werden (Spektrum hier nicht gezeigt).

Das Ergebnis der NMR-Integration (4.3 von 8 möglichen Aminogruppen) über ausgewählte Peaks von $[EMM]_7$ und dem Rhodamin-Farbstoff RBITC (zur Bestimmung des Beladungsfaktors siehe Kapitel 4.2.5 auf Seite 63) wurde mit Hilfe der UV-Absorption des Rhodamin Farbstoffes bestätigt. Hierzu wurde eine Kalibriergerade von Rhodamin bei verschiedenen Konzentrationen aufgenommen und

anschließend ein Modifizierungsgrad von RBITC-GFLG-[EMM]₇ (**E8**) von 4.2 der 8 möglichen Aminogruppen bestimmt (53 %).

4.2.8 Synthese und Charakterisierung der Endverbindung Dox-GFLG-[EMM]₇ (**E9**)

Die Darstellung von Dox-GFLG-[EMM]₇ erfolgte vollkommen analog zu den vorhergehenden Reaktionsbedingungen in Kapitel 4.2.7.

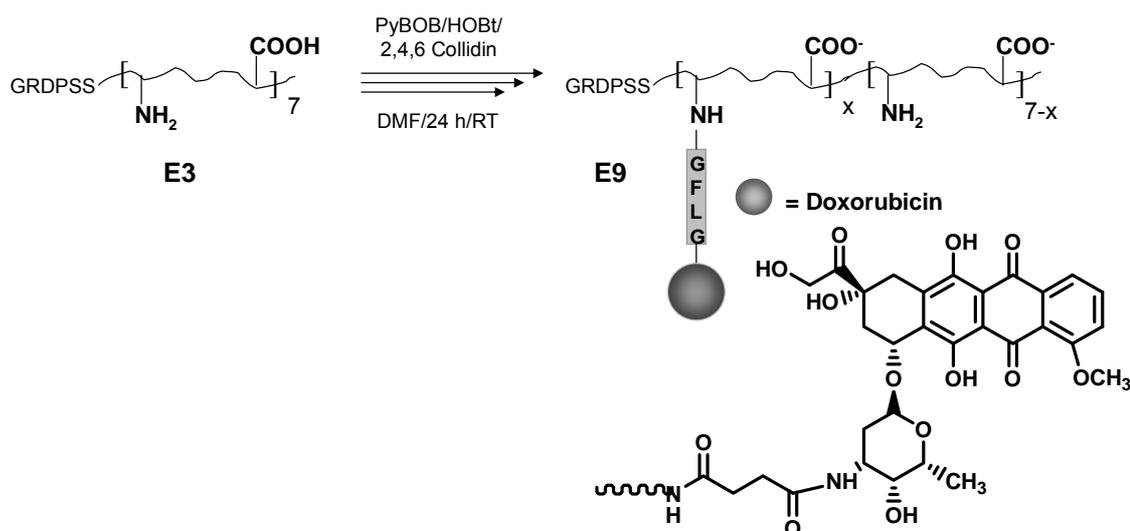


Abbildung 4-29 Schematische Darstellung der Synthese der Endverbindung Dox-GFLG-[EMM]₇ **E9**.

Die erfolgreiche Umsetzung zu **E9** konnte mit Hilfe von ¹H-NMR bestätigt werden, wobei ein Vergleichsspektrum von **E3** herangezogen wurde (siehe Abbildung 4-30). Vermessen wurden beide Spektren in deuteriertem DMSO.

Ein charakteristischer Peak im ¹H-NMR-Spektrum von **E9** ist das aromatische Multiplett Signal des Phenylalanins im GFLG-Linker im Bereich von 7.11-7.38 ppm. Die Zuordnung der Signale für Doxorubicin wurde durch Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Daten für Doxorubicin vorgenommen.^[131] Die Methyl-Protonen (im Spektrum mit 2 und 3 gekennzeichnet) des Dox-GFLG-Linkers (**P3**) sind bei 1.25 ppm zu sehen. Alle weiteren Signale des Konjugats Dox-GFLG-[EMM]₇ (**E9**) sind durch die Signale des polymeren Polypeptidrückgrats von [EMM]₇ überlagert.

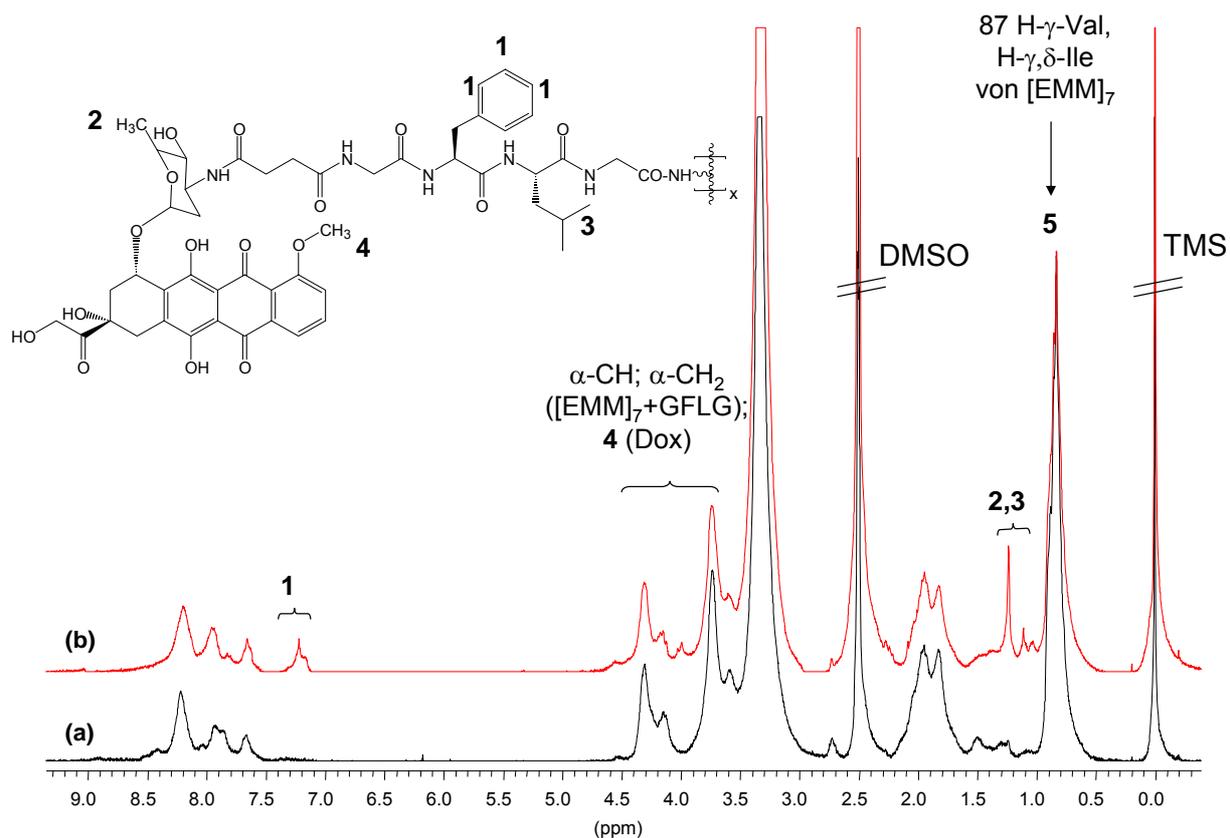


Abbildung 4-30 Vergleichende Darstellung der ^1H -NMR Spektren (300 MHz, 20 °C) von b) **E9** (Dox-GFLG-[EMM]₇ in rot) und a) dem Polypeptidrückgrat von **E3** ([EMM]₇ in schwarz) in DMSO-d₆, wobei ausgewählte Peaks zugeordnet wurden.

Ebenfalls konnte durch die ^1H -NMR-Spektroskopie der Beladungsfaktor bestimmt werden. Exemplarisch sei hier die Berechnung des Konjugationsverhältnisses in Abbildung 4-31 dargestellt. Peak 1 im Bereich von 7.11-7.38 ppm in Abbildung 4-30 entspricht den fünf aromatischen Protonen des Phenylalanins. Das Integral der Peaks im Bereich von 4.41-3.72 ppm wurde mit einem Wert von 78.7 bestimmt, wobei diesem Bereich die H α des Polypeptidrückgrats von **E3** (vgl. Tabelle 4-1 auf Seite 51), elf Protonen des Doxorubicin und sechs H α s des GFLG-Linkers zugeordnet werden konnten. Des Weiteren entspricht das Integral bei 0.85 ppm der Anzahl aller H- γ -Valin, H- γ,δ -Isoleucin von **E3**. Somit lässt sich der Beladungsfaktor aus der Anzahl der H-Atome eines [EMM]₇-Moleküls zu der Anzahl der H-Atome des jeweiligen Bereiches modifizierten [EMM]₇ bestimmen. Durch Integration ausgewählter Peaks von **P3** und **E3** konnte hier ein Beladungsfaktor von 4.9 (61 %) Dox-GFLG (**P3**) pro [EMM]₇ ermittelt werden.

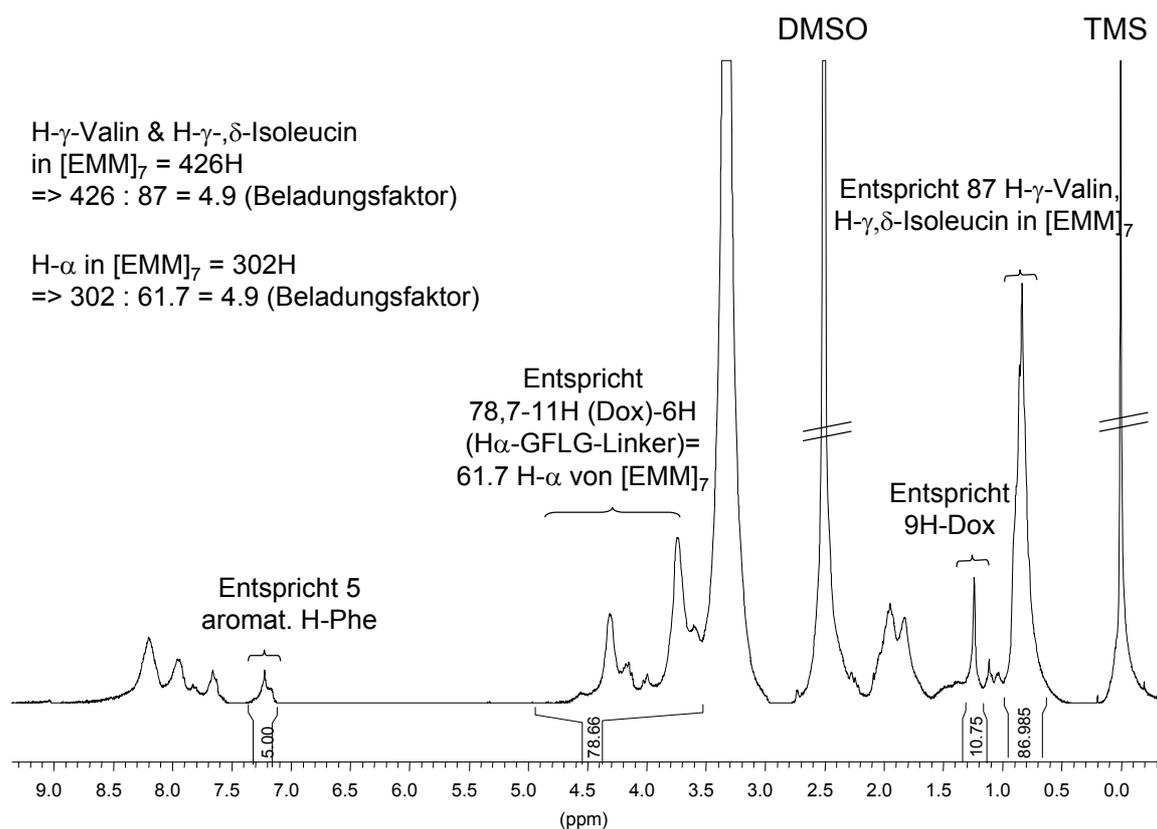


Abbildung 4-31 ¹H-NMR Spektrum zur Bestimmung des Beladungsfaktors von Dox-GFLG-[EMM]₇.

Mit dem Ziel das Ergebnis der NMR-Integration (4.9 von 8 möglichen Aminogruppen) von **E9** zu überprüfen, wurde mittels UV-Spektroskopie der Modifizierungsgrad ein weiteres Mal bestimmt. Mit Hilfe der UV-Spektroskopie konnte ein Beladungsfaktor von **E9** (Dox-GFLG-[EMM]₇) von 4.8 von 8 möglichen Aminogruppen bestimmt werden (60 %). Hierzu wurde eine Kalibriergerade von Doxorubicin mit verschiedenen Konzentrationen aufgenommen. Der Absorptionskoeffizient von Doxorubicin bei 495 nm entspricht dem Wert von 80000 cm⁻¹M⁻¹ und konnte mit einer Abweichung im Rahmen der Fehlergrenzen bestätigt werden.^[132]

Zusätzlich konnte von Verbindung **E9** ein 2D-TOCSY-NMR aufgenommen werden.

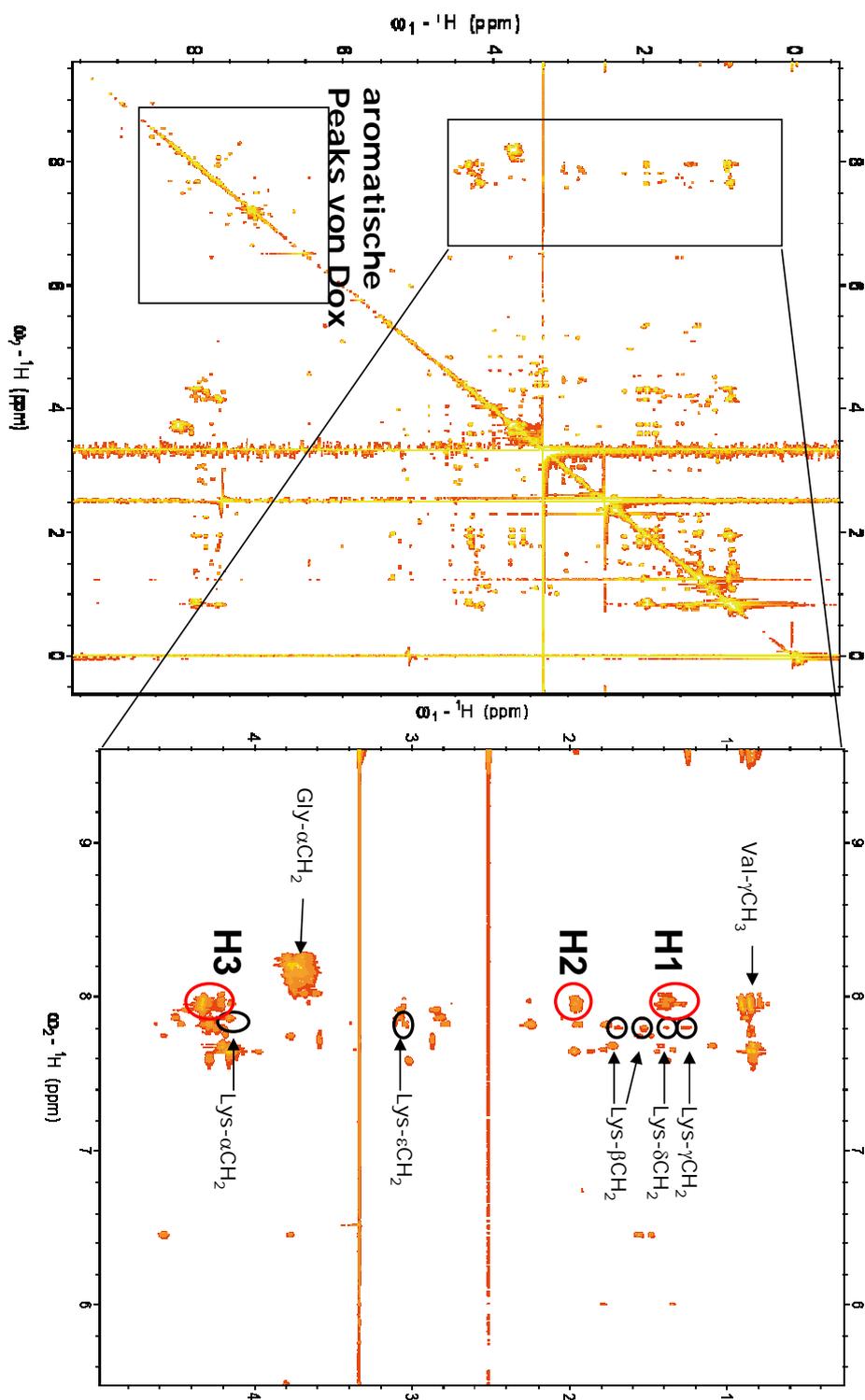


Abbildung 4-32 2D-TOSCY-NMR-Spektrum von **E9** (Dox-GFLG-[EMM]₇) in d₆-DMSO, 900 MHz, 20 °C mit ausgewählten Zuordnungen. Die rot gekennzeichneten Protonen H1, H2 und H3 werden in Tabelle 4-3 (nächste Seite) zugeordnet. Das Spektrum ist um 90° gedreht.

Anhand dieses Spektrums konnten weitere Peaks der Zuckereinheit des Doxorubicins zugeordnet werden (siehe Tabelle 4-3).

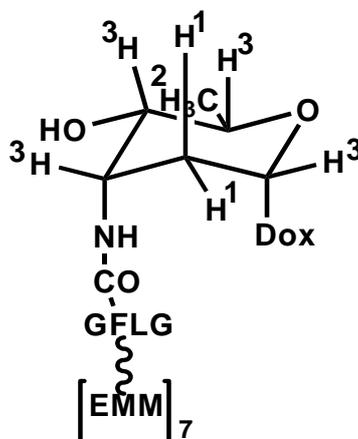


Tabelle 4-3 Zuordnung der chemischen Verschiebung ausgewählter chem. Gruppen der Zuckereinheit anhand des 2D-TOCSY-Spektrums von **E9** (Dox-GFLG-[EMM]₇) in ppm.

Atom (Anzahl der H-Atome)	δ (ppm) (Kreuzpeak mit 7.99)
H1 (2)	1.21
H2 (3)	2.01
H3 (4)	4.05 und 4.23

Die H3-Atome konnten nicht eindeutig den entsprechenden Peaks zugeordnet werden und wurden deshalb nicht getrennt aufgelistet.

Im Vergleich mit dem 2D-TOCSY-NMR von **E3** ([EMM]₇) (siehe Kapitel 4.1.5.2 auf Seite 48) fällt die geringere Intensität der Lysin-Peaks auf. Dies stellt einen deutlichen Hinweis für die Konjugation der Lysine mit den zytostatisch wirksamen Dox-GFLG-Linker dar. Durch die eingeschränkte Beweglichkeit der Lysin-Seitenkette erscheinen die Peaks wesentlich schwächer.^[133]

4.3 Synthese, Charakterisierung und biologische Evaluation zelladhäsiver [EMM]₇-Hydrogele

4.3.1 Synthesestrategie zur Darstellung der 1-1 Konjugate auf Basis von Cys-[EMM]₇

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit sollten 1-1 Konjugate auf der Basis von [EMM]₇ dargestellt werden. Hierzu erfolgte mit Hilfe biochemischer Methoden die Einführung einer Thiolgruppe durch eine Punktmutation im DNA-Strang (siehe Kapitel 4.1.2 auf Seite 40).

Der Aufbau derartiger 1-1 Konjugate erfolgte in drei Schritten:

- Schritt 1:** Darstellung des bioaktiven Liganden **P5** an der festen Phase
- Schritt 2:** Evaluierung einer geeigneten Kopplungsvariante mit Thiolverbindungen („Thiol-Ankergruppe“)
- Schritt 3:** Konjugation des bioaktiven Liganden mit reduzierten **E4** (Cys-[EMM]₇) in Lösung

4.3.1.1 Darstellung des bioaktiven Liganden und Wahl eines geeigneten Ankermoleküls

Die Synthese des linearen RGD-Peptids **P6** wurde unter Standardbedingungen der SPPS (siehe Kapitel 4.2.1) am Tritylchlorid-Polystyrol-Harz durchgeführt.



Die Verbindung **P6** konnte mit einer Ausbeute von 89 % und in hoher Reinheit gewonnen werden.

Im nächsten Schritt galt es eine geeignete Ankergruppe zur Konjugation mit Thiolen zu finden. In der Literatur findet man zwei Wege der chemoselektiven Ligation von Thiolen (siehe Abbildung 4-33).^[134]

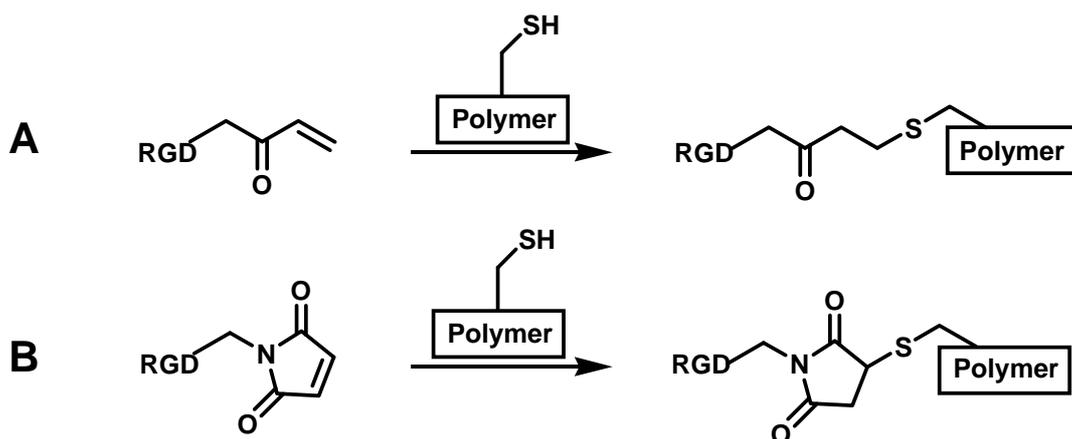


Abbildung 4-33 Chemoselektive Ligation mit Thiolen auf zwei unterschiedliche Wege: **A:** RGD-Acrylat mit Thiol funktionalisierten Polymer; **B:** RGD-Maleinimid mit Thiol funktionalisierten Polymer.

Zum einen können Thiol-funktionalisierte Polymere bzw. Proteine in einer Michael-Addition mit Acryl-Estern bzw. Acryl-Amiden verknüpft werden.^[135] Zum anderen können SH-Polymere mit Maleinimid-Gruppen unter milden Reaktionsbedingungen eine stabile Bindung eingehen.^[136-138]

Für die vorliegende Fragestellung wurde die Verankerung mittels eines heterobifunktionellen Maleinimidcarbonsäure-Linkers ausgewählt. Prinzipiell kann die Kupplung des Peptids **P6** an den Linker nach Abspaltung vom Harz oder noch an der Festphase durchgeführt werden. Wesentlicher Vorteil einer Synthese an der Festphase ist die unter geringem präparativen Aufwand mögliche Aufreinigung des Produktes.

Zur Darstellung von **P5** (Abbildung 4-34) wurde der Maleinimidcarbonsäure-NHS-Aktivester (aktivierte Säure) verwendet. Bei dieser Methode konnte auf die Zugabe der Kupplungsreagenzien verzichtet werden. Die Abspaltung vom Harz erfolgte mit Hexafluorisopropanol, wobei die permanenten Schutzgruppen bei dieser Methode nicht abgespalten werden. Die erfolgreiche Synthese von **P5** mit einer Ausbeute von 88 % konnte mittels ESI-Massenspektrometrie bestätigt werden.

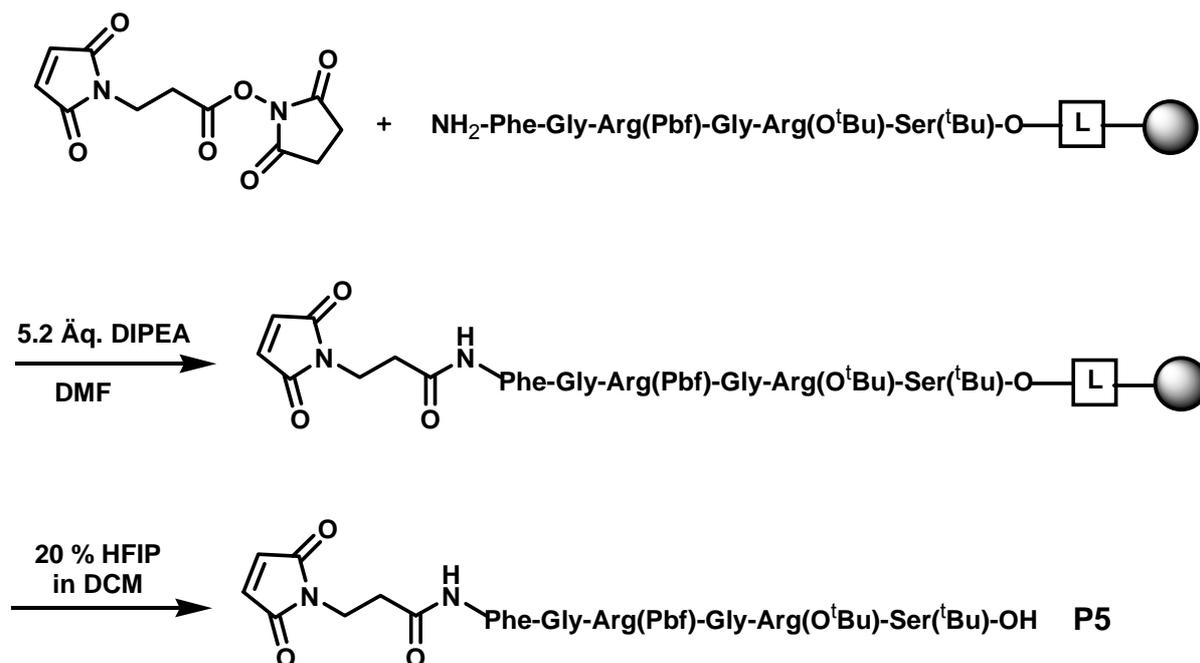


Abbildung 4-34 Schematische Darstellung der Synthese des Peptids **P5** mit Maleinimid.

4.3.1.2 Kupplung von **P5** mit Cys-[EMM]₇

Maleinimide reagieren bei neutralen pH-Werten (pH = 6.5-7.5) sehr spezifisch mit Thiolen. Bei höheren pH-Werten (pH ≥ 8.0) kann eine Hydrolyse der Maleinimide oder eine Reaktion mit Aminen auftreten.

Nach der Reduktion und Aufreinigung von Cys-[EMM]₇ (siehe Kapitel 4.1.6.2, Seite 53) konnte die gewünschte Verbindung **P5** bei einem pH-Wert von 6.8 über Nacht mit **E3** gekoppelt werden (siehe Abbildung 4-35).

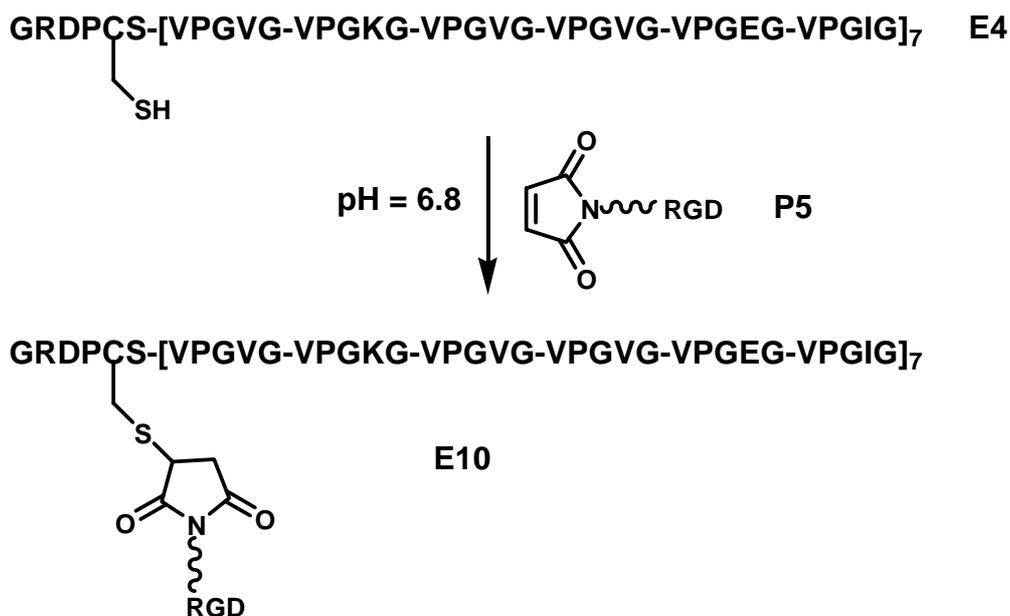


Abbildung 4-35 Schematische Darstellung der Synthese des 1-1 Konjugats **E10**.

Die Charakterisierung der Verbindung **E10** erfolgte durch MALDI-TOF-MS. Das bestimmte Molekulargewicht von 19501 Da stimmt gut mit dem theoretisch für **E10** erwarteten Wert von 19496 Da überein. Der Peak bei 18462 Da kann nicht umgesetztem **E3** Cys-[EMM]₇ zugeordnet werden (theoretisch erwarteter Wert: 18442 Da).

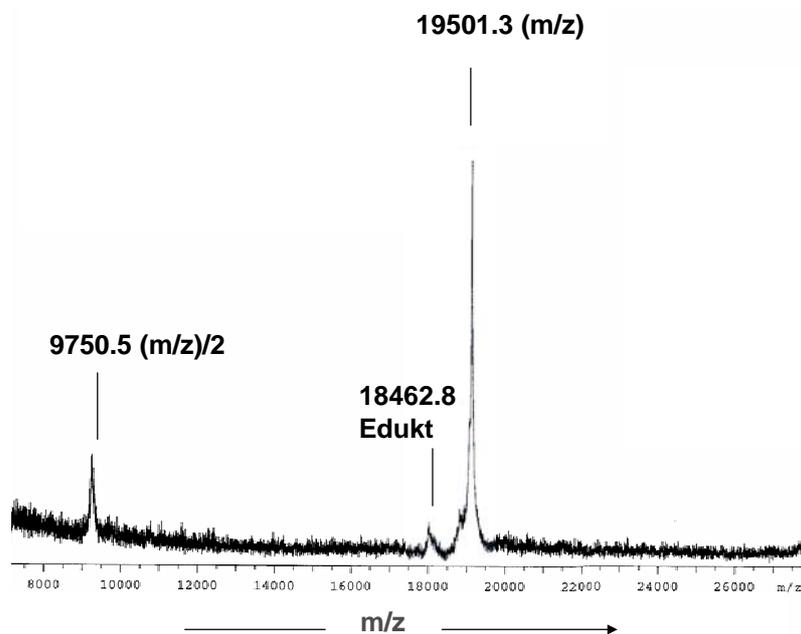


Abbildung 4-36 MALDI-TOF-Spektrum von **E10** im Reflektormodus (Matrix: α -Cyano-Hydroxy-Zimtsäure). Zu sehen ist der Produktpeak bei 19501g/mol bzw. 9750.5 (halbe Masse) und der Edukt-Peak von **E3** (Cys-[EMM]₇) bei 18462.8 g/mol.

4.3.2 Zwei unterschiedliche Synthesestrategien zur Darstellung von bioaktiven [EMM]₇ Hydrogelen

Zur Synthese bioaktiver Hydrogele können unterschiedliche Synthesewege beschrieben werden. Zum einen kann nach einer erfolgreichen BrCN-Spaltung die Vernetzung und dann die Kupplung mit bioaktiven Liganden durchgeführt werden. Zum anderen kann der Weg B beschrieben werden, in dem anfangs die Amino-Funktion maskiert wird, gefolgt von der Kupplung mit RGD und der Vernetzung (siehe Abbildung 4-37).

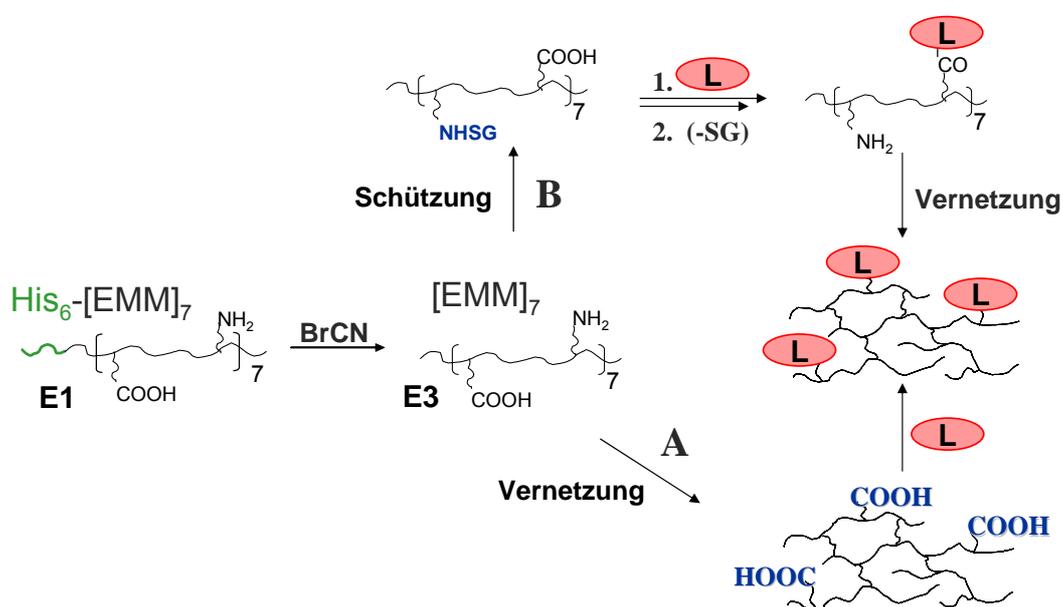


Abbildung 4-37 Schematische Darstellung zur Synthesestrategie von bioaktiven Hydrogelen auf der Basis von [EMM]₇. L = bioaktiver Ligand (z.B. lineares RGD: NH₂-GRGDSF, zyklisches RGD: NH₂-c(RGDfK)).

Die Vorteile der Syntheseroute B sind einerseits die Möglichkeit der Charakterisierung eines jeden Zwischenschritts, andererseits kann durch eine geschickte Wahl der Schutzgruppen die Entschützung des Polypeptidrückgrats [EMM]₇ und der bioaktiven Liganden in einer Stufe erfolgen.

Der Vorteil des Syntheseweges A ist ein Arbeiten ohne Schutzgruppen und somit die Einsparung zweier Syntheseschritte, nämlich der Schützung und Entschützung. Allerdings kann hier keine direkte Analytik zur Charakterisierung der

Endverbindungen durchgeführt werden. Nur biologische Testsysteme lassen einen Rückschluss auf eine erfolgreiche Synthese zu.

Alle weiteren Schritte der Syntheseplanung werden im Folgenden kurz für Syntheseweg B aufgelistet. Im Fall A entfallen die Schritte der Schützung und Entschützung von **E3** [EMM]₇:

- Schritt 1:** Darstellung der geschützten bioaktiven Liganden an der festen Phase
- Schritt 2:** Wahl einer geeigneten Strategie (Fmoc bzw. Boc) zur Maskierung der Amino-Funktion im polymeren Rückgrat [EMM]₇
- Schritt 3:** Konjugation des geschützten bioaktiven Liganden mit [EMM]₇ in Lösung (bzw. nach einer Variante an der festen Phase siehe Kapitel 4.3.7 auf Seite 89)
- Schritt 4:** Entschützung des bioaktiven Liganden und des [EMM]₇-Grundgerüsts
- Schritt 5:** Vernetzung der freien Lysin-Seitenketten zum Hydrogel

4.3.3 Synthese der geschützten bioaktiven Liganden an der Festphase

Die Synthese der bioaktiven Liganden erfolgte auf der Basis der Festphasensynthese (Kapitel 4.2.1 auf Seite 55). Hierbei konnten unter Standardbedingungen (2 Äq. AS, 2 Äq. HOBT/TBTU, 5.2 Äq. DIPEA in tr. DMF) die in Abbildung 4-38 gezeigten RGD-Sequenzen dargestellt werden. Die Peptide wurden mit ESI-MS charakterisiert und konnten ohne weitere Aufreinigung für die Kupplung in Lösung mit **E3** eingesetzt werden.

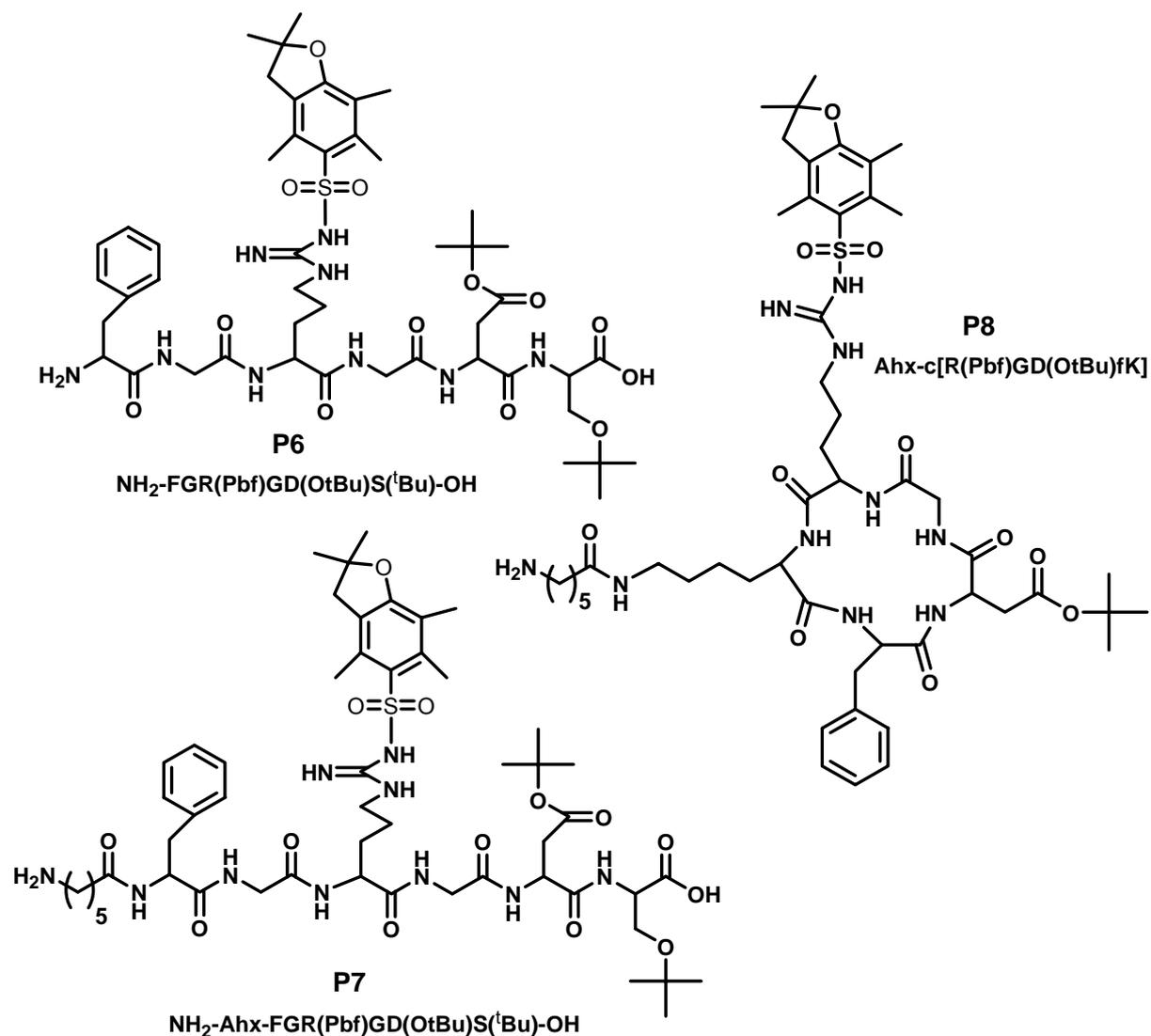


Abbildung 4-38 Synthetisierte bioaktive „RGD“-Verbindungen **P6**, **P7** und **P8** (wurde von *J. Auernheimer* zur Verfügung gestellt).

4.3.4 Fmoc- und Boc- Schützungen von [EMM]₇

4.3.4.1 Synthese und Charakterisierung von Fmoc-[EMM]₇

Eine der bekanntesten und ältesten Schutzgruppen für freie Amine ist die Fmoc-Gruppe.^[139] Die Einführung der Fmoc-Aminoschutzgruppe erfolgt üblicherweise mit 9-Fluorenylmethylcarbonylchlorid (Fmoc-Cl). Hierzu wurden analog einer Prozedur von *Carpino* und *Chan* die freien Aminogruppen des Proteins **E3** im basischen Milieu (wässrige Na₂CO₃-Lösung) mit Fmoc-Cl in Dioxan bei 0 °C umgesetzt (siehe Abbildung 4-39). Die Reaktionszeit wurde abweichend von der Literaturstelle auf 12 h

erhöht. Das Fmoc-geschützte [EMM]₇ konnte so in guten Ausbeuten von 81 % isoliert werden.

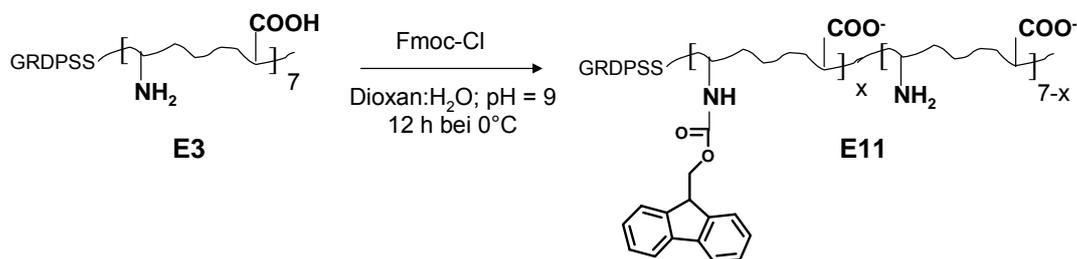


Abbildung 4-39 Schematische Darstellung der Synthese von **E11** (Fmoc-[EMM]₇).

Die Charakterisierung von Fmoc-[EMM]₇ (**E11**) erfolgte über UV- und ¹H-NMR-Spektroskopie. Die UV-Absorptionsmaxima von Fmoc liegen typischerweise bei 289 und 298 nm. Bei gleicher Wellenlänge trat bei Verbindung **E3** keine Absorption auf. Um eine Quantifizierung von Fmoc-Gruppen im Protein zu ermöglichen, wurde zunächst eine Kalibriergerade mit verschiedenen Konzentrationen von Fmoc-Cl in DMF aufgenommen. Aus dem so erhaltenen Zusammenhang zwischen Konzentration und Absorption sollte die Zahl der Fmoc-Gruppen pro Molekül festgestellt werden. Die abschließende Messung von **E11** ergab, wie bereits von *Fiedler*^[140] und *Ehrmann*^[141] nachgewiesen, eine erfolgreiche Schützung von 5.4 der 8 möglichen Aminofunktionen (68 %).

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde ebenfalls ein ¹H-NMR Spektrum aufgenommen. Im Vergleich der Spektren von Fmoc-[EMM]₇ und [EMM]₇, sowie Spektren von Fmoc-Cl und Fmoc-Valin, konnte eine genaue Zuordnung der neuen Signale durchgeführt und die Schutzgruppeneinführung bestätigt werden (siehe Abbildung 4-40). Der Schützungsgrad wurde über das Integralverhältnis des neuen Fmoc-Signals zu den Signalen der H- α s bzw. des Signals bei 0.88 ppm von [EMM]₇ errechnet und betrug 65 %, was einem Verhältnis von 5.2 verglichen zu 8 entspricht. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit dem Resultat (68 %) der UV-Spektroskopie überein.

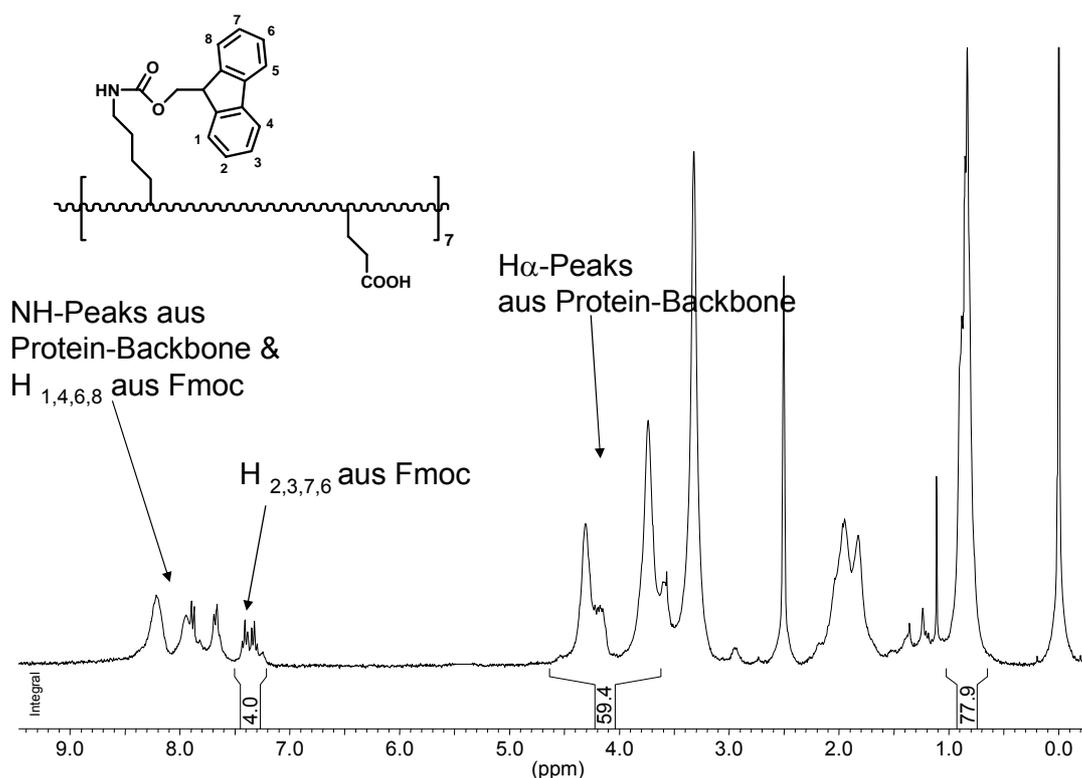


Abbildung 4-40 ¹H-NMR-Spektrum von **E11** (Fmoc-[EMM]₇) in d₆-DMSO und TMS als Referenzsubstanz.

4.3.4.2 Synthese und Charakterisierung von Boc-[EMM]₇

Eine weitere häufig verwendete Aminoschutzgruppe stellt die Boc-Gruppe dar. Die Einführung der Boc-Schutzgruppe erfolgte analog einer literaturbekannten Vorschrift mit Boc-Anhydrid (Boc₂O). In wässriger NaOH-Lösung wurden die freien Aminofunktionen des Proteins **E3** mit einem Überschuss an Boc-Anhydrid in Dioxan unter Eiskühlung umgesetzt.^[142]

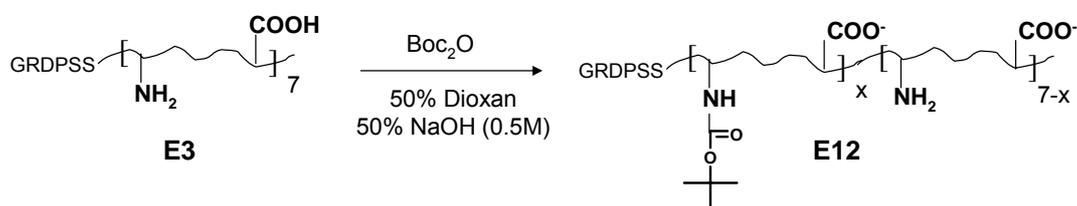


Abbildung 4-41 Schematische Darstellung der Synthese von **E12** Boc-[EMM]₇.

Die Reaktionsmischung konnte mittels Dialyse bzw. Größenausschluss-Chromatographie gereinigt werden. Die Ausbeuten dieser Reaktion lagen bei 88 %.

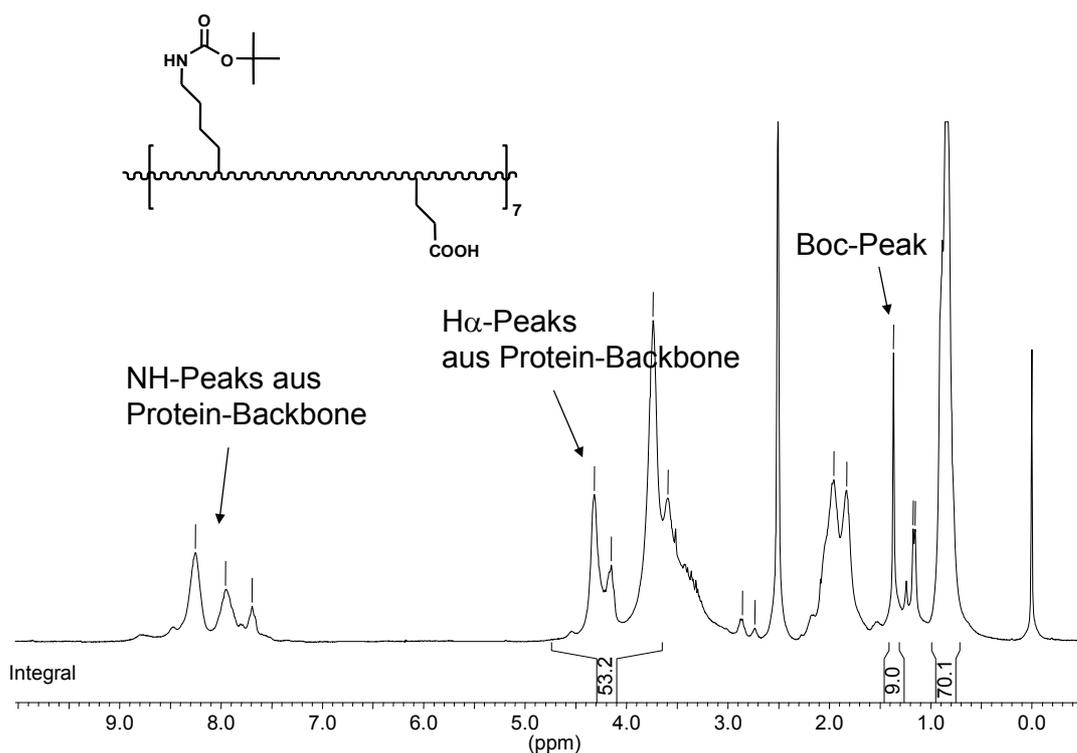


Abbildung 4-42 ¹H-NMR-Spektrum von **E12** (Boc-[EMM]₇) in d₆-DMSO und TMS als Referenzsubstanz.

Die Charakterisierung von Boc-[EMM]₇ erfolgte mit Hilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie. Der eingeführten Boc-Schutzgruppe konnte hierbei eindeutig ein Signal bei 1.33 ppm zugeordnet werden. Der Schützungsgrad lässt sich somit über das Integralverhältnis des neuen Boc-Signals zu den Signalen der H- α s bzw. den Signalen von Val_{1,2} γ -CH₃ und Ile δ -CH₃ bei 0.88 ppm von [EMM]₇ errechnen. Da die Boc-Schutzgruppe neun Protonen besitzt konnte ein Schützungsgrad im Protein **E12** von 74 % ermittelt werden, was im Mittel einem Verhältnis von 5.9 geschützten Aminofunktionen zu 8 möglichen Funktionen entspricht.

4.3.5 Synthese der biologisch aktiven Hydrogele auf der Basis von Syntheseweg A

Zur Vernetzung der Aminofunktionen von [EMM]₇ konnte bereits von *Junger* und *Fiedler* ein geeigneter *crosslinker*^{XIII} (BS₃) gefunden werden, sowie die Versuchsbedingungen optimiert werden (Abbildung 4-43).^[140,143]

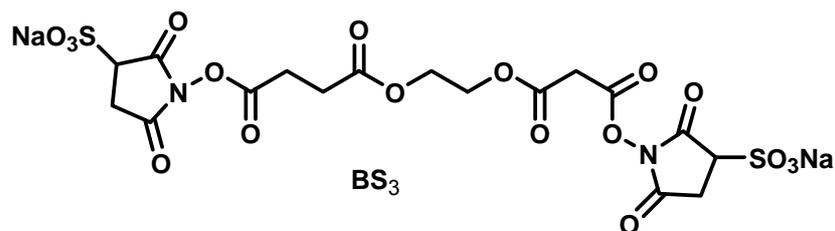


Abbildung 4-43 Darstellung der chemischen Struktur des verwendeten *crosslinkers* Bis(Sulphosuccinimidyl)Suberat (BS₃).

Nach der Vernetzung und Aufreinigung von **E3** mit BS₃ in DMF, erfolgte die Voraktivierung der freien Carboxylgruppen des Hydrogels **V1** mit PyBOP/HOBT und Collidin in DMF. Anschließend wurde das geschützte lineare Peptid **P6** zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 24 h und der Aufreinigung des Hydrogels wurden die säurelabilen Schutzgruppen von **P6** mittels TFA entschützt. Nach erneuten Waschschrinen zur Aufreinigung erfolgte letztendlich der Lösemittelwechsel zu H₂O (siehe Abbildung 4-44).

^{XIII} „*crosslinker*“ stammt aus dem Englischen und bedeutet „Quervernetzter“.

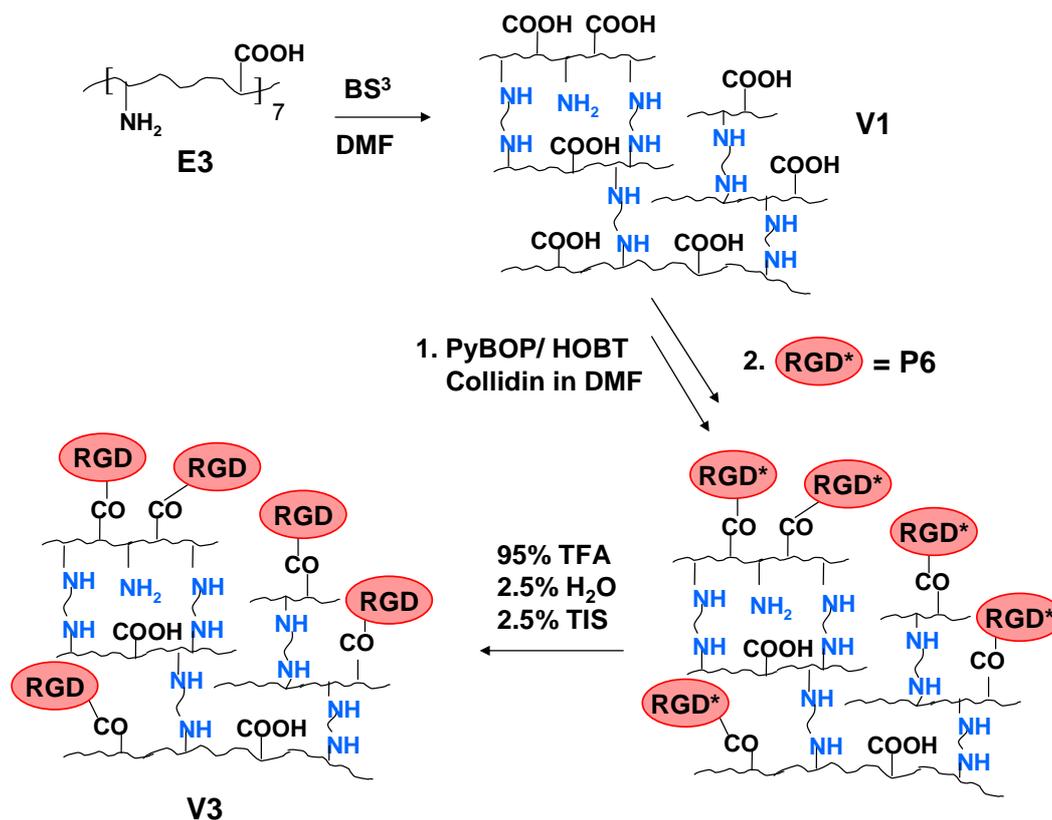


Abbildung 4-44 Schema zur Synthese des bioaktiven Hydrogels **V3** nach Synthesestrategie A.

Die Charakterisierung der Probe **V3** erfolgte anschließend an Hand von Zelltests (siehe Kapitel 4.4.2 auf Seite 91).

4.3.6 Synthese der biologisch aktiven Hydrogele auf der Basis von Syntheseweg B

Zur Herstellung bioaktiver Hydrogele wurden im Fall des Syntheseweges B zwei verschiedene Schutzgruppenstrategien angewandt.

- Fmoc-Schützung von $[\text{EMM}]_7$ (**E11**) (siehe Kapitel 4.3.4.1 auf Seite 80)
- Boc-Schützung von $[\text{EMM}]_7$ (**E12**) (siehe Kapitel 4.3.4.2 auf Seite 82)

Anfangs wurde die Maskierung der Lysinseitenkette ausschließlich mit Fmoc untersucht, da sich die Boc-Entschützung von **E12**, untersucht im Rahmen einer Diplomarbeit (*A. Fiedler*), als schwierig herausstellte.^[140]

Der erste Schritt der Synthese umfasste die Schützung der Aminofunktion mit Fmoc analog Kapitel 4.3.4.1. Im zweiten Schritt erfolgte die Kopplung geschützter

RGDs (**P6**) mit **E3** in Lösung unter optimierten Reaktionsbedingungen (vgl. Kapitel 4.2.6 auf Seite 65). Anschließend mussten jeweils die säurelabilen Schutzgruppen von **P6** und die basenlabile Fmoc-Gruppe abgespalten werden. Der letzte Schritt umfasste schließlich die Vernetzung des modifizierten $[\text{EMM}]_7$ mit BS_3 (siehe Abbildung 4-45).

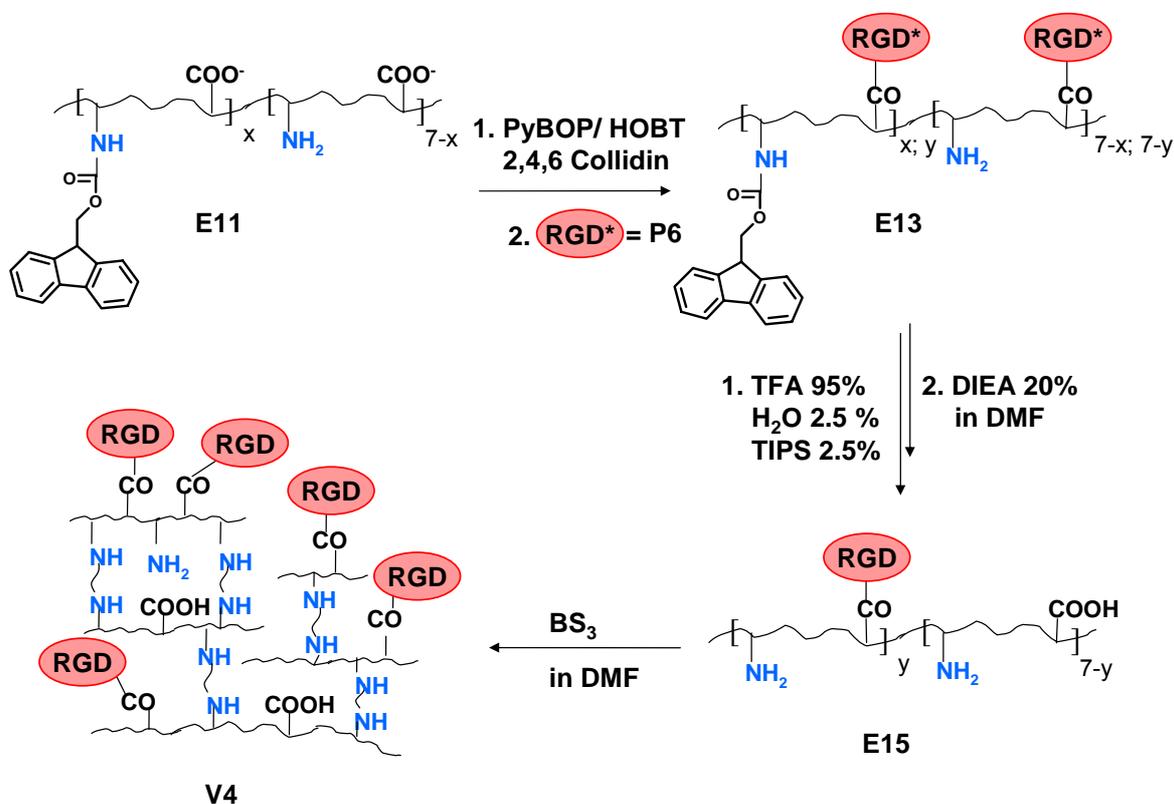


Abbildung 4-45 Schema zur Synthese des bioaktiven Hydrogels **V4** unter Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe nach Synthesestrategie B.

Die Verbindung **V4** konnte mit Hilfe dieser Strategie erfolgreich synthetisiert werden. Wobei alle Zwischenstufen (**E11**, **E13**, **E14** und **E15**) der Synthese über ^1H -NMR-Spektroskopie analysiert werden konnten. Der Beladungsfaktor betrug nach ^1H -NMR Messungen 64 % (5.1 von 8 möglichen Gruppen).

Bei der Wahl der Boc-Schützung der Aminofunktionen wird ein Syntheseschritt weniger durchlaufen. Allerdings musste die von *A. Fiedler* benutzte Methode (50 % TFA-Lösung) variiert werden (95 % TFA, 2.5 % H_2O , 2.5 % TIPS-Lösung), um eine erfolgreiche Abspaltung der Amino-Maskierung zu gewährleisten. Mit Hilfe von ^1H -NMR konnte die Entschützung durch das Verschwinden des Boc-Peaks bei 1.33 ppm bestätigt werden (Spektrum hier nicht gezeigt).

Somit gelang es ebenso, wie mit der Fmoc-Schützung auch, auf Grundlage der Boc-Strategie nach Syntheseweg B bioaktive Hydrogele zu synthetisieren. Der erste Schritt der Synthese umfasste die Maskierung der Aminofunktion mit Boc-anhydrid analog Kapitel 4.3.4.2 (Seite 82). Im zweiten Schritt erfolgte die Kupplung geschützter RGDs (**P6**, **P7** und **P8**) mit **E3** in Lösung unter optimierten Reaktionsbedingungen (vgl. Kapitel 4.2.6 auf Seite 65). Abschließend wurden die säurelabilen Schutzgruppen von den RGD-Peptiden sowie vom **E12** in einem einzigen Schritt abgespalten (siehe Abbildung 4-46).

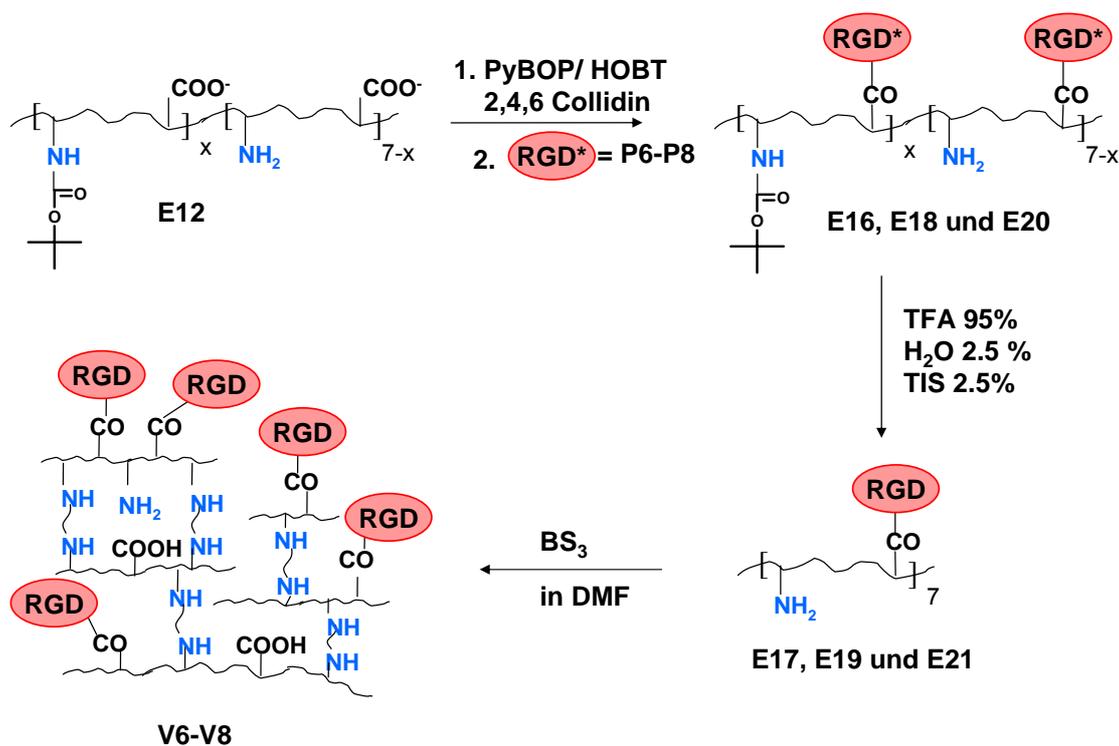


Abbildung 4-46 Schema zur Synthese bioaktiver Hydrogels **V6-V8** unter Verwendung der Boc-Schutzgruppe nach Synthesestrategie B.

Mit Hilfe dieser Strategie konnten die in Abbildung 4-47 dargestellten RGD-Elastine **E17**, **E19** und **E21** dargestellt werden. Die unterschiedlichen Beladungsfaktoren sind durch einen höheren Überschuss an Verbindung **P6** (3 Äquivalente) zur Kupplung zu erklären. Die Charakterisierung und die Bestimmung des Beladungsfaktors erfolgte über ¹H-NMR-Spektrometrie. Exemplarisch ist hier das Spektrum von Verbindung **E21** in Abbildung 4-48 gezeigt.

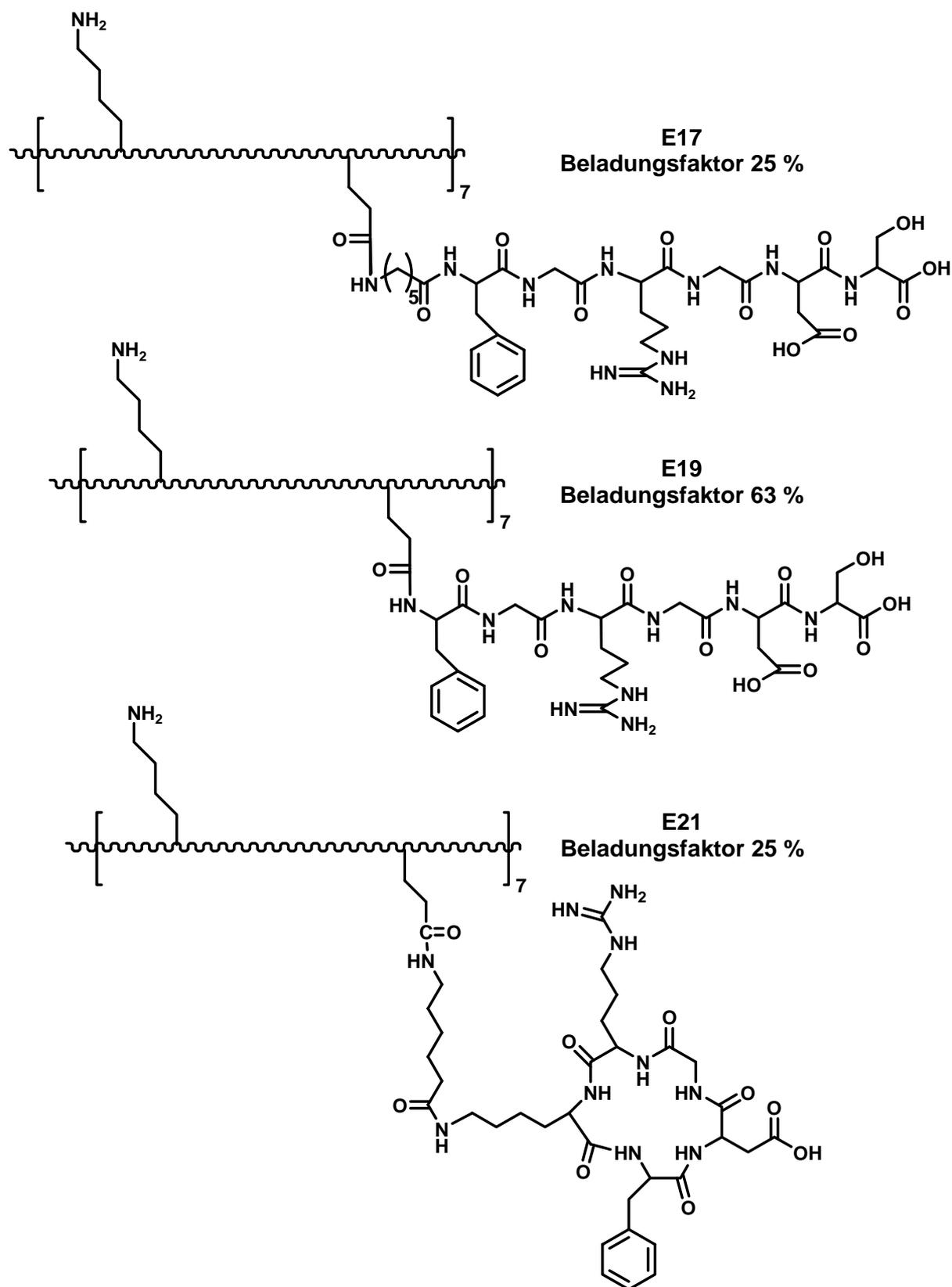


Abbildung 4-47 Schematische Darstellung synthetisierter RGD-[EMM]₇-Verbindungen **E17**, **E19** und **E21**.

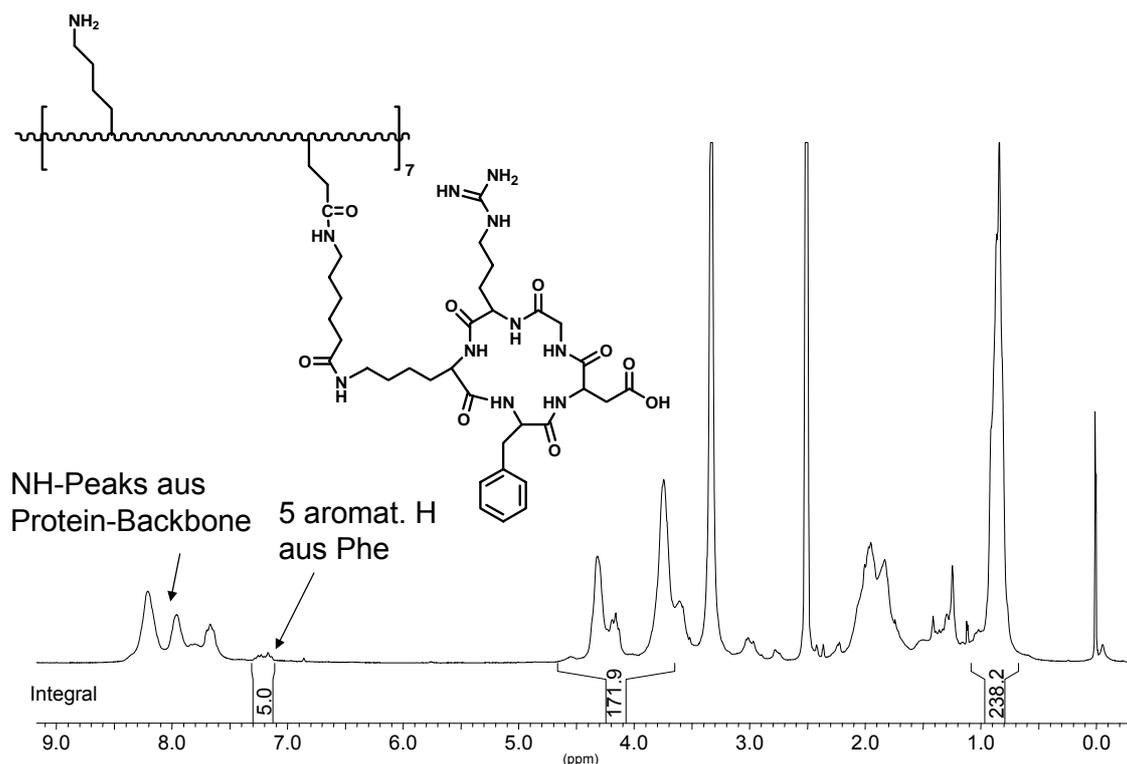


Abbildung 4-48 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **E21** in d_6 -DMSO und TMS als Referenzsubstanz.

Der letzte Schritt umfasste schließlich die Vernetzung der modifizierten $[\text{EMM}]_7$ -Verbindungen **E17**, **E19** und **E21** mit BS_3 und resultiert in den Hydrogelen **V6-V8**.

4.3.7 Variante der Syntheseroute B zur Darstellung von bioaktiven Hydrogelen

Ein weiterführender Gedanke zur Synthese der zelladhäsiven Hydrogele erschloss sich aus der Tatsache, dass alle linearen RGDs eigenständig an der festen Phase synthetisiert wurden. Die Idee bestand in der Kupplung geschützter RGDs und **E12** an der festen Phase (Variation im Schritt 3 der Syntheseplanung, siehe Kapitel 4.3.2 auf Seite 78). Die Vorteile dieses Syntheseweges sind zum einen die leichte Aufreinigung, zum anderen erhält man ausschließlich modifiziertes $[\text{EMM}]_7$, da unmodifiziertes $[\text{EMM}]_7$ einfach durch Filtration entfernt werden kann (siehe Abbildung 4-49).

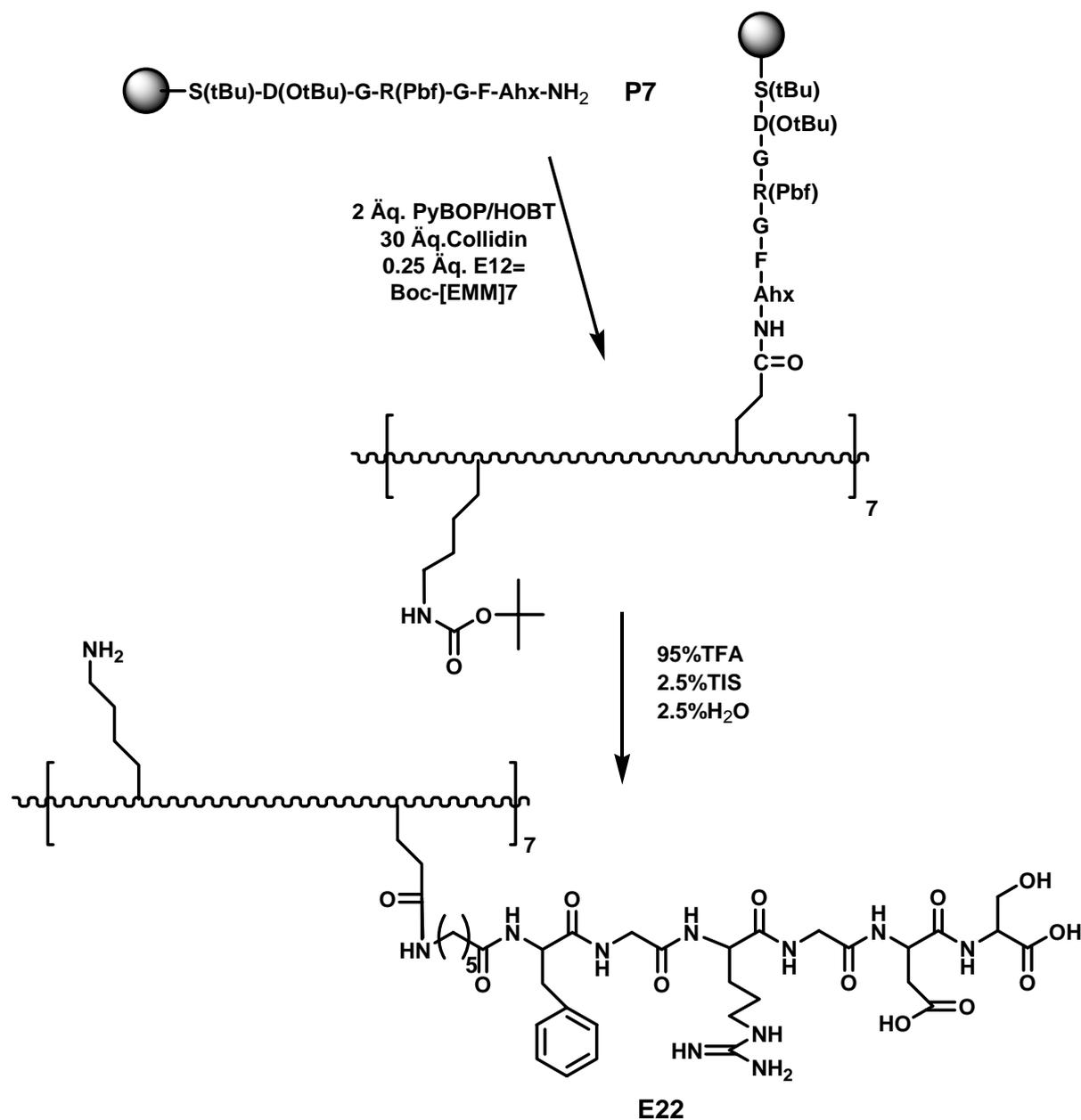


Abbildung 4-49 Schematische Darstellung der Synthese von **E22** an der festen Phase. Das Peptid **P7** wurde durch Standard-SPPS aufgebaut.

Auf Grund großer Löslichkeitsprobleme und schlechter Ausbeuten von 5 % konnte nur Verbindung **E22** am Harz erfolgreich synthetisiert werden. Die Charakterisierung von **E22** erfolgte mittels ¹H-NMR (Spektrum hier nicht gezeigt). Es konnte ein Beladungsfaktor von 50 % berechnet werden.

Die weiteren Schwierigkeiten dieser Variante bestanden in einem hohen Verbrauch an **E12** (Boc-[EMM]₇) (36 mg), da hier **E12** im Überschuss zugesetzt werden musste.

4.4 Biologische Evaluierung bioaktiver [EMM]₇-Hydrogele

4.4.1 Bestimmung der Zahl adhärenter Zellen

Die Wirksamkeit der einzelnen Beschichtungen wurde in der vorliegenden Arbeit durch Adhäsionsversuche an der Mausosteoblasten Zelllinie EC3T3-E1 überprüft. Die Anzahl der adhärenter Zellen wurde dabei durch die Aktivität des lysosomalen Enzyms Hexosaminidase (β -N-Acetyl-D-hexosaminide-N-acetylhexosaminohydrolase) bestimmt. Hexosaminidase spaltet von *p*-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucoseaminid die Nitrophenolgruppe ab, die Menge an freiem Nitrophenol kann dann anschließend photometrisch gemessen werden. Da die Hexosaminidase-Aktivität proportional zur Zellzahl ist, kann so mit Hilfe einer Standardkurve die Zahl adhärenter Zellen bestimmt werden.^[144]

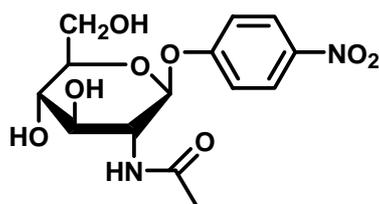


Abbildung 4-50 Struktur von *p*-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucoseaminid.

4.4.2 Biologische Evaluierung der Hydrogele V1, V2, V3 und V4

In Zusammenarbeit mit *Gabi Chmel* (Lehrstuhl für Biophysik (E22), Department Physik, TUM) wurden erste Zelladhäsionstests mit den vernetzten Hydrogelen **V1**, **V2**, **V3** und **V4** durchgeführt. Sie dienten unter anderem dazu zelladhäsive [EMM]₇-Hydrogele, hergestellt über Syntheseroute B, erstmals zu charakterisieren. Im Rahmen der biologischen Evaluierung wurde ein Nullwert (Blank), eine Blindprobe **V1** (vernetztes [EMM]₇), eine Probe mit vernetzten [EMM]₇ und **P6** jedoch ohne Kupplungsreagenzien (**V2**), zur Untersuchung einer adsorptiven Wechselwirkung, **V3** (Syntheseroute A) und **V4** (Syntheseroute B) getestet. Es stellte sich heraus, dass die vernetzten Hydrogele **V1-V3** keine Adhäsion der Mausosteoblasten-Zelllinie hervorrufen. Im Gegenteil, es wurde sogar eine negative Absorption in Vergleich mit dem Blindwert gemessen. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass vernetztes [EMM]₇

(V1) den Farbstoff Nitrophenyl aufnimmt. Bestätigt werden konnte diese Vermutung durch eine Gelbfärbung der [EMM]₇-Proben V1-V3. Das Hydrogel V3, welches über Syntheseroute B hergestellt wurde, bewirkte keine Steigerung der Zelladhäsionsrate^{XIV}. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass eine Modifizierung von V3 über Syntheseweg A nicht stattgefunden hat. Verbindung V4 hingegen erzielte eine Steigerung der Zelladhäsionsrate um 78 % (siehe Abbildung 4-51). Dieses Ergebnis zeigt sehr gut, dass bioaktive Hydrogele auf der Basis von [EMM]₇ zur Stimulierung der Zelladhäsion geeignet sind. Die große Steigerung der Zelladhäsionsrate des Hydrogels V4 unterstreicht die Notwendigkeit der Schutzgruppenstrategie und einer vorausgehenden Modifizierung von [EMM]₇.

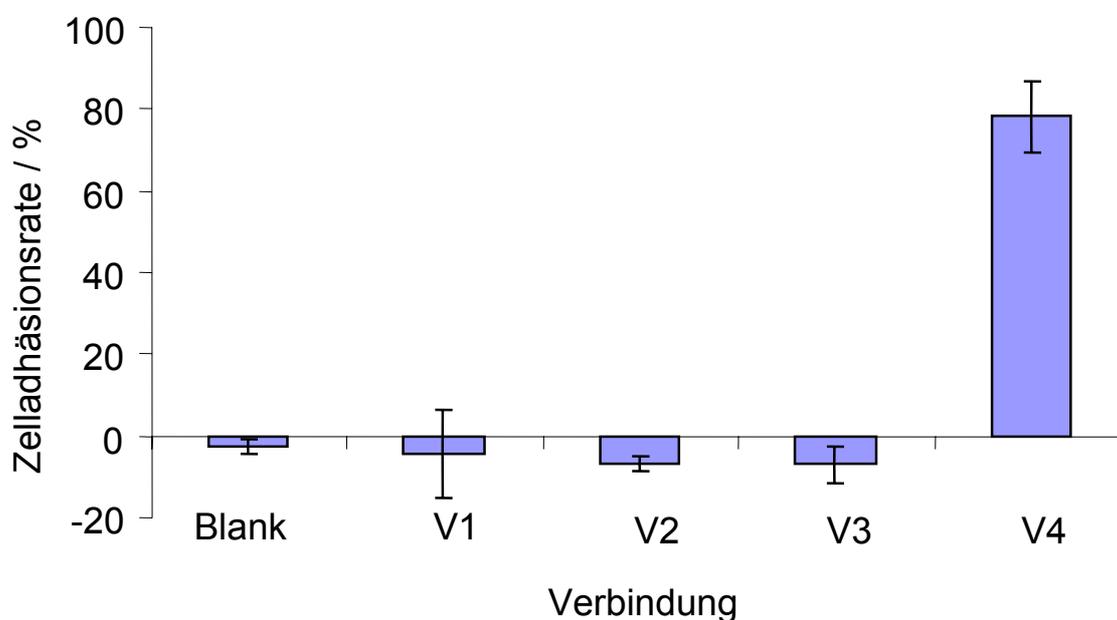


Abbildung 4-51 Zelladhäsionsraten nach 1h von EC3T3-E1 Mausosteoblasten auf Hydrogelen auf der Basis von [EMM]₇. Die Mittelwerte stammen von Dreifachmessungen, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Blank = Nullwert, V1 = vernetztes E3 ([EMM]₇), V2 = vernetztes E3 und P6, V3 = vernetztes E3 und P6 und Kupplungsreagenzien (Syntheseweg B), V4 = vernetztes E15.

Für die nachfolgenden Zelladhäsionstests wurden demnach alle Proben über Syntheseweg B dargestellt.

^{XIV} Die Zelladhäsionsrate beschreibt das Verhältnis der Zahl adhärirter Zellen zur Gesamtzahl der Zellen x 100.

4.4.3 Biologische Evaluierung der Hydrogele V1, V5, V6, V7 und V8

Nachdem die Modifizierung der Hydrogele nach Syntheseweg A nicht gelang, wurden alle weiteren Verbindungen über Syntheseweg B dargestellt. Die bioaktiven [EMM]₇-Polymere konnten mit Hilfe der Boc-Schutzgruppenstrategie synthetisiert werden.

Im Rahmen dieser Testreihe wurden die Hydrogele **V1**, **V5**, **V6**, **V7** und **V8** (vgl. Kapitel 4.3.6 und 4.3.7) an der Mausosteoblastenzelllinie biologisch evaluiert. Die getesteten Verbindungen umfassten einen Nullwert (Blank), eine Blindprobe **V1** (vernetztes **E3**), vernetztes **E22** (**V5**), vernetztes **E21** (**V6**), vernetztes **E19** (**V7**) und vernetztes **E17** (**V8**). Abermals konnte bei **V1** eine negative Absorption im Vergleich zum Nullwert gemessen werden, was wiederum in einer negativen Zelladhäsionsrate resultiert. Alle hier getesteten Verbindungen **V5-V8** zeigten eine signifikante Steigerung der Zelladhäsionsrate (siehe Abbildung 4-52).

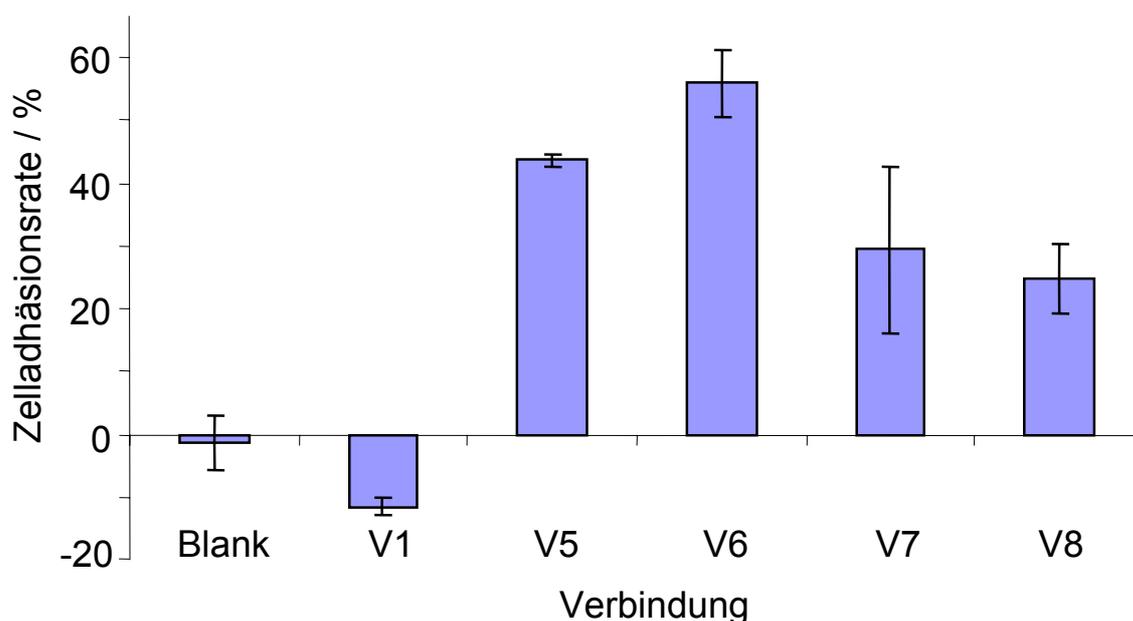


Abbildung 4-52 Zelladhäsionsraten nach 1h von EC3T3-E1 Mausosteoblasten auf Hydrogelen auf der Basis von [EMM]₇. Die Mittelwerte stammen von Dreifachmessungen, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Blank = Nullwert, **V1** = vernetztes **E3**, **V5** = vernetztes **E22**, **V6** = vernetztes **E21**, **V7** = vernetztes **E19**, **V8** = vernetztes **E17**.

Die Proben **V7** und **V8** zeigten ähnliche Zelladhäsionsraten im Rahmen der Fehlergenauigkeit von 29.5 % bzw. 24.8 %. Wobei sich die Proben deutlich in ihren

Beladungsfaktoren mit zelladhäsiven Liganden unterschieden. Das vernetzte **E19 (V7)** konnte zu 63 % modifiziert werden. Hingegen betrug bei **V8** der Beladungsfaktor nur 25 %. Demzufolge konnte bei einer geringeren Anzahl an bioaktiven Liganden an der [EMM]₇-Oberfläche eine ähnliche Zelladhäsionsrate hervorgerufen werden. Die Zelladhäsionsrate von 43.7 % bei **V5** (Beladungsfaktor 50 %) bestätigt den positiven Einfluss der Ahx-Einheit. Aus unterschiedlichen Studien geht hervor, dass der optimale Abstand eines künstlichen Integrinliganden von der Oberfläche einer effektiven Spacerlänge von 3.0-3.5 nm (gestreckt) entspricht.^[145-147] Dieser Wert hängt jedoch stark von der Strukturierung der Materialoberfläche ab. Elastische Oberflächen wie z.B. Proteine (BSA) benötigen, im Gegensatz zu porösen oder stark gegliederten Materialien (z.B. PMMA), in der Regel keinen *spacer*.^[148] Diese Testreihe zeigt jedoch, dass ein Abstandshalter auch bei elastischen Oberflächen einen positiven Einfluss auf die Zelladhäsion hat und offensichtlich die Wechselwirkung von Integrin-RGD Sequenz verbessert.

Die Proben **V5** und **V6** zeigen eine hohe Steigerung der Zelladhäsionsrate von 43.7 bzw. 56 Prozent auf, wobei **V6** trotz eines niedrigen Modifizierungsgrades (25 %) die höchste Zelladhäsionsrate aufweist. Die Erklärung hierfür, beruht auf der Spezifität zyklischer RGDs im Vergleich zu linearen. Lineare RGDs weisen ein flexibles Rückgrat auf, welches ihnen sehr viele verschiedene Konformationen erlaubt. Durch den Einbau einer *D*-Aminosäure (hier *f* = *D*-Phenylalanin) lässt sich die Struktur des Zyklopeptidrückgrates fixieren, so dass relativ starre Template entstehen. Selektive RGD-Peptide vom Typ cyclo(-RGDfX-) binden spezifisch an $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrine.^[149]

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit Hilfe der biologischen Evaluierung die Notwendigkeit einer Schutzgruppenstrategie bestätigt werden konnte. Im Vergleich der bioaktiven Hydrogele konnte eine Steigerung der Zelladhäsionsrate durch eine Erhöhung der Konzentration an bioaktiven Liganden (höherer Modifizierungsgrad), sowie der Einbau eines *spacer*-Moleküls (Ahx) beobachtet werden. Des Weiteren konnte im Vergleich von zyklischen und linearen RGDs, die höhere Spezifität zyklischer RGDs bewiesen werden.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation widmete sich der Entwicklung neuartiger monodisperser Biomaterialien für medizinische Anwendungen auf der Basis von *Elastin like polymers (ELPs)*. Im Mittelpunkt stand hierbei die posttranslationale chemische Modifizierung des von *Junger* klonierten [EMM]₇-Proteins (*elastin mimetic monomer* mit sieben Wiederholungseinheiten). Die angestrebten Anwendungsgebiete derartiger modifizierter [EMM]₇-Polymere erstrecken sich von polymeren Wirkstoffträgern bis hin zur Herstellung bioaktiver Hydrogele für die Gewebezüchtung.

Im biochemischen Teil dieser Arbeit konnte durch eine Punktmutation Cystein an Position 35 der Aminosäuresequenz von His₆-[EMM]₇ eingeführt werden. Mit Hilfe dieser Mutante (Cys-[EMM]₇) von [EMM]₇ wurde ein so genanntes 1-1 Konjugat, d. h. nur ein bioaktiver Ligand **P5** wurde pro [EMM]₇ kovalent angeknüpft, über die spezifische Reaktion von Thiolen und Acrylaten synthetisiert.

Zur Herstellung von polymeren Wirkstoffträgern nach dem Konzept von *R. Duncan*, mit [EMM]₇ als polymeres Grundgerüst, wurde der enzymatisch abbaubare und zytostatisch wirksame Linker Dox-GFLG-OH **P4** (Dox = Doxorubicin; G = Glycin, F = Phenylalanin, L = Leucin) komplett an der festen Phase aufgebaut. Zudem konnte auch für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen RBITC-GFLF-OH **P3** (RBITC = Rhodamin B Isothiocyanat) über *solid phase peptide synthesis* dargestellt werden. Die Konjugation der Linker **P3** und **P4** an das Polypeptidrückgrat von **E1**, gelang über eine Kupplung in Lösung mit PyBOP/HOBT und 2,4,6 Collidin als sterisch gehinderte Base. Eine Kupplung mit EDC*HCl als Aktivierungsreagenz bewährte sich nicht, da auf Grund langer Reaktionszeiten und H₂O als Reaktionsmedium die aktive Spezies hydrolytisch abgebaut wurde. Die strukturelle Charakterisierung und die Bestimmung des Modifizierungsgrades der Endverbindungen erfolgte über UV-Spektroskopie, ¹H-NMR, 2D-TOCSY. Die Verbindung **E8** bzw. **E9** wurden mit einem Modifizierungsgrad von 53 bzw. 60 % synthetisiert.

Zur Entwicklung neuartiger zelladhäsiver Hydrogele auf der Basis von [EMM]₇, gelang im ersten Schritt die Synthese folgender RGD-Liganden an der festen Phase:

NH ₂ -FGRGDS-OH	P6
NH ₂ -FGRGDS-Ahx-OH	P7
c(RGDfK)-Ahx-OH ^{XV}	P8

Durch eine Variation der Synthesewege zur Darstellung bioaktiver Hydrogele, konnte eine notwendige Schutzgruppenstrategie, gefolgt von der Kupplung der „RGDs“ **P6**, **P7** und **P8** in Lösung (PyBOP/HOBT und 2,4,6 Collidin) und einer abschließenden Vernetzung, entwickelt werden. In diesem Fall gelang die Charakterisierung aller Endverbindungen über ¹H-NMR-Spektroskopie. Bei der Synthese zelladhäsiver Hydrogele ohne Schutzgruppenstrategie und vorausgehender Vernetzung konnte keine Zelladhäsion der Mausosteoblasten Zelllinie EC3T3-E1 beobachtet werden was darauf hin deutet, dass keine chemische Modifizierung des

^{XV} c(RGDfK)-Ahx-OH wurde von *J. Auernheimer* zur Verfügung gestellt.

Hydrogels mit RGD Liganden erfolgt war. Zelladhäsion resultierte nur für Hydrogele, welche über Syntheseroute B dargestellt wurden, d. h. bei der Modifizierung unter homogenen Bedingungen erfolgte und erst anschließend vernetzt wurde.

In weiteren Zellexperimenten wurden die Hydrogele **V5-V8** biologisch evaluiert, wobei all diese Verbindungen eine Steigerung der Zelladhäsionsrate bewirkten. Analog zu den unterschiedlichen Studien in der Literatur, konnte eine Steigerung der Anzahl adhärerender Zellen abhängig vom Beladungsfaktor (entspricht der Peptidkonzentration der Oberfläche), vom Abstand Oberfläche-RGD und schließlich auch von der Selektivität der RGD-Sequenz beobachtet werden (siehe Abbildung 5-1).

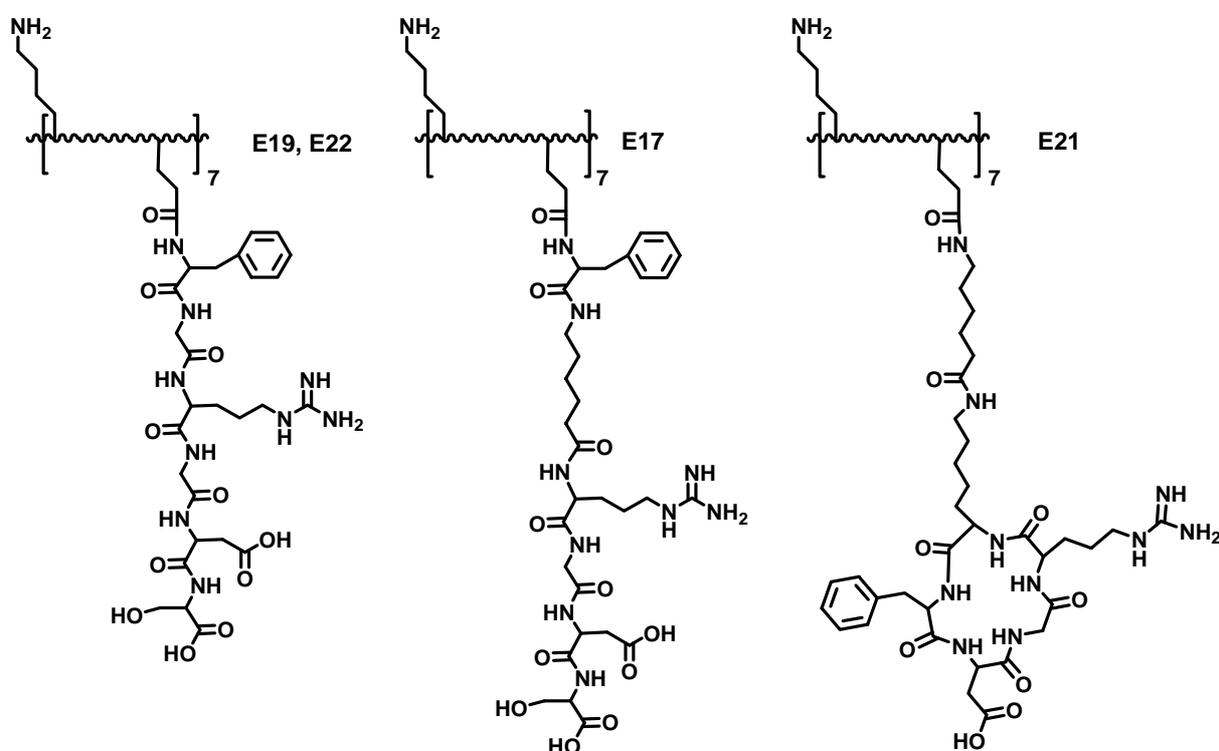


Abbildung 5-1 Schematische Darstellung der unvernetzten Verbindungen **E19**, **E22**, **E17** und **E21** wobei die durch Vernetzung resultierenden Hydrogele (**V5-V8**) eine Steigerung der Zahl adhärerender Zellen hervorrufen. Die Zelladhäsionsrate nimmt von links nach rechts zu.

In dieser Arbeit konnten erste wichtige Schritte zum neuen monodispersen $[EMM]_7$ -Biomaterial bewerkstelligt werden. So konnte der polymere Wirkstoffträger $[EMM]_7$ -GFLG-Dox **E9**, synthetisiert und charakterisiert werden. Allerdings stehen erste Zelltests noch aus. Außerdem wurde eine Strategie für die erfolgreiche, chemische Modifizierung des *Elastin like polymers* $[EMM]_7$ mit verschiedenen RGD

Liganden entwickelt, die eine wesentliche Voraussetzung für eine spätere Verwendung in der Geweberegeneration darstellt.

6 Experimenteller Teil

6.1 Material und Methoden

6.1.1 Biochemischer Teil

Alle eingesetzten Chemikalien stammen von den Firmen *Amersham Biosciences*, *ICN*, *Merck*, *Roth* und *Sigma-Aldrich* und entsprachen der Qualität „per analysis“ bzw. „geeignet für die Molekularbiologie“. Die Größenstandards (DNA, Protein) und die Kits wurden von den Firmen *Amersham Biosciences*, *BioRad*, *Peplab*, *Roche* und *Quiagen* bezogen. Die Synthese der Oligonukleotide als Primer wurde bei der Firma *Metabion* in Auftrag gegeben. Die Plasmide (pBluescriptSK(+)-ADF3, pBluescriptSK(+)-ADF4) wurden von *J. Gosline* (Vancouver, BC, Canada) zur Verfügung gestellt und die Plasmide (pET28a, pET28b) von *Novagen* bezogen. Die zur Klonierung verwendeten Bakterienstämme (*E. coli* DH10B) stammen von *Invitrogen* und die Stämme zur Expression (*E. coli* BLR (DE3)) von *Novagen*. Zur

Reinigung des Proteins wurde eine Chromatographieanlage des Typs Äkta FPLC von der Firma *Amersham-Pharmacia* verwendet.

6.1.2 Chemischer Teil

Alle technischen Lösemittel wurden vor Gebrauch destilliert. Falls erforderlich, wurden wasserfreie Lösemittel von den Firmen *Aldrich*, *Fluka* und *Merck* bezogen oder nach den gängigen Methoden absolutiert.

Die eingesetzten Reagenzien stammen von den Firmen *Aldrich*, *Fluka*, *Sigma* und *Merck*, entsprachen der Qualität „zur Synthese“ oder „per analysis“ und wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet. Die Aminosäuren, Schutzgruppenderivate und Kupplungsreagenzien wurden von den Firmen *Aldrich*, *Advanced ChemTech*, *Bachem* und *NovaBiochem* bezogen. Das für die Festphasensynthese verwendete Harz stammt von *PepChem* (Tübingen) (Tritylchlorid-Polystyrol-Harz). Sämtliche hydrolyse- oder luftempfindliche Reaktionen wurden in ausgeheizten Glasgeräten in einer Argonatmosphäre durchgeführt. Lösungen wurden zu diesen Ansätzen über Gummisepten zugegeben. Bei lichtempfindlichen Reaktionen wurde direkte Lichteinstrahlung durch Umhüllen der Reaktionsgefäße mit Alufolie vermieden.

Die Festphasensynthesen wurden in 2, 5, 10 oder 20 mL-Kunststoffspritzen mit PE-Fritten der Firma *Vetter-Laborbedarf* (Tübingen) durchgeführt. Die Durchmischung der Harzsuspension erfolgte durch Rotieren der Spritzen.

Die präparative RP-HPLC wurden am Lehrstuhl für Organische Chemie II an folgendem Gerät (*Beckman*, System Gold, Hochdruckpumpenmodul 125, UV-Detektor 166) semipräparativ und Säulen (Säulenmaterial: ODS-A C18 (120 Å, 5 µm, 250 mm × 20 mm)) durchgeführt. Als Eluent dienten Laufmittelgemische aus Wasser (Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B) mit jeweils 0.1 Vol-% Trifluoressigsäure im Gradientenbetrieb. Es wurden unterschiedliche lineare Gradientenprofile innerhalb von 30 Minuten verwendet. Die Flussgeschwindigkeiten betragen 8 mL/min (semipräparativ) Die UV-Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 220 und 254 nm.

Massenspektren wurden durch Laser-Desorption (MALDI) oder Elektronenspray Ionisation (ESI) erhalten. ESI-MS-Untersuchungen wurden an einem Gerät der Firma

Finnigan vom Typ LCQ in Kombination mit dem HPLC-System *Hewlett Packard* HP1100 (Säulenmaterial: Omnicrom YMC ODS-A C18 (120 Å, 3 µm, 125 mm × 2 mm), Flussgeschwindigkeit 0.2 mL/min) durchgeführt. Als Eluent dienten Laufmittelgemische aus H₂O und Acetonitril mit jeweils 0.1 Vol-% Ameisensäure im Gradientenbetrieb. Es wurden unterschiedliche lineare Gradientenprofile innerhalb von 15 Minuten verwendet.

Die MALDI-MS Untersuchungen erfolgten an einem Gerät der Firma *Bruker* vom Typ BILFEX III im Reflektor Modus (Matrix: α-Cyanohydroxymizsäure). Die ESI Spektren werden in der Form „X [M + Z]⁺“ bzw. bei mehrfacher Ladung in der Form „X [(M + nZ)/n]ⁿ⁺“ angegeben. Die Detektion der Molekülmasse X entspricht dabei dem positiv geladenen Anlagerungsprodukt des untersuchten Moleküls mit dem Molekulargewicht M und dem Kation Z bzw. den n Kationen Z geteilt durch n.

Die NMR-Spektren wurden an den Geräten der Firma *Bruker* AC 250, ARX 300 und Avance 900 in deuteriertem Lösemitteln bei 300 K aufgenommen. Interner Standard für chemische Verschiebungen von ¹H war das Lösemittelsignal von DMSO-d₆ für ¹H (δ = 2.49 ppm) bzw. als externer Standard Trimethylsilan (δ = 0.0 ppm). Die Signal- und Konfigurationszuordnung erfolgte teilweise mit Hilfe von 2D-Experimenten (TOCSY).

6.2 Molekularbiologische Arbeitstechniken

6.2.1 Anzucht und Aufbewahrung von *E. coli*

Sämtliche *E. coli* - Stämme werden in **Luria - Bertani (LB)** Medium kultiviert. Zur Selektion rekombinanter Zellen wird Kanamycin (Endkonzentration: 35 µg/mL) zugesetzt. Für Übernachtskulturen werden 4 mL LB Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt, mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte oder aus einem Glycerolstock angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Zur Stammhaltung wird die Kultur im Verhältnis 1:1 mit Glycerol versetzt und bei – 80 °C gelagert.

LB ₀ Medium	10 g/L Bacto Trypton
	5 g/L <i>Yeast Extract</i>
	5 g/L NaCl
	eingestellt auf pH 7.2 (1 M NaOH)
	15 g/L Bacto Agar (für Platten)
Antibiotika	35 µg/mL Kanamycin

6.2.2 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* werden die zu transformierenden Stämme nach Sambrook kompetent gemacht.^[150] Dazu wird eine frische 100 mL *E. coli*-Flüssigkultur mit einer OD₆₀₀ von 0.5-1.0 mit 2 mL 1 M MgCl₂ versetzt und 10 min weiter bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Kultur 60 min auf Eis gekühlt, 5 min bei 4 °C und 5000 × g abzentrifugiert, das Sediment in 20 mL Lösung A resuspendiert und weitere 60 min auf Eis gekühlt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4 °C wird das Sediment in 2 mL Lösung A – Glycerin aufgenommen und die Zellen in Aliquots zu je 200 µL aufgeteilt. Diese Aliquots werden entweder direkt mit Plasmid-DNA transformiert oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Transformation werden je 200 µL kompetente Zellen mit maximal 10 % (v/v) der zu transformierenden DNA vermischt und 15 min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wird anschließend einem einminütigen Hitzeschritt bei 42 °C unterzogen, wieder auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 500 µL LB₀ 40 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden ca. 100 µL der Bakteriensuspension auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und diese bei 37 °C ü. N. bebrütet.

Lösung A	13 mL 3 M NaAc pH 5.5
	100 mL 1 M CaCl ₂
	25 mL 2.8 M MnCl ₂
	862 mL H ₂ O _{dd} sterilfiltriert

Lösung A-Glycerin	69 mL Glycerin
	331 mL Lösung A

6.2.3 Präparation, Reinigung und Sequenzierung von DNA

Für die Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten wurden folgende *Kits* den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	<i>High Pure Plasmid Isolation Kit</i>
DNA-Isolierung aus Agarosegelen	<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>
Reinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten	<i>High Pure PCR Product Purification Kit</i>

Molekularbiologisch veränderte Vektoren wurden vor ihrer Weiterverwendung sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma *GATC Biotech AG* (Konstanz, Deutschland). Soweit im Folgenden nicht anders beschrieben, wurden die Standardprimer der Firma verwendet.

6.2.4 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Proben werden diese in Agarosegelen nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Herstellung eines Gels wird die in $1 \times$ TAE-Puffer gelöste Agarose aufgekocht; nach Abkühlung unter 60°C werden $0.4 \mu\text{g/mL}$ Ethidiumbromid zugegeben, und die Lösung zum Polymerisieren in die Laufapparatur gegossen. Nach Auftrag der DNA-Lösung in $1 \times$ Laufpuffer wird für 30 min eine Spannung von 110 V angelegt. Das System *BioDocII* wird zur Dokumentation der Auftrennung verwendet. Als Längenstandard dient mit BstEII geschnittene λ -DNA, die 100 bp oder 1 kb DNA-Leiter.

TAE (50 \times)	2 M Tris/Acetat pH 8.0
	50 mM EDTA pH 8.0
Gelauftragspuffer	50 % (v/v) Glycerin
(10x)	10 mM EDTA pH 8.0

0.2 % (w/v) Bromphenolblau

0.2 % (w/v) Xylencyanol

Ethidiumbromid-Lösung 0.04 % (w/v) Ethidiumbromid

6.2.5 Enzymatische Modifikation von DNA

Enzymatische Modifikationen von DNA wurden den Herstellerangaben entsprechend mit folgenden Enzymen durchgeführt.

DNA-Spaltung an spezifischen Sequenzen Restriktionsendonukleasen^{XVI} (Not I und Bam H1 bzw. Bam H1 und Eam 1104).

Standardreaktionsansatz (10 µL) 5 µL DNA (ca. 100-500 ng)

3.5 µL H₂O_{dd}

1 µL 10 × Reaktionspuffer

0.5 µL Enzym (2 U^{XVII})

6.2.6 Punktmutagenese innerhalb eines DNA Abschnitts (QuickChange®)

Bei dieser Methode zur gerichteten Mutagenese innerhalb eines DNA Abschnitts wird das gesamte Plasmid, welches das Gen trägt, amplifiziert. Als Primer dienen hierbei zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide von 25-40 bp Länge (siehe Tabelle 6-1), welche die gewünschte Mutation im Zentrum ihrer Sequenz tragen. Zur Amplifikation wird die Pfu DNA-Polymerase verwendet, welche Korrekturlesefunktion besitzt. Während der Amplifikation entstehen ausgehend von den Primern Kopien des Plasmids, welche nun die gewünschte Mutation tragen. Da diese jedoch aufgrund ihrer Linearität nicht als Templat während der PCR dienen können, handelt

^{XVI} Die Schnittstellen der hier verwendeten Restriktionsendonukleasen können auf der Internetseite: <http://www.neb.com/nebecomm/products/category1.asp> abgerufen werden.

^{XVII} U steht als Abkürzung für *unit* und ist definiert als diejenige Menge Enzym, welche unter angegebenen Bedingungen ein Mikromol Substrat pro Minute umsetzt: 1 U = 1 µmol/min.

- 2 μL 1. PCR Primer (10 pM/ μL)
- 2 μL 2. PCR Primer (10 pM/ μL)
- 0.5 μL Pfu-DNA-Polymerase (2 U/ μL)
- 36.5 μL H₂O (für die Molekularbiologie)

6.3 Expression und Reinigung

6.3.1 Anzucht, Induktion und Ernte der Bakterien

Nachdem mit Hilfe einer von *Junger* durchgeführten Expressionskinetik die optimalen Bedingungen zur Produktion von rekombinantem Protein gefunden werden konnten, wird die Anzucht in großem Maßstab mit 4-8 L LB_{kana}-Medium (35 μg Kanamycin pro mL LB-Medium) in Schwenkkolben (2 L Medium pro 5 L Kolben) durchgeführt. Konstrukte in pET28 Plasmiden werden zur Expression in den *E. coli* - Stamm BLR(DE3) transformiert. Dazu werden die Medien mit Zellen aus 200 mL Vorkulturen überimpft, die aus gefrorenen Glycerinkulturen (gelagert bei -80 °C, vgl. Kapitel 6.2.1) und über Nacht angezogen werden. Die 4-8 L Kulturen werden 24 h bei 30 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator kultiviert bis eine optische Dichte OD₆₀₀ von 0.6 – 0.8 erreicht ist. Anschließend werden die Zellen durch Zentrifugation (6000 g^{XVIII}, 10 min, 4 °C) geerntet und dann in 80 mL Puffer A (8 M Harnstoff, 100 mM Na₂HPO₄, pH 7.5 (HCl), 100 mM NaCl, 20 mM Imidazol) resuspendiert und durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Auftauen lysiert und schließlich zusätzlich durch Ultraschall aufgeschlossen (3x je 30 sek. Ultraschall). Unlösliche Bestandteile und Zellreste werden bei 40 000 g^{XVIII} für 45 min bei 4 °C abgetrennt. Zur längeren Lagerung wird der Überstand bei -20 °C eingefroren. Bei der Expression des Proteins erhält man typischerweise Ausbeuten von 50 mg pro Liter LB-Medium.

^{XVIII} Hier steht die Abkürzung „g“ für die Erdbeschleunigung, $g = 9.81 \text{ m/s}^2$.

6.3.2 Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie mit Ni-NTA

Alle rekombinanten Proteine werden im pET-Expressionssystem exprimiert, welches durch die Bereitstellung von sechs Histidinresten am *N*-Terminus der rekombinanten Proteine eine affinitätschromatographische Aufreinigung über eine Nickel-Chelat-Säule ermöglicht. Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen und reversiblen Adsorption eines Moleküls an einen individuellen, matrixgebundenen Bindungspartner, welcher kovalent an eine Matrix gebunden wird und somit als immobilisierter Ligand dient. Die biospezifische Wechselwirkung mit dem Zielmolekül wird genutzt, um diesen Adsorbenten selektiv aus einer komplexen Mischung heraus zu adsorbieren. Die Elution des Adsorbenten wird dann entweder durch eine kompetitive Verdrängung aus der Bindung erreicht oder durch einen Konformationswechsel aufgrund einer Änderung des pH-Werts bzw. der Ionenstärke. Die Affinitätschromatographie ist die Trennmethode mit der größten Spezifität und Selektivität für die Isolierung und Reinigung von Biomolekülen.^[151]

Im Rahmen dieser Arbeit wird als Affinitätsmaterial Nitrilotriessigsäure (NTA) verwendet. Das hexavalente Ni^{2+} -Ion wird mit vier seiner Koordinationsstellen an NTA gebunden, womit es noch zwei freie Koordinationsstellen besitzt. Diese werden mit hoher Affinität von den *His-tags* der rekombinanten Proteine erkannt und gebunden. So lässt sich das gewünschte Protein im Idealfall quantitativ an der Säule aufnehmen und anschließend durch kompetitive Bindung einer im Elutionspuffer enthaltenen Substanz, wie z.B. Imidazol, das mit den Histidinseitenketten um die Metallbindungsplätze konkurriert, ab einer bestimmten Konzentration wieder verdrängen und von der Säule eluieren. Der Reinigungserfolg wird durch SDS-PAGE (vgl. Kapitel 4.1.3 auf Seite 42) kontrolliert.

6.3.3 Ergänzender Reinigungsschritt durch Proteinpräzipitation

Elastin-ähnliche Proteine (ELPs) können einen inversen Phasenübergang vollziehen. Unterhalb der inversen Phasenübergangstemperatur (T_i) sind die ELPs strukturell ungeordnet, hoch solvatisiert und deshalb in wässrigen Medien löslich. Erhöht man die Temperatur, kollabiert das Protein, indem es Wasser verdrängt und

intramolekulare Wechselwirkungen zwischen unpolaren Bereichen des Proteins in den Vordergrund treten, das Protein aggregiert. Der Temperaturbereich, in dem sich der Phasenübergang vollzieht beträgt nur wenige Grad und ist reversibel. Normale Proteine hingegen denaturieren irreversibel bei Erhöhung der Temperatur. Sind nach dem ersten Affinitätschromatographischen Reinigungsschritt im SDS-PAGE noch Verunreinigungen sichtbar, erhitzt man die Proteinlösung für 10 min auf 80 °C. Die Lösung wird dabei milchig-trüb, da sämtliches Protein darin ausfällt. Kühlt man nach dieser Zeit die Lösung wieder auf 4 °C ab, löst sich das Zielprotein wieder und man zentrifugiert die unlöslichen, denaturierten Proteinverunreinigungen bei 14 000 g^{XIX} ab.

6.3.4 Veränderung der Pufferzusammensetzung (Dialyse)

Zur Veränderung der Pufferbedingungen wird gegen das 50-1000fache des entsprechenden Ausgangsvolumens bei 4 °C dialysiert. Der Pufferaustausch erfolgt durch die semipermeable Membran eines Dialyseschlauches. Je nach Proteingröße haben die Dialyseschläuche Ausschlussgrößen zwischen 2500 und 12000 kDa. Die Dialyseschläuche werden vor der Verwendung 30 min in H₂O_{dd} eingelegt. Dialyseschläuche können in 20 %iger ethanolischer Lösung über mehrere Wochen bei 4 °C zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden.

6.3.5 Standardreinigung His₆-getaggtter Proteine

Alle His₆-getaggtten Proteine werden nach einem ähnlichen Schema gereinigt. Alle Arbeitsschritte sind am Beispiel von His₆-[EMM]₇ (**E1**) beschrieben, das auf dem Plasmid pET28b vorlag.

Nach der Anzucht und Ernte der Bakterien (vgl. Kapitel 6.3.1 auf Seite 106) werden die Zellen in Puffer A resuspendiert und im Zellaufschlussgerät disruptiert. Zur Verringerung der Viskosität des Aufschlusses wird das freigesetzte Protein dreimal durch Ultraschall mit 30 sek. Pulsen fragmentiert. Unlösliche Bestandteile und

^{XIX} Hier steht die Abkürzung „g“ für die Erdbeschleunigung, $g = 9.81 \text{ m/s}^2$.

Zellreste werden bei $40\,000\text{ g}^{\text{XX}}$ für 45 min bei 18 °C abgetrennt. Der Überstand (das Zelllysat) wird auf eine in Puffer A äquilibrierte Ni-NTA-Säule aufgetragen, mit 100 mL Puffer A gewaschen und mit einem Stufengradient von Puffer B eluiert. Die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthalten, werden durch SDS-PAGE ermittelt und vereinigt. Im Weiteren werden die gepoolten Fraktionen dreimal gegen $5\text{ L H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ dialysiert und lyophilisiert. Das gefriergetrocknete Protein ist in diesem Zustand bei Raumtemperatur unbegrenzt haltbar.

Verwendete Lösungen:

Resuspensions- und Lysepuffer: 100 mM Natriumdihydrogenphosphat, pH 8.0

(Puffer A) 150 mM Natriumchlorid

8 M Harnstoff

20 mM Imidazol

Elutionspuffer (Puffer B) 100 mM Natriumdihydrogenphosphat, pH 8.0

150 mM Natriumchlorid

8 M Harnstoff

250 mM Imidazol

Expressierte Proteine: **His₆-[EMM]₇ E1**

21513.9 g/mol (berechnet mit Hilfe von ^[152])

MALDI-TOF-MS (6000-26000) m/z : 21528.9 (M + H⁺), 10764.5 ((M + 2H⁺)/2).

His₆-Cys-[EMM]₇ E2

21529.9 g/mol (berechnet mit Hilfe von ^[152])

MALDI-TOF-MS (6000-26000) m/z : 21547.3 (M + H⁺), 1074.1 ((M + 2H⁺)/2).

^{XX}Hier steht die Abkürzung „g“ für die Erdbeschleunigung, $g = 9.81\text{ m/s}^2$.

6.4 Proteinanalytik

6.4.1 SDS–Polyacrylamid–Gelelektrophorese

Für die analytische Auftrennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht wird die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. In dieser Arbeit werden SDS-Gele der Größe 10 x 8 x 0.075 cm mit 10-, 12.5- und 15 %-igem Trenngel und 3 %-igem Sammelgel verwendet.^[153] Für die Gele werden Lösungen mit den folgenden Endkonzentrationen hergestellt:

Trenngel:	1 × Trenngelpuffer; 10 % - 15 % Acrylamid, 0.2 % SDS, 0.065 % (w/v) APS, 0.033 % (v/v) TEMED
Sammelgel:	1 × Sammelgelpuffer; 3 % Acrylamid, 0.2 % SDS, 0.13 % (w/v) APS, 0.066 % (v/v) TEMED

Nach Zugabe von APS und TEMED wird die Gellösung zur Polymerisation in eine entsprechende Vorrichtung gegossen. Die Proben werden in 1 × Auftragspuffer für 5 min auf 95 °C erhitzt und aufgetragen. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine werden Proteinstandards mit auf die SDS-PAGE aufgetragen. Die Laufzeiten der Gele bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel variierten zwischen 45 min bei 10 %-igen Gelen und 55 min bei 15 %-igen Gelen.

Trenngelpuffer (4×)	0.8 % SDS 5 M Tris/HCl, pH 8.8
Sammelgelpuffer (2×)	0.4 % SDS 0.25 M Tris/HCl, pH 6.8
10× Laufpuffer	250 mM Tris/HCl, pH 8.8 2 M Glycin 1 % SDS
5× Auftragspuffer	300 mM Tris/HCl, pH 6.8 10 % (w/v) SDS

	50 % (v/v) Glycerin
	0.05 % (w/v) Bromphenolblau
	5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol (optional)
Acrylamid (Rotiphorese)	38 % (w/v) Acrylamid
	2 % Bisacrylamid

6.4.2 Färbung nach Fairbanks

Für die Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit dem Farbstoff *Coomassie Blau* wird das Gel in Lösung A aufgekocht und 5 min inkubiert. Nichtgebundener Farbstoff wird durch anschließendes mehrmaliges Aufkochen in Lösung D entfernt. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei etwa 50 ng des betreffenden Proteins.^[154]

Lösung A	25 % (v/v) Isopropanol
	10 % (v/v) Essigsäure (technisch)
	0.05 % (w/v) <i>Coomassie Blau</i>
Lösung D	10 % (v/v) Essigsäure (technisch)

6.5 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: Belegung von TCP-Harz

Zu trockenem TCP-Harz (maximale Belegungsdichte 0.9 mmol/g, 1.0 g) werden *N*-terminal geschützte Aminosäure (1.2 bis 1.5 mmol), trockenes CH₂Cl₂ (8 mL) und DIPEA (3 mmol) hinzugefügt. Zum *cappen* von nicht umgesetzten Trityl-Gruppen werden nach 1 h Schütteln DIPEA (0.5 mL, 3 mmol) und Methanol (3 mL) zugesetzt und weitere 15 min geschüttelt. Das Harz wird über eine Fritte abgesaugt und mit CH₂Cl₂ (3 x 8 mL, je 3 min), *N*-Methyl Pyrrolidon (3 x 8 mL, je 3 min), und nochmals mit CH₂Cl₂ (3 x 8 mL, je 3 min) gewaschen. Beim letzten Waschschrift gibt man sukzessive kleinere Mengen Methanol zu und wäscht abschließend mit reinem

Methanol (2 x 8 mL, je 3 min). Nach Trocknen des Harzes über Nacht im Hochvakuum wird die Belegungsdichte nach folgender Formel bestimmt:

$$c[\text{mol} / \text{g}] = \frac{m_{\text{Ges}} - m_{\text{Harz}}}{(M_{\text{xx}} - M_{\text{HCl}}) * m_{\text{Ges}}}$$

m_{Harz} Masse des eingesetzten Harzes [g]

m_{Ges} Gesamtmasse des Polymers nach Ankupplung [g]

M_{xx} Molmasse der Fmoc-Aminosäure [g/mol]

M_{HCl} Molmasse HCl [36.46 g/mol]

Der Fehler, der dabei durch die unterschiedlichen Massen von Cl- und MeO-entsteht, ist vernachlässigbar.

AAV 2: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe:

Das Harz (1 g) wird für 5 min mit DMF (1 x 10 mL) gequollen. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt mit 20 %-iger Piperidin/DMF Lösung (2 x 10 mL) zuerst 5 min danach 15 min.

AAV 3: Festphasensynthese linearer Peptide mit Fmoc/*tert*-Butyl-Schutzgruppenstrategie

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe der harzgebundenen Aminosäure und die Kupplung einer weiteren *N*-Fmoc-geschützten Aminosäure erfolgt nach folgendem Fließschema:

Tabelle 6-3 Fließschema zur Peptidsynthese.

Schritt	Operation	Reagenzien	Zeit/min
1	Waschen	DMF	1 x 3
2	Entschützen	20 % Piperidin in DMF	1 x 5
3	Entschützen	20 % Piperidin in DMF	1 x 15
4	Waschen	DMF	5 x 1
5	Kuppeln	Fmoc-AS / TBTU / HOBT	1 x 40-60
6	Waschen	DMF	5 x 1

AAV 4: Abspaltung seitenkettengeschützter Verbindungen vom TCP-Harz

Nach Waschen des Harzes (0.25 g) mit CH_2Cl_2 (4 x 2 mL, je 2 min) erfolgt die Abspaltung durch:

- a) CH_2Cl_2 :HOAc:TFE (3:1:1) 1 x 60 min, 1 x 30 min und 2 x 10 min oder
- b) 20 % HFIP in CH_2Cl_2 5 x 20 min.

Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum eingeengt und der Rückstand bei (a) zweimal mit Toluol ko-evaporiert. Abschließend lyophilisiert man aus einem *tert*Butanol/Wasser-Gemisch.

AAV 5: Abspaltung vollständig entschützter Verbindungen vom TCP-Harz

a) Das Harz (0.25 g) wird mit CH_2Cl_2 (4 x 2 mL, je 2 min) gewaschen und mit einem 47.5:47.5:5-Gemisch aus CH_2Cl_2 , TFA und TIPS (2 mL) für 1.5 h versetzt. Anschließend wird mit einem 1:1 Gemisch CH_2Cl_2 :TFA gewaschen (1 x 30 min, 1 x 10 min), die vereinigten Filtrate im Vakuum eingeengt und der Rückstand aus *tert*Butanol/Wasser lyophilisiert.

b) Das Harz (0.25 g) wird zunächst mit CH_2Cl_2 (4 x 2 mL, je 2 min) gewaschen. Vor der Zugabe der Abspalllösung werden ca. 250 μL TIPS in wenig CH_2Cl_2 zu dem Harz hinzugefügt. Anschließend erfolgt die Abspaltung vom Harz mit einem Gemisch aus 95 % TFA und 5 % Wasser (3 x 2 mL, je 5 min). Wird das Harz nicht entfärbt, so wird zusätzlich TIPS zur Abspalllösung gegeben. Die vereinigten Filtrate werden noch 3 h unter gelegentlichem Schütteln stehen gelassen. Anschließend wird das Lösungsmittel im Hochvakuum bei 35 °C abdestilliert. Der Rückstand wird aus Wasser/*tert*-Butanol lyophilisiert.

AAV 6: Kupplung in Lösung mit PyBOP/HOBT und 2,4,6 Collidin

Die Verbindung mit freiem C-Terminus wird mit dem Amin (1.1 Äq.), PyBOP (1.1 Äq.), 1.1 Äq. HOBT und 2,4,6 Collidin (30 Äq.) in tr. DMF 24 h gerührt. Anschließend wird das Lösemittel im Hochvakuum entfernt.

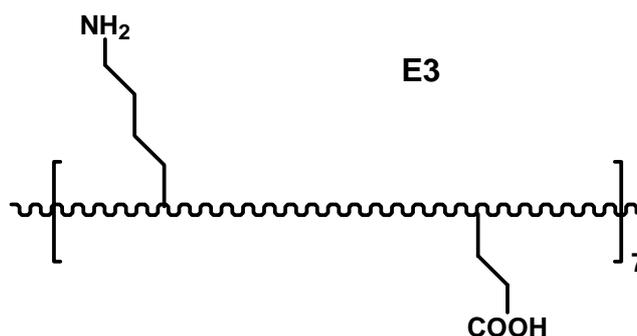
AVV 7: BrCN-Spaltung der His₆-tag-Proteine

Das zu spaltende Protein wird in 88 %iger Ameisensäure gelöst und mit 100 Äquivalenten an Bromcyan (BrCN) versetzt. Die Reaktionsmischung wird 5 h unter Lichtausschluss bei RT gerührt. Anschließend werden 40 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ zugegeben und das Lösemittel am N_2 -Rotationsverdampfer entfernt. Dieser Schritt wird dreimal wiederholt. Der Rückstand wird in wenig $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ aufgenommen, gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ dialysiert und lyophilisiert.

6.6 Synthese der Doxorubicin–Wirkstoffträgerkonjugate

6.6.1 Bromcyano–Spaltungen

Synthese von [EMM]₇ E3



100 mg von His₆-[EMM]₇ **E1** ($4.7 \cdot 10^{-3}$ mmol) werden nach **AVV7** umgesetzt. Man erhält **E3** als weißen Feststoff.

18426.5 g/mol (berechnet mit Hilfe von ^[152])

Ausbeute: 78.8 mg ($4.3 \cdot 10^{-3}$ mmol, 91 %)

¹H-NMR: (300 MHz, D₂O): δ in ppm = 8.44-7.85 (NH), 4.40 (Pro- α CH, Val₂- α CH, Lys- α CH, Glu- α CH), 4.11 (Val₁- α CH), 3.92 (Gly- α CH₂), 3.83-3.64 (Pro- δ CH₂), 2.92 (Lys- ϵ CH₂), 2.28 (Pro- β CH₂, Glu- γ CH₂), 2.24-1.89 (Val_{1,2}- β CH, Pro- γ CH₂, Lys- β CH₂, Glu- β CH₂, Ile- β CH₂), 1.64 (Ile- γ CH₂, Lys- δ CH₂), 1.38 (Lys- γ CH₂), 0.88 (Val_{1,2}- γ CH₃, Ile- γ CH₃, Ile- δ CH₃).

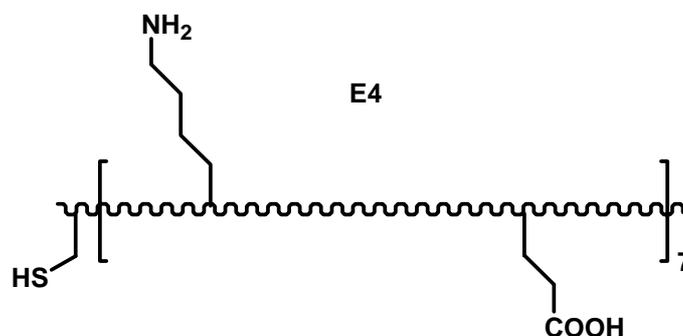
(300 MHz, DMF-d₇): δ in ppm = 8.39-7.75 (NH), 4.43-4.21 (Pro- α CH, Val_{1,2}- α CH, Lys- α CH, Glu- α CH), 3.86 (Gly- α CH₂), 2.26-1.83 (Pro- β CH₂, Glu- γ CH₂, Val_{1,2}- β CH, Pro- γ CH₂, Lys- β CH₂, Glu- β CH₂, Ile- β CH₂), 1.65 (Ile- γ CH₂, Lys- δ CH₂), 1.41 (Lys- γ CH₂), 1.04-0.88 (Val_{1,2}- γ CH₃, Ile- γ CH₃, Ile- δ CH₃). Pro- δ CH₂ und Lys- ϵ CH₂ durch Lösemittelsignale überdeckt.

(300 MHz, DMSO-d₆ / TMS): δ in ppm = 8.41-7.54 (NH), 4.35-4.05 (Pro- α CH, Val₁- α CH, Lys- α CH, Glu- α CH, Val₂- α CH), 3.73 (Gly- α CH₂), 3.58 (Pro- δ CH₂), 2.72 (Lys-

ϵCH_2), 2.21-1.73 (Val_{1,2}- βCH , Pro- $\beta,\gamma\text{CH}_2$, Lys- βCH_2 , Glu- $\beta,\gamma\text{CH}_2$, Ile- βCH_2), 1.61-1.51 (Ile- γCH_2 , Lys- δCH_2), 1.25 (Lys- γCH_2), 0.83 (Val_{1,2}- γCH_3 , Ile- γCH_3 , Ile- δCH_3).

MALDI-TOF-MS (6000-26000) m/z : 18457 (M + H⁺), 9248 (M + 2H⁺/2).

Synthese von Cys-[EMM]₇ E4



100 mg von His₆-Cys-[EMM]₇ **E2** ($4.7 \cdot 10^{-3}$ mmol) werden nach **AVV7** umgesetzt. Man erhält **E4** als weißen Feststoff.

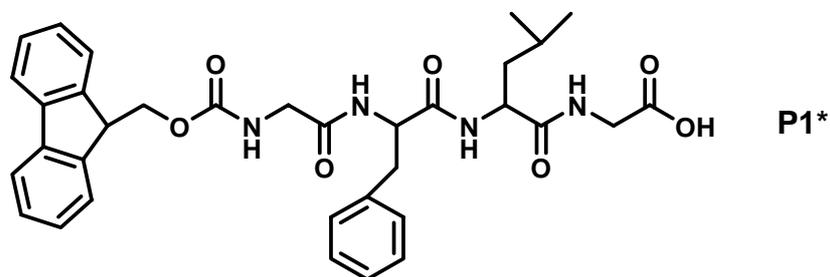
18442.6 g/mol (berechnet mit Hilfe von ^[152])

Ausbeute: 76.3 mg ($4.1 \cdot 10^{-3}$ mmol, 90 %)

MALDI-TOF-MS (6000-26000) m/z : 18462.3 (M + H⁺), 9231.1 (M + H⁺/2).

6.6.2 Synthese enzymatisch abbaubarer Peptidlinker

Synthese von (2-{2-[2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl-amino)-acetylamino]-3-phenyl-propionylamino}-4-methyl-pentanoylamino)-essigsäure (Fmoc-NH-Gly-Phe-Leu-Gly-OH) **P1***



Mit (9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-essigsäure (Fmoc-Gly) belegtes TCP Harz (200 mg, 0.61 mmol/g, 0.122 mmol) ergibt nach **AVV3** und **AVV4b** und Lyophilisieren einen weißen Feststoff.

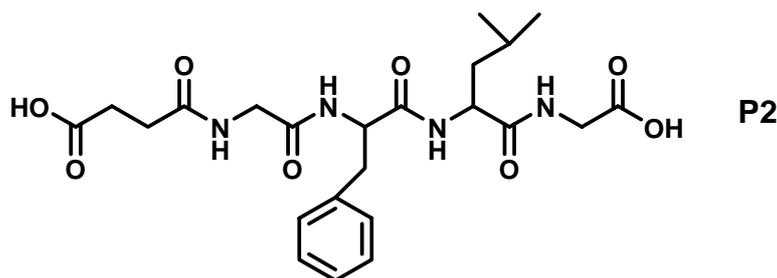
$C_{34}H_{38}N_4O_7$: 614.69 g/mol

Ausbeute: 66.7 mg (0.109 mmol, 89 % (bezogen auf Harzbelegung))

HPLC: (10-90 % in 30 min) $R_t = 14.37$ min

ESI-MS m/z: 615.3 (50) $[M + H^+]$, 637.4 (100) $[M + Na^+]$, 1229.1 (26) $[2M + H^+]$, 1251.2 (96) $[2M + Na^+]$.

Synthese von N-({1-[1-(Carboxymethylcarbamoyl)-3-methyl-butyl-carbamoyl]-2-phenyl-ethylcarbamoyl}-methyl)-Bernsteinsäure P2 ^[155]

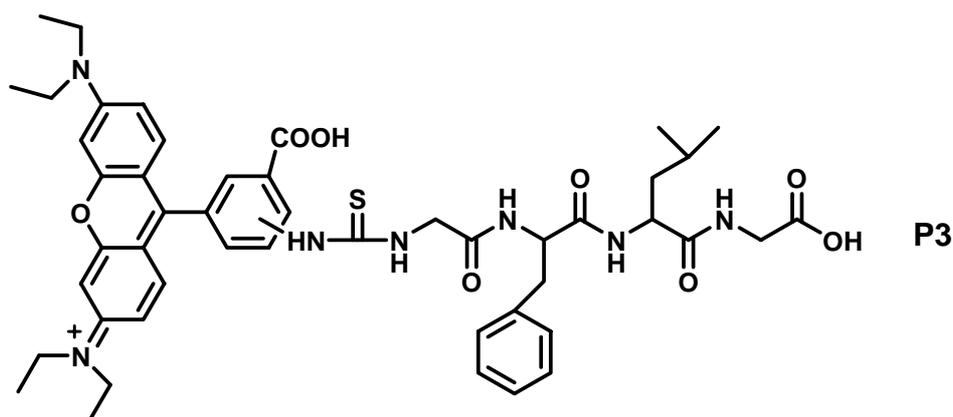


Das an der Festphase synthetisierte Tetrapeptid **P1** (100 mg, 0.61 mmol/g, 0.061 mmol) wird zuerst gemäß **AVV2** entschützt und die Spritze wird fünfmal je eine Minute mit DMF gewaschen. Anschließend werden zwei Äquivalente Bernsteinsäureanhydrid (Dihydro-2,5-furandion) (12.2 mg, 0.122 mmol) gelöst in 2 mL einer 1:1 Mischung aus Pyridin und DMF, zugegeben und 5 h geschüttelt.

$C_{23}H_{32}N_4O_8$: 492.52 g/mol

HPLC: (10-90 % in 30 min) $R_t = 9.34$ min

ESI-MS m/z: 493.3 (40) $[M + H^+]$, 516.4 (55) $[M + Na^+]$, 985.2 (28) $[2M + H^+]$, 1007.2 (100) $[2M + Na^+]$.

Synthese von Rhodamin-Gly-Phe-Leu-Gly-OH P3

Mit Verbindung **P1** beladenes TCP-Harz (50 mg, 0.61 mmol/g, 0.031 mmol) wird unter Lichtausschluss gemäß **AVV2** entschützt und anschließend mit 2 Äquivalenten Rhodamin B Isothiocyanat (RBITC) (32.7 mg, 0.061 mmol), 20 Äquivalenten an DIPEA (108 μ L, 0.62 mmol) umgesetzt. Die Abspaltung vom Harz nach **AVV5b**, HPLC-Reinigung (50-90 % in 30 min) und Lyophilisieren ergibt das TFA-Salz von **6** als dunkelroten Feststoff.

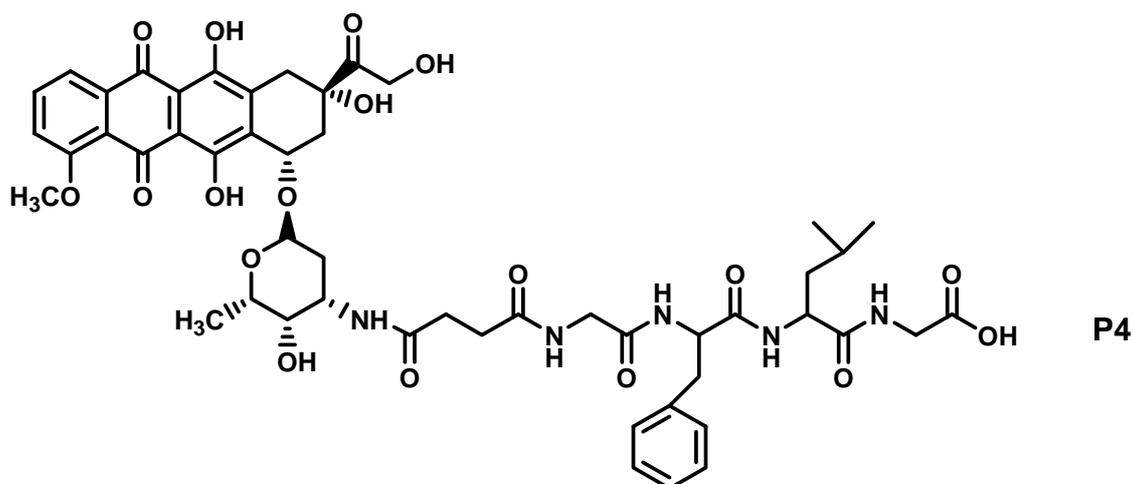
$C_{48}H_{58}N_7O_8S^*TFA$: 893.08*114.02 g/mol

Ausbeute: 21.1 mg (0.021 mmol, 68 %)

HPLC: (10-90 % in 30 min) $R_t = 11.72$ min und 12.36 min (Isomere-Mischung)

ESI-MS m/z: 892.5 (100) [M^+].

Synthese von Dox-Gly-Phe-Leu-Gly-OH P4



Mit Verbindung **P2** beladenes TCP Harz (25 mg, 0.61 mmol/g, 0.015 mmol) wird unter Lichtausschluss nach **AVV3** mit 2 Äquivalenten an Doxorubicinhydrochlorid (17.4 mg, 0.03 mmol) umgesetzt. Die Abspaltung vom Harz nach **AVV5b**, HPLC-Reinigung (40-90 % in 30 min) und Lyophilisieren ergibt das TFA-Salz von **P4** als rötlichen Feststoff.

$C_{50}H_{59}N_5O_{18} \cdot TFA$: 1018.03*114.02 g/mol

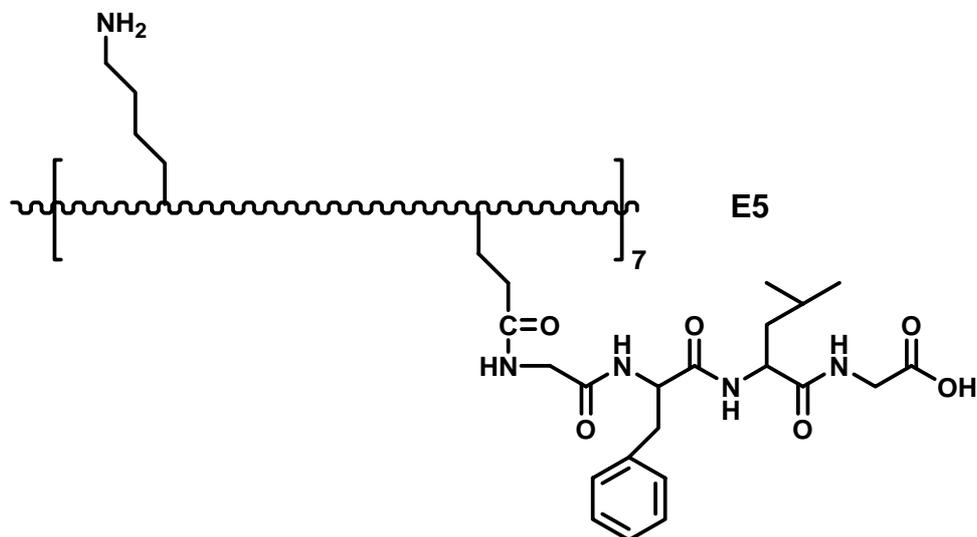
Ausbeute: 9.2 mg (0.0081 mmol, 54 %)

HPLC: (10-90 % in 30 min) $R_t = 11.46$ min

ESI-MS m/z: 1018.1 (10) $[M + H^+]$, 1040.1 (30) $[M + Na^+]$, 1056.3 (100) $[M + K^+]$
529.3 (14) $[(M + H^+ + K^+)/2]$.

6.6.3 Testung der Kupplungsreagenzien

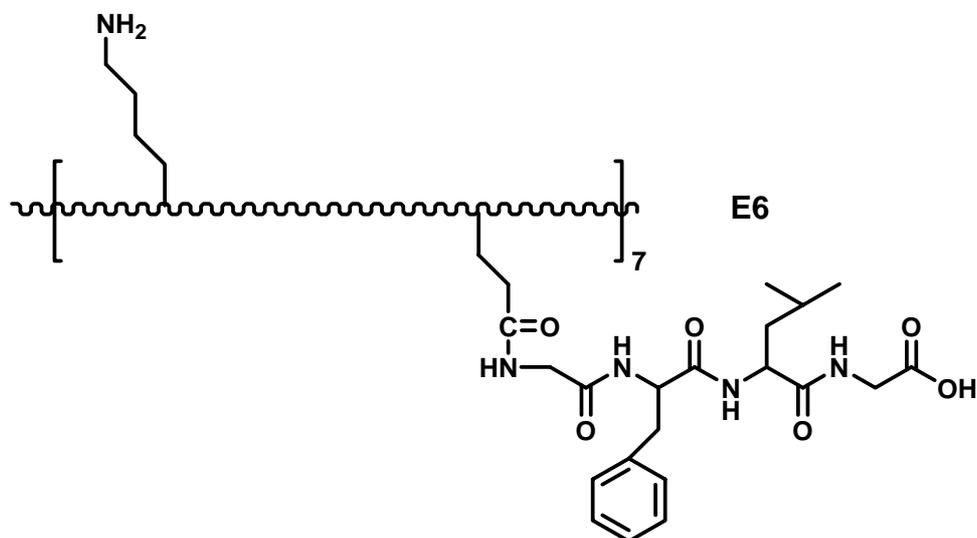
Synthese von **E5** mit EDC*HCl (*N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimidhydrochlorid)



E3 (10 mg, $5.4 \cdot 10^{-4}$ mmol) wird mit 1.1*8 Äquivalenten an EDC*HCl (0.9 mg, $4.7 \cdot 10^{-3}$ mmol) und 1.1*8 Äquivalenten an DIPEA (0.9 μ L, $4.7 \cdot 10^{-3}$ mmol) in 500 μ L H₂O_{dd} eine halbe Stunde voraktiviert. Anschließend gibt man 1.1*8 Äquivalente an **P1** (2.9 mg, $4.7 \cdot 10^{-3}$ mmol) zu. Nach Aufreinigung über Dialyse in basischen Medium (pH = 10) (MWCO: 3000 g/mol) und Lyophilisieren erhält man **E5** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 8.5 mg

MALDI-TOF-MS (6000-26000) m/z : 18581.3 (M + H⁺), 9290.2 ((M + 2H⁺)/2) nur Eduktpeaks.

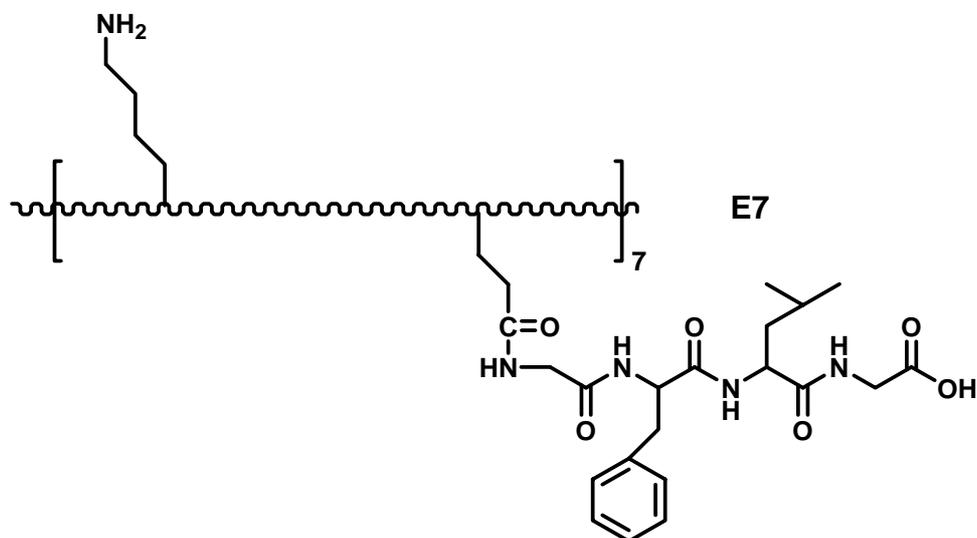
Synthese von E6 mit HATU & HOAT (O-(7-Azabenzotriazol-1yl)-N,N,N',N-tetramethyluronium-hexafluorophosphat & 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol)

E3 (10 mg, $5.4 \cdot 10^{-4}$ mmol) wird mit 1.1*8 Äquivalenten an HATU (1.8 mg, $4.7 \cdot 10^{-3}$ mmol) und HOAT (0.64 mg, $4.7 \cdot 10^{-3}$ mmol) und 30 Äquivalenten an 2,4,6 Collidin (2.1 μ L, 0.0162 mmol) in 500 μ L tr. DMF eine halbe Stunde voraktiviert. Anschließend gibt man 1.1*8 Äquivalente an **P1** (2.9 mg, $4.7 \cdot 10^{-3}$ mmol) zu. Nach Aufreinigung im basischen Medium über Dialyse (MWCO: 3000 g/mol) und Lyophilisieren erhält man **E6** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 7.8 mg

MALDI-TOF-MS (6000-26000) m/z : 18469.8 (M + H⁺), 18857.7 ((M + GFLG) + H⁺), 19220.8 ((M + 2GFLG) + H⁺), 19555.12 ((M + 3GFLG) + H⁺).

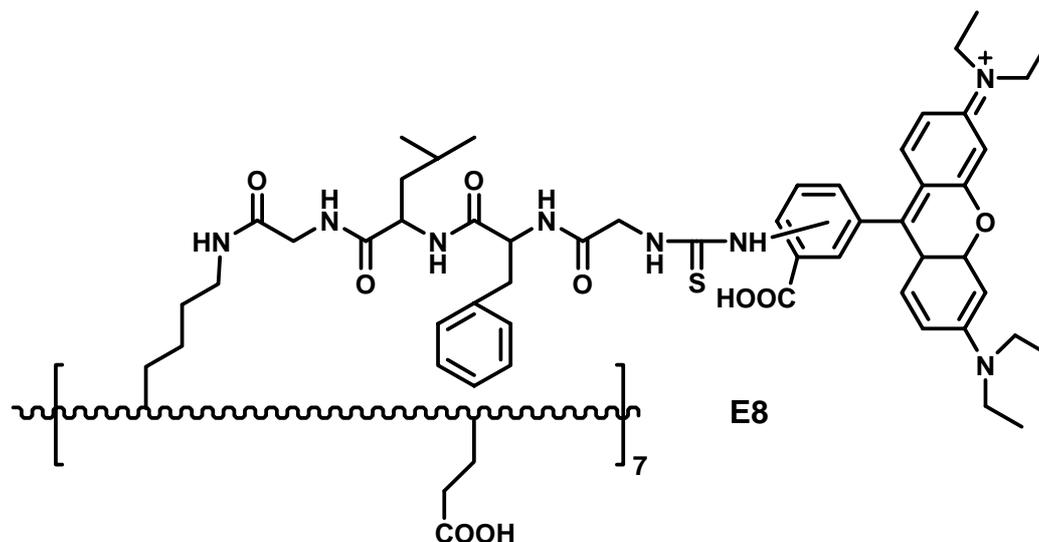
Synthese von E7 mit PyBOP & HOBT ((Benzotriazo-1-yloxy)-tris-(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat & 1-Hydroxy-benzotriazol)



E3 (10 mg, $5.4 \cdot 10^{-4}$ mmol) wird mit 1.1*8 Äquivalenten an PyBOP (2.45 mg, $4.7 \cdot 10^{-3}$ mmol) und HOBT (0.64 mg, $4.7 \cdot 10^{-3}$ mmol) und 30 Äquivalenten an 2,4,6 Collidin (2.1 μ L, 0.0162 mmol) in 500 μ L tr. DMF eine halbe Stunde voraktiviert. Anschließend gibt man 1.1*8 Äquivalente an **P1** (2.9 mg, $4.7 \cdot 10^{-3}$ mmol) zu. Nach Aufreinigung im basischen Medium (pH = 10) über Dialyse (MWCO: 3000 g/mol) und Lyophilisieren erhält man **E7** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 7.5 mg

MALDI-TOF-MS (6000-26000) m/z : 18469.8 (M + H⁺), 18841.7 ((M + GFLG) + H⁺), 19217.8 ((M + 2GFLG) + H⁺), 19592.1 ((M + 3GFLG) + H⁺), 19970.1 ((M + 3GFLG) + H⁺), 20335.2 ((M + 3GFLG) + H⁺).

6.6.4 Synthese der Endverbindung Rhodamin-GFLG-[EMM]₇ E8

Die Verbindung **E8** wird nach **AVV6** unter Lichtausschluss synthetisiert. **E3** (10 mg, $5.4 \cdot 10^{-4}$ mmol) wird mit 1.1 *8 Äquivalent an Kupplungsreagenzien (PyBOP: 2.5 mg, $4.7 \cdot 10^{-3}$ mmol, HOBT: 0.63 mg, $4.7 \cdot 10^{-4}$ mmol) und 30 Äquivalenten an 2,4,6-Collidin (2.1 μ L, 0.0162 mmol) voraktiviert. Nach einer halben Stunde gibt man **P3** (4.7 mg, $4.7 \cdot 10^{-3}$ mmol) zu und rührt 24 h. Die Aufreinigung erfolgt mittels Dialyse (MWCO: 3000 g/mol) und ergibt nach Lyophilisieren aus H₂O einen weinroten Feststoff.

Ausbeute: 10.6 mg

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆ / TMS): δ in ppm = 8.41-7.66 (NH) 7.43-7.17 (aromat. *H*-Phe und aromat. *H*-Rhodamin), 6.63-6.44 (aromat. *H*-Rhodamin), 4.57-4.07 (Phe- α CH, Leu- α CH, Pro- α CH, Val₁- α CH, Lys- α CH, Glu- α CH, Val₂- α CH), 3.74 (Gly- α CH₂), 3.60-3.50 (Pro- δ CH₂, (-N-(CH₃)₂-), 2.83 (Lys- ϵ CH₂), 2.26 (Pro- β CH₂, Glu- γ CH₂), 2.16-1.64 (Val_{1,2}- β CH, Pro- γ CH₂, Lys- β CH₂, Glu- β CH₂, Ile- β CH₂, Ile- γ CH₂, Lys- δ CH₂), 1.38 (Lys- γ CH₂), 1.30-1.05 (Leu- β CH₃, Leu- γ CH₃, N-CH₂-CH₃), 0.84 (Val_{1,2}- γ CH₃, Ile- γ CH₃, Ile- δ CH₃, Leu- δ CH₃). Phe- β CH₂ durch Lösemittelsignale überdeckt.

Beladungsfaktor: ~ 4.3 Rhodamin-Einheiten im Konjugat nach NMR-Integration

Beladungsfaktor: ~ 4.2 Rhodamin-Einheiten im Konjugat nach UV-Messung

Beladungsfaktor: ~ 4.9 Doxorubicin-Einheiten im Konjugat nach NMR-Integration

Beladungsfaktor: ~ 4.8 Doxorubicin-Einheiten im Konjugat nach UV-Messungen

UV/VIS: Absorptionsmaximum bei $\lambda = 495$ nm gemessen in Methanol bei 20 °C

6.7 Synthese der biologisch aktiven Hydrogele

6.7.1 Synthese der 1–1 Konjugate mit Cys–[EMM]₇ (E4)

Reduktion und Fällung von oxidiertem E4 mit 1,4-Dithiothreitol (DTT)

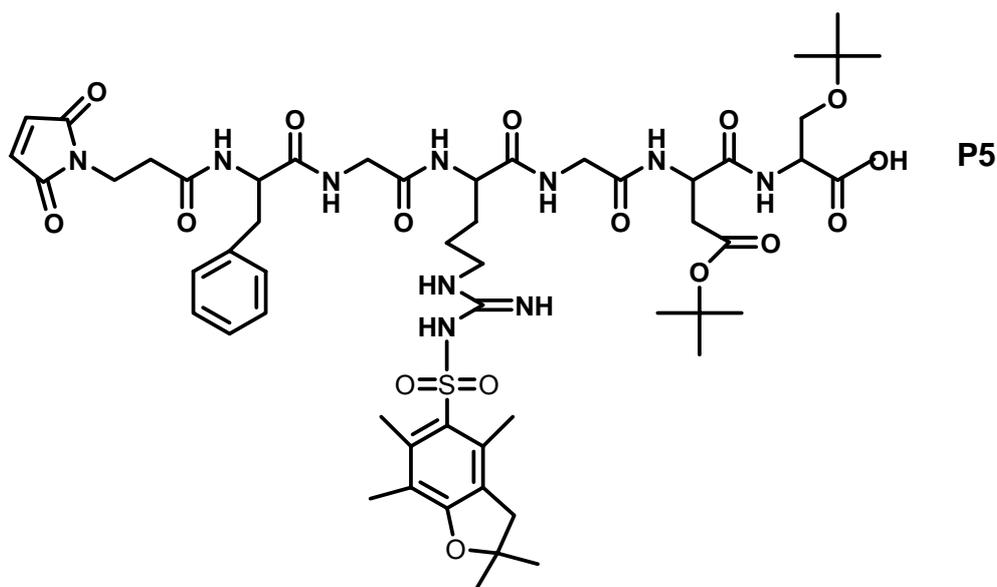
E4 (16 mg, $8.7 \cdot 10^{-4}$ mmol) werden in 10 mL Puffer B (pH 11, 100 mM Na₂CO₃, 1 M NaCl, 200 mM DTT) gelöst und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Um überschüssiges DTT zu entfernen, wird das reduzierte Cys-Elastin durch eine Erhöhung der Salzkonzentration auf 3 M NaCl (Zugabe von 1.17 g (0.02 mol) NaCl) gefällt. Man lässt bei 40 °C 15 min inkubieren und zentrifugiert dann ab (9000 rpm, 10 min, 35 °C), dieser Schritt wird dreimal wiederholt.

Ausbeute: 14 mg

Der Ellman-Assay

Der Ellman-Assay wird zur Detektion und Quantifizierung freier Thiolgruppen durchgeführt. Hierzu werden Proteinlösungen geeigneter Konzentration in Puffer A (pH 6.8, 100 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) hergestellt. Je 1 mL Probe-lösung wird in einer Messküvette (Schichtdicke $d = 1$ cm) mit 50 μ L 3 mM DTNB Lösung (ebenfalls in Puffer A) versetzt. Die Absorptionsspektren werden im Bereich von 350 nm bis 500 nm aufgenommen und die Maxima bei 412 nm bestimmt. Die Konzentration reduziert vorliegender Thiol-Gruppen kann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt werden (Absorptionskoeffizient von NTB: $\epsilon_{412\text{nm}} = 13600$ M⁻¹cm⁻¹).

Synthese von P5

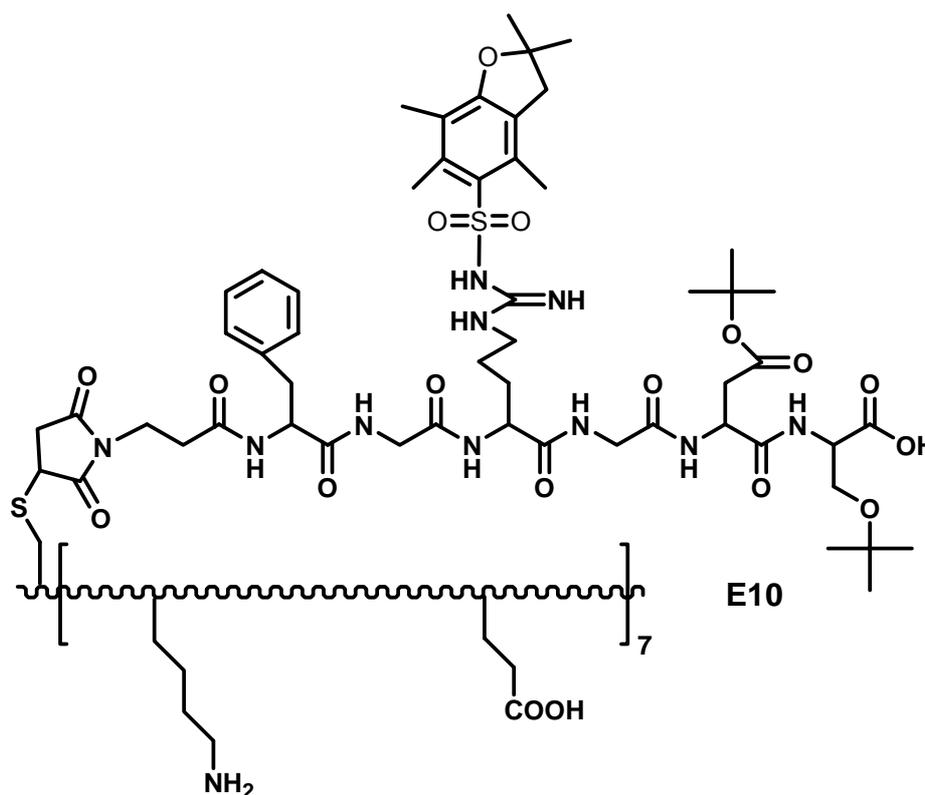


Das an der Festphase synthetisierte Hexapeptid **P6** (236 mg, 0.72 mmol/g, 0.17 mmol) wird zuerst gemäß **AVV2** entschützt und die Spritze wird fünfmal je eine Minute mit DMF gewaschen. Anschließend werden 33.3 mg an Maleinsäureanhydrid (0.34 mmol, 2 Äq.) in 1.75 mL DMF gelöst. Nach Zugabe von 154 μ L (0.88 mmol, 5.2 Äq.) DIPEA wird die Lösung in das Schüttelgefäß gegeben. Man lässt 40 min schütteln und wäscht anschließend mit DMF.

$C_{54}H_{76}N_{10}O_{16}S$: 1153.5 g/mol

Ausbeute: 135.1 mg (0.116 mmol, 68 %)

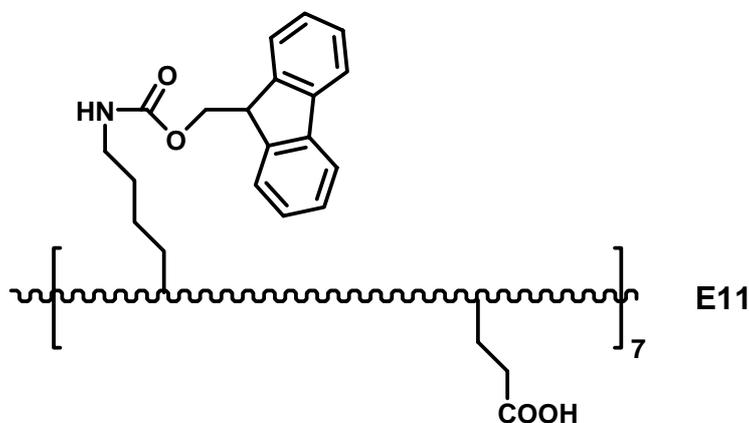
MS (ESI) m/z (%): 1153.5 (100) [$m + H^+$], 1175.5 (29) [$m + Na^+$].

Kupplung von P5 mit reduziertem Cys-[EMM]₇

Reduziertes **E4** (14 mg, $7.6 \cdot 10^{-4}$ mmol) wird in 10 mL Puffer A (pH 6.8, 100 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) aufgenommen. Man gibt 8.8 mg ($7.6 \cdot 10^{-3}$ mmol, 10 Äq.) von **P5** gelöst in 5 mL Puffer A zu und lässt über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Die Aufreinigung erfolgt mittels Dialyse (MWCO: 3000 g/mol) und ergibt nach Lyophilisieren aus H_2O einen weißen Feststoff.

Ausbeute: 12 mg

MALDI-TOF-MS (6000-26000) m/z : 18462.8 ($\text{M} - \text{P5} + \text{H}^+$), 19501.3 ($\text{M} + \text{H}^+$), 9750.5 ($(\text{M} + 2\text{H}^+)/2$).

6.7.2 Schützungen von [EMM]₇ (E3)Fmoc-Schätzung der freien Amine von E3 (Fmoc-[EMM]₇, E11)^[116]

E3 (30 mg, $1.6 \cdot 10^{-3}$ mmol) wird in 7.5 mL einer 10 %igen Na_2CO_3 -Lösung (pH = 9) unter Eiskühlung vorgelegt. Anschließend wird in 1.5 mL Dioxan gelöstes 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (Fmoc-Cl) (5 x 8 Äq., 16.6 mg, $6.4 \cdot 10^{-2}$ mmol) tropfenweise zugegeben und die Mischung wird bei RT 24 h gerührt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Dialyse (MWCO: 3000 g/mol) und ergibt nach Lyophilisieren aus $\text{H}_2\text{O}/\text{tert}$ -Butanol einen weißen Feststoff.

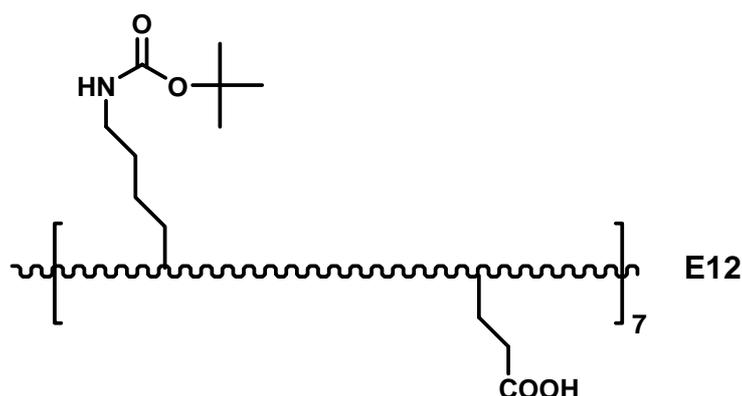
Ausbeute: 25 mg ($1.3 \cdot 10^{-3}$ mmol (Beladungsfaktor 5.3), 81 %)

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d_6 / TMS): δ in ppm = 8.41-7.60 (NH, aromat. H-Fmoc), 7.45-7.21 (aromat. H-Fmoc), 4.45-4.05 (Pro- αCH , Val₁- αCH , Lys- αCH , Glu- αCH , Val₂- αCH , H-Fmoc), 3.74 (Gly- αCH_2), 3.57 (Pro- δCH_2), 2.93 (Lys- ϵCH_2), 2.28-2.21 (Pro- βCH_2 , Glu- γCH_2) 2.14-1.69 (Val_{1,2}- βCH , Pro- γCH_2 , Lys- βCH_2 , Glu- βCH_2 , Ile- βCH_2 , Ile- γCH_2 , Lys- δCH_2), 1.24 (Lys- γCH_2), 0.83 (Val_{1,2}- γCH_3 , Ile- γCH_3 , Ile- δCH_3).

Beladungsfaktor: ~ 5.2 Fmoc-Einheiten im Konjugat nach NMR-Integration

Beladungsfaktor: ~ 5.4 Fmoc-Einheiten im Konjugat nach UV-Messungen

UV/VIS: Absorptionsmaxima bei $\lambda = 289$ und 298 nm gemessen bei 20°C in DMF

Boc-Schützung der freien Amine E3 (Boc-[EMM]₇, E12) ^[156]

E3 (30 mg, $1.6 \cdot 10^{-3}$ mmol) wird in einer Lösung aus 50 % Dioxan, 25 % 1 M NaOH und 25 % H₂O mL unter Eiskühlung vorgelegt. Anschließend werden 5 x 8 Äquivalente an Di-*tert*-butyl-dicarbonat (Boc₂O) (5 x 8 Äq., 14.0 mg, $6.4 \cdot 10^{-2}$ mmol) zugegeben und die Mischung wird 24 h bei RT gerührt. Die Aufreinigung erfolgt mittels Gelfiltrationschromatographie und ergibt nach Lyophilisieren aus H₂O/*tert*-Butanol einen weißen Feststoff.

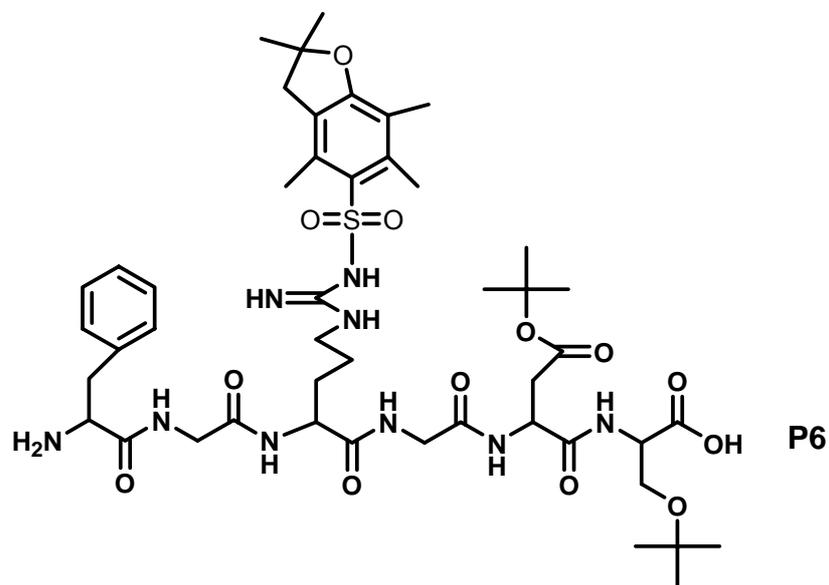
Ausbeute: 26 mg ($1.4 \cdot 10^{-3}$ mmol, 88 %)

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆ / TMS): δ in ppm = 8.41-7.60 (NH), 4.45-4.05 (Pro- α CH, Val₁- α CH, Lys- α CH, Glu- α CH, Val₂- α CH), 3.74 (Gly- α CH₂), 3.57 (Pro- δ CH₂), 2.93 (Lys- ϵ CH₂), 2.28-2.21 (Pro- β CH₂, Glu- γ CH₂) 2.14-1.69 (Val_{1,2}- β CH, Pro- γ CH₂, Lys- β CH₂, Glu- β CH₂, Ile- β CH₂, Ile- γ CH₂, Lys- δ CH₂), 1.33 (C-(CH₃)₃), 1.24 (Lys- γ CH₂), 0.83 (Val_{1,2}- γ CH₃, Ile- γ CH₃, Ile- δ CH₃).

Beladungsfaktor: ~ 5.9 Boc-Einheiten im Konjugat nach NMR-Integration

6.7.3 Synthese der linearen RGDs

Synthese des linearen RGDs P6 (OH-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-Phe-NH₂)



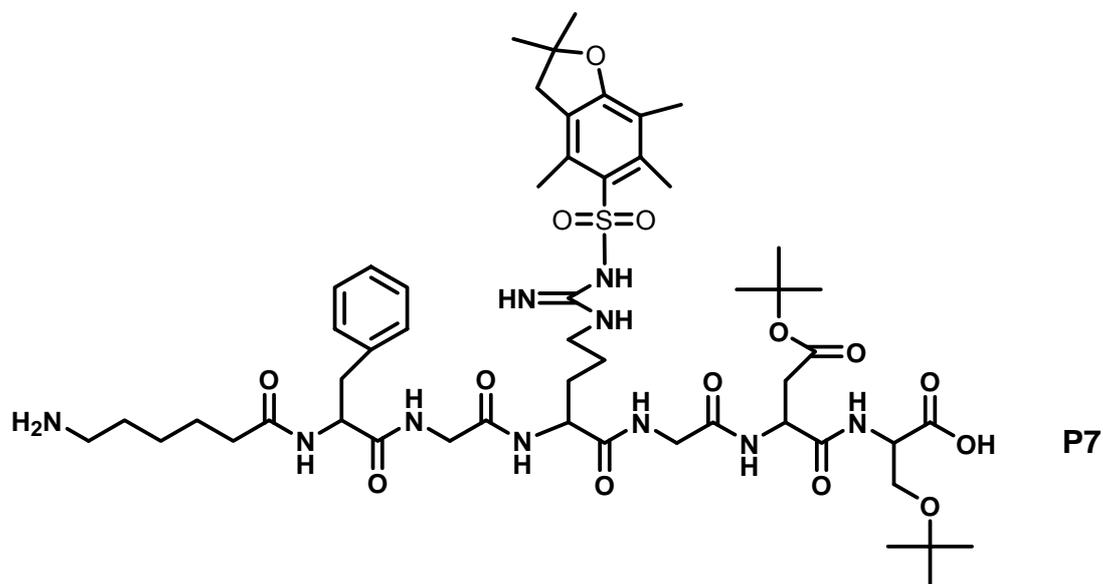
Mit 3-tert-Butoxy-2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-Propionsäure (Fmoc-Ser(tBu)) belegtes TCP Harz (200 mg, 0.59 mmol/g, 0.118 mmol) ergibt nach **AVV3** und **AVV4b** und Lyophilisieren einen weißen Feststoff.

$C_{47}H_{71}N_9O_{13}S$: 1002.2 g/mol

Ausbeute: 88.7 mg ($8.9 \cdot 10^{-2}$ mmol, 75 % bezogen auf Harzbelegung)

ESI-MS m/z: 1002.5 (100) [M + H⁺], 1024.4 (10) [M + Na⁺], 502.0 (50) [(2M + 2H⁺)/2], 521.0 (27) [(2M + H⁺ + K⁺)/2].

HPLC: (10-90 % in 30 min) $R_t = 11.81$ min

Synthese des linearen RGDs P7 (OH-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-Phe-Ahx-NH₂)

Mit 3-*tert*-Butoxy-2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-Propionsäure (Fmoc-Ser(tBu)) belegtes TCP Harz (200 mg, 0.59 mmol/g, 0.118 mmol) ergibt nach **AVV3** und **AVV4b** und Lyophilisieren einen weißen Feststoff.

$C_{53}H_{82}N_{10}O_{14}S$: 1115.3 g/mol

Ausbeute: 93.4 mg ($8.3 \cdot 10^{-2}$ mmol, 71 % bezogen auf Harzbelegung)

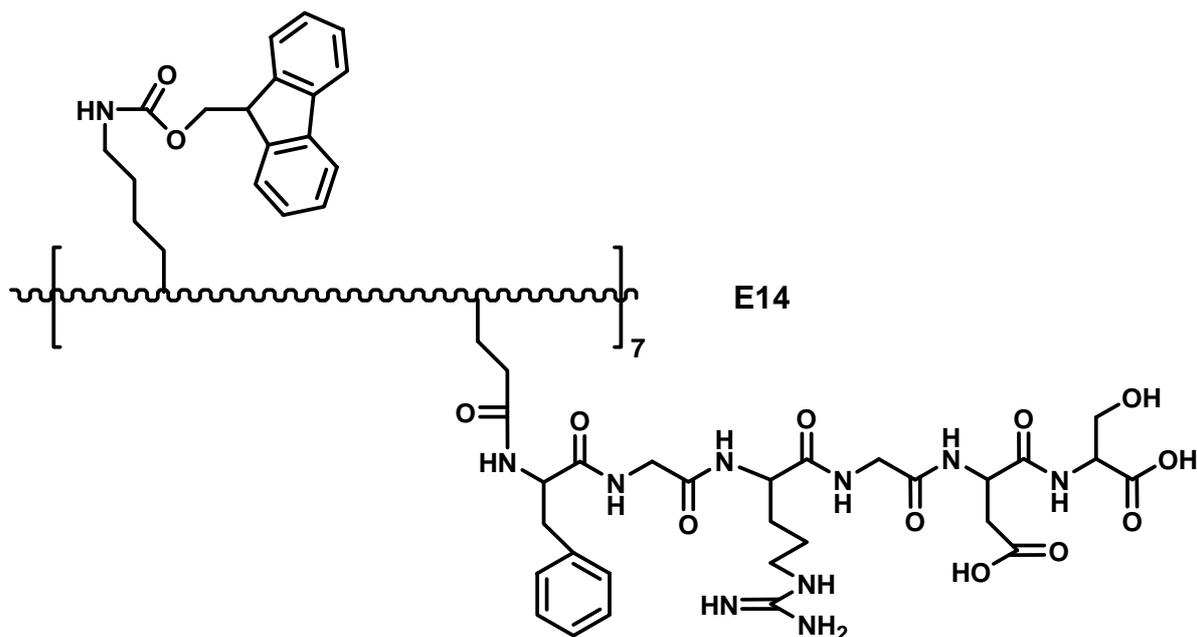
ESI-MS m/z: 1115.8 (83) [M + H⁺], 1137.6 (18) [M + Na⁺].

HPLC: (10-90 % in 30 min) $R_t = 10.56$ min

2.85-2.65 (Lys- ϵ CH₂, Arg- δ CH₂, Asp- β CH₂), 2.28-2.21 (Pro- β CH₂, Glu- γ CH₂) 2.14-1.69 (*H*-Pbf, Arg- β CH₂, Val_{1,2}- β CH, Pro- γ CH₂, Lys- β CH₂, Glu- β CH₂, Ile- β CH₂, Ile- γ CH₂, Lys- δ CH₂), 1.51-1.20 (*H*-Pbf, *H*-Boc, Arg- γ CH₂, Lys- γ CH₂), 1.11-1.04 (*H*-^tBu), 0.83 (Val_{1,2}- γ CH₃, Ile- γ CH₃, Ile- δ CH₃).

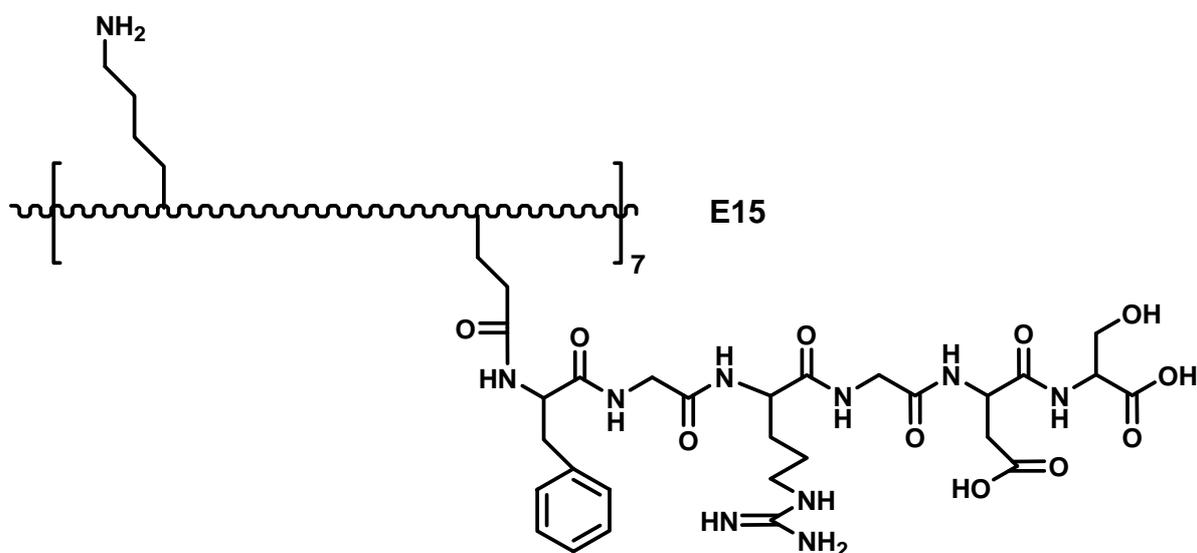
Beladungsfaktor: ~ 5.0 P6-Einheiten im Konjugat nach NMR-Integration

Synthese von E14



Die Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen von Verbindung **E13** (20 mg, $8.1 \cdot 10^{-4}$ mmol) erfolgt in 10 mL einer Mischung aus 95 % TFA, 2.5 % TIPS und 2.5 % H₂O. Das gewonnene Produkt wird anschließend dialysiert (gegen H₂O_{dd}) und lyophilisiert und gleich weiter umgesetzt zur nachfolgenden Verbindung.

Synthese von E15



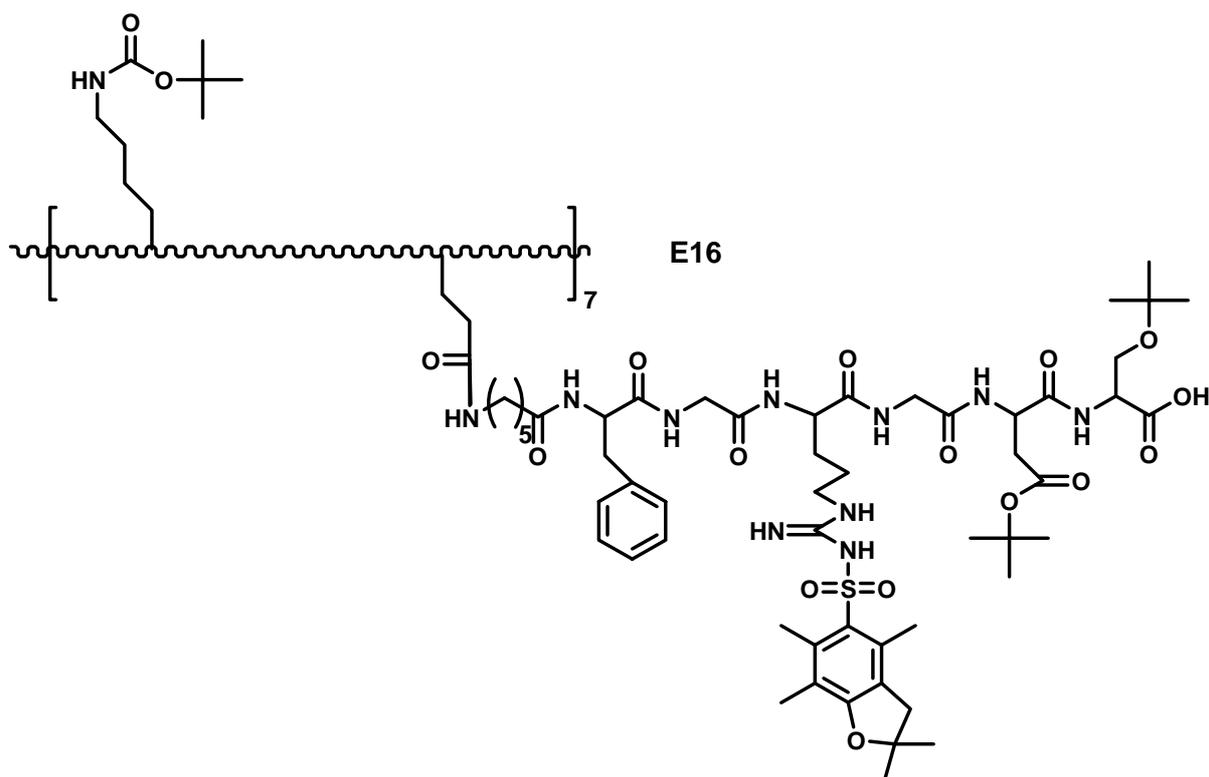
Die Abspaltung der basenlabilen Schutzgruppe Fmoc von Verbindung **E14** (18 mg, $7.9 \cdot 10^{-4}$ mmol) erfolgt in 10 mL einer Mischung aus 20 % DIEA in DMF. Das gewonnene Produkt wird anschließend dialysiert (gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$) und lyophilisiert.

Ausbeute: 11 mg ($5.1 \cdot 10^{-4}$ mmol (Beladungsfaktor 5.0), 64 %)

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, DMSO-d_6 / TMS): δ in ppm = 8.41-7.60 (NH), 7.45-7.18 (aromat. *H*-Phe), 4.45-4.05 (Asp- αH , Phe- αH , Pro- αCH , Arg- αCH , Ser- αCH , Val₁- αCH , Lys- αCH , Glu- αCH , Val₂- αCH), 3.74 (Gly- αCH_2 , Ser- βCH_2), 3.59 (Pro- δCH_2), 3.15-2.90 (Phe- βCH_2), 2.85-2.65 (Lys- ϵCH_2 , Arg- δCH_2 , Asp- βCH_2), 2.28-2.21 (Pro- βCH_2 , Glu- γCH_2) 2.14-1.69 (Arg- βCH_2 , Val_{1,2}- βCH , Pro- γCH_2 , Lys- βCH_2 , Glu- βCH_2 , Ile- βCH_2 , Ile- γCH_2 , Lys- δCH_2), 1.51-1.20 (Arg- γCH_2 , Lys- γCH_2), 0.83 (Val_{1,2}- γCH_3 , Ile- γCH_3 , Ile- δCH_3).

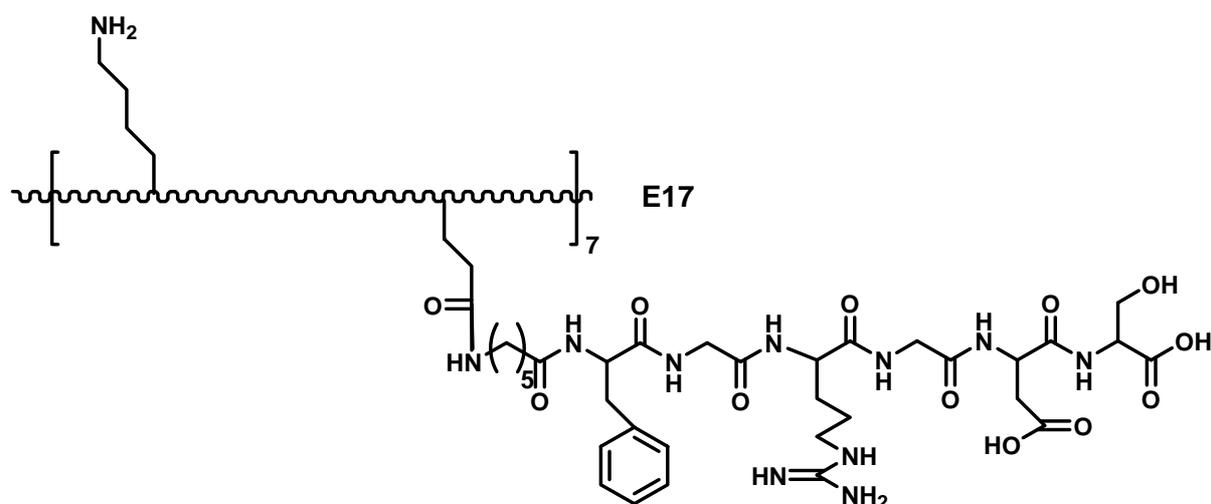
Beladungsfaktor: ~ 5.0 **P6**-Einheiten im Konjugat nach NMR-Integration

Synthese von E16 in Lösung



Die Umsetzung von 15 mg **E12** (Boc-[EMM]₇) ($1.1 \cdot 10^{-3}$ mmol) erfolgt mit $1.1 \cdot 8$ Äquivalenten an Kupplungsreagenzien (PyBOP: 5.0 mg, $8.8 \cdot 10^{-3}$ mmol, HOBT: 1.2 mg, $8.8 \cdot 10^{-4}$ mmol) und 30 Äquivalenten 2,4,6-Collidin (4.4 μ L, 0.033 mmol) in 500 μ L tr. DMF. Nach einer halben Stunde gibt man **P7** (21.6 mg, 0.019 mmol) zu und rührt 24h. Die Aufreinigung erfolgt mittels Dialyse (MWCO: 3000 g/mol) und ergibt nach Lyophilisieren aus H₂O/*tert*-Butanol einen weißen Feststoff, der sofort weiter umgesetzt wird.

Synthese von E17

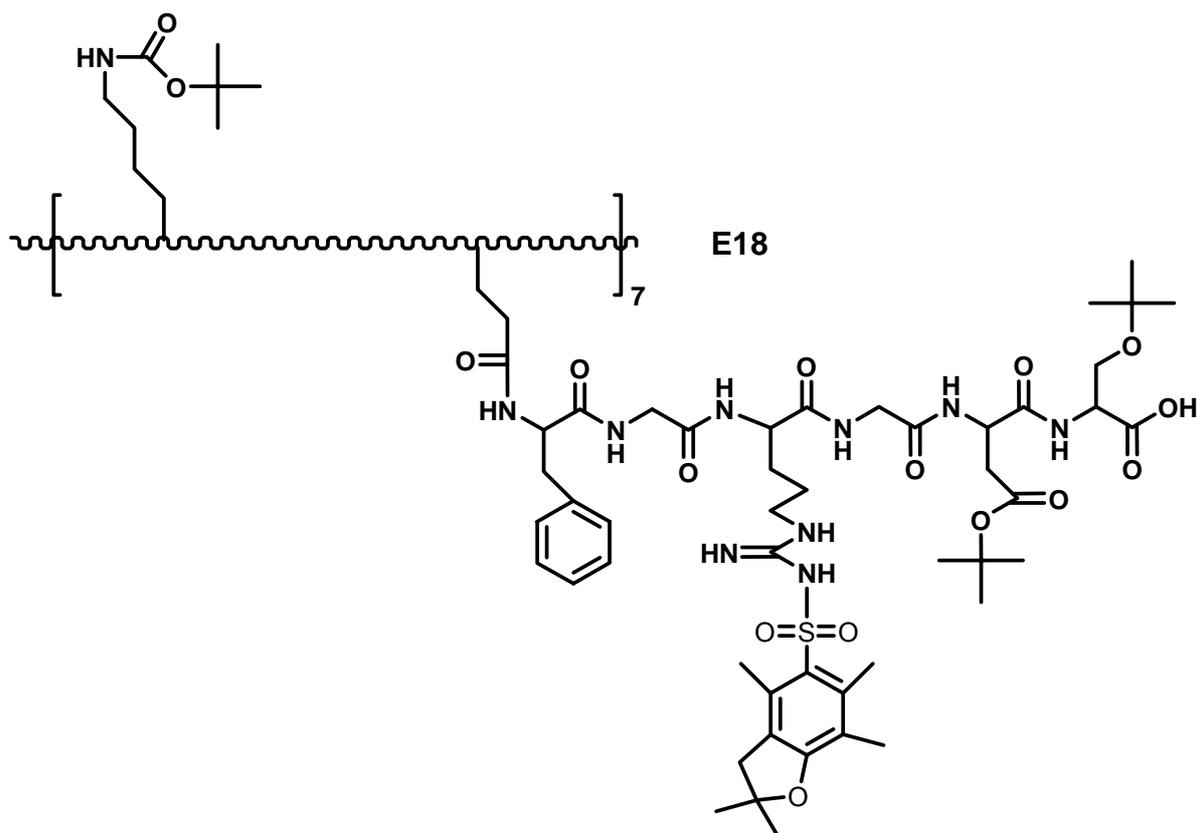


Die Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen von Verbindung **E16** (18 mg, $8.5 \cdot 10^{-4}$ mmol) erfolgt in 10 mL einer Mischung aus 95 % TFA, 2.5 % TIPS und 2.5 % H₂O. Das gewonnene Produkt wird anschließend dialysiert (gegen H₂O_{dd}) und lyophilisiert und man erhält einen weißen Feststoff.

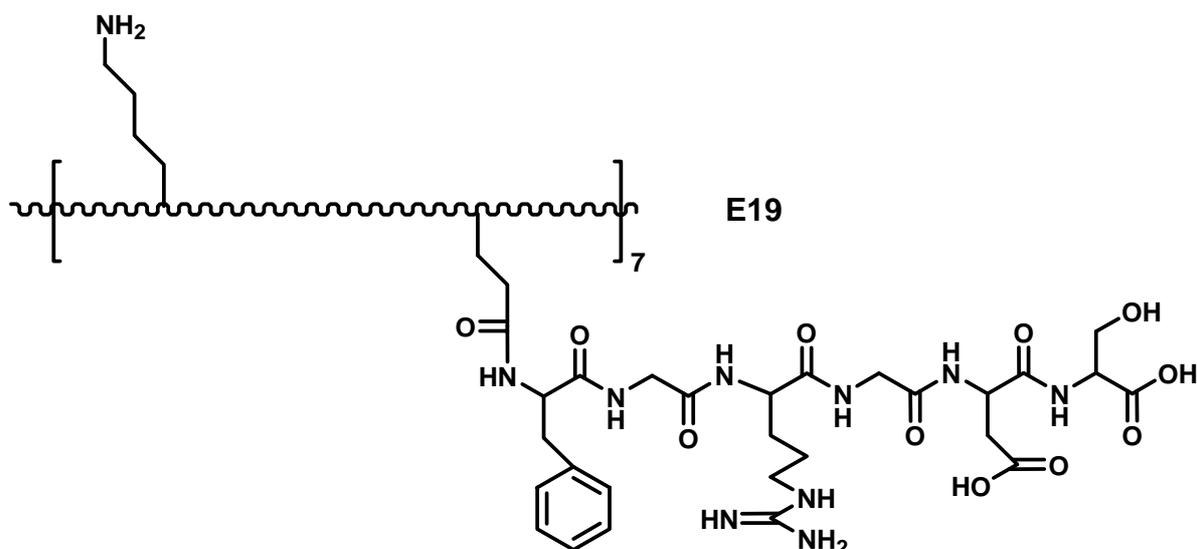
Ausbeute: 14 mg ($6.8 \cdot 10^{-4}$ mmol, 80 %)

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆ / TMS): δ in ppm = 8.41-7.60 (NH), 7.35-7.18 (aromat. *H*-Phe), 4.45-4.05 (Asp- α H, Phe- α H, Pro- α CH, Arg- α CH, Ser- α CH, Val₁- α CH, Lys- α CH, Glu- α CH, Val₂- α CH), 3.74 (Gly- α CH₂, Ser- β CH₂, Ahx- α CH₂), 3.59 (Pro- δ CH₂), 3.15-2.90 (Phe- β CH₂), 2.85-2.65 (Lys- ϵ CH₂, Arg- δ CH₂, Asp- β CH₂), 2.30-1.71 (Pro- β CH₂, Glu- γ CH₂, Arg- β CH₂, Val_{1,2}- β CH, Pro- γ CH₂, Lys- β CH₂, Glu- β CH₂, Ile- β CH₂, Ile- γ CH₂, Lys- δ CH₂), 1.41-1.20 (Ahx- β,γ,δ CH₂, Arg- γ CH₂, Lys- γ CH₂), 0.83 (Val_{1,2}- γ CH₃, Ile- γ CH₃, Ile- δ CH₃).

Beladungsfaktor: ~ 2.0 **P7**-Einheiten im Konjugat nach NMR-Integration

Synthese von Boc-(ELP)₇-FGRGDS geschützt in Lösung E18

Die Umsetzung von 15 mg **E12** (Boc-[EMM]₇) ($1.1 \cdot 10^{-3}$ mmol) erfolgt mit $1.1 \cdot 8$ Äquivalenten an Kupplungsreagenzien (PyBOP: 5.0 mg, $8.8 \cdot 10^{-3}$ mmol, HOBT: 1.2 mg, $8.8 \cdot 10^{-4}$ mmol) und 30 Äquivalenten 2,4,6-Collidin (4.4 μ L, 0.033 mmol) in 500 μ L tr. DMF. Nach einer halben Stunde gibt man 3 Äq. an **P7** (29.4 mg, 0.026 mmol) zu und rührt 24h. Die Aufreinigung erfolgt mittels Dialyse (MWCO: 3000 g/mol) und ergibt nach Lyophilisieren aus H₂O/*tert*-Butanol einen weißen Feststoff, der gleich weiter umgesetzt wird.

Synthese von (ELP)₇-FGRGDS entschützt in Lösung E19

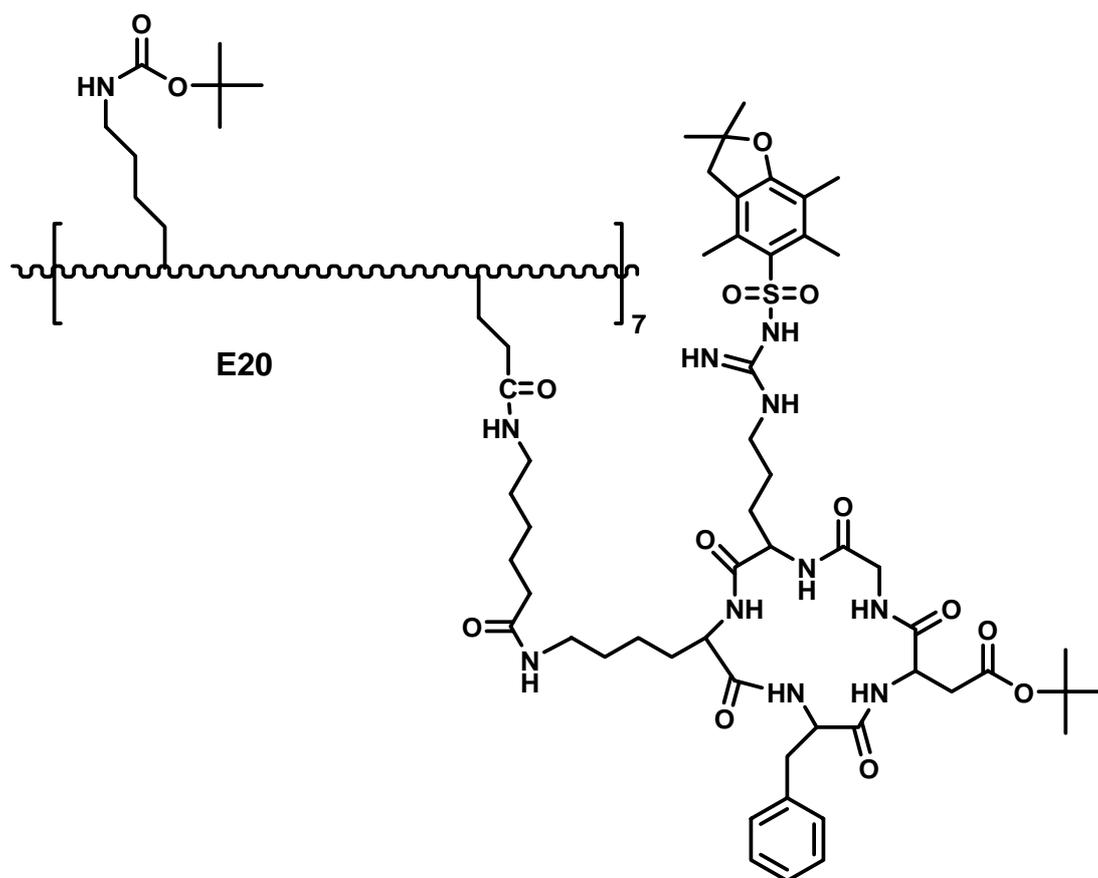
Die Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen von Verbindung **E18** (13 mg, $5.4 \cdot 10^{-4}$ mmol) erfolgt in 10 mL einer Mischung aus 95 % TFA, 2.5 % TIPS und 2.5 % H₂O. Das gewonnene Produkt wird anschließend dialysiert (gegen H₂O_{dd}) und lyophilisiert. Man erhält einen weißen Feststoff.

Ausbeute: 10 mg ($4.3 \cdot 10^{-4}$ mmol, 80 %)

¹H-NMR: (300 MHz, DMSO-d₆ / TMS): δ in ppm = 10.51 (COOH), 8.41-7.60 (NH), 7.35-7.23 (aromat. *H*-Phe), 4.45-4.05 (Asp- α H, Phe- α H, Pro- α CH, Arg- α CH, Ser- α CH, Val_{1,2}- α CH, Lys- α CH, Glu- α CH), 3.74 (Gly- α CH₂, Ser- β CH₂), 3.59 (Pro- δ CH₂), 3.15-2.90 (Phe- β CH₂), 2.85-2.65 (Lys- ϵ CH₂, Arg- δ CH₂, Asp- β CH₂), 2.30-1.71 (Pro- β CH₂, Glu- γ CH₂, Arg- β CH₂, Val_{1,2}- β CH, Pro- γ CH₂, Lys- β CH₂, Glu- β CH₂, Ile- β CH₂, Ile- γ CH₂, Lys- δ CH₂), 1.42-1.21 (Arg- γ CH₂, Lys- γ CH₂), 0.83 (Val_{1,2}- γ CH₃, Ile- γ CH₃, Ile- δ CH₃).

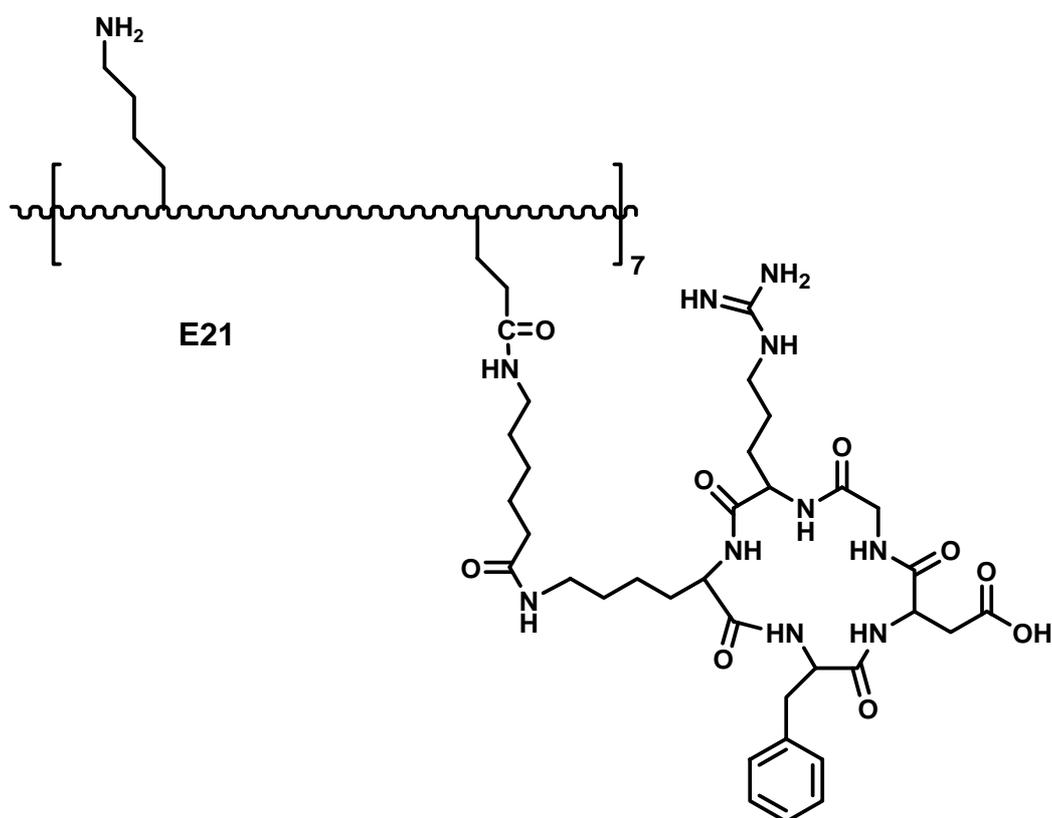
Beladungsfaktor: ~ 5.0 **P7**-Einheiten im Konjugat nach NMR-Integration

Synthese von E20 in Lösung



Die Umsetzung von 15 mg **E12** (Boc-[EMM]₇) ($1.1 \cdot 10^{-3}$ mmol) erfolgt mit $1.1 \cdot 8$ Äquivalenten an Kupplungsreagenzien (PyBOP: 5.0 mg, $8.8 \cdot 10^{-3}$ mmol, HOBt: 1.2 mg, $8.8 \cdot 10^{-4}$ mmol) und 30 Äquivalenten 2,4,6-Collidin (4.4 μ L, 0.033 mmol) in 500 μ L tr. DMF. Nach einer halben Stunde gibt man **P8** (19.5 mg, 0.019 mmol) zu und rührt 24h. Die Aufreinigung erfolgt mittels Dialyse (MWCO: 3000 g/mol) und ergibt nach Lyophilisieren aus H₂O/*tert*-Butanol einen weißen Feststoff, der gleich weiter umgesetzt wird.

Synthese von E21 in Lösung



Die Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen von Verbindung **E20** (14 mg, $6.6 \cdot 10^{-4}$ mmol) erfolgt in 10 mL einer Mischung aus 95 % TFA, 2.5 % TIPS und 2.5 % H_2O . Das gewonnene Produkt wird anschließend dialysiert (gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$) und lyophilisiert. Man erhält einen weißen Feststoff.

Ausbeute: 11 mg ($5.4 \cdot 10^{-4}$ mmol, 82 %)

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, DMSO-d_6 / TMS): δ in ppm = 8.41-7.55 (NH), 7.3-7.15 (aromat. *H*-Phe), 4.45-4.05 (Asp- αH , Phe- αH , Pro- αCH , Arg- αCH , Val_{1,2}- αCH , Lys- αCH , Glu- αCH), 3.78-3.69 (Gly- αCH_2 , Ahx- αCH_2), 3.60 (Pro- δCH_2), 3.15-2.90 (Phe- βCH_2), 2.85-2.65 (Lys- ϵCH_2 , Asp- βCH_2), 2.30-1.71 (Pro- βCH_2 , Glu- γCH_2 , Arg- βCH_2 , Val_{1,2}- βCH , Pro- γCH_2 , Lys- βCH_2 , Glu- βCH_2 , Ile- βCH_2 , Ile- γCH_2 , Lys- δCH_2), 1.42-1.21 (Arg- γCH_2 , Lys- γCH_2 , Ahx- $\beta,\gamma,\delta\text{CH}_2$), 0.84 (Val_{1,2}- γCH_3 , Ile- γCH_3 , Ile- δCH_3) Arg- δCH_2 Signale wurden durch Lösemittelsignale überdeckt.

Beladungsfaktor: ~ 2.0 P8-Einheiten im Konjugat nach NMR-Integration

sich ein grau-weißes, stabiles Hydrogel. Zum Entfernen des nicht reagierten Vernetzers und der Abspaltprodukte wird zur Reaktionsmischung 1 mL H₂O_{dd} gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis wird die überschüssige Flüssigkeit entfernt und der Vorgang zwei weitere Male wiederholt. Das Hydrogel wird in 1mL H₂O_{dd} bei 4 °C gelagert. Zur Konservierung über mehrere Wochen kann dem Wasser etwas Natriumazid (0.1 % (v/v)) zugesetzt werden.

Liste der vernetzten Verbindungen:

E3	V1
E15	V4
E22	V5
E21	V6
E19	V7
E17	V8

6.8 Zelladhäsionstests mit MC3T3–E1 –Mausosteoblasten

Um eine unspezifische Zellbindung zu verhindern, werden die Plättchen mit 5 % (w/v) BSA in PBS 90 min bei 37 °C geblockt. Die Zellen werden mit sterilem PBS gewaschen, mit Trypsin / EDTA abgelöst und anschließend 10 min bei 200 x g, 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden in Kulturmedium resuspendiert. Zur Feststellung der Zellzahl wird ein Aliquot Zellsuspension entnommen und mit Trypanblau (0.5 %) versetzt und in einer Neubauerkammer ausgezählt. Die Zellzahl wird nach erneuter Zentrifugation mit Zelllanhaftungspuffer (1 % (w/v) BSA im Kulturmedium der jeweiligen Zellen, ohne FCS) auf 5*10⁵ Zellen / mL eingestellt. Die geblockten Plättchen werden noch einmal gewaschen und anschließend werden 5*10⁵ Zellen pro Vertiefung vorsichtig ein pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C, 5 % CO₂, wird vorsichtig mit PBS pH 7.4 gewaschen und 250 µL Substratlösung (7.5 mM p-Nitrophenol-N-acetyl-β-D-glucosamin, 0.05 % (v/v) TWEEN-20 in 0.1 M CP-Puffer pH 5.0) und 250 µL PBS

pH 7.4 hinzu pipettiert. Anschließend wird für 2 h bei 37 °C inkubiert und danach die Umsetzung durch die Zugabe von 100 µL 5 mM EDTA in 0.2 M NaOH gestoppt. Zur Messung der Farbintensität werden 100 µL in eine 96-*well*-Platte transferiert und bei 405 nm im ELISA-Reader vermessen. Als Nullwert dienen unbeschichtete Vertiefungen.

Parallel wird zur Ermittlung der direkten Zellzahl eine Kalibrierkurve erstellt. Aus der Zellsuspension wird eine Verdünnungsreihe erstellt und ebenfalls 1 h bei 37 °C inkubiert, mit Substratlösung versetzt und weitere 2 h bei 37 °C inkubiert.

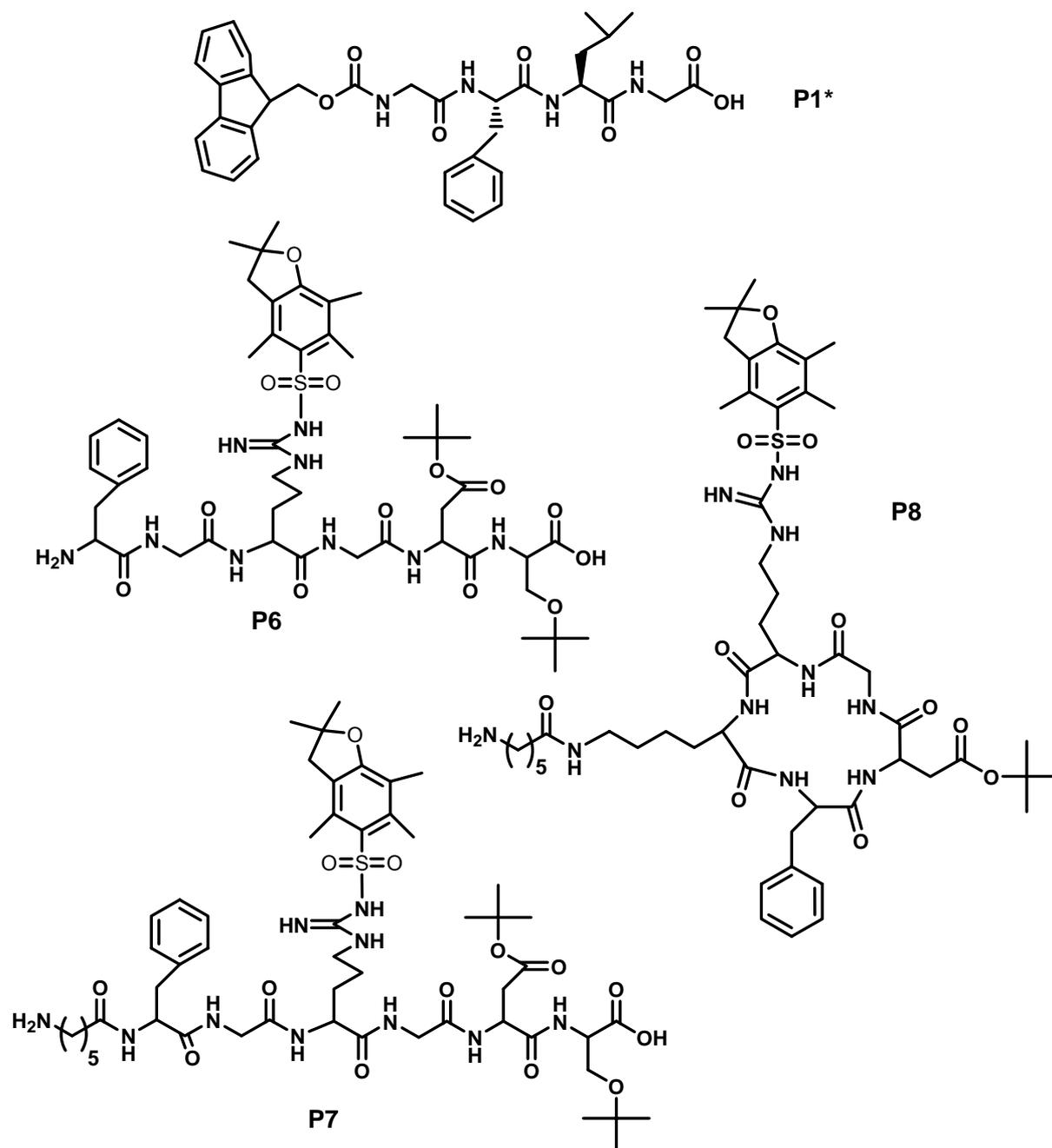
7 Anhang

7.1 Versuchsdaten

Abbildung 4-51: Blank (-2.62 ± 1.70), V1 (-4.52 ± 10.94), V2 (-6.90 ± 1.89), V3 (-6.90 ± 4.53), V4 (78.25 ± 8.79).

Abbildung 4-52: Blank (-1.37 ± 4.51), V1 (-11.49 ± 1.31), V5 (43.70 ± 0.99), V6 (55.98 ± 5.47), V7 (29.53 ± 13.29), V8 (24.83 ± 5.52).

7.2 Zusammenstellung der untersuchten Peptide

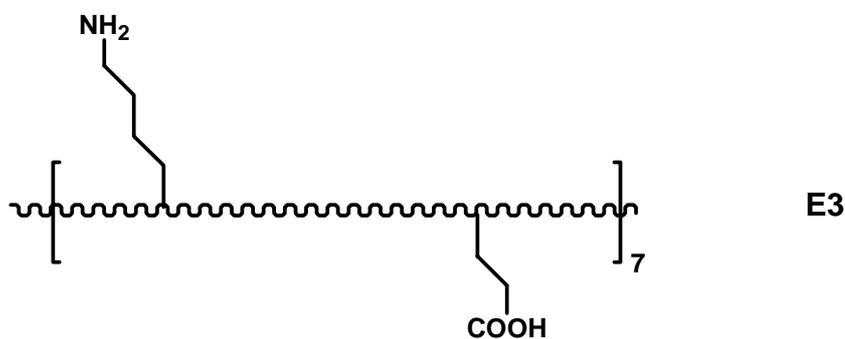


7.3 Zusammenstellung der untersuchten Elastine

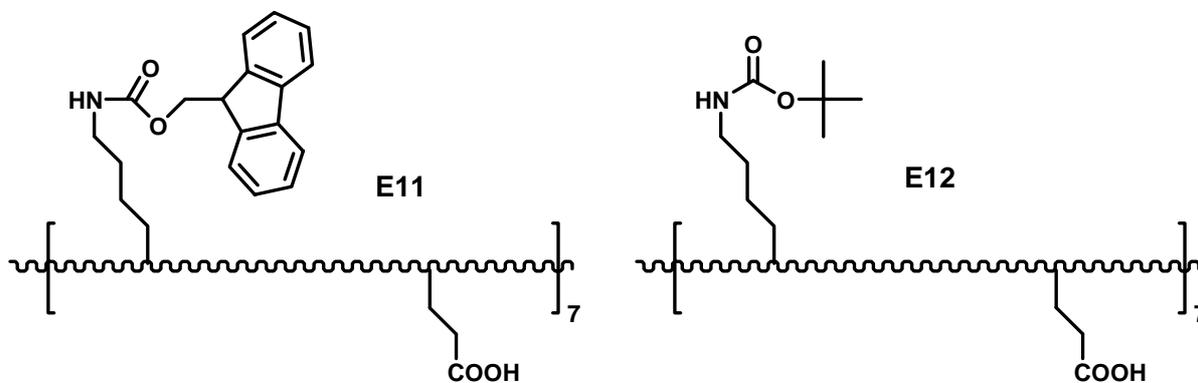
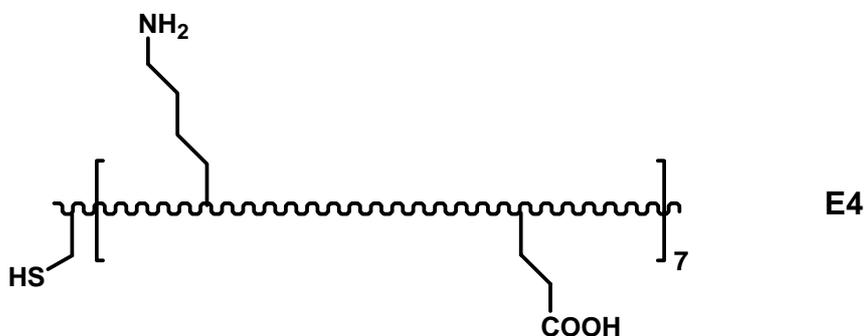
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRDPSS-
[VPGVG-VPGKG-VPGVG-VPGVG-VPGEV-VPGIG]₇ E1

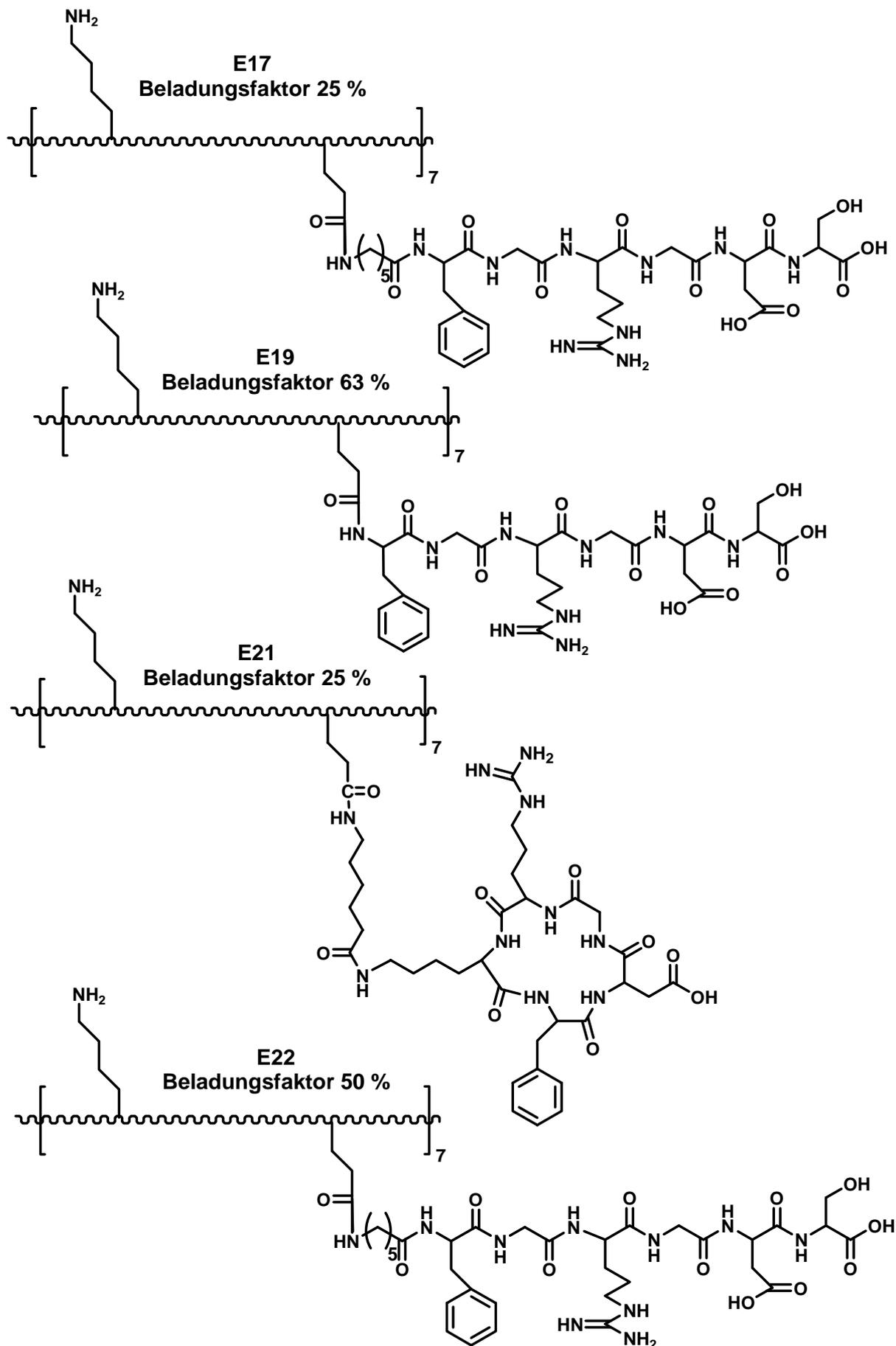
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRDPCS-
[VPGVG-VPGKG-VPGVG-VPGVG-VPGEV-VPGIG]₇ E2

GRDPSS(VPGVGVPKGVPGVGVPGVGVPGEVVPGVG)₇ E3



GRDPCS(VPGVGVPKGVPGVGVPGVGVPGEVVPGVG)₇ E4





7.4 Zusammenstellung der untersuchten Hydrogele

V1 = vernetztes E3

V4 = vernetztes E15

V5 = vernetztes E22

V6 = vernetztes E21

V7 = vernetztes E19

V8 = vernetztes E17

7.5 Veröffentlichungen

Posterpräsentation:

D. Kaufmann, A. Junger and R. Weberskirch, “*Chemical Modification of an Elastin Mimetic Polypeptide (EMP) for Medical Applications*”, International Symposium on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering (APME-6) **2005**, 15.- 18. August, Istanbul/Türkei.

Veröffentlichung:

A. Junger, D. Kaufmann, T. Scheibel, R. Weberskirch, “*Biosynthesis of an Elastin-Mimetic Polypeptide with Two Different Chemical Functional Groups within the Repetitive Elastin Fragment*”, *Macromol. Biosci.* **2005**, 5, 494.

8 Literaturverzeichnis

- [1] H. Ringsdorf, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1082.
- [2] J. C. Rodríguez-Cabello, J. Reguera, A. Girotti, M. Alonso, A. M. Testera, *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30*, 1119.
- [3] D. W. Urry, T. M. Parker, M. C. Reid, D. C. Gowda, *J. Bioact. Compat. Polym.* **1991**, *6*, 263.
- [4] D. W. Urry, in: *Biotechnological polymers: medical, pharmaceutical and industrial applications* **1993**, C. G. Gebelein (Editor), Technomic Publishing Co. Inc., 82.
- [5] C. Guda, X. Zhang, D. T. McPherson, J. Xu, J. H. Cherry, D. W. Urry, *Biotechnol. Lett.* **1995**, *17*, 745.

- [6] A. Nicol, D. C. Gowda, T. M. Parker, D. W. Urry, *Biotechnology and bioactive polymers* **1994**, C. G. Gebelein und C. Carraher (Editoren), New York: Plenum Press, p. 95.
- [7] D. W. Urry, A. Pattanaik, J. Xu, T. C. Woods, D. T. Mc Pherson, T. M. Parker, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **1998**, *9*, 1015.
- [8] A. Panitch, T. Yamaoka, M. J. Fournier, T. L. Mason, D. A. Tirrell, *Macromolecules* **1999**, *32*, 1701.
- [9] E. R. Welsh, D. A. Tirrell, *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 23.
- [10] P. J. Nowatzki, D. A. Tirrell, *Biomaterials* **2004**, *25*, 1261.
- [11] J. C. Liu, S. C Heilshorn, D. A. Tirrell, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 497.
- [12] G. P. Richman, D. A. Tirrell, A. R. Asthagiri, *J. Controlled Release* **2005**, *101*, 3.
- [13] S. C. Heilshorn, J. C. Liu, C. A. Tirrell *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 318.
- [14] A. Girotti, J. Reguera, J. C. Rodríguez-Cabello, F. J. Arias, M. Alonso, A. M. Testera, *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* **2004**, *15*, 479.
- [15] A. J. Alix, *J. Soc. Biol.* **2001**, *195*, 181.
- [16] R. Herrero-Vanrell, A. Rincón, M. Alonso, V. Remoto, I. Martinez, J. C. Rodríguez-Cabello *J. Controlled Release* **2005**, *102*, 113.
- [17] P. S. Stayron, A. S. Hoffmann, N. Murthy, C. Lackey, C. Cheung, P. Tan *J. Controlled Release* **2000**, *65*, 203.
- [18] M. R. Dreher, D. Raucher, N. Balu, O. M. Colvin, S. M. Ludeman, A. Chilkoti *J. Controlled Release* **2003**, *91*, 31.
- [19] J. Kostal, A. Mulchandani, W. Chen, *Macromolecules*, **2001**, *34*, 2257.

- [20] D. W. Urry, D. C. Gowda, C. M. Harris, R. D. Harris, B. A. Cox, *Polym. Prepr. Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)* **1992**, 33, 84.
- [21] A. Chilkoti, M. R. Dreher, D. E. Meyer, *Adv. Drug Del. Rev* **2002**, 54, 613.
- [22] R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, 2, 347.
- [23] Roempp, "Chemie Lexikon", <http://www.roempp>, **2005**, Stichwort: Elastin.
- [24] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, *Molecular Biology of the Cell* **1994**, Garland Publishing New York, 971.
- [25] L. B. Sandberg, N. T. Soskel, J. B. Leslie, *N. Engl. J. Med.* **1981**, 304, 566.
- [26] D. W. Urry, K. Okamoto, R. D. Harris, C. F. Hendrix, M. M. Long, *Biochemistry* **1976**, 15, 4083.
- [27] D. W. Urry, *J. Protein Chem.* **1988**, 7, 1.
- [28] A. M. Tamburro, V. Guanterri, D. Daga Gordini, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1992**, 10, 441.
- [29] D. W. Urry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, 32, 819.
- [30] W. A. Petka, J. L. Harden, K. P. McGrath, D. Wirtz, D. A. Tirrell, *Science* **1998**, 281, 389.
- [31] M. T. Krejchi, E. D. Atkins, A. J. Waddon, M. J. Fournier, T. L. Mason, D. A. Tirrell, *Science* **1994**, 265, 1427.
- [32] S. J. Yu, V. P. Conticello, G. H. Zhang, C. Kayser, M. J. Fournier, T. L. Mason, D. A. Tirrell, *Nature* **1997**, 389, 167.
- [33] S. T. Li, in: *Biotechnological Polymers* **1993**, C.G. Gebelein, Ed., Technomic Publisher, 66.
- [34] L. Gros, H. Ringsdorf, H. Schupp, *Angew. Chem.* **1981**, 93, 311.

- [35] P. A. Vasey, S. B. Kaye, R. Morrison, C. Twelves, P. Wilson, R. Duncan, A. H. Thomson, L.S. Murray, T. E. Hilditch, T. Murray, S. Burtles, D. Fraier, E. Frigerio, J. Cassidy, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 83.
- [36] D. W. Urry, A. Nicol, D. C. Gowda, D. H. Lynne, A. McKee, T. Williams, D. B. Olsen, B. A. Cox, *Biotechnol. Polym.* **1993**, 82.
- [37] F. Kratz, U. Beyer, M. T. Schütte, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **1999**, *16*, 245.
- [38] Y. Takakura, M. Hashida, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **1994**, *18*, 207.
- [39] Y. Matsumura, H. Maeda, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 6387.
- [40] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, *J. Controlled Release* **2000**, *65*, 271.
- [41] R. K. Jain, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 3039.
- [42] R. K. Jain, *Cancer Metastasis Rev.* **1987**, *6*, 559.
- [43] H. Maeda, Y. Matsumura, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1989**, *6*, 193.
- [44] R. Duncan, J. Kopeček, *Adv. Polym. Sci.* **1984**, *57*, 51.
- [45] D. Putnam, J. Kopeček, *Adv. Polym. Sci.* **1995**, *122*, 55.
- [46] A. Trouet, M. Masquelier, R. Baurain, D. Deprez-de Campeneere, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1982**, *79*, 626.
- [47] L. W. Seymour, K. Ulbrich, J. Strohalm, J. Kopeček, R. Duncan, *Biochemical Pharmacology* **1990**, *39*, 1125.
- [48] R. Duncan, J. K. Coatsworth, S. Burtles, *Hum. Exp. Toxicol.* **1998**, *17*, 93.
- [49] H. Ringsdorf, *J. Polymer Sci. Polym. Symp.* **1975**, *51*, 135.
- [50] R. Duncan, *Anti-Cancer Drugs* **1992**, *3*, 175.
- [51] H. Maeda, L. M. Seymour, Y. Miyamoto, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 351.

- [52] D. Putnam, J. Kopeček, *Adv. Polym. Sci.* **1995**, *122*, 55.
- [53] A. Godwin, K. Bolina, M. Clochard, E. Dinand, S. Rankin, S. Simic, S. Brocchini, *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, *53*, 1175.
- [54] H. Sezaki, M. Hashida, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.*, **1984**, *1*, 1.
- [55] J. Kopeček, P. Kopečková, T. Minko, Z.-R. Lu, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 61.
- [56] L. Šprincl, J. Exner, O. Štěrbá, J. Kopeček, *J. Biomed. Mater. Res.* **1976**, *10*, 953.
- [57] B. Říhová, J. Kopeček, K. Ulbrich, J. Pospíšil, P. Mančal, *Biomaterials* **1984**, *5*, 143.
- [58] P. A. Vasey, R. Duncan, S. B. Kaye, J. Cassidy, *Eur. J. Cancer* **1995**, *31*, 193.
- [59] P. A. Vasey, S. B. Kaye, R. Morrison, C. Twelves, P. Wilson, R. Duncan, A. H. Thomson, L. S. Murray, T. E. Hilditch, T. Murray, S. Burtles, D. Fraier, E. Frigerio, J. Cassidy, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *8*, 83.
- [60] P. J. Julyan, L. W. Seymour, D. R. Ferry, S. Daryani, C. M. Boivin, J. Doran, M. David, D. Anderson, C. Christodoulou, A. M. Young, S. Hessewood, D. J. Kerr, *J. Controlled Release* **1999**, *57*, 281.
- [61] E. Gianasi, M. Wasil, E. G. Evagorou, A. Kedde, G. Wilson, R. Duncan, *Eur. J. Cancer* **1999**, *35*, 994.
- [62] R. Haag, F. Kratz, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 1218.
- [63] K. Ulbrich, V. Šubr, J. Strohalm, D. Plocavá, M. Jelínková, B. Říhová, *J. Controlled Release* **2000**, *64*, 63.
- [64] A. Godwin, M. Hartenstein, A. H. E. Müller, S. Brocchini, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 614.
- [65] E. R. Gillies, J. M. J. Fréchet, *J. Amer. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14137.

- [66] D. F. Mosher, J. Sottile, C. Wu, J. A. McDonald, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1992**, *4*, 810.
- [67] J. Labat-Robert, M. Bihari-Varga, L. Robert, *FEBS Letters* **1990**, *268*, 386.
- [68] J. E. Scott, *J. Anat.* **1995**, *187*, 259.
- [69] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell* **2002**, Garland Publishing, New York, USA: 3rd. Ed., 1090.
- [70] H. Leonhardt, H. *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen* **1990**, Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland: 8. Auflage.
- [71] K. A. Piez, *Matrix Biol.* **1997**, *16*, 85.
- [72] E. Ruoslahti, *Glycobiology* **1996**, *6*, 489.
- [73] J. F. Woessner in: *Matrix Metalloproteinases* **1998**, W. C. Parks und R. P. Mecham (Editoren), Academic Press, London, 1.
- [74] S. E. Ayad, R. Boot-Handford, R. *The Extracellular Matrix Factsbook* **1998**, Academic Press, London, England: 2nd Edition.
- [75] T. Kreis, R. Vale *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor and Adhesion Proteins* **1999**, Oxford University Press Inc., Oxford, England: 2nd Edition, 335.
- [76] J. L. Sechler, S. A. Corbett, M. B. Wenk, J. E. Schwarzbauer, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1998**, *857*, 143.
- [77] R. O. Hynes, *Cell* **1992**, *69*, 11.
- [78] K. E. Gottschalk, R. Günther, H. Kessler, *Chembiochem.* **2002**, *5*, 470.
- [79] K.-E. Gottschalk, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3764.
- [80] C. H. Damsky, M. Bernfield, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1990**, *2*, 813.
- [81] F. G. Giancotti, E. Ruoslahti, *Science* **1999**, *285*, 1028.

- [82] W. A. Clark, J. S. Brugge, *Science* **1995**, 268, 233.
- [83] A. Howe, A. E. Aplin, S. K. Alahari, R. L. Juliano, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, 10, 220.
- [84] R. O. Hynes, *Cell* **2002**, 110, 673.
- [85] K. M. Yamada, B. Geiger, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, 9, 76.
- [86] M. A. Arnaout, S. L. Goodman, J. P. Xiong, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, 14, 641.
- [87] S. Dedhar, *Curr. Opin. Hematol.* **1999**, 6, 37.
- [88] C. Pfarrer, P. Hirsch, M. Guillomot, R. Leiser, *Placenta* **2003**, 24, 588.
- [89] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, 309, 30.
- [90] E. Ruoslahti, *Matrix Biol.* **2003**, 22, 459.
- [91] P. Schaffner, M. Dard, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, 60, 119.
- [92] D. Irvine, A. Mayes, L. Griffith, *Biomacromolecules* **2001**, 2, 85.
- [93] J. Hubbell, S. Massia, N. Desai, P. Drumheller, *Biotechnology* **1991**, 9, 568.
- [94] S. Massia, J. Hubbel, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 14019.
- [95] G. B. Stark, R. Horch, E. Tanczos, *Biological Matrices and Tissue Reconstruction* **1998**, Springer Verlag, Berlin.
- [96] E. Reichmann, R. Gobet, J. Schneider, *J. Urol. Urogynäkol.* **2005**, 4, 24.
- [97] M. J. Humphries, S. K. Akiyama, A. Komoriya, K. Olden, K. M. Yamada, *J. Cell Biol.* **1986**, 103, 2637.
- [98] H. Shin, S. Jo, A. G. Mikos, *Biomaterials* **2003**, 24, 4353.
- [99] R. A. Quirk, W. C. Chan, M. C. Davies, S. J. B. Tendler, K. M. Shakesheff, *Biomaterials* **2001**, 22, 865.

- [100] H. B. Lin, Z. C. Zhao, C. Garciaecheverria, D. H. Rich, S. L. Cooper, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1992**, 3, 217.
- [101] H. B. Lin, W. Sun, D. F. Mosher, C. Garciaecheverria, K. Schaufelberger, P. I. Lelkes, S. L. Cooper, *J. Biomed. Mater. Res.* **1994**, 28, 329.
- [102] A. Junger, D. Kaufmann, T. Scheibel, R. Weberskirch, *Macromol. Biosci.* **2005**, 5, 494.
- [103] B. R. Dumas, F. Grosclaude, J.-C. Mercier, *Eur. J. Biochem.* **1970**, 14, 451.
- [104] R. A. McMillan, V. P. Conticello, *Macromolecules* **2000**, 33, 4809.
- [105] A. Bundi, K. Wüthrich, *Biomacromolecules* **1979**, 18, 285.
- [106] D. Kurková, J. Kríz, P. Schmidt, J. Dybal, J. C. Rodríguez-Cabello, M. Alonso, *Biomacromolecules* **2003**, 4, 589.
- [107] D. W. Urry, K. Okamoto, R. D. Harris, C. F. Hendrix, M. M. Long, *Biochemistry* **1976**, 15, 4083.
- [108] G. L. Ellman, *Arch. Bioch. Biophys.* **1959**, 82, 70.
- [109] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* **1989**, Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, New York.
- [110] R. Herrero-Vanrell, A. Rincón, M. Alonso, V. Reboto, I. T. Molina-Martinez, J. Rodríguez-Cabello, *J. of Controlled Release* **2005**, 102, 113.
- [111] D. J. Urry, *J. Phys. Chem.* **1997**, 51, 11007.
- [112] R. B. Merrifield, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1985**, 24, 799.
- [113] G. Barany, N. Kneibcordonier, D. G. Mullen, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1987**, 30, 705.
- [114] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 35, 161.

- [115] L. A. Carpino, D. Sadat-Aalae, H. G. Chao, R. H. DeSelms, *J. Amer. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9651.
- [116] L.A. Carpino und G.Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404.
- [117] J.-N. Bertho, A. Loffet, C. Pinel, F. Reuther, G. Sennyey, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1303.
- [118] L. A. Carpino, M. Beyermann, H. Wenschuh, M. Bienert, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 268.
- [119] J. M. Humphrey, A. R. Chamberlin, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2243.
- [120] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678.
- [121] P. Alewood, D. Alewood, L. Miranda, S. Love, W. Meutermans, D. Wilson *Methods Enzymol.* **1997**, 289 14.
- [122] S.-Y. Han, Y.-A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447.
- [123] L. A. Carpino, H. Shroff, S. A. Triolo, E. M. E. Mansour, H. Wenschuh, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7829.
- [124] R. Bollhagen, M. Schmiedberger, K. Barlos, E. Grell, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1994**, *22*, 2559.
- [125] N. A. Solé, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5399.
- [126] D. A. Pearson, M. Blanchette, M. L. Baker, C. A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739.
- [127] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, G. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927.
- [128] E. Hoffmann, A. G. Beck-Sickinger, G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 585.
- [129] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 2024.

- [130] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1973**, *106*, 3626.
- [131] V. Pinciroli, V. Rizzo, F. Angelucci, M. Tatò, A. Vigevani, *Magn. Reson. Chem.* **1997**, *35*, 2.
- [132] D. Willner, P. A. Trail, S. J. Hofstead, H. D. King, S. J. Lasch, G. R. Braslwasky, R. S. Greenfield, T. Kaneko, R. A. Firestone, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 521.
- [133] A. Enthardt, "Persönliche Mitteilung", TUM, **2005**.
- [134] P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923.
- [135] D. L. Elbert, J. A. Hubbell, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 430.
- [136] R. A. Quirk, W. C. Chan, M. C. Davies, S. J. B. Tendler, K. M. Shakesheff, *Biomaterials* **2001**, *22*, 865.
- [137] J. P. Bearinger, D. G. Castner, K. E. Healy, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **1998**, *9*, 629.
- [138] S. S. Lateef, S. Boateng, T. J. Hartman, C. A. Crot, B. Russell, L. Hanley, *Biomaterials* **2002**, *23*, 3159.
- [139] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404.
- [140] A. Fiedler, *Diplomarbeit* Technische Universität München **2004**.
- [141] A. Ehrmann, *Semesterarbeit* Technische Universität München **2003**.
- [142] M. Bodanzky, A. Bodanzky, *The Practice of Peptide Synthesis* **1984**, Springer-Verlag, Heidelberg, 2. Auflage.
- [143] A. Junger, *Dissertation* Technische Universität München **2006**.
- [144] U. Landegren, *J. Immunol. Methods* **1984**, *67*, 379.
- [145] M. Kantlehner, D. Finsinger, J. Meyer, P. Schaffner, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 560.

- [146] J. H. Beer, K. T. Springer, B. S. Coller, *Blood* **1992**, 79, 117.
- [147] W. S. Craig, S. Cheng, D. G. Mullen, J. Blevitt, M. D. Pierschbacher, *Biopolymers* **1995**, 37, 157.
- [148] M. Kantlehner, D. Finsinger, J. Meyer, P. Schaffner, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 560.
- [149] R. Haubner, R. Gartias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Amer. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7461.
- [150] J. Sambrook, D. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* **2001** Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY
- [151] F. Lottspeich, *Bioanalytik* **1998**, Spektrum Verlag, Heidelberg-Berlin.
- [152] <http://au.expasy.org/tools/protparam.html>, **2006**.
- [153] S. P. Fling, D. S. Gregerson, *Anal. Biochem.* **1986**, 155, 83.
- [154] G. Fairbanks, T. Steck, D. Wallach, *Biochemistry* **1971**, 10, 2606.
- [155] A. Bendavid, C. J. Burns, L. D. Field, K. Hashimoto, D. D. Ridley, K. R. A. Samankumara Sandanayake, L. Wiczorek, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 3709.
- [156] L. Grehn und U. Ragnarsson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1984**, 23, 296.