

# **Hemmung von verdauungsrelevanten Enzymen durch Einsatz neuer Affinitätspolymere**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

**Patrick Andre Johannes Gilles**

aus Leverkusen

Fakultät für Chemie der  
Universität Duisburg-Essen

Essen 2014



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2010 bis Mai 2014 an der Fakultät für Chemie der Universität Duisburg-Essen, Standort Essen, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. T. Schrader angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. T. Schrader

Zweitgutachter: Prof. Dr. G. Haberhauer

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. S. Rumann

Tag der Disputation: 11.07.2014

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Hemmung von verdauungsrelevanten Enzymen durch Einsatz neuer  
Affinitätspolymere“**

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, Mai 2014

Patrick Gilles

*für meinen Großvater Iwan*

*„Es gibt zwei Möglichkeiten, Karriere zu machen: Entweder leistet man wirklich etwas, oder man behauptet, etwas zu leisten. Ich rate zur ersten Methode, denn hier ist die Konkurrenz bei weitem nicht so groß.“*

(Danny Kaye)

# Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Schrader für die interessante Themenstellung sowie der intensiven Betreuung innerhalb dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Gebhard Haberhauer danke ich für die Übernahme des Koreferates sowie der Diskussionsbereitschaft bei gelegentlichen Problemen.

Herrn Prof. Dr. S. Rumann danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Herrn Dr. Torsten Schaller und Herrn Dipl. Ing. Heinz Bandmann möchte ich für die Aufnahme der NMR-Spektren sowie deren stete Diskussionsbereitschaft bei Problemstellungen danken.

Ich danke Frau Heike Wöll für die Durchführung der Gelpermeationschromatographie-Analysen.

Frau Gudrun Heinrich und Herrn Dipl. Ing. Werner Karow möchte ich für die Aufnahme von Massenspektren danken.

Herrn Klaus Kowski danke ich für die Hilfe bei Geräteinstallationen, ITC-Messungen sowie der Übernahme von logistischen Angelegenheiten.

Frau Lina Bartsch wie auch Herrn Dr. Michael Meltzer danke ich für viele hilfreiche Tipps zur Etablierung neuer Enzym-Assays in unserem Arbeitskreis.

Für die Übernahme von logistischen Angelegenheiten bedanke ich mich bei Frau Jessica Kunter und im Besonderen bei Frau Ingeborg Reiter sowie Frau Elke Sprünken.

Für ein angenehmes Laborklima danke ich meinen ehemaligen Labornachbarn Thomas Gersthagen und Patricia Latza.

Weiterhin danke ich herzlich Max Peters, Christof Füten, Patricia Latza, Burkhard Wettig und Thomas Gersthagen für die stetige Hilfsbereitschaft bei praktischen und theoretischen Fragestellungen.

Bei Patrizia Chamier Cieminski, Tim Uffmann und Xenia Deilmann-Wansing möchte ich mich für die praktische Unterstützung im Labor während ihrer Ausbildungszeit herzlich bedanken. Ohne euch würde ich wahrscheinlich immer noch im Labor stehen.

Inga Stratmann danke ich für die angenehme und sehr ertragreiche Laborzeit während ihrer Bachelorarbeit.

Dem kompletten Arbeitskreis von Prof. Dr. Thomas Schrader sowie dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Gebhard Haberhauer danke ich für die angenehme Atmosphäre während meiner Arbeit, sowie den unterhaltsamen und lustigen Momenten im Aufenthaltsraum.

Frau Dr. Jolanta Polkowska, Patrizia Chamier Cieminski, Max Peters, Thomas Gersthagen, Christof Füten und meinem Onkel Andreas Lajojda danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern sowie meiner Freundin Patrizia für die mentale Unterstützung während meiner Promotion.

Teile dieser Arbeit sind publiziert oder auf Kongressen präsentiert worden:

P. Latza, P. Gilles, T. Schaller, T. Schrader, Affinity Polymers Tailored for the Protein A Binding Site of IgGs, *Chem. Eur. J.*, **2014**, DOI: 10.1002/chem.201402399R1.

O. Rotan, V. Sokolova, P. Gilles, W. Hu, S. Dutt, T. Schrader, M. Epple, Transport of supramolecular drugs across the cell membrane by calcium phosphate nanoparticles, *Mat.-wiss.u.Werkstofftech.*, **2013**, 44, 176-182.

P. Gilles, K. Wenck, T. Schrader, Specific Enzyme Inhibition by Designed Polymers, Poster im Rahmen des Internationalen Symposiums „Aggregation of small molecules“, Bochum, **2012**.

P. Gilles, K. Wenck, T. Schrader, *Specific Enzyme Inhibition by Designed Polymers*, Poster im Rahmen des GDCh-Wissenschaftsforums, Bremen, **2011**.

P. Gilles, K. Wenck, T. Schrader, *Specific Enzyme Inhibition by Designed Polymers*, Poster im Rahmen des Forschungstags der Medizinischen Fakultät, Essen, **2011**.

*Inhibition von Verdauungsenzymen mit proteinselektiven Copolymeren*, Vortrag im Rahmen des 16. Workshop: Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung, Xanten, **2010**.

## Summary

In today's medicinal research, pancreatitis represents an omnipresent topic. Within this clinical picture a preactivation of trypsin in the pancreas results in the activation of different hydrolases implicating a self-destruction of the organs.<sup>[12]</sup> Furthermore, the enzyme-based attack may lead to diabetes or even multiorgan dysfunction.<sup>[12, 19-24]</sup> Hitherto, all therapeutic approaches with protease inhibitors or hormones with antisecretic effects remained unsuccessful.<sup>[27, 30-35, 37]</sup>

Based on this background the aim of the present thesis was the inhibition of the digestion-relevant enzymes. For its realization, a polymer-based approach with surface-affine receptor molecules was pursued. To this end, a variety of established as well as new monomers was synthesized. The pre-existing polymerization method of these monomers using AIBN was thoroughly optimized. The optimal parameters for the polymerization in terms of economy were identified via kinetic studies from a total of 52 polymerization experiments to achieve reproducible results (70 °C, 24 - 30 h). The established method was further extended by introducing a purification step. In this way, residues of monomers, oligomers and DMF in the product mixture could be removed by ultrafiltration and polymers with high purity could be obtained within one week. Within the scope of this work 50 high purity polymers were synthesized and characterized in accordance with this method.

The efficacy/performance of the polymers as specific enzyme inhibitors was validated by means of enzyme assays. After having established the respective effective measuring method an enzyme screening monitored the efficacy of each particular polymer. Specifically, concentration-dependent fluorescence emission or UV-Vis absorption intensities furnished IC<sub>50</sub>-values which provided information about the inhibition profile/mode of the polymers. With these data at hand, systematic comparison allowed to derive the contribution of the different types of combined binding sites in a given polymer to the overall inhibition process. In summary, for trypsin,  $\alpha$ -chymotrypsin, carboxypeptidase A, kallikrein, thrombin and cathepsin D polymeric receptor molecules could be identified with IC<sub>50</sub>-values between the low micromolar and low nanomolar regime. However, most polymers worked on two different enzymes; only cathepsin D could be inhibited specifically. Thermodynamic and kinetic studies on trypsin with ITC measurements and Lineweaver-Burk-plots shed light on the putative mechanism of inhibition.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Verdauung im menschlichen Organismus .....	1
1.2 Funktionen der Bauchspeicheldrüse.....	3
1.3 Krankheitsbild Pankreatitis .....	4
1.4 Enzymhemmung durch künstliche Rezeptoren.....	7
1.5 Enzymhemmung mittels Oberflächenerkennung.....	10
1.6 Enzymhemmung durch lineare Affinitätspolymere .....	14
<b>2. Aufgabenstellung.....</b>	<b>19</b>
<b>3. Durchführung und Ergebnisse.....</b>	<b>21</b>
3.1 Monomer-Bausteine .....	21
3.1.1 Synthetisierte Monomere .....	23
3.1.1.1 Monomere-Spacer-Einheiten (8, 16 und 17).....	24
3.1.1.2 Hydrophile Monomere (2 und 3).....	25
3.1.1.3 Unpolare Monomere (4, 6 und 14).....	26
3.1.1.4 Monomere zur Erkennung basischer Aminosäuren (1, 11, 15, 18 und 19) ...	28
3.1.1.5 Monomere zur Erkennung saurer Aminosäuren (9, 12, 20, und 21) .....	33
3.1.2 Monomer-Lösungen.....	39
3.2 Polymere .....	40
3.2.1 Polymerisationsbedingungen .....	40
3.2.2 Aufreinigung und Verfahrensoptimierung der Polymerisation .....	46
3.2.3 Polymerdesign und Charakterisierung.....	52
3.2.3.1 Polymerdesign .....	53
3.2.3.2 Polymercharakterisierung .....	54
3.2.4 Dargestellte Polymere .....	57

---

<b>3.3 Enzymhemmung</b> .....	<b>61</b>
<b>3.3.1 Allgemeine Grundlagen und Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivität</b>	<b>61</b>
3.3.1.1 Grundlagen der Enzymkinetik .....	61
3.3.1.2 UV/VIS- und Fluoreszenz-Messungen .....	62
3.3.1.3 Bestimmung des IC <sub>50</sub> -Wertes .....	64
3.3.1.4 Lineweaver-Burk-Auftragung .....	65
3.3.1.5 ITC-Messung .....	67
<b>3.3.2 Untersuchte Enzyme</b> .....	<b>68</b>
3.3.2.1 Elastase .....	69
3.3.2.2 $\alpha$ -Chymotrypsin .....	73
3.3.2.3 Trypsin .....	78
3.3.2.4 Carboxypeptidase A .....	88
3.3.2.5 Kallikrein .....	92
3.3.2.6 Thrombin .....	97
3.3.2.7 Cathepsin D .....	101
<b>3.3.3 Diskussion und Zusammenfassung der wirksamen Polymere</b> .....	<b>105</b>
<b>4. Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	<b>111</b>
4.1 Zusammenfassung .....	111
4.2 Ausblick .....	114
<b>5. Experimenteller Teil</b> .....	<b>116</b>
5.1 Verwendete Lösungsmittel und Analysemethoden .....	116
5.2 Verwendete Puffer .....	118
5.3 Synthese der Monomer-Bausteine .....	120
5.3.1 Synthese des Glucose-Monomers (3) .....	120
5.3.2 Synthese des Isopropanol-Monomers (2) .....	122
5.3.3 Synthese des Ethylendiamin-Monomers (8) .....	124
5.3.4 Synthese des C <sub>5</sub> -Spacer-Monomers (17) .....	128
5.3.5 Synthese des C <sub>6</sub> -Spacer-Monomers (16) .....	132

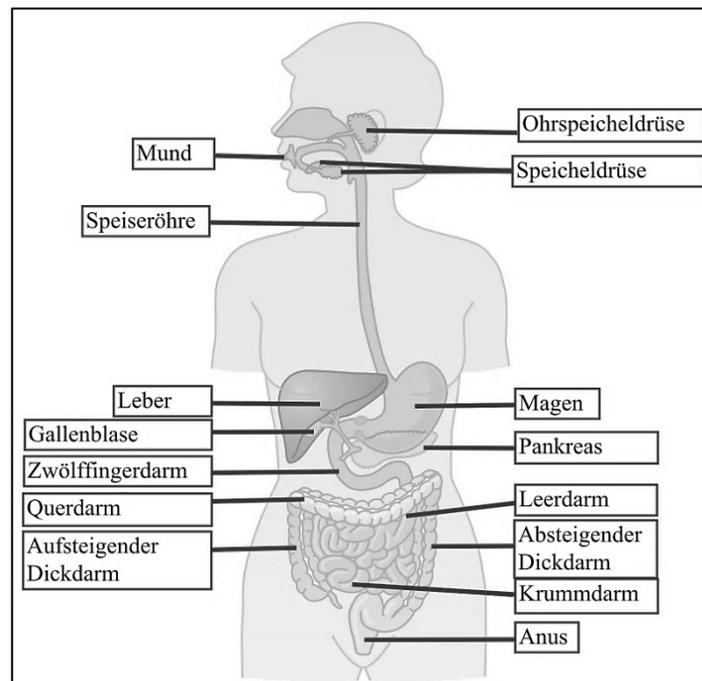
---

5.3.6	Synthese des Bisphosphonat-Monomers (1) .....	136
5.3.7	Synthese des C <sub>5</sub> -Bisphosphonat-Monomers (19).....	141
5.3.8	Synthese des C <sub>6</sub> -Bisphosphonat-Monomers (18).....	144
5.3.9	Synthese des NTA-Monomers (11).....	147
5.3.10	Synthese des NTA-Glu-Monomers (15) .....	152
5.3.11	Synthese des Aminobenzamindin-Monomers (12).....	157
5.3.12	Synthese des CBS-Monomers (9).....	159
5.3.13	Synthese des Dodecyl-Monomers (6).....	169
5.3.14	Synthese des C <sub>6</sub> -Anilin-Monomers (14) .....	171
5.3.15	Synthese des Dansyl-Monomers (4).....	176
5.3.16	Synthese der C <sub>6</sub> -BA-Monomere (20, 21 [44]) .....	180
5.4	Synthese der Polymere .....	188
5.4.1	Multisynthese der Polymere.....	188
5.4.2	Darstellung von PPGSUN2 .....	263
5.5	Durchgeführte Enzym-Assays .....	265
5.5.1	Elastase Assay.....	266
5.5.2	$\alpha$ -Chymotrypsin Assay .....	272
5.5.3	Trypsin Assay .....	280
5.5.4	Carboxypeptidase A Assay.....	305
5.5.5	Kallikrein Assay .....	318
5.5.6	Thrombin Assay .....	343
5.5.7	Cathepsin D Assay .....	355
5.6	Lineweaver-Burk-Auftragung.....	363
5.7	Isotherme Mikrokalorimetrie (ITC).....	369
6.	Abkürzungsverzeichnis.....	372
7.	Literaturverzeichnis.....	375

# 1. Einleitung

## 1.1 Verdauung im menschlichen Organismus

Die Energiezufuhr eines Organismus erfolgt über die Aufnahme von Nahrungsmitteln. Der durchschnittliche Energiebedarf des Menschen beträgt ca. 2000 kcal/Tag und variiert dabei stark vom Geschlecht, Alter und körperlicher Aktivität.<sup>[1]</sup> Grundvoraussetzung zur Energiegewinnung ist der enzymatische Abbau der oral aufgenommenen Lebensmittel. Bei diesem Vorgang werden beispielweise Kohlenhydrate und Proteine zu Monosacchariden sowie  $\alpha$ -Aminosäuren abgebaut, die nun über Resorption in den Blutkreislauf gelangen können. Dieser makromolekulare Abbau wird allgemein als Verdauung oder Digestion bezeichnet, welche in der Mundhöhle beginnt und im Darm endet (Abb. 1.1).<sup>[2-4]</sup>



**Abb. 1.1:** Magen-Darm-Trakt. Überarbeitetes Bild von Guyton, Hall, Textbook of Medical Physiology.<sup>[4]</sup>

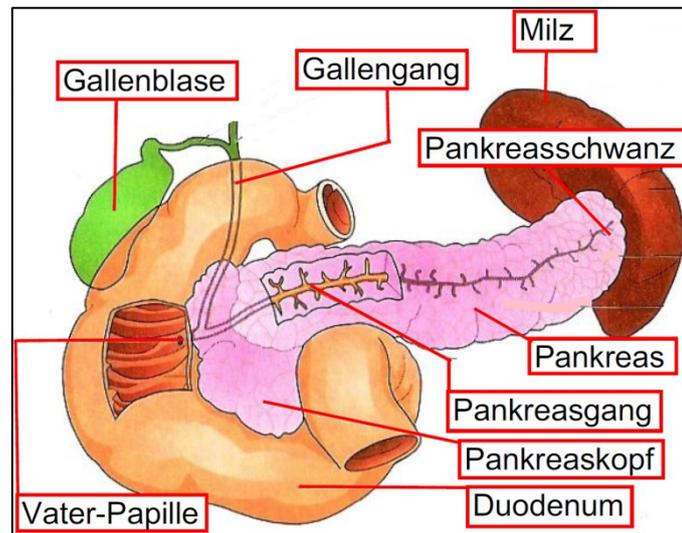
Der erste Schritt des makromolekularen Abbaus erfolgt unmittelbar nach der oralen Aufnahme. Während des Kauvorgangs vermischen sich die Nährstoffe mit dem Speichel. Bei diesem Vorgang beginnt die enzymatische Spaltung von Polysacchariden durch die im Speichel enthaltene Amylase (Speichel-Amylase, Ptyalin).

Nachdem der Nahrungsbrei über die Speisröhre in den Magen gelangt, erfolgt der zweite Verdauungsschritt. Der im Magen enthaltene saure Magensaft führt zur Aktivierung von Pepsinogen, welches für die Denaturierung der enthaltenen Proteine verantwortlich ist. Ferner werden in diesem sauren Milieu aufgenommene Mikroorganismen wie beispielsweise Bakterien abgetötet.

Die letzte und fundamentale Phase der Verdauung findet im Dünndarm (Duodenum) statt. Grundvoraussetzung für diesen Abbau sind die aus der Bauspeicheldrüse (Pankreas) sezernierten Hydrolasen. Peptidasen wie beispielsweise Elastase, Trypsin und Chymotrypsin hydrolysieren vorverdaute Proteine unter Ausbildung von  $\alpha$ -Aminosäuren, welche nun resorbiert werden können. Die wichtigste Serinesterase für den Lipidabbau stellt die Pankreaslipase dar. Hauptaufgabe dieses Enzyms ist die Spaltung von Triglyceriden zu Fettsäuren und 2-Monoglyceriden. Der Kohlenhydratabbau erfolgt in erster Linie durch die Pankreas-Amylase (P-Amylase), welche Poly- und Oligosaccharide glykosidisch spaltet. Jedoch entsteht durch die enzymatische Spaltung nur ein sehr geringer Anteil an Monosacchariden, bedingt durch die abnehmende Substrataffinität der P-Amylase bei sinkender Saccharidgröße. Der letzte Schritt des Kohlenhydratabbaus, welcher zu resorbierbaren Monosacchariden führt, erfolgt über eine membranassoziierte Verdauung durch Disaccharidasen wie Maltase und Laktase.<sup>[1, 3-6]</sup>

## 1.2 Funktionen der Bauchspeicheldrüse

Bei der Bauchspeicheldrüse handelt es sich um das zentrale Organ für die Sekretion der Verdauungshydrolasen. Das ca. 80 - 90 g schwere Drüsenorgan besteht aus einer exokrinen und einer endokrinen Drüse (Abb. 1.2).<sup>[7]</sup>



**Abb. 1.2:** Pankreas so wie die umgebenden Organe. Überarbeitetes Bild von Schmidt, Lang, Heckmann, Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie.<sup>[7]</sup>

Der endokrine Teil des Pankreas hat die Funktion der Hormonproduktion, welche für die Blutzucker-Regulierung verantwortlich ist. Dabei werden die produzierten Hormone, wie beispielsweise Insulin, direkt in den Blutkreislauf gegeben. Im exokrinen Teil werden täglich rund 1.5 L Pankreassekret produziert, in welchem die gebildeten Proteine in das Duodenum transportiert werden. Die rund 20 sezernierten Proteine stellen jedoch nicht nur aktive Verdauungshydrolasen dar, sondern ebenfalls Inhibitoren, wie auch Zymogene (Tab. 1.1).<sup>[8]</sup> Diese fungieren dabei als inaktive Vorstufen (Proenzyme) der Hydrolasen, die erst nach Austritt aus der Bauchspeicheldrüse durch andere Enzyme, wie beispielsweise Trypsin aktiviert werden. Das dahinter steckende Motiv ist ein Selbstschutz der Bauchspeicheldrüse, da die aktivierten Hydrolasen das Drüsenorgan selbst angreifen würden, was auch als Selbstverdauung oder Autolyse bezeichnet wird.<sup>[6, 8]</sup>

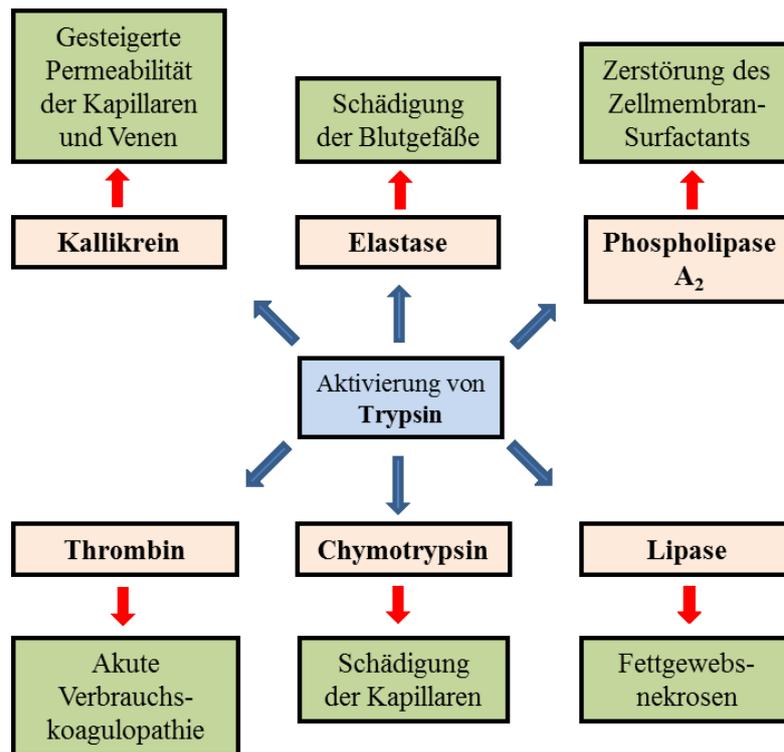
**Tab. 1.1:** Im Pankreassaft enthaltene Proteine.<sup>[8]</sup>

Gruppe	Name	Funktion
<b>Zymogene Proteinverdauung</b>	Trypsi(noge)ne	Hydrolyse von Arg-, Lys-Peptidbindungen
	Chymotrypsinogen	Hydrolyse von Phe-, Tyr-, Trp-Peptidbindungen
	(Pro)Elastasen	Hydrolyse aliphatischer Peptidbindungen
	Proprotease E	Hydrolyse aliphatischer Peptidbindungen
	(Pro)Carboxypeptidasen A	C-terminale Hydrolyse von Phe-, Tyr-, Trp-Peptidbindungen
	(Pro)Carboxypeptidasen B	C-terminale Hydrolyse von Arg-, Lys-Peptidbindungen
	Kallikrein(ogen)e	Hydrolyse von Arg-, Lys-Peptidbindungen
<b>Kohlenhydratverdauung</b>	$\alpha$ -Amylase	Hydrolyse $\alpha$ -1,4 glykosidische Bindungen
<b>Lipidverdauung</b>	Carboxylester-Lipase	Hydrolase aller Esterbindungen
	Pankreaslipase	Hydrolase von C1 & C3 Glycerinesterbindungen
	(Pro)Kolipase	Cofaktor der Pankreaslipase
	(Pro)Phospholipase A	
<b>Nukleinsäureverdauung</b>	DNase 1&2	DNA-Hydrolase am 3 und 5-Ende der Phosphatesterbindung
	RNase	RNA-Verdauung
<b>Sonstige</b>	Trypsininhibitoren	Schutz vor Selbstverdauung

### 1.3 Krankheitsbild Pankreatitis

Bei der Pankreatitis handelt es sich um eine Entzündung der Bauchspeicheldrüse. Hervorgerufen wird diese Entzündungsreaktion durch eine „Selbstverdauung“ des Organs. Hierbei wird zwischen akuter und chronischer Pankreatitis differenziert.<sup>[9-11]</sup>

Eine akute Pankreatitis tritt spontan auf und äußert sich zumeist durch starke Oberbauchschmerzen. Auslöser für die Autolyse kann eine Aktivierung von Trypsin innerhalb der Bauchspeicheldrüse sein. Trypsin führt gegenwärtig zur Aktivierung einiger anderer Verdauungshydrolasen innerhalb des Drüsenorgans. Diese Enzyme können nun zu erheblichen Schäden des Pankreasgewebes, wie auch anderer Organe führen (Abb. 1.3).<sup>[12]</sup>



**Abb. 1.3:** Schematische Darstellung der unerwünschten Verdauungshydrolasenwirkungen.<sup>[12]</sup>

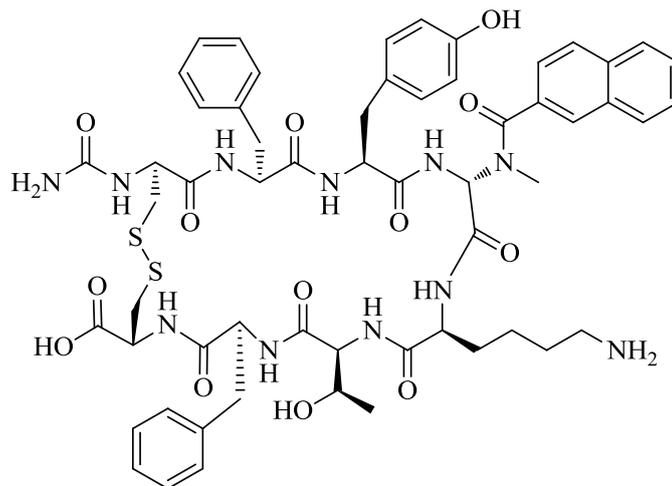
Der klinische Nachweis erfolgt entweder über eine erhöhte Konzentration von  $\alpha$ -Amylase und Lipase im Blut, welche durch das geschädigte Organ direkt in den Blutkreislauf gelangen können oder über eine erhöhte Konzentration der Hydrolasen im Urin.<sup>[13, 14]</sup> Ursachen für die akute Pankreatitis sind in 80 - 90 %<sup>[12]</sup> aller Fälle erhöhter oder langjähriger Alkoholkonsum, wie auch eine Verstopfung des Bauchspeicheldrüsenhauptgangs bedingt durch Gallensteine.<sup>[12, 15-18]</sup>

Die akute Pankreatitis verläuft in ca. 80 - 90 %<sup>[19]</sup> aller Fälle ödematös (leichte Verlaufsform) und klingt nach fünf bis sieben Tagen unter stationärer Behandlung ab. In 10 - 20 % aller Fälle handelt es sich jedoch um eine schwere Pankreatitis, welche nekrotisierend verläuft. Bei dieser Form der Pankreatitis kommt es zumeist zur Infektion des nekrotischen Gewebes bedingt durch Darmbakterien, was zu einer Sepsis führen kann. Die Folgen der Blutvergiftung wiederum können Organversagen, Multiorganversagen sowie im schlimmsten Fall der Tod sein.<sup>[19-22]</sup>

Bei der chronischen Pankreatitis handelt es sich um eine rezidivierende Entzündungsreaktion des Pankreasparenchym, welches durch fibrotisches Bindegewebe ersetzt wird. Die daraus resultierende Folge, ist eine stetige Limitierung der endokrinen und exokrinen Pankreasfunktion.<sup>[23, 24]</sup>

Die Behandlung der Krankheit ist aus heutiger Sicht zumeist begrenzt auf eine konservative Basistherapie. Der Schwerpunkt dieser Therapie basiert auf Schmerzminderung sowie einer enteralen Ernährung unter stationärer Beobachtung.<sup>[25-27]</sup> Zeigt diese Form der Therapie jedoch keinen Erfolg, so ist wie in vielen Fällen einer schweren Verlaufsform ein chirurgischer Eingriff nötig, in welchem beispielsweise vorhandenes nekrotisches Gewebe entfernt wird.<sup>[27-29]</sup>

Eine weitere Möglichkeit der Therapie wäre ein kausaler Eingriff in den pathologisch physiologischen Mechanismus. Dies wäre auf zweierlei Weisen möglich, zum einen durch die Zugabe von Hormonen, welche die Pankreassekretion unterdrücken sollten oder alternativ durch Verabreichung von Protease-Hemmstoffen.<sup>[27, 30]</sup> Im ersten Ansatz wurden antisekretorische Hormone wie beispielsweise Glukagon, Calcitonin, Somatostatin und das synthetisch analoge Octreotid verwendet, jedoch ohne klinischen Erfolg. Ferner führten letztere zur einer reduktiven gastrointestinalen Durchblutung.<sup>[30-35, 37]</sup>



**Abb. 1.4:** Strukturformel von Octreotid.<sup>[37]</sup>

Der zweite Ansatz, welcher sich auf den Einsatz von Protease-Inhibitoren wie Aprotinin und Gabexat-Mesilat beschränkt, verlief ebenso wenig erfolgreich. Dies kann unter anderem daran liegen, dass das Pharmakon Gabexat-Mesilat, eine Halbwertszeit von lediglich einer Minute besitzt und zudem nur einen sehr schwachen Trypsin-Komplex ausbildet. Das Antifibrinolytikum Aprotinin, welches als Trasylol<sup>®</sup> vertrieben wurde, zeigte ebenso wenig einen positiven Effekt bei der Therapie.<sup>[30, 34-36]</sup>

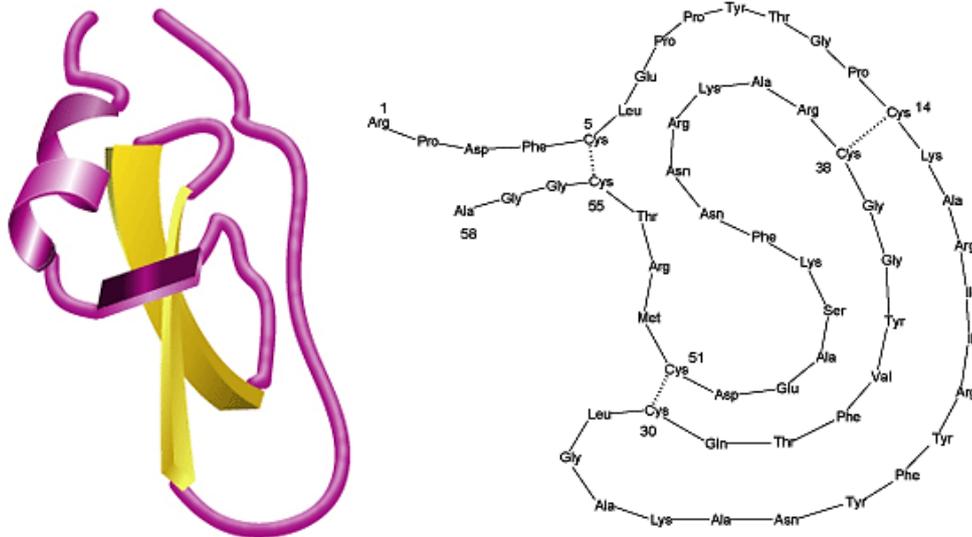


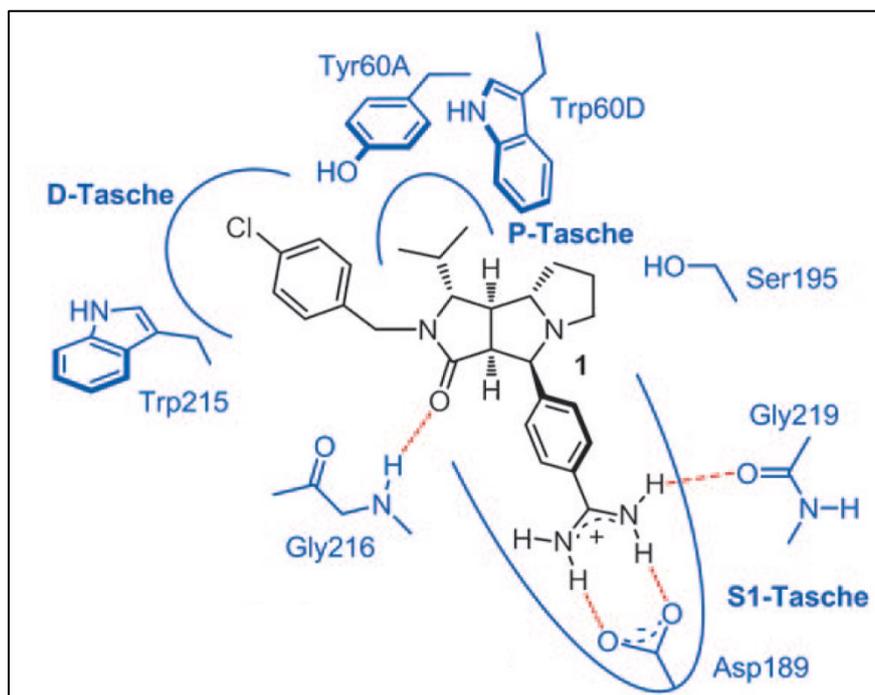
Abb. 1.5: Struktur und Sequenz von Aprotinin.<sup>[38]</sup>

## 1.4 Enzymhemmung durch künstliche Rezeptoren

Die Hemmung von Enzymen durch maßgeschneiderte künstliche Rezeptoren ist ein allgegenwärtiges Thema in der Bioorganischen Chemie. Das dahinter stehende Motiv ist der aktive Eingriff in biologische Prozesse, um diese gezielt zu steuern. Musterhaft finden solche Rezeptoren Anwendung bei vielfältigen Operationen, indem sie in die Gerinnungskaskade eingreifen und somit die Thrombus-Bildung aktiv regulieren können. So kann die Fibrinolyse durch Einsatz von Antifibrinolytika wie Tranexamsäuren (Anvitoff<sup>®</sup>, Ugurol<sup>®</sup> und Cyklokapron<sup>®</sup>), 6-Aminocaprinsäure und Aprotinin gehemmt werden.<sup>[39-49]</sup> Entgegengesetzt wirken Heparine (Certoparin-Natrium, Dalteparin-Natrium, Enoxaparin-Natrium etc.) als Antithrombotika (Antikoagulantien).<sup>[50-52]</sup>

Die Kenntnis des Wirkungsmechanismus des jeweiligen Enzyms ist in der Regel die Grundvoraussetzung für die Entwicklung eines effektiven Rezeptors. Da die katalytische Wirksamkeit hauptsächlich auf das aktive Zentrum beschränkt ist, liegt der Schwerpunkt des Designs oft auf Basis des natürlichen Substrats oder falls alternativ bekannt, auf einen häufig strukturanalogen natürlichen Antagonisten.<sup>[53-58]</sup> Die Bindung des potentiellen Inhibitors erfolgt dabei zumeist durch ein additives und kooperatives Zusammenspiel von nichtkovalenten Wechselwirkungen wie beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen. Durch die gegenseitige Verstärkung dieser recht „schwachen Bindungen“ ist eine Hemmung und damit verbundene Erkennung auch unter physiologischen Bedingungen möglich.<sup>[59-64]</sup>

Ein Beispiel für ein maßgeschneidertes Molekül zur Enzymhemmung stellt der von *Diederichs* entwickelte Thrombin-Inhibitor dar (Abb. 1.6).<sup>[65-69]</sup> Die Molekül-Basis dieses Inhibitors beinhaltet ein starres tricyclisches Lactamgerüst, welches spezifisch auf das aktive Zentrum des Thrombins angepasst wurde. So füllt der Phenylamidiniumrest exakt die S1-Tasche (hydrophobe Selektivitätstasche) des Enzyms aus, unter Ausbildung einer zweizähligen Salzbrücke. Die distale Tasche (D-Tasche) wird durch Einsatz eines komplementären *p*-Chlorbenzyl-Substituenten belegt. Durch die Besetzung der proximalen Tasche (P-Tasche) mittels eines Isopropyl-Substituenten erfolgt die hohe Selektivität des künstlichen Rezeptors gegenüber ähnlichen Serinproteasen. Zu erklären ist die Effektivität des Hemmstoffes durch das Vorhandensein der P-Tasche, welche spezifisch für das Thrombin ist. So liegt beispielsweise der  $K_i$ -Wert bei Thrombin im nanomolaren Bereich (8 nM)<sup>[69]</sup>, wogegen dieser bei Trypsin im mikromolaren Bereich liegt (12.9  $\mu$ M)<sup>[69]</sup>. Auf diese Weise kann dem Thrombin-Inhibitor eine um Faktor 1600 höhere Selektivität gegenüber Trypsin zugeordnet werden.<sup>[69]</sup>



**Abb. 1.6:** Inhibierung von Thrombin im aktiven Zentrum durch einen maßgeschneiderten Hemmstoff.<sup>[65, 69]</sup>

Die Synthese eines solchen Hemmstoffes ist jedoch, neben der Entwicklungszeit, mit einem hohen präparativen Aufwand verbunden. Begründet wird letzteres durch die Einhaltung der Stereochemie einer solchen Verbindung, welche häufig mehrere Chiralitätszentren beinhaltet.

Eine Auflistung weiterer literaturbekannte Protease-Inhibitoren sind in Tabelle 1.2 vereint.

**Tab. 1.2:** Zusammenfassung einiger Proteasen sowie deren komplementären Inhibitoren.

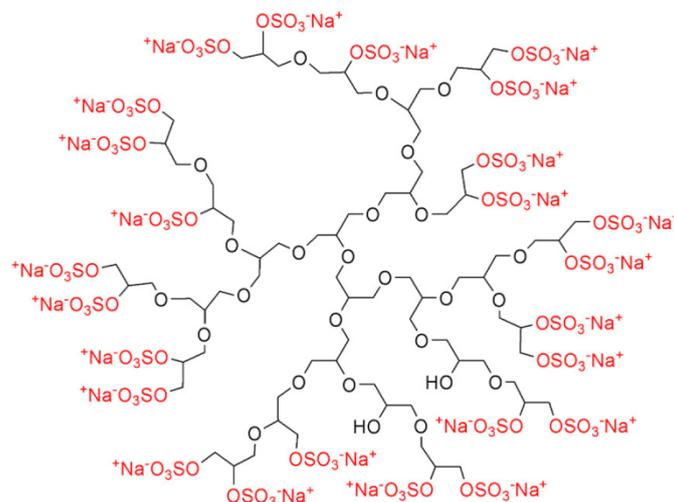
Protease/n	Hemmstoff
Chymotrypsin, diverse Cathepsine und Papain	Chymostatin <sup>[70-73]</sup>
Chymotrypsin und Elastase	Elasnin <sup>[74-76]</sup>
Diverse Cathepsine	Z-Phe-Gly-NHO-Bz-pMe <sup>[77]</sup>
Cathepsin D, Pepsin und Renin	Pepstatin A <sup>[78-80]</sup>
Carboxypeptidase A	1,10-Phenanthrolin <sup>[81, 82]</sup>
Carboxypeptidase A	2-Benzylbernsteinsäure <sup>[83, 84]</sup>
Elastase	Scyptolin A <sup>[85, 86]</sup>
Elastase	SSR 69071 (C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S) <sup>[87-89]</sup>
Elastase	DIFP <sup>[90, 91]</sup>
Kallikrein, Elastase, Trypsin und Chymotrypsin	Aprotinin <sup>[92, 93]</sup>
Pepsin, Renin, diverse Cathepsine	Aspine <sup>[94, 95]</sup>
Trypsin, Plasmin, Thrombin	4-Aminobenzamindin <sup>[96, 97]</sup>
Thrombin	Argatroban <sup>[98, 99]</sup>

Wie aus der Tabelle 1.2 zu entnehmen ist, verläuft die Hemmung der Proteasen in den seltensten Fällen selektiv. Dies kann begründet werden durch strukturähnliche Kavitäten der Hydrolasen, in welcher sich die katalytische Kaskade befindet. So weisen beispielhaft Verdauungshydrolasen wie Elastase, Trypsin und Chymotrypsin zusätzlich eine Strukturanalogie von ca. 40 % vor, was eine spezifische Inhibition ergänzend erschwert.<sup>[100]</sup>

## 1.5 Enzymhemmung mittels Oberflächenerkennung

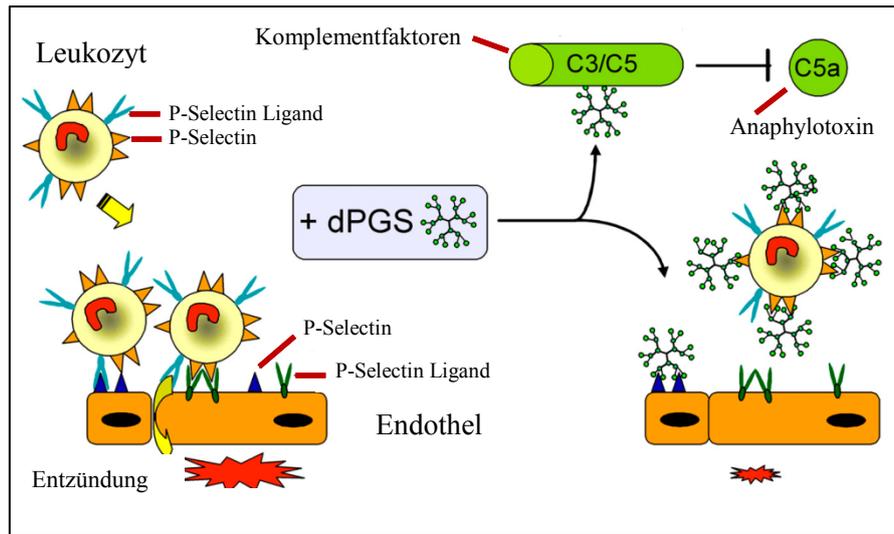
Eine weitere Möglichkeit der Protein Erkennung bzw. Enzymhemmung stellt die Proteinoberflächenerkennung dar. Diese Methode zeichnet sich dadurch aus, dass gezielt Regionen des Proteins gebunden werden. Das dahinter stehende Motiv der Rezeptorinteraktion beruht hierbei auf einer Abdeckung des aktiven Zentrums oder bestenfalls auf einer Konformationsänderung bzw. Denaturierung des Proteins. Einige prominente Beispiele der Enzymhemmung durch teils makromolekulare Rezeptoren sollen hier vorgestellt werden.

*Haag et al.* entwickelten einen multivalenten Rezeptor zur Behandlung von Entzündungskrankheiten (Abb. 1.7).



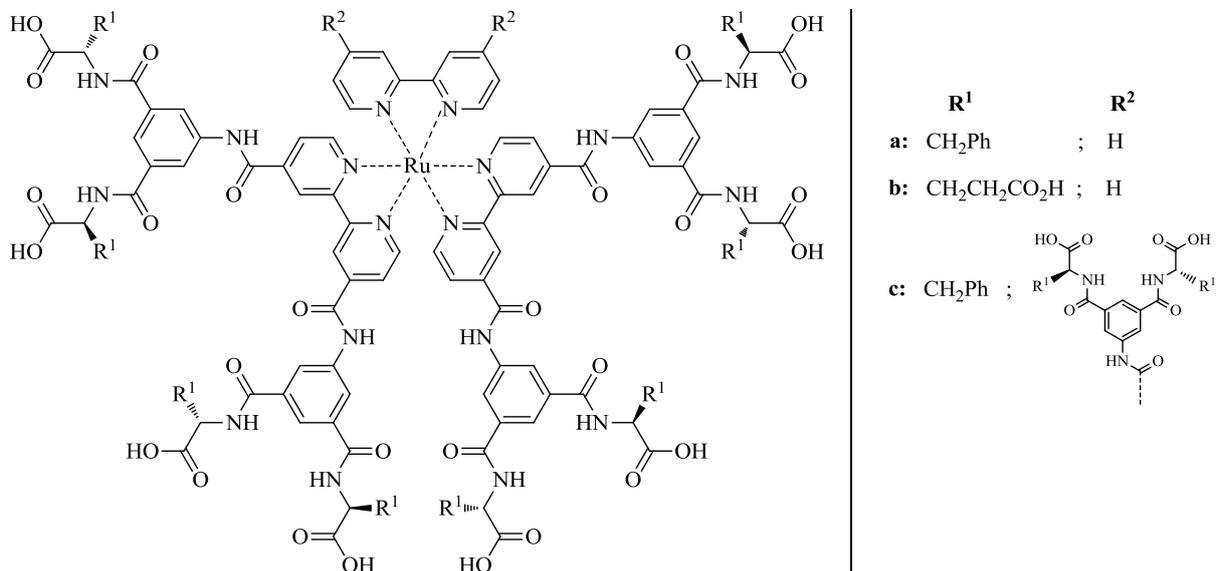
**Abb. 1.7:** Idealisierte Struktur des dendritischen Rezeptors von *Haag et al.*.<sup>[101]</sup>

Das für diesen Zweck synthetisierte dendritische Polyglycerolsulfat (dPGS), hat die Funktion, Selectine, welche die Oberflächenproteine der Leukocyten (weiße Blutkörperchen) darstellen, zu komplexieren. Das angestrebte Ziel ist die rezeptorvermittelte Extravasation der Leukozyten in das vorhandene Wundgewebe zu unterdrücken und so regulativ in den Prozess einzugreifen (Abb. 1.8).<sup>[101]</sup>



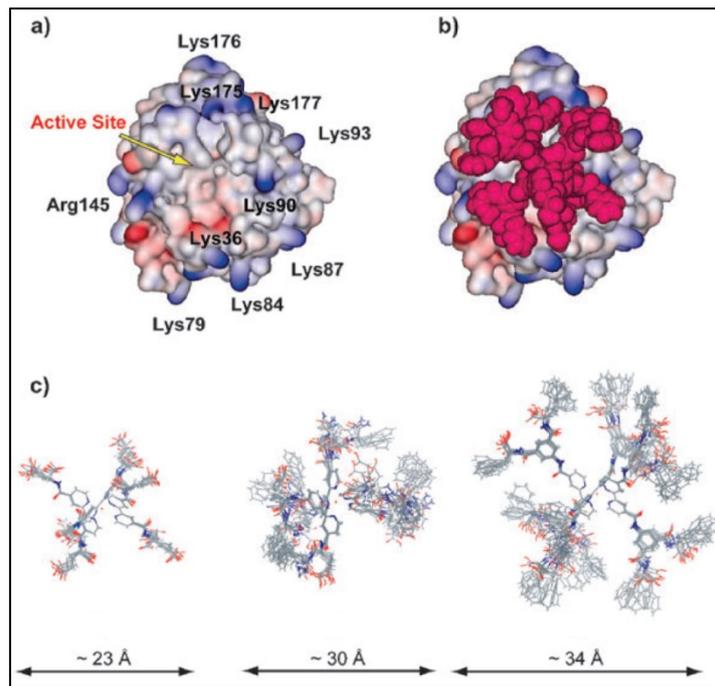
**Abb. 1.8:** Schematische Darstellung des Wirkungsmechanismus des dendritischen Rezeptors.<sup>[101]</sup>

Ausgehend von Arbeiten von *Hamachi et al.* stellen Ruthenium (II)-Trisbipyridin Komplexe ein allgegenwärtiges Motiv zur Proteinerkennung dar.<sup>[102]</sup> Wurden in Pionierarbeiten lediglich Bindungsaffinitäten der Protein-Interaktionen zwischen dem basischen Cytochrom C (Cyt C) und dem metallorganischen Rezeptor untersucht, so konnten aktuell einige Fortschritte auf diesem Gebiet verzeichnet werden.<sup>[103-106]</sup>



**Abb. 1.9:** Beispiele für dendritische Ruthenium (II)-trisbipyridin Komplexe.<sup>[103, 106]</sup>

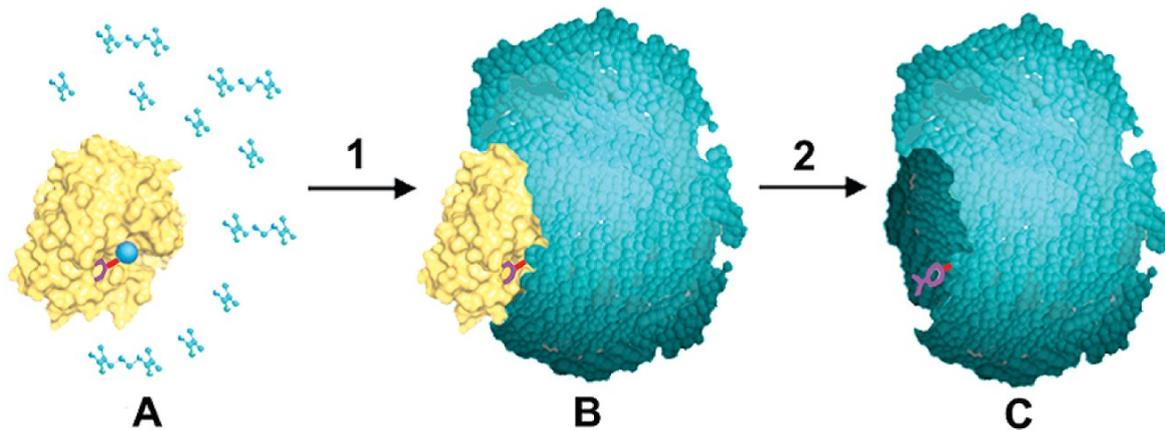
Durch gezielte Variation der Bipyridin-Liganden in Form von Größe und Art des Substituenten, konnten diverse Proteasen inhibiert werden (Abb. 1.9). Die Funktionsweise der Inhibition beruht auf einer Oberflächenerkennung der komplementären Aminosäurereste nahe der „active site“, was zu einer Blockierung des katalytischen Zentrums führt (Abb. 1.10).



**Abb. 1.10:** (a) Veranschaulichte Proteinoberfläche des ChT. Blaue Flächen markieren basische Aminosäuren, rote Flächen symbolisieren saure Aminosäuren. (b) Simulierter Komplex zwischen dem multivalenten Rezeptor und dem Enzym. (c) Struktur und Größe diverser Dendrimere in ungefährender Relation zum ChT.<sup>[103]</sup>

Die dendritischen Rezeptoren, welche einen Durchmesser von bis zu 3.4 nm besitzen, verdecken nahezu ideal die Fläche ( $6.0 \text{ nm}^2$ ), an welcher sich das aktive Zentrum des  $\alpha$ -Chymotrypsins (ChT) befindet.<sup>[103]</sup> Weitere Studien zeigten, dass neben der Ladung des potentiellen Inhibitors, die Struktur von fundamentaler Bedeutung bei der Proteinerkennung ist. So konnte gezeigt werden, dass Cyt C (pI = 9.8,  $\sim 12.6 \text{ kDa}$ )<sup>[104]</sup> um Faktor 240 besser gebunden wurde, als das oberflächenähnliche Protein Lysozym (pI = 9.3,  $\sim 14.4 \text{ kDa}$ ).<sup>[104]</sup> Ferner wies derselbe Rezeptor keine Affinität gegenüber den weitaus weniger basischen Proteinen Myoglobin (pI = 7.2), Meeretisch-Peroxidase (pI = 5.7) und Ferredoxin (pI = 4.3) auf.

Eine weitere Möglichkeit der Enzyminhibierung durch „Oberflächenerkennung“ stellt das Molekulare Imprinting (MIP) dar, welches erstmals auf Grundlage organischer Komponenten von *Wulff et al.* durchgeführt wurde.<sup>[107, 108]</sup> Basierend auf diesem Verfahren konnte *Haupt et al.* mittels eines wasserlöslichen Mikrogels die verdauungsrelevante Protease Trypsin hemmen (Abb. 1.11).<sup>[109]</sup>

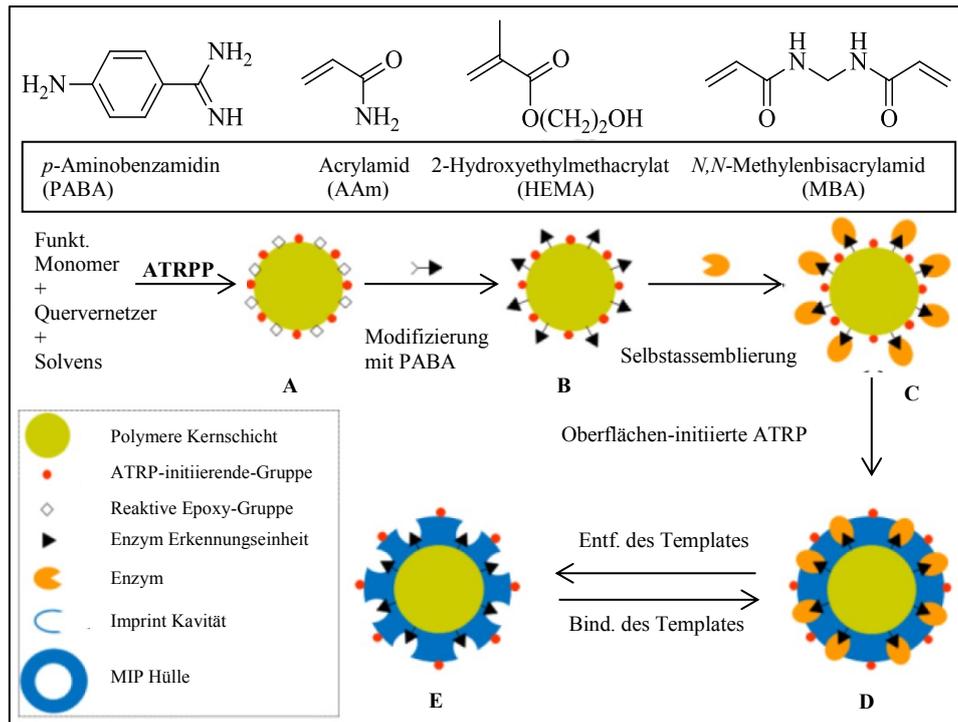


**Abb. 1.11:** Schematische Darstellung des Prägens durch Einsatz eines funktionalisierten Monomers, eines Templats sowie eines Quervernetzters.<sup>[109]</sup>

Als Grundbaustein verwendete *Haupt et al.* ein funktionalisiertes Monomer (*N*-Methacryl-*p*-Aminobenzamidin) auf Basis des literaturbekannten *p*-Aminobenzamidins ein. Das Monomer wurde sowohl mit dem Templat als auch mit Bismethacrylamid (Quervernetzer) versetzt (**A**) und polymerisiert. Danach wurde das Templat aus dem Enzym-Polymer-Komplex (**B**) entfernt. Das erhaltene geprägte Mikrogel (**C**) zeichnet sich als selektiver Trypsin-Inhibitor aus, dessen Hemmwirkung um drei Größenordnungen höher ist als die des *p*-Aminobenzamidins.

Inspiziert von dieser Arbeit entwickelten *Zhang et al.* ein „core-shell“ geprägtes Polymer zur selektiven Enzymerkennung. Durch die Kombination der MIP-Technik, einer Oberflächen Verankerung-Strategie sowie zwei „lebenden“ Polymerisation konnte die Darstellung der multivalenten Erkennungseinheit ermöglicht werden (Abb. 1.12).<sup>[110]</sup>

Die erste Stufe der Synthese dient zur Bildung der oberflächenaktiven Polymerkernschicht (**A**). Nach der Modifizierung der Polymeroberfläche mit *p*-Aminobenzamidin (**B**) erfolgt die Selbstassemblierung von Trypsin (**C**). Eine erneute Polymerisation unter Vorlage des Polymeroberflächen-Enzym-Komplexes, führte zur Bildung des Protease-Abdrucks (**D**). Der nun synthetisierte Imprint stellt eine multivalente Enzym-Erkennungseinheit dar (**E**).



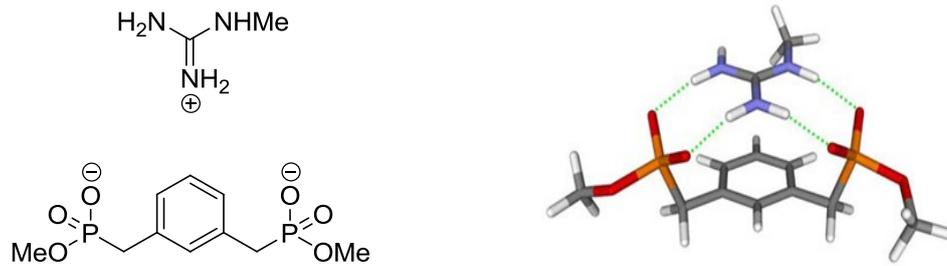
**Abb. 1.12:** Bildliche Illustration der Darstellung der Enzym-Erkennungseinheit durch MIP.<sup>[110]</sup>

Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Selektivität und Effektivität der dargestellten Imprints durch die Schichtdicke der Polymerhülle gesteuert werden konnte. Dementsprechend zeigte ein Imprint eine spezifische Hemmung gegenüber Trypsin ohne jedoch  $\alpha$ -Chymotrypsin, Kallikrein, Lysozym und Albumin zu hemmen. Ferner wurde nach dem oben beschriebenen Verfahren ein Kallikrein-Imprint synthetisiert, welcher die Protease um Faktor 1000 ( $K_i = 262$  nM) effektiver hemmt als *p*-Aminobenzamidin selbst ( $K_i = 296$   $\mu$ M).<sup>[110]</sup>

## 1.6 Enzymhemmung durch lineare Affinitätspolymere

Die Darstellung von multivalenten Rezeptoren zur Erkennung von Proteinoberflächen bzw. zur Hemmung von Proteasen stellt ein allgegenwärtiges Thema im Arbeitskreis *Schrader* dar. Ausgehend von ersten Arbeiten, in welchen Protein-Interaktionen mit künstlichen Rezeptoren lediglich in aprotischen Lösungsmitteln wie DMSO messbar waren, können heute Protein-Komplexierungen selbst unter physiologischen Bedingungen verzeichnet werden.

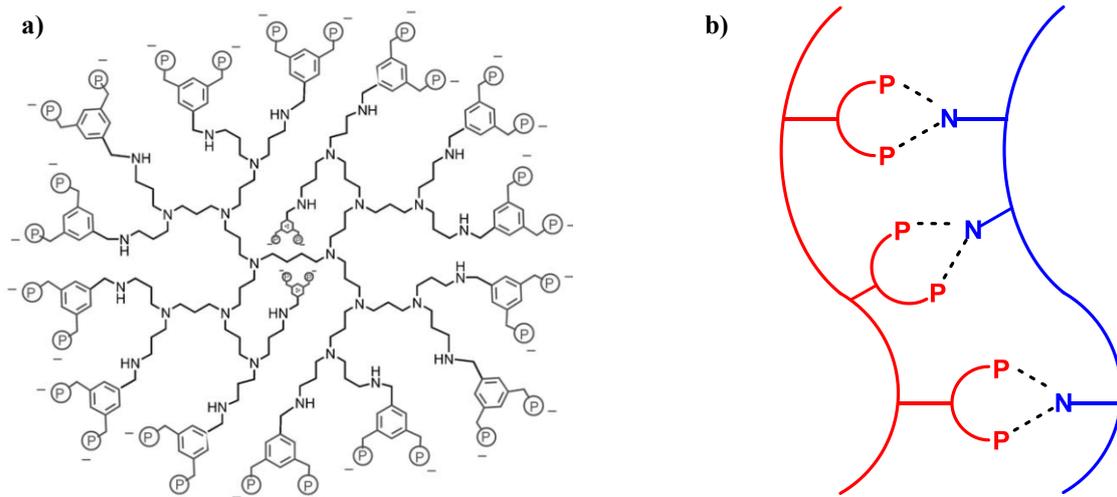
Grundlage für das Design von polyvalenten Rezeptoren war die von *Schrader et al.* entwickelte „Bisphosphonatpinzette“ (Abb. 1.13).<sup>[111-113]</sup>



**Abb. 1.13:** Erkennungsmotiv der „Bisphosphonatpinzette“. Schematische Darstellung der Interaktion des Rezeptors mit einer Guanidinium-Substituenten.<sup>[114, 115]</sup>

Die oben abgebildete „*m*-Xylylenbisphosphonat-Pinzette“ zeichnete sich durch ein additives Zusammenspiel von Wasserstoffbrückenbindungen, ionischen Wechselwirkungen sowie  $\pi$ -Kationen Wechselwirkungen aus. Basierend auf diesen sich gegenseitig verstärkenden, nicht kovalenten Wechselwirkungen, stellt diese Verbindung eine ubiquitäre Komplementär-Einheit zur Bindung von Argininen bzw. Lysin dar. Die besonders hohe Guanidinium-Affinität des Rezeptors konnte in DMSO mit einem  $K_a$ -Wert von  $8.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  verdeutlicht werden, hingegen konnte in Wasser ( $K_a \sim 100 \text{ M}^{-1}$ ) nur eine geringfügige Affinität gemessen werden. Um jedoch aktiv in biologische Prozesse einzugreifen, war eine Rezeptorerkennung unter physiologischen Bedingungen unumgänglich.

Um das vorhandene Bindungsmotiv zu stärken wurde das Prinzip der Multivalenz genutzt. So konnte die „Bisphosphonatpinzette“ erfolgreich in zwei verschiedene multivalente Erkennungseinheiten überführt werden (Abb. 1.14).



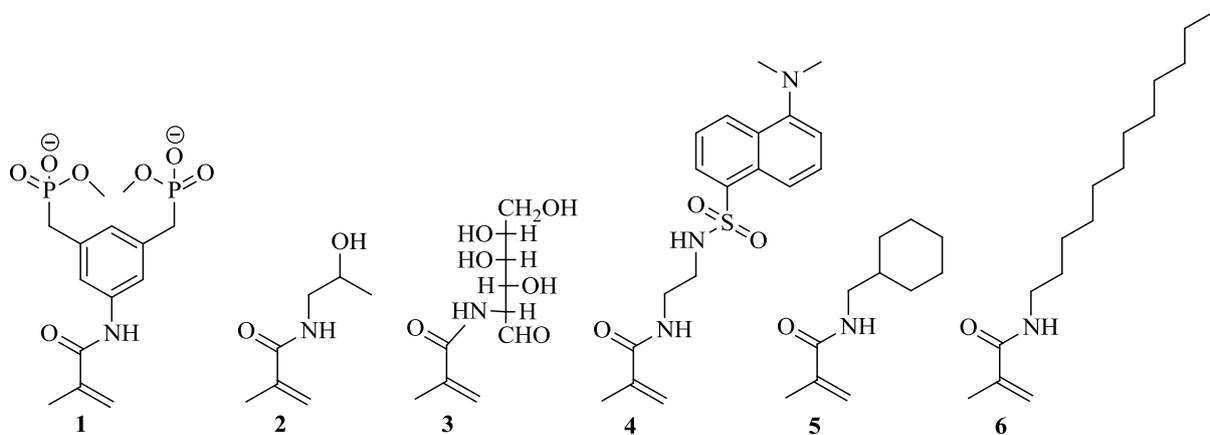
**Abb. 1.14:** Multivalente Bisphosphonatpinzetten: a) Hexadecamer-Dendrimer<sup>[116]</sup> b) Lineares Polymer<sup>[117]</sup>

Durch Modifikation der „Bisphosphonatpinzette“ und anschließender Kupplung mit Methacrylsäurechlorid wurde der Rezeptor in ein polymerisierbares Monomer überführt. Die

nach der Polymerisation erhaltene Erkennungseinheit (ca. 100 Einheiten; 40 kDa) zeichnete sich nun selbst unter physiologischen Bedingungen als hervorragende Komplementär-Einheit zu den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin aus. Ferner konnte dem Polymer sogar ein synergetischen Effekt zugesprochen werden.<sup>[117]</sup>

Weitere Studien verifizierten, dass ebenso eine Protein-Komplexierung unter physiologischen Bedingungen mit dem Homopolymer erreicht wurde. Entsprechend zeichnete sich das Polymer als patente Erkennungseinheit für basische Proteine aus. So wurde mustergültig das Arginin- und Lysin -reiche Histon H1 erfolgreich gebunden. Wesentlich erstaunlicher war jedoch, dass ebenso eine Polymer-Protein-Interaktion mit dem sauren Albumin (BSA) verzeichnet wurde. Demgemäß wurde das unerwartete Ergebnis so erklärt, dass das saure Protein, Arginin- und Lysin -reiche Domänen besitzt, an welches das Polymer nicht kovalent binden kann.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden einige Haftmonomere etabliert (Abb. 1.15), welche die vorhandene Erkennungseinheit durch neue Bindungsmotive verstärken sollten. Zugleich sollte mittels gezielter Auswahl an Haftgruppen eine partielle Protein-Selektivität erreicht werden.



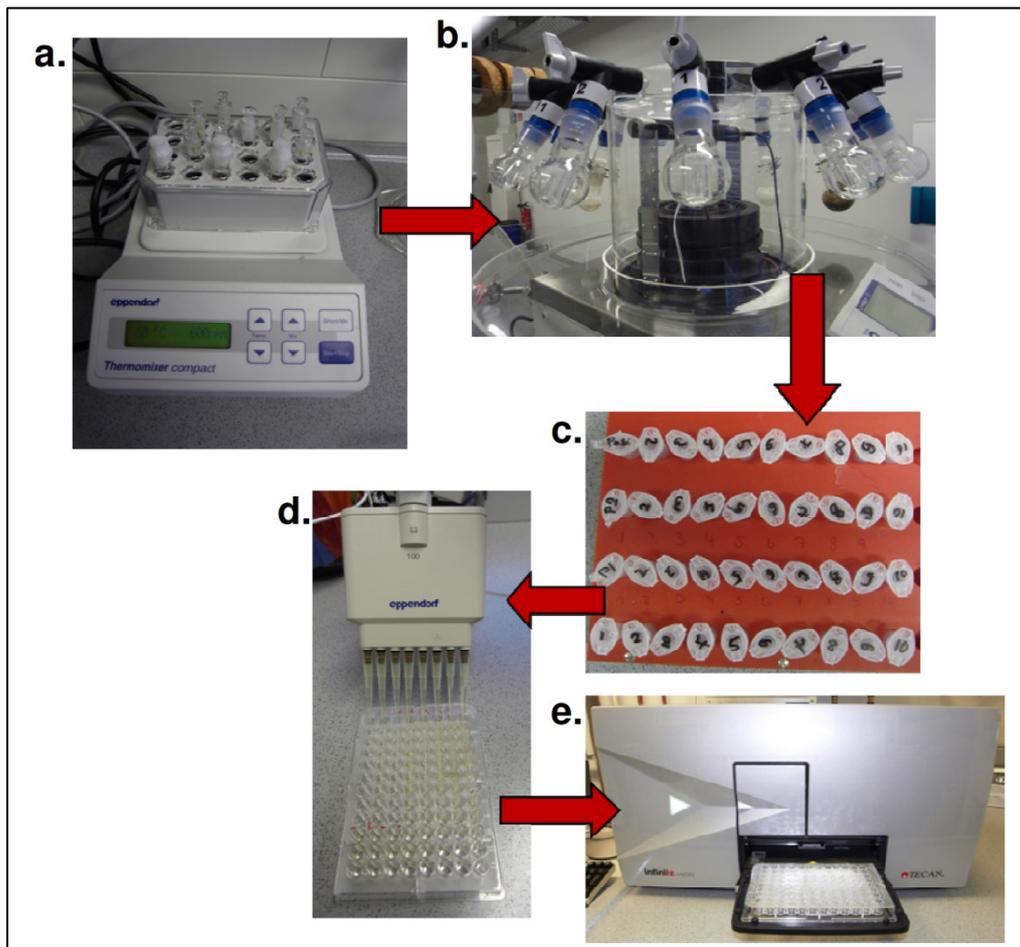
**Abb. 1.15:** Zusammenfassung der ersten etablierten Monomere im Arbeitskreis *Schrader*.<sup>[118]</sup>

Bindungsstudien an Lysozym bestätigten den gewünschten Effekt. So wurde zwischen einem Copolymer (Bausteine: **1**, **3**, **4**, **6**; im Verhältnis 3: 1: 0.5: 1) und dem Enzym eine um Faktor 100 höhere Bindungskonstante verzeichnet, als unter Verwendung des analogen Homopolymers (Baustein: **1**).<sup>[118]</sup> Weitergehende Untersuchungen von *Wenck* zeigten, dass die dargestellten Polymere nicht nur eine hohe Proteinaffinität besitzen, sondern sogar dessen enzymatische Aktivität hemmten, durch Abdeckung des aktiven Zentrums. Überdies wurde

zeigt, dass es sich bei der Inhibition um einen reversiblen Vorgang handelt, welcher ohne Denaturierung des Enzyms verläuft.<sup>[119]</sup>

Ausgehend von diesem Erfolg, wurden in den letzten Jahren einige neue Haftmonomere etabliert, welche eine selektive Enzyminhibierung unter physiologischen Bedingungen bewirkten.<sup>[120-124]</sup>

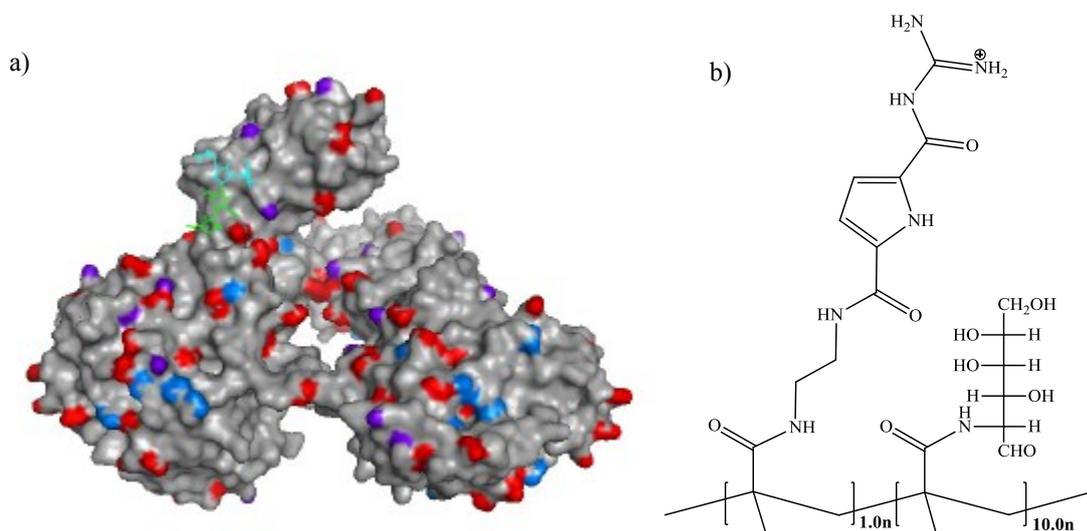
Darüber hinaus wurde von *Wenck* ein Verfahren eingeführt, welches die Parallelsynthese von Polymeren ermöglichte (Abb. 1.16a-c) und so zum Aufbau einer „Polymer-Bibliothek“ führte.<sup>[122]</sup> Die Polymerisation wurde in einem Thermomixer mit einem Bruchteil der sonst üblichen Monomermengen durchgeführt. Die anschließende Aufarbeitung erfolgte lediglich durch Gefriertrocknung der Reaktionslösungen. Entsprechend konnte durch das eingeführte Verfahren, ein „High-Throughput-Screenings“ ermöglicht werden (Abb. 1.16c-e).



**Abb. 1.16:** Schematische Darstellung des von *Wenck* eingeführten Polymerisationsverfahrens, wie auch den anschließenden enzymatischen Aktivitätstests.<sup>[122]</sup>

Die im Rahmen von *Wencks* Arbeit erstellte Polymer-Bibliothek wurde speziell gegen diverse Verdauungshydrolasen getestet. Das dahinter stehende Motiv beruhte auf einer noch nicht vorhandenen Behandlungsmöglichkeit der Pankreatitis. Dies sollte dadurch erreicht werden, dass die im Pankreas voraktivierten Enzyme selektiv gehemmt werden, um den von ihnen verursachten Organschäden aktiv entgegenzuwirken.

Dementsprechend wurden bereits einige Hydrolasen erfolgreich inhibiert. Neben der spezifischen Inhibition von Lipase und Cathepsin D, konnte ferner, wenn auch nicht selektiv Trypsin gehemmt werden. Die Hemmung der Lipase kann durch Abbildung 1.17 demonstriert werden. Da dieses Enzym sich durch eine besonders große Carboxylat-Domäne auszeichnet, konnte es selektiv durch eine multivalente Carboxylat-Erkennungseinheit (Abb. 17b) inhibiert werden.



**Abb. 1.17:** a) Oberflächenabschnitt der Lipase: rote Flächen symbolisieren die Carboxylat-Gruppen der sauren Aminosäuren, blaue Flächen stellen Arginine, violette Lysine dar. b) Aufbau des polyvalenten Lipase-Hemmstoffes (Polymer 31).<sup>[122]</sup>

In weiteren Versuchen wurde der Einbau von Substratmimetika auf Methacrylsäure-Basis untersucht. Jedoch zeigten die gebildeten Copolymere keinen Erfolg bei der Inhibition der substratspezifischen Hydrolasen.

## 2. Aufgabenstellung

Die Behandlung der Pankreatitis stellt ein allgegenwärtiges Problem der heutigen Medizin dar. Ursache der Krankheit kann eine Aktivierung von Trypsinogen innerhalb des Drüsenorgans sein.<sup>[12]</sup> Das freigesetzte Trypsin führt zur einer Aktivierung der in der Pankreas enthaltenen Proenzyme, was eine „Selbstverdauung“ des Organs zur Folge hat. Überdies kann die Autodigestion zur einer Limitierung der exokrinen und endokrinen Pankreasfunktion<sup>[23, 24]</sup>, wie auch zu Schädigungen anderer Organe führen.<sup>[12, 19-22]</sup> Therapie-Ansätze welche kausal in den pathologisch, physiologischen Mechanismus eingreifen sollten, verliefen erfolglos. So konnten weder antisekretorische Hormone<sup>[30-35, 37]</sup>, noch literaturbekannte Protease Hemmer<sup>[27, 30]</sup> einen therapeutischen Erfolg verzeichnen.

Basierend auf der oben beschriebenen Problematik, ist das Ziel dieser Arbeit die spezifische Inhibition von verdauungsrelevanten Enzymen. Dies sollte mittels selektiver Oberflächenerkennung der Proteasen, durch komplementäre Copolymere erreicht werden. Zudem durfte ein potentieller Hemmstoff nicht das gerinnungsrelevante Enzym Thrombin inhibieren. Ferner sollten weiterführende Studien Auskunft über den Hemmmechanismus der Polymer-Enzym-Interaktion geben, welches ein gezielteres Polymerdesign erlaubte.

Ausgangspunkt für die Darstellung multivalenter Rezeptoren ist die Synthese von Monomer-Bausteinen. Neben der Synthese bereits etablierter Monomere, war es wesentlich bestehende Bindungsmotive zu verstärken bzw. zu erweitern. Ein Ansatzpunkt sollte die Erhöhung der Flexibilität der Haftgruppen durch Einsatz von Spacer-Einheiten sein. Das dahinter stehende Motiv war die Stärkung der Oberflächeninteraktion der Haftgruppen, durch Distanzierung des sterisch anspruchsvollen Polymerrückgrats. Dies sollte gewährleisten, dass eine mögliche Oberflächenabstoßung durch benachbarte nicht komplementäre Haftgruppen vermieden wird. Ferner wäre so eine Interaktion zu Protein-Kavitäten möglich, welche aus sterischer Sicht durch direkte Anbindung der Haftgruppe an das Polymerrückgrat undenkbar wäre. So könnten neben der Haftgruppen bedingten Oberflächenerkennung, bestenfalls eine zusätzliche Wechselwirkung zum Aktiven Zentrum ausgebildet werden, was eine Erhöhung der Enzymselektivität zur Folge hätte. Weiterhin war die Syntheseoptimierung und Modifizierung einiger Monomere von ubiquitärer Bedeutung.

Der zweite Abschnitt dieser Arbeit befasste sich mit der Synthese der polyvalenten Erkennungseinheiten bzw. mit dem Aufbau einer „Polymer-Bibliothek“. Zu diesem Zweck musste das von *Wenck* eingeführte Polymer-Parallelsynthese-Verfahren<sup>[122]</sup> in einigen Punkten optimiert werden. In erster Instanz sollten die optimalen Polymerisationsparameter durch diverse Copolymerisation bei variablen Reaktionstemperaturen und Zeiten ermittelt werden, welche eine „möglichst schnelle“ und „reproduzierbare“ Polymerisation gewährleisten. Der zweite Punkt bestand darin, ein Reinigungsverfahren zu entwickeln bzw. zu finden, was die Polymerisationsprodukte von Oligomeren, nicht umgesetzten Monomeren und idealerweise auch von DMF separiert. Ferner sollte das ganze Verfahren, welches die Polymerisation, die Aufreinigung, sowie die Trocknung der Copolymere beinhaltet, innerhalb von einer Woche ermöglicht werden.

Das Design der Polymere selbst, sollte sich an zwei Aspekten orientieren. Im ersten Aspekt konnte aus den Resultaten der vorhandenen „Polymer-Bibliothek“, eine Polymergrundstruktur abgeleitet werden. Der zweite Aspekt beruht auf der Kenntnis der Kristallstruktur des zu hemmenden Enzyms, welche Auskunft über die Proteinoberfläche gibt und so ein spezifischeres Polymer-Design erlaubt.

Die inhibitorische Wirksamkeit der dargestellten Polymere sollten in Form von Enzym-Assays untersucht werden. Um ein „High-Throughput-Screening“ zu gewährleisten, mussten diese Messungen in einem Mikroplatten-Reader durchgeführt werden. Grundvoraussetzung hierfür war die Etablierung eines Enzym-Assays, welcher sich in mehrere Punkte gliederte. Neben der Literaturrecherche nach bereits vorhanden Enzym-Assays, Substraten und Puffer-Systemen in welchen das Enzym unter physiologischen Bedingungen arbeitet, mussten die Substrat- und Enzymkonzentrationen optimal angepasst werden. Weiterhin musste die Funktionalität der Messmethode durch literaturbekannte Inhibitoren überprüft werden.

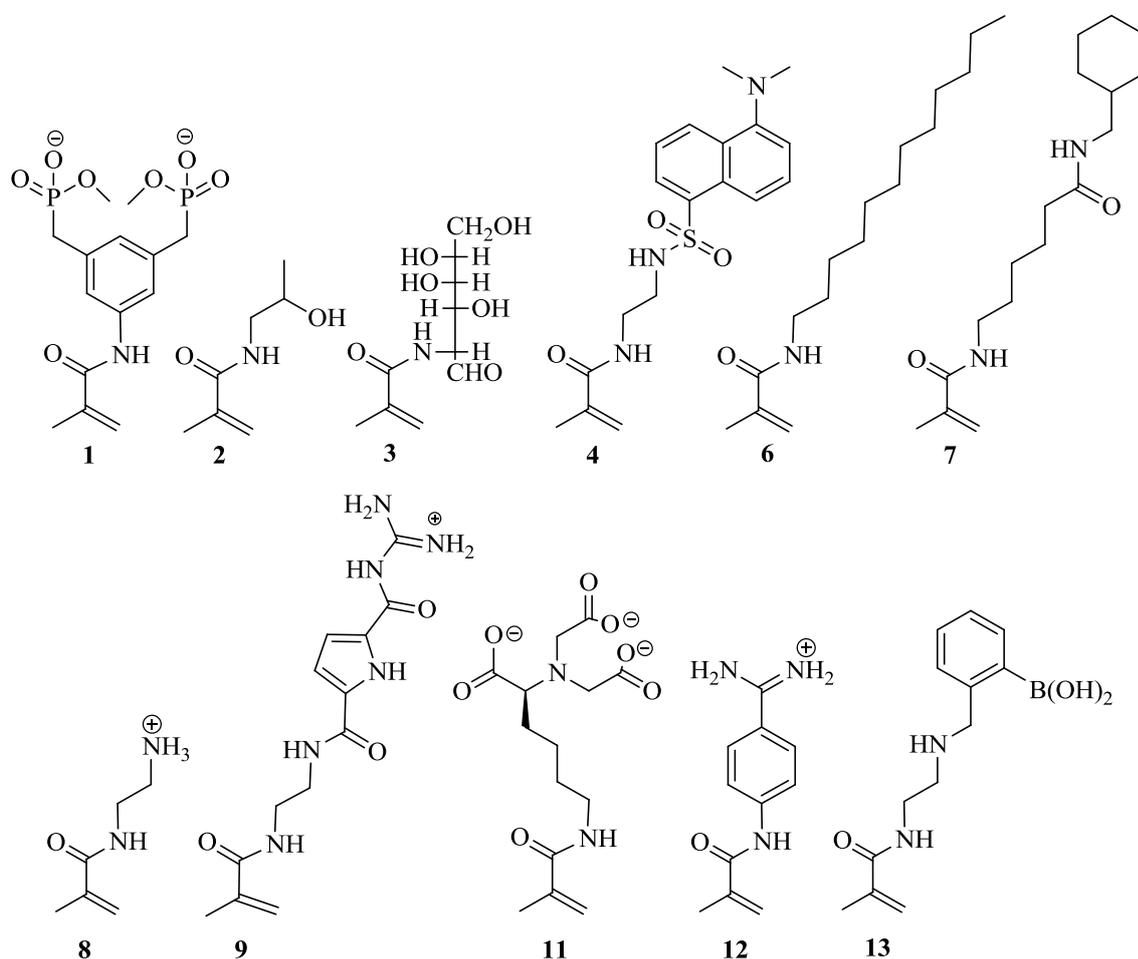
Nachdem einem Polymer eine inhibitorische Wirksamkeit zugeordnet werden konnte, sollte die Effektivität des Polymers durch Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes ermittelt werden.

Aufbauende Studien, beispielsweise durch Lineweaver-Burk- und ITC-Messungen, sollten Auskunft über den Wirkungsmechanismus bzw. die Stärke der Protein-Polymer-Interaktion geben.

### 3. Durchführung und Ergebnisse

#### 3.1 Monomer-Bausteine

Innerhalb der letzten Jahre konnten in unserem Arbeitskreis einige Enzyme durch polyvalente Erkennungseinheiten erfolgreich gehemmt werden.<sup>[118, 119, 122, 123]</sup> Grundlage für die Oberflächenerkennung war eine gezielte Auswahl von diversen Monomeren, welche durch radikalische Copolymerisation erfolgreich verknüpft wurden. Die dabei verwendeten Haftgruppen (Abb. 3.1.1) zeichnen sich durch unterschiedliche Bindungsmotive aus, welche kurz erläutert werden.



**Abb. 3.1.1:** Überblick einiger Monomer-Bausteine, welche bereits erfolgreich im Arbeitskreis *Schrader* etabliert und im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Die auf Methacrylsäure-Basis modifizierte Bisphosphonat-Pinzette (BP) **1** zeichnet sich als Erkennungseinheit für Lysine bzw. effizienter für Arginine aus.<sup>[111-113, 125]</sup>

Das Glucose-Monomer (Glu) **3**, wie auch das Isopropylamid-Monomer (Iso) **2**, haben die Funktion, die Wasserlöslichkeit des resultierenden Copolymers zu erhöhen.<sup>[126]</sup> Weiterhin könnten diese Wasserstoffbrückenbindungen zu Proteinoberflächen ausbilden.

Der Methacrylsäure modifizierte Dansyl-Baustein (Dan) **4** dient als Fluoreszenzmarker.<sup>[127]</sup> Der „Polymer-Einbau“ dieser Komponente ermöglicht eine Fluoreszenz-Titration, welche Auskunft über die Bindungsstärke der Polymer-Protein-Interaktion gibt. Ferner könnte das Monomer eine  $\pi$ - $\pi$ -Stapel-Wechselwirkung zu aromatischen Aminosäuren ausbilden.

Das Dodecyl-Monomer (Dod) **6** wie auch das C<sub>6</sub>-Cyclohexyl-Monomer (C<sub>6</sub>-CyH) **7** sollen durch ihren hydrophoben Charakter mit unpolaren Kavitäten, wie auch mit unpolaren Aminosäuren interagieren und so bekannte Bindungsmotive verstärken.<sup>[128]</sup>

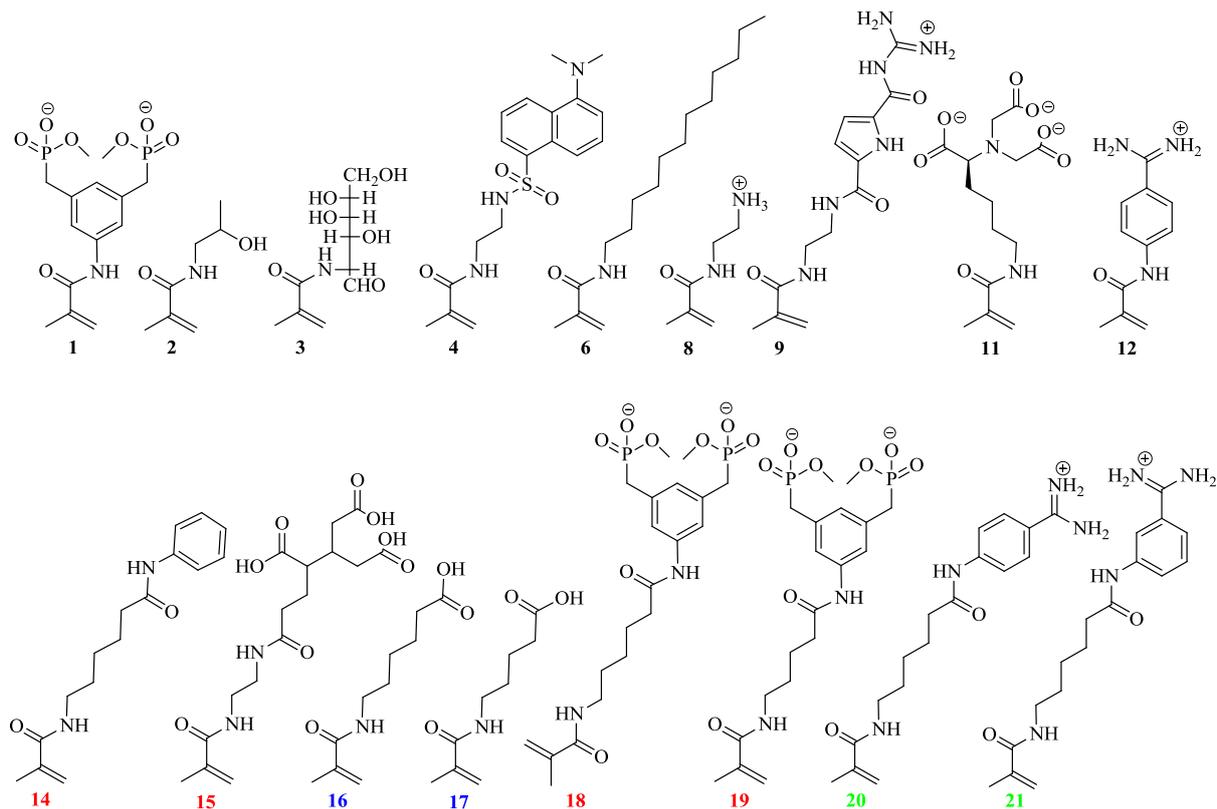
Ammonium-Monomer (ED) **8** sollte ursprünglich als Carboxylat-Erkennungseinheit fungieren, jedoch konnte dieser Effekt unter physiologischen Bedingungen nicht nachgewiesen werden.<sup>[121]</sup> Ferner dient das Monomer als Spacer-Einheit bzw. trägt das Monomer durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit des resultierenden Copolymers bei. Als Carboxylat-Erkennungseinheit fungiert das von *Schmuck et al.* entwickelte Bindungsmotiv auf Basis eines Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptors (CBS) **9**.<sup>[129-131]</sup> Weiterhin dient das 4-Amino-Benzamidin-Monomer (BA) **12** als Carboxylat-Erkennungseinheit.<sup>[132]</sup>

Das von *Hochuli et al.* entwickelte Bindungsmotiv fungiert mittels Einsatz von Ni<sup>2+</sup>-Ionen als Histidin-Erkennungseinheit<sup>[133]</sup>, welche erfolgreich auf Methacrylsäure-Basis modifiziert wurde (NTA) **11**.<sup>[121, 134]</sup>

Boronsäure dient zur Bindung von 1,2- bzw. 1,3-Diolen durch cyclische Esterbildung.<sup>[135]</sup> Neben der Hauptfunktion als Glucose-Erkennungseinheit, könnte das Boronsäure-Monomer (Bor) **13** eventuell Serinreste an der Proteinoberfläche binden.<sup>[136, 137]</sup>

### 3.1.1 Synthetisierte Monomere

Im Rahmen der Arbeit konnten neben den bereits etablierten Monomeren **1-4**, **6**, **8-12** einige weitere Monomere bzw. Spacer erfolgreich synthetisiert werden. Ferner wurde versucht zwei unterschiedliche, mit Spacer modifizierte BA-Monomere darzustellen (Abb. 3.1.2). Die Darstellung der bereits etablierten Haftgruppen, sowie die Synthesestrategie die zu neuen Monomeren führte, wird unter den folgenden Punkten beschrieben.

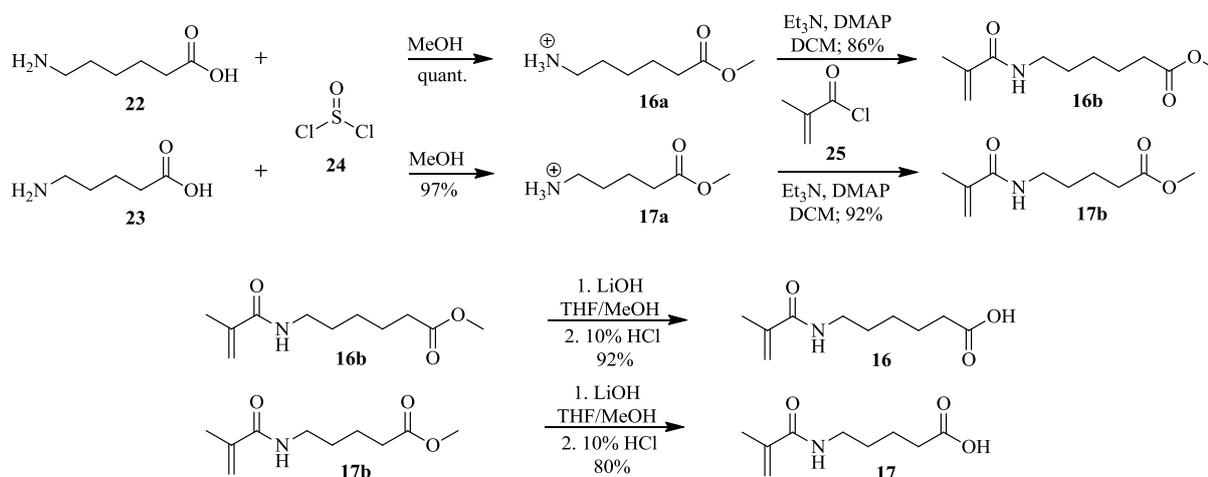


**Abb. 3.1.2:** Im Rahmen dieser Arbeit „synthetisierte“ Monomer-Bausteine. Die schwarz gekennzeichneten Monomere stellen bereits etablierte Haftgruppen dar. Rot markierte Verbindungen veranschaulichen die in dieser Arbeit neu dargestellten Monomere, blau markierte Spacer. Die grünen Moleküle bilden modifizierte BA-Monomere ab, deren Synthese jedoch, trotz großem präparativem Aufwands, fehlschlug.

### 3.1.1.1 Monomere-Spacer-Einheiten (8, 16 und 17)

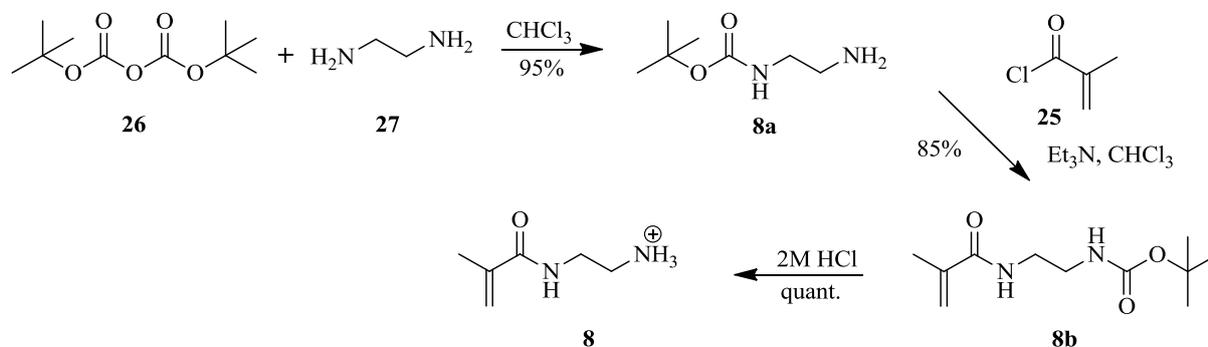
Um bereits etablierten Erkennungseinheiten eine höhere Flexibilität im Polymerrückgrat zu ermöglichen, war die Entwicklung von neuen Spacer-Einheiten nötig. Alternativ zu dem relativ kurzem ED-Spacer **8**, sollten diese eine „verlängerte“ Methacrylsäure darstellen, welche durch einfache Peptidkupplung mit einem Rezeptor verknüpft werden kann.

Die Darstellung der C<sub>5/6</sub>-Methacrylsäure-Spacer-Einheiten **16** und **17** erfolgte in jeweils drei Syntheseschritten (Abb. 3.1.3).



**Abb. 3.1.3:** Reaktionsschema zur Darstellung der Spacer-Monomere **16** und **17**.

Nach dem oben beschriebenen Reaktionsschema konnten die Monomere **16** und **17** mit sehr hohen Ausbeuten im „Gramm“-Maßstab synthetisiert werden. Die erhaltenen Monomer-Bausteine wiesen keinerlei Verunreinigungen in der MS-Analyse, wie auch in den <sup>13</sup>C-NMR- und <sup>1</sup>H-NMR-Spektren auf (Abb. 5.3.7 - 5.3.10).



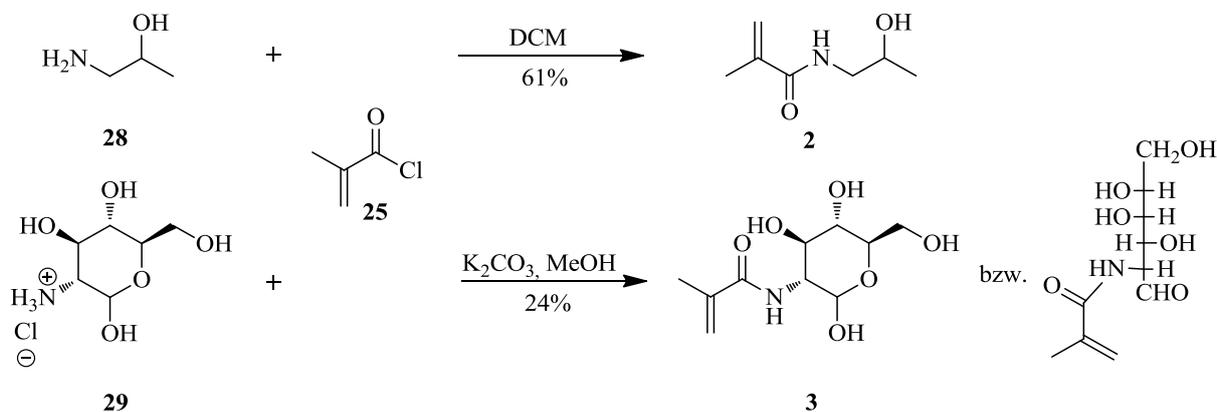
**Abb. 3.1.4:** Reaktionsschema zur Darstellung des Ammonium-Monomers **8**.

Als weitere Spacer-Alternative wurde das Monomer **8** dargestellt (Abb. 3.1.4). Abweichend zur bekannten Vorschrift<sup>[122]</sup> erfolgte die Aufreinigung der 2. Stufe säulenchromatographisch, was eine Ausbeuteerhöhung des Produktes zur Folge hatte. Ferner konnte das beschriebene Reinigungsverfahren leichter verwirklicht werden, als eine zweifache Umkristallisation eines flüssigen Rohproduktes.

### 3.1.1.2 Hydrophile Monomere (2 und 3)

Bedingt durch die Hydroxy-Gruppe/n der Monomere **2** und **3**, führen diese zur einer erhöhten Polymer-Wasserlöslichkeit, was eine Polymer-Protein-Interaktion unter physiologischen Bedingungen ermöglicht. Ferner findet das Iso-Monomer **2** als Spacer-Baustein innerhalb des Polymerrückgrats Verwendung, ohne die Gesamtlöslichkeit des Copolymers zu mindern. Der Einbau dieser Komponente soll sterisch anspruchsvolle oder „gleichgeladene“ Haftgruppen voneinander distanzieren und so diesen im resultierenden Polymer zur einer möglichst hohen Flexibilität verhelfen.

Die Darstellung der beiden Monomere verläuft jeweils über eine einstufige Peptidkupplung mit Methacrylsäurechlorid **25** (Abb. 3.1.5).



**Abb. 3.1.5:** Reaktionsschema zur Darstellung der polaren Monomer-Bausteine **2** und **3**.

Alternativ erfolgte die Synthese des Glu-Monomers **3** unter Verwendung von Kaliumcarbonat als Base.<sup>[138]</sup> Dies vereinfachte die Reaktionsführung, verringerte die Aufarbeitungszeit und erhöhte die Ausbeute des gewünschten Produktes um Faktor drei.

Die Darstellung von Monomer **2** erfolgte nach einer bereits etablierten Vorschrift.<sup>[121]</sup>

### 3.1.1.3 Unpolare Monomere (4, 6 und 14)

Neben der Darstellung von Hydrophilen- und Aminosäure-selektiven-Monomeren, war die Synthese und Verwendung von Hydrophoben-Monomeren ein ubiquitäres Thema dieser Arbeit. Die Bausteine **4**, **6**, und **14** haben die Funktion mittels nicht kovalenter hydrophober Wechselwirkung an Proteinoberflächen zu binden. Die Triebkraft dieser unpolaren Wechselwirkung ist entropischer Natur, bedingt durch eine Verringerung der Solvatationshülle. Weiterhin können die aromatischen Monomere **4** und **14** neben  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen auch  $\pi$ -kationische Wechselwirkungen ausbilden.

Monomer **4** stellt weiterhin einen Fluoreszenzmarker dar, durch welchen Affinitätsmessungen zwischen dem resultieren Polymer und dem zu bindenden Enzym ermöglicht werden. Die Synthese des hydrophoben Bausteins erfolgt in zwei Schritten (Abb. 3.1.6).<sup>[121, 139]</sup> Wobei lediglich die 2. Stufe, welche mittels säulenchromatographischer Aufreinigung gewonnen wurde, charakterisiert wurde (Abb. 5.3.29 und 5.3.30).

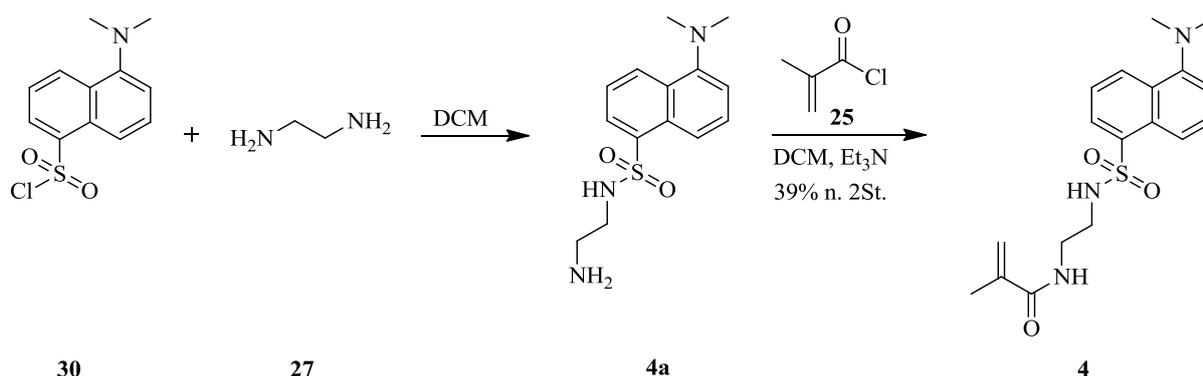


Abb. 3.1.6: Reaktionsschema zur Darstellung des Dan-Monomers **4**.

Baustein **14** stellt ein neues hydrophobes Monomer dar. Die Motivation zur Synthese dieser Verbindung war neben der  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung zu aromatischen Aminosäuren, eine  $\pi$ -kationische Wechselwirkung zu basischen Aminosäuren. Abweichend vom oben aufgeführten Dan-Baustein **4** sollte dieser jedoch eine erhöhte Flexibilität im Polymerrückgrat erhalten.

Die Darstellung des Monomers erfolgte in vier Stufen (Abb. 3.1.7). Als Spacer-Einheit wurde 6-Aminohexansäure **22** gewählt, welche durch Einsatz von Boc<sub>2</sub>O **26** geschützt wird.<sup>[140]</sup> Anschließend wurde eine Peptidkupplung unter Verwendung von HCTU und Anilin **31** durchgeführt. Nach Boc-Entschützung erfolgte eine weitere Peptidkupplung mit Methacrylsäurechlorid **25**. Eine säulenchromatographische Aufreinigung des Rohproduktes konnte mittels Fällung des Produktes **14** in VE-Wasser erspart werden.

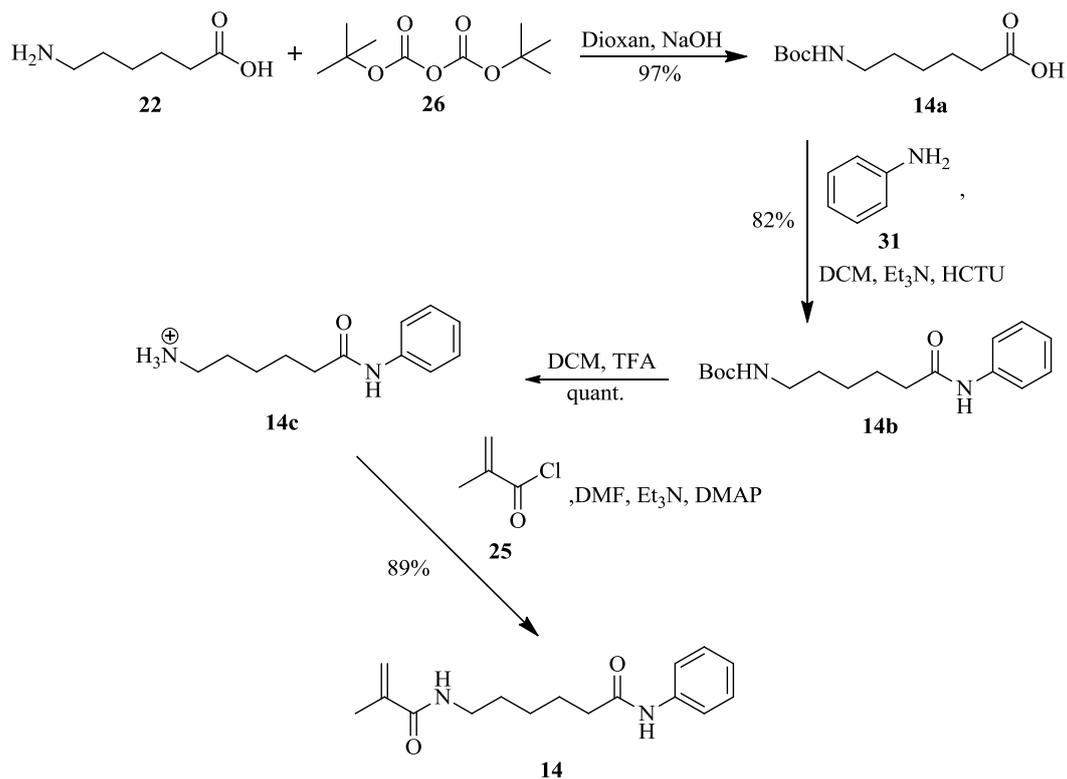


Abb. 3.1.7: Reaktionsschema zur Darstellung des Ani-Monomers 14.

Anhand des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums konnte das Produkt eindeutig zugeordnet werden.

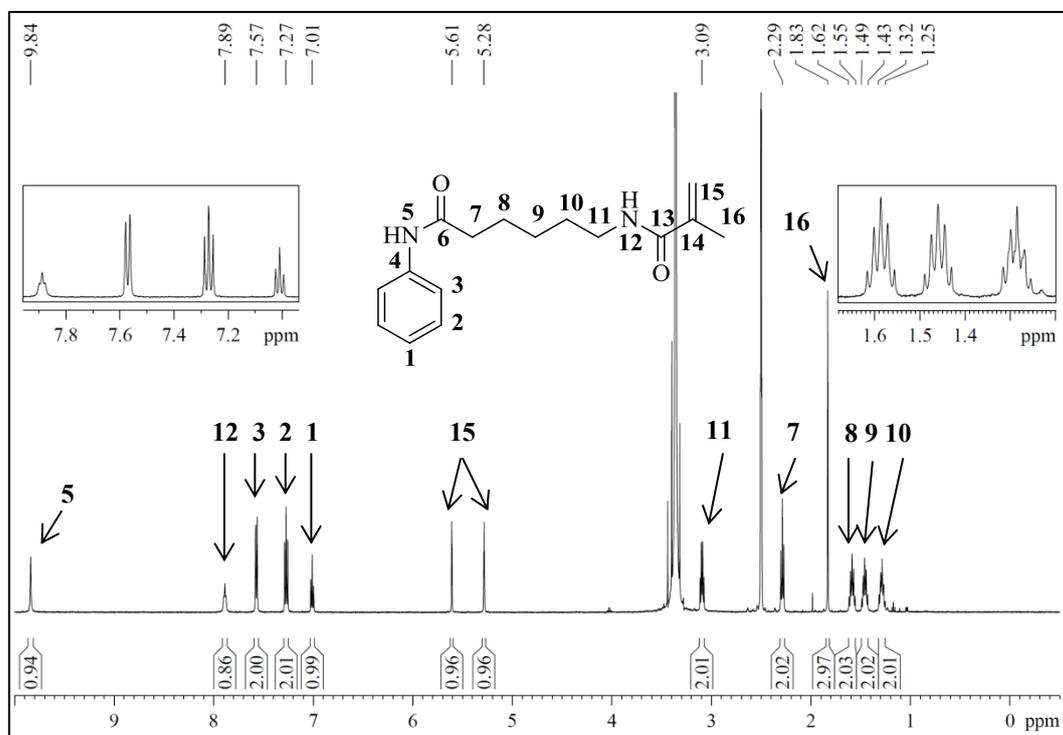
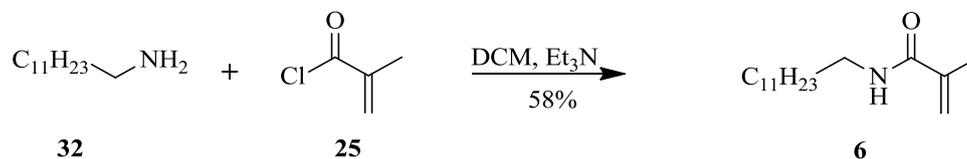


Abb. 3.1.8:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) des Ani-Monomers 14.

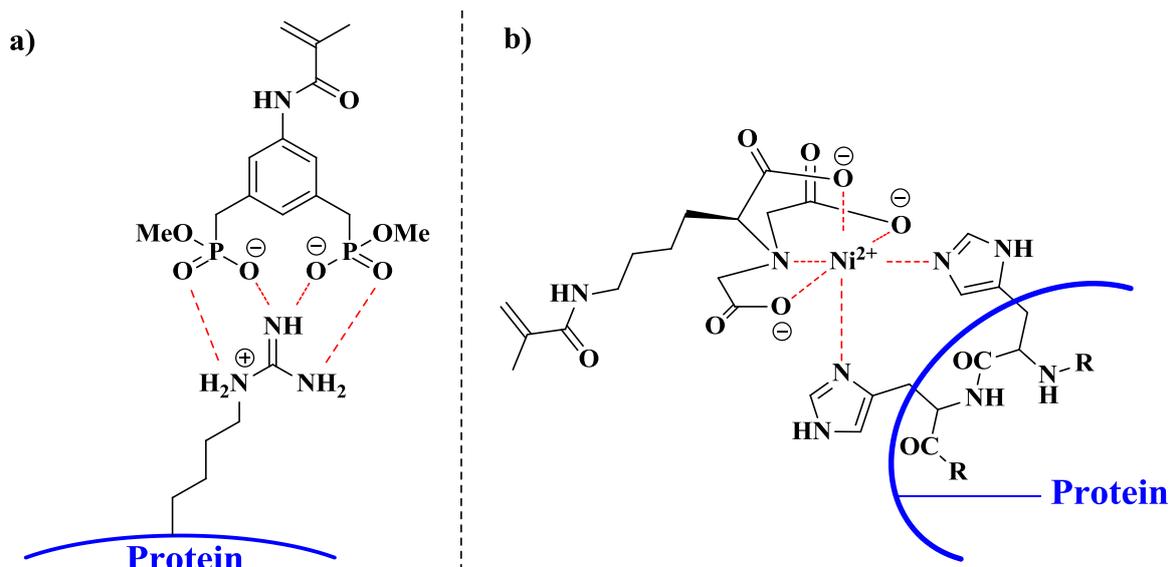
Die Darstellung des bereits etablierten Dod-Monomers **6** erfolgte durch eine einfache Peptidkupplung nach literaturbekannter Vorschrift (Abb. 3.1.9).<sup>[121]</sup> Abweichend erfolgte eine säulenchromatographische Aufreinigung des verunreinigten Produkts, was zur einer starken Erhöhung des Reinigungsgrads des Bausteins führte.



**Abb. 3.1.9:** Reaktionsschema zur Darstellung des Dod-Monomers **6**.

### 3.1.1.4 Monomere zur Erkennung basischer Aminosäuren (**1**, **11**, **15**, **18** und **19**)

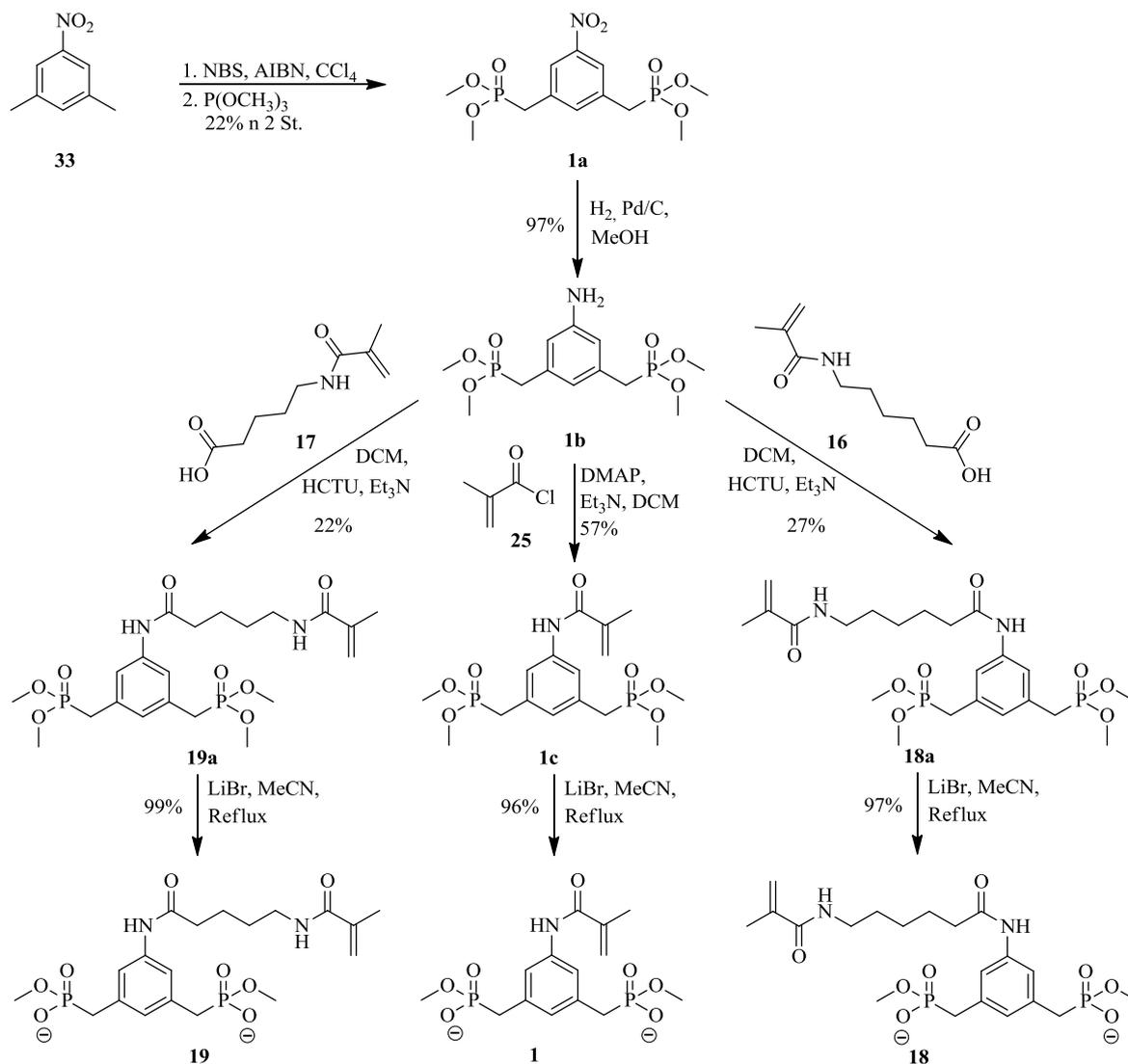
Zur Gruppe der basischen Aminosäuren gehören Arginin, Lysin und Histidin. Als bereits bekannte Erkennungseinheit für Arginine und „Lysine“ fungiert das BP-Monomer **1**. Das Erkennungsmotiv beruht auf einem Zusammenspiel von Wasserstoffbrückenbindungen, ionischen Wechselwirkungen sowie  $\pi$ -kationischen Wechselwirkungen (Abb. 3.1.10a).<sup>[111-114]</sup> Hingegen dient das von *Hochuli et al.*<sup>[133]</sup> entwickelte und von *Shea et al.*<sup>[134]</sup> modifizierte Methacrylsäure Bindungsmotiv als Histidin-Erkennungseinheit. Das Bindungsmotiv des Nitrilotriessigsäure basierenden NTA-Monomers **11** beruht auf einer Komplexierung von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen. Die beiden verbleibenden Bindungsstellen des Zentralatoms fungieren nun als Akzeptorstellen für die Stickstoffatome des Histidins, wodurch die Erkennung ermöglicht wird (Abb. 3.1.10b).



**Abb. 3.1.10:** Proteinbindung durch Oberflächenerkennung basischer Aminosäuren. a) Schematische Darstellung einer möglichen Interaktion zwischen den BP-Monomer **1** und einer Arginin enthaltene Guanidinium-Gruppe. b) Schematische Darstellung einer möglichen Histidin-Erkennung durch Bildung eines oktaedrischen  $\text{Ni}^{2+}$ -Komplexes unter Verwendung des NTA-Monomers **11**.

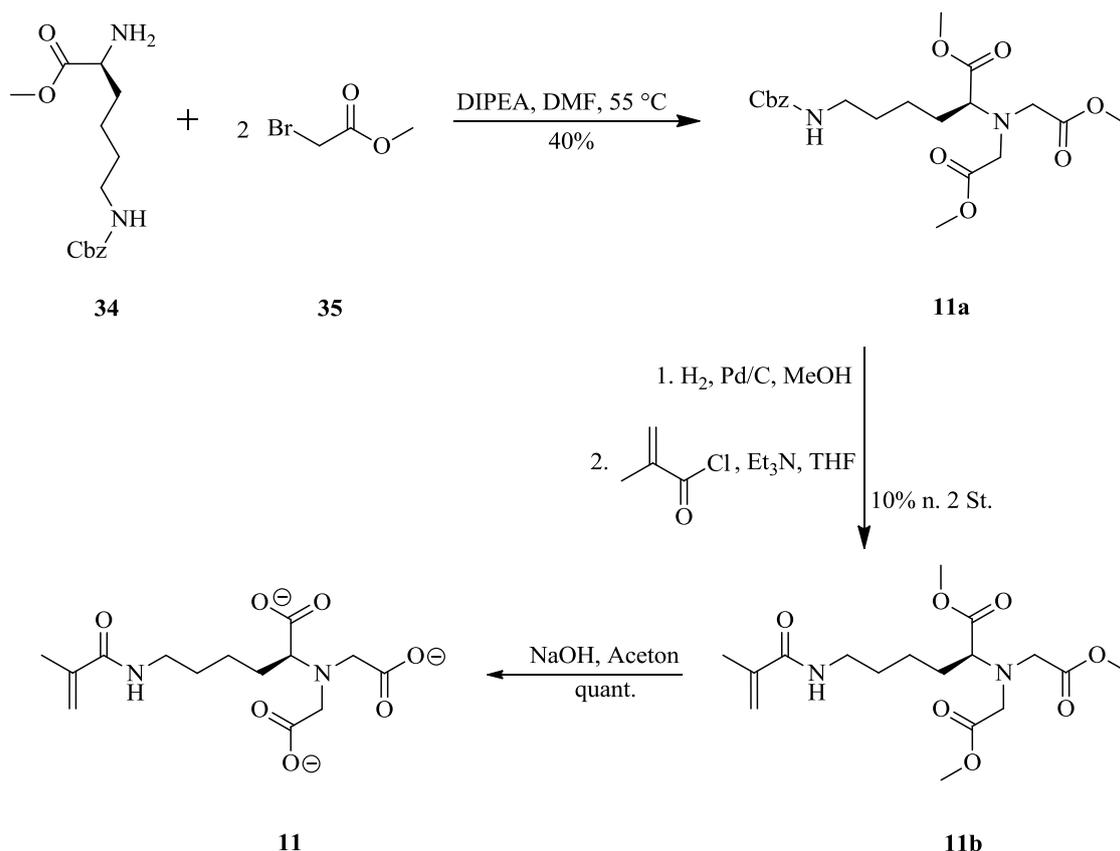
Wie aus der Abbildung 3.3.10 ersichtlich ist, besitzt das NTA-Monomer **11** gegenüber den BP-Baustein **1**, eine „Lysin basierende Spacer-Einheit“, welches dem Rezeptor ein hohes Maß an Flexibilität im Polymerrückgrat gewährt. Hingegen befindet sich das aromatische System des BP-Bausteins „direkt“ am Polymerrückgrat, was dessen Beweglichkeit innerhalb eines Copolymers stark einschränkt. Aus diesem Grund war es nötig, dass vorhandene BP-Bindungsmotiv **1** durch Einbau von Spacer-Einheiten zu variieren.

Die Darstellung der unterschiedlichen BP-Monomere **1**, **18** und **19** erfolgte in jeweils fünf Stufen. Als Ausgangssubstanz dient 5-Nitro-*m*-xylo **33**, welches nach radikalischer Substitution und Arbusow-Reaktion in einen *Bis*-Phosphonsäureester überführt wurde **1a**. Nach Reduktion der Nitro-Gruppe erfolgte eine variable Peptidkupplung mit Methacrylsäurechlorid **25** wie auch den beiden Spacer-Monomeren **16** und **17**. Die einfache Esterspaltung der *Bis*-Phosphonsäureester **1c**, **18a** und **19a** führte zu den BP-Monomeren (BP-Monomer **1**, C<sub>5</sub>-BP-Monomer **19** und C<sub>6</sub>-BP-Monomer **18**).



**Abb. 3.1.11:** Syntheseroute zur Darstellung der variablen BP-Monomere (C<sub>5</sub>-BP-Monomer **19**, BP-Monomer **1** und C<sub>6</sub>-BP-Monomer **18**).

Die Darstellung des „sauberen“ NTA-Monomers **11**, war nach literaturbekannter Vorschrift sehr zeitaufwendig.<sup>[122, 134]</sup> Ferner waren die Produktausbeuten der einzelnen Stufen sehr gering. Auf Grundlage dieser Probleme wurde die bekannte Syntheseroute verändert (Abb. 3.1.12), was zum einen dazu führte, dass die Ausbeute der 1. Stufe erhöht werden konnte, zum anderen konnte die säulenchromatographische Aufreinigung in einem Bruchteil der Zeit durchgeführt werden. *Stratmann*<sup>[141]</sup> konnte so beispielsweise die Ausbeute der 1. Stufe von 24 % auf 53 % steigern. Weiterhin von Interesse ist, dass es sich bei dem in dieser Stufe befindlichen Nebenprodukt um das einfach substituierte Lysin-Derivat handelt, welches in zukünftigen Arbeiten eventuell zur Darstellung asymmetrischer NTA-Monomere verwendet werden könnte. Die Aufreinigung und Ausbeute der 3. Stufe stellte weiterhin ein Problem dar.



**Abb. 3.1.12:** Reaktionsschema zur Darstellung des NTA-Monomers **11**.

Alternativ wurde ein weiterer NTA-Baustein auf Glutaminsäure-Basis synthetisiert, dessen Darstellung und Aufreinigung einen wesentlich geringeren Zeitaufwand beanspruchte. Die Darstellung des NTA-Glu-Monomers erfolgte in vier Stufen (Abb. 3.1.13). Substitution wie Cbz-Entschützung, welche zum Zwischenprodukt **15b** führten, stellten bereits literaturbekannte Synthesen dar.<sup>[142]</sup> Durch Peptidkupplung mittels Einsatz des ED-Monomers **8** und anschließender Entschützung durch TFA wurde das NTA-Glu-Monomer **15** erhalten. Der Baustein konnte gegenüber dem bereits etablierten NTA-Monomer **11** mit relativ geringem Zeitaufwand und hoher Produktausbeute dargestellt werden. Hingegen zeigte dieses eine wesentlich schlechteres Lösungsverhalten in Wasser, selbst unter geringer Zugabe von Natronlauge, welche die dreiwertige Säure in ihr Salz überführen sollte. Ferner enthielt das Produkt *tert*-Butanol Reste, welche selbst unter Ölpumpenvakuum nicht entfernt werden konnten.

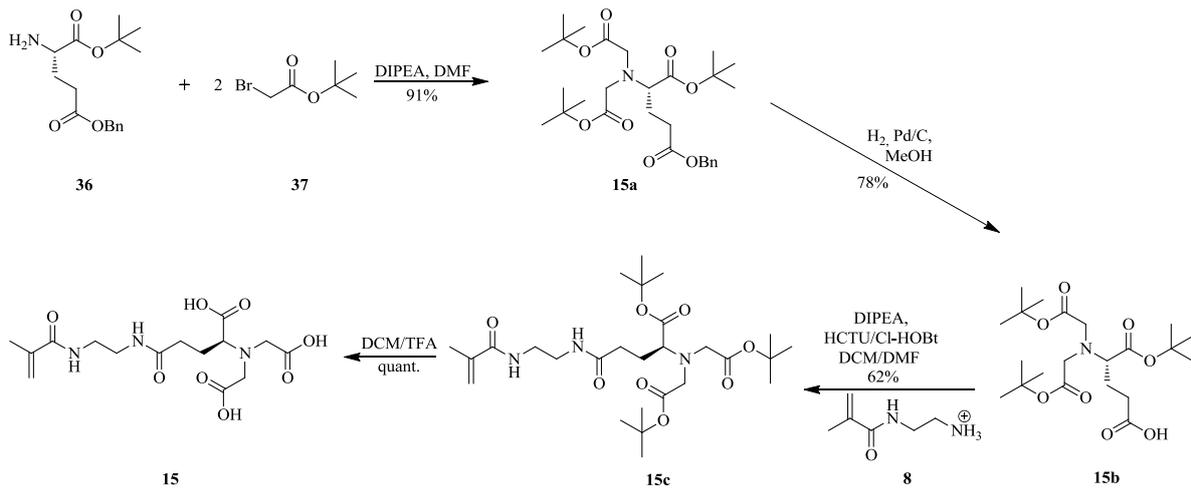


Abb. 3.1.13: Reaktionsschema zur Darstellung des NTA-Glu-Monomers **15**.

Anhand des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums konnte das Produkt eindeutig zugeordnet werden.

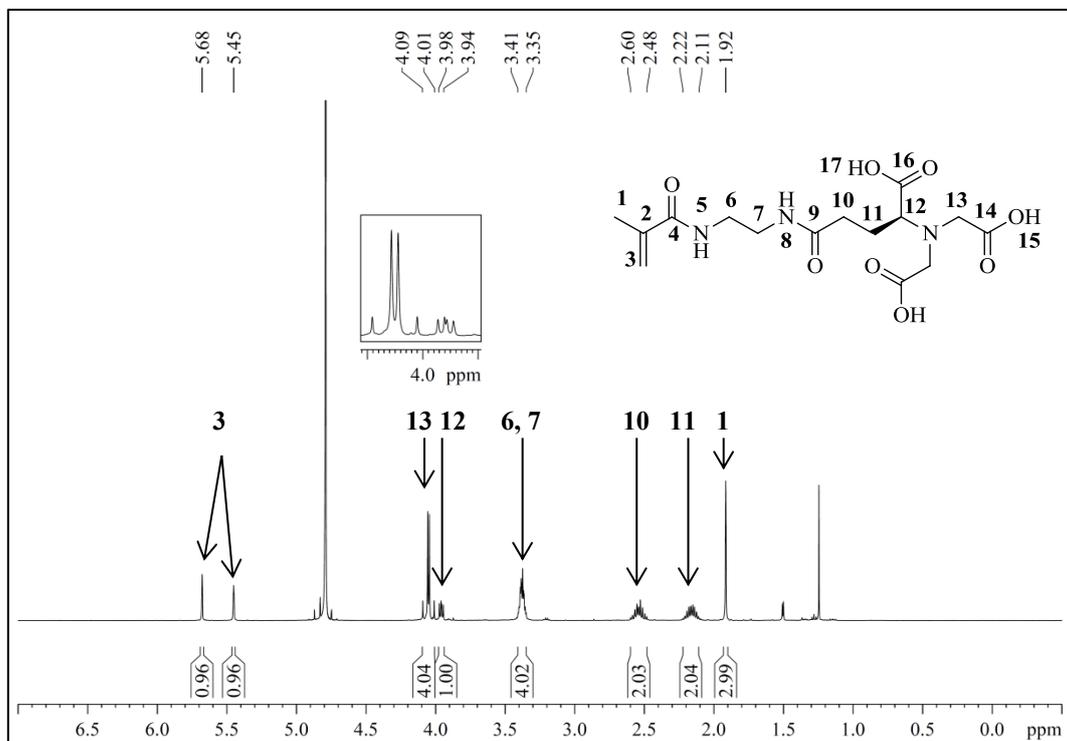
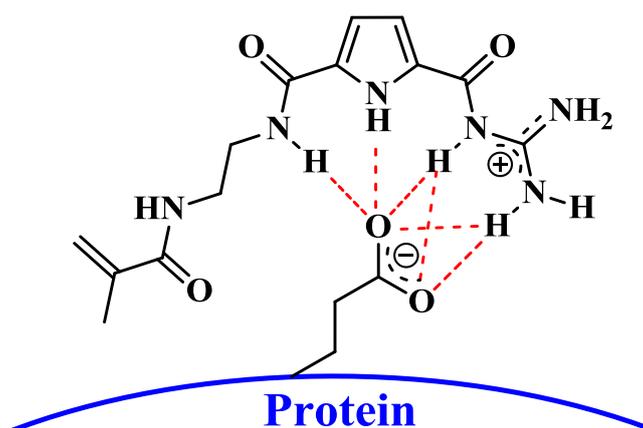


Abb. 3.1.14:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) des NTA-Glu-Monomers **15**.

### 3.1.1.5 Monomere zur Erkennung saurer Aminosäuren (9, 12, 20, und 21)

Als allgegenwertige Carboxylat-Erkennungseinheit fungiert das von *Schmuck* eingeführte Bindungsmotiv auf Basis eines Guanidiniocarbonylpyrrol-Rezeptors.<sup>[129-131]</sup> Die Spezifität der Oxo-Anionen-Erkennung, welche selbst eine Komplexierung in wässrigen Medien ermöglicht, beruht auf einer Vielzahl kooperativer Wechselwirkungen (Abb. 3.1.15). Neben Wasserstoffbrückenbindungen kann das planare System  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen ausbilden.<sup>[115, 143]</sup>



**Abb. 3.1.15:** Proteinbindung durch Oberflächenerkennung saurer Aminosäuren. Schematische Darstellung einer möglichen Interaktion zwischen dem CBS-Monomer **9** und einer Glutaminsäure enthaltene Carboxylat-Gruppe.

Die Darstellung des Guanidiniocarbonylpyrrol basierenden Monomers **9** erfolgt in neun literaturbekannten Stufen (Abb. 3.1.16).<sup>[122, 144]</sup> Ausgangspunkt der Synthese war die elektrophile Substitution von Pyrrol **39** mit Trichloracetylchlorid **38**. Nach der Haloform-Reaktion erfolgte die Zweitsubstitution des heteroaromatischen Systems **9c** mittels Vilsmeier-Haack-Formylierung. Daraufhin wurde das Aldehyd durch Kaliumpermanganat oxidiert, was eine Peptidkupplung ermöglichte mit der Boc-geschützten Guanidinium-Gruppe **41**. Durch hydrogenolytische Entschützung des Benzylesters **9e**, konnte eine Peptidkupplung an der entschützten Säure vollzogen werden. Alternativ zur bekannten Vorschrift<sup>[122]</sup> wurde die Peptidkupplung mit dem ED-Monomer **8** im trockenen DMF unter Schutzgas-Atmosphäre durchgeführt. Nachdem das Lösungsmittel durch Kondensation entfernt wurde, erfolgte eine zweifache säulenchromatographische Aufreinigung des Rohproduktes, was zu einer Ausbeuteerhöhung von 37 % führte. Bei der letzten Stufe handelt es sich um eine Entschützung der Guanidinium-Gruppe, was zum CBS-Monomer **9** führte.

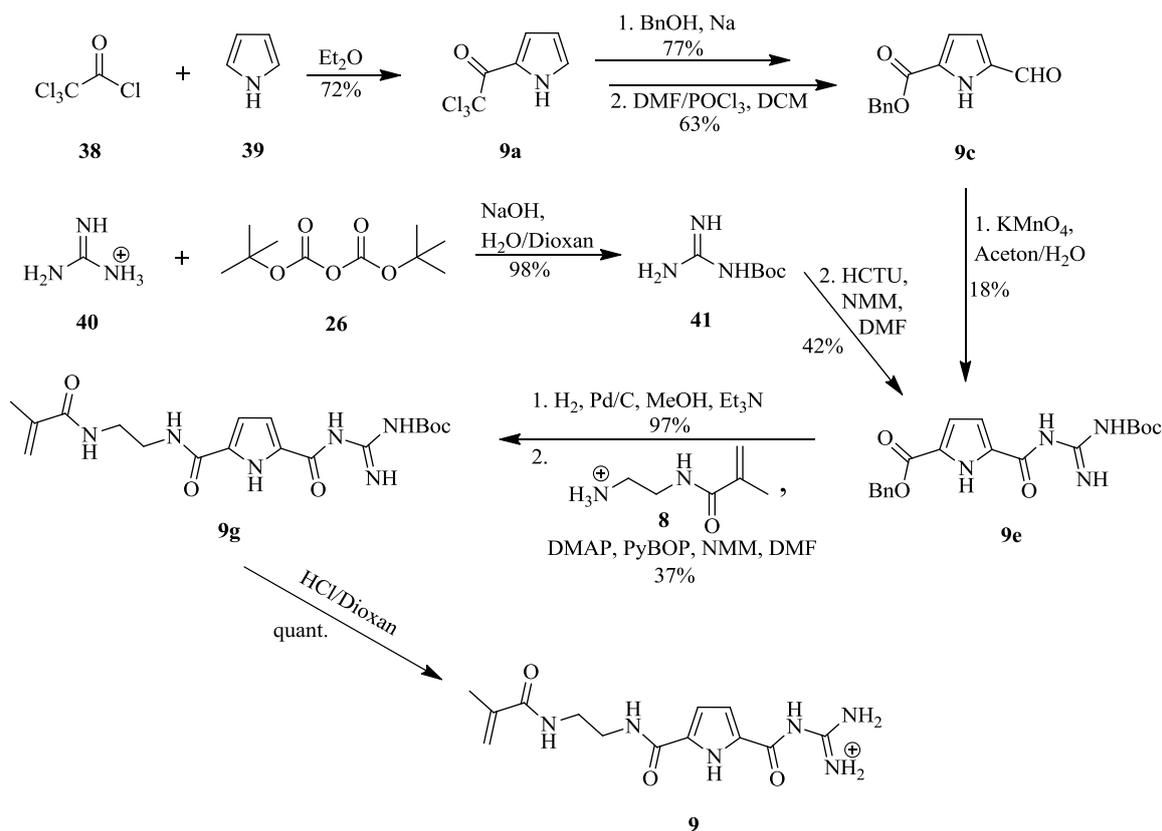


Abb. 3.1.16: Reaktionsschema zur Darstellung des CBS-Monomers **9**.

Die Darstellung des Monomers **9**, war jedoch mit einem hohen präparativen Aufwand verbunden. Neben der teils aufwendigen Synthese mussten fünf der neun Stufen säulenchromatographisch aufgereinigt werden. Ferner zeigt der Baustein keine Wasserlöslichkeit, was den Einsatz des Monomers bei der Copolymerisation auf Glucose-Baustein -reiche Polymere beschränkte.

Eine alternative Carboxylat-Erkennungseinheit stellt das bereits etablierte BA-Monomer **12** dar.<sup>[123, 145]</sup> Bei diesem Baustein fungiert die Amidin-Einheit, welche direkt an ein aromatisches System geknüpft ist als Carboxylatbinder. Benzamidine eignen sich ideal als Erkennungseinheit für Carboxylat-Gruppen, welche sich in Protein-Kavitäten befinden. So fungiert der nahezu planare Rezeptor beispielsweise als Trypsin-Hemmstoff. In diesem Fall bildet die Amidin-Gruppe Wasserstoffbrückenbindungen mit Serin- und Aspartat-Resten des aktiven Zentrums aus. Weiterhin bildet das aromatische System, welches sich in einer unpolaren Seitentasche befindet,  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zu anderen Aminosäure-Resten aus.<sup>[146]</sup>

Zahlreiche Veröffentlichungen bestätigen die universelle Verwendung der Benzamidin-Leitstruktur zur Enzymhemmung.<sup>[146-149]</sup>

Die Darstellung des BA-Monomers **12** (Abb. 3.1.17) erfolgte mittels Peptidkupplung mit Methacrylsäurechlorid **25**.

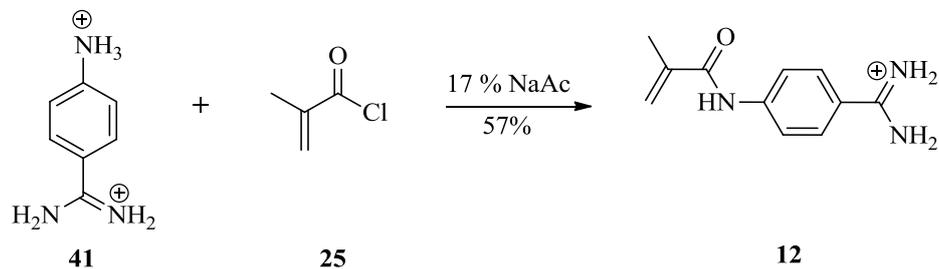


Abb. 3.1.17: Reaktionsschema zur Darstellung des BA-Monomers **12**.

Um eine höhere Flexibilität des Rezeptors im Polymerrückgrat zu gewährleisten, sollte dieser mit Methacrylsäure-basierenden Spacern verknüpft werden. Das dahinter stehende Motiv war neben der Proteinoberflächen-Interaktion der BA-Einheit, eine mögliche Wechselwirkung mit dem aktiven Zentrum der zu hemmenden Protease (Abb 3.1.18). Durch diese kombinierte Protein-Rezeptor-Interaktion, wäre die Hemmung von diversen Serin-Proteasen denkbar.

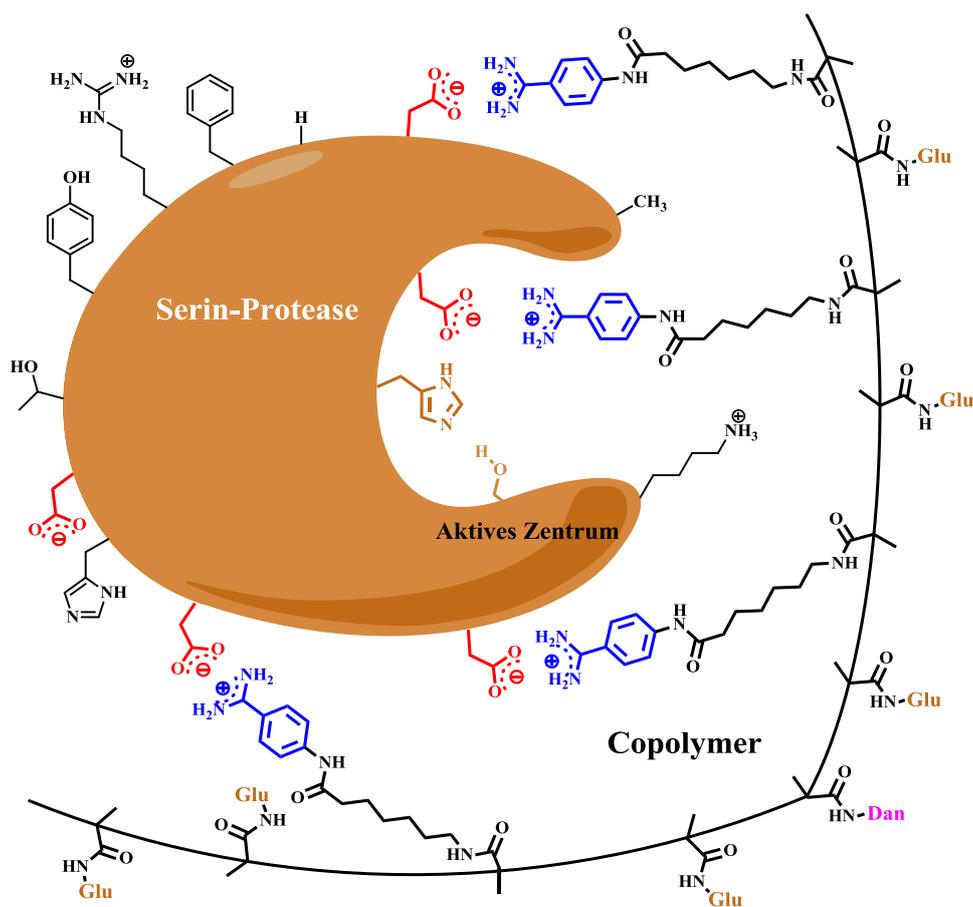
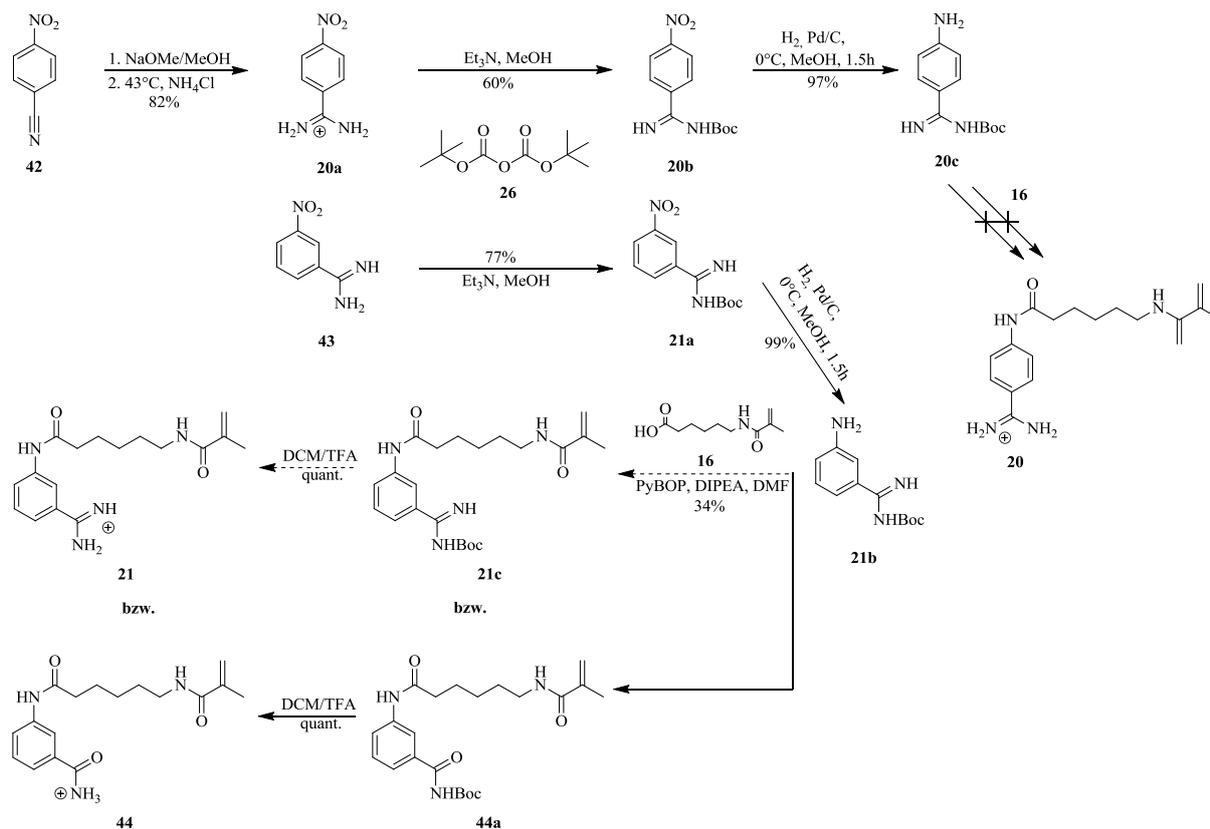


Abb. 3.1.18: Schematische Darstellung einer möglichen Serin-Protease Hemmung durch ein BA -reiches Copolymer. Neben der Oberflächenerkennung findet eine Wechselwirkung mit dem aktiven Zentrum des Enzyms statt, was eine höhere Enzymselektivität zur Folge haben könnte.

Die Darstellung eines solchen BA-Monomers konnte jedoch nicht durch einfache Peptidkupplung des C<sub>6</sub>-Methacrylsäure-Spacers **16** mit *p*-Aminobenzamidin **41** erfolgen. Dies lag zum einen daran, dass es aufgrund der freien Amino- und Amidin-Gruppen zu einer großen Anzahl von Produkten kam, zum anderen ließen sich diese säulenchromatographisch nicht trennen. Aus diesem Grund musste vor der Peptidkupplung die Amidin-Gruppe selektiv geschützt werden. Die dabei verwendete Synthesestrategie wird in Abbildung 3.1.19 schematisch dargestellt.



**Abb. 3.1.19:** Syntheseroute zur Darstellung der „C<sub>6</sub>-Spacer modifizierten BA-Monomere **20** und **21**“.

Ausgehend von 4-Nitrobenzonnitril **42** wurde das teure 4-Nitrobenzamidin **20a** im „Gramm-Maßstab“ unter geringem präparativen Aufwand gewonnen.<sup>[150]</sup> Die Amidin-Schätzung der Strukturisomere **20a** und **43** konnte mittels Einsatz von trockenem Methanol unter Schutzgasatmosphäre verwirklicht werden. Als problematisch stellte sich jedoch die säulenchromatographische Aufreinigung der Produkte **20b** und **21a** heraus, da dass jeweilige Nebenprodukt einen nahezu identischen R<sub>F</sub>-Wert hatte. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Nebenproduktzunahme abhängig von der Menge des verwendeten Lösungsmittels zur Aufreinigung, sowie der Aufarbeitungszeit selbst ist. Die hydrogenolytische Reduktion der Nitro-Gruppe, konnte lediglich unter Verwendung von trockenem Methanol bei 0 °C erfolgen. Weiterhin musste die Reaktion nach maximal 1.0 - 1.5 h beendet werden, da mit

fortlaufender Reaktionszeit es zur Bildung von unerwünschten Nebenprodukten kam. Die Peptidkupplung der freien Amino-Gruppe **21b** mit dem C<sub>6</sub>-Spacer-Monomer **16** stellt das größte Problem dar. Neben der schlechten Reproduzierbarkeit, war die Isolierung des vermeintlich reinen Produktes kaum möglich, da eine Vielzahl von Nebenprodukten gebildet wurden, welche ebenfalls annähernd identische R<sub>F</sub>-Werte besaßen. Das reine Produkt **21c** zeigte im <sup>1</sup>H-NMR-, <sup>13</sup>C-NMR und 2D-NMR-Spektroskopie zwar plausible Signale, jedoch wich das im Elektrosprayspektrum der Anionen detektierte Quasimolekularion um ein Dalton ab. Die quantitative Entschätzung von **21c**, welche zum gewünschten Monomer **21** führen sollte zeigte ebenfalls in der Massenspektrometrie eine zu hohe Massenzahl. Statt der erwarteten molaren Masse von 316.18 g/mol (C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) wurde eine Verbindung mit 317.16 g/mol (C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>) nachgewiesen. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum in DMSO-d<sub>6</sub> zeigte eine weitere Abweichung. Obwohl alle Protonen zugeordnet werden konnten, fehlte ein NH-Proton (Abb. 3.1.20).

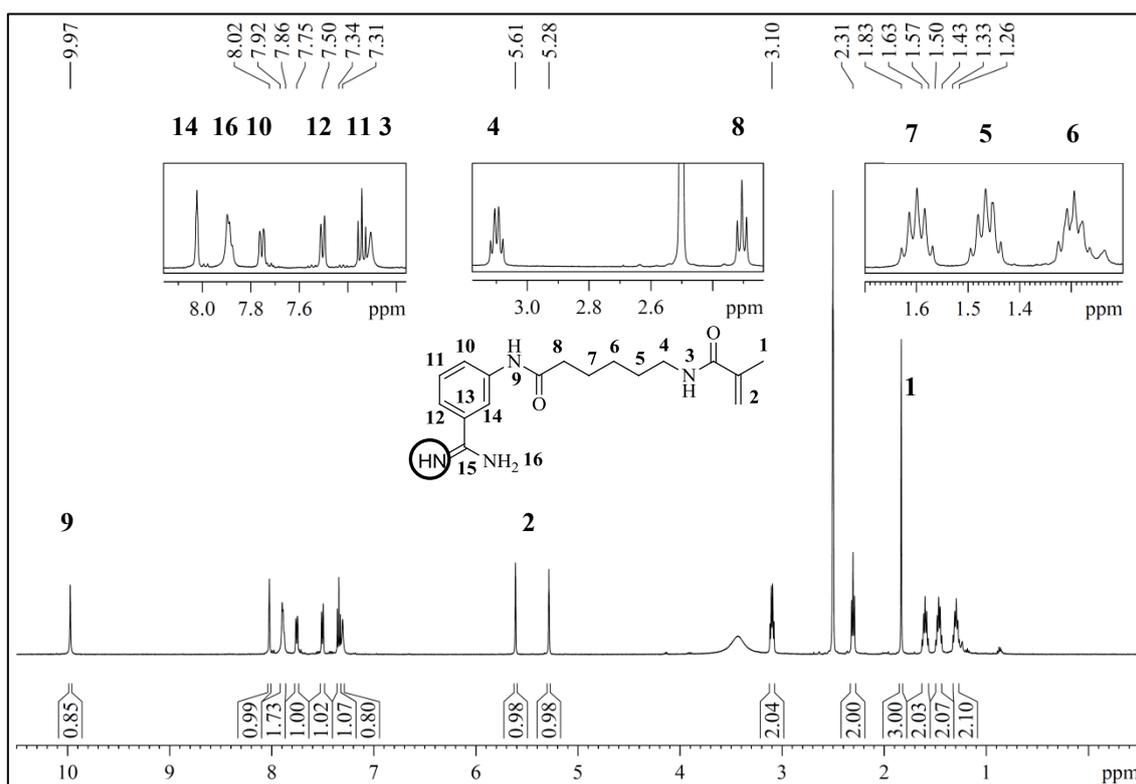
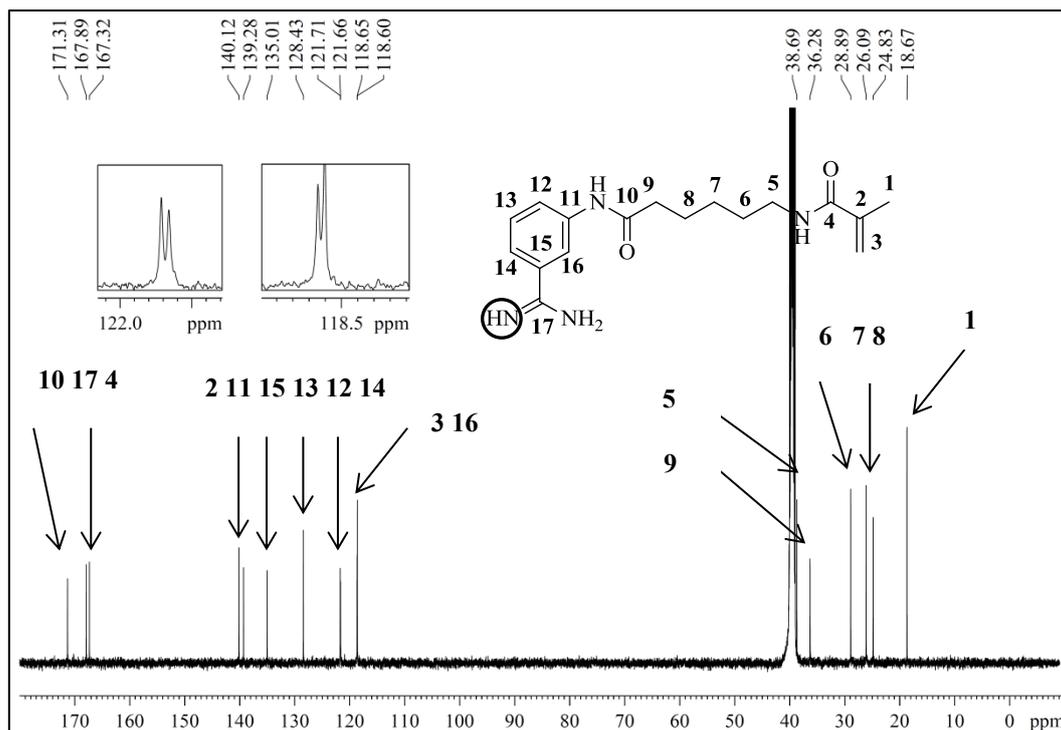


Abb. 3.1.20: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) des vermeintlichen *m*-C<sub>6</sub>-BA-Monomers **21**.

Ferner konnten alle Signale im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum eindeutig mittels korrelierter 2D-Spektren zugeordnet werden (Abb. 3.1.20).



**Abb. 3.1.21:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (126 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) des vermeintlichen *m*- $\text{C}_6$ -BA-Monomers **21**.

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass es sich bei dem Produkt nicht um das gewünschte Amidin **21** handelt sondern um das Hydrolyseprodukt **44**. Dies würde zum einen erklären, weshalb das Ergebnis der Massenspektrometrie abweicht, zum anderen das „fehlende“ Proton im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum. Ein hochauflösendes Massenspektrum bestätigte die These, dass es sich um das Amid **44** und nicht um das gewünschte Amidin **21** handelte (HRMS für  $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_3^-$ ; berechnet: 316.1656 g/mol; gefunden: 316.1682 g/mol). Ein weiteres hochauflösendes Massenspektrum von der vermeintlichen Vorstufe **21c** stärkte die These, dass es sich bereits bei dieser Stufe um das Hydrolyseprodukt **44a** handelte. Anhand dieser Ergebnisse kann erklärt werden, warum die Aufreinigung der Vorstufen sehr problematisch war. Da die Nebenprodukte (Hydrolyseprodukte) nahezu strukturanalog sind, ist eine säulenchromatographische Aufreinigung kaum möglich, erschwert wird dies zusätzlich dadurch, dass das Produkt während des Reinigungsvorgangs höchstwahrscheinlich hydrolysiert. Hochauflösende Massenspektren,  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren der Verbindungen **20b**, **20c**, **21a**, **21b** und deren jeweilig isolierten Hydrolyseprodukte bewiesen die aufgestellte Hypothese. Da diese Erkenntnisse zum Ende der Arbeit gewonnen wurde, konnte im zeitlichen Rahmen die Darstellung der gewünschten Monomer **20** und **21** nicht verwirklicht werden. Durch Einsatz trockener Lösungsmittel für die Reaktion und Aufreinigung könnte in späteren Arbeiten die Synthese der BA-Monomere **20** und **21** realisiert werden.

### 3.1.2 Monomer-Lösungen

Nach der erfolgreichen Baustein-Synthese, wurden diese je nach Polarität in DMF oder VE-Wasser gelöst. Die Massenkonzentrationen der Monomer-Stammlösungen betragen dabei 50 - 100 mg/mL (Tab. 3.1.1).

**Tab. 3.1.1:** Zusammensetzung der Monomer-Stammlösungen und deren Massen- und Stoffmengenkonzentration. Die bräunlich gefärbten Bausteine stellen Aminosäure selektive Rezeptoren dar, blaue symbolisieren hydrophobe Monomere und grüne hydrophile bzw. Spacer-Monomere.

Monomere je 100 mg	DMF [ $\mu$ L]	Wasser [ $\mu$ L]	Massenkonz. [mg/mL]	Stoffmengenkonz. [ $\mu$ mol/mL]
CBS (9)	1500	50	50	146
CBS-Boc (9g)	2000	/	50	123
BA (12)	1000	/	100	376
NTA-Lys (11)	/	1000	100	252
NTA-Glu (15)	500	1000	66.7	179
BP (1)	500	1000	66.7	171
C <sub>5</sub> -BP (19) <sup>[141]</sup>	500	1000	66.7	137
C <sub>6</sub> -BP (18) <sup>[141]</sup>	500	1000	66.7	133
Bor (13)	1000	/	100	382
Ani (14)	1000	/	100	364
C <sub>6</sub> -CyH (7)	1000	/	100	340
Dod (6)	1000	/	100	395
Dan (4)	1000	/	100	277
Glu (3)	250	1000	80	323
Iso (2)	250	1000	80	559
ED (8)	/	1000	100	608
C <sub>6</sub> -Sp (16)	500	500	100	502
„AIBN“	1000	/	100	609

Die Darstellung der jeweiligen Stammlösung erfolgte hierbei nach dem „freeze-and-exhaust-Verfahren“. Anschließend wurden die „Lösungen“ kühl unter Schutzgas-Atmosphäre verwahrt.

Jedoch zeigten nicht alle Monomere ein gutes Löslichkeitsverhalten in DMF/VE-Wasser, so konnte beispielsweise das CBS-Monomer **9** weder in DMF, VE-Wasser noch in diversen Mischungsverhältnissen vollständig gelöst werden. Ebenso zeigte das NTA-Glu-Monomer **15** im Gegensatz zum NTA-Monomer **11** eine sehr schlechte Löslichkeit. Lediglich unter Zugabe von einer geringen Menge Natronlauge verbesserte sich dessen Löslichkeit. Aus diesem Grund wurden die Monomer-Bausteine **9** und **15** kurz vor der Polymerisation aufgeschlämmt und daraufhin entnommen.

Alle restlichen Monomere zeigten eine hervorragende Löslichkeit in dem verwendeten Lösungsmittel.

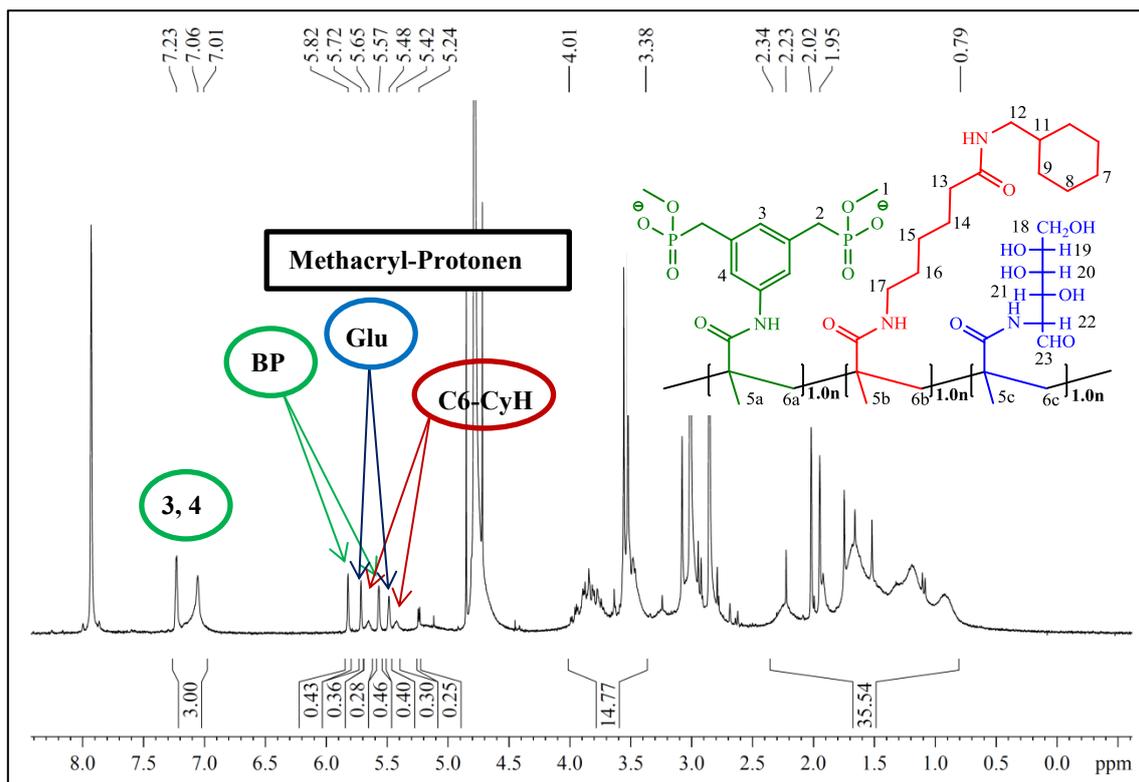
## 3.2 Polymere

Die Darstellung der Polymere erforderte ein Verfahren mit welchem diese möglichst reproduzierbar synthetisiert werden konnten. Weiterhin sollte durch dieses Verfahren der Zugang zu einer Polymer-Bibliothek mit relativ kurzem Zeitaufwand verwirklicht werden. Ergänzend musste ein Reinigungsverfahren gefunden/entwickelt werden, durch welches die Polymerisationsprodukte von nicht umgesetzten Monomeren, Oligomeren und nach Möglichkeit von DMF befreit werden konnten.

### 3.2.1 Polymerisationsbedingungen

Ausgehend von *Wencks* entwickelten Polymerisationsverfahren<sup>[122]</sup>, sollten einige Polymerisationsversuche durchgeführt werden, durch welche die optimalen Polymerisationsbedingungen ermittelt werden konnten. Zu diesem Zweck wurden die Monomere **1**, **3** und **7** gewählt. Diese zeichneten sich dadurch aus, dass sie im Rahmen dieser Arbeit für eine Vielzahl der Polymerisation verwendet werden sollten. Ferner findet Monomer **1** als Erkennungseinheit für Arginine und Baustein **3** als hydrophile Einheit, bereits zahlreiche Verwendung in vorherigen Arbeiten. Monomer **7** diente als hydrophober Baustein.

Die Polymerisationsversuche wurden dabei bei unterschiedlichen Temperaturen sowie variabler Reaktionszeit durchgeführt. Weiterhin wurden alle Versuche dreifach durchgeführt, um dessen Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Die Stöchiometrie der verwendeten Monomere **1**, **3** und **7** betrug 1:1:1. Der Reaktionsumsatz wurde dabei durch  $^1\text{H}$ -NMR kontrolliert. Die Monomer-Rückstände der ersten Kinetik-Reihe sind in Tabelle 3.2.1 zusammengefasst. Als Bezugswert fungierten die aromatischen Protonen des BP-Monomers **1**, deren Integrationswert unabhängig vom Polymerisationsgrad immer drei beträgt (Abb. 3.2.1).



**Abb. 3.2.1:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (300 MHz in  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPGK 9.1.

Abbildung 3.2.1 stellt ein schematisches Beispiel dar, durch welches der Monomer-Umsatz mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie bestimmt wurden ist. Da alle Monomere im selben Verhältnis eingesetzt wurden, sollten die Integrationswerte der Methacrylsäure-Protonen vor der Reaktion jeweils „eins“ betragen. Hingegen sollten diese bei vollständiger Umsetzung nicht mehr im resultierenden Spektrum detektierbar sein. Anhand der resultierenden Integrationswerte (5.24 - 5.82 ppm) konnte demgemäß der Umsatzgrad bestimmt werden. Um die Protonenpaare des jeweiligen Monomers fest zuordnen zu können, wurde das resultierende Polymer nacheinander mit jeweils einem enthaltenen Monomer versetzt und erneut vermessen.

**Tab. 3.2.1:** Zusammenfassung des Monomer-Umsatzes in Abhängigkeit der Reaktionszeit bei einer Reaktionstemperatur von 60 °C.

Bezeichnung	Reaktionszeit [h]	Wasserlöslichkeit	Monomer-Rückstand [%]		
			BP	Glu	C <sub>6</sub> -CyH
PPGK 1.1	1	/	87	100	77
PPGK 1.2	1	/	85	50	48
PPGK 1.3	1	/	90	100	80
PPGK 2.1	4	/	91	100	62
PPGK 2.2	4	/	87	100	82
PPGK 2.3	4	/	87	86	65
PPGK 3.1	8	/	86	83	62
PPGK 3.2	8	/	79	64	63
PPGK 3.3	8	/	85	87	63
PPGK 4.1	24	/	87	93	72
PPGK 4.2	24	/	79	80	59
PPGK 4.3	24	/	84	84	66
PPGK 5.1	96	gut	4	3	5
PPGK 5.2	96	gut	/	/	/
PPGK 5.3	96	/	85	80	65
PPGK 6.1	172	/	90	87	87
PPGK 6.2	172	gut	8	/	9
PPGK 6.3	172	/	90	92	80

Aus den Ergebnissen der ersten Kinetik-Reihe konnte entnommen werden, dass frühestens nach vier Reaktionstagen bei 60 °C die Polymerisation nahezu vollständig verlief. Dieses Ergebnis war jedoch nicht reproduzierbar. Anhand dieser Kinetik-Reihe konnte die Problematik von vorherigen Versuchen symbolisiert werden, in welchen die Copolymerisationen bei 60 °C nicht reproduzierbar waren und teilweise unvollständig verliefen.

Alternativ wurde eine Copolymerisationsreihe bei 70 °C durchgeführt. Bei dieser Versuchsreihe wurden ebenfalls die Monomere **1**, **3** und **7** im Verhältnis 1:1:1 verwendet. Die Ergebnisse der zweiten Kinetik Reihe sind in Tabelle 3.2.2 zusammengefasst.

**Tab. 3.2.2:** Zusammenfassung des Monomer-Umsatzes in Abhängigkeit der Reaktionszeit bei einer Reaktionstemperatur von 70 °C.

Bezeichnung	Reaktionszeit [h]	Wasserlöslichkeit	Monomer-Rückstand [%]		
			BP	Glu	C <sub>6</sub> -CyH
PPGK 7.1	1	/	99	99	77
PPGK 7.2	1	/	85	79	69
PPGK 7.3	1	/	97	100	100
PPGK 8.1	4	/	85	78	58
PPGK 8.2	4	/	88	79	65
PPGK 8.3	4	/	91	94	77
PPGK 9.1	8	gut	44	38	29
PPGK 9.2	8	mäßig	57	52	40
PPGK 9.3	8	mäßig	65	51	44
PPGK 10.1	24	gut	39	29	33
PPGK 10.2	24	gut	10	4	10
PPGK 10.3	24	gut	16	5	9
PPGK 11.1	96	gut	14	6	11
PPGK 11.2	96	gut	17	7	14
PPGK 11.3	96	gut	16	4	10
PPGK 12.1	172	gut	10	4	9
PPGK 12.2	172	gut	5	2	6
PPGK 12.3	172	gut	15	4	9

Die Polymerisationsreihen bei 70 °C zeigten einen nahezu vollständigen Monomer-Umsatz nach bereits 24 Stunden Reaktionszeit. Der Reaktionsumsatz der Monomere nach vier bzw. nach sieben Tagen nahm hingegen nur geringfügig ab. Ein weiterer Trend, der aus den Messungen ersichtlich wurde, war, dass der Glu-Monomer-Umsatz gegenüber den anderen Monomeren am größten war. Begründet könnte der nahezu vollständige Umsatz des Monomers **3** dadurch werden, dass dieser aufgrund seiner hervorragenden Wasserlöslichkeit und seines geringen sterischen Anspruchs als Spacer-Einheit im resultierenden Copolymerisationsrückgrat fungiert.

Eine letzte Kinetik-Reihe bei 70 °C sollte Auskunft über das Polymerisationsverhalten der einzelnen Monomere geben. Zu diesem Zweck wurden die Monomere **1**, **3** und **7** homopolymerisiert. Weiterhin sollte die Reproduzierbarkeit der Polymerisationsparameter durch Copolymerisation der Monomere **1**, **3** und **7** im Verhältnis 1:1:1 überprüft werden. Eine Zusammenfassung der durchgeführten dritten Kinetik Reihe und deren Ergebnisse ist in Tabelle 3.2.3 zusammengefasst.

**Tab. 3.2.3:** Zusammenfassung des Monomer-Umsatzes in Abhängigkeit der Reaktionszeit bei einer Reaktionstemperatur von 70 °C. Bei der Polymerreihe PPGK 13 handelt es sich um eine Homopolymerisation des BP-Monomers **1**. Die Reihen PPGK 14 und 15 stellen die Homopolymerisationsprodukte des Glu-Monomers **3** und des C<sub>6</sub>-CyH-Monomers **7** dar. Copolymerisationsreihe PPGK 16 besteht aus den Monomeren **1**, **3** und **7** im Verhältnis 1:1:1.

Bezeichnung	Reaktionszeit [h]	Wasserlöslichkeit	Monomer-Rückstand [%]		
			BP	Glu	C <sub>6</sub> -CyH
PPGK 13.1	8	gut	48	-	-
PPGK 13.2	8	gut	43	-	-
PPGK 13.3	96	gut	41	-	-
PPGK 13.4	96	gut	48	-	-
PPGK 14.1	8	gut	-	6	-
PPGK 14.2	8	gut	-	3	-
PPGK 14.3	96	gut	-	3	-
PPGK 14.4	96	gut	-	3	-
PPGK 15.1	8	/	-	-	5
PPGK 15.2	8	/	-	-	2
PPGK 15.3	96	/	-	-	4
PPGK 15.4	96	/	-	-	2
PPGK 16.1	24	gut	15	5	9
PPGK 16.2	24	gut	16	5	8
PPGK 16.3	96	gut	14	5	8
PPGK 16.4	96	gut	16	5	7

Die Ergebnisse der dritten Kinetik-Reihe bestätigte die Reproduzierbarkeit des Monomer-Umsatzes bei einer Reaktionstemperatur von 70 °C. Ferner bestätigt die Reihe PPGK 16, dass der Monomer-Umsatz nach 24 Stunden nahezu abgeschlossen ist.

Die Ergebnisse der Homopolymerisationen der Monomere **1**, **3**, und **7** zeigten, dass die Polymerisation bereits nach acht Stunden abgeschlossen war. Bei der Polymerisation der Monomere **3** und **7** war besonders auffällig, dass diese annähernd vollständig umgesetzt wurden. Erklärt könnte dieses Resultat dadurch werden, dass das C<sub>6</sub>-CyH-Monomer **7** aufgrund seiner Spacer-Einheit eine ausreichend große Flexibilität im Homopolymer besitzt und so problemlos polymerisiert werden kann. Ebenso könnte das sehr gute Polymerisationsverhalten des Glu-Monomer **3** bei der Homopolymerisation, durch den geringen sterischen Anspruch des hydrophilen Bausteins begründet werden. Der geringe Umsatzgrad des BP-Monomers **1** bei der Homopolymerisation kann demzufolge erklärt werden, dass sich die Bausteine bedingt durch ihre Ladung untereinander abstoßen, was eine Polymerisation erschwert. Diese These kann dadurch gestärkt werden, dass der Umsatzgrad des BP-Baustein **1** bei der Copolymerisation erhöht wird. Bei diesem Vorgang könnten die Bausteine **3** und **7** als Spacer-Einheiten innerhalb des Polymerrückgrats fungieren, was eine gegenseitige Abstoßung des BP-Bausteins **1** verhindern würde. Weiterhin könnte das gute Polymerisationsverhalten der Bausteine **3** und **7** dazu führen, dass diese bevorzugt untereinander Bindungen eingehen könnten, was den geringeren Umsatzgrad des BP-Monomers **1** gegenüber den anderen Monomeren erklären würde.

Basierend auf den 52 durchgeführten Polymerisationsansätzen konnten die optimalen Bedingungen für den schnellen Aufbau einer Polymer-Bibliothek erschlossen werden (70 °C, ca. 1 Tag Reaktionszeit). Weiterhin konnte die Reproduzierbarkeit der Copolymerisation bestätigt werden. Homopolymerisationsversuche gaben Auskunft über das Polymerisationsverhalten einzelner Bausteine bzw. erläutern den Umsatz der einzelnen Monomere innerhalb eines Copolymers.

### 3.2.2 Aufreinigung und Verfahrensoptimierung der Polymerisation

Neben der Optimierung der Polymerisationsbedingungen war die möglichst schnelle Aufreinigung und Charakterisierung der darzustellenden Polymere von fundamentaler Bedeutung.

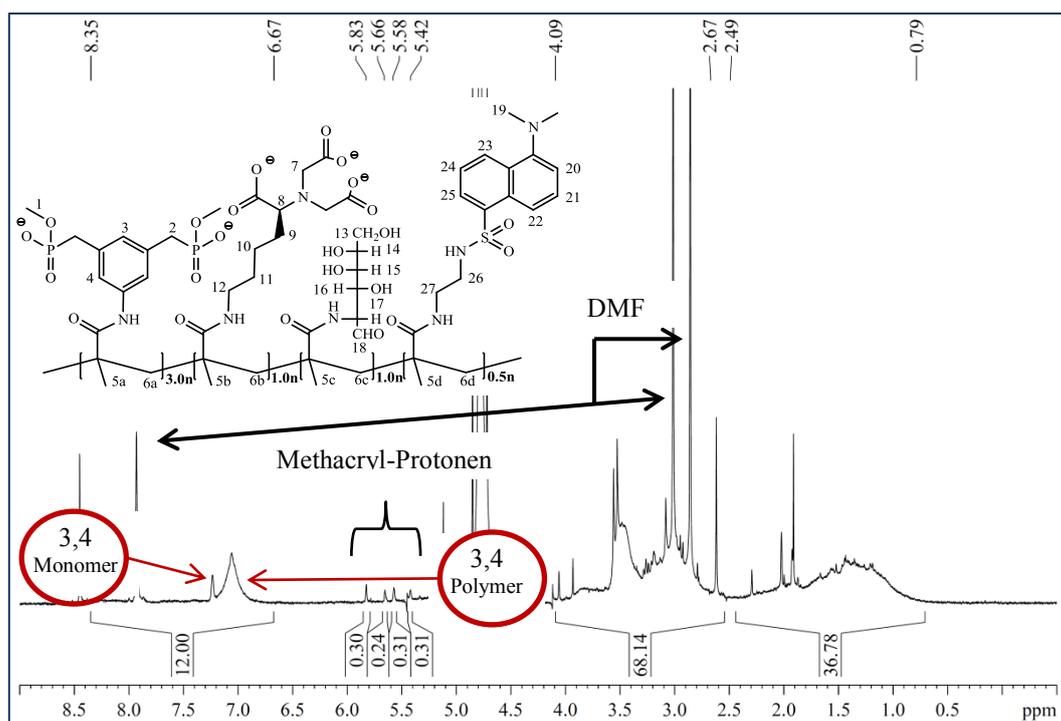
Basierend auf dem vorherigen Verfahren, in welchem das Polymerisationsvolumen auf maximal 700  $\mu\text{L}$  begrenzt war, sollte das Reaktionsvolumen nach Möglichkeit verdoppelt werden. Das dahinter stehende Motiv war eine bisherige Rohausbeute von ca. 30 - 40 mg, welche stark verunreinigt war, durch Monomere, Oligomere und DMF. Nach Aufreinigung dieses Produktgemisches und anschließender Charakterisierung wäre die Polymermenge stark limitiert, was weiterführende Messungen erschweren würde.

Durch Austausch des vorher verwendeten *Eppendorf* Thermomixer mit einem für diese Arbeit erworbenen HLC-Heating Thermomixer könnte das Reaktionsvolumen theoretisch auf 2 mL erhöht werden. Zu diesem Zweck wurden 2 mL große Reaktionsgefäße angefertigt, mit welchem die Copolymerisation unter Schutzgas-Atmosphäre durchgeführt werden konnte (Abb. 3.2.2). Um eine Reaktionstemperatur von 70 °C zu gewährleisten, durfte das Polymerisationsvolumen maximal 1.3 mL betragen.



**Abb. 3.2.2:** Copolymerisation in einem HLC-Heating Thermomixer.

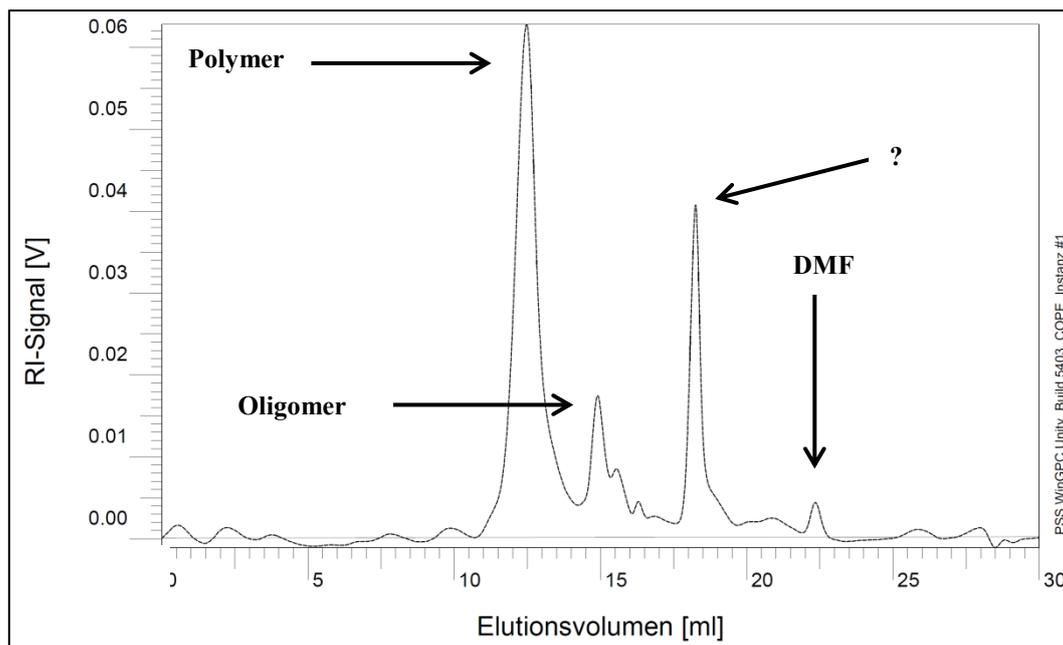
Nach erfolgreicher Copolymerisation bei 70 °C und einer Reaktionszeit von 24 - 30 Stunden wurden die Produktlösungen alternativ in einem Spitzkolben überführt und gefriergetrocknet. Dies hatte zur Folge, dass die Polymerisationslösungen innerhalb von 1 - 2 Tagen weitestgehend vom Lösungsmittel befreit wurden. Die Charakterisierung des Rohproduktes erfolgte durch Einsatz von  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie sowie Gel-Permeations-Chromatographie (GPC). Dies soll hier Anhand eines Beispiels symbolisiert werden (Abb. 3.2.3 und 3.2.4).



**Abb. 3.2.3:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (300 MHz in  $\text{D}_2\text{O}$ ) vom PPGKW 11.2 vor der Aufreinigung.

Das oben abgebildete  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum verdeutlicht die Problematik der Copolymerisation. Neben der unvollständigen Copolymerisation, welche durch die Methacrylsäure-Protonen dargelegt werden (5.42 - 5.83 ppm), enthält das Rohprodukt Lösungsmittelreste in Form von DMF. Ferner lassen sich die Monomer-Reste anhand von scharfen Signalen veranschaulichen.

Das GPC-Chromatogramm zeigt neben dem Produkt Signal bei einem Elutionsvolumen von 12.5 mL drei weitere Signale bei 15.0 mL, 18.5 mL und 22.5 mL. Bei letzteren handelt es sich um polymerisationsbedingte DMF-Reste. Das Signal bei einem Elutionsvolumen von 18.5 mL könnte von Dimeren/Trimeren, wie auch von Monomer-Resten stammen.<sup>[123]</sup> Ergänzend handelt es sich bei dem Elutionsvolumen von 15.0 mL um ein Polymerisationsprodukt auf Oligomer-Basis.



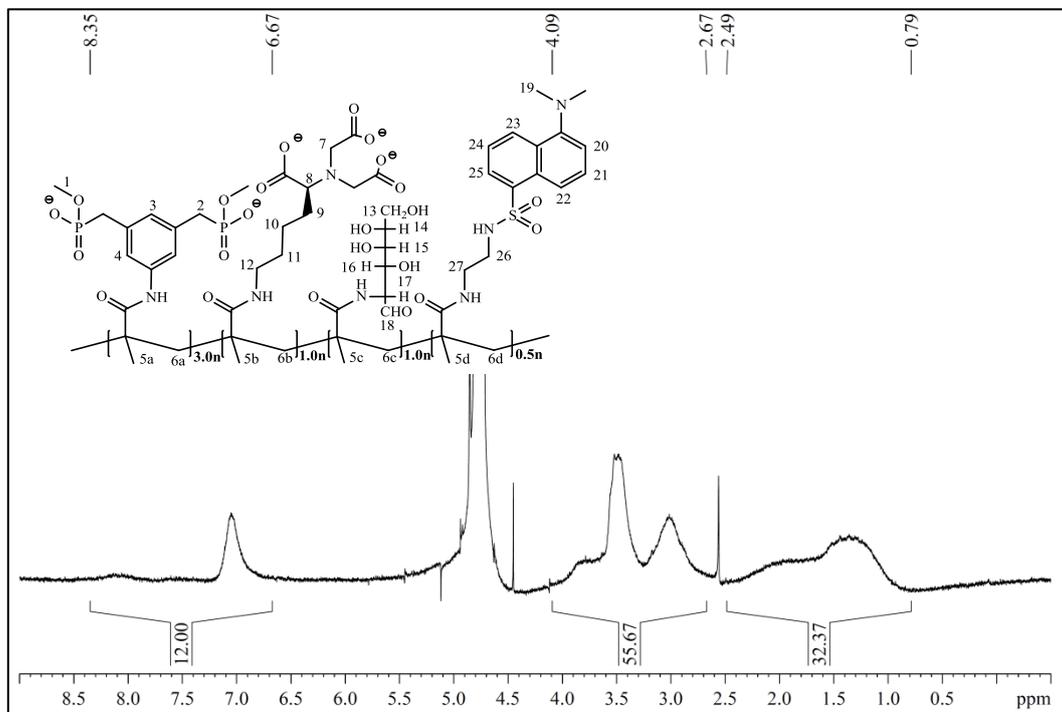
**Abb. 3.2.4:** GPC-Chromatogramm vom PPGKW 11.2 vor der Aufreinigung.

Wie aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sowie dem GPC-Chromatogramm ersichtlich ist, handelt es sich bei dem Copolymerisationsprodukt um ein Produktgemisch aus Monomeren, Oligomeren, Polymeren und DMF-Resten. Um jedoch bei späteren Messungen dem Polymer eine inhibitorische Wirksamkeit zuordnen zu können, war eine Aufreinigung unumgänglich.

Die Aufreinigung der Polymerisationsprodukte konnte durch Einsatz von „2 mL Amicon Ultra 3K Membranfilter“ der Firma *Millipore* verwirklicht werden. Bei diesem Reinigungsverfahren handelte sich um eine Ultrafiltration. Zu diesem Zweck wurde das Rohprodukt in wenig VE-Wasser gelöst/aufgeschlämmt und in den Filter überführt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation des 3K (3000 g/mol) permeablen Filterkörpers. Das Filtrat wurde verworfen und das Konzentrat mit wenig VE-Wasser verdünnt. Dieser Vorgang wurde insgesamt 4-mal durchgeführt. Das resultierende Konzentrat wurde nun erneut für zwei Tage gefriergetrocknet, unter Ausbildung eines meist „voluminösen und farblosen“ Feststoffes.

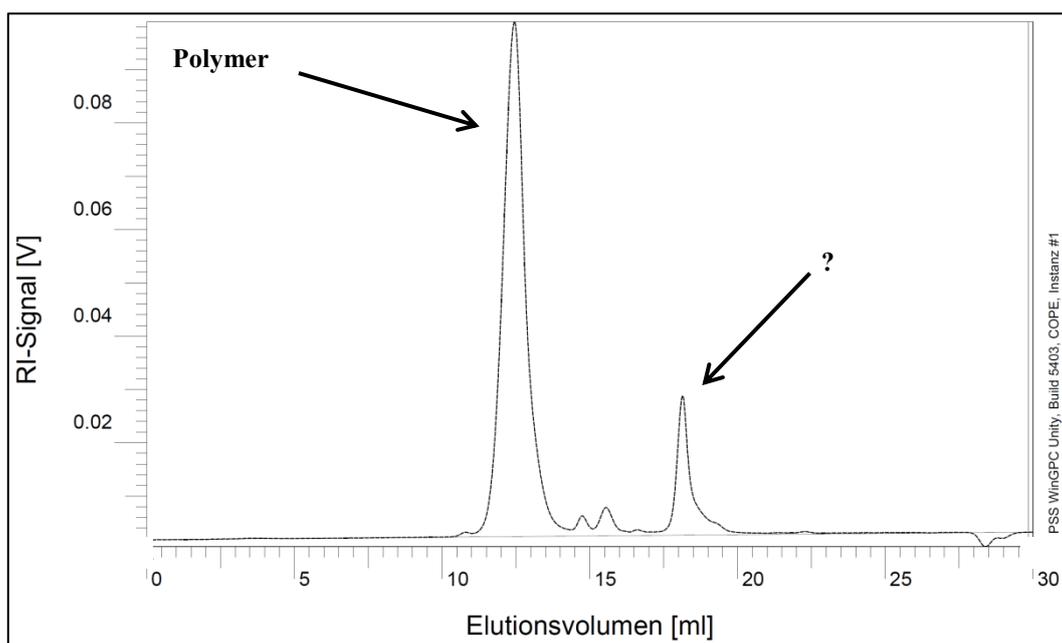
Besonders auffällig war, dass sich die Ausbeute des Produktes nach der Reinigung nahezu halbierte (75 mg  $\rightarrow$  33 mg). Demgemäß könnte der Massenverlust auf die starke Verunreinigung des Polymers zurückgeführt werden. Ferner konnte ein geringfügiger Polymerverlust durch eine nicht vollständig spezifische Filtration verzeichnet werden.

Eine erneute Charakterisierung des Polymers PGKW11.2 mittels GPC- und  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie zeigt eine beachtliche Verbesserung der Polymerreinheit. (Abb. 3.2.5 und 3.2.6).



**Abb. 3.2.5:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz in  $\text{D}_2\text{O}$ ) vom PPGKW 11.2 nach der Aufreinigung.

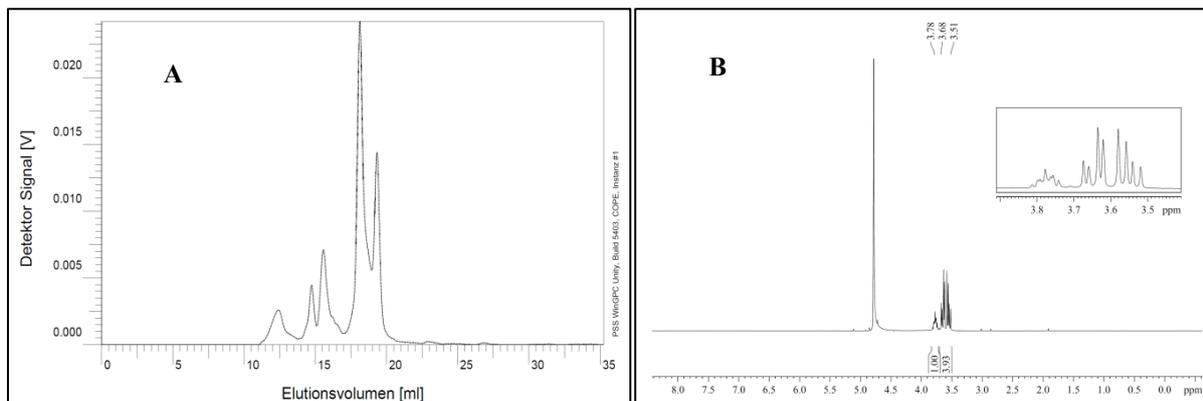
Aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist ersichtlich, dass das aufgereinigte Polymer PGKW11.2 von Monomer-Resten befreit wurde. Weiterhin enthält das Polymer keine Lösungsmittelreste in Form von DMF.



**Abb. 3.2.6:** GPC-Chromatogramm vom PPGKW 11.2 nach der Aufreinigung.

Neben dem nun fehlenden DMF Signal bei einem Elutionsvolumen von 22.5 mL nahm die Intensität des Oligomer Signals bei 15 mL stark ab. Weiterhin machte es den Anschein, dass das vermeintliche Dimer/Trimer-Signal geringfügig verschoben wurde. Theoretisch konnte es sich allerdings nicht um eine Monomer/Dimer/Trimer-Verbindung handeln, welche bereits vor der Aufreinigung im Rohprodukt enthalten war, da diese innerhalb des Reinigungsvorgangs bereits hätten entfernt sein müssen. Aus diesem Grund musste/n die unbekannte/n Komponente/n während oder nach dem Reinigungsvorgangs zum Produkt gelangt sein. Bei genauerer Betrachtung der Membran-Tube nach der Ultrafiltration konnten leichte Schlieren an der Körperinnenwandung festgestellt werden. Was ein Indiz dafür sein könnte, dass die Polymerisationslösung mit dem Filter interagiert. In Folge wurde der Reinigungsvorgang daher mit reinem VE-Wasser sowie einer 10 %igen DMF-Lösung durchgeführt. Während der Befüllung der Membran-Tube mit der 10 %igen DMF-Lösung, konnte beobachtet werden, dass diese die Körperinnenwandung geringfügig löste. Nach mehrmaliger Zentrifugation, wurden die Filtrate gefriergetrocknet und anschließend charakterisiert.

Die GPC, wie auch die  $^1\text{H-NMR}$  Kontrolle der VE-Wasser Probe, zeigte keine Spuren von Verunreinigungen. Hingegen führte die Untersuchung der 10 %igen DMF-Blindprobe zur Lösung des Problems (Abb. 3.2.7).

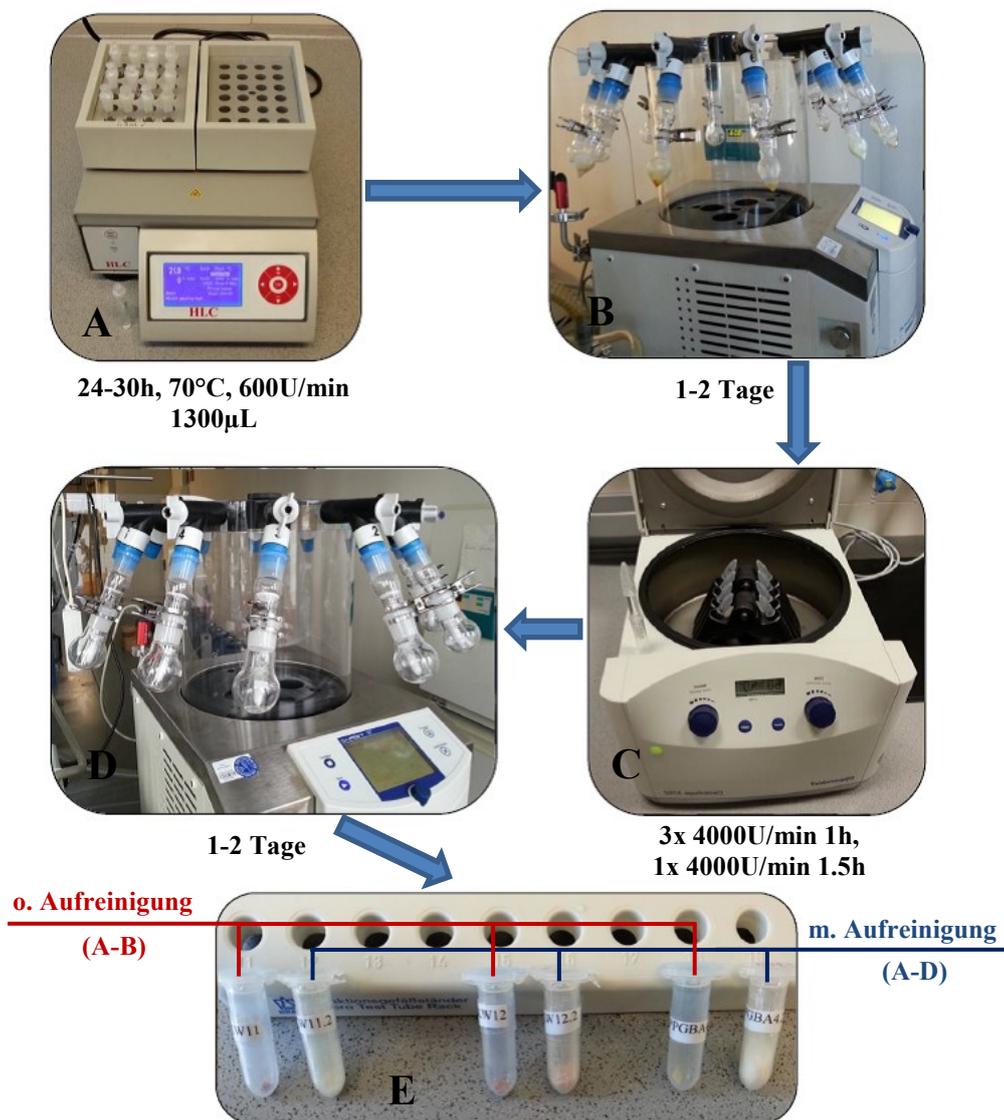


**Abb. 3.2.7:** GPC (A)- und  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (B) der 10 %igen DMF Blindprobe nach der Ultrafiltration.

Aus dem oben abgebildeten GPC-Chromatogramm lässt sich der gelöste Membran-Tube-Rückstand, eindeutig als gesuchte Verunreinigung zuordnen. Ferner könnte der vermeintliche Oligomerrest aus dem GPC-Chromatogramm (Abb. 3.2.6) des aufgereinigten Polymers PGKW11.2 ebenfalls fester Bestandteil des Filtrerrückstands sein. Die Untersuchung des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bestätigt anhand der Signalschärfe, dass es sich bei der Verunreinigung höchstwahrscheinlich um einen niedermolekularen Weichmacher handeln könnte und nicht

um das Kunststoffmaterial des Membran-Tubes selbst. Die Masse des DMF verursachten Rückstandes betrug ungefähr 1 mg, dies entspricht einer maximal 2 - 3 %igen Verunreinigung bezogen auf die resultierenden Copolymere.

Als ein Ergebnis dieser Arbeit konnte durch gezielte Verfahrensoptimierung die Darstellung hochreiner Polymere binnen einer Woche verwirklicht werden. Die Zusammenfassung der einzelnen Arbeitsschritte welche zu den gewünschten Polymeren führten, sind in Abbildung 3.2.8 schematisch zusammengefasst.



**Abb. 3.2.8:** Schematische Darstellung des optimierten Polymerisationsverfahrens.

Ausgehend von der Polymerisation welche bei 70 °C und 24 - 30 h Reaktionszeit durchgeführt wurde (A), wurden die Polymerisationslösungen gefriergetrocknet (B). Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels mehrfacher Ultrafiltration gereinigt (C). Nach erneuter Gefrierdrying (D), wurde das reine Polymer gewonnen (E).

### 3.2.3 Polymerdesign und Charakterisierung

Mit Hilfe des optimierten Copolymerisationsverfahrens konnte nun eine Polymer-Bibliothek aufgebaut werden. Basierend auf der Kristallstruktur des zu hemmenden Enzyms, sollten oberflächenkomplementäre Bausteine verwendet werden, welche nach erfolgreicher Copolymerisation als potentielle Inhibitoren fungieren könnten. Dementsprechend machte es Sinn für Arginin- und Lysin-reiche Proteine, Polymere auf BP-Basis **1** zu synthetisieren. Ebenso könnten CBS **9** und BA **12**-haltige Copolymere als erfolgreiche Hemmstoffe für Glutaminsäure- und Asparaginsäure-reiche Enzyme fungieren. Jedoch musste bei der Wahl der Monomere auf einige Faktoren geachtet werden.

Grundvoraussetzung für die Hemmung des jeweiligen Enzyms unter physiologischen Bedingungen war eine ausreichende Wasserlöslichkeit des multivalenten Rezeptors. Um dies zu gewährleisten musste eine entsprechende Menge an hydrophilen Bausteinen (**2**, **3** und **8**) im resultierenden Polymer enthalten sein. Demnach musste bei einem Polymer auf Basis des schlecht wasserlöslichen CBS-Bausteins **9**, eine wesentlich größere Menge des Glu-Bausteins **3** verwendet werden als bei Polymeren auf Basis des besser löslichen BA-Bausteins **12**. Weiterhin führte der zusätzliche Einbau von unpolaren Bausteinen (**4**, **6**, **7** und **14**) zwangsweise zu einer Erhöhung der verwendeten Menge an wasserlöslichen Komponenten (**2**, **3** und **8**). Ferner sollten die hydrophilen Bausteine als Polymerrückgrat-Spacer für sterisch anspruchsvolle Haftgruppen wie beispielsweise das BP-Monomer **1** fungieren.

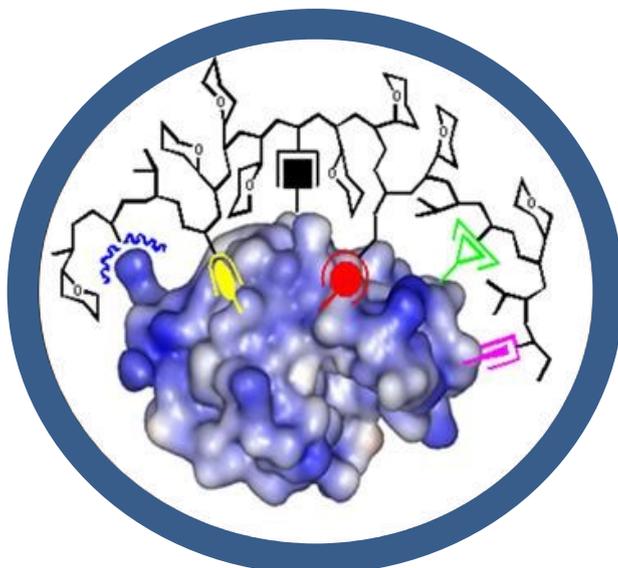
Überdies führte die Kombination des CBS-, BA-, und ED-Bausteins mit den C<sub>5</sub>-BP-, C<sub>6</sub>-BP-, BP-, NTA-Glu-, und NTA-Baustein zu einer sofortigen Komplexierung innerhalb des Polymergefäßes. Weiterhin konnten Polymere auf Basis des Bor-Monomers **13** nicht mit den hydrophilen Bausteinen **2** und **3** verknüpft werden, da dies ebenfalls zu einer Komplexierung führen würde.

Ferner musste darauf geachtet werden, dass bei dem Einsatz der durch Edukte verunreinigten Monomere **8** und **15** der Reinheitsgrad berücksichtigt wurde.

Die Darstellung der gewünschten Copolymere erfolgte mittels radikalischer Copolymerisation aus den jeweils vorbereiteten Monomer-Stammlösungen (Tab. 3.1.1). Als Radikalstarter fungierte eine 100 mg/mL AIBN-Lösung. Die Gesamtkonzentration des AIBN betrug 5 mol% bezogen auf die verwendeten Monomere.

### 3.2.3.1 Polymerdesign

Das Polymerdesign richtet sich nach der jeweils zu hemmenden Protease. Demgemäß sollten basische Enzyme wie Trypsin,  $\alpha$ -Chymotrypsin und Elastase durch Copolymere auf Basis von BP-Monomeren (**1**, **18** und **19**) oder NTA-Bausteinen (**11** und **15**) erfolgreich inhibiert werden.



**Abb. 3.2.9:** Schematische Darstellung der Proteinoberflächenerkennung durch ein komplementäres Copolymer.

Arbeiten von *Wenck* zeigten eine erfolgreiche Hemmung von Trypsin durch eine Verknüpfung der Bausteine **1** und **11**.<sup>[122]</sup> Anhand dieser Kenntnis und Vorarbeiten im Rahmen dieser Arbeit, diente ein Grundgerüst bestehend aus den Bausteinen **1**, **3** und **11** im Verhältnis 3:1:1 als Referenz für die Darstellung neuer effizienterer Trypsin-Inhibitoren. So wurden beispielsweise einige strukturähnliche Polymere (PG17, PG18, PG24 - PG26 und PG37) mit dem alternativen NTA-Glu-Baustein **15** synthetisiert. Bei diesen Polymeren wurden zum Teil hydrophobe Haftgruppen integriert, mit dem Hintergrund, das bereits vorhandene Bindungsmotiv zu verstärken. Ferner fungierte diese Musterverbindung als Grundlage einer Bachelor-Arbeit, in welcher *Stratmann* die BP- und NTA-Anteile variierte und zusätzlich den vorhandenen BP-Baustein **1** durch die neuen C<sub>5</sub>- und C<sub>6</sub>-BP-Bausteine ersetzte (Polymere IS1 - IS9).<sup>[141]</sup>

Im Gegensatz zu vorherigen Arbeiten<sup>[122, 123]</sup> könnte eine vergrößerte Polymerflexibilität, wie auch die Haftgruppenvielfalt der neuen Polymere, zur einer Hemmung der strukturähnlichen Serin-Proteasen  $\alpha$ -Chymotrypsin und Elastase führen.

Folglich sollten die sauren Enzyme Carboxypeptidase A, Kallikrein wie auch Cathepsin D durch Copolymere auf Basis des CBS-Monomers **9** oder des BA-Monomers **12** erfolgreich gehemmt werden. Basierend auf dieser Annahme wurde eine Vielzahl von variablen kationischen Copolymeren synthetisiert (PG30 - PG33 und PG38 - PG45).

Hingegen dieser Theorie zeigten BP-haltige Copolymere in vorherigen Arbeiten, eine große inhibitorische Wirksamkeit gegenüber Cathepsin D.<sup>[122]</sup> Das für die Blutgerinnung relevante, nahezu neutrale Thrombin sollte hingegen nach Möglichkeit, nicht von einem wirksamen Hemmstoff inhibiert werden. Ferner sollten die dargestellten Homopolymere PGBP, IS1 und PGK14.5 als Referenzwerte für die neuen Copolymere fungieren.

### 3.2.3.2 Polymercharakterisierung

Die Charakterisierung der dargestellten Polymere erfolgte mittels GPC sowie NMR-Spektroskopie. Durch Hilfe der <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie wurde die Baustein-Stöchiometrie im resultierenden Copolymer geprüft. Entgegen der Umsatzkontrolle, welche ebenfalls mittels <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie durchgeführt wurde, stellte diese Charakterisierungsmethode bei den aufgereinigten Copolymeren ein wesentlich größeres Problem der Auswertung dar.

Die allgemeine Vorgehensweise zur Bestimmung/Überprüfung der Baustein-Stöchiometrie innerhalb eines Polymers erfolgte über Integration von Baustein spezifischen Protonen. Entsprechend diente ein oder mehrere signifikante/s Proton/en eines ausgewählten Monomers als Bezugswert. Dies soll Anhand des Beispiels in Abbildung 3.2.10 erläutert werden. Bei dem Polymer PG42 handelt es sich um ein Copolymer bestehend aus dem CBS-Baustein **9** und dem Glu-Baustein **3** im Verhältnis 1:3. Als Referenzwert dienten die beiden aromatischen Protonen des CBS-Bausteins, welche nun in Relation gesetzt wurden sind. Aus dem Spektrum ist ersichtlich, dass beide Bausteine im Polymer enthalten sind. Ferner stimmen die theoretisch angestrebten Integrationswerte des Copolymers mit den gefunden nahezu überein, was eine tatsächliche 1:3 Stöchiometrie (CBS:Glu) im Polymer bestätigt.

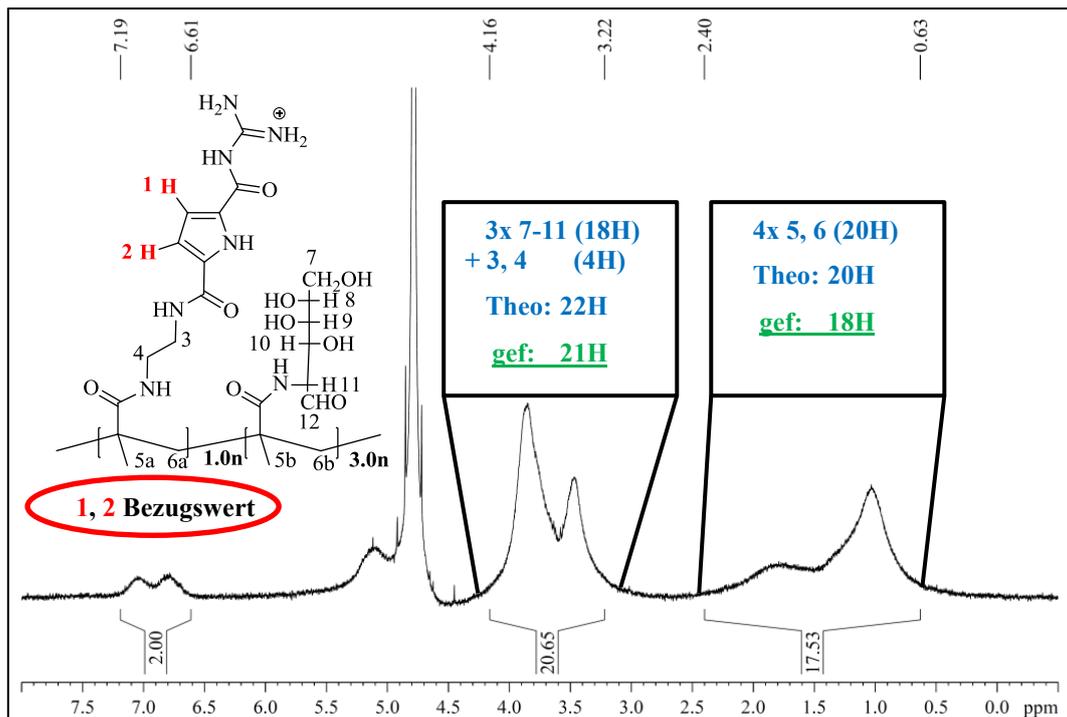


Abb. 3.2.10:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) des Polymers PG42.

Wesentlich komplexer und ungenauer wird die Auswertung eines Copolymers, welches drei und mehr Bausteine enthält. Überdies wird die Auswertung erschwert, wenn kein Baustein spezifische Protonen im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigt (Abb. 3.2.11).

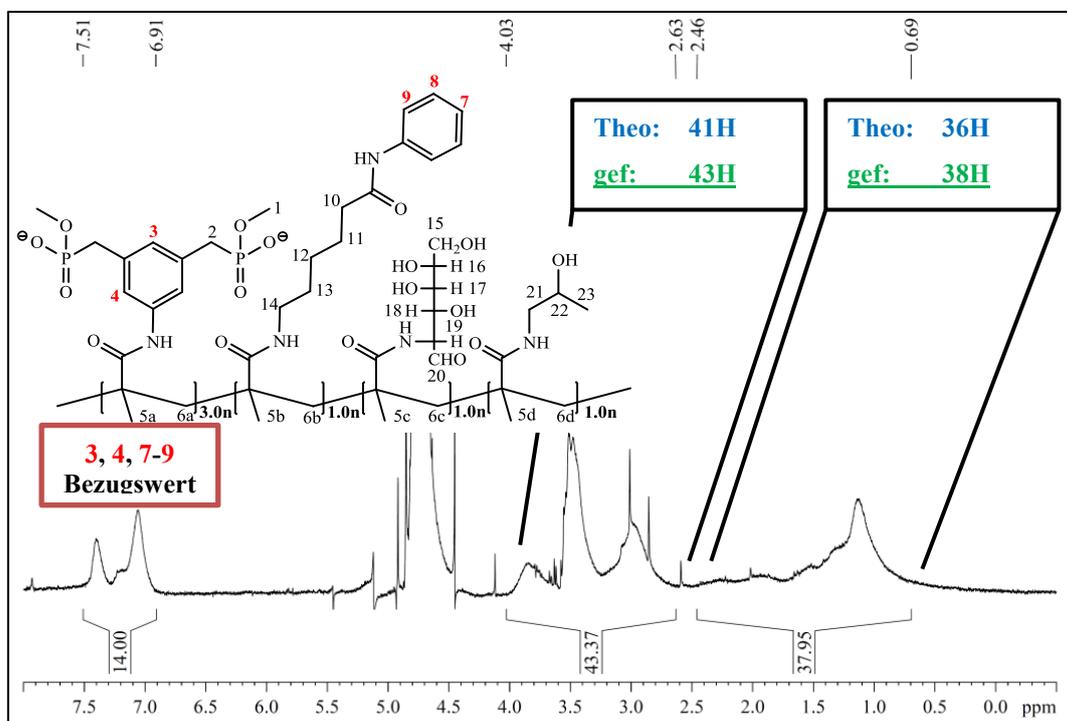
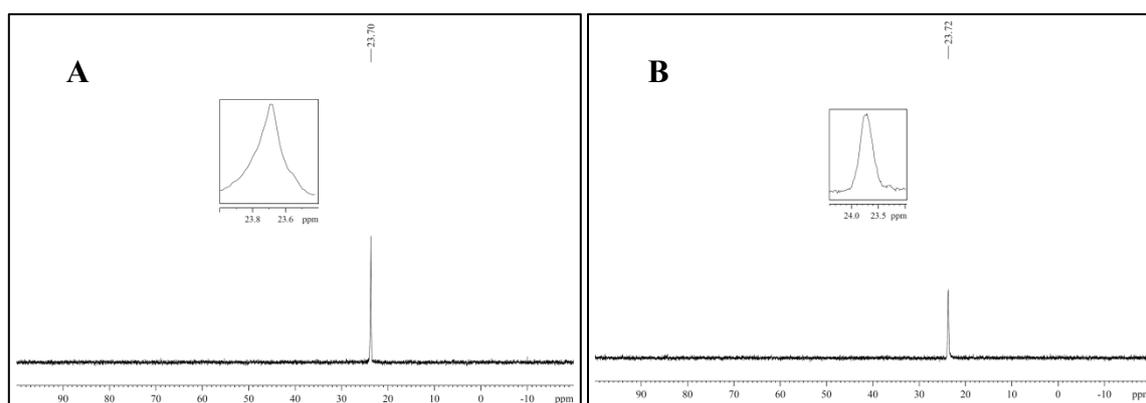


Abb. 3.2.11:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) des Polymers PG23.

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, stimmen die gefundenen Integrationswerte mit den theoretischen nahezu überein, jedoch ist die Bestimmung der Baustein-Stöchiometrie durch diese Form der Charakterisierung bei komplexeren Copolymeren nicht möglich.

Eine  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie von BP-haltigen Copolymeren wie auch von dem Homopolymer PGBP, zeigte jeweils ein breites Signal bei einer chemischen Verschiebung von 23.7 ppm (Abb. 3.2.12). Daher trug diese Form der Polymeranalytik unwesentlich zur Charakterisierung bei.



**Abb. 3.2.12:**  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) der Polymere PGBP (A) und PGKW11.3 (B).

Die Molekulargewichtsbestimmung der dargestellten Polymere erfolgte mittels Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) von Frau *Wöll*. Durch diese Größenausschluss-Chromatographie konnte ferner die Polydispersität der dargestellten Polymere ermittelt werden. Jedoch stellt diese Form der Polymercharakterisierung eine Relativmethode dar, welche abhängig vom verwendeten Standard ist.<sup>[152]</sup> Da allerdings alle Polymere, welche im Rahmen dieser Arbeiten synthetisiert wurden, strukturell voneinander abwichen, ist die Methode fehlerbehaftet. Ferner konnte die Kalibrierung nicht mit einem strukturähnlichen Standard erfolgen, da ein solcher zum jetzigen Zeitpunkt nicht existent war. Da jedoch ein Großteil der synthetisierten Polymere einen Glu-Baustein **3** enthielt, wurde als gegenwärtiger Kompromiss ein auf Polysaccharid basierender Pullulan-Standard verwendet.

Alternativ zu vorherigen Arbeiten wurde bei der GPC zwischen kationischen und anionischen Copolymeren differenziert.<sup>[122,123]</sup> Dies hatte den Hintergrund das kationische Polymere stark mit den bereits etablierten Chromatographiesäulen bzw. mit dem Säulenmaterial interagierten und so zu fehlerhaften Messergebnissen führten. Bedingt durch diese Problematik wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei „NOVEMA-Max 300 x 80 mm Säulen“ erworben, welche die Charakterisierung von kationischen Polymeren erlaubte.

Die mittleren Molekulargewichte ( $M_n$ ) der dargestellten Rezeptoren variierten hierbei zwischen 35000 g/mol und 202000 g/mol (Tab. 3.2.4 und 3.2.5). Der Polydispersitätsindex (PDI), welcher sich durch Gleichung (1) errechnen ließ, gab Auskunft über die Molekulargewichtsverteilungsbreite.

$$\frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n} = \text{PDI} \quad (1)$$

Der PDI der meisten Polymere lag zwischen 2 und 3. Einen außergewöhnlich geringen PDI stellten die Polymere IS1 - IS9 dar, welche zwischen 1.2 und 1.8 lagen (Abb. 3.2.13).<sup>[141]</sup>

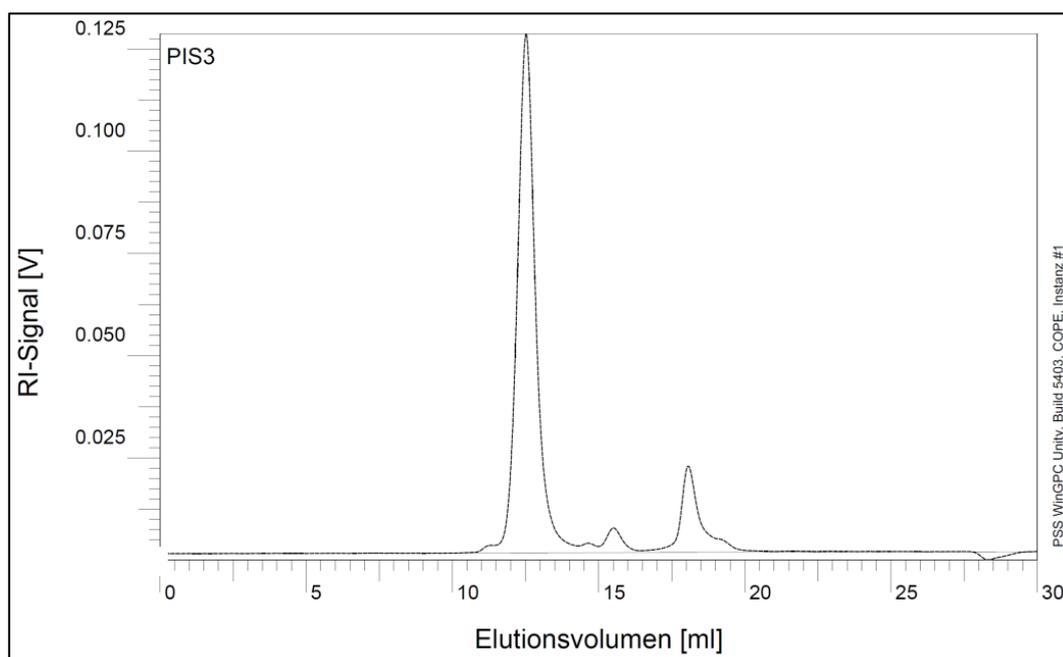


Abb. 3.2.13: GPC-Chromatogramm des Polymers IS3 mit einem PDI von 1.4.<sup>[141]</sup>

Ein weiterer Trend zeigte, dass sich anionische Polymere durch eine wesentlich geringere Polydispersität auszeichnen als Polymere auf kationischer Basis.

### 3.2.4 Dargestellte Polymere

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Darstellung von 50 hochreinen Polymeren verwirklicht werden. Lediglich Polymer PG48 zeigte keine Wasserlöslichkeit. Alternativ zu den anderen Polymeren stellte das Polymer PGSUN2 ein literaturbekanntes Copolymer dar<sup>[121]</sup>, welches nach dem alten Polymerisationsverfahren im Kolbenmaßstab synthetisiert wurde.<sup>[121, 153]</sup> Tabelle 3.2.4 und 3.2.5 fassen die Polymer-Bestandteile der synthetisierten Polymere zusammen.

Tab. 3.2.4: 1. Zusammenfassung der dargestellten Polymere.

Polymere	Verwendete Monomer-Bausteine (in eq.)																M <sub>n</sub> in [kDa]	
	CBS	CBS-Boc	BA	BP	C <sub>5</sub> -BP	C <sub>6</sub> -BP	NTA	NTA-Glu	Bor	Ani	C <sub>6</sub> -CyH	Dod	Glu	Iso	ED	C <sub>6</sub> -Sp		Dan
PPG17				3.0				1.0					1.0				0.5	135
PPG18				2.0				1.0					1.0					139
PPG19				1.5						0.5			1.0					122
PPG20				1.5							0.5		1.0					133
PPG21				1.5								0.5	1.0					150
PPG22				1.5									1.0			0.5		158
PPG23				3.0						1.0			1.0	1.0				132
PPG24				1.0				1.0		1.0			1.0					122
PPG25				1.0				1.0			0.5		1.0					142
PPG26				1.0				1.0					1.0				0.3	145
PPG27				1.0						0.5			1.0	1.0		0.3		133
PPG28				1.0							0.5		1.0	1.0		0.3		132
PPG29				1.0								0.5	1.0	1.0			0.3	124
PPG30	1.0												3.0	1.0	1.0			133
PPG31									1.0	0.5						3.0		123
PPG32									1.0			0.5				3.0		81
PPG33									1.0		0.5					3.0		78
PPG34				4.0					1.0									116
PPG35								0.5				0.5	1.0	1.0				71
PPG36								0.5					1.0	1.0		0.5		118
PPG37				1.0				0.5					1.0	1.0		0.5		158
PPG38			1.0								1.0		3.0					196
PPG39			1.0										3.0				1.0	202
PPG40			1.0							1.0			3.0					107
PPG41			1.0										1.0	1.0				142
PPG42	1.0												3.0					180
PPG43	1.0										1.0		4.0					147

Tab. 3.2.5: 2. Zusammenfassung der dargestellten Polymere.

Polymere	Verwendete Monomer-Bausteine (in eq.)																M <sub>n</sub> in [kDa]	
	CBS	CBS-Boc	BA	BP	C <sub>5</sub> -BP	C <sub>6</sub> -BP	NTA	NTA-Glu	Bor	Ani	C <sub>6</sub> -CyH	Dod	Glu	ISO	ED	C <sub>6</sub> -Sp		Dan
PPG44	1.0		1.0										4.0					167
PPG45	1.0												5.0				1.0	148
PPG46a	1.0			1.0									3.0					123
PPG46b		1.0		1.0									3.0					87
PPG47				4.0			1.0	0.5										134
PPG48							4.0										1.0	-
PPG49				4.0													1.0	120
PPGBA4.2			1.0										1.0					222
PPGBP				1.0														103
PPGK12.4				1.0							1.0		1.0					155
PPGK14.5													1.0					37
PPGKW11.2				3.0			1.0						1.0				0.5	100
PPGKW11.3				3.0			1.0						1.0					94
PPGKW12.2				5.0								1.0	0.3				0.4	103
PIS1 <sup>[141]</sup>							1.0											112
PIS2 <sup>[141]</sup>				1.0			3.0						1.0					83
PIS3 <sup>[141]</sup>				2.0			2.0						1.0					92
PIS4 <sup>[141]</sup>				3.0			1.0						1.0					104
PIS5 <sup>[141]</sup>				3.0			1.0						1.0				1.0	119
PIS6 <sup>[141]</sup>				1.5	1.5		1.0						1.0					104
PIS7 <sup>[141]</sup>				1.5		1.5	1.0						1.0					118
PIS8 <sup>[141]</sup>					3.0		1.0						1.0					95
PIS9 <sup>[141]</sup>						3.0	1.0						1.0					113
PPGSUN2									1.0						2.0		0.3	67

Polymere PG21, PG29, PG31 - PG33, PGKW12.2 und PGBA4.2 zeigten ein etwas schlechteres Wasserlöslichkeitsverhalten als die restlichen hervorragend wasserlöslichen Copolymere. Ferner zeigten die Polymere PG21, PG29 und PGKW12.2 eine leichte Trübung

beim Lösevorgang. Dies könnte ein Indiz für eine Mizellenartige Ausrichtung der langkettigen Dodecyl-Bausteine **6** innerhalb des Polymers sein. Gestützt werden könnte diese These dadurch, dass die Dodecyl-typischen Protonen nicht im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum detektiert werden konnten.

Die Polymere PG46a und 46b stellten Versuche zu Darstellung eines zwitterionischen Copolymers dar. Während Polymer PG46a aus einer CBS- sowie einer BP-Stammlösung synthetisiert wurde, wurde alternativ Polymer PG46b mit einem geschützten CBS-Baustein durchgeführt. Dementsprechend handelte es sich bei der Zusammenführung der einzelnen Monomer-Lösungen um eine klare Lösung, während die Zugabe des CBS-Bausteins und des BP-Bausteins bei Polymer PG46a zu einer Fällung führte. Das aufgereinigte Polymer PG46a zeigte unter großen Ausbeuteverlusten eine sehr gute Wasserlöslichkeit, sowie die CBS **9** und BP **1** spezifischen aromatischen Signale im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, was für die Bildung eines Zwitterions sprach. Hingegen führte die Entschützung des aufgereinigten Polymer PG46b zu einem wasserunlöslichen Feststoff.

Weiterhin wurden einige Polymere nachsynthetisiert, dadurch konnte die Reproduzierbarkeit des Verfahrens mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie sowie GPC überprüft werden (Tab. 3.2.6).

**Tab. 3.2.6:** Zusammenfassung der GPC-Daten der nachsynthetisierten Copolymere.

Polymer	Bausteine in [eq]				Molekulargewicht [ $M_n$ ]	PDI
	BP	NTA	Glu	Bor		
<b>PGKW11.3</b>	3	1	1		94 000 g/mol	1.9
<b>(IS4)</b>	3	1	1		104 000 g/mol	1.5
<b>PGKW11.4</b>	3	1	1		100 000 g/mol	1.5
<b>PG34</b>	4			1	116 000 g/mol	2.0
<b>PG34.2</b>	4			1	143 000 g/mol	2.4
<b>PGBP</b>	1				103 000 g/mol	1.8
<b>PGBP2</b>	1				124 000 g/mol	1.9
<b>PGBP3</b>	1				106 000 g/mol	2.0
<b>PGBP4</b>	1				106 000 g/mol	1.7

Obgleich die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der nachsynthetisierten Polymere annäherungsweise identisch waren, variierten die Molekulargewichte sowie die PDI's der Polymere um maximal 20 %.

### 3.3 Enzymhemmung

Das fokussierte Ziel dieser Arbeit beinhaltet die selektive Enzymhemmung durch neue Affinitätspolymere. Im Zuge dessen war die Etablierung von Enzym-Assays, welche Auskunft über die inhibitorische Wirksamkeit des jeweiligen Rezeptors geben sollten unumgänglich. Ferner war die Bestimmung von  $IC_{50}$ -Werten ein ubiquitäres Mittel zur Ermittlung der Inhibitorischen-Effektivität des jeweiligen wirksamen Rezeptors. Überdies konnte beiliegend die Enzym-Polymer-Stöchiometrie ermittelt werden. Optionale Studien wie isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) oder Lineweaver-Burk-Auftragungen (LWB) sollten einen tieferen Einblick in den Hemmmechanismus geben.

#### 3.3.1 Allgemeine Grundlagen und Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivität

##### 3.3.1.1 Grundlagen der Enzymkinetik

Proteine mit biokatalytischer Funktion werden im Allgemeinen als Enzyme bezeichnet.<sup>[154]</sup> Diese hochmolekularen Verbindungen erhöhen vorwiegend die Reaktionsgeschwindigkeit von spezifischen Reaktionen, durch Verringerung der Aktivierungsenergie. Der enzymatische Substratabbau, welcher zum Katalyse-Produkt führt, kann nach folgendem Reaktionsschema beschrieben werden.<sup>[155]</sup>



Mit E = Enzym; S = Substrat; ES = Enzym-Substrat-Komplex, k = Geschwindigkeitskonstante; P = Produkt.

Die reversible Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes (Michaelis-Komplex) stellt den ersten Schritt einer enzymkatalysierten Reaktion dar. Unter Regeneration des Biokatalysators erfolgt die Produktbildung, bei diesem Vorgang wird eine mögliche Rückreaktion vernachlässigt.

Bei kinetischen Messungen ist jedoch lediglich der geschwindigkeitsbestimmende zweite Schritt, welcher zum Produkt führt von Interesse. Die Ermittlung der Enzymaktivität erfolgt hierbei durch Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit ( $v_0$ ). Grundvoraussetzung für die Ermittlung von  $v_0$  ist eine „konstante“ Enzym-Substrat-Komplexkonzentration (steady-state). Ermöglicht wird dies durch einen großen Substratüberschuss.

Bei einer konstanten Komplexkonzentration gilt:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (2)$$

und somit,

$$\frac{-d[S]}{dt} = v_0 \quad (3)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = v_0 \quad (4)$$

$$[ES] \cdot k_2 = v_0 \quad (5)$$

Die ermittelte Anfangsgeschwindigkeit entspricht bei Abwesenheit eines Inhibitors der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{\max}$  eines Enzyms. Demgemäß kann aus  $v_{\max}$  die Enzymaktivität abgeleitet werden, welche definitionsgemäß der Menge an Substrat (mmol) gleichkommt, welche vom Enzym innerhalb von einer Minute unter festgelegten Versuchsbedingungen katalysiert wird.<sup>[155]</sup>

### 3.3.1.2 UV/VIS- und Fluoreszenz-Messungen

Die Fluoreszenz- wie auch UV/VIS-Spektroskopie stellen allgegenwertige Methoden zur Messung von Enzymaktivitäten dar. Der geringe apparative Aufwand sowie die schnelle Durchführung dieser Analysemethoden machen sie unentbehrlich bei biochemischen Untersuchungen.<sup>[155]</sup>

Bei UV/VIS-Messungen wird monochromatisches Licht einer bestimmten Intensität „ $I_0$ “ durch eine Probelösung gestrahlt und die austretende Intensität des Lichtes „ $I$ “ detektiert. Der Quotient aus  $I$  und  $I_0$  wird als Transmission (Durchlässigkeit) „ $T$ “ bezeichnet. Die Transmission ist wiederum abhängig von der Konzentration des Chromophors in der Probelösung.<sup>[156]</sup> Einen Zusammenhang dieser Größen bildet das Lambert-Beersche Gesetz:<sup>„[123]“</sup>

$$E = \lg \frac{I_0}{I} = \frac{1}{T} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (6)$$

Mit  $E$  = Extinktion;  $c$  = Stoffmengenkonzentration;  $d$  = Schichtdicke der Küvette;  $\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient.

Aus Gleichung (6) ist erkennbar, dass wenn  $d$  und  $\varepsilon$  konstant sind, die Extinktion (Absorption) direkt proportional zur Konzentration des Analyten ist.

Dieser Zusammenhang wird bei enzymatischen Aktivitätstests genutzt. Hierbei wird das Enzym im hohen Überschuss mit einem modifizierten Substrat versetzt, welches beim Abbau ein Chromophor freisetzt, und somit einen Anstieg der Extinktion verursacht. Somit ist die Extinktionsdifferenz  $\Delta E$  direkt proportional zur Konzentration des freigesetzten Chromophors. Die Aktivität des Enzyms kann nun nach folgender Gleichung berechnet werden.<sup>[123]</sup>

$$\text{Enzymaktivität} = \frac{\Delta E}{\Delta t} = \frac{\Delta c(\text{Chromophor})}{\Delta t} \quad (7)$$

Bei biochemischen Messungen wird jedoch meist der Begriff der optischen Dichte „OD“ bzw. mittleren optischen Dichte „mOD“ gewählt, welcher der Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge gleicht.<sup>[123, 157]</sup>

Die Fluoreszenz-Spektroskopie stellt eine weitere optische Methode zur Auswertung von enzymatischen Tests dar. Abweichend zur UV/VIS-Spektroskopie dient bei diesem spektroskopischen Verfahren das Emissionslicht als Basis der Auswertung. Als Fluoreszenz bezeichnet man beispielsweise den Übergang vom niedrigst angeregten  $S_1$ -Schwingungsniveau ( $v = 0$ ) zum Schwingungsgrundzustand ( $S_0$ ,  $v = 1$ ). Die Lebensdauer solcher Übergänge beträgt in der Regel zwischen  $10^{-9}$  bis  $10^{-7}$  s.<sup>[155, 156]</sup>

Die quantitative Auswertung erfolgt nach Gleichung (8):

$$F = I(\lambda) = Q \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (8)$$

Mit  $F$  bzw.  $I(\lambda)$  = Fluoreszenzintensität;  $Q$  = Fluoreszenzausbeute;  $I_0$  = Ausgangsintensität.

Wie aus Gleichung (8) ersichtlich ist, beinhaltet diese ebenfalls das Lambert-Beersche Gesetz. „ $Q$ “ stellt die Fluoreszenzausbeute dar, welche wie folgt definiert ist.<sup>[156]</sup>

$$Q = \frac{\text{Anzahl als Fluoreszenz ermittelte Photonen}}{\text{Anzahl absorbierter Photonen}} \quad (9)$$

Da analog zu Gleichung (6)  $d$ ,  $\varepsilon$ ,  $I_0$  und  $Q$  unter bestimmten Voraussetzungen als konstant erachtet werden, ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Konzentration des zu analysierenden Fluorophors, womit gilt:

$$\text{Enzymaktivität} = \frac{\Delta F}{\Delta t} = \frac{\Delta c(\text{Fluorophor})}{\Delta t} \quad (10)$$

Grundvoraussetzung dafür ist eine möglichst geringe Konzentration während der Messvorgangs, da mit steigender Konzentration Gleichung (8) immer weniger zutrifft. Dies wird dadurch begründet, dass es bei einer steigender Konzentration zu einer Selbstabsorption bzw. zu einem Quenching kommen kann.<sup>[156]</sup>

### 3.3.1.3 Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes

Durch eine Verknüpfung der Kenntnisse aus den Kapiteln 3.3.1.1 und 3.3.1.2 ist es nun möglich einen IC<sub>50</sub>-Wert zu bestimmen.

Hierbei wird die Anfangsgeschwindigkeit, welche der Aktivität des Enzyms entspricht, in Abhängigkeit von der Hemmstoff-Konzentration nach den Gleichungen (7, 10) bestimmt. Dabei dient die errechnete Aktivität des Enzyms, ohne Gegenwart eines Inhibitors, als maximale Aktivität „ $\Delta E_{max}$ “. Der Quotient aus errechneter Aktivität  $\Delta E$  und  $\Delta E_{max}$  entspricht der prozentualen Wirksamkeit des Enzyms.

$$\frac{\Delta E}{\Delta E_{max}} \cdot 100\% = \text{Prozentuale Hemmung} \quad (11)$$

Durch eine sigmoidale Auftragung gegen die Hemmstoff-Konzentration kann der IC<sub>50</sub>-Wert graphisch ermittelt werden (Abb. 3.3.1).<sup>[123]</sup>

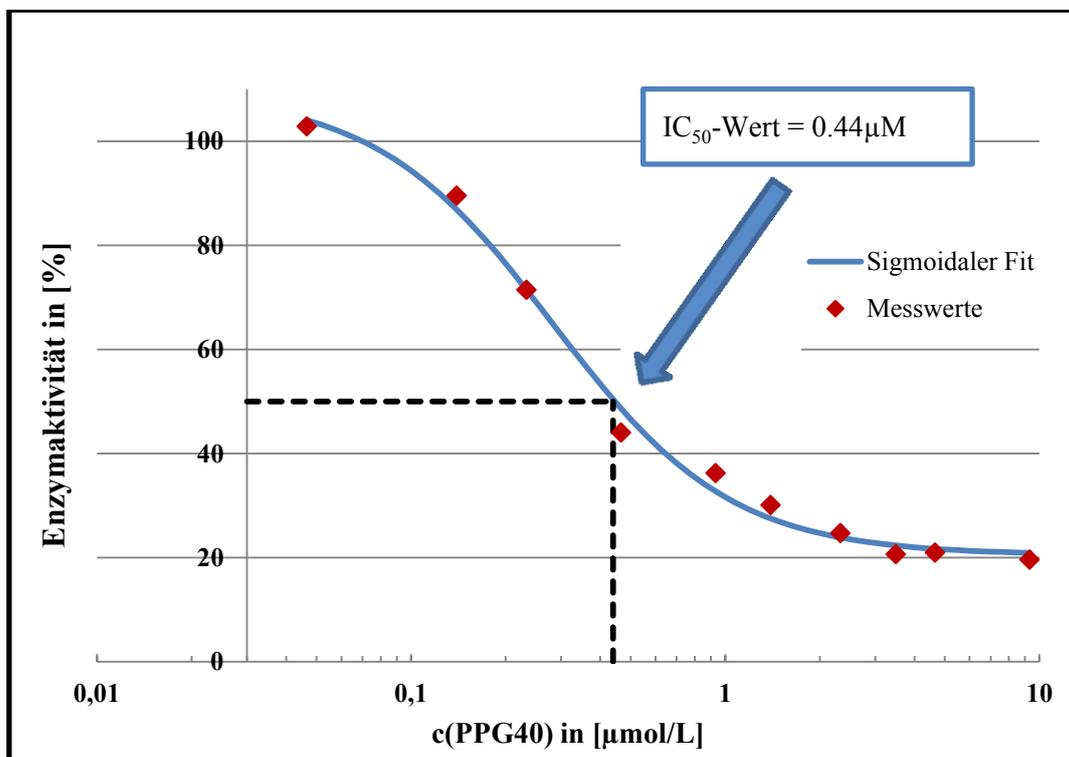


Abb. 3.3.1: Darstellung zur Bestimmung eines IC<sub>50</sub>-Wertes am Beispiel des Polymeres PPG40.

Wie aus Abbildung 3.3.1 zu entnehmen ist, entspricht der  $IC_{50}$ -Wert der Konzentration an Hemmstoff welche benötigt wird um die Enzymaktivität der zu hemmenden Protease auf 50 % reduziert.

### 3.3.1.4 Lineweaver-Burk-Auftragung

Einen tieferen Einblick in den Wirkungsmechanismus der vom Polymer verursachten Hemmung liefert eine Lineweaver-Burk-Auftragung. Die zugrunde liegende Theorie beruht auf der Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (12)$$

„ $K_M$ “ stellt hierbei die Michaelis-Konstante dar. Mittels algebraischer Umformung der Gleichung (11) kann die folgende Gleichung erhalten werden (Lineweaver-Burk-Gleichung):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (13)$$

Durch lineare Auftragung der reziproken Reaktionsgeschwindigkeit ( $v^{-1}$ ) gegen die reziproke Substratkonzentration ( $S^{-1}$ ) kann  $K_M$  wie auch  $v_{\max}$  grafisch ermittelt werden (Abb. 3.3.2).

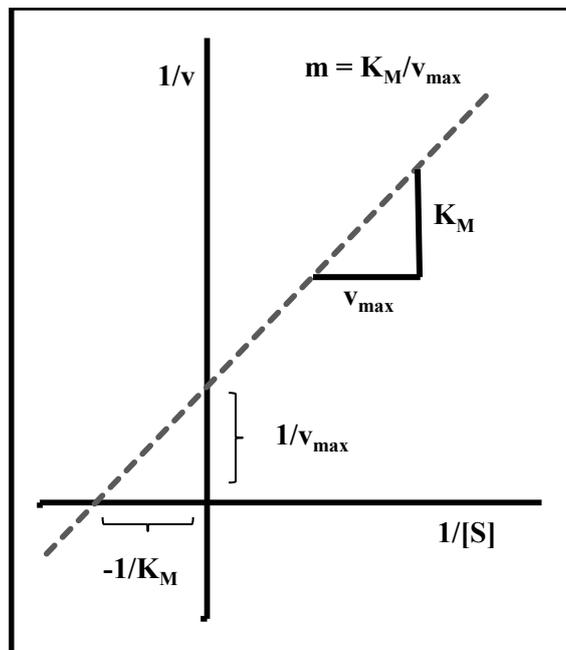
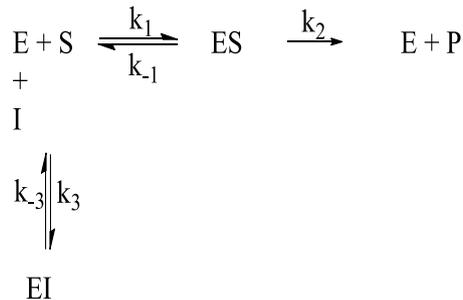


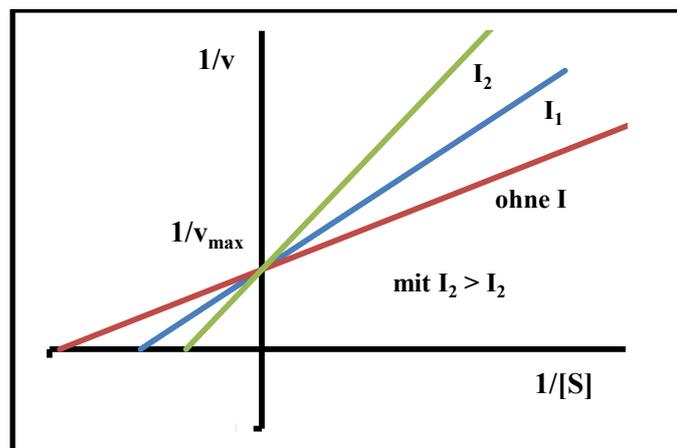
Abb. 3.3.2: Lineweaver-Burk-Diagramm.

Ferner kann durch die doppelt reziproke Auftragung in Gegenwart eines Inhibitors auf den Hemmmechanismus geschlossen werden. Hierbei wird zwischen kompetitiver und nichtkompetitiver Hemmung differenziert.

Bei einer kompetitiven Hemmung bildet der Inhibitor einen reversiblen Inhibitor-Enzym-Komplex aus, der in Konkurrenz zum reversiblen Enzym-Substrat-Komplex steht. Der Inhibitor konkurriert dabei um die Substratbindungsstelle (aktives Zentrum).

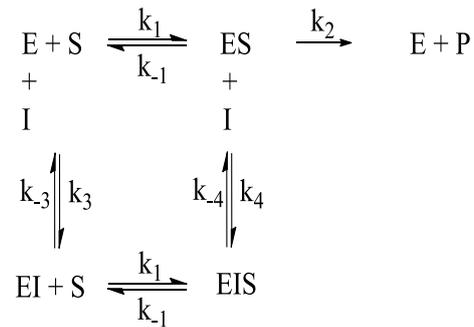


Die doppelt reziproke Auftragung einer kompetitiven Hemmung ist in Abbildung 3.3.3 zusammengefasst.

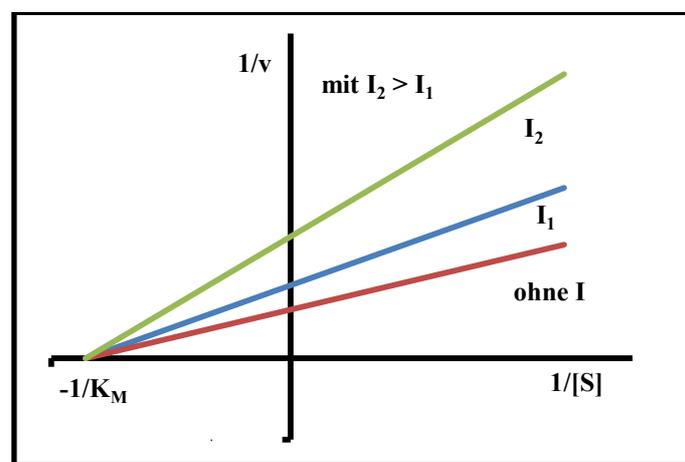


**Abb. 3.3.3:** Lineweaver-Burk-Darstellung unter Verwendung eines kompetitiven Inhibitors (I).

Bei einer nichtkompetitiven Hemmung konkurriert der Hemmstoff nicht um die Bindungsstelle am aktiven Zentrum. Demzufolge kann die Hemmwirkung nicht durch Erhöhung der Substratkonzentration erniedrigt werden. Überdies kann der Inhibitor an das Enzym wie auch an den Enzym-Substrat-Komplex binden, jedoch führt dieser Komplex nicht zur Produktbildung.



Die doppelt reziproke Auftragung einer nichtkompetitiven Hemmung ist in Abbildung 3.3.4 zusammengefasst.<sup>[155, 158]</sup>



**Abb. 3.3.4:** Lineweaver-Burk-Darstellung unter Verwendung eines nichtkompetitiven Inhibitors (I).

### 3.3.1.5 ITC-Messung

Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) stellt eine Methode zur Untersuchung von biomolekularen Wechselwirkungen dar.<sup>[159]</sup> Der Vorteil dieser kalorimetrischen Messmethode ist, dass neben der Bindungskonstante ( $K$ ) die freie Reaktionsenthalpie ( $\Delta H$ ) sowie die Reaktionsentropie ( $\Delta S$ ) einer Proteininteraktion gemessen werden kann. Mit der Kenntnis dieser Größen lässt sich die freie Reaktionsenthalpie ( $\Delta G$ ) wie folgt berechnen:

$$-RT \ln K = \Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (14)$$

Die Funktionsweise der Messmethode beruht auf dem Temperaturvergleich zweier benachbarten Zellen während der Titration. Hierbei dient eine Zelle als Vergleichselement, während das zweite Element als Messzelle fungiert. Als Konsequenz der Protein-Titrant-Interaktion erfolgt eine ständige isotherme Temperaturanpassung der beiden Zellen. Der dabei verwendete Heizstrom in Abhängigkeit der Komponentenkonzentration (Protein und Titrant)

fungiert als Auswertungsbasis. Das Titrationschema (A) wie auch ein messtypischer Graph (B) sind in Abbildung 3.3.5 veranschaulicht.

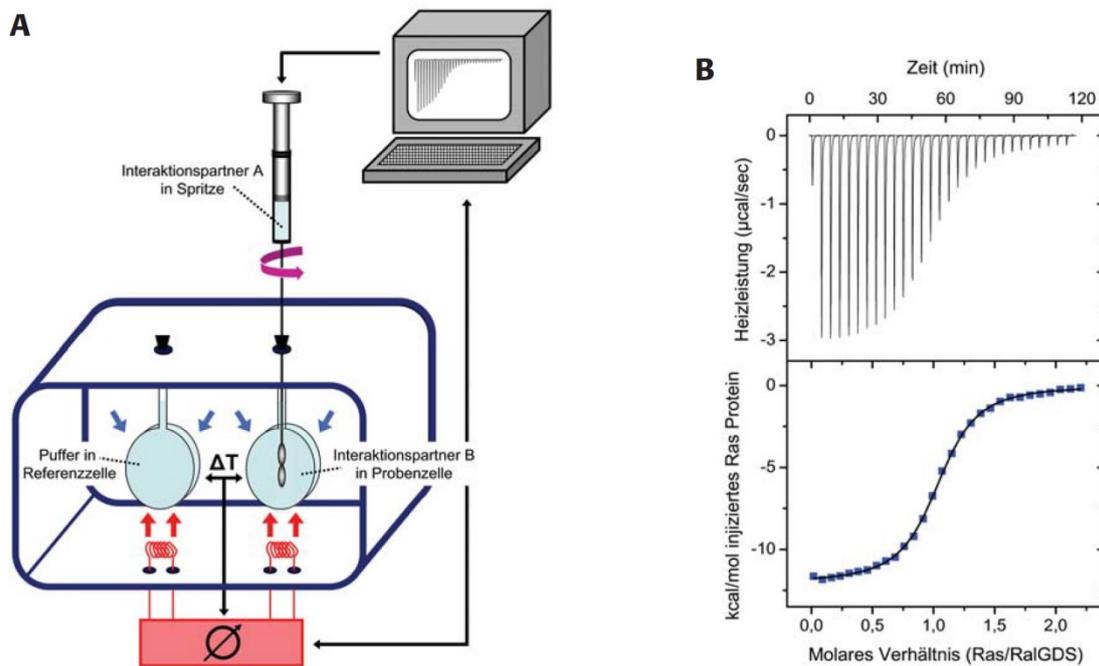


Abb. 3.3.5: Schematischer Aufbau einer ITC-Apparatur (A). Grafische Auswertung einer ITC-Messung (B).<sup>[159]</sup>

### 3.3.2 Untersuchte Enzyme

Die inhibitorische Wirksamkeit der dargestellten Polymere erfolgte mittels eines Enzym-Screenings. Grundvoraussetzung hierfür war die Etablierung eines geeigneten Assays, welcher unter annähernd physiologischen Bedingungen durchgeführt werden konnte. Zu diesem Zweck musste eine möglichst geringe DMSO-Konzentration gewählt werden, die dennoch das für den Assay benötigte Substrat vollständig löste. Weiterhin musste die Substrat- wie auch die Enzym-Konzentration so angepasst werden, dass die durchgeführten Messungen möglichst genau und reproduzierbar waren. Letztlich wurde die Inkubationszeit der Enzym-Polymer-Interaktion so angepasst, dass das Polymer eine maximale Hemmleistung erzielen konnte.

Das Screening der jeweiligen Hydrolase erfolgte durch Verwendung von Polymer-Stammlösungen (20 mg/mL bzw. 1 mg/mL). Additional wurden NTA-haltige Polymere mit mit einer 50 %igen  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen Konzentration (bezogen auf den NTA-Baustein) vermessen. Anschließend wurden die  $\text{IC}_{50}$ -Werte der wirksamen Polymere ermittelt.

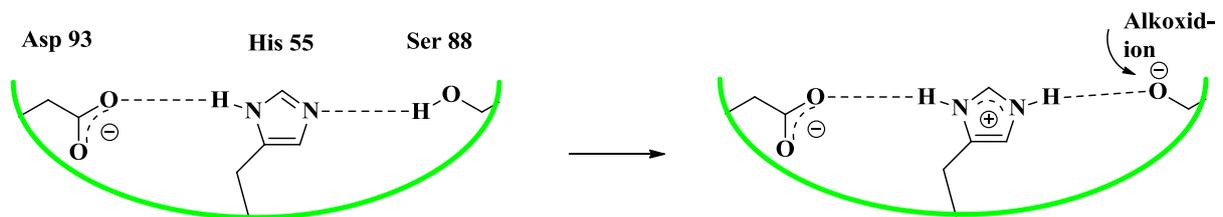
### 3.3.2.1 Elastase

Die Pankreas-Elastase gehört zur Familie der Serin-Proteasen. Das Enzym wird in zymogener Form in den Azinuszellen des exokrinen Pankreasteils gebildet. Mittels Trypsin erfolgt die Aktivierung des Proenzym im Duodenum.<sup>[5]</sup>

Elastase besteht aus einer Sequenz von 240 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 26 kDa. Ferner zeichnet es sich das Enzym durch vier Disulfidbrücken aus.<sup>[160]</sup> Der isoelektrische Punkt (pI) des Enzyms beträgt 8.75.<sup>[161]</sup> Casein, Elastin stellen die natürlichen Substrate der Pankreas-Elastase dar.<sup>[162]</sup> Als natürlicher Hemmstoff der Serin-Protease dient  $\alpha_1$ -Antitrypsin.<sup>[163]</sup>

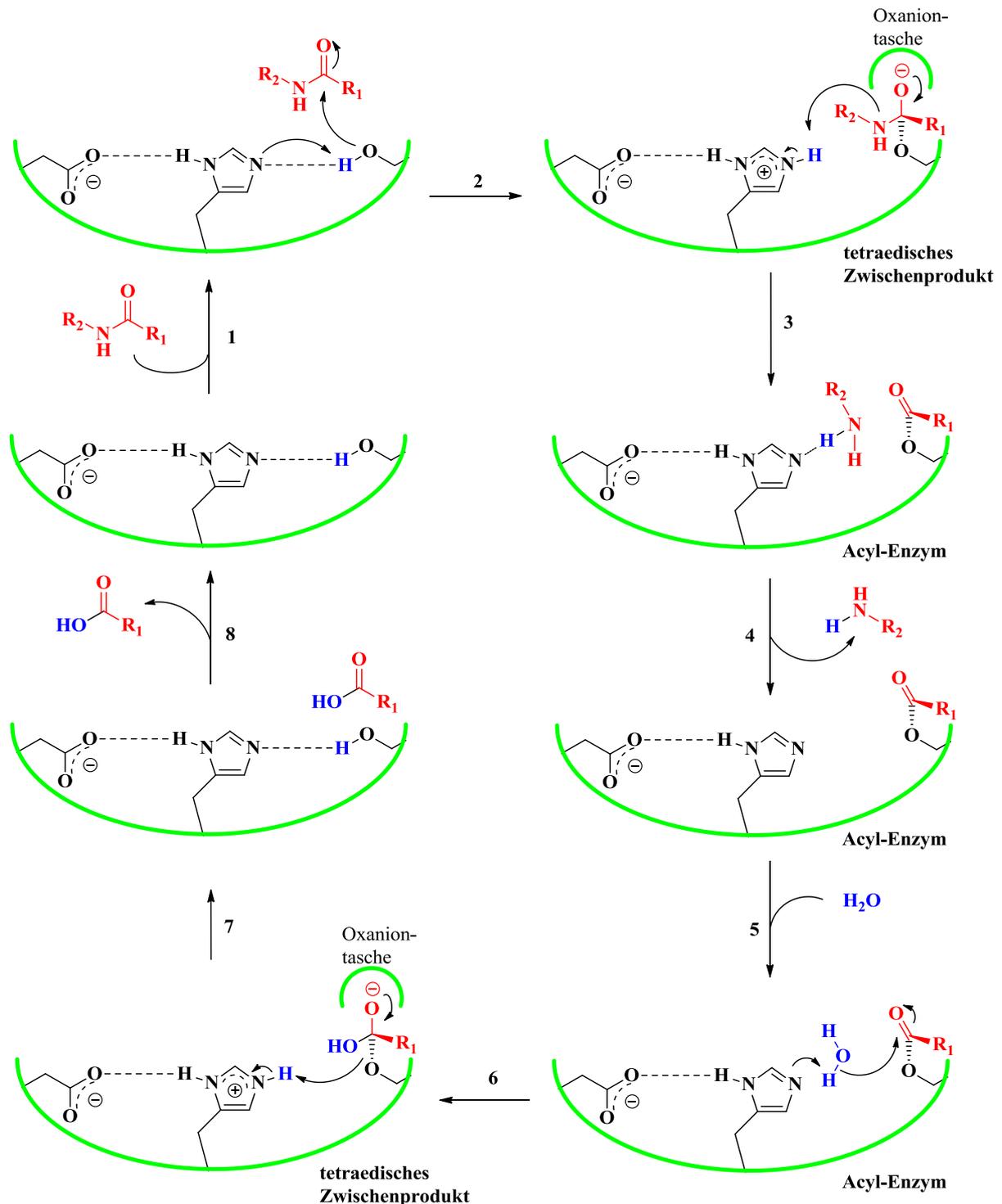
Der hydrolytische Substratabbau erfolgt durch die Serin-Protease typische Aminosäuretriade welche aus Serin, Histidin und Asparaginsäure besteht.

Der hydrolytische Substratabbau erfolgt bei Elastase durch eine Serin-Protease typische Aminosäuretriade(Abb. 3.3.6).



**Abb. 3.3.6:** Katalytische Triade der Elastase.<sup>[100, 123]</sup>

Das oben dargestellte aktive Zentrum einer Serin-Protease beruht auf dem kooperativen Zusammenspiel der Aminosäuren. Ausgangspunkt des Katalyse-Mechanismus ist die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Serin- und dem Histidinrest. Nach Protonübertragung fungiert das gebildete Alkoxidion als Nukleophil, welches den Substratabbau initiieren kann. Der ausführliche Mechanismus, der über mehrere Zwischenstufen verläuft, ist in Abbildung 3.3.7 zusammengefasst.



**Abb. 3.3.7:** Ausführlicher Mechanismus des Substratabbaus durch die katalytische Triade.<sup>[100, 123]</sup>

Obwohl der Peptidabbau durch die strukturähnlichen Endopeptidasen Elastase, Trypsin und  $\alpha$ -Chymotrypsin nach demselben Mechanismus verläuft, besitzen diese unterschiedliche Substrataffinitäten. Die Spezifität des hydrolytischen Substratabbaus beruht hierbei auf der Kavität des aktiven Zentrums. Während beispielsweise  $\alpha$ -Chymotrypsin bedingt durch seine „große“  $S_1$ -Tasche bevorzugt nach Phenylalaninen schneidet, beschränkt sich Elastase durch eine „relativ kleine“ Seitentasche auf ungeladene kleine Aminosäuren wie Alanin.<sup>[164]</sup>

Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Enzym-Assay basiert auf der angesprochenen Spezifität. Bei diesem fungiert *N*-Succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-Nitroanilid **45** als künstliches Substrat, welches nach dem enzymatischen Abbau das Chromophor *p*-Nitroanilin **46** bildet (Abb. 3.3.8).<sup>[165]</sup>

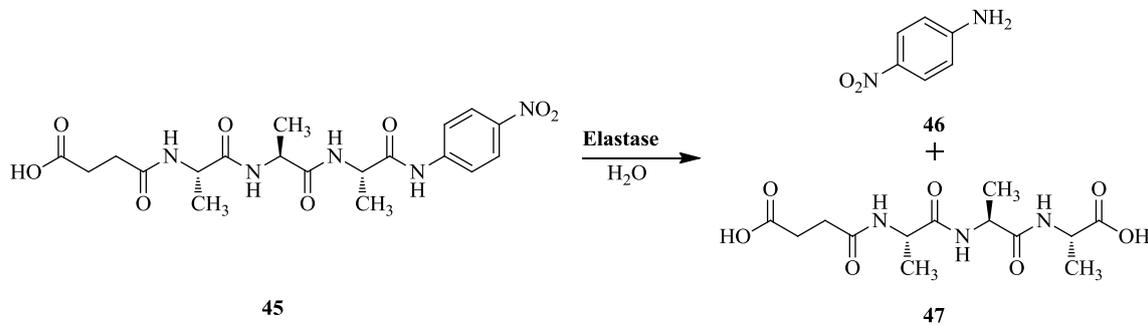


Abb. 3.3.8: Hydrolytische Spaltung von Suc-(Ala)<sub>3</sub>-pNA **45** unter Freisetzung von *p*-Nitroanilin **46**.<sup>[165]</sup>

Die Messung wurde bei einem pH-Wert von 8.0 (pH-Optimum = 8.5) und bei einer Wellenlänge von 380 nm durchgeführt. Das Absorptionsübersichtsspektrum (Abb. 3.3.9) zeigt, dass bei der gewählten Wellenlänge das Absorptionsmaximum des Chromophors **46** vorliegt. Hingegen zeigt das Substrat **45**, sowie das Enzym bei dieser Wellenlänge nur eine geringe Absorption.

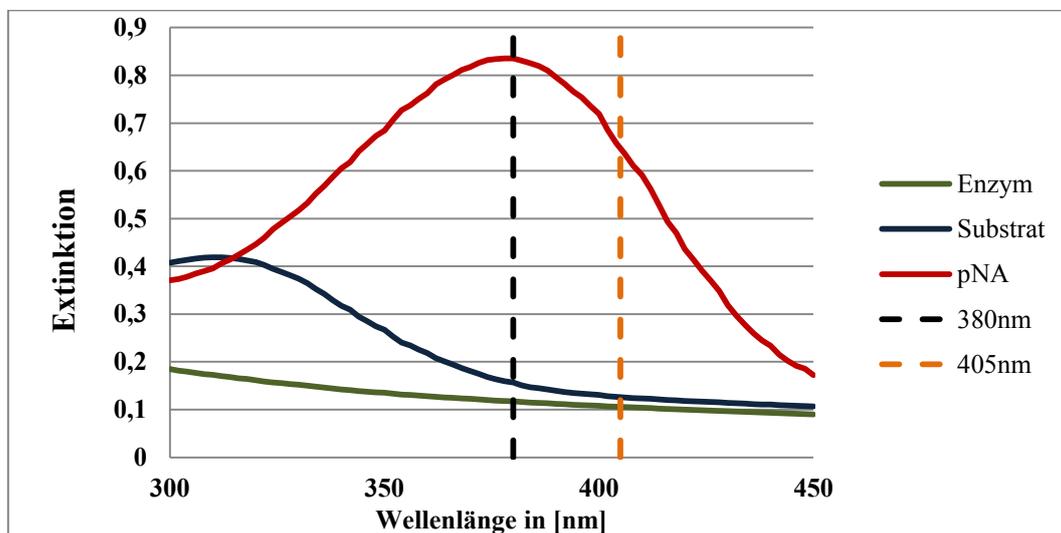
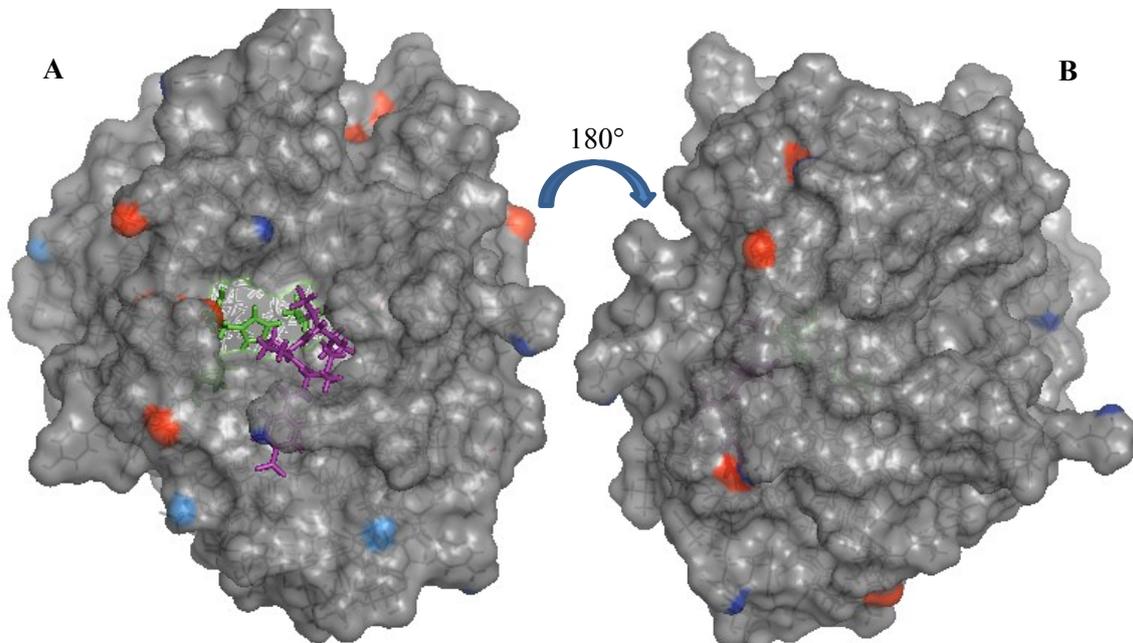


Abb. 3.3.9: Absorptionsübersichtsspektrum der im Elastase Assay verwendeten Komponenten.

Ferner wurde die Funktionalität des Assays mit dem literaturbekannten Serin-Protease-Hemmstoff Diisopropylfluorophosphat (DIFP) kontrolliert.<sup>[90, 91, 100]</sup> DIFP bildet unter Dehydratisierung eine kovalente Bindung zu Serinresten aus, was zur Deaktivierung der katalytischen Kaskade führt.

Jedoch zeigte kein Polymer im Screening eine inhibitorische Wirksamkeit gegenüber der Hydrolase. Aufgrund des basischen Charakters des Arginin -reichen Enzyms sollten theoretisch BP-haltige Polymere eine vielversprechende Option zur Hemmung sein. Eine mögliche Erklärung für dieses Testergebnis liefert eine Kristallstruktur der Protease (Abb. 3.3.10).



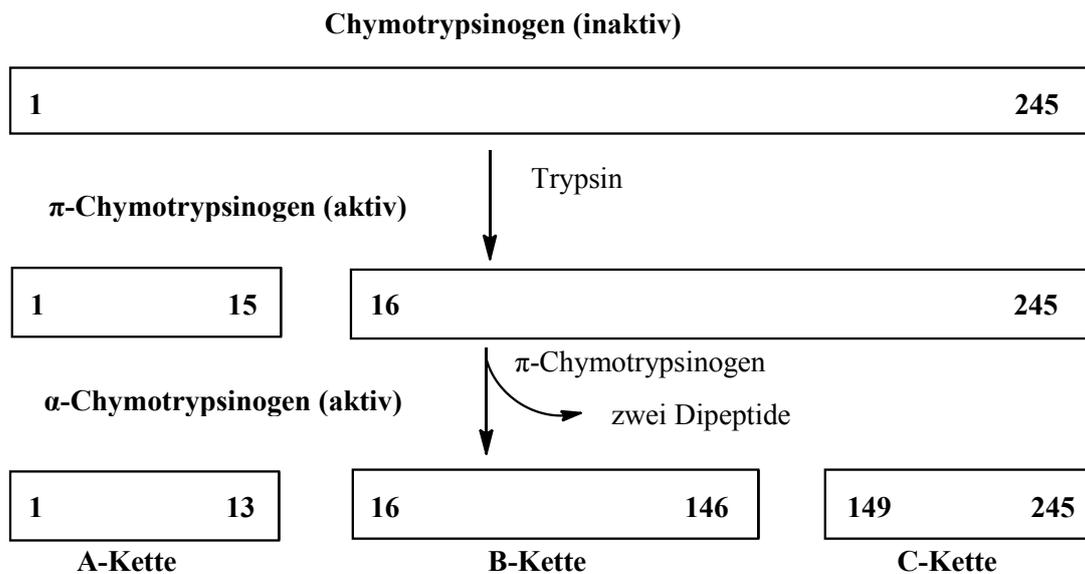
**Abb.: 3.3.10:** Kristallstruktur der Pankreas-Elastase.<sup>[166]</sup> Rote Flächen stellen Carboxylat-Gruppen der sauren Aminosäuren (Asp, Glu) dar. Hellblaue Flächen symbolisieren Lysine, blaue Flächen Arginine. Das violette Molekül stellt einen Hemmstoff dar, welcher am aktiven Zentrum bindet. Die grünen Aminosäuren stellen die katalytische Triade dar.

Wie aus der Raumstruktur ersichtlich ist, befindet sich am aktiven Zentrum (A) weder eine Carboxylat- noch eine Arginin- bzw. Lysin-reiche Domäne, was eine Polymer-Komplexierung in der Nähe der katalytischen Triade erschwert. Ferner befinden sich in unmittelbarer Nähe von Arginin- und Lysin-Resten Carboxylat-Gruppen der sauren Aminosäuren, was eine Komplexierung zusätzlich erschwert. Infolgedessen kann erklärt werden, warum weder das BP-Homopolymer (PGBP) noch flexiblere BP-haltige Copolymere (IS6 - IS9) eine inhibitorische Wirksamkeit gegenüber dem Enzym zeigten.

Eine direkte Interaktion mit dem aktiven Zentrum des Enzym durch BA-haltige Copolymere kann aufgrund mangelnder Kavitätgröße sicher ausgeschlossen werden.

### 3.3.2.2 $\alpha$ -Chymotrypsin

$\alpha$ -Chymotrypsin gehört wie Elastase und Trypsin zur Klasse der Serin-Proteasen. Chymotrypsinogen stellt mit einem Anteil von 9 % die zweithäufigste Endopeptidase im Pankreassaft dar.<sup>[167]</sup> Innerhalb des Duodenums erfolgt die proteolytische Aktivierung von Chymotrypsinogen zum  $\alpha$ -Chymotrypsin. Dieser Vorgang verläuft in zwei Schritten (Abb. 3.3.11).



**Abb. 3.3.11:** Proteolytische Aktivierung von Chymotrypsinogen zu  $\alpha$ -Chymotrypsin.<sup>[100]</sup>

Im ersten Schritt wird das Proenzym durch Trypsin zwischen Arg 15 und Ile 16 gespalten, was zum aktiven  $\pi$ -Chymotrypsin führt. Durch eine zweifache autokatalytische Dipeptidabspaltung von  $\pi$ -Chymotrypsin erfolgt die Bildung von  $\alpha$ -Chymotrypsin. Die dabei gebildeten Fragmente sind über zwei Disulfidbrücken verknüpft.<sup>[5, 100]</sup>

$\alpha$ -Chymotrypsin besteht aus 241 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 25 kDa. Das Enzym hat einen isoelektrischen Punkt von 8.7 und ein pH Optimum bei 7.8. Der mechanistische Substratabbau verläuft über die für Serin-Proteasen typische Triade (His 57, Asp 102 und Ser 195).<sup>[100, 168]</sup> Die Substratspezifität der Endopeptidase beschränkt sich auf die hydrolytische Spaltung von aromatischen Aminosäuren wie Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan.

Das für die Untersuchung genutzte Substrat basiert auf der oben beschriebenen Enzymspezifität. Das Reaktionsschema des enzymatischen Substratabbaus ist in Abbildung 3.3.12 zusammengefasst.

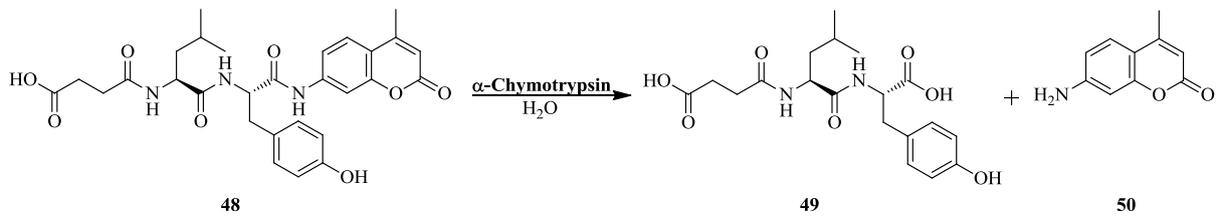


Abb. 3.3.12: Hydrolytische Spaltung von Suc-Leu-Tyr-AMC **48** unter Freisetzung AMC **50**.<sup>[169]</sup>

Bei dem Assay fungiert 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) **50** als Fluorophor, welches nach hydrolytischer Spaltung von Suc-Leu-Tyr-AMC **48** freigesetzt wird. Die Messung wurde bei einem pH-Wert von 8.0 (pH-Optimum = 7.8) durchgeführt bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm und einer Emissionswellenlänge von 444 nm. Das Emissionsübersichtsspektrum (Abb. 3.3.13) zeigt, dass bei der gewählten Wellenlänge das Emissionsmaximum des Fluorophors **50** vorliegt.

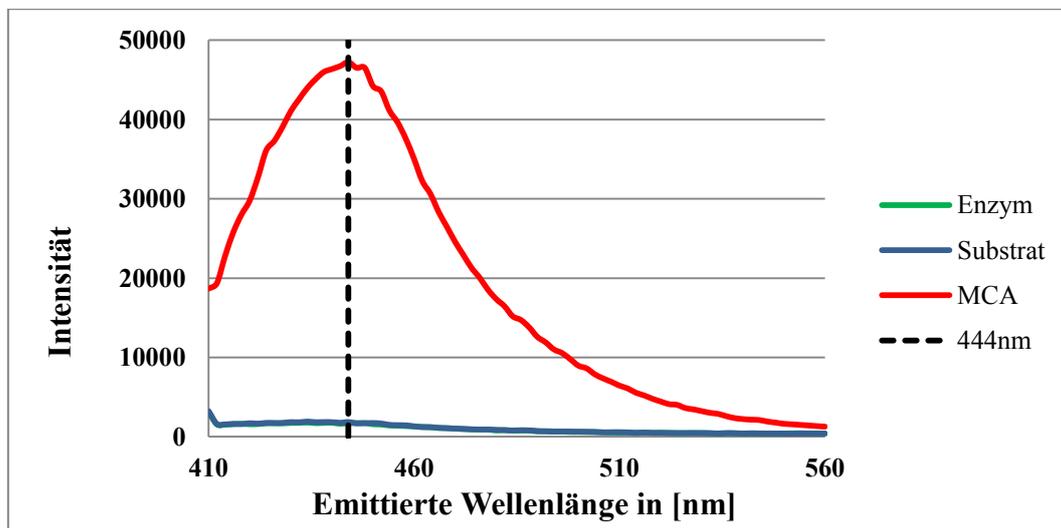
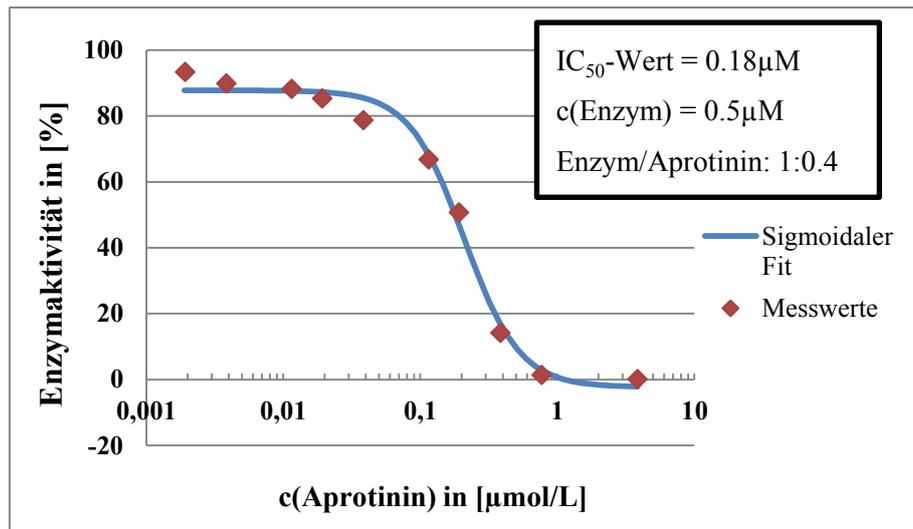


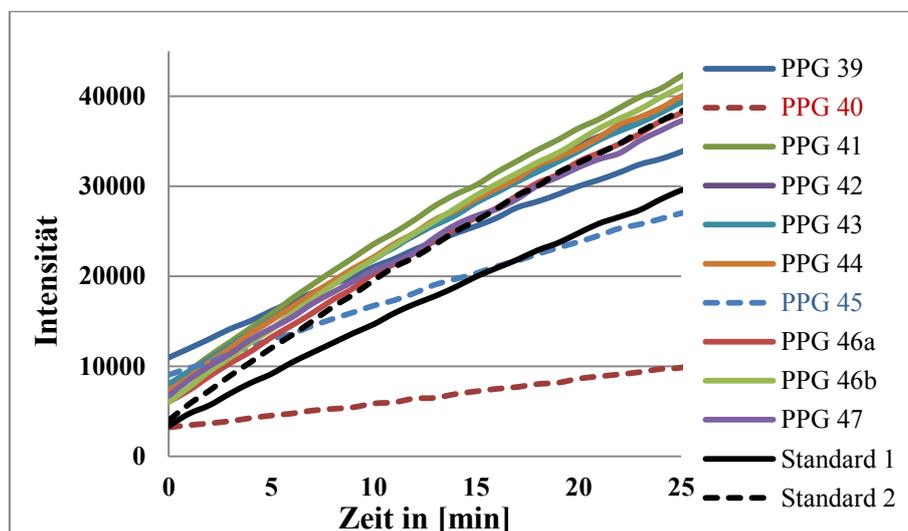
Abb. 3.3.13: Übersichtsspektrum des Enzyms, Substrats und Fluorophors im  $\alpha$ -Chymotrypsin Assay.

Die Funktionalität des Assays wurde mit literaturbekanntem Hemmstoff Aprotinin kontrolliert.<sup>[92, 93]</sup> Neben der Bekräftigung der Messfunktionalität des Assays, wurde der  $IC_{50}$ -Wert der Aprotinin-Hemmung bestimmt. Der  $0.18 \mu M$   $IC_{50}$ -Wert des Hemmstoffes (bei einer  $0.5 \mu M$  Enzymkonzentration) versicherte zusätzlich, dass das verwendete Enzym nach wie vor aktiv war.



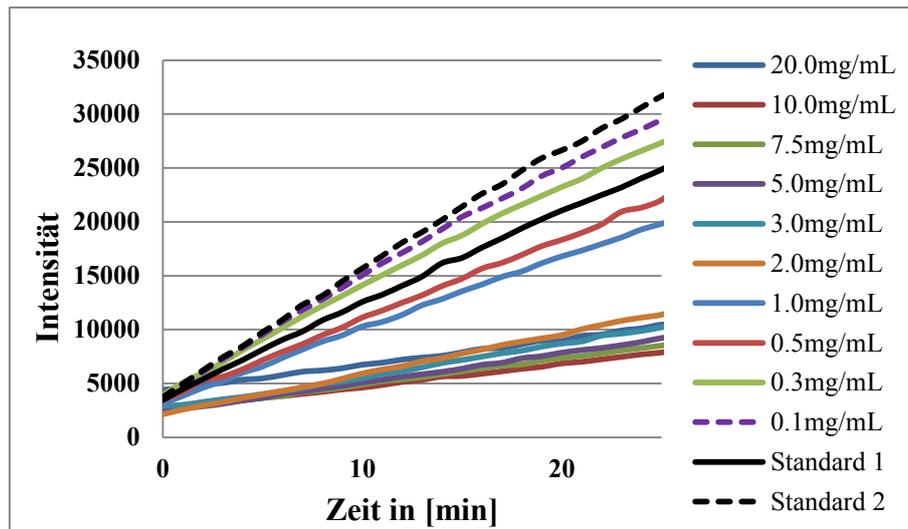
**Abb. 3.3.14:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von Aprotinin zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes ( $0.18 \mu\text{M}$  bei einer  $0.5 \mu\text{M}$  Enzymkonzentration).

Das Screening zeigte, dass drei der verwendeten Copolymere eine inhibitorische Wirksamkeit zugesprochen werden konnte (Polymere PG38, PG40 und PG45). Auffällig hierbei war das alle Polymere Carboxylat-Erkennungseinheiten enthielten. Jedoch zeigte lediglich Polymer PG40 eine ausreichend hohe Wirksamkeit, welche für die Bestimmung eines  $IC_{50}$ -Wertes benötigt wurde (Abb. 3.3.15).

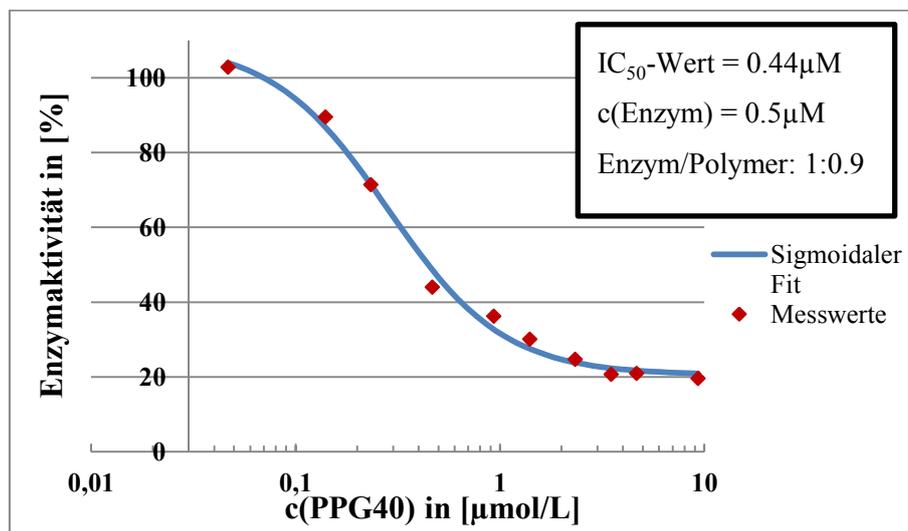


**Abb. 3.3.15:**  $\alpha$ -Chymotrypsin Screening von diversen Copolymeren.

Durch die Kombination der Gleichungen (11 und 12) bei der konzentrationsabhängigen Hemmung des Polymers PG40 (Abb. 3.3.16) konnte der  $IC_{50}$ -Wert grafisch ermittelt werden (Abb. 3.3.17). Der dabei ermittelte  $IC_{50}$ -Wert lag im nM-Bereich ( $0.44 \mu\text{M}$ ).

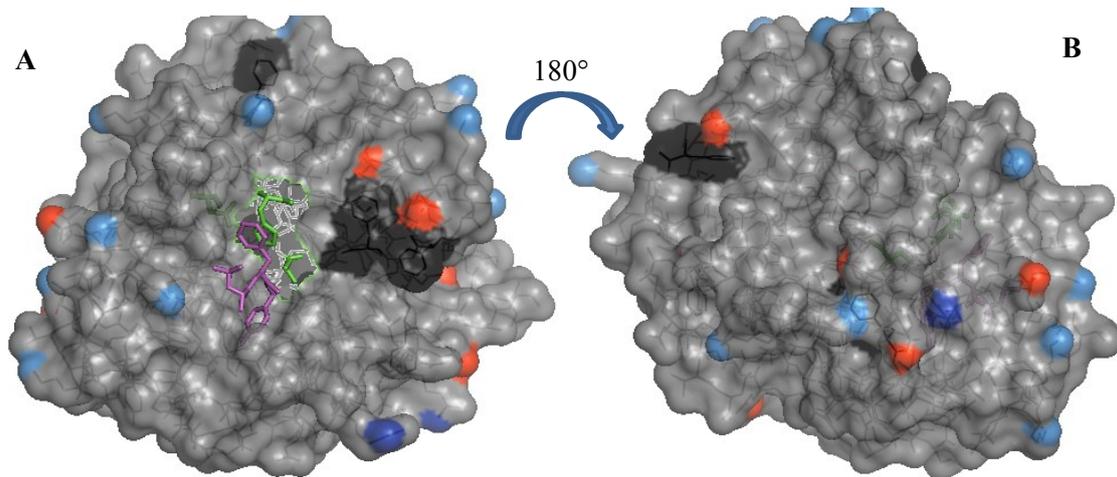


**Abb. 3.3.16:** Inhibition von  $\alpha$ -Chymotrypsin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PPG40. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 20.0 - 0.1 mg/mL.



**Abb. 3.3.17:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG40 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (0.44  $\mu$ M bei einer 0.5  $\mu$ M Enzymkonzentration).

Entgegen der Theorie, dass das Lysin- reiche Enzym durch BP- oder NTA-haltige Polymere gehemmt werden müsste, zeigten lediglich CBS- und BA-haltige Polymere eine inhibitorische Wirksamkeit. Eine mögliche Erklärung für das unerwartete Ergebnis, kann durch die genaue Betrachtung der Kristallstruktur erläutert werden (Abb. 3.3.18). Die Raumstruktur zeigte zwar eine hohe Anzahl von Lysinresten, indessen befanden sich lediglich zwei distanzierte Lysinreste in der Nähe des aktiven Zentrums. Demzufolge wäre eine Bindung von BP- und NTA- reichen Polymeren denkbar, ohne jedoch die biokatalytische Aktivität des Enzyms zu beeinflussen.



**Abb. 3.3.18:** Kristallstruktur von  $\alpha$ -Chymotrypsin.<sup>[170]</sup> Rote Flächen stellen Carboxylat-Gruppen der sauren Aminosäuren (Asp, Glu) dar. Hellblaue Flächen symbolisieren Lysine, blaue Flächen Arginine. Das violette Molekül stellt einen Hemmstoff dar, welcher am aktiven Zentrum bindet. Die grünen Aminosäuren stellen die katalytische Triade dar. Schwarze Flächen stellen Phenylalanine dar.

Hingegen lagen zwei benachbarte Carboxylatgruppen in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums (A). Weiterhin kann aus der Kristallstruktur entnommen werden, dass die Kavität, in welcher sich die katalytische Triade befindet, aus sterischer Sicht leichter zugänglich ist, als bei der strukturähnlichen Serin-Protease Elastase.

Die wirksame Hemmung von Polymer PG40 (BA, Ani, Glu im Verhältnis 1:1:3) könnte dadurch begründet werden, dass sich der BA-Baustein **12** an die leicht zugänglichen Carboxylat-Gruppen bindet und das aktive Zentrum verdeckt bzw. mit diesem interagiert. Weiterhin könnte der aromatische Ani-Baustein **14** durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen bzw.  $\pi$ -kationischen-Wechselwirkungen zur Erhöhung der Bindungsaffinität führen, was erklären würde warum das BA-reichere Polymer PGBA4.2 (BA, Glu im Verhältnis 1:1) keine inhibitorische Wirksamkeit zeigte. Bekräftigt wird die These durch das strukturähnliche Polymer PG38 (BA, C<sub>6</sub>-CyH, Glu im Verhältnis 1:1:3), welches ebenfalls eine geringfügige Hemmwirkung zeigte. Der C<sub>6</sub>-CyH-Baustein **7** könnte zwar mit unpolaren Aminosäureresten interagieren, jedoch ohne Ausbildung von  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen bzw.  $\pi$ -kationischen-Wechselwirkungen zu basischen Aminosäureresten.

### 3.3.2.3 Trypsin

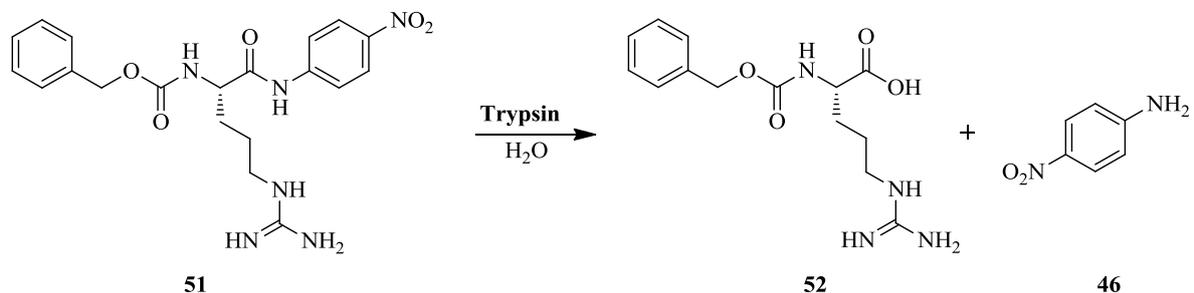
Die Protease Trypsin stellt das anspruchsvollste Target dieser Arbeit dar. Neben dem makromolekularen Abbau von aufgenommenen Proteinen fungiert das Enzym als Aktivator. Bei diesem Vorgang interagiert die Serin-Protease mit zymogenen Verdauungshydrolasen und aktiviert diese mittels proteolytischer Spaltung.<sup>[5, 100]</sup>

Die vorzeitige Aktivierung von Trypsinogen führt zur proteolytischen Spaltung diverser Proenzyme innerhalb des Drüsenorgans.<sup>[12]</sup> Als Folge dessen wird die Bauchspeicheldrüse von den aktivierten Hydrolasen angegriffen. Weiterhin kann die Autodigestion zu einer Limitierung der exokrinen und endokrinen Pankreasfunktion<sup>[23, 24]</sup>, wie auch zu Schädigungen anderer Organe führen.<sup>[12, 19-22]</sup> Dementsprechend könnte durch selektive Hemmung von Trypsin einer Autodigestion des Organs entgegengewirkt werden.

Trypsinogen wird im exokrinen Pankreasteil gebildet, die Aktivierung des Proenzym erfolgt autokatalytisch im Duodenum. Das Lysin -reiche Enzym besteht aus 233 Aminosäuren, welche über sechs Disulfidbrücken verknüpft sind. Die ca. 24 kDa schwere Hydrolase hat einen isoelektrischen Punkt von 10.1 bei einem pH-Optimum von 7.5 - 8.5.<sup>[171-174]</sup>

Der Substratabbau erfolgt analog zu  $\alpha$ -Chymotrypsin und Elastase durch die katalytische Triade (Ser, Asp und His). Die Substratspezifität der Hydrolase beschränkt sich auf kationische Aminosäuren (Arg und Lys), welche auf der Carboxylseite gespalten werden.

Das für die Untersuchung genutzte Substrat basiert auf der oben beschriebenen Enzymspezifität. Das Reaktionsschema des enzymatischen Substratabbaus ist in Abbildung 3.3.19 zusammengefasst.



**Abb.: 3.3.19:** Hydrolytische Spaltung von BAPNA **51** unter Freisetzung von *p*-Nitroanilin **46**.<sup>[175]</sup>

Die literaturbekannte Messmethode wurde bei einem pH-Wert von 8.0 und einer Wellenlänge von 405 nm durchgeführt.<sup>[122]</sup> Das Absorptionsübersichtsspektrum (Abb. 3.3.20) zeigt, dass bei der gewählten Wellenlänge das Absorptionsmaximum des Chromophors **46** vorliegt. Hingegen zeigt das Substrat **51**, sowie das Enzym bei dieser Wellenlänge nur eine geringe Absorption.

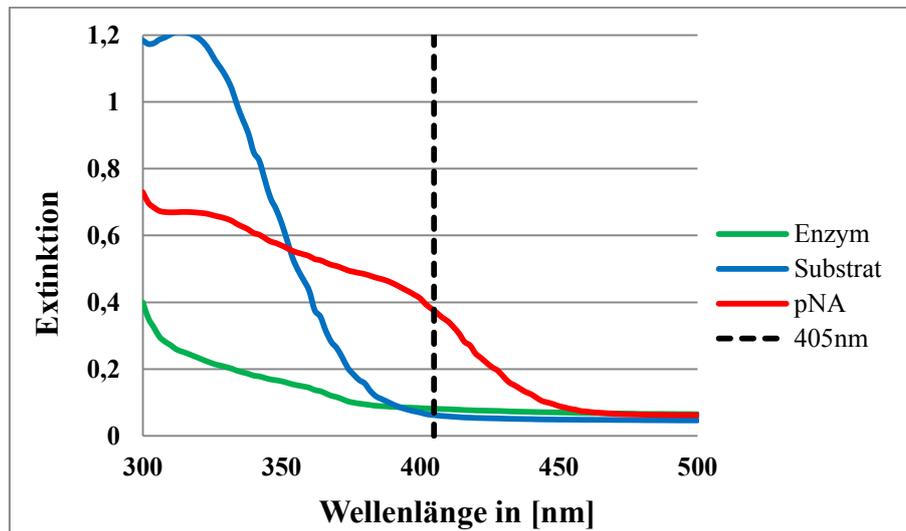


Abb. 3.3.20: Absorptionsübersicht des Enzyms, Substrats **51** und Chromophors **46** im Trypsin Assay.

Die Funktionalität des Assays wurde mit dem literaturbekannten Hemmstoff *p*-Amino-Benzamidin bestätigt.<sup>[96, 97]</sup>

Motiviert von *Wencks* Arbeiten, stellten BP-haltige Polymere eine vielversprechende Option zur Hemmung der Protease dar. Die beste Inhibition zeigte jedoch ein Copolymer, welches den NTA- wie auch den BP-Baustein enthielt.

Mittels Enzym Screening konnten den Polymeren PGBP, PG34 und PGKW11.2 eine starke inhibitorische Wirksamkeit zugesprochen werden. Auffällig hierbei war, dass alle Polymere den BP-Baustein **1** enthielten. Dementsprechend könnte ein Homopolymer auf BP-Basis die beste Wirksamkeit erzielen. Entgegen dieser Theorie zeigte jedoch das Homopolymer PGBP die vermeintlich schlechteste Hemmung ( $IC_{50}$ -Wert = 3.2  $\mu$ M). Gleichwohl verzeichnete das BP-reiche Polymer PG34 eine um Faktor fünf bessere Hemmung als das Homopolymer.

Interessant war außerdem, dass das NTA- und BP-haltige Polymer PPGKW11.2 eine wesentlich bessere Enzyminhibition verursachte (1.0  $\mu$ M  $IC_{50}$ -Wert), als das BP-Homopolymer. Entgegen der Theorie, dass der NTA-Baustein **11** durch Anwesenheit von  $Ni^{2+}$ -Ionen als Histidin-Erkennungseinheit fungiert, zeigte das Copolymer in Abwesenheit dieser eine wesentlich bessere Hemmung (Tab. 3.3.1).

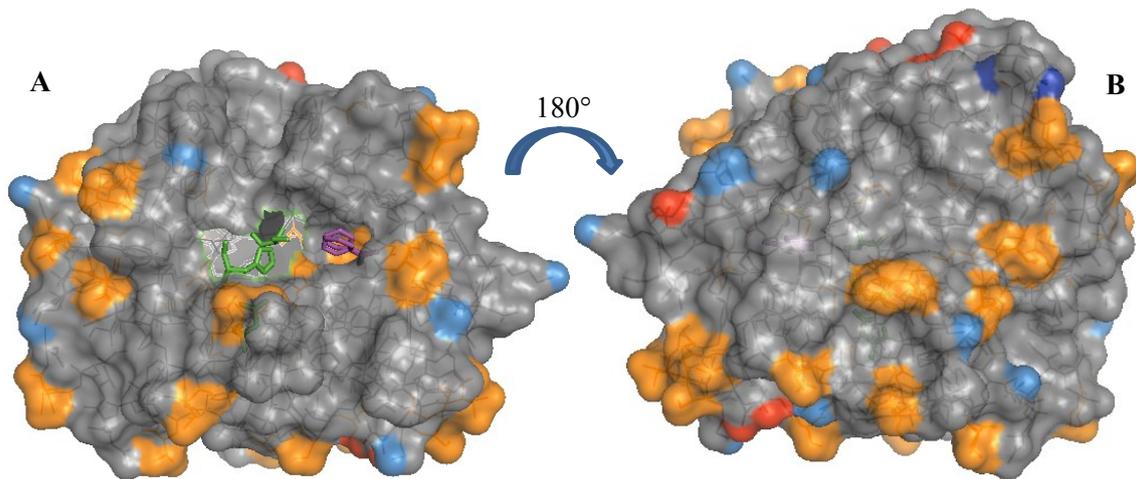
**Tab. 3.3.1:** Zusammenfassung der IC<sub>50</sub>-Werte der Wirksamen Polymere.

Polymer	Bausteine	Verhältnisse	IC <sub>50</sub> -Werte	Pol./Enz.
		[eq]	[μM]	
PGBP	BP	1	3.2	1:1.6
PG34	BP/Bor	4:1	0.6	1:0.3
PGKW11.2	BP/NTA/Glu/Dan	3:1:1	1.0	1:0.5
PGKW11.2+Ni	BP/NTA/Glu/Dan	3:1:1	1.6	1:0.8

Ausgehend von diesen ersten Ergebnissen ergaben sich eine Vielzahl von Fragen, die systematisch durch weiterführende Versuche erklärt werden sollten.

Die relativ schlechte inhibitorische Wirksamkeit des BP-Homopolymers PGBP könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich die geladenen Haftgruppen gegenseitig abstoßen, was dazu führt, dass sich das Polymer räumlich vororientiert und aus entropischer Sicht wesentlich schlechter an eine Proteinoberfläche bindet als BP -reiche Copolymere. Gefestigt werden könnte die These durch Versuche mit Spacer-modifizierten BP-Homopolymeren (**18** und **19**). Diese sollten aufgrund der Spacer-Funktionen die Flexibilität der Haftgruppen erhöhen und somit die von ihnen induzierte Polymervorprägung minimieren, was sich durch eine bessere Hemmwirkung bestätigen lies. Allerdings würde ein solches Homopolymer, aufgrund der nun enthaltenen Spacer-Einheiten eine wesentlich schlechtere Löslichkeit aufweisen was einen direkten Vergleich verhindert.

Ebenso könnte die gute Hemmwirkung des Polymers PG34 dadurch erklärt werden, dass der Boronsäure-Baustein **13** als Polymerrückgrat-Spacer fungiert und somit die Polymerflexibilität erhöht. Einen weiteren Erklärungsansatz liefert die Kristallstruktur des Enzyms (Abb. 3.3.21). Neben der hohen Anzahl an Lysinresten zeichnet sich das Enzym durch eine Vielzahl von Serinresten aus. Bei genauer Betrachtung des sequenziellen Aufbaus fällt auf, dass Serin den Hauptbestandteil der Hydrolase bildet (15 %, 34 Serinreste).<sup>[176]</sup> Dementsprechend könnte der Boronsäure-Baustein **13** an benachbarte Serinreste binden, was das vorhandene BP-Bindungsmotiv kooperativ verstärkt und so die erheblichen verbesserte Hemmwirkung erklären würde. Aufgrund mangelnder Wasserlöslichkeit des Bor-Bausteins **13** konnte ein Kontrollversuch mit einem Bor-Homopolymer unter physiologischen Bedingungen nicht verwirklicht werden.



**Abb. 3.3.21:** Kristallstruktur von Trypsin.<sup>[176]</sup> Rote Flächen stellen Carboxylat-Gruppen der sauren Aminosäuren (Asp, Glu) dar. Hellblaue Flächen symbolisieren Lysine, blaue Flächen Arginine. Die grünen Aminosäuren stellen die katalytische Triade dar. Orange Flächen symbolisieren Serinreste. Das violette Molekül stellt einen Hemmstoff dar, welcher am aktiven Zentrum bindet.

Weitaus schwieriger zu erklären war die gute inhibitorische Wirksamkeit des Polymers PGKW11.2. Die verbesserte Hemmung könnte dadurch erläutert werden, dass das Copolymer aufgrund der anderen enthaltenen Bausteine (Glu, Dan und NTA) eine erhöhte Polymerflexibilität erfährt. Entgegen der Theorie, dass die Hemmung lediglich durch das BP-Bindungsmotiv hervorgerufen wird, sollte der  $IC_{50}$ -Wert durch die Anwesenheit von  $Ni^{2+}$ -Ionen eher einen positiven inhibitorischen Effekt haben. Dies könnte zum einen dadurch erklärt werden, dass aufgrund der geringen Anzahl von Histidinresten das NTA-typische Bindungsmotiv nicht ausgebildet werden kann. Ferner könnten die Komplexierung der  $Ni^{2+}$ -Ionen durch den NTA-Baustein zu einer Präorganisation des Polymers führen, was dieses aus entropischer Sicht einschränkt. Zum andern könnte der NTA-Baustein in Abwesenheit von  $Ni^{2+}$ -Ionen ein neues Bindungsmotiv ausbilden.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde eine Vielzahl von weiteren Polymeren dargestellt, welche die aufgestellten Thesen bekräftigten. So wurde beispielsweise im Rahmen von *Stratmanns* Bachelorarbeit die inhibitorische Wirksamkeit von Polymeren auf Basis des NTA- und des BP-Bausteins in Abhängigkeit der jeweiligen Bausteinkonzentration untersucht.<sup>[141]</sup> Ferner wurde erstmals die Hemmwirkung von Spacer-versetzten BP-Bausteinen (**18** und **19**) untersucht.

Bei dem Screening der dargestellten Polymere (IS1 - IS9) zeigten diese eine inhibitorische Wirksamkeit gegenüber Trypsin (Abb. 3.3.22), jedoch konnte dieser Effekt lediglich in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen verzeichnet werden (Abb. 3.3.23).

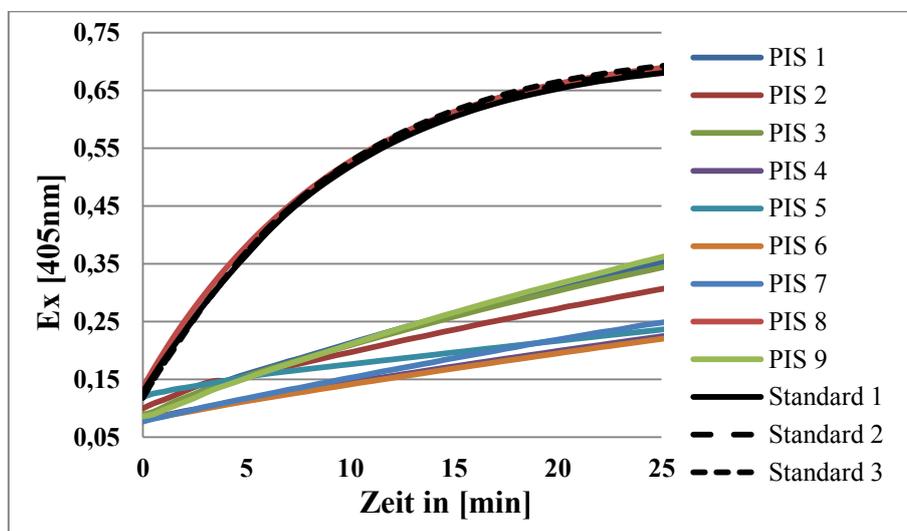


Abb. 3.3.22: Screening der Polymere IS1 - IS9 in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen.<sup>[141]</sup>

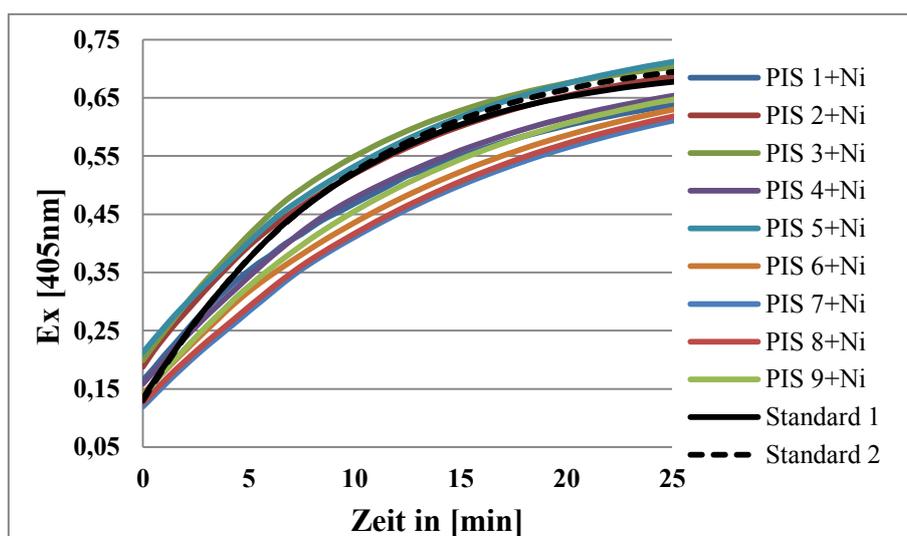


Abb. 3.3.23: Screening der Polymere IS1 - IS9 in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen.<sup>[141]</sup>

$\text{IC}_{50}$ -Messungen zeigten eine besonders gute Hemmung von Trypsin durch das erstmals synthetisierte NTA-Homopolymer IS1. Da die Hemmung in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen sowie des BP-Bausteins **1** erfolgte, wird die These bekräftigt, dass es sich um ein neues Bindungsmotiv handeln könnte. Ferner konnte *Stratmann* zeigen, dass der Einbau von Spacer-modifizierten BP-Bausteinen eventuell zu einer Erhöhung der Polymerflexibilität führen könnte. Diese hatte jedoch nahezu keine Auswirkung auf Hemmungsverhalten der Polymere. Tabelle 3.2.2 fasst die dargestellten Polymere sowie deren ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte zusammen.

Ferner ist der Tabelle zu entnehmen, dass mit absteigender NTA-Konzentration die Hemmwirkung des jeweiligen Copolymers abnimmt.

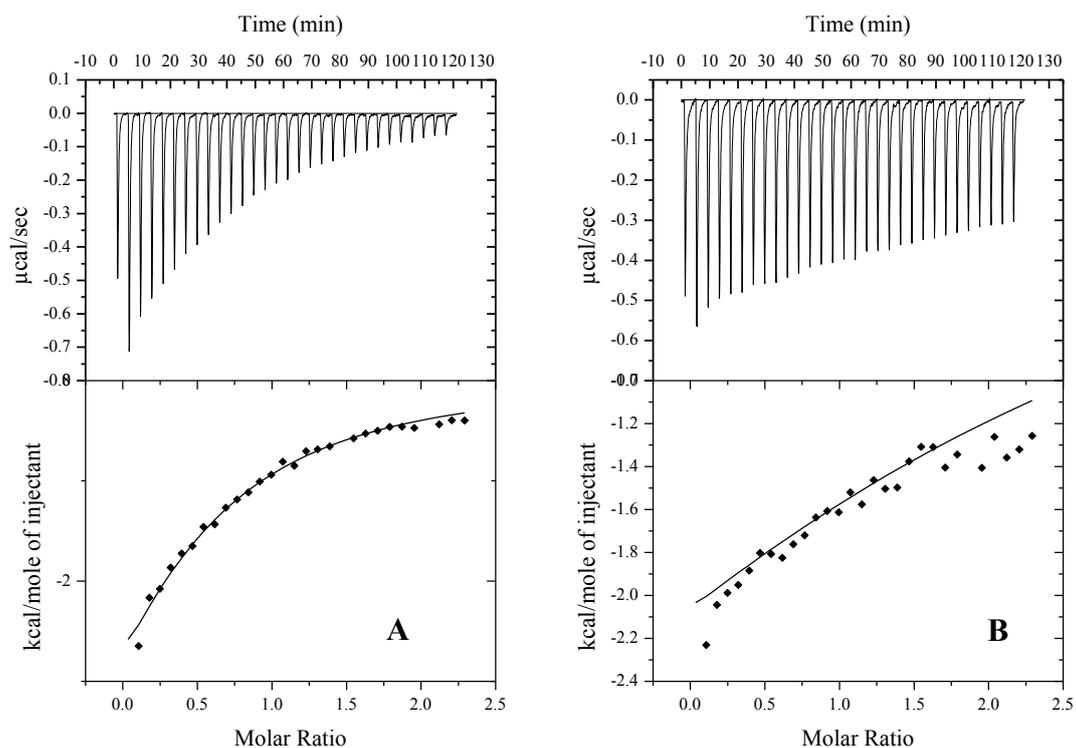
**Tab. 3.3.2:** Zusammenfassung der von *Stratmann* synthetisierten Polymere sowie die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte.

Polymer	Bausteine	Verhältnisse	IC <sub>50</sub> -Werte	Enz./Pol.
		[eq]	[μM]	
IS1	NTA	1	0.51	1:1.0
IS2	NTA/BP/Glu	3:1:1	0.89	1:1.8
IS3	NTA/BP/Glu	2:2:1	0.89	1:1.8
IS4	NTA/BP/Glu	1:3:1	1.42	1:2.9
IS5	NTA/BP/Glu/Dan	1:3:1:1	1.8	1:3.6
IS6	NTA/BP/C <sub>5</sub> -BP/Glu	1:1.5:1.5:1	1.7	1:3.4
IS7	NTA/BP/C <sub>6</sub> -BP/Glu	1:1.5:1.5:1	1.5	1:3.0
IS8	NTA/ C <sub>5</sub> -BP/Glu	1:3:1	1.5	1:3.0
IS9	NTA/ C <sub>6</sub> -BP/Glu	1:3:1	1.5	1:3.0

Die zusammengefassten Ergebnisse bestätigen die These, dass es sich bei der NTA verursachte Hemmung um ein neues Bindungsmotiv handeln könnte. Da es sich bei dem Baustein um ein dreifach negativ geladenes Molekül handelt und Trypsin ein basisches Enzym darstellt, kann es sich lediglich um eine Lysin- bzw. Arginin-Erkennung handeln. Basierend auf vorherigen Studien welche verifizierten, dass es sich bei dem BP-Baustein um eine starke Arginin- und eine schwache Lysin-Erkennungseinheit handelt lag der Schluss nahe, dass die NTA-Baustein verursachten Hemmung auf einer Lysin-Erkennung beruht. Verstärkt wird die Aussage durch den direkten Vergleich der Polymere IS2, IS4 und IS9. Ein direkter Vergleich der Polymer IS2 und IS4 zeigte, dass dem NTA -reicheren Polymer IS2 eine höhere Hemmwirkung zugeordnet werden kann. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass der NTA-Baustein aufgrund einer höheren Flexibilität besser an Oberflächen befindliche Arginine binden könnte. Laut dieser Theorie müsste das Spacer-modifizierte Polymer IS9 eine ähnlich gute Hemmwirkung zeigen wie das Polymer IS2, was jedoch nicht der Fall ist.

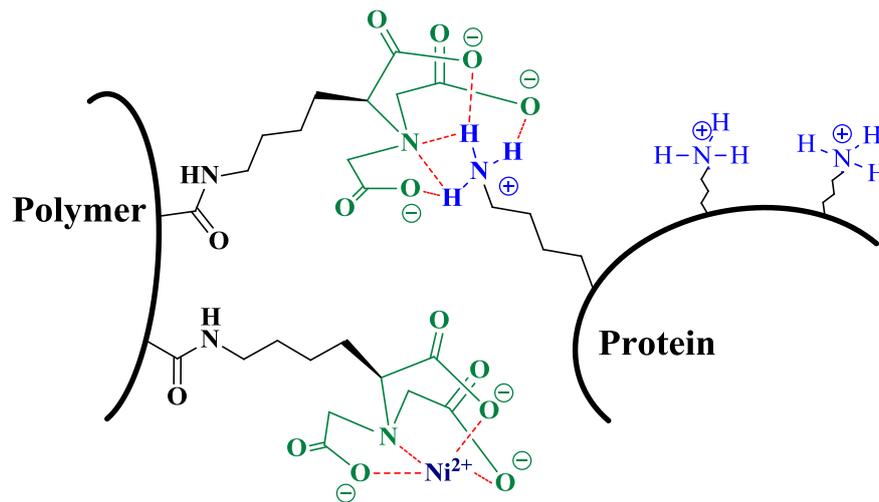
ITC-Messungen sollten zudem die Proteinaffinität bzw. das Komplexierungsverhalten der wirksamen Polymere untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die BP- und NTA-Homopolymere verwendet. Als Referenz fungierten die jeweiligen Monomere. Bei den durchgeführten Messungen konnte allerdings keine Komplexierung vom BP-Monomer **1** wie

auch vom Homopolymer PGBP mittels ITC nachgewiesen werden. Hingegen bestätigten Titrationsversuche mit dem NTA-Homopolymer IS1 eine Protein-Polymer-Komplexierung. Um den Polymeren eine eindeutige Proteinaffinität als multivalente Erkennungseinheit zuordnen zu können, wurden einige systematische Titrationsversuche durchgeführt. Ausgehend von Messungen mit dem einzelnen NTA-Baustein zeigten diese lediglich ein sehr schwaches Komplexierungsverhalten, was darauf zurückgeführt werden könnte, dass das verwendete „Monomer“ zu ca. 20-30 % polymerisiert vorlag. Dementsprechend zeigte das NTA-Homopolymer bei gleicher Bausteinkonzentration ein wesentlich stärkeres Komplexierungsverhalten. Die Messergebnisse zeigten zum einen die Proteinaffinität des Polymers, zum anderen bestätigten sie das multivalente Bindungsprinzip der Polymere. Weiterhin zeigte eine Messung mit dem NTA-Homopolymer in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen (50 % bezogen auf NTA-Baustein) eine wesentlich schlechtere Komplexierung (Abb.3.3.24).



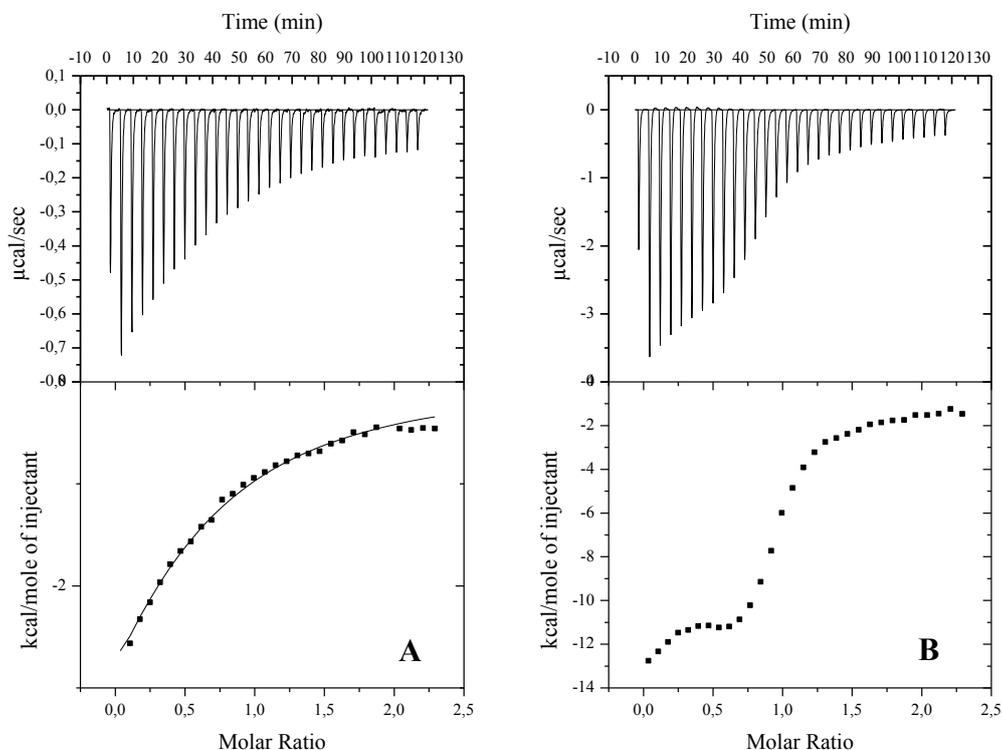
**Abb. 3.3.24:** ITC-Titration des NTA-Homopolymers IS1 gegen Trypsin (A). ITC-Titration des NTA-Homopolymers IS1 in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen gegen Trypsin (B).

Dieses Ergebnis bestätigte die These, dass der NTA-Baustein in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen ein neues Bindungsmotiv ausübt, welches durch Komplexierung der  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen nicht erfolgen kann. Abbildung 3.3.25 symbolisiert ein mögliches Erkennungsmotiv.



**Abb. 3.3.25:** Mögliches Erkennungsmotiv des NTA-Bausteins. Der Baustein komplexiert Ammonium-Ionen in Form von Lysinresten, jedoch lediglich in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen.

Da die angesprochene mögliche Lysin-Komplexierung lediglich in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen erfolgen kann liegt es nahe, dass der gebildete Metall-Komplex stabiler ist. Zur Überprüfung dieser These wurde eine Verdrängungstitration durchgeführt. Bei dieser Messung wurde zuerst der gesättigte Polymer-Enzym-Komplex gebildet, welcher anschließend gegen eine  $\text{Ni}^{2+}$ -Lösung titriert wurde (Abb. 3.3.26).



**Abb. 3.3.26:** ITC-Titration des NTA-Homopolymers IS1 gegen Trypsin (A). ITC-Titration einer  $\text{Ni}^{2+}$ -Lösung gegen den gebildeten Polymer-Trypsin-Komplex (B).

Das dahinter stehende Motiv war die Verdrängung des Protein-Polymer-Komplexes durch Ausbildung des vermeintlich stärkeren Metallkomplexes. Die Messung bekräftigte die aufgestellte Hypothese, dass die Protein-Komplexierung mittels des NTA-Homolymers lediglich in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen erfolgen kann. Ferner ist der Auswertung der Titration (Abb. 3.3.26 B) zu entnehmen, dass zuerst das überschüssige Polymer komplexiert wird, gefolgt von dem Protein-gebundenen Polymer. Eine mögliche Metall-Protein-Komplexierung, konnte durch eine Kontrollmessung der  $\text{Ni}^{2+}$ -Lösung gegen Trypsin ausgeschlossen werden.

Die ITC-Messungen bestätigten den Trend der vorher durchgeführten Enzym Assays. Allerdings ist die Auswertung der Parameter mit einem hohen Fehler verbunden, da die Konzentration der verwendeten Polymer-Lösungen auf den enthaltenen NTA-Baustein bezogen wurden. Angesichts der durchschnittlichen molaren Masse des Polymers (112 000 g/mol), war es nicht möglich eine 1 mM-Lösung zu erstellen. Aus diesem Grund fungieren die durchgeführten Messungen vielmehr zur Bestätigung der Enzyminhibierung durch eine Polymer-Enzym-Komplexbildung.

Weiterhin von großem Interesse war die Untersuchung des vorliegenden Hemmmechanismus. Ausgehend von Studien von *de Groot* und *Kirsch* konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Polymer-verursachten Trypsinhemmung um eine „slow-binding inhibition“ handelt. Dies bedeutet, dass sich das Enzym-Hemmstoff-Gleichgewicht erst innerhalb von Sekunden bzw. Minuten einstellt.<sup>[177]</sup> Als Folge dessen ist die Hemmwirkung abhängig von der Inkubationszeit. Dieses Ergebnis konnte durch eine Kontrollmessung bei Polymer PG34 bestätigt werden (Abb. 3.3.27).

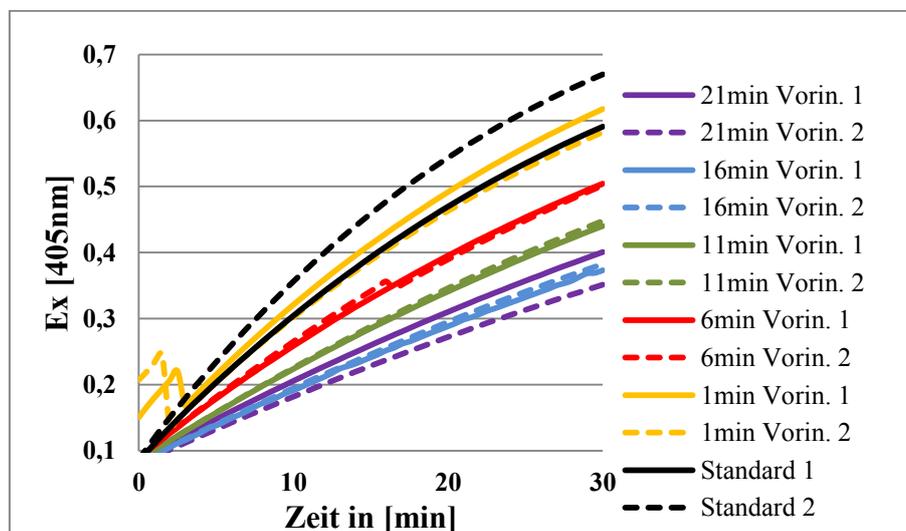


Abb. 3.3.27: Trypsinhemmung von Polymer PG34 (5 mg/mL) in Abhängigkeit der Inkubationszeit.

Bei der Messung wurde eine Polymerkonzentration gewählt (5 mg/mL), welche ungefähr der  $IC_{50}$ -Konzentration entspricht. Wie aus dem Graph ersichtlich ist, zeigt das Polymer, welches unmittelbar nachdem es zum Enzym gegeben wurde (1min) nahezu keine Inhibition. Hingegen liegt der Grenzwert der Inkubationszeit, bei der das Polymer seine maximale Hemmwirkung erreicht bei 16 min.

Eine Lineweaver-Burk-Auftragung sollte darüber hinaus Auskunft geben, ob es sich bei der Polymer verursachten Inhibition um eine kompetitive bzw. nichtkompetitive Hemmung handelt.

Bei den substratkonzentrationsabhängigen Messungen diene das von *Wenck* dargestellte Polymer 3 als Trypsinhemmstoff.<sup>[122]</sup> Die verwendeten Polymerkonzentrationen variierten um Faktor zwei. Durch doppelt reziproke Auftragung der Enzymreaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration konnte der folgende Graph erhalten werden (Abb. 3.3.28).

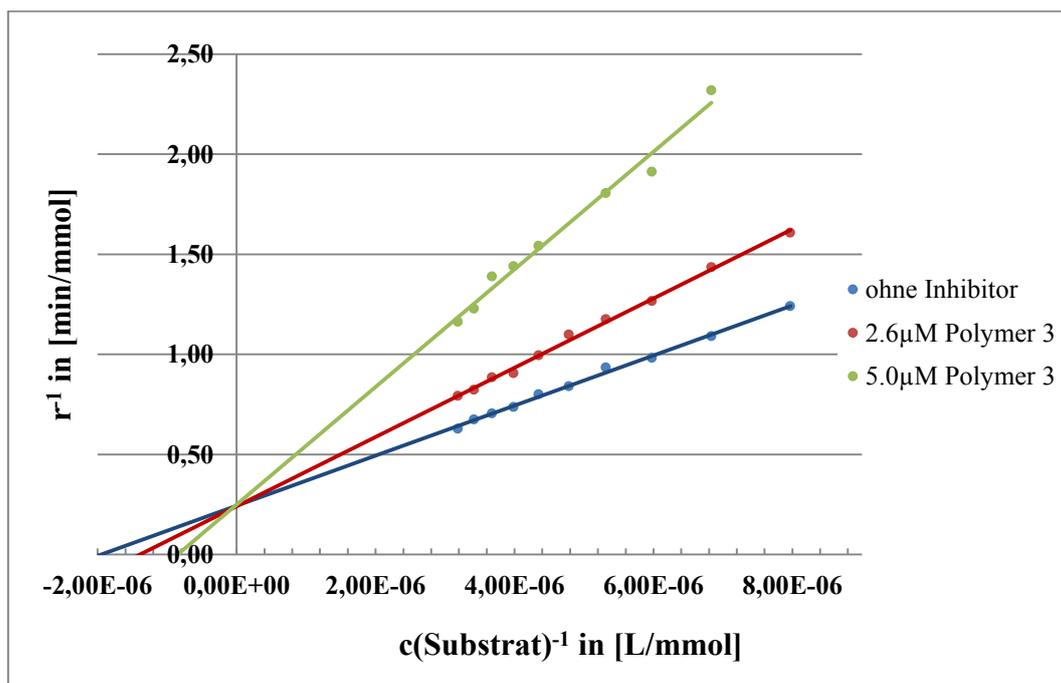


Abb. 3.3.28: Lineweaver-Burk-Darstellung bei unterschiedlichen Konzentrationen von Polymer 3.

Aus der Auftragung ist ersichtlich, dass es sich um eine kompetitive Hemmung handelt was bedeutet, dass der Inhibitor reversibel an die Substratbindungsstelle bindet (aktives Zentrum).

Weiterhin wurden  $IC_{50}$ -Werte von NTA-, BP-, und Bor-haltigen Polymeren (PG47 und PG49) bestimmt, die den vorhandenen Trend der Trypsin-Inhibierung bestätigen.

### 3.3.2.4 Carboxypeptidase A

Bei Carboxypeptidase A (CPA) handelt es sich um eine Metalloprotease welche in zymogener Form im Pankreas gebildet wird. Die Aktivierung des Verdauungshydrolyse erfolgt durch proteolytische Spaltung im Doudenum. Analog zu den Serin-Proteasen fungiert Trypsin als Aktivator.<sup>[178]</sup>

CPA hat ein Molekulargewicht von 34.5 kDa und besteht aus einer Kette von 307 Aminosäuren.<sup>[179, 180]</sup> Die Hydrolase besitzt einen isoelektrischen Punkt von 6.0 und ein pH-Optimum von 7.5.<sup>[181, 182]</sup> Die Substratspezifität der Zinkprotease beschränkt sich sowohl auf aromatische Aminosäuren, wie Phenylalanin und Tryptophan, als auch auf Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten wie Leucin.<sup>[183]</sup> Der Katalysemechanismus des Enzyms, welcher zum Substratabbau führt, ist in Abbildung 3.3.29 beschrieben.

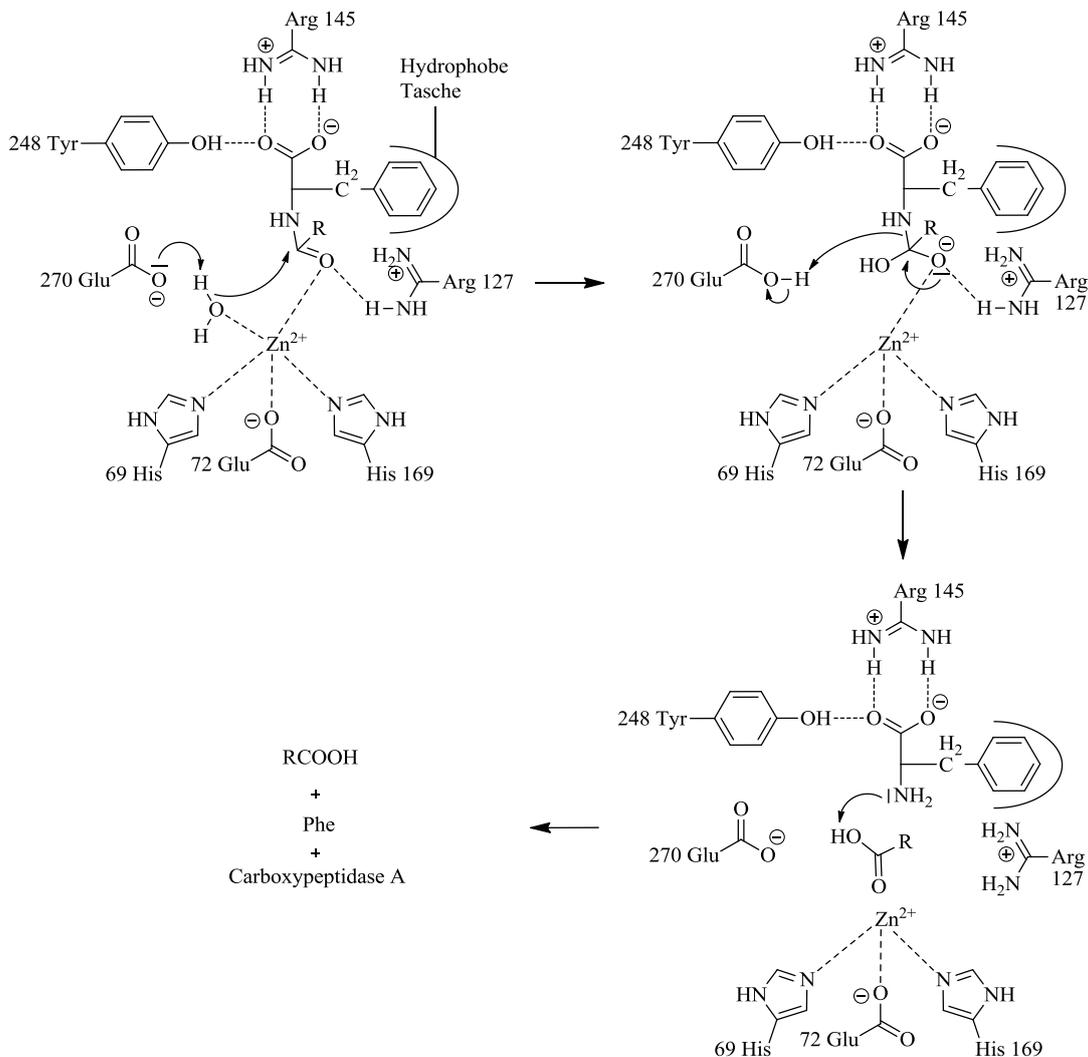
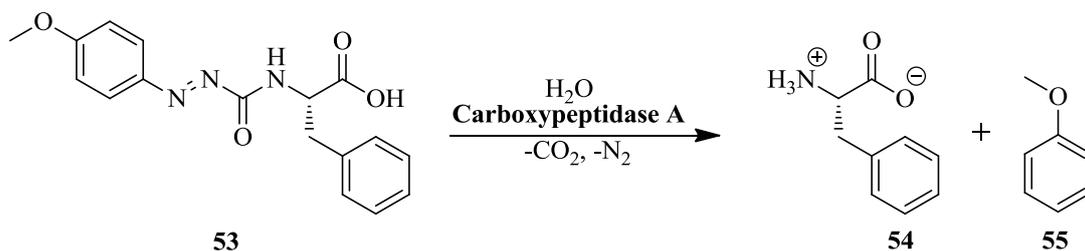


Abb. 3.3.29: Katalysemechanismus von Carboxypeptidase A.<sup>[179]</sup>

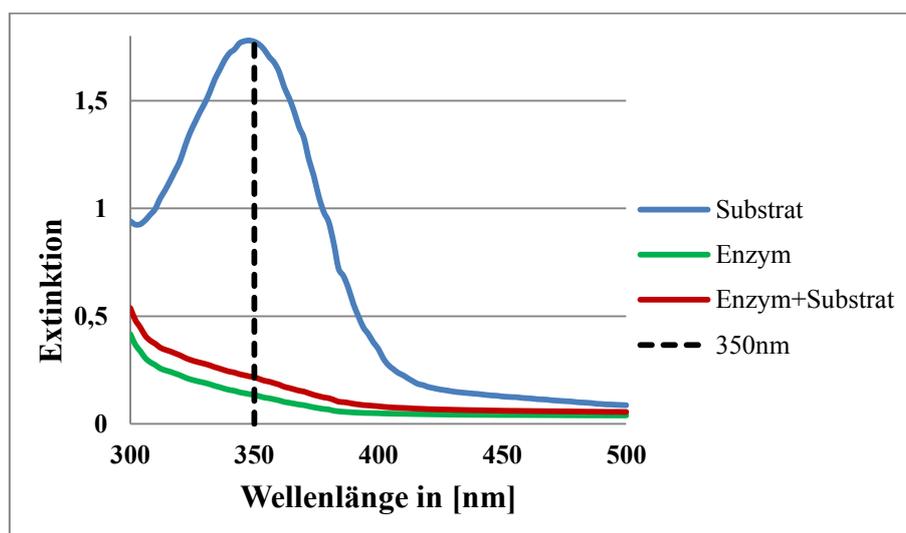
Der Reaktionsmechanismus des enzymatischen Substratabbaus verläuft ähnlich zu dem der Serinproteasen. In diesem Fall fungiert Zink als Lewis-Säure, welche ein Wasser-Molekül aktiviert. Nach anschließender Deprotonierung durch den Glutaminsäurerest (Glu 270) erfolgt ein nukleophiler Angriff an den Carbonyl-Kohlenstoff der Peptidbindung, welcher den Substratabbau zur Folge hat.

Der in dieser Arbeit durchgeführte Enzym-Assay beruht auf der Substratspezifität der Hydrolase. Alternativ zu vorherigen Messungen dient das Substrat **53** selbst als Chromophor, welches durch Enzymkatalyse abgebaut wird (Abb. 3.3.30).



**Abb. 3.3.30:** Hydrolytische Spaltung von *N*-(4-methoxyphenylazoformyl)-Phe-OH **53** unter Freisetzung von Phe **54** und Methoxyphenyl **55**.<sup>[183]</sup>

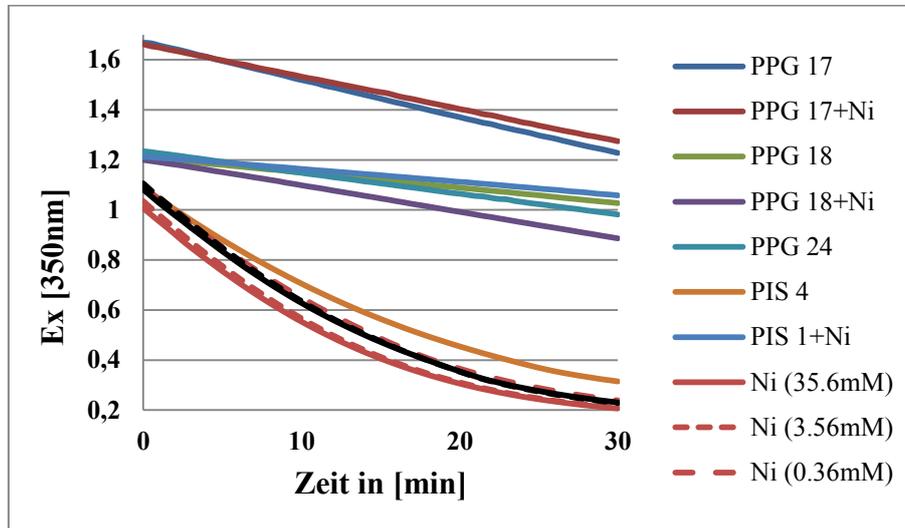
Die Messung wurde bei einem pH-Wert von ca. 8 (pH-Optimum = 7.5) und einer Wellenlänge von 350 nm durchgeführt. Das Absorptionsübersichtsspektrum (Abb. 3.3.31) zeigt, dass bei der gewählten Wellenlänge das Absorptionsmaximum des Chromophors **53** vorliegt.



**Abb. 3.3.31:** Absorptionsübersichtsspektrum der im Carboxypeptidase A Assay verwendeten Komponenten.

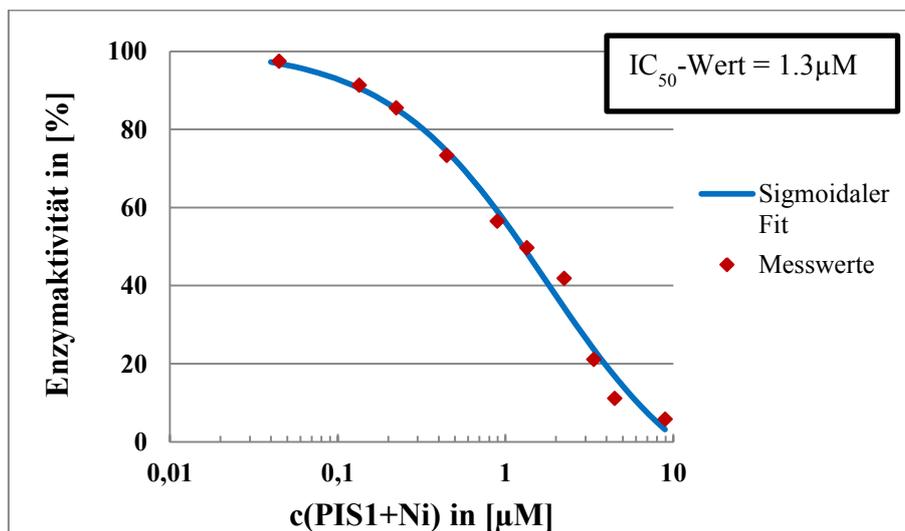
Die Kontrollmessung wurde mit einem Hemmstoff, durchgeführt, welcher dem Assay Kit als Referenz beilag.<sup>[184]</sup>

Bei dem Screening der Polymere konnte den vier Polymeren PG17, PG18, PG24 und IS1 eine inhibitorische Wirksamkeit zugeordnet werden. Ferner wurden Kontrollmessungen mit reiner  $\text{Ni}^{2+}$ -Lösung durchgeführt, jedoch zeigte die Metall-Lösung keine Hemmwirkung gegenüber der Hydrolase (Abb. 3.3.32).



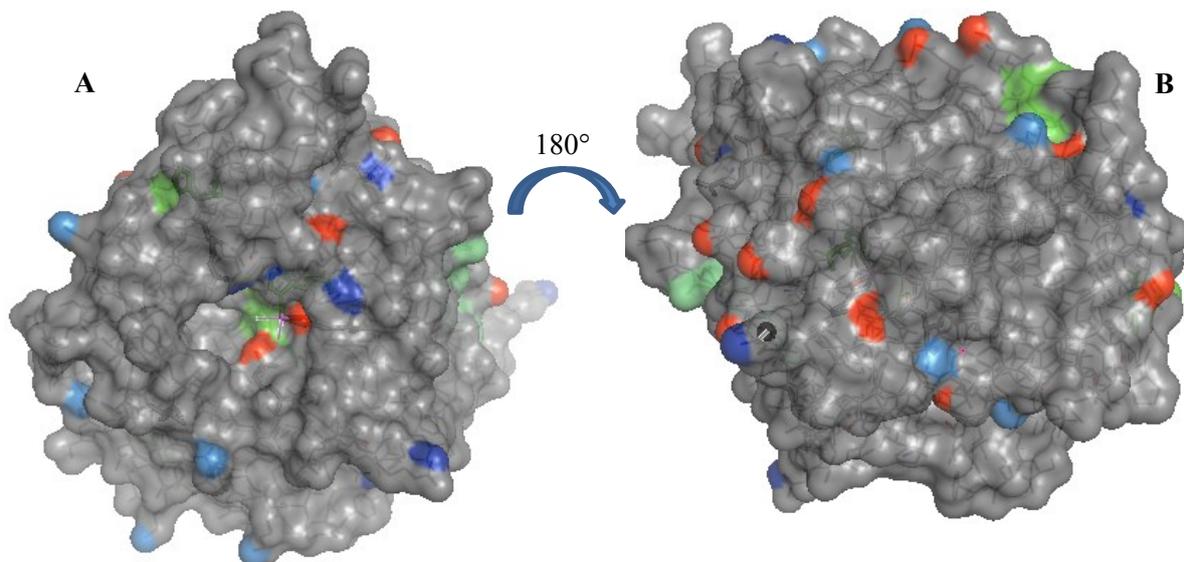
**Abb. 3.3.32:** Screening der wirksamen Polymere sowie  $\text{Ni}^{2+}$ -Lsg. und Polymer IS4 als Referenz.

Als wirksamstes Polymer zeichnete sich das Polymer IS1 in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen aus ( $\text{IC}_{50}$ -Wert =  $1.3 \mu\text{M}$ ). Hingegen zeigte das Polymer alternativ zu Trypsin in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen keine Hemmwirkung.



**Abb. 3.3.33:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PIS1+Ni.

Da das Enzym nahezu „neutral“ vorliegt (11 Arg, 15 Lys, 13 Glu und 16 Asp)<sup>[185]</sup> könnten theoretisch BP- und NTA -reiche Polymere wie auch CBS- und BA -reiche Polymere eine inhibitorische Wirksamkeit erreichen. Wie aus dem Screening ersichtlich ist, konnte jedoch lediglich für NTA -reiche Polymere eine inhibitorische Wirksamkeit verzeichnet werden.



**Abb. 3.3.34:** Kristallstruktur von Carboxypeptidase A.<sup>[185]</sup> Rote Flächen stellen Carboxylat-Gruppen der sauren Aminosäuren (Asp, Glu) dar. Hellblaue Flächen symbolisieren Lysine, blaue Flächen Arginine. Grüne Flächen symbolisieren Histidine. Die türkise Flächen zeigt zwei benachbarte Histidine. Das violette Molekül stellt einen Hemmstoff dar, welcher am aktiven Zentrum bindet.

Die Kristallstruktur des Enzyms (Abb. 3.3.34) kann nur bedingt die Hemmwirkung der NTA-reichen Polymere erklären. Theoretisch könnte der NTA-Baustein an die lysinreiche Proteindomäne, an welcher sich das aktive Zentrum (A) befindet, binden und so eine Hemmwirkung verursachen. Additiv könnte diese Bindung durch einen „Histidin-Tag“ an der Proteinoberfläche (türkise Fläche) gestärkt werden. Weiterhin könnte die Polymer verursachte Hemmung durch eine  $Zn^{2+}$ -NTA-Interaktion begründet werden. Jedoch erklärt dies nicht, warum lediglich den Polymeren PG17, PG18, PG24 und IS1 eine inhibitorische Wirksamkeit zugeordnet werden kann, die Inhibition bei den NTA-reichen Polymeren PG49 und PGKW11.2 jedoch nicht beobachtet wurde. Ferner kann durch die Kristallstruktur nicht erklärt werden, weshalb Polymer IS1 lediglich in Gegenwart von  $Ni^{2+}$ -Ionen eine Hemmung verursacht, wogegen Polymer PG24 nur in Abwesenheit der Metall-Ionen als Hemmstoff fungiert. Auffällig ist außerdem das die Polymere PG17, PG18 und PG24 den NTA-Glu-Baustein **15** enthalten, welcher beispielsweise bei der Trypsinhemmung keine Wirksamkeit zeigte.

Eine Komplexierung von CBS- und BA-haltigen Polymeren wäre aufgrund der Carboxylat-reichen Proteindomäne (B) denkbar. Jedoch würde die Erkennung keinen Einfluss auf die Enzymaktivität haben, sofern die Enzymkonformation als Folge der Komplexierung erhalten bleibt.

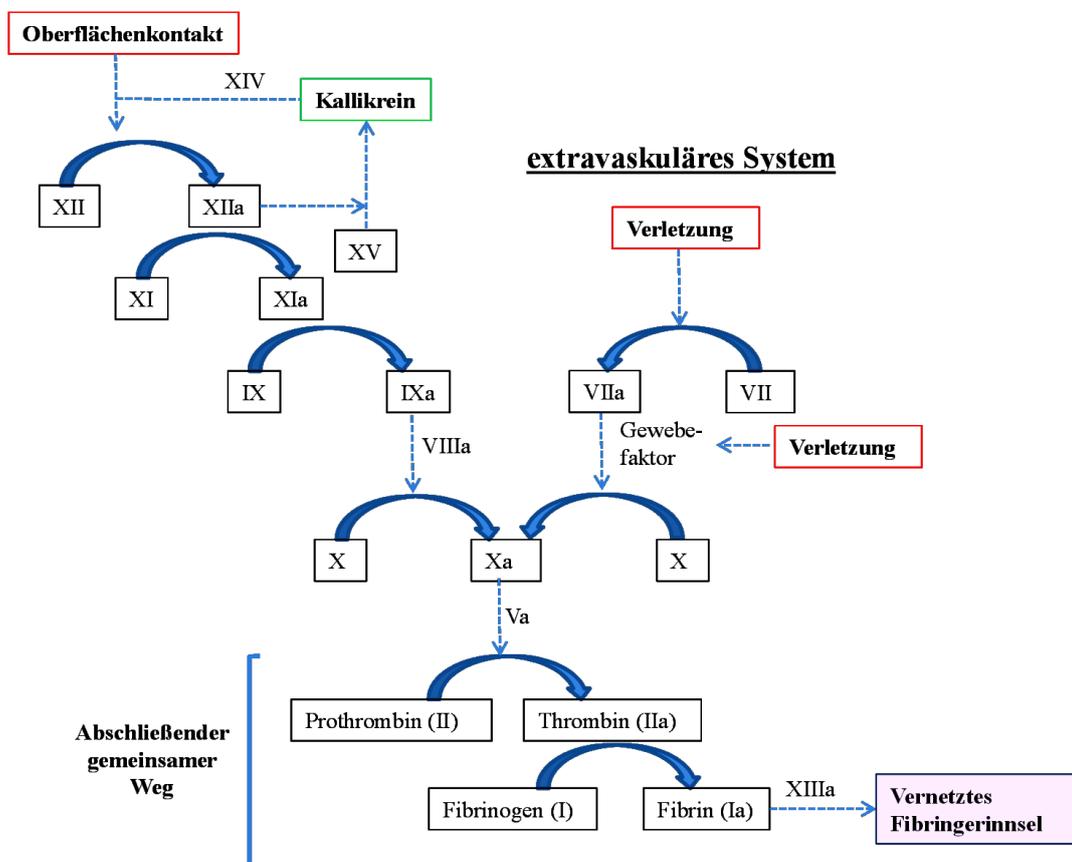
### 3.3.2.5 Kallikrein

Kallikreine gehören zur Familie der Serinproteasen. Die Hydrolase spielt bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen, wie beispielsweise der Blutgerinnung, eine fundamentale Rolle.<sup>[100, 186]</sup>

Das zymogene Präkallikrein wird in den Hepatozyten der Leber gebildet. Die Aktivierung des Enzyms kann zum einen durch Trypsin erfolgen, zum anderen durch Faktor XII (Hageman-Faktor). Bei diesem Vorgang wird das 86 kDa (619 Aminosäuren) schwere Zymogen gespalten (Arg 371-Ile 372), was zur Bildung zweier Ketten führt, welche über eine Disulfidbrücke zusammengehalten werden. Die leichtere Kette (248 Aminosäuren, 33 kDa) beinhaltet das aktive Zentrum des Enzyms.<sup>[187]</sup> Der Substratabbau erfolgt hierbei durch die Serin-Protease typische Kaskade (Ser, Asp und His).<sup>[188]</sup>

Plasma-Kallikrein führt zur Umwandlung von hochmolekularen Kinogen (Fitzgerald-Faktor, Faktor-XIV) zu Kinin innerhalb der Blutgerinnungskaskade (Abb. 3.3.35).

#### intravaskuläres System



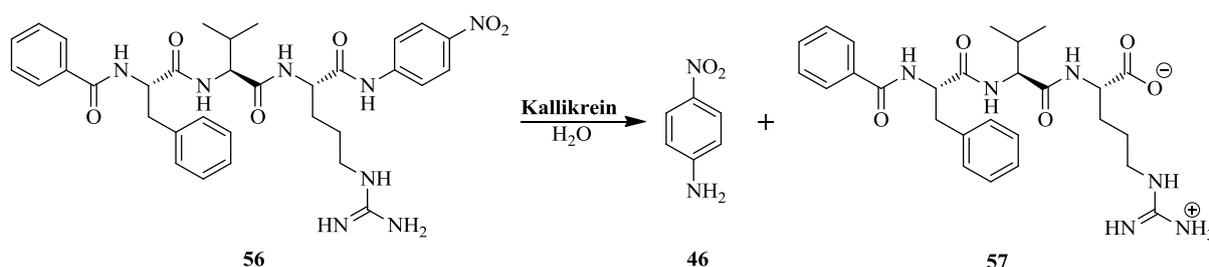
**Abb. 3.3.35:** Schematische Darstellung der Blutgerinnungskaskade. „a“ stellt die aktive Form eines Gerinnungsfaktors dar.<sup>[100, 186]</sup>

Weiterhin von hoher biologischer Relevanz ist das Gewebe-Kinin-Kallikrein-System. In diesem fungiert Gewebe-Kallikrein mittels Peptidspaltung zur Bildung der Kinine (Gewebshormone) wie beispielsweise Bradykinin und Kallidin. Diese sind von ubiquitärer Bedeutung bei entzündlichen Prozessen, bei welchen ihnen eine gefäßerweiternde und Blutdrucksenkende Wirksamkeit zugesprochen werden kann.<sup>[189, 190]</sup>

Die vorzeitige Aktivierung von Trypsin innerhalb der Bauchspeicheldrüse (Pankreatitis) führt zur Bildung von Kallikrein. Als Folge dessen kommt es im Rahmen des Kinin-Kallikrein-Systems zur Bildung von Kininen, welche ihrerseits zu Schmerzen und Schockzuständen führen können.<sup>[191, 192]</sup>

Kallikrein besitzt einen isoelektrischen Punkt von ca. 4.0 - 4.5 bei einem pH-Optimum von 7 - 8.<sup>[193, 194]</sup>

Bei dem durchgeführten Assay fungierte Bz-Phe-Val-Arg-pNA als künstliches Substrat **56**, welches nach dem enzymatischen Abbau das Chromophor *p*-Nitroanilin **46** bildet.



**Abb. 3.3.36:** Hydrolytische Spaltung von Bz-Phe-Val-Arg-pNA **56** unter Freisetzung von *p*-Nitroanilin **46**.<sup>[195]</sup>

Die Messung wurde bei einem pH-Wert von 7.8 (pH-Optimum = 7-8) und einer Wellenlänge von 380 nm durchgeführt. Das Absorptionsübersichtsspektrum (Abb. 3.3.37) zeigt, dass bei der gewählten Wellenlänge das Absorptionsmaximum des Chromophors **46** vorliegt. Hingegen zeigt das Enzym bei dieser Wellenlänge nahezu keine Absorption.

Die Funktionalität des Assays wurde mit dem Serin-Protease-Hemmstoff Aprotinin kontrolliert.<sup>[92, 93]</sup>

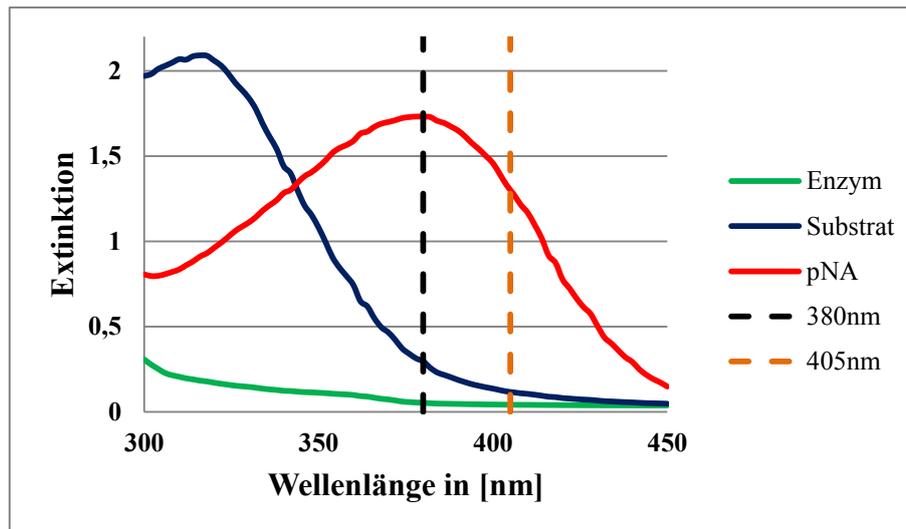


Abb. 3.3.37: Absorptionsübersichtsspektrum der im Kallikrein Assay verwendeten Komponenten.

Da es sich bei Kallikrein um eine saure Serin-Protease handelt, liegt es nahe das CBS- bzw. BA-haltige Polymere eine vielversprechende Option zur Enzymhemmung darstellen. Entgegen dieser Theorie zeigten wiederum lediglich BP- und NTA-haltige Polymere eine inhibitorische Wirksamkeit gegenüber der Hydrolase im Screening. Ferner konnten NTA-reichen Polymeren in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen eine höhere Hemmwirkung im Screening zugeordnet werden. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen als schwacher literaturbekannter Kallikreinhemmstoff fungiert und die Inhibition des jeweiligen Polymers in Anwesenheit dieser additional verstärkt wird.<sup>[196]</sup> Demgegenüber steht jedoch die geringe Metallionenkonzentration (50 % bezogen auf einen im Polymer enthaltenen NTA-Baustein [11, 15]), wodurch keine freien  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen in Lösung vorhanden sein dürften.

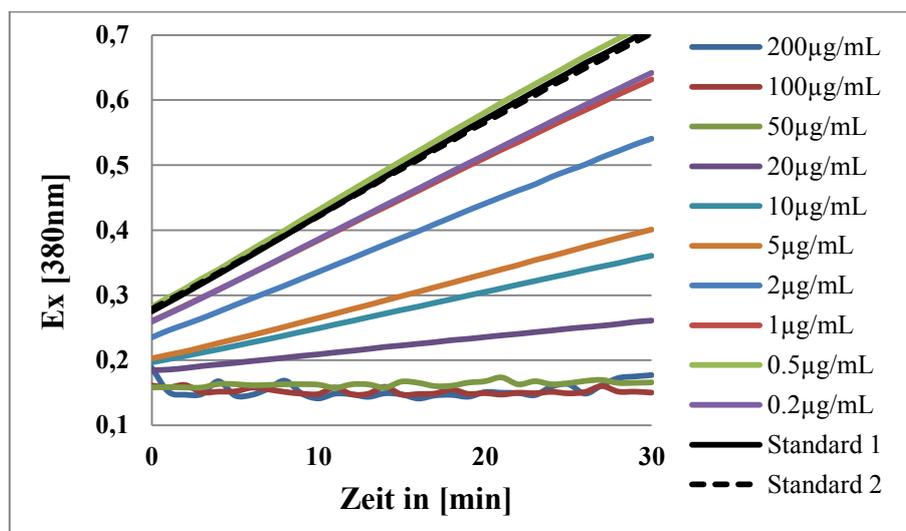


Abb. 3.3.38: Inhibition von Kallikrein in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PPG49. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 200 - 0,2 µg/mL.

Sonderbar war weiterhin, dass bei der Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte die Hemmwirkung des Polymers mit sinkender InhibitorKonzentration bis zu einem Grenzwert anstieg. Aus diesem Grund wurden die üblichen Massenkonzentrationen der Polymere welche zu IC<sub>50</sub>-Bestimmung verwendet wurden (20 mg/mL - 0.5 mg/mL) auf 200 µg/mL - 0.2 µg/mL reduziert (Abb. 3.3.38).

Desweiterm konnten bei diesen Konzentrationen, NTA -reichen Polymeren in Abwesenheit von Ni<sup>2+</sup>-Ionen ein höheres Hemmpotential zugeordnet werden. Weiterhin zeigten positiv getestete Polymere wie PG21, PG22 und PG36+Ni innerhalb dieses Konzentrationsbereiches keine Hemmwirkung gegenüber Kallikrein. Ferner zeigten nahezu alle Trypsin-Hemmstoffe eine positive inhibitorische Wirksamkeit gegenüber Kallikrein (Tab. 3.3.3), obgleich es sich bei dieser um eine saure Hydrolase handelt und bei Trypsin um ein basisches Enzym.

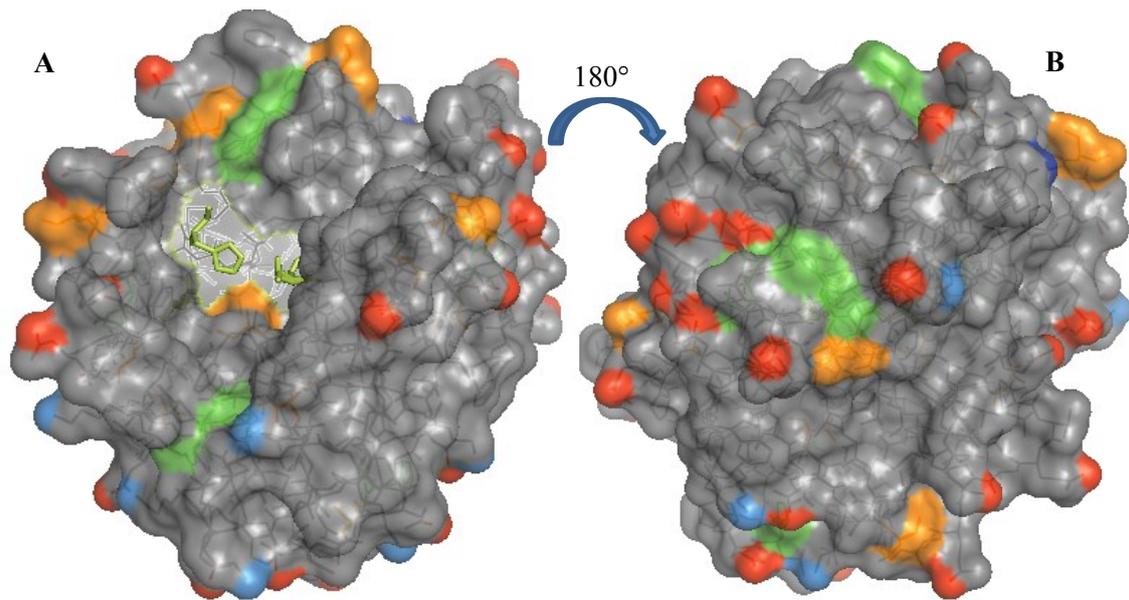
**Tab. 3.3.3:** Zusammenfassung der IC<sub>50</sub>-Werte der Wirksamen Polymere.

Polymer	Bausteine	Verhältnisse	IC <sub>50</sub> -Werte	Enz./Pol.
		[eq]	[nM]	
<b>PG17</b>	BP/NTA-Glu/Glu/Dan	3:1:1:0.5	3.9	136:1
<b>PG17+Ni</b>	BP/NTA-Glu/Glu/Dan	3:1:1:0.5	7.1	75:1
<b>PG18</b>	BP/NTA-Glu/Glu	2:1:1	7.6	70:1
<b>PG18+Ni</b>	BP/NTA-Glu/Glu	2:1:1	9.7	55:1
<b>PG34</b>	BP/Bor	4:1	7.6	70:1
<b>PG47</b>	BP/NTA/Bor	4:1:0.5	3.7	143:1
<b>PG49</b>	BP/Dan	4:1	2.8	189:1
<b>PGBP</b>	BP	1	4.4	120:1
<b>PGKW11.2</b>	BP/NTA/Glu/Dan	3:1:1:0.5	4.6	115:1
<b>PGKW11.2+Ni</b>	BP/NTA/Glu/Dan	3:1:1:0.5	9.2	58:1
<b>PGKW11.3</b>	BP/NTA/Glu	3:1:1	6.2	85:1
<b>IS4</b>	BP/NTA/Glu	3:1:1	6.0	88:1
<b>PGKW12.2</b>	BP/Dod/Glu/Dan	5:1:0.3:0.4	7.7	69:1
<b>IS1</b>	NTA	1	3.3	160:1
<b>IS1+Ni</b>	NTA	1	6.1	87:1
<b>IS2</b>	BP/NTA/Glu	1:3:1	8.9	60:1
<b>IS2+Ni</b>	BP/NTA/Glu	1:3:1	11.5	46:1
<b>IS3</b>	BP/NTA/Glu	2:2:1	6.5	82:1

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, zeigen NTA- und BP-haltige Polymere die stärkste Hemmung. Desweiteren ist erkennbar, dass die Hemmung der NTA -reichen Polymere in Anwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen stark abnimmt. Bemerkenswert ist zudem, dass die Hemmwirkung der strukturanalogen Polymere PGKW11.3 und IS4 nahezu identische  $\text{IC}_{50}$ -Werte vorweisen, was die Reproduzierbarkeit der Polymerisationsmethode einmal mehr bestätigt. Von fundamentaler Bedeutung ist jedoch die Betrachtung der Enzym-Polymer-Stöchiometrie. Aus dieser ist ersichtlich, dass es sich bei der Inhibition um eine substöchiometrische Hemmung handelt.

Für dieses Phänomen gibt es mehrere Erklärungsansätze. Die unwahrscheinlichste Erklärung wäre, dass ein Polymer wie beispielsweise Polymer IS1, welches ungefähr 400 NTA-Bausteine **11** enthält, 160 Enzyme bindet bzw.hemmt. Dies ist jedoch aus sterischer Sicht schier unmöglich. Ein weiterer Ansatz wäre, dass das Polymer sich im Assay zersetzt und die einzelnen Haftgruppen eine Hemmung verursachen, da nun ca. 2.5 NTA-Bausteine mit einem Enzym interagieren könnten. Jedoch ist es relativ unwahrscheinlich, dass die C-C-Bindungen des Polymerrückgrates unter physiologischen Bedingungen aufbrechen. Ferner müsste nach dieser Theorie den Monomer-Bausteinen **1** und **11** bereits eine inhibitorische Wirksamkeit zugesprochen werden können, was allerdings überprüft wurde und nicht der Fall war. Weiterhin denkbar wäre, dass die BP- und NTA -reichen Polymere an das Arginin -reiche Substrat binden könnten und dieses infolgedessen nicht enzymatisch abgebaut werden kann. Fluoreszenz- wie auch ITC-Messungen konnten den Polymeren jedoch keine Substrataffinität zugeordnet werden. Ferner ist eine vollständige Komplexierung des Substrates mittels der Polymere unwahrscheinlich, da dieses innerhalb des Assays im großen Überschuss (23  $\mu\text{M}$ ) vorlag. Die letzte und wahrscheinlichste These ist, dass ein Polymer an die Proteinoberfläche unter Konformationsänderung bzw. Denaturierung an dieses bindet, was einen Substratabbau unterbindet. Überprüft werden könnte diese These mittels CD-Spektroskopie, was eine potentielle Aufgabe für aufbauende Arbeiten darstellt.

Aus der Kristallstruktur des Enzyms können nur bedingt Rückschlüsse auf die Proteinaffinität der wirksamen Polymere geschlossen werden (Abb. 3.3.38).



**Abb. 3.3.38:** Kristallstruktur von Kallikrein.<sup>[197]</sup> Rote Flächen stellen Carboxylat-Gruppen der sauren Aminosäuren (Asp, Glu) dar. Hellblaue Flächen symbolisieren Lysine, blaue Flächen Arginine. Grüne Flächen symbolisieren Histidine. Orange Flächen zeigten Serinreste. Das aktive Zentrum (His, Glu und Ser) ist transparent dargestellt.

Der Kristallstruktur ist zu entnehmen, dass sich unterhalb des aktiven Zentrums eine Lysinreiche Domäne befindet (A), welche eine mögliche Polymer-Protein-Komplexierung erklären könnte. Weiterhin befinden sich in unmittelbarer Umgebung zum aktiven Zentrum zwei benachbarte Histidinreste, die wiederum einen His-NTA-Tag mit einem Polymer ausbilden könnten. Ferner befinden sich einige Serinreste in direkter Nachbarschaft zu katalytischen Triade, durch welche die Hemmung der Bor-haltigen Polymere PG34 und PG47 erläutert würde. Jedoch wäre eine mögliche Enzym-Polymer-Komplexierung durch NTA- und BP-haltige Polymere lediglich auf eine geringe Proteinoberfläche beschränkt, da außerhalb des aktiven Zentrums eine hohe Carboxylatdichte vorliegt (B), welche zur Abstoßung des Polymers führen würde.

### 3.3.2.6 Thrombin

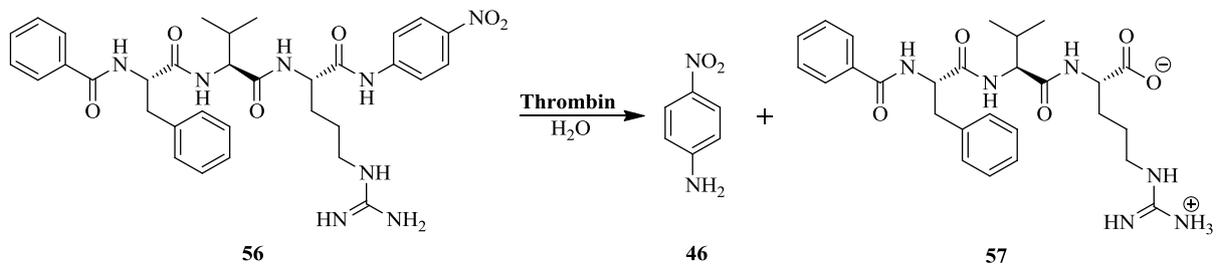
Thrombin stellt eine Serin-Protease dar. Die Hydrolase wird in zymogener Form (Faktor IIa) in der Leber gebildet. Die Aktivierung der Protease erfolgt durch die Gerinnungsfaktoren Xa und Va innerhalb der Blutgerinnungskaskade (Abb. 3.3.35). Das Enzym (Faktor II) führt seinerseits mittels vierfacher Arginin-Glycin-Peptidspaltung zur Aktivierung von Fibrinogen (Faktor I). Die gebildeten Fibrinmomere bilden in Gegenwart von Gerinnungsfaktor VIIIa mit

bereits vorliegenden Thrombozyten ein vernetztes Fibringerinnsel aus, welches zum Wundverschluss (Thrombus) führt. Die Hemmung der Hydrolase erfolgt mittels des körpereigenen Hemmstoffes Antithrombin III, dessen Wirksamkeit durch Anwesenheit von Heparin um ein Vielfaches gestärkt wird. Dieser Vorgang ist von fundamentaler Bedeutung bei der Fibrinolyse, welche zur Auflösung des gebildeten Thrombus führt.<sup>[100, 186]</sup>

Der Substratabbau der Hydrolase erfolgt nach der Serin-Protease-typischen Triade (Ser, Asp und His), hierbei spaltet diese bevorzugt nach Argininen.<sup>[198, 199]</sup> Thrombin hat ein Molekulargewicht von 37 kDa und besteht aus einer leichten (A-Kette, 49 Aminosäuren) und einer schweren Kette (B-Kette, 259 Aminosäuren), welche über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind.<sup>[200]</sup> Das Enzym hat einen isoelektrischen Punkt von 7.15 und ein pH-Optimum im Bereich von 7.5 - 8.5.<sup>[201, 202]</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit sollte jedoch die nahezu neutrale Hydrolase nach Möglichkeit nicht inhibiert werden. Das dahinter stehende Motiv war die Gewährleistung der Wundheilung durch die Serin-Protease bei einem Pankreatitis verursachten Gewebeangriff.

Der in dieser Arbeit durchgeführte Enzym-Assay beruht auf der Substratspezifität der Protease. Das Kallikrein-analoge Reaktionsschema des enzymatischen Substratabbaus ist in Abbildung 3.3.39 zusammengefasst.



**Abb. 3.3.39:** Hydrolytische Spaltung von Bz-Phe-Val-Arg-pNA **56** unter Freisetzung von *p*-Nitroanilin **46**.<sup>[195]</sup>

Die Messung wurde bei einem pH-Wert von 7.5 (pH-Optimum = 7.5 - 8.5) und einer Wellenlänge von 380 nm durchgeführt. Das Absorptionsübersichtsspektrum (Abb. 3.3.40) zeigt, dass bei der gewählten Wellenlänge das Absorptionsmaximum des Chromphors **46** vorliegt. Hingegen zeigt das Enzym bei dieser Wellenlänge nahezu keine Absorption.

Die Funktionalität des Assays wurde mit dem literaturbekannten Hemmstoff Argatroban kontrolliert.<sup>[98, 99]</sup> Ferner konnte ein 9 nM IC<sub>50</sub>-Wert bei einer 14 nM Enzymkonzentration ermittelt werden.

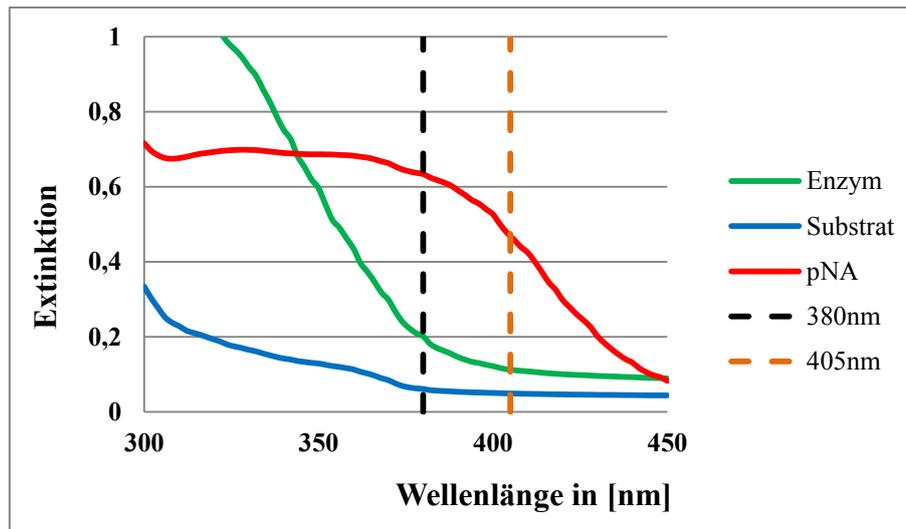


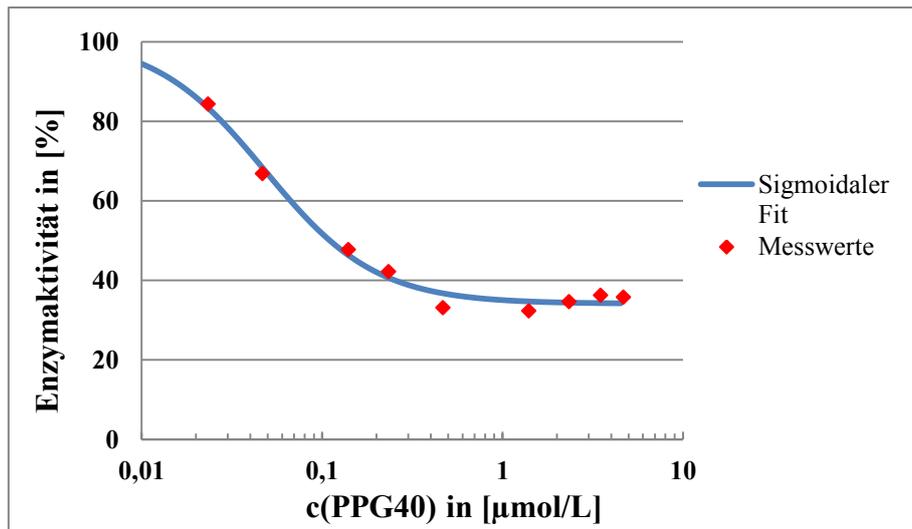
Abb. 3.3.40: Absorptionsübersichtsspektrum der im Thrombin Assay verwendeten Komponenten.

Jedoch konnte den Polymeren PG40, PG47, PG49, PGBP und PGKW12.2 innerhalb des Thrombin-Screenings eine inhibitorische Wirksamkeit zugesprochen werden. Bei genauerer Betrachtung der wirksamen Polymere fiel auf, dass es sich bei diesen mit Ausnahme von Polymer PG40 um sehr BP -reiche Polymere handelt. Entgegen vorheriger Enzymuntersuchungen zeigten NTA (**11** und **15**) -reiche Polymere wie beispielsweise IS1 nahezu keinen Effekt. Die  $IC_{50}$ -Werte der wirksamen Inhibitoren sind in Tabelle 3.3.4 zusammengefasst.

Tab. 3.3.4: Zusammenfassung der  $IC_{50}$ -Werte der Wirksamen Polymere.

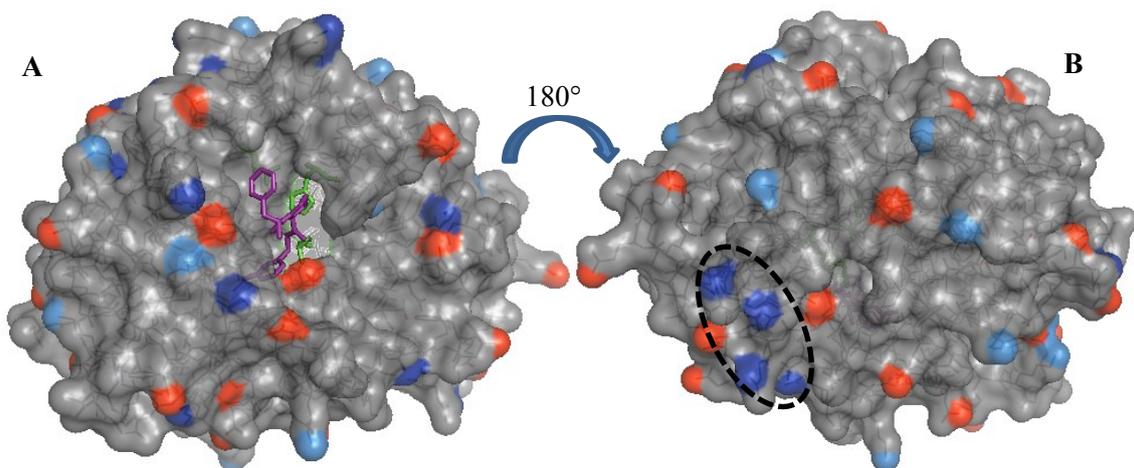
Polymer	Bausteine	Verhältnisse [eq]	$IC_{50}$ -Werte [nM]	Pol./Enz.
PG40	BA/Ani/Glu	1:1:3	110	12:1
PG47	BP/NTA/Bor	4:1:0.5	470	53:1
PG49	BP/Dan	4:1	30	3.3:1
PGBP	BP	1	70	7.8:1
KW12.2	BP/Dod/Glu/Dan	5:1:0.3:0.4	17	1.9:1

Aus der Tabelle ist zu entnehmen, dass die Polymer-Enzym-Stöchiometrie bei der  $IC_{50}$ -Konzentration weitaus höher ist als bei den zuvor untersuchten Hydrolasen. Auffällig war weiterhin, dass die wirksamen Polymere Thrombin um maximal 65 % - 70 % hemmten. Obgleich die Konzentration des Hemmstoffes erhöht wurde, stellt dieser Wert einen Grenzwert der Hemmung dar, wie beispielsweise bei Polymer PG40 (Abb. 3.3.41).



**Abb. 3.3.41:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG40 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (110 nM bei einer 9 nM Enzymkonzentration).

Die Kristallstruktur des neutralen Enzyms (Abb. 3.3.42) zeigt weder eine Carboxylat- noch eine Arginin- bzw. Lysin-reiche Domäne in der Nähe des aktiven Zentrums.



**Abb. 3.3.42:** Kristallstruktur von Thrombin.<sup>[203]</sup> Rote Flächen stellen Carboxylat-Gruppen der sauren Aminosäuren (Asp, Glu) dar. Hellblaue Flächen symbolisieren Lysine, blaue Flächen Arginine. Das violette Molekül stellt einen Hemmstoff dar, welcher am aktiven Zentrum bindet (grün).

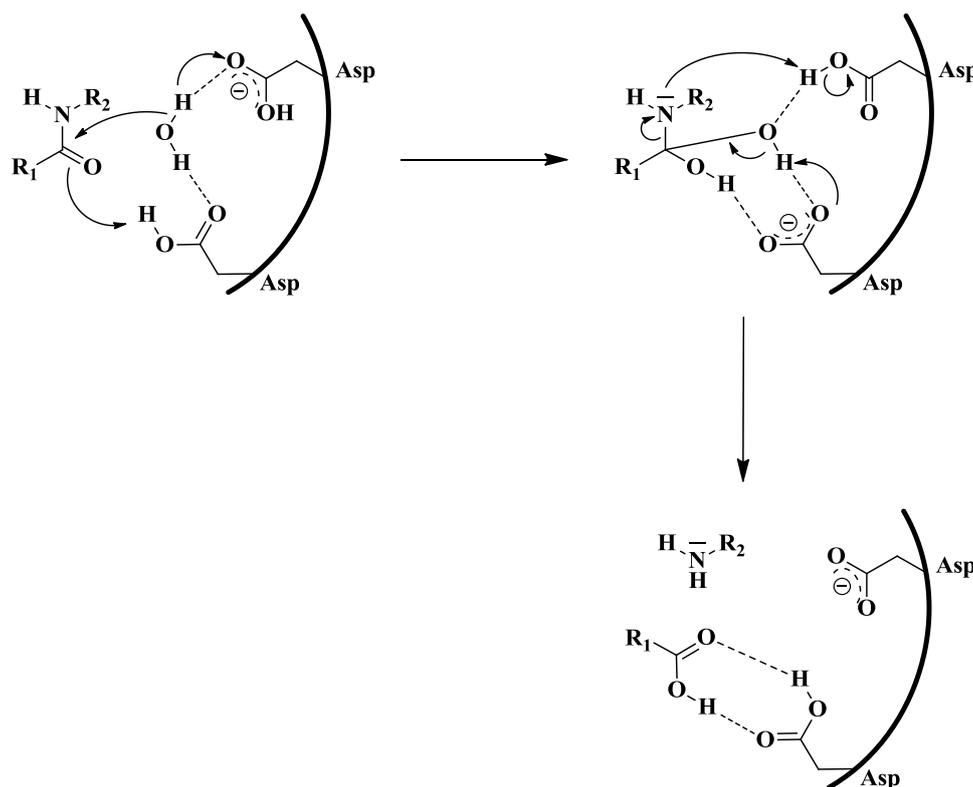
Die Hemmung von Polymer PG40 könnte dadurch erklärt werden, dass der BA-Baustein **12** eine Carboxylat-Gruppe bindet, während der Ani-Baustein **14** zum einen  $\pi$ -kationische Wechselwirkungen mit einem Lysinrest ausbilden könnte, zum andern bestünde die Möglichkeit, dass dieser mit der vorhandenen Kavität interagiert (**A**). Polymere auf BP-Basis könnten hingegen an eine Arginin-reiche Domäne des Enzyms binden (**B**), was möglicherweise eine Konformationsänderung des Enzyms zur Folge hätte. Dies wiederum könnte einen direkten Einfluss auf das katalytische System haben.

### 3.3.2.7 Cathepsin D

Alternativ zu den vorher besprochenen Serin-Proteasen handelt es sich bei Cathepsin D um eine lysosomale Aspartat-Endopeptidase. Das sogenannte Präprocathepsin D wird im rauen endoplasmatischen Retikulum gebildet. Mittels proteolytischer Spaltung und Glykosylierung erfolgt die Bildung von Procathepsin D. Die Aktivierung der zymogenen Hydrolase erfolgt autokatalytisch.<sup>[204-206]</sup>

Die 48 kDa schwere Protease, welches aus einer leichten (14 kDa) und einer schweren Kette (34 kDa) aufgebaut ist, findet bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen wie beispielsweise der Alzheimersche Krankheit und im Rahmen der Apoptose Relevanz.<sup>[206-208]</sup>

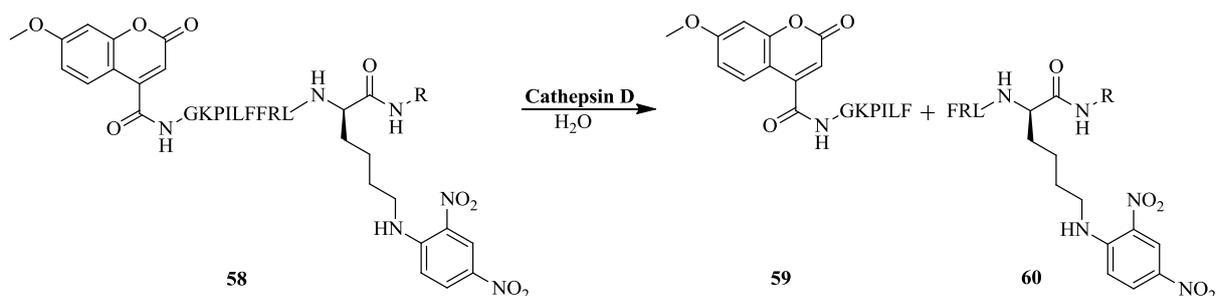
Das aktive Zentrum der Aspartat-Proteasen besteht aus einer katalytischen Diade aus zwei Asparaginsäureresten. Der allgemeine Reaktionsmechanismus der zum hydrolytischen Substratabbau führt ist in Abbildung 3.3.43 zusammengefasst.



**Abb. 3.3.43:** Möglicher Katalysemechanismus von Cathepsin D.<sup>[209]</sup>

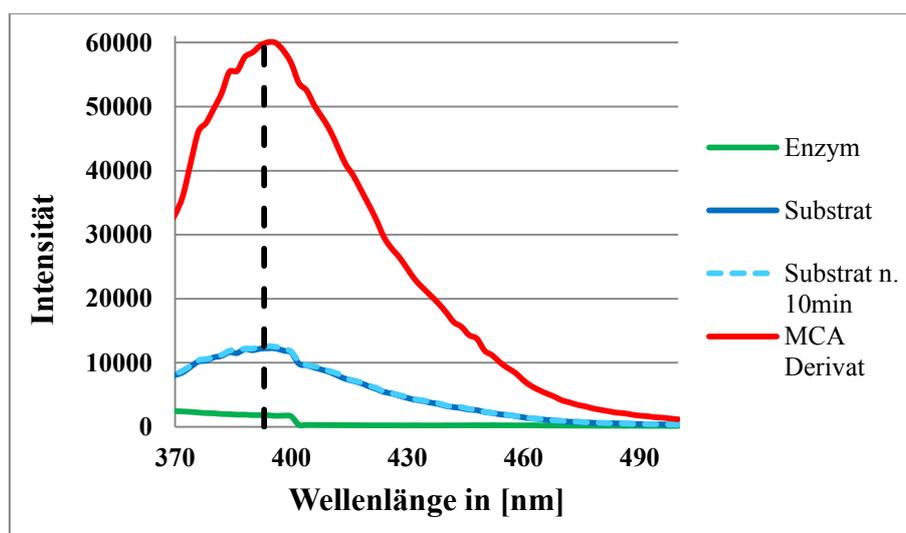
Der Reaktionsmechanismus des hydrolytischen Substratabbaus der Aspartat-Proteasen verläuft nahezu analog zu dem bereits beschriebenen Serin-Protease-Mechanismus. In diesem Fall aktiviert die Carboxylat-Gruppe der katalytischen Diade ein Wassermolekül, welches als Nukleophil fungiert und zum Substratabbau führt.

Die Substratspezifität von Cathepsin D beschränkt sich zumeist auf Phe-Phe-Bindungen, hierbei erfolgt der Substratabbau zwischen dieser Bindung.<sup>[210-211]</sup> Cathepsin D besitzt einen isoelektrischen Punkt von 5.6 - 6.4 und ein pH-Optimum von 3.5 - 5.<sup>[201, 206, 212]</sup> Das für die Untersuchung genutzte Substrat basiert auf der oben beschriebenen Enzymspezifität. Das Reaktionsschema des enzymatischen Substratabbaus ist in Abbildung 3.3.44 zusammengefasst.



**Abb.3.3.44:** Hydrolytische Spaltung des Substrates **58** unter Freisetzung des fluoreszenzaktiven Cumarine Derivats **59** und dem Dinitrophenyl Derivats **60**.<sup>[213]</sup>

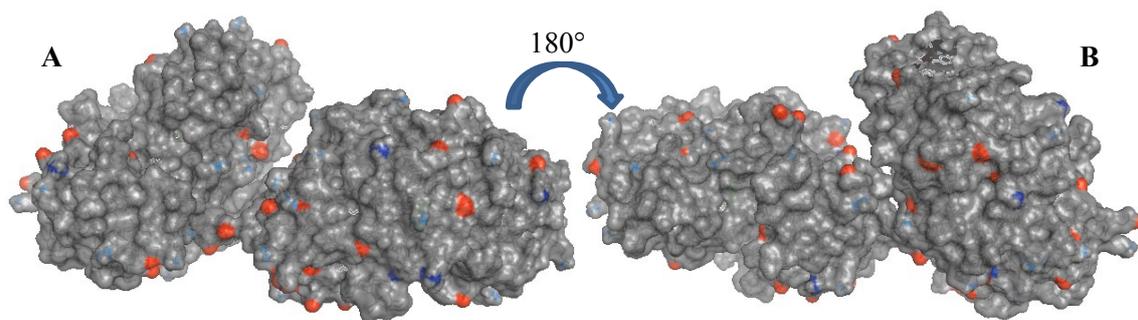
Bei dem Assay fungiert das Cumarine Derivat **59** als Fluorophor, welches nach hydrolytischer Spaltung von Substrat **58** freigesetzt wird. Die Messung wurde bei einem pH-Wert von 4.0 (pH-Optimum = 3.5 - 5) durchgeführt. Zur Bestimmung der Fluoreszenz wurde als Anregungswellenlänge 328 nm und als Emissionswellenlänge 393 nm ausgewählt. Das Emissionsübersichtsspektrum (Abb. 3.3.45) zeigt, dass bei der gewählten Wellenlänge das Emissionsmaximum des Fluorophors **59** vorliegt.



**Abb. 3.3.45:** Absorptionsübersicht des Enzyms, Substrats und Chromophors im Cathepsin D Assay.

Die Funktionalität des Assays wurde mit dem literaturbekannten natürlichen Hemmstoff Pepstatin A kontrolliert.<sup>[78-80]</sup>

Entgegen der Theorie, dass die Carboxylat -reiche Hydrolase (Abb. 3.3.46) durch Polymere auf BA- bzw. auf CBS-Basis gehemmt werden müsste, zeigten im Rahmen von *Wencks* Arbeit lediglich Polymere auf BP- bzw. NTA-Basis eine inhibitorische Wirksamkeit.<sup>[122]</sup> Ein möglicher Erklärungsansatz für dieses Phänomen kann auf den pH-Wert der Messung zurückgeführt werden. Alternativ zu den anderen Enzymuntersuchungen, welche im nahezu neutralen Bereich durchgeführt wurden, erfolgt der Assay im sauren Medium. Dies kann zur Folge haben, dass die Carboxylat -reiche Enzymoberfläche größtenteils protoniert vorliegt, wodurch das typische CBS- und BA-Bindungsmotiv nicht ausgebildet werden kann. Ferner könnten die protonierten Carboxylat-Gruppen, sowie die Arginin- und Lysin-Reste mit den BP- und NTA-Erkennungseinheiten interagieren, sofern diese nicht protoniert vorliegen.



**Abb. 3.3.46:** Vermeintlich dimere Kristallstruktur von Cathepsin D.<sup>[214]</sup> Rote Flächen stellen Carboxylat-Gruppen der sauren Aminosäuren (Asp, Glu) dar. Hellblaue Flächen symbolisieren Lysine, blaue Flächen Arginine.

Aus diesem Grund sollten BP- und NTA -reiche Polymere eine vielversprechende Option zur Hemmung der Protease darstellen. Das Enzym-Screening erfolgte mit allen Polymeren. NTA -reiche Copolymere wurden zusätzlich in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen vermessen. Obgleich diese bei einem pH-Wert von 4.0 höchstwahrscheinlich protoniert vorlagen, wodurch eine Metall-Komplexierung stark erschwert wäre. Aus dem Screening konnte entnommen werden, dass nahezu alle Polymere auf BP- bzw. NTA-Basis Cathepsin D vollständig hemmten (Abb. 3.3.47).

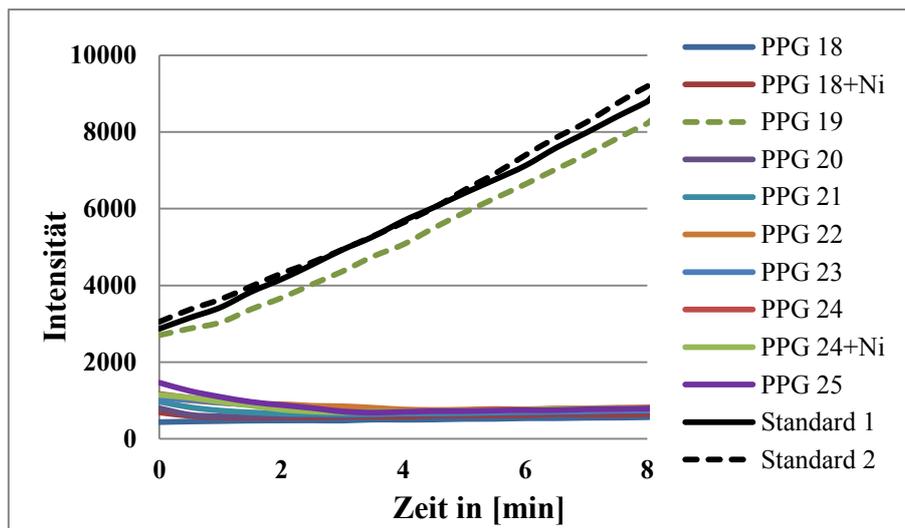


Abb. 3.3.47: Cathepsin D Screening von diversen Copolymeren.

Da nahezu alle Polymere auf BP- und NTA-Basis Cathepsin D hemmten, wurde die Überprüfung der Wirksamkeit der einzelnen Bausteine **1** und **11** notwendig. Jedoch konnte weder dem BP- noch dem NTA-Monomer eine inhibitorische Wirksamkeit nach dem Screening zugesprochen werden. Weiterhin wurde aufgrund der hohen Anzahl an potentiellen Hemmstoffen lediglich ein  $IC_{50}$ -Wert, welcher als Referenz/Vergleichswert fungieren sollte, bestimmt (Abb. 3.3.48).

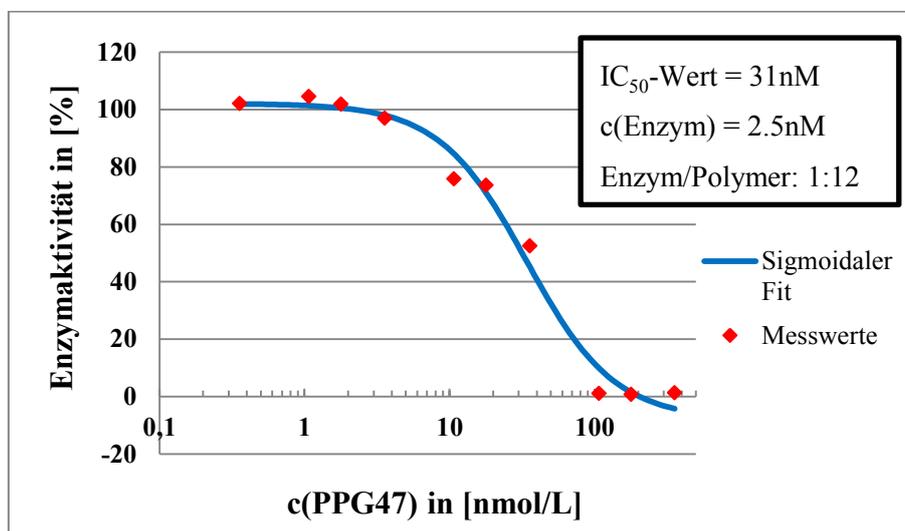


Abb.3.3.48: Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG47 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (31 nM bei einer 2.5 nM Enzymkonzentration).

Der ermittelte  $IC_{50}$ -Wert des Polymeres PG47 lag im nM Bereich. Das Polymer ist der bisher effektivste Cathepsin D Hemmstoff, der im Arbeitskreis bisher vermessen wurde.<sup>[122]</sup>

### 3.3.3 Diskussion und Zusammenfassung der wirksamen Polymere

Die aus den Enzym-Messungen erhaltenen Ergebnisse sowie die daraus resultierenden Kenntnisse werden in diesem Kapitel zusammengefasst. Mit Ausnahme von Elastase konnten im Rahmen dieser Arbeit alle untersuchten Hydrolasen erfolgreich durch polyvalente Rezeptoren gehemmt werden. Eine Zusammenfassung der wirksamen Polymere sowie die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte sind in Tabelle 3.3.5 zusammengefasst.

Bei genauerer Betrachtung der Polymerzusammensetzung (Tab. 3.2.4 und 3.2.5) der wirksamen Polymere fällt auf, dass außer dem Anilin-Monomer **14** und dem Dansyl-Monomer **4** kein hydrophober Baustein einen positiven Effekt auf die Enzymhemmung hatte. Vielmehr zeigte die Verringerung der BP- oder der NTA-Konzentration (**1**, **11** und **15**) zugunsten einer hydrophoben Haftgruppe meist eine nahezu vollständige Aufhebung der Enzymhemmung. So zeichnet sich beispielsweise das Polymer PG18 (BP/NTA-Glu/Glu; 2:1:1) als hervorragender Kallikrein Hemmstoff aus. Hingegen zeigten die Polymere PG19 - 22 welche keinen NTA-Glu-Baustein **15** enthielten (bei identischer BP-Konzentration) keine inhibitorische Wirksamkeit gegenüber Kallikrein. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass die Konzentrationsabnahme der geladenen Haftgruppen (**1**, **11** und **15**) dazu führt, dass keine ausreichend starke Proteinoberflächenerkennung stattfinden kann und die Hemmung lediglich auf diese zurückzuführen ist. Alternativ könnte dieser Effekt auch auf das Polymerisationsverfahren zurückgeführt werden. Da die Verknüpfung der Bausteine mittels statistischer radikalischer Copolymerisation erfolgte, lag keine feste Bausteinsequenz vor. Vielmehr wäre es möglich, dass die unpolaren Bausteine aufgrund eines besseren Polymerisationsverhaltens Blöcke ausbilden könnten und diese kontraproduktiv bei der Proteinerkennung wären. Verstärkt werden kann diese These, durch die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Polymerisationskinetik-Reihen aus Kapitel 3.2.1. Bei einer geordneten Bausteinsequenz könnte jedoch die Anwesenheit von hydrophoben Haftgruppen, wie beispielsweise des  $C_6$ -Cyclohexyl-Monomers **7**, zur Erhöhung der Proteinaffinität bzw. sogar zu einer spezifischen Hemmung führen. Weiter konnte für CBS-Baustein-haltige Polymere in keinem der untersuchten Enzyme eine ausreichend hohe Hemmwirkung ermittelt werden. Daher ist der Erfolg der Wirksamkeit des Monomers **9** unwahrscheinlich. Die Darstellung des Monomers **9** über neun Synthesufen für weitere aufbauende Arbeiten risikoreich. Für die Spacer modifizierten BP-Bausteinen (**18** und **19**) konnte aufgrund ihrer erhöhten Flexibilität keine verstärkte Wirksamkeit nachgewiesen werden. Jedoch könnte dieser Effekt genauer bei Untersuchung von Arginin-reichen Proteinen wie Lysozym kontrolliert werden.

**Tab. 3.3.5:** Zusammenfassung der IC<sub>50</sub>-Werte der wirksamen Polymere sowie die dabei vorliegende Enzym-Polymer-Stöchiometrie.

Polymer	$\alpha$ -Chymotrypsin	Enzym/Polymer	Trypsin	Enzym/Polymer	Carboxypeptidase A	Kallikrein	Enzym/Polymer	Thrombin	Enzym/Polymer	Cathepsin D	Enzym/Polymer
	PG17					3.8 $\mu$ M	3.9nM	136:1			pos
+Ni					2.8 $\mu$ M	7.1nM	75:1			pos	
PG18					1.6 $\mu$ M	7.6nM	70:1			pos	
+Ni					3.8 $\mu$ M	9.7nM	55:1			pos	
PG24					3.6 $\mu$ M					pos	
PG34			0.6 $\mu$ M	1:0.3		7.6nM	70:1			pos	
PG40	0.44 $\mu$ M	1:0.9						110nM	1:12		
PG47			1.3 $\mu$ M	1:0.7		3.7nM	143:1	470nM	1:53	31nM	1:12
PG49			2.3 $\mu$ M	1:4.6		2.8nM	189:1	30nM	1:3.3	pos	
PGBP			3.2 $\mu$ M	1:1.6		4.4nM	120:1	70nM	1:7.8	pos	
PGKW11.2			1.0 $\mu$ M	1:0.5		4.6nM	115:1			pos	
+Ni			1.6 $\mu$ M	1:0.8		9.2nM	58:1			pos	
PGKW11.3			1.4 $\mu$ M	1:0.7		6.2nM	85:1			pos	
PGKW12.2						7.7nM	69:1	17nM	1:1.9	pos	
IS1			0.51 $\mu$ M	1:1.0		3.3nM	160:1			pos	
+Ni					1.3 $\mu$ M	6.1nM	87:1			pos	
IS2			0.89 $\mu$ M	1:1.8		8.9nM	60:1			pos	
+Ni						11.5nM	46:1			pos	
IS3			0.89 $\mu$ M	1:1.8		6.5nM	82:1			pos	
IS4			1.42 $\mu$ M	1:2.9		6.0nM	88:1			pos	
IS5			1.8 $\mu$ M	1:3.6						pos	
IS6			1.7 $\mu$ M	1:3.4						pos	
IS7			1.5 $\mu$ M	1:3.0						pos	
IS8			1.5 $\mu$ M	1:3.0						pos	
IS9			1.5 $\mu$ M	1:3.0						pos	
PG19										pos	
PG20										pos	
PG21										pos	
PG22										pos	
Enz.-Konz.	0.5 $\mu$ M		2.0 bzw. 0.5 $\mu$ M		/	0.53 $\mu$ M		9nM		2.5nM	

Die Serin-Protease **Elastase** konnte von keinem der dargestellten Polymere erfolgreich gehemmt werden. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre die geringe Arginin-, Lysin- und Carboxylat-Dichte in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum. Weiterhin befindet sich in direkter Nachbarschaft zu einer Carboxylat-Gruppe immer ein Arginin- bzw. Lysin-Rest, was eine Komplexierung zusätzlich erschwert. Ferner ist der Zugang zur Kavität, in welcher sich das aktive Zentrum der Hydrolase befindet, aus sterischer Sicht schwer zugänglich. Dies könnte mitunter auch die Enzymaffinität zu einem Alanin -reichen Substrat erklären, welches als künstliches Substrat im Assay dient. Allerdings könnte ein Polymer auf Basis eines Spacer-modifiziertem BA-Bausteins als potentieller Hemmstoff fungieren, da dieser aufgrund seiner Flexibilität zusätzlich mit dem aktiven Zentrum interagieren könnte und so eine Enzyminhibierung ermöglichen würde.

**$\alpha$ -Chymotrypsin** konnte lediglich von Polymer PG40 ausreichend wirksam gehemmt werden. Die Polymerkonzentration beim ermittelten  $IC_{50}$ -Wert betrug  $0.44 \mu M$  bei einer  $0.5 \mu M$  Enzymkonzentration, womit eine ungefähre 1:1 Enzym-Polymer-Stöchiometrie vorlag. Alternativ zu den anderen Rezeptoren, zeichnete sich das Copolymer dadurch aus, dass dieses neben dem BA-Baustein **12** als Carboxylat-Erkennungseinheit den Ani-Baustein **14**, welcher  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen bzw.  $\pi$ -kationische-Wechselwirkungen ausbilden konnte, beinhaltet. Die Wirksamkeit des Polymers PG40 (BA/Ani/Glu; 1:1:3) kann eventuell auf die Raumstruktur der Verdauungshydrolase zurückgeführt werden. Bei dieser befinden sich neben der Vielzahl von Lysinresten, in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum zwei benachbarte Carboxylat-Gruppen sowie zwei Phenylalaninreste. Somit könnte die BA-Einheit **12** an die Carboxylat-Gruppen binden, während der Anilin-Baustein **14** mit den aromatischen Aminosäuren  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen, sowie eventuell auch  $\pi$ -kationische Wechselwirkungen zu Lysinresten ausbilden könnte. Dies würde wiederum erklären, warum den strukturähnlichen Polymeren PG38, PG39 und PG41 auf BA-Basis keine inhibitorische Wirksamkeit zugeordnet werden konnte. Ein Polymer bestehend aus dem Dansyl-Baustein **4** in Kombination mit dem BA-Baustein **14** könnte die aufgestellte Hypothese bekräftigen. Ferner könnte ein Polymer auf BA-Basis in Kombination mit einer Cyclodextrin-Einheit eine vielversprechende Option zur Hemmung von  $\alpha$ -Chymotrypsin darstellen.

**Trypsin** konnte durch eine Vielzahl von Polymeren gehemmt werden. Aus der Tabelle 3.3.5 ist zu entnehmen, dass die Kombinationen der Bausteine **1** und **11**; **1** und **13**; **1**, **11** und **13** eine gute Hemmwirkung gewährleisteten. Ferner konnte dem Homopolymer PGBP wie auch dem NTA-Homopolymer IS1 eine gute bis sehr gute Hemmwirkung zugeordnet werden.

Weiterhin ist ersichtlich, dass den NTA-reichen Polymere lediglich in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen eine Hemmwirkung zugeordnet werden konnte, was gegen eine Histidin-Erkennung spricht. Die hervorragende inhibitorische Wirksamkeit des NTA-Homopolymers IS1 könnte höchstwahrscheinlich auf die lysinreiche Proteinoberfläche zurückgeführt werden. Da die vorhandenen NTA-Bausteine diese komplexierten und somit das Enzym hemmten. ITC-Messungen sowie eine aktuelle Veröffentlichung unseres Arbeitskreises stärken die These.<sup>[215]</sup> Hingegen konnte die ineffizientere Hemmung durch das BP-Homopolymer auf die geringe Anzahl von Argininresten zurückgeführt werden. Der BP-Baustein **1** bindet zwar an Lysine, ist aber prädestiniert für die Arginin-Erkennung. Die Kombination des BP-Bausteins **1** mit dem Boronsäure-Baustein **13** führt zu einer immensen Verstärkung der Trypsin-Hemmung. Dieser Effekt kann anhand der Kristallstruktur erörtert werden. Da das Enzym eine hohe Anzahl an Serinresten enthält, könnte der Bor-Baustein **13** mit benachbarten Serinreste interagiert, während der BP-Baustein **1** an Arginin- und Lysin-Reste bindet. Ferner könnte der Einbau des Boronsäure-Monomers **13** als Polymerrückgrat-Spacer fungieren, durch welches das resultierende Polymer an Flexibilität gewinnt. Aus der Kombination des BP-Bausteins **1** mit dem NTA-Baustein **11** ist der Trend der Homopolymere klar erkennbar. Durch Verringerung der NTA-Baustein-Konzentration zugunsten des BP-Bausteins **1** nimmt die Hemmwirkung kontinuierlich ab. Verdeutlicht werden kann dies durch die von *Stratmann* synthetisierten Polymere IS1 - IS4.<sup>[141]</sup> Während das NTA-Homopolymer IS1 sich durch einen  $0.51 \mu\text{M}$   $\text{IC}_{50}$ -Wert auszeichnet, verdoppelt sich dieser fast bei Polymer IS2 ( $0.89 \mu\text{M}$ , NTA/BP/Glu; 3:1:1, 60 % NTA) und verdreifacht sich bei Polymer IS4 ( $1.41 \mu\text{M}$ , NTA/BP/Glu; 1:1:3, 20 % NTA). Die Kombination der drei prädestinierten Trypsin-Haftgruppen führte zwar nicht zum vermeintlich besten Hemmstoff, der NTA-Bestandteil des Polymers PG47 lag jedoch unterhalb von 20 %. Ferner ist auffällig, dass die strukturanalogen Polymere IS4 und PGKW11.3 identische  $\text{IC}_{50}$ -Werte aufweisen, allerdings bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen. Dieser Trend konnte auch bei den anderen Polymeren nachgewiesen werden. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass im Assay eine Mindestkonzentration an Inhibitor vorliegen muss, um eine Hemmung zu gewährleisten, jedoch ist die Aussage bei unterschiedlichen  $\text{IC}_{50}$ -Werten mehr als fraglich.

ITC-Messungen konnten zudem eine Enzym-Komplexierung durch Polymer IS1 bestätigen. Weiterhin verifizierte diese Methode eine mögliche Lysin-Affinität des Polymers, welche zudem durch eine Verdrängungstitration bestätigt werden konnte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es sich bei der von Polymeren verursachten Hemmung um eine „slow-binding inhibition“ handelt. Ein Hinweis darauf war, dass sich das Enzym-Hemmstoff-Gleichgewicht

erst innerhalb von Sekunden bzw. Minuten einstellt. Ferner konnte durch eine Lineweaver-Burk-Auftragung gezeigt werden, dass es sich bei der Polymer verursachten Hemmung (Polymer 3)<sup>[122]</sup> um eine kompetitive Hemmung handelt. Was bedeutet, dass der Inhibitor reversibel an die Substratbindungsstelle bindet (aktives Zentrum).

**Carboxypeptidase A** konnte lediglich durch vier Polymere gehemmt werden. Auffällig war, dass alle wirksamen Polymere einen NTA-Baustein (**11** und **15**) enthielten. Umso erstaunlicher war es, dass die Polymere PG17 und PG18 mit und in Abwesenheit von Ni<sup>2+</sup>-Ionen die Hydrolase hemmten. Hingegen inhibierte Polymer PG24 das Enzym lediglich in Abwesenheit von Ni<sup>2+</sup>-Ionen und Polymer IS1 ausschließlich in deren Gegenwart. Weiter war erkennbar, dass die Polymere PG17, PG18 und PG24 nicht nur den NTA-Glu-Baustein **15** enthielten, sondern zusätzlich den BP-Baustein **1**. Die unterschiedlichen Ergebnisse können darauf zurückgeführt werden, dass das Enzym Histidin-reich ist. Ferner beinhaltet dieses sogar zwei benachbarte Histidine in der Nähe des aktiven Zentrums. Hier wäre ein „NTA-His-Tag“ denkbar. So könnten die Polymere PG17 und PG18 an Arginine wie auch an Histidine binden. Polymer PG24 könnte alternativ durch den Anilin-Baustein **13** in Kombination mit den BP- und den -NTA-Glu-Baustein an Lysine bzw. Arginine binden. Ferner könnte das NTA-Homopolymer IS1 mit Ni<sup>2+</sup>-komplexierten Bindungsstellen an Histidine binden, während die freien Bindungsstellen des NTA-Bausteins mit Lysin bzw. Argininen interagieren würden. Jedoch erklärt dies nicht, warum lediglich den vier genannten Polymeren eine inhibitorische Wirksamkeit zugesprochen werden konnte. Ein Polymer auf Basis der Bausteine **1**, **11** und **13** mit variabler Ni<sup>2+</sup>-Ionenkonzentration könnte einen potentiellen Hemmstoff darstellen. Dieses Copolymer könnte die aufgestellten Thesen verifizieren und zur Aufklärung der erhaltenen Ergebnisse führen. Bei den durchgeführten Messungen konnte ausschließlich die Effektivität der Polymere in Form von IC<sub>50</sub>-Werten ermittelt werden. Die Polymer-Enzym-Stöchiometrie konnte allerdings nicht bestimmt werden, da die Konzentration der aus dem Assay Kit erhaltene Enzym-Lösung nicht bekannt war.

**Kallikrein** stellt eine weitere Serin-Protease dar, welche durch eine Vielzahl von Polymeren erfolgreich gehemmt werden konnte. Analog zu Trypsin zeigten Polymere welche den BP- oder NTA-Baustein (**1**, **11** und **15**) enthielten eine inhibitorische Wirksamkeit gegenüber der Hydrolase. Ähnlich war ebenfalls, dass die NTA-reichen Polymere in Abwesenheit von Ni<sup>2+</sup>-Ionen eine starke Enzymhemmung verursachten als in Gegenwart der Metall-Ionen. Alternativ zu Trypsin stellt Kallikrein eine saure Hydrolase dar, welche lediglich eine Lysin-

reiche Domäne in der Nähe des aktiven Zentrums besitzt. Weiterhin zeigten die Boronsäurehaltigen Polymere PG34 und PG47 eine gute Hemmwirkung gegenüber der Protease, was auf die Serin- reiche Oberfläche zurückzuführen ist. Auffällig war jedoch, dass die Polymere das Enzym substöchiometrisch im nM-Bereich hemmten. Beispielsweise betrug der ermittelte  $IC_{50}$ -Wert des Homopolymers IS1 3.3 nM bei einer Enzym-Polymer-Stöchiometrie von 160:1. Ein möglicher Erklärungsansatz für dieses Phänomen wäre, dass die wirksamen Polymere das Enzym irreversibel denaturieren. Vielmehr würde am Beispiel von Polymer IS1 ein Polymer durchschnittlich 160 Kallikreine denaturieren. Bestätigt werden könnte diese These mittels CD-Spektroskopie, was eine potentielle Aufgabe für weitere Arbeiten darstellt.

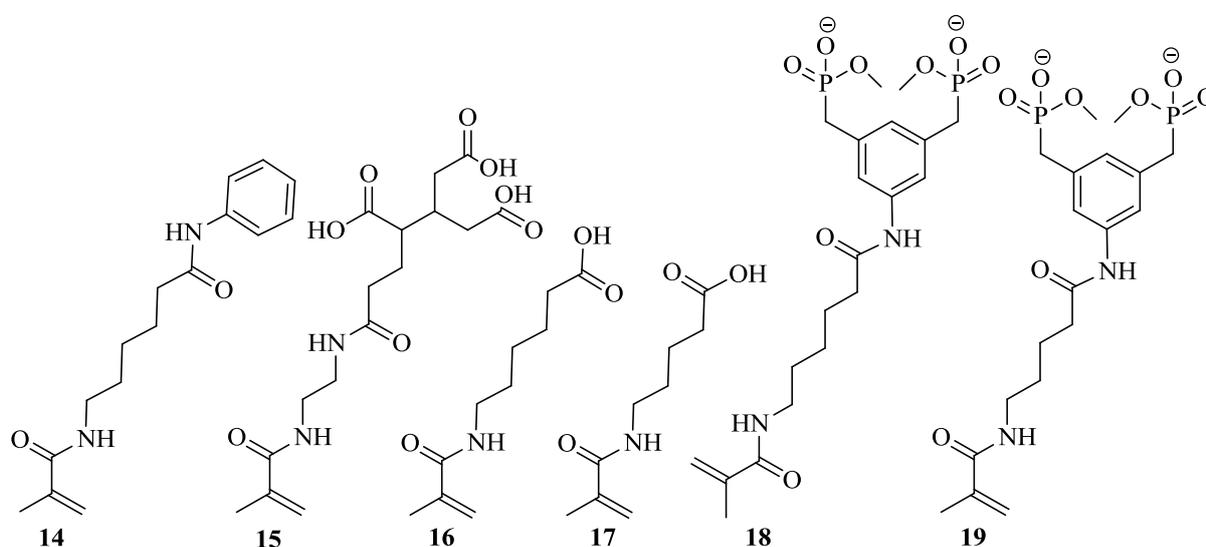
Das für die Blutgerinnung relevante **Thrombin** konnte durch fünf Polymere erfolgreich inhibiert werden. Die Hemmstoffe zeichneten sich mit Ausnahme von Polymer PG40 durch einen hohen BP-Polymeranteil aus. Alternativ zu den bisher behandelten Hydrolasen führt der Einbau des NTA- bzw. des Boronsäure-Bausteins zur Verringerung des Hemmeffizienz (Polymer PG34 und PG47). Hingegen führt der Zusatz von geringen Mengen anderer Haftgruppen wie beispielsweise dem Dan-Baustein **4** zur Erhöhung der Hemmwirkung (Polymer PG49 und PGKW12.2). Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass der Einbau von anderen Haftgruppen zur Polymerflexibilität beiträgt, da diese als Polymerrückgrat-Spacer fungieren könnten. Die Effektivität von BP -reichen Polymeren kann eventuell auf die relativ hohe Anzahl von Arginin- bzw. Lysin-Resten zurückgeführt werden. Obwohl das nahezu neutrale Enzym ebenso viele Carboxylat-Gruppen beinhaltet, besitzt dieses eine Argininreiche Domäne, welche als Fixierpunkt für BP -reiche Polymere dienen könnte.

**Cathepsin D** konnte durch alle bisher ermittelten Hemmstoffe auf BP- und NTA-Basis inhibiert werden. Ferner zeigten viele weitere Polymere auf BP-Basis eine inhibitorische Wirksamkeit gegenüber der Hydrolase wie beispielsweise Polymer PG22. Womit diese Cathepsin D selektive Hemmstoffe darstellen. Bei Polymer PG47 konnte ein 31  $\mu$ M  $IC_{50}$ -Wertes ermittelt werden bei einer Polymer-Enzym-Stöchiometrie von 12:1, wodurch dieser den bisher effektivsten Cathepsin D Hemmstoff darstellt.<sup>[122]</sup>

## 4. Zusammenfassung und Ausblick

### 4.1 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Inhibierung von verdauungsrelevanten Hydrolasen durch polyvalente Rezeptoren. Um dieses Ziel zu verwirklichen, wurde eine Vielzahl von literaturbekannten Haftgruppen auf Methacrylsäure-Basis synthetisiert. Ergänzend wurden im Rahmen dieser Arbeit einige neue Monomere dargestellt, die bereits etablierte Bindungsmotive erweiterten bzw. verstärkten sollten (Abb. 4.1).



**Abb. 4.1:** Zusammenfassung der neuen Monomere, welche im Rahmen dieser Arbeit dargestellt wurden.

Der Grundbaustein der Monomere **18** und **19** stellt der literaturbekannte BP-Rezeptor **1b** dar. Mittels Peptidkupplung der neuen Bausteine **16** und **17** mit dem BP-Rezeptor **1b** sowie anschließender Esterspaltung, wurden die Spacer-modifizierten BP-Bausteine **18** und **19** gewonnen. Monomer **15** stellt eine alternative Histidin-Erkennungseinheit auf Glutaminsäure-Basis dar. Der flexible Anilin-Baustein **14**, welcher als hydrophober-Baustein fungiert, wurde durch zweifache Peptidkupplung gewonnen.

Die Verknüpfung der Bausteine erfolgte durch das bereits bekannte Polymerisationsverfahren, welches durch eine Vielzahl von Versuchen optimiert wurde. Zur Ermittlung der ökonomisch besten Polymerisationsparameter wurden drei Polymerisationsreihen durchgeführt. Bei diesen wurden der Umsatzgrad der verwendeten Monomere in Abhängigkeit der Temperatur und Reaktionszeit ermittelt. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde jeder Copolymerisationsversuch dreifach durchgeführt. Ferner wurde das

Polymerisationsverhalten der einzelnen Bausteine in Form von Homopolymerisationen untersucht. Durch insgesamt 52 Polymerisationsansätze wurden die optimalen Versuchsbedingungen ermittelt (70 °C, 24 - 30 h), welche ein reproduzierbares Polymerisationsergebnis gewährleisteten.

Unumgänglich war weiterhin die Aufreinigung der erhaltenen Polymerisationsprodukte. Zu diesem Zweck wurden die gefriergetrockneten Polymere mittels mehrfacher Ultrafiltration von Monomeren, Oligomeren wie auch weitestgehend von DMF befreit. Nach anschließender Gefriertrocknung wurden die hochreinen Polymere erhalten. Die Charakterisierung der Polymere erfolgte mittels GPC sowie <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie. Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit über 50 Polymere, nach dieser Methode erfolgreich synthetisiert werden. Mit Ausnahme von Polymer PG48 waren diese allesamt wasserlöslich. Ferner konnte die Reproduzierbarkeit des Verfahrens durch nachsynthetisierte Polymere in Form von Enzym-Assays bestätigt werden.

Zusammenfassend konnte durch die Polymerisationsoptimierung und anschließende Aufreinigung die Darstellung von hochreinen Polymeren binnen einer Woche verwirklicht werden.

Das Inhibitionsverhalten der dargestellten Polymere auf die zu hemmenden Hydrolasen, erfolgte durch Enzym-Assays. Das Hemmpotential der Polymere wurde bei Carboxypeptidase A sowie Cathepsin D mit Hilfe von Assay Kits durchgeführt. Die enzymatischen Untersuchungen der Serin-Proteasen  $\alpha$ -Chymotrypsin, Elastase, Kallikrein, Trypsin und Thrombin erfolgte durch bereits etablierte sowie optimierte Enzym-Assays. Weiterhin wurde die Funktionalität der Messmethoden durch literaturbekannte Hemmstoffe verifiziert.

Elastase konnte durch kein verwendetes Polymer erfolgreich inhibiert werden.

$\alpha$ -Chymotrypsin konnte lediglich durch das BA-haltige Polymer PG40 mit einem 0.44  $\mu$ M IC<sub>50</sub>-Wert gehemmt werden. Da das Polymer weiterhin Thrombin inhibiert, stellt dieses keinen hochspezifischen Hemmstoff dar.

Trypsin konnte durch eine Vielzahl von Polymeren auf Basis der Bausteine **1** und **11** gehemmt werden. Ferner wies das Polymer PG34, welches neben den BP-Baustein **1** den Boronsäure-Baustein **13** enthielt, ein hohes Hemmpotential gegenüber der Hydrolase auf. Eine Polymerisationsreihe auf Basis der Bausteine **1** und **11** zeigte jedoch, dass die

Effektivität der Hemmung proportional zum NTA-Bausteinanteil **11** des Polymers ist. Dementsprechend stellt ein Homopolymer (IS1) auf NTA-Basis den effektivsten Hemmstoff dar.<sup>[141]</sup> ITC-Messungen bestätigten zudem die Trypsinaffinität des Polymers IS1. Durch eine Verdrängungstitration konnte zudem gezeigt werden, dass es bei der Erkennung höchstwahrscheinlich um ein neues Bindungsmotiv handelt. Inkubationsversuche von Polymer PG34 bestätigten die von *deGroot* und *Kirsch* ermittelten Ergebnisse, dass es sich bei Trypsin verursachter Hemmung um eine „slow-binding Inhibition“ handelt. Eine Lineweaver-Burk-Auftragung offenbarte, dass es sich bei der Polymer verursachten (Polymer 3<sup>[122]</sup>) Inhibition um einen kompetitiven Hemmmechanismus handelt.

Carboxypeptidase A konnte durch vier Polymere erfolgreich gehemmt werden. Alle wirksamen Polymere beinhalten die NTA-Bausteine **11** oder **15**. Jedoch konnte lediglich die Effektivität der Hemmstoffe in Form von IC<sub>50</sub>-Werten bestimmt werden.

Ähnlich wie bei Trypsin zeigten Polymere auf Basis der NTA-Bausteine ein hohes Hemmpotential gegenüber Kallikrein. Auffällig war weiterhin, dass die wirksamen Polymere das Enzym in substöchiometrischen Konzentration hemmten. Dies könnte durch eine irreversible Denaturierung der Hydrolase erklärt werden.

Das für die Blutgerinnung relevante Enzym Thrombin, welches nach Möglichkeit nicht gehemmt werden sollte, konnte allerdings von diversen Polymeren inhibiert werden. Hierbei zeigten Polymere mit hohem BP-Anteil eine besonders gute Hemmwirkung.

Cathepsin D konnte durch nahezu alle BP- oder NTA-haltigen (**1**, **11** und **15**) Polymere erfolgreich gehemmt werden. Ferner zeigten Polymere auf BP-Basis, welche bei den sechs anderen Hydrolasen keine Hemmwirkung zeigten ein positives Inhibitionsverhalten. Aus diesem Grund kann beispielsweise den Polymeren PG19 - 22 eine hohe Spezifität gegenüber Cathepsin D zugesprochen werden.

Mit Ausnahme von Elastase konnte jede behandelte Hydrolase durch die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Polymere erfolgreich gehemmt werden. Jedoch zeigten die Enzyme größtenteils analoge Haftgruppenaffinitäten, wodurch lediglich Cathepsin D selektiv inhibiert werden konnte.

## 4.2 Ausblick

Die Einsatzmöglichkeiten von polyvalenten Rezeptoren zur Enzymhemmung sind nahezu unbegrenzt. Neben der Verknüpfung von aminosäureselektiven Haftgruppen mittels statistischer Copolymerisation, stellen alternative Methoden, eine vielversprechende Option zur selektiven Enzymhemmung dar.

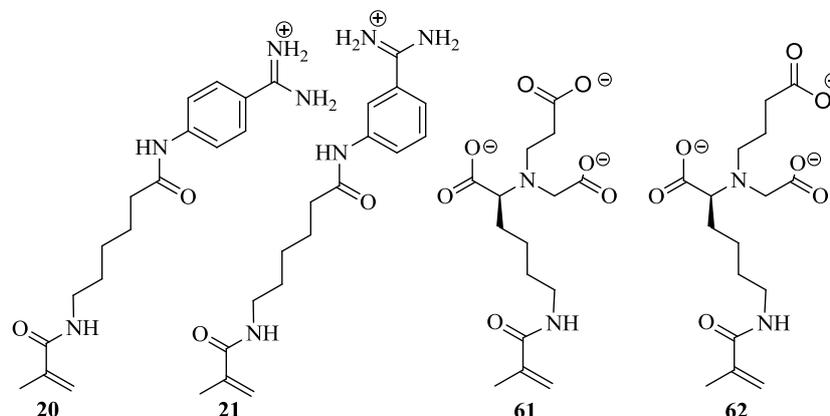
Die aus dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bzw. Erkenntnisse setzen den Grundbaustein für weiterführende Studien. Basierend auf den ermittelten  $IC_{50}$ -Werten der wirksamen Polymere und der damit zu entnehmenden Haftgruppenaffinität der Hydrolasen, können möglicherweise hochspezifische Hemmstoffe dargestellt werden. Fördernd könnten hierbei Berechnungen von *Hoffmann* sein, durch welche die optimale Polymerzusammensetzung für das zu hemmende Enzym ermittelt werden könnte. Von fundamentaler Bedeutung ist weiterhin die Aufklärung des jeweiligen Hemmmechanismus. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie könnte beispielsweise die aufgestellte Hypothese bestätigt werden, dass es sich bei der Kallikrein Inhibition um einen irreversiblen Denaturierungsvorgang handelte. Ergänzende Kinetik-Studien am Beispiel von Trypsin, könnten darüber Auskunft geben, ob es sich bei Polymer-verursachten Hemmungen jeweils um eine kompetitive Inhibition handelt. Eine Kooperation im Rahmen des aktuellen Sonderforschungsbereichs (SFB 1093) mit der Arbeitsgruppe *deGroot* und *Kirsch* stellt hierbei eine essentielle Unterstützung dar.

Eine weitere potentielle Aufgabe für zukünftige Arbeiten ist die Etablierung von neuen Enzym-Assays. Neben den bereits untersuchten Verdauungshydrolasen Elastase, Trypsin, Carboxypeptidase A und  $\alpha$ -Chymotrypsin, könnte das Hemmpotential der dargestellten Polymere an Enzymen wie Pankreas-Lipase, Carboxypeptidase B sowie an Phospholipasen untersucht werden.

Ein alternatives Anwendungsgebiet von biologischer Relevanz stellt die Blutgerinnung dar. Mittels selektiver Hemmung der gerinnungsrelevanten Enzyme Thrombin und Kallikrein könnte die Thrombusbildung unterbunden werden. Hingegen könnte die Inhibition von Plasmin zur Unterbrechung der Fibrinolyse führen, was eine schnellere Thrombusbildung zur Folge hätte. Somit wäre der aktive Eingriff in die Blutgerinnungskaskade durch spezifische Copolymere denkbar. Erste Schritte zu diesem Thema konnten bereits durch die Hemmung von Kallikrein und Thrombin im Rahmen dieser Arbeit verwirklicht werden.

Mittels Darstellung neuer Haftmonomere könnte die Inhibition von Elastase ermöglicht werden. Ebenfalls denkbar wäre, dass diese zu einer erhöhten Enzymspezifität führen

könnten. Vielversprechende Beispiele stellen die Spacer-modifizierte-Bausteine **20** und **21** dar. Überdies stellen weitere asymmetrische NTA-Bausteine (**61** und **62**) eine erfolgsversprechende Option zur selektiven Hemmung dar (Abbildung 4.2).



**Abb. 4.2:** Mögliche neue Monomer-Bausteine auf Methacrylsäure-Basis.

Die vermutete Lysin-Affinität des NTA-Bausteins **11** könnte mittels Fluoreszenztitration von fluoreszenzmarkierten Lysin-reichen Proteinen, durch ein NTA-Homopolymer überprüft werden. Ferner sollte eine Referenztitration mit dem Arginin-reichen Lysozym die aufgestellte These durch den direkten Vergleich mit einem Homopolymer auf BP-Basis festigen.

Ebenfalls möglich wäre die Verknüpfung von Substratmimetika mit den bereits etablierten Erkennungsmotiven. Alternativ zu Arbeiten von *Wenck* sollten diese Mimetika handelsübliche Substrate berücksichtigen, welche durch die Bausteine **16** und **17** in Spacer-modifizierte Monomer-Bausteine überführt werden. Durch den Flexibilitätsgewinn des Substrats wäre ein kooperatives Zusammenspiel aus Oberflächenerkennung und einer Interaktion mit dem aktiven Zentrum denkbar, was eine erhöhte Enzymspezifität zur Folge hätte.

Alternativ zu dem bisher verwendeten Polymerisationsverfahren können molekular geprägte Polymere eine erfolgsversprechende Option zur selektiven Hemmung durch massgescheiderte Oberflächenerkennung ermöglichen. Bei diesem Verfahren wird das Enzym in einem geeigneten Medium den komplementären Monomer-Bausteinen ausgesetzt. Nach der erfolgten hochspezifischen Erkennung werden die einzelnen Monomerbausteine miteinander quervernetzt. Hierbei entsteht das spezifische, komplementäre Abbild des Enzyms. Gewissermassen wird das regiospezifische Enzym-Imprint erhalten.

## 5. Experimenteller Teil

### 5.1 Verwendete Lösungsmittel und Analysemethoden

#### Chemikalien

Die in dieser Arbeit genutzten Chemikalien wurden von den Firmen *Acros Organics*, *Bachem*, *Fluka*, *Merck* und *Sigma Aldrich* erworben. Weiterhin wurden diese in der angegebenen Qualität, falls nicht anders angegeben, verwendet.

#### Lösungsmittel

Die für die Säulenchromatographie verwendeten technisch hergestellten Lösungsmittel, Cyclohexan und Essigsäureethylester, wurden vor Gebrauch destillativ aufgereinigt. Bei allen anderen Lösungsmitteln handelte es sich um *p.a.*-Ware bzw. um abs. Lösungsmittel, wie Aceton, Acetonitril, Dichlormethan, DMF, Methanol und Tetrachlormethan, welche vom Chemikalienfachhändler *Acros Organics* erworben wurden.

#### Chromatographie

Dünnschichtchromatographien wurden auf Polygram DC-Platten (SIL G/UV254) der Firma *Macherey-Nagel* durchgeführt. Das eingesetzte Kieselgel 60 (40-63  $\mu\text{m}$ , 230-400 mesh), wurde von der Firma *Merck* erworben. Zum Anfärben der DC-Platten wurde eine CAM-Lösung verwendet. Diese hatte folgende Zusammensetzung: 2 g Cer(IV)-sulfat, 50 g Ammoniummolybdat $\cdot$ 4 H<sub>2</sub>O in 500 mL 30 %iger Schwefelsäure.

#### Gelpermeationschromatographie (GPC)

GPC-Messungen wurden mit einem Gerät der Firma *Jasco* mit einer PU-980 Pumpe und einem RI-930 Detektor durchgeführt. Bei Vermessung von anionischen Polymeren, wurden zwei *HEMA*-Bio-Linear 300 x 80 mm Säulen verwendet. Als Lösungsmittel diente eine 0.01 M NaN<sub>3</sub>-Lösung. Alternativ wurden bei kationischen Polymeren zwei *NOVEMA*-Max 300 x 80 mm Säulen verwendet unter Einsatz von 0.3 M Essigsäure als Lösungsmittel.

### **Isotherme Mikrokalorimetrie (ITC)**

ITC-Messungen wurden an einem *MicroCal* VP-ITC Kalorimeter durchgeführt.

### **Gefriertrocknung**

In einer Lyophylle, der Firma *Christ* des Modells Alpha 2-4 LSC, erfolgte die Gefriertrocknung der Polymer-Lösungen.

### **Massenspektrometrie**

Hochaufgelöste Massenspektren wurden mit einem *Bruker* maXis 4G und einem *Bruker* BioTOF III Flugzeit-Massenspektrometer mit ESI-Ionenquellen aufgenommen. Niedrigaufgelöste Massenspektren wurden in einem *Bruker* amaZon SL-Massenspektrometer aufgenommen.

### **NMR-Spektroskopie**

Die vermessenen  $^1\text{H}$ - und  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren wurden unter Einsatz eines *Bruker* DMX 300-Gerätes (300 MHz) aufgenommen. Für genauere  $^1\text{H}$ -NMR Auswertungen, sowie für  $^{13}\text{C}$ -, DEPT 90-, DEPT 135-Auswertungen, wurde ein DRX 500-Gerät (500 MHz) oder alternativ ein Advance-III-HD 600-Gerät (600 MHz) der Firma *Bruker* genutzt. Weiterhin wurden mit diesem auch 2D-Messungen (HMBC; HSQC;  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY;  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -COSY) durchgeführt. Die chemische Verschiebung  $\delta$  wird in ppm angegeben und bezieht sich auf die Standardverschiebungen der eingesetzten deuterierten Lösungsmittel.

Für die Auswertung der NMR-Spektren wurden folgende Abkürzungen genutzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, m = Multipllett, dd = Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplett, sb = breites Singulett.

### **Thermomixer**

Die Polymerisationen, welche zur Methodenoptimierung dienten, wurden in einem *Eppendorf* Thermomixer durchgeführt. Für alle anderen Polymerisationen wurde ein HLC-Heating MHL 23 Thermomixer der Firma *Ditabis* verwendet.

## Ultrafiltration

Für die Filtration der Polymere wurden 2 mL Amicon Ultra 3K Membranfilter der Firma *Millipore* verwendet. Zur Zentrifugation wurde eine *Eppendorf* Zentrifuge 5706 genutzt.

## UV/Vis- und Fluoreszenz-Spektroskopie

Die Aufnahme der Absorptionsspektren erfolgte auf einem Infinite M200 Mikroplatten-Reader der Firma *Tecan*. Transparente wie auch schwarze 96-well-Platten aus Polystyrol der Firma *BD Falcon* dienten hierbei als Küvetten.

## 5.2 Verwendete Puffer

### Darstellung des $\alpha$ -Carboxypeptidase-Assay-Puffers

Es wurde der im Assay Kit enthaltene Puffer verwendet, der einen pH-Wert von 8 besaß.

### Darstellung des Cathepsin D-Assay-Puffers

Es wurde der im Assay Kit enthaltene Puffer verwendet, der einen pH-Wert von 4 besaß.

### Darstellung des $\alpha$ -Chymotrypsin-TRIS-Puffers

3.03 g (25.0 mmol) TRIZMA-Base, 2.92 g (50.0 mmol) NaCl sowie 0.93 g (2.5 mmol) EDTA wurden in 480 mL bidest. Wasser gelöst und mit 1.0 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 8.0 eingestellt. Anschließend wurde auf ein Gesamtvolumen von 500 mL mit bidest. Wasser verdünnt.

### Darstellung des Elastase-TRIZMA-Puffers

3.03 g (25.0 mmol) TRIZMA-Base wurden in 240 mL bidest. Wasser gelöst und mit 1.0 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 8.0 eingestellt. Anschließend wurde auf ein Gesamtvolumen von 250 mL mit bidest. Wasser verdünnt.

**Darstellung des Kallikrein-TRIS-Puffers**

1.21 g (10.0 mmol) TRIZMA-Base sowie 2.92 g (50.0 mmol) NaCl wurden in 480 mL bidest. Wasser gelöst und mit 1.0 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 7.8 eingestellt. Anschließend wurde auf ein Gesamtvolumen von 500 mL mit bidest. Wasser verdünnt.

**Darstellung des Thrombin-HEPES-Puffers**

2.98 g (12.5 mmol) HEPES, sowie 2.92 g (50.0 mmol) NaCl wurden in 240 mL bidest. Wasser gelöst und mit 2.0 M Natronlauge auf einen pH-Wert von 7.5 eingestellt. Anschließend wurde auf ein Gesamtvolumen von 250 mL mit bidest. Wasser verdünnt.

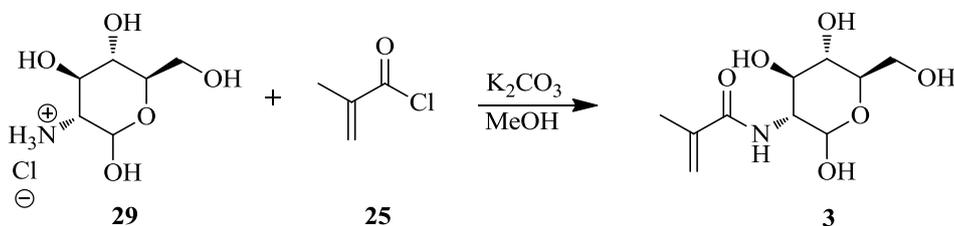
**Darstellung des Trypsin-TRIS/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffers**

4.72 g (37.5 mmol)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , sowie 4.54 g (37.5 mmol) TRIZMA-Base wurden in 480 mL bidest. Wasser gelöst und mit 1.0 M Salzsäure auf einen pH-Wert von 8.0 eingestellt. Anschließend wurde auf ein Gesamtvolumen von 500 mL mit bidest. Wasser verdünnt.

## 5.3 Synthese der Monomer-Bausteine

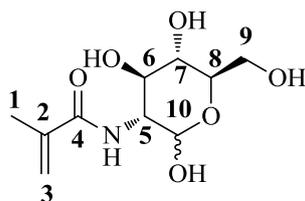
### 5.3.1 Synthese des Glucose-Monomers (3)

#### 5.3.1.1 Darstellung von *N*-2-Glucosylmethacrylamid (3)<sup>[138]</sup>



10.00 g (46.4 mmol, 1.1 eq.) Glucosaminhydrochlorid **29** sowie 6.41 g (46.4 mmol, 1.1 eq.) Kaliumcarbonat wurden in 250 mL abs. Methanol suspendiert. Die auf -10 °C gekühlte Suspension wurde innerhalb von 30 min mit 4.04 mL (4.36 g, 41.7 mmol, 1.0 eq.) Methacrylsäurechlorid **25** versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde nach vollständiger Zugabe 30 min bei -10 °C und 3 h bei RT gerührt und anschließend weitestgehend vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Rohprodukt wurde auf Celite aufgenommen und säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH = 6:1) gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde ein weißer kristalliner Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 2.46 g (10.0 mmol, 24 %). **R<sub>F</sub>** = 0.40 (DCM/MeOH = 4:1).



**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = **1.96** (s, 3H, H-1), **3.46–3.99** (m, 6H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9), **5.25** (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 3.6 Hz, 0.5H, H-10), **5.49** (s, 1H, H-3a), **5.72** (s, 1H, H-3b).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = **17.8**, **17.8** (C-1), **54.3**, **56.9**, **60.6**, **60.8**, **70.0**, **70.2**, **70.6**, **71.6**, **73.8**, **76.0**, **90.9**, **94.9** (C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10), **121.1**, **121.2** (C-3), **139.2**, **139.4** (C-2), **172.8**, **172.9** (C-4).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): für C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>NNaO<sub>6</sub>: berechnet: 270.0948; gefunden: 270.0982.

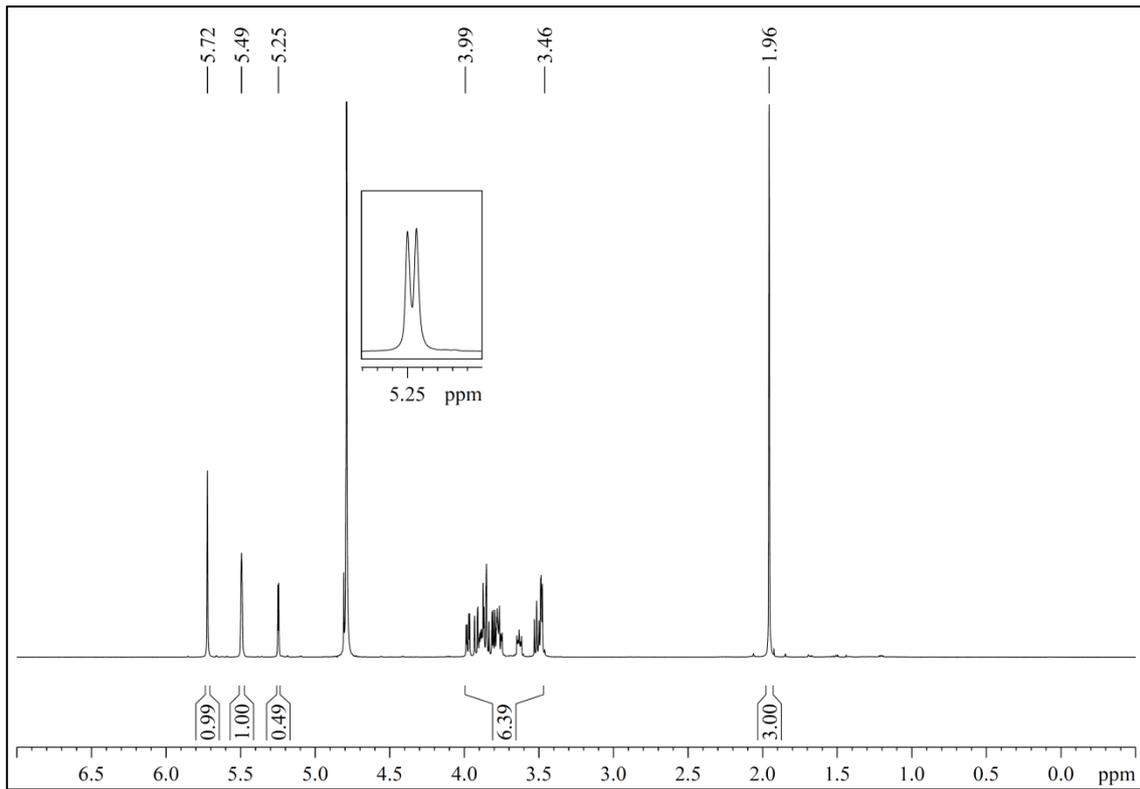


Abb. 5.3.1:  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von *N*-2-Glucosylmethacrylamid **3**.

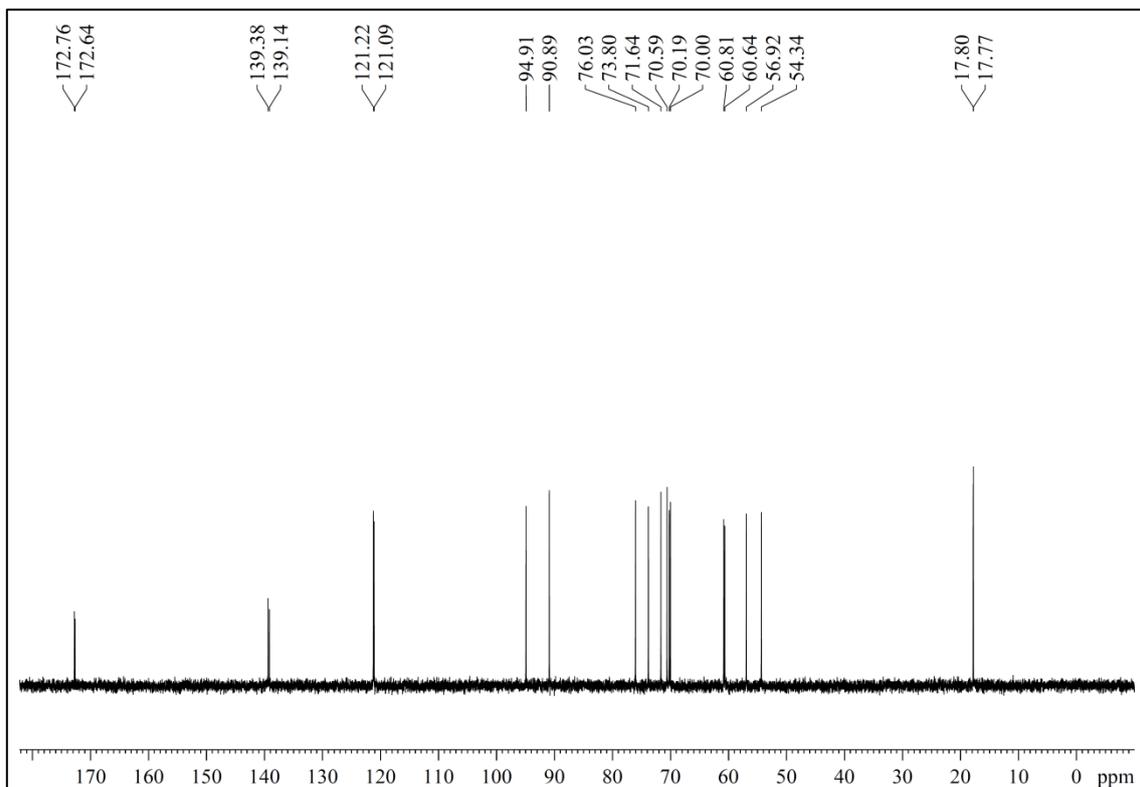
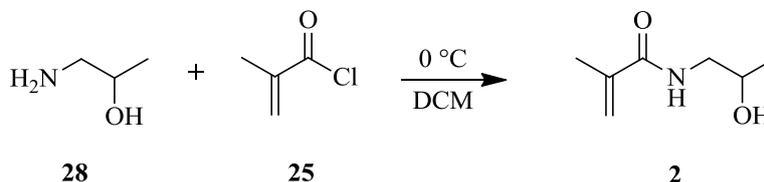


Abb. 5.3.2:  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von *N*-2-Glucosylmethacrylamid **3**.

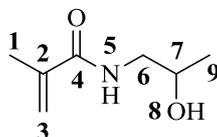
### 5.3.2 Synthese des Isopropanol-Monomers (2)

#### 5.3.2.1 Darstellung von *N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylsäureamid (2)<sup>[121]</sup>



Unter Argon Atmosphäre wurde eine Lösung aus 2.52 mL (2.72 g, 26.0 mmol, 1.0 eq.) Methacrylsäurechlorid **25** und 40 mL abs. Dichlormethan innerhalb von 2 h bei 0 °C zu einer Lösung aus 4.34 mL (4.21 g, 56.1 mmol, 2.2 eq.) 1-Aminopropan-2-ol **28** und 40 ml abs. Dichlormethan zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde die Suspension 30 min bei 0 °C gerührt und anschließend filtriert. Das Filtrat welches weitestgehend vom Lösungsmittel befreit werden konnte, wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH = 14:1) gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels konnte ein weißer Feststoff erhalten werden.

**Ausbeute:** 2.26 g (15.8 mmol, 61 %).  $R_F = 0.33$  (DCM/MeOH = 14:1).



**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = **1.17** (d,  $^3J_{H,H} = 6.4$  Hz, 3H, H-9), **1.94** (s, 3H, H-1), 3.25 (dd,  $^3J_{H,H-7} = 7.0$  Hz,  $^2J_{H,H-6b} = 14.1$  Hz, 1H, H-6a), **3.32** (dd,  $^3J_{H,H-7} = 4.7$  Hz,  $^2J_{H,H-6a} = 14.1$  Hz, 1H, H-6b), **3.93-3.99** (m, 1H, H-7), **5.46** (s, 1H, H-3a), **5.71** (s, 1H, H-3b).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = **17.7** (C-1), **19.5** (C-9), **46.3** (C-6), **66.3** (C-7), **121.1** (C-3), **139.1** (C-2), **172.2** (C-4).

**MS** (ESI, pos., MeOH): für C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>NNaO<sub>2</sub>: berechnet: 166.04; gefunden: 166.08.

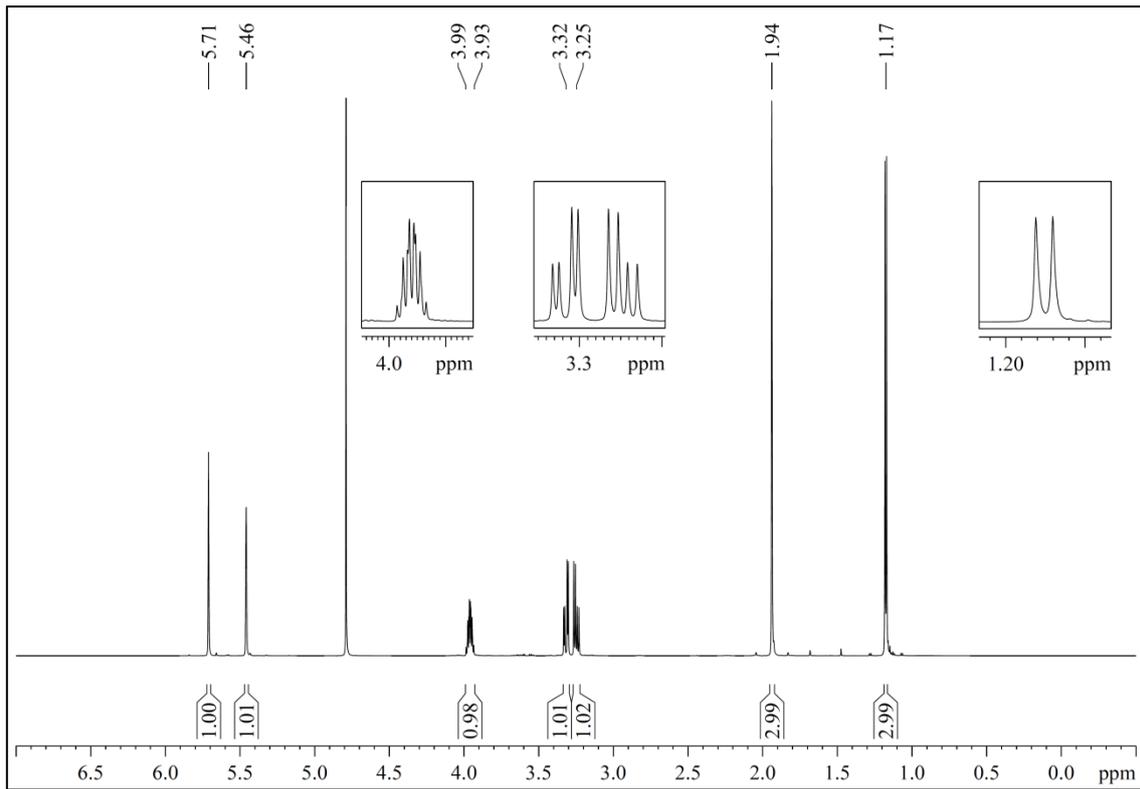


Abb. 5.3.3: <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O) von *N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid **2**.

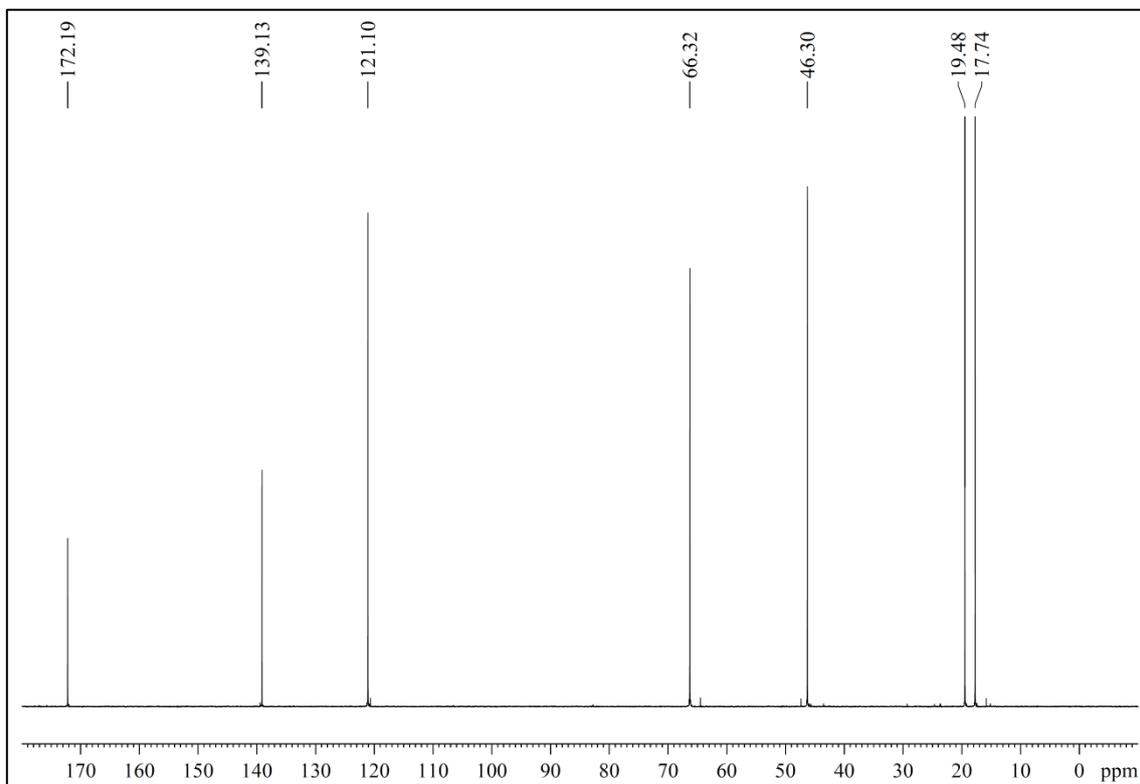
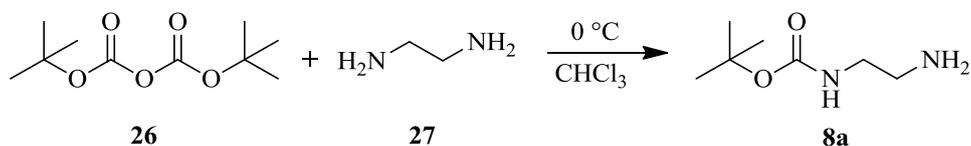


Abb. 5.3.4: <sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, D<sub>2</sub>O) von *N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid **2**.

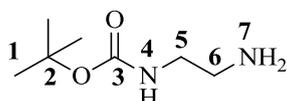
### 5.3.3 Synthese des Ethylendiamin-Monomers (8)

#### 5.3.3.1 Darstellung von *N*-Boc-Ethylendiamin (8a)<sup>[122]</sup>



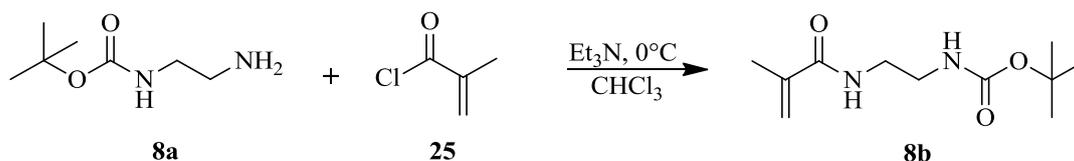
27.6 mL (24.8 g, 413 mmol, 9.0 eq.) Ethylendiamin **27** wurde mit 200 mL Chloroform verdünnt. Die auf 0 °C gekühlte Lösung wurde innerhalb von 30 min tropfenweise mit einer Lösung aus 10.0 g (45.8 mmol, 1.0 eq.) Di-*tert*-butylcarbonat **26** und 80 mL Chloroform versetzt. Nach vollständiger Zugabe wurde 12 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde weitestgehend vom Lösungsmittel befreit und in 200 mL VE-Wasser aufgenommen. Der unlösliche Feststoff wurde abfiltriert und die wäßrige Phase mehrmals mit 150 mL Dichlormethan extrahiert. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Es wurde ein farbloses Öl erhalten.

**Ausbeute:** 7.0 g (43.7 mmol, 95 %).



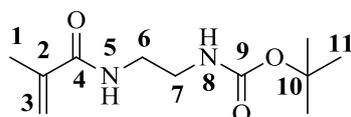
<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = **1.24** (sb, 2H, H-7), **1.44** (s, 9H, H-1), **2.79** (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 6.2 Hz, 2H, H-5), **3.16** (q, 2H, H-6), **4.89** (sb, 1H, H-4).

### 5.3.3.2 Darstellung von *N*-{2-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]ethyl}methacrylamid (**8b**)<sup>[122]</sup>



6.80 g (42.4 mmol, 1.00 eq.) *N*-Boc-Ethylenediamin **8a** und 17.1 mL (12.5 g, 123 mmol, 2.90 eq.) Triethylamin wurden in 80 mL Chloroform gelöst. Die auf 0 °C gekühlte Lösung wurde innerhalb von 8 h tropfenweise mit einer Lösung aus 4.60 mL (4.98 g, 47.5 mmol, 1.12 eq.) Methacrylsäurechlorid **25** in 50 mL Chloroform versetzt und 2 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mehrmals mit 100 mL VE-Wasser gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels bei vermindertem Druck wurde das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (EE). Es wurde ein weißer kristalliner Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 8.21 g (36.0 mmol, 85 %).  $R_F = 0.55$  (EE).

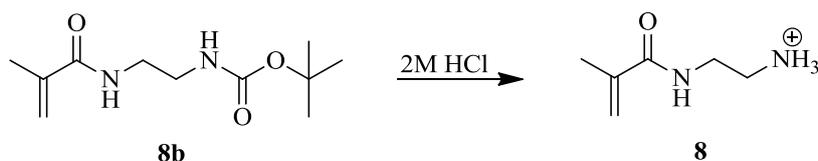


**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = **1.37** (s, 9H, H-11), **1.84** (s, 3H, H-1), **3.01** (q, 2H, H-6, H-7), **3.13** (m, 2H, H-6, H-7), **5.03** (s, 1H, H-3a), **5.64** (s, 1H, H-3b), **6.85** (sb, 1H, H-8), **7.87** (sb, 1H, H-5).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = **18.5** (C-1), **28.2** (C-11), **39.3**, **39.3** (C-6, C-7), **77.6** (C-10), **119.0** (C-3), **139.9** (C-2), **155.7** (C-9), **167.5** (C-4).

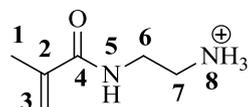
**HRMS** (ESI, pos., MeOH): für C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>3</sub>: berechnet: 251.1366; gefunden: 251.1379.

### 5.3.3.3 Darstellung von *N*-(2-Aminoethyl)methacrylamid Hydrochlorid (**8**)<sup>[122]</sup>



8.20 g (36.0 mmol, 1.0 eq.) der Substanz **8b** wurden mit 90.0 mL einer 2 M Salzsäure (180 mmol, 5.0 eq.) versetzt und 12 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels mit Hilfe des Rotationsverdampfers, sowie Resttrocknung mittels Ölpumpenvakuum, wurde ein beigefarbenes Öl erhalten.

**Ausbeute:** Quantitativ mit Spuren an HCl.



<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = **1.92** (s, 3H, H-1), **3.18** (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.9 Hz, 2H, H-7), **3.56** (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 5.9 Hz, 2H, H-6), **5.49** (s, 1H, H-3a), **5.76** (s, 1H, H-3b).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = **17.7** (C-1), **37.1** (C-6), **39.4** (C-7), **122.1** (C-3), **138.5** (C-2), **172.5** (C-4).

HRMS (ESI, pos., MeOH): für C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O: berechnet: 129.1022; gefunden: 129.1020.

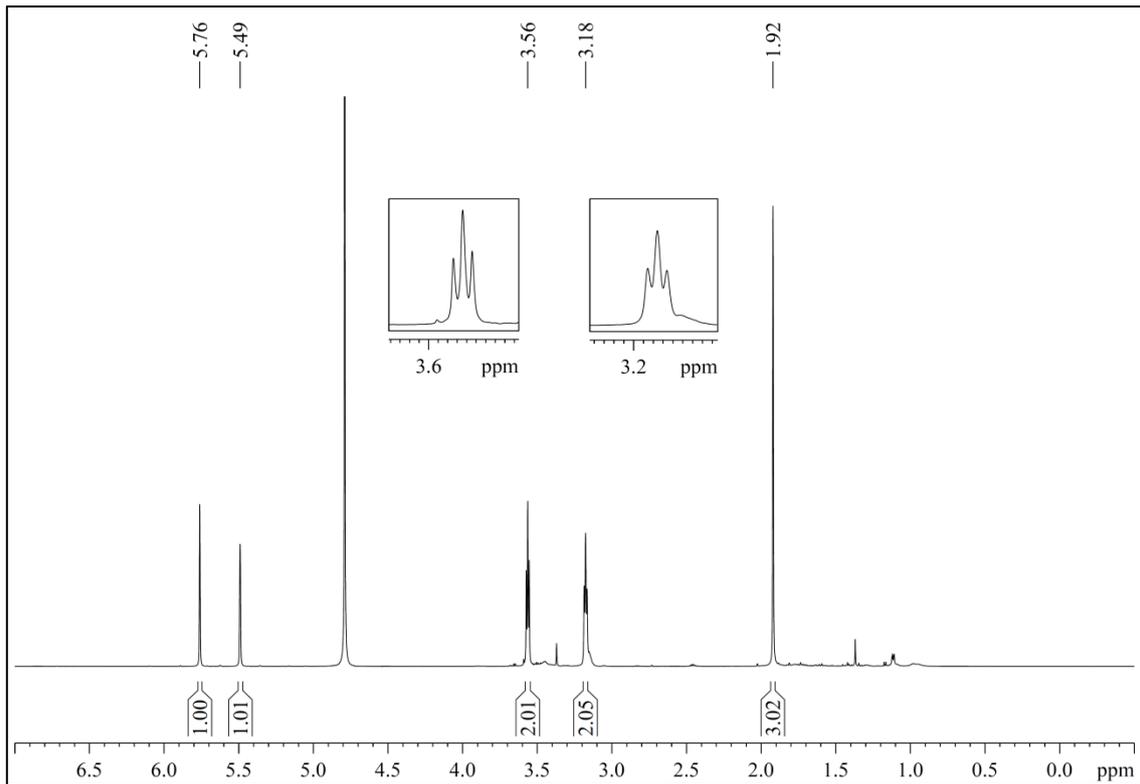


Abb. 5.3.5:  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von *N*-(2-Aminoethyl)methacrylamid Hydrochlorid **8**.

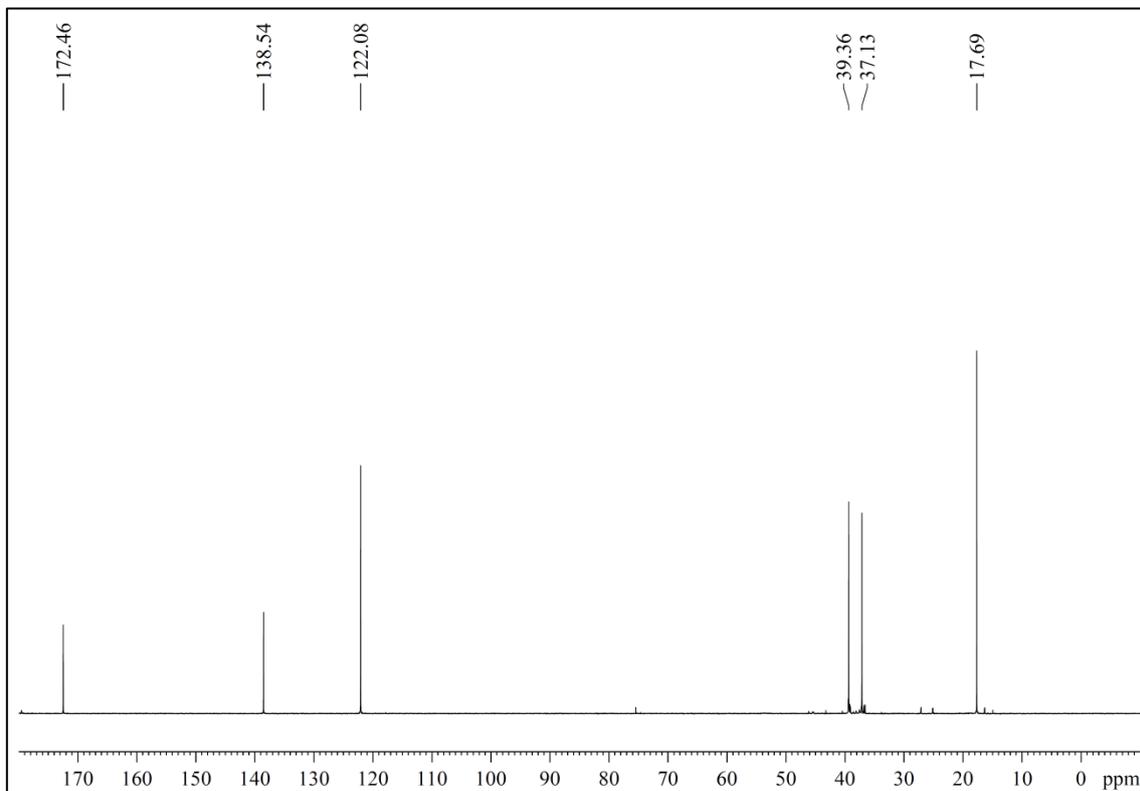
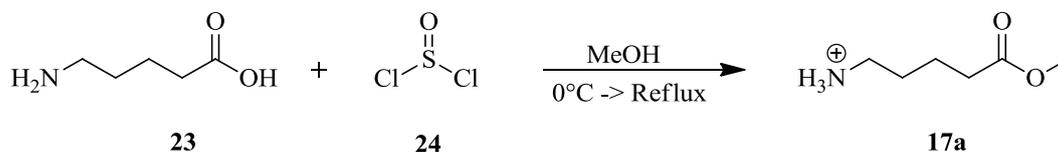


Abb. 5.3.6:  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von *N*-(2-Aminoethyl)methacrylamid Hydrochlorid **8**.

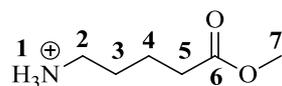
### 5.3.4 Synthese des C<sub>5</sub>-Spacer-Monomers (17)

#### 5.3.4.1 Darstellung von 5-Aminopentansäuremethylester Hydrochlorid (17a)<sup>[216]</sup>



3.25 g (27.7 mmol, 1.0 eq.) 5-Aminopentansäure **23** wurde in 11.3 mL (8.90 g, 279 mmol, 10.0 eq.) tr. Methanol suspendiert. Unter Eiskühlung wurde diese tropfenweise mit 6.0 mL (9.80 g, 82.7 mmol, 3.0 eq.) Thionylchlorid **24** versetzt. Nach vollständiger Zugabe wurde das Reaktionsgemisch vorsichtig erwärmt und für 12 h refluxiert. Das Lösungsmittel wurde mit Hilfe des Rotationsverdampfers entfernt. Die Resttrocknung erfolgte mittels Ölpumpenvakuum unter Bildung eines beigefarbenen kristallinen Feststoffes.

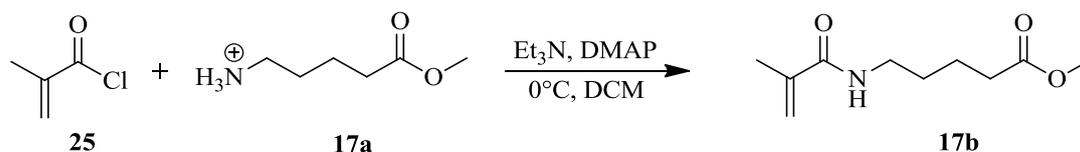
**Ausbeute:** 4.49 g (26.8 mmol, 97 %).



**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>): δ [ppm] = **1.66-1.73** (m, 4H, H-3, H-4), **2.38-2.44** (m, 2H, H-5), **2.91-2.97** (m, 2H, H-2), **3.67** (s, 2H, H-7),.

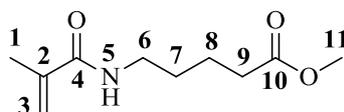
**HRMS (ESI, pos., MeOH):** für C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub>:            berechnet: 132.1019; gefunden: 132.1005,  
für C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NNaO<sub>2</sub>:            berechnet: 154.0838; gefunden: 154.0818.

### 5.3.4.2 Darstellung von 5-Methacrylamidpentansäuremethylester (17b)



3.49 g (20.8 mmol, 1.0 eq.) **17a** wurden in 175 mL Dichlormethan gelöst und nacheinander mit 8.7 mL (6.35 g, 62.8 mmol, 3.0 eq.) Triethylamin sowie katalytischen Mengen DMAP versetzt. Die Reaktionslösung wurde im Eisbad tropfenweise mit einer Lösung aus 3.10 mL (3.30 g, 31.6 mmol, 1.5 eq.) Methacrylsäurechlorid **25** und 90 mL Dichlormethan versetzt. Nach vollständiger Zugabe, wurde das Reaktionsgemisch unter Argon-Atmosphäre für 12 h gerührt. Die Lösung wurde mehrmals mit Wasser gewaschen und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Unter vermindertem Druck, wurde das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene Öl wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (EE). Es wurde ein beigefarbenes Öl erhalten.

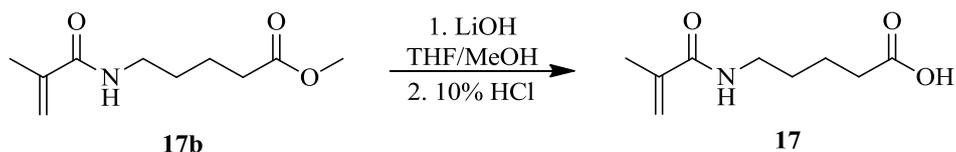
**Ausbeute:** 3.82 g (19.2 mmol, 92 %).  $R_F = 0.55$  (EE).



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = **1.37-1.56** (m, 4H, H-7, H-8), **1.83** (s, 3H, H-1), **2.31** (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$  Hz, 2H, H-9), **3.08** (q, 2H, H-6), **3.57** (s, 3H, H-11), **5.28** (s, 1H, H-3a), **5.61** (s, 1H, H-3b), **7.88** (sb, 1H, H-5).

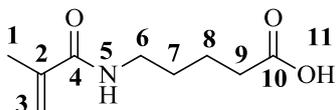
**HRMS** (ESI, pos., MeOH): für  $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NNaO}_3$ : berechnet: 222.1101; gefunden: 222.1099.

### 5.3.4.3 Darstellung von 5-Methacrylamidpentansäure (17)



3.82 g (19.2 mmol, 1.0 eq.) **17b** wurden in 96 mL THF/MeOH (2:1) gelöst und mit einer Lösung aus 2.42 g (57.6 mmol, 3.0 eq.) LiOH • H<sub>2</sub>O und wenig VE-Wasser versetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 Tage gerührt und anschließend bei vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde mit wenig VE-Wasser aufgenommen und tropfenweise mit einer 10 %igen HCl angesäuert. Die saure Lösung wurde mehrmals mit Essigester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels mit Hilfe des Rotationsverdampfers sowie Resttrocknung im Ölpumpenvakuum wurde ein gelbfarbener Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 2.84 g (15.3 mmol, 80 %).



**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = **1.41-1.50** (m, 4H, H-7, H-8), **1.84** (s, 3H, H-1), **2.21** (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.0 Hz, 2H, H-9), **3.09** (m, 2H, H-6), **5.29** (s, 1H, H-3a), **5.62** (s, 1H, H-3b), **7.89** (sb, 1H, H-5), **11.98** (sb, 1H, H-11).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = **18.7** (C-1), **21.9** (C-8), **28.6** (C-7), **33.3** (C-9), **38.4** (C-6), **118.7** (C-3), **140.1** (C-2), **167.3** (C-4), **174.4** (C-10).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): für C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>NNaO<sub>3</sub>: berechnet: 208.0944; gefunden: 208.0990.

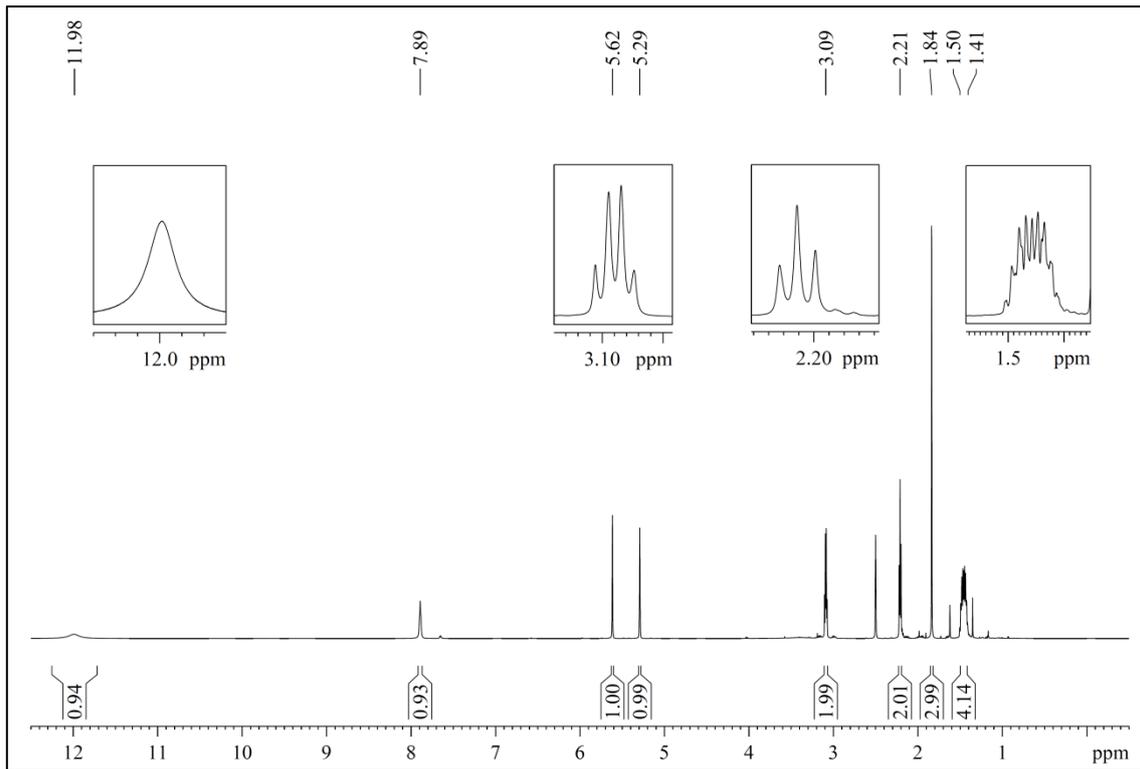


Abb. 5.3.7:  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) von 5-Methacrylamidpentansäure **17**.

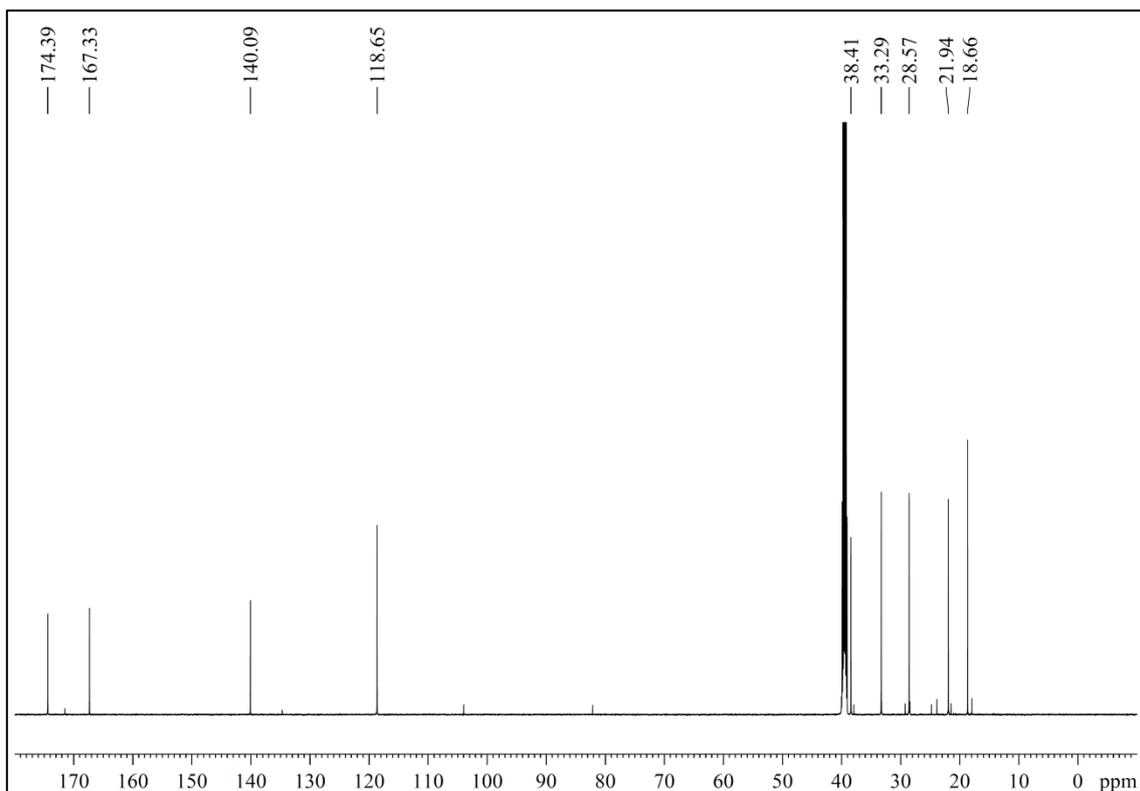
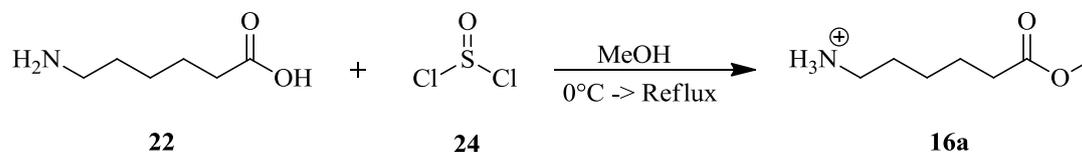


Abb. 5.3.8:  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) von 5-Methacrylamidpentansäure **17**.

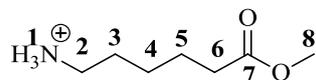
### 5.3.5 Synthese des C<sub>6</sub>-Spacer-Monomers (16)

#### 5.3.5.1 Darstellung von 6-Aminohexansäuremethylester Hydrochlorid (16)<sup>[216]</sup>



10.0 g (76.2 mmol, 1.0 eq.) 6-Aminohexansäure **22** wurde in 31 mL (24.5 g, 765 mmol, 10.0 eq.) tr. Methanol suspendiert. Unter Eiskühlung wurde diese tropfenweise mit 16.5 mL (27.1 g, 227 mmol, 3.0 eq.) Thionylchlorid **24** versetzt. Nach vollständiger Zugabe wurde das Reaktionsgemisch vorsichtig erwärmt und für 12 h refluxiert. Das Lösungsmittel wurde mit Hilfe des Rotationsverdampfers entfernt. Die Resttrocknung erfolgte mittels Ölpumpenvakuum unter Bildung eines weißen kristallinen Feststoffes.

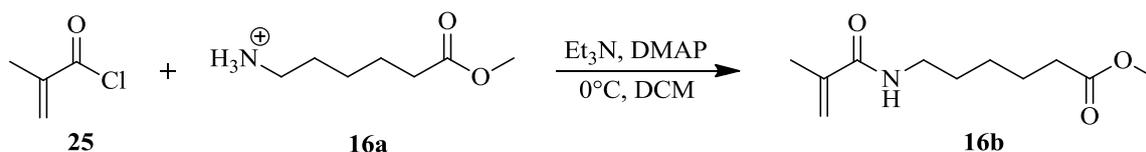
**Ausbeute:** Quantitativ mit Spuren von HCl.



**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>):  $\delta$  [ppm] = **1.37-1.49** (m, 2H, H-4), **1.59-1.73** (m, 4H, H-2, H-5), **2.37** (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.2 Hz, 2H, H-6), **2.92** (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.6 Hz, 2H, H-2), **3.66** (s, 3H, H-8).

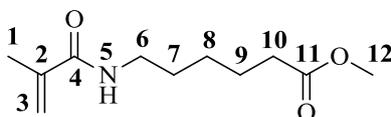
**HRMS (ESI, pos., MeOH):** für C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub>: berechnet: 146.1176; gefunden: 146.1169,  
für C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>NNaO<sub>2</sub>: berechnet: 168.0995; gefunden: 168.1000.

### 5.3.5.2 Darstellung 6-Methacrylamidhexansäuremethylester von (16b)



13.9 g (76.7 mmol, 1.0 eq.) **16a** wurden in 650 mL Dichlormethan gelöst und nacheinander mit 31.9 mL (23.3 g, 230 mmol, 3.0 eq.) Triethylamin sowie katalytischen Mengen DMAP versetzt. Die Reaktionslösung wurde im Eisbad tropfenweise mit einer Lösung aus 11.5 mL (12.0 g, 115 mmol, 1.5 eq.) Methacrylsäurechlorid **25** und 70 mL Dichlormethan versetzt. Nach vollständiger Zugabe wurde das Reaktionsgemisch unter Argon-Atmosphäre für 12 h gerührt. Die Lösung wurde mehrmals mit Wasser gewaschen und über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Unter vermindertem Druck wurde das Lösungsmittel entfernt. Das erhaltene Öl wurde auf Celite aufgenommen und säulenchromatographisch aufgereinigt (EE). Es wurde ein klares Öl erhalten.

**Ausbeute:** 14.1 g (66.1 mmol, 86 %).  $R_F = 0.55$  (EE).

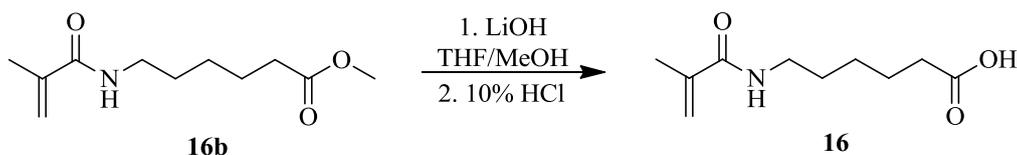


$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = **1.22-1.28** (m, 2H, H-8), **1.40-1.45** (m, 2H, H-7), **1.49-1.55** (m, 2H, H-9), **1.84** (s, 3H, H-1), **2.29** (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$  Hz, 2H, H-10), **3.08** (q, 2H, H-6), **3.58** (s, 3H, H-12), **5.29** (s, 1H, H-3a), **5.61** (s, 1H, H-3b), **7.87** (sb, 1H, H-5).

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = **18.7** (C-1), **24.1** (C-9), **25.8** (C-8), **28.7** (C-7), **33.2** (C-10), **38.6** (C-6), **51.1** (C-12), **118.6** (C-3), **140.1** (C-2), **167.3** (C-4), **173.3** (C-11).

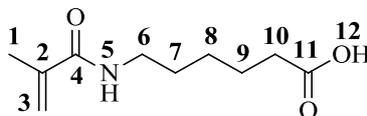
**HRMS** (ESI, pos., MeOH): für  $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NNaO}_3$ : berechnet: 236.1257; gefunden: 236.1292.

### 5.3.5.3 Darstellung von 6-Methacrylamidhexansäure (16)



14.0 g (65.6 mmol, 1.0 eq.) **16b** wurden in 300 mL THF/MeOH (2:1) gelöst und mit einer Lösung aus 8.26 g (197 mmol, 3.0 eq.) LiOH • H<sub>2</sub>O und wenig VE-Wasser versetzt. Die Reaktionslösung wurde 3 Tage gerührt und anschließend bei vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde mit wenig VE-Wasser aufgenommen und tropfenweise mit einer 10 %igen HCl angesäuert. Die saure Lösung wurde mehrmals mit Essigester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels mit Hilfe des Rotationsverdampfers, sowie Resttrocknung im Ölpumpenvakuum, wurde ein leicht beigefarbener Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 11.9 g (59.7 mmol, 91 %).



**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = **1.22-1.28** (m, 2H, H-8), **1.40-1.52** (m, 4H, H-7, H-9), **1.84** (s, 3H, H-1), **2.19** (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 2H, H-10), **3.08** (m, 2H, H-6), **5.29** (s, 1H, H-3a), **5.61** (s, 1H, H-3b), **7.87** (sb, 1H, H-5), **11.99** (sb, 1H, H-12).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = **18.7** (C-1), **24.2** (C-9), **26.0** (C-8), **28.8** (C-7), **33.7** (C-10), **38.6** (C-6), **118.6** (C-3), **140.1** (C-2), **167.3** (C-4), **174.4** (C-11).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): für C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>NNaO<sub>3</sub>: berechnet: 222.1101; gefunden: 222.1127.

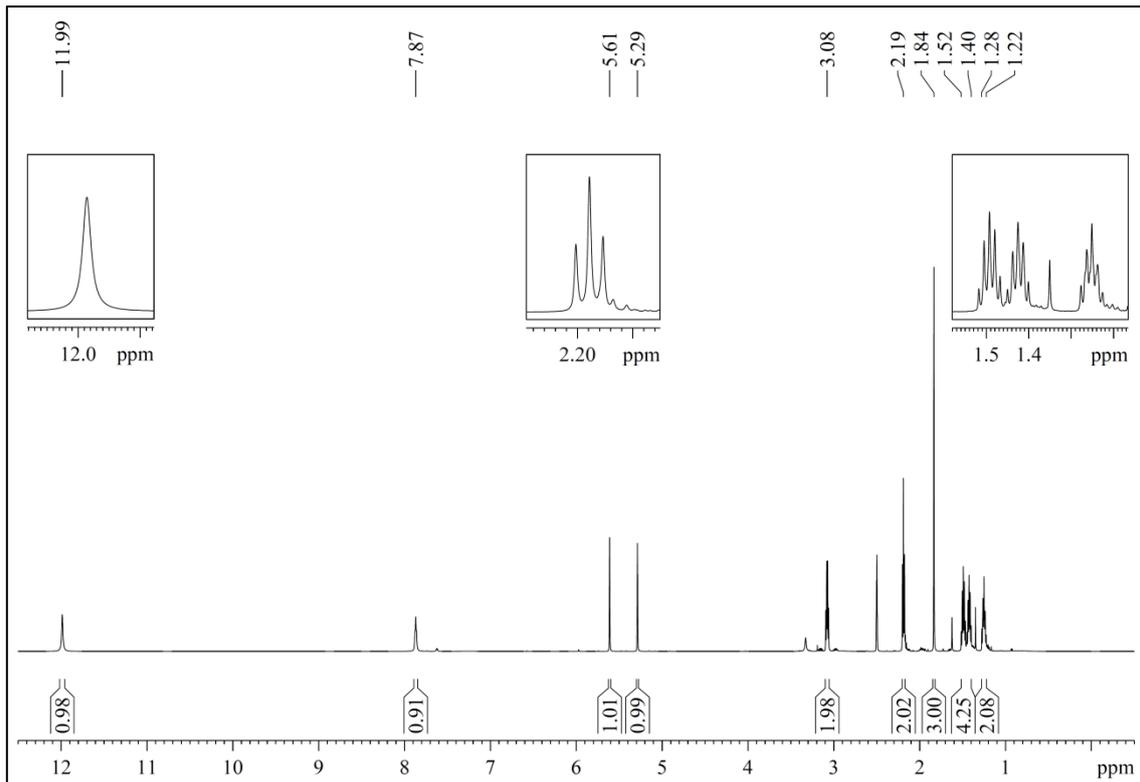


Abb. 5.3.9:  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) von 6-Methacrylamidhexansäure **16**.

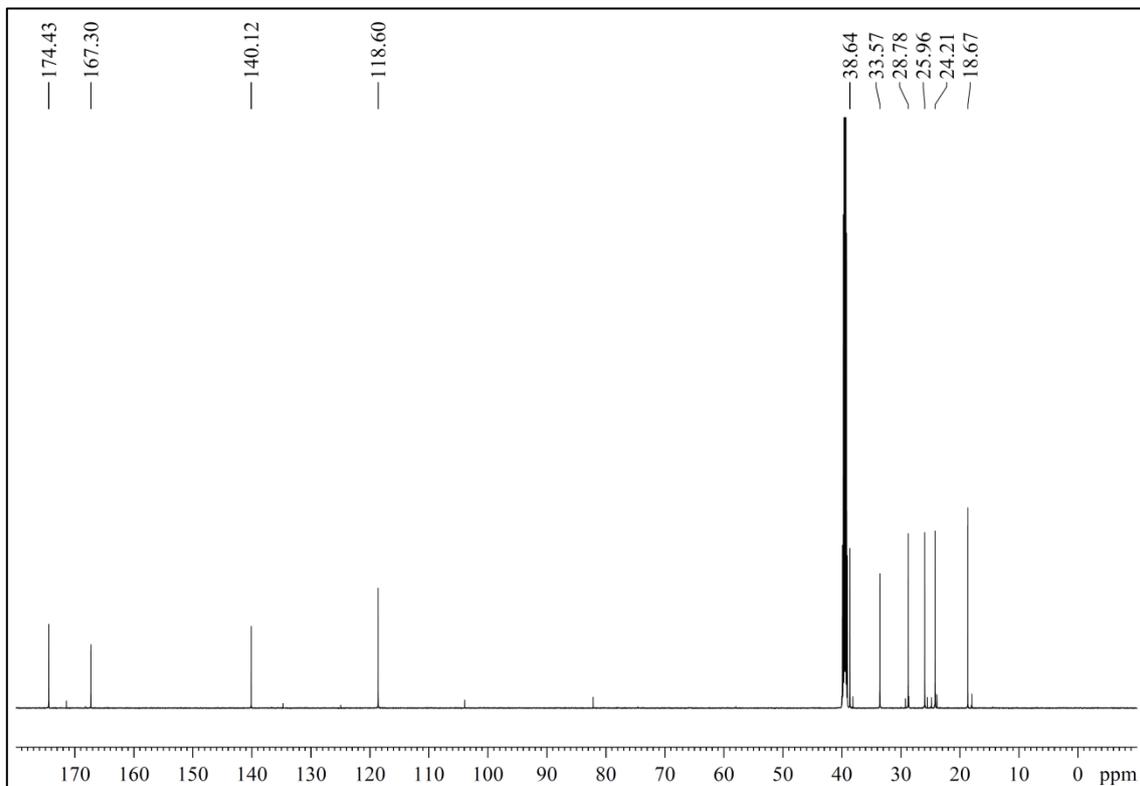
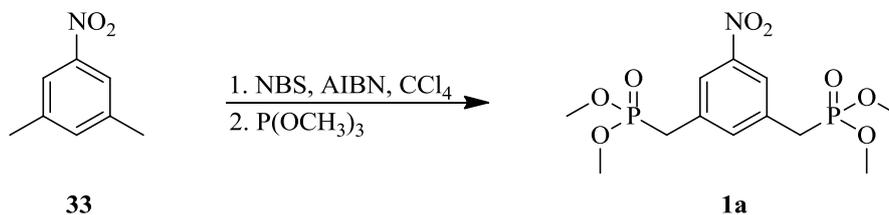


Abb. 5.3.10:  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) von 6-Methacrylamidhexansäure **16**.

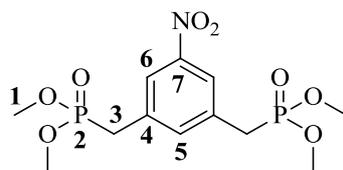
### 5.3.6 Synthese des Bisphosphonat-Monomers (1)

#### 5.3.6.1 Darstellung von 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)nitrobenzol (**1a**)<sup>[122]</sup>



Eine Lösung aus 5.0 g (33.1 mmol, 1.0 eq.) 5-Nitro-*m*-xylol **33** und 250 mL Tetrachlormethan, wurde mit 12.3 g (69.1 mmol, 2.1 eq.) *N*-Bromsuccinimid, sowie einer katalytischen Menge AIBN versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde so lange refluxiert, bis das entstandene Succinimid sich an der Flüssigkeitsoberfläche absetzte. Diese Suspension wurde filtriert und der Filtrerrückstand mehrmals mit wenig Tetrachlormethan nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden mit Hilfe einer Destillation vom Lösungsmittel befreit. Der gelbfarbene ölige Rückstand (10.3 g) wurde ohne Aufreinigung für den nächsten Syntheseschritt verwendet. Das Rohprodukt wurde mit 10.1 mL (10.6 g, 85.5 mmol, 2.6 eq.) Trimethylphosphit versetzt und für 5 h refluxiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mittels Kondensation vom überschüssigen Trimethylphosphit befreit. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/EtOH = 19:1). Nach der Aufreinigung wurde ein gelbfarbener Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 2.61 g (7.1 mmol, 22 %).  $R_F = 0.15$  (DCM/EtOH = 9:1).



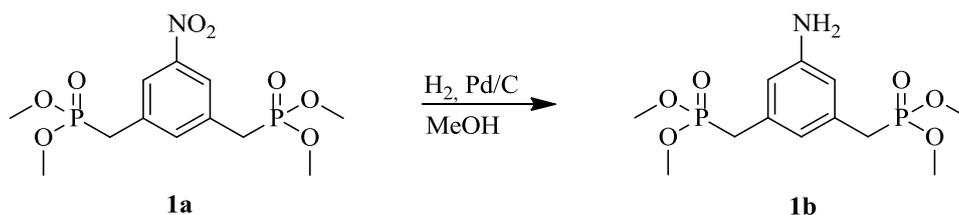
**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = **3.24** (d,  $^2J_{H,P} = 22.0$  Hz, 4H, H-3), **3.72** (d,  $^3J_{H,P} = 11.0$  Hz, 12H, H-1), **7.60** (s, 1H, H-5), **8.05** (s, 2H, H-6).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = **32.7** (d,  $^1J_{C,P} = 139$  Hz, C-3), **53.2** (C-1), **123.4** (C-6), **134.1** (C-4), **137.2** (C-5), **148.7** (C-7).

**<sup>31</sup>P-NMR** (243 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = **26.9** (P-2).

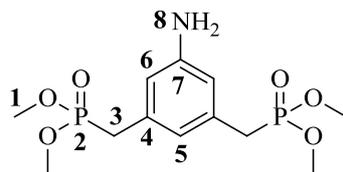
**HRMS (ESI, pos., MeOH):** für C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>8</sub>P<sub>2</sub>: berechnet: 368.0659; gefunden: 368.0711,  
für C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>NNaO<sub>8</sub>P<sub>2</sub>: berechnet: 390.0478; gefunden: 390.0537.

### 5.3.6.2 Darstellung von 3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)anilin (**1b**)<sup>[122]</sup>



2.55 g (6.93 mmol) **1a** wurden in 100 mL Methanol gelöst und mit 0.4 g (10 % Pd) Pd/C versetzt. Anschließend wurde 16 h unter Wasserstoff-Atmosphäre gerührt. Nach Umsatzkontrolle mittels DC, erfolgte eine Filtration über Celite. Das Filtrat wurde bei vermindertem Druck entfernt, unter Bildung eines grauen Feststoffes.

**Ausbeute:** 2.27 g (6.73 mmol, 97 %).  $R_F = 0.0$  (DCM/EtOH = 9:1).



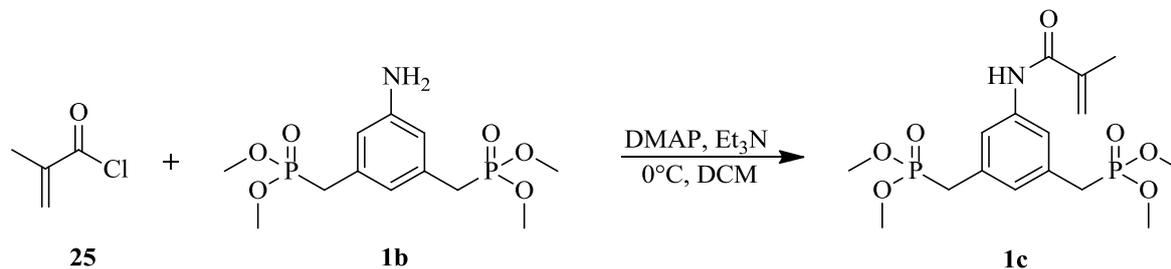
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = **3.05** (d,  $^2J_{\text{H,P}} = 21.9$  Hz, 4H, H-3), **3.67** (d,  $^3J_{\text{H,P}} = 10.7$  Hz, 12H, H-1), **6.59** (s, 2H, H-6), **6.62** (s, 1H, H-5).

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = **32.8** (d,  $^1J_{\text{C,P}} = 138$  Hz, C-3), **53.1** (C-1), **115.8** (C-6), **122.1** (C-5), **132.7** (C-4), **146.1** (C-7).

$^{31}\text{P-NMR}$  (243 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = **28.9** (P-2).

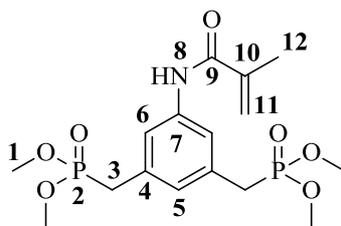
**HRMS** (ESI, pos., MeOH): für  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{NO}_6\text{P}_2$ : berechnet: 338.0917; gefunden: 338.0972,  
für  $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NNaO}_6\text{P}_2$ : berechnet: 360.0736; gefunden: 360.0802.

### 5.3.6.3 Darstellung von *N*-[3,5-Bis(dimethoxyphosphorylmethyl)phenyl]methacrylsäureamid (**1c**)<sup>[122]</sup>



2.05 g (6.1 mmol, 1.0 eq.) **1b** wurden in 50 mL Dichlormethan gelöst und nacheinander mit 0.95 mL (0.69 g, 6.8 mmol, 1.1 eq.) Triethylamin sowie einer katalytischen Menge DMAP versetzt. Unter Eiskühlung wurde tropfenweise eine Lösung aus 0.88 mL (0.95 g, 9.1 mmol, 1.5 eq.) Methacrylsäure **25** und 20 mL Dichlormethan hinzugegeben. Nach vollständiger Zugabe, wurde die Reaktionslösung 1 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mehrmals mit 0.6 M Natronlauge gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und letztlich bei vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der ölige Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH = 19:1). Nach der Aufreinigung wurde ein gelbfarbenes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 1.40 g (3.5 mmol, 57 %). **R<sub>F</sub>** = 0.1 (DCM/MeOH = 19:1).



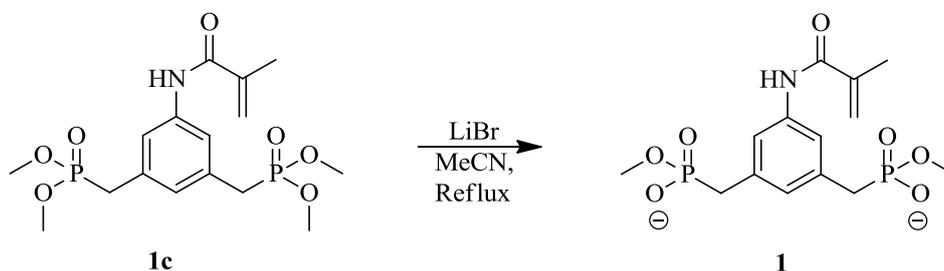
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = **2.04** (s, 3H, H-12), **3.13** (d, <sup>2</sup>J<sub>H,P</sub> = 21.9 Hz, 4H, H-3), **3.69** (d, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 10.8 Hz, 12H, H-1), **5.46** (s, 1H, H-11a), **5.80** (s, 1H, H-11b), **6.99** (s, 1H, H-5), **7.48** (s, 2H, H-6), **7.70** (sb, 1H, H-8).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = **18.9** (C-12), **32.7** (d, <sup>1</sup>J<sub>C,P</sub> = 138 Hz, C-3), **53.1** (C-1), **120.1** (C-6), **120.3** (C-11), **127.2** (C-5), **132.6** (C-4), **138.6** (C-7), **140.8** (C-10), **166.7** (C-9).

<sup>31</sup>P-NMR (243 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = **28.4** (P-2).

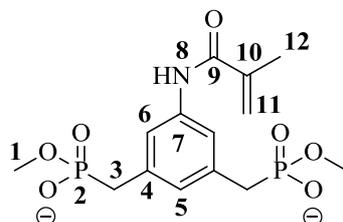
**HRMS (ESI, pos., MeOH):** für C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>7</sub>P<sub>2</sub>: berechnet: 406.1179; gefunden: 406.1234.

### 5.3.6.4 Darstellung von Dilithium-*N*-[3,5-bis(methoxyphosphorylmethyl)phenyl]-methacrylsäureamid (**1**)



1.05 g (2.59 mmol, 1.0 eq.) **1c** wurden unter Argon-Atmosphäre in 35 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 655 mg (7.54 mmol, 2.9 eq.) LiBr versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1 Tag refluxiert und nach dem Abkühlen zentrifugiert. Der Rückstand wurde 4-mal mit 15 mL abs. Acetonitril sowie 2-mal mit 15 mL tr. Diethylether gewaschen. Der beigefarbene Feststoff wurde im Ölpumpenvakuum restgetrocknet. Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 0.97 g (2.49 mmol, 96 %).

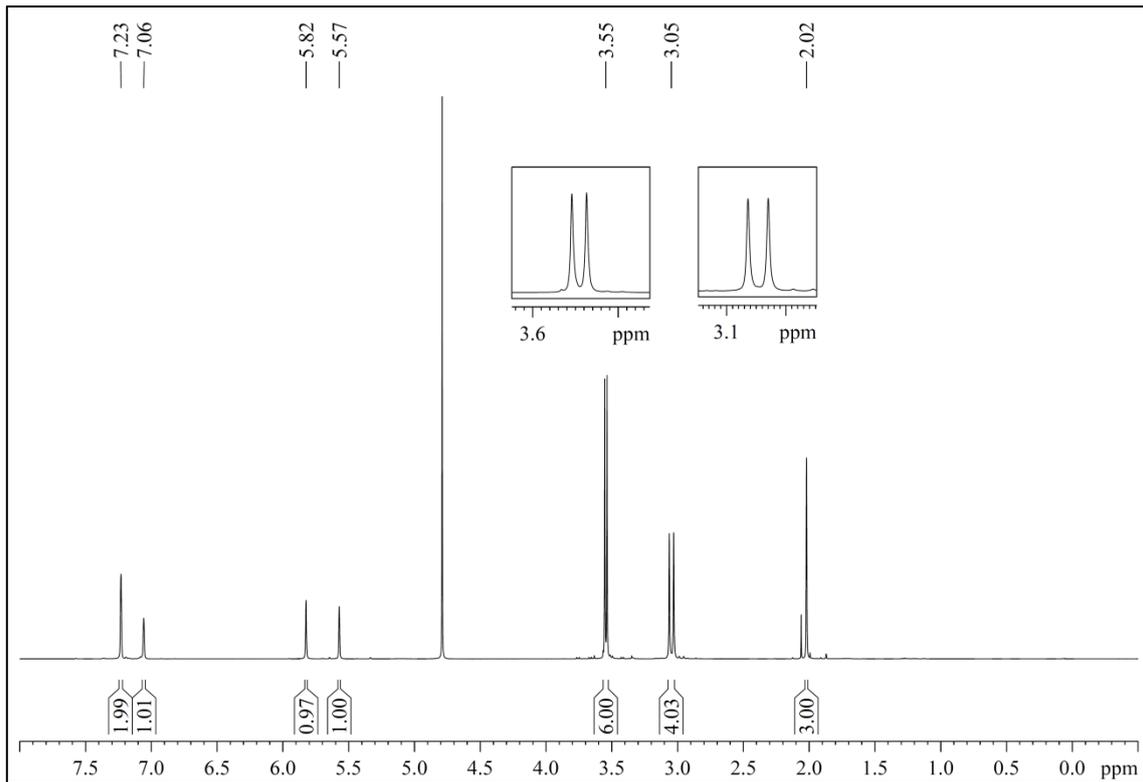


**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = **2.02** (s, 3H, H-12), **3.05** (d,  $^2J_{H,P} = 20.4$  Hz, 4H, H-3), **3.55** (d,  $^3J_{H,P} = 10.5$  Hz, 6H, H-1), **5.57** (s, 1H, H-11a), **5.82** (s, 1H, H-11b), **7.07** (s, 1H, H-5), **7.23** (s, 2H, H-6).

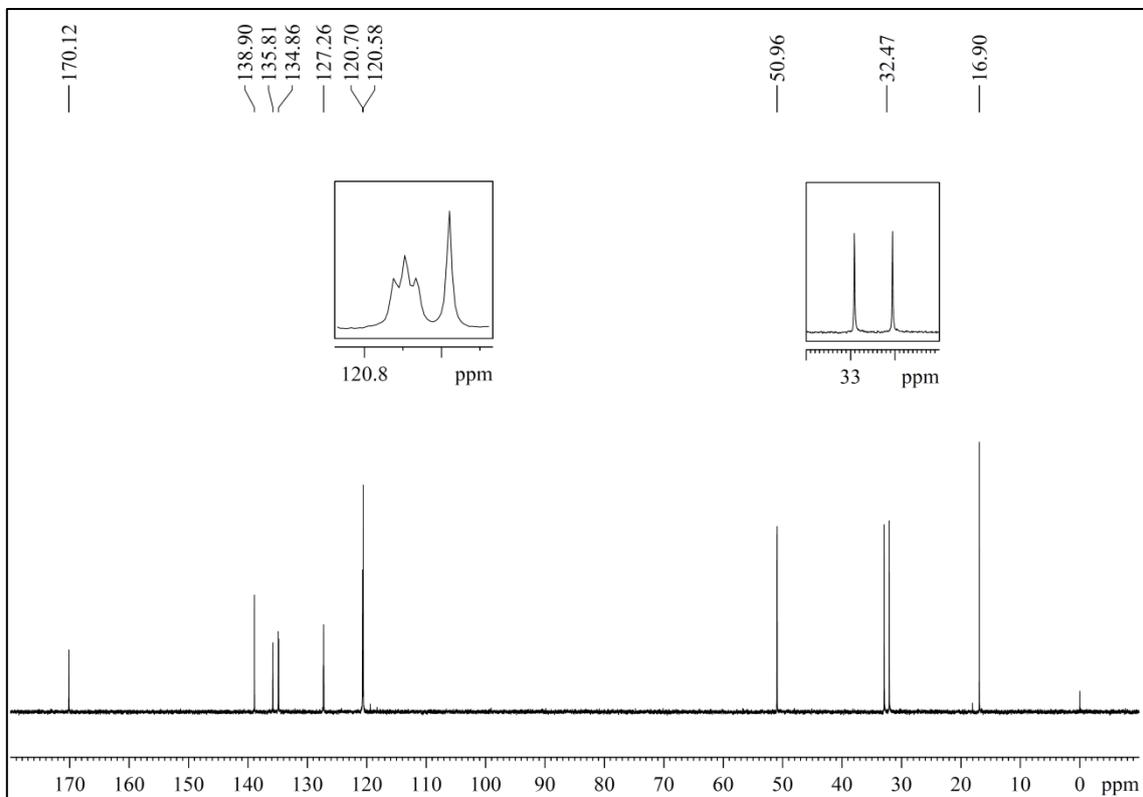
**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = **16.9** (C-12), **32.5** (d,  $^1J_{C,P} = 130$  Hz, C-3), **51.0** (C-1), **120.6** (C-11), **120.7** (C-6), **127.3** (C-5), **134.9** (C-4), **135.8** (C-7), **138.9** (C-10), **170.1** (C-9).

**<sup>31</sup>P-NMR** (243 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = **23.8** (P-2).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): für C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>Li<sub>2</sub>NO<sub>7</sub>P<sub>2</sub>: berechnet: 390.1030; gefunden: 390.1039,  
für C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>Li<sub>3</sub>NO<sub>7</sub>P<sub>2</sub>: berechnet: 396.1112; gefunden: 396.1124.



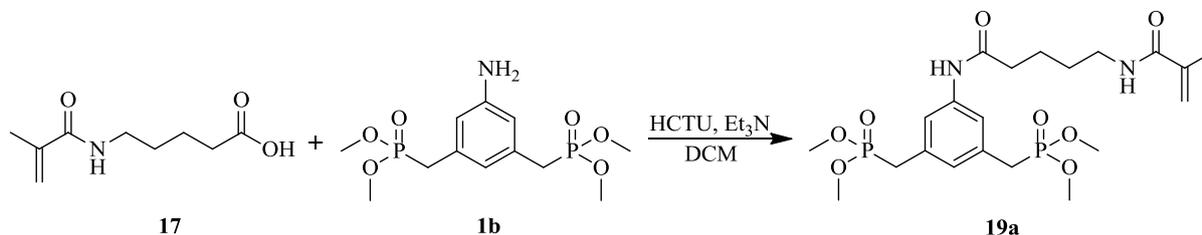
**Abb. 5.3.11:**  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von Dilithium-*N*-[3,5-bis(methoxyphosphorylmethyl)phenyl]methacrylsäureamid **1**.



**Abb. 5.3.12:**  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von Dilithium-*N*-[3,5-bis(methoxyphosphorylmethyl)phenyl]methacrylsäureamid **1**.

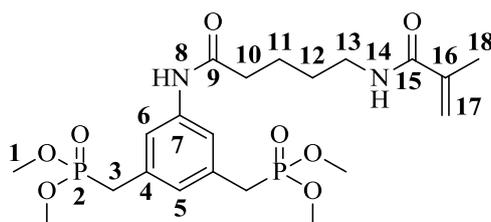
### 5.3.7 Synthese des C<sub>5</sub>-Bisphosphonat-Monomers (19)

#### 5.3.7.1 Darstellung von *N*-[3,5-bis(methoxyphosphorylmethyl)phenyl]5-methacrylsäureamidpentan (19a)



274 mg (1.48 mmol, 1.0 eq.) des C<sub>5</sub>-Spacer-Monomers **17**, 620  $\mu\text{L}$  (450 mg, 4.45 mmol, 3.0 eq.) Triethylamin sowie 808 mg (1.95 mmol, 1.3 eq.) HCTU wurden nacheinander in 15 mL Dichlormethan eingetragen. Die Reaktionslösung wurde bei 0 °C tropfenweise mit einer Lösung aus 600 mg (1.78 mmol, 1.2 eq.) **1b** und 5 mL Dichlormethan versetzt. Nach vollständiger Zugabe, wurde die Reaktionslösung entgast und 14 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mehrmals mit 0.6 M Natronlauge gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und letztlich bei vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der ölige Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH = 24:1). Nach der Aufreinigung wurde ein gelbfarbenes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 162 mg (0.32 mmol, 22 %). **R<sub>F</sub>** = 0.32 (DCM/MeOH = 9:1).



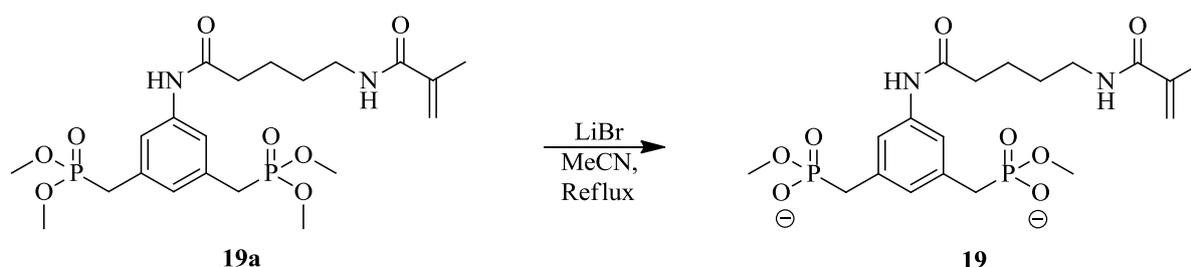
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = **1.57-1.64** (m, 2H, H-12), **1.70-1.76** (m, 2H, H-11), **1.97** (s, 3H, H-18), **2.40** (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 2H, H-10), **3.10** (d, <sup>2</sup>*J*<sub>H,P</sub> = 21.8 Hz, 4H, H-3), **3.33-3.39** (m, 2H, H-13), **3.69** (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,P</sub> = 10.8 Hz, 12H, H-1), **5.34** (s, 1H, H-17a), **5.75** (s, 1H, H-17b), **6.44** (sb, 1H, H-14), **6.94** (s, 1H, H-5) **7.43** (s, 2H, H-6), **8.40** (s, 1H, H-8).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = **18.9** (C-18), **22.7** (C-11), **29.0** (C-12), **32.7** (d, <sup>1</sup>*J*<sub>C,P</sub> = 138 Hz, C-3), **36.7** (C-10), **38.8** (C-13), **53.1** (C-1), **119.8** (C-6), **120.1** (C-17), **126.5** (C-5), **132.3** (C-4), **139.2** (C-7), **139.9** (C-16), **169.1** (C-15), **172.0** (C-9).

**<sup>31</sup>P-NMR** (203 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = **28.5** (P-2).

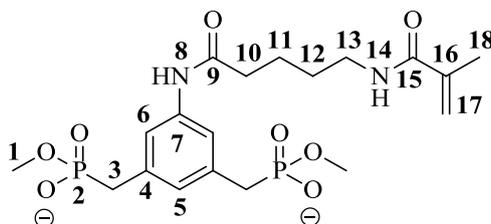
**MS (ESI, pos., MeOH):** für  $C_{21}H_{34}N_2NaO_8P_2$ : berechnet: 527.17; gefunden: 527.19.

### 5.3.7.2 Darstellung von Dilithium-*N*-[3,5-bis(methoxyphosphorylmethyl)phenyl]5-methacrylsäureamidpentan (19)



146 mg (289  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq.) **19a** wurden unter Argon-Atmosphäre in 5 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 70.4 mg (810  $\mu\text{mol}$ , 2.8 eq.) LiBr versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1 Tag refluxiert, und nach dem Abkühlen zentrifugiert. Der Rückstand wurde 4-mal mit 5 mL abs. Acetonitril sowie 2-mal mit 5 mL tr. Diethylether gewaschen. Der beigefarbene Feststoff wurde im Ölpumpenvakuum restgetrocknet.

**Ausbeute:** 140 mg (287  $\mu\text{mol}$ , 99 %).

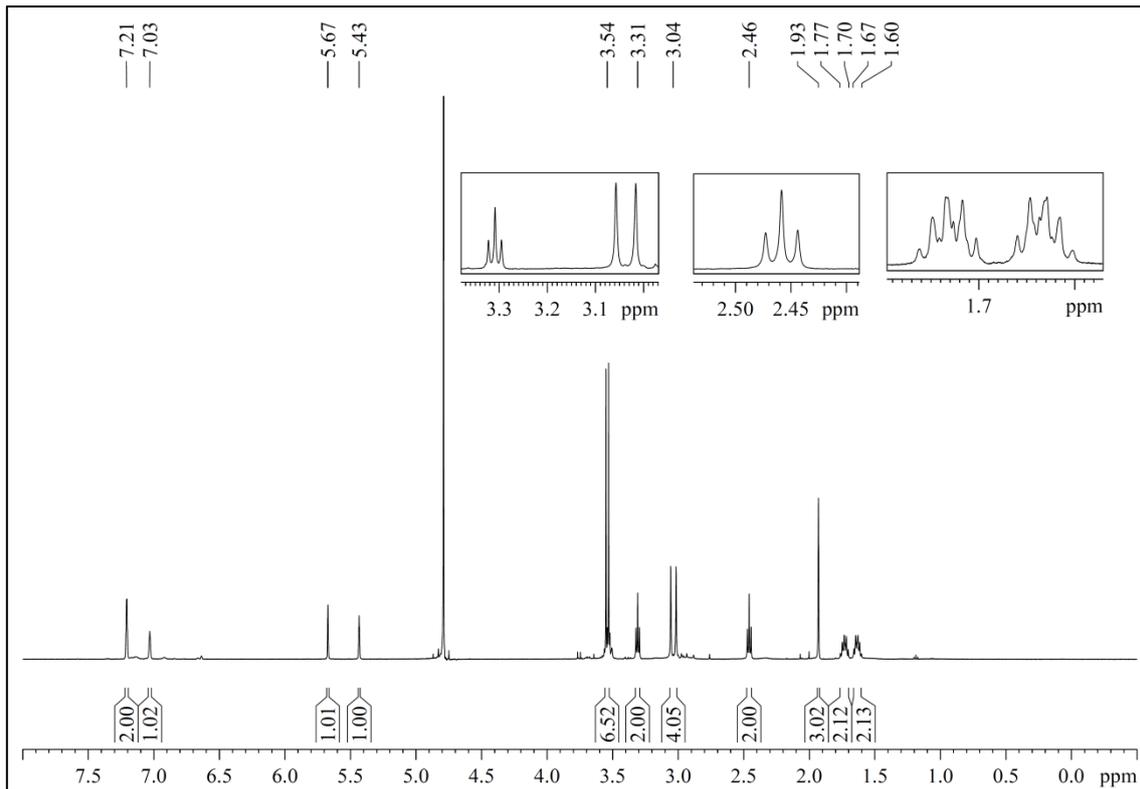


**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **1.60-1.67** (m, 2H, H-12), **1.70-1.77** (m, 2H, H-11), **1.93** (s, 3H, H-18), **2.46** (t,  $^3J_{H,H} = 7.3$  Hz, 2H, H-10), **3.04** (d,  $^2J_{H,P} = 20.6$  Hz, 4H, H-3), **3.31** (m,  $^3J_{H,H} = 6.8$  Hz, 2H, H-13), **3.54** (d,  $^3J_{H,P} = 10.4$  Hz, 6H, H-1), **5.43** (s, 1H, H-17a), **5.67** (s, 1H, H-17b), **7.03** (s, 1H, H-5), **7.21** (s, 2H, H-6).

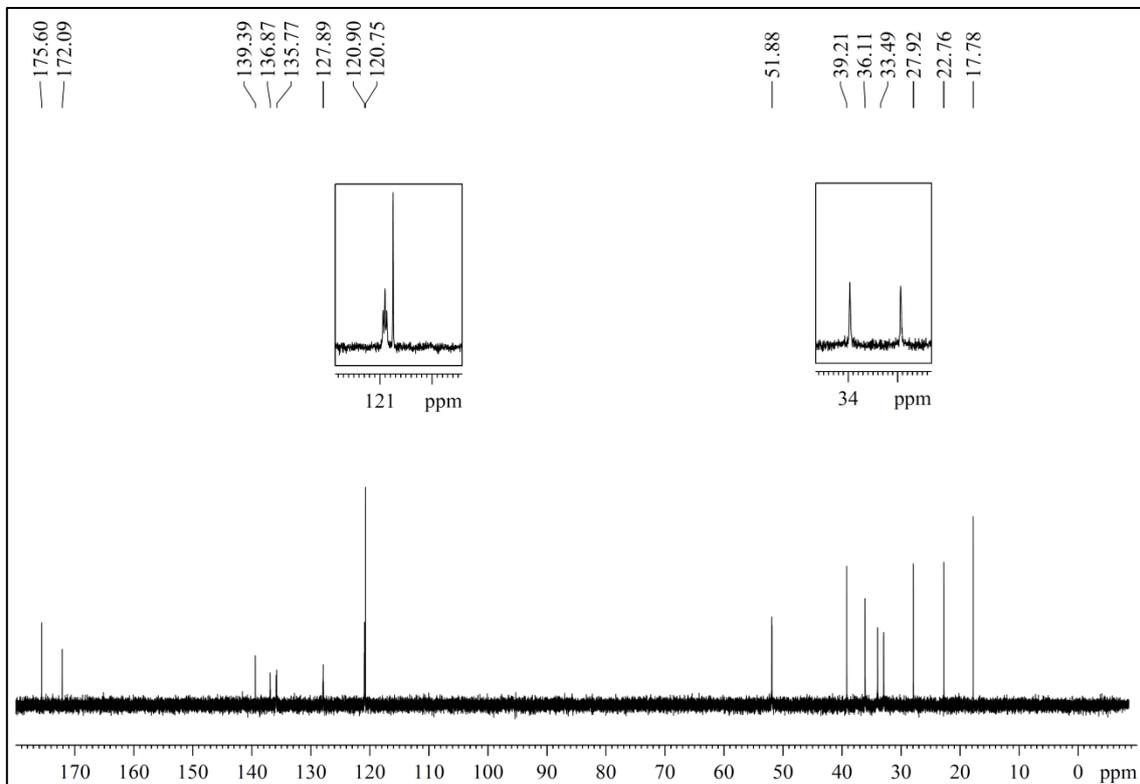
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **17.8** (C-18), **22.8** (C-11), **27.9** (C-12), **33.5** (d,  $^1J_{C,P} = 130$  Hz, C-3), **36.1** (C-10), **39.1** (C-13), **51.9** (C-1), **120.8** (C-17), **120.9** (C-6), **127.9** (C-5), **135.8** (C-4), **136.9** (C-7), **139.4** (C-16), **172.1** (C-15), **175.6** (C-9).

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (203 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **23.8** (P-2).

**MS (ESI, pos., MeOH):** für  $C_{19}H_{28}LiN_2Na_2O_8P_2$ : berechnet: 527.13; gefunden: 527.17.



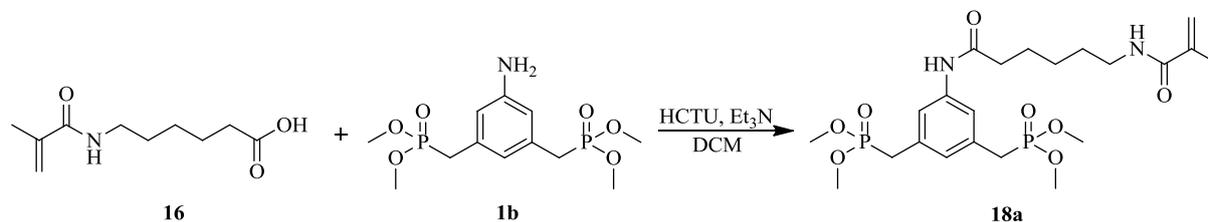
**Abb. 5.3.13:**  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von Dilithium-*N*-[3,5-bis(methoxyphosphorylmethyl)phenyl]5-methacrylsäureamidpentan **19**.



**Abb. 5.3.14:**  $^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von Dilithium-*N*-[3,5-bis(methoxyphosphorylmethyl)phenyl]5-methacrylsäureamidpentan **19**.

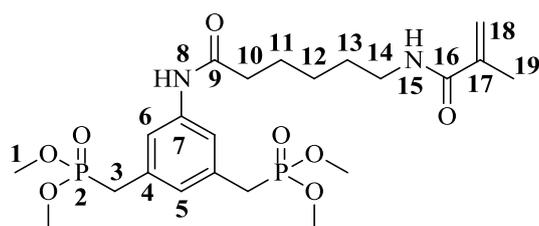
### 5.3.8 Synthese des C<sub>6</sub>-Bisphosphonat-Monomers (18)

#### 5.3.8.1 Darstellung von *N*-[3,5-bis(methoxyphosphorylmethyl)phenyl]6-methacrylsäureamidhexan (18a)



1.19 g (5.95 mmol, 1.2 eq.) des C<sub>6</sub>-Spacer-Monomers **16**, 3.1 mL (2.30 g, 22 mmol, 4.5 eq.) Triethylamin sowie 3.25 g (7.86 mmol, 1.3 eq.) HCTU wurden nacheinander in 40 mL Dichlormethan eingetragen. Die Reaktionslösung wurde bei 0 °C tropfenweise mit einer Lösung aus 1.68 g (4.98 mmol, 1.0 eq.) **1b** und 10 mL Dichlormethan versetzt. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionslösung entgast und 14 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mehrmals mit 0.6 M Natronlauge gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und letztlich bei vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der ölige Rückstand wurde 2-mal säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH = 14:1). Nach der Aufreinigung wurde ein gelbfarbendes Öl erhalten.

**Ausbeute:** 695 mg (1.34 mmol, 27 %). **R<sub>F</sub>** = 0.15 (DCM/MeOH = 14:1).



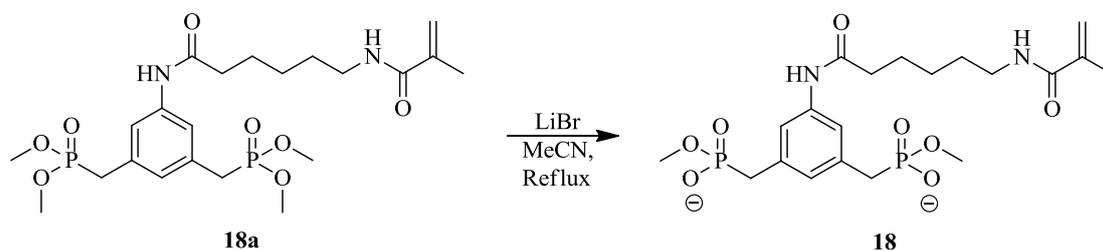
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = **1.35-1.42** (m, 2H, H-12), **1.54-1.60** (m, 2H, H-13), **1.69-1.75** (m, 2H, H-11), **1.95** (s, 3H, H-19), **2.35** (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 2H, H-10), **3.10** (d, <sup>2</sup>J<sub>H,P</sub> = 21.8 Hz, 4H, H-3), **3.28-3.34** (m, 2H, H-14), **3.68** (d, <sup>3</sup>J<sub>H,P</sub> = 10.8 Hz, 12H, H-1), **5.30** (s, 1H, H-18a), **5.69** (s, 1H, H-18b), **6.26** (sb, 1H, NH), **6.93** (s, 1H, H-5) **7.45** (s, 2H, H-6), **8.31** (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = **18.8** (C-19), **24.9** (C-11), **26.4** (C-12), **29.2** (C-13), **32.6** (d,  $^1J_{\text{C,P}} = 138$  Hz, C-3), **37.2** (C-10), **39.5** (C-14), **53.1** (C-1), **119.7** (C-18), **119.8** (C-6), **126.5** (C-5), **135.7**, **139.1**, **140.1** (C-4, C-7, C-17), **168.8**, **171.9** (C-9, C-16).

$^{31}\text{P}$ -NMR (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = **28.5** (P-2).

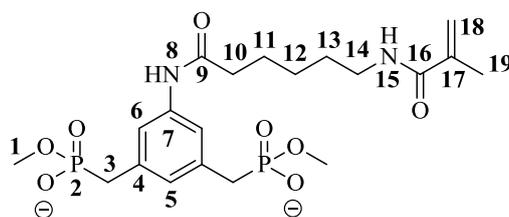
MS (ESI, pos., MeOH): für  $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{NaO}_8\text{P}_2$ : berechnet: 541.18; gefunden: 541.17.

### 5.3.8.2 Darstellung von Dilithium-*N*-[3,5-bis(methoxyphosphorylmethyl)phenyl]6-methacrylsäureamidhexan (**18**)



140 mg (270  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq.) **18a** wurden unter Argon-Atmosphäre in 5 mL abs. Acetonitril gelöst und mit 66.0 mg (760  $\mu\text{mol}$ , 2.8 eq.) LiBr versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1 Tag refluxiert und nach dem Abkühlen zentrifugiert. Der Rückstand wurde 4-mal mit 5 mL abs. Acetonitril sowie 2-mal mit 5 mL tr. Diethylether gewaschen. Der beigefarbene Feststoff wurde im Ölpumpenvakuum restgetrocknet.

**Ausbeute:** 132 mg (262  $\mu\text{mol}$ , 97 %).

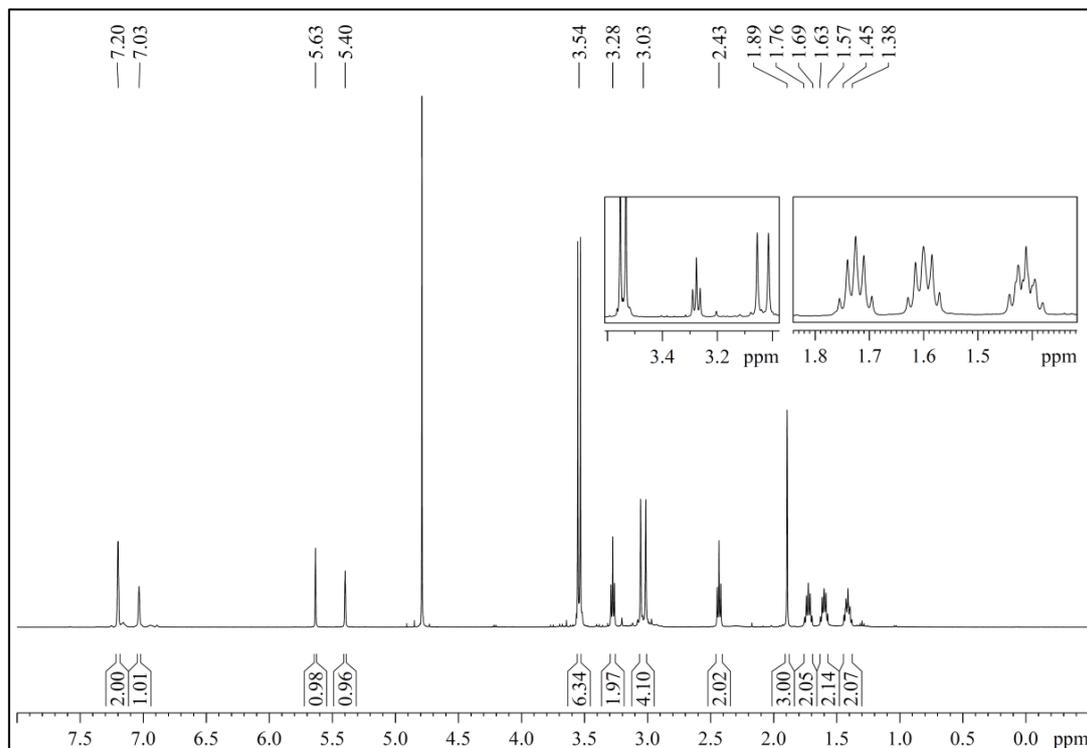


$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **1.38-1.45** (m, 2H, H-12), **1.57-1.63** (m, 2H, H-13), **1.69-1.76** (m, 2H, H-11), **1.89** (s, 3H, H-19), **2.43** (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$  Hz, 2H, H-10), **3.03** (d,  $^2J_{\text{H,P}} = 20.6$  Hz, 4H, H-3), **3.28** (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$  Hz, 2H, H-14), **3.54** (d,  $^3J_{\text{H,P}} = 10.4$  Hz, 6H, H-1), **5.40** (s, 1H, H-18a), **5.63** (s, 1H, H-18b), **7.03** (s, 1H, H-5), **7.20** (s, 2H, H-6).

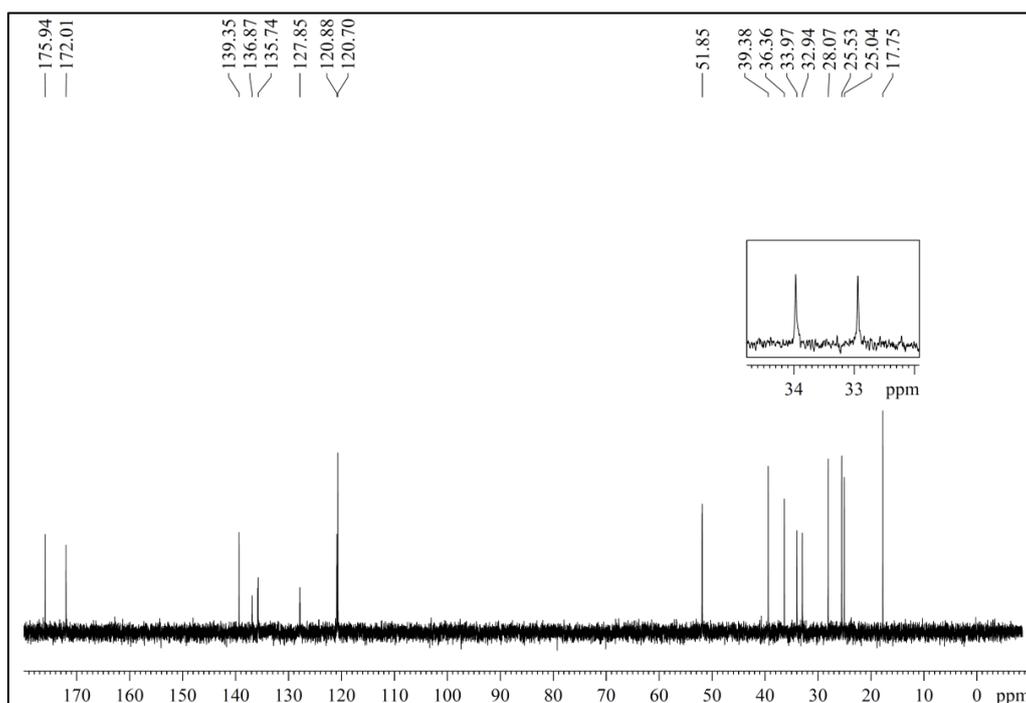
$^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **17.8** (C-19), **25.0** (C-11), **25.5** (C-12), **28.1** (C-13), **33.5** (d,  $^1J_{\text{C,P}} = 129$  Hz, C-3), **36.4** (C-10), **39.4** (C-14), **51.9** (C-1), **120.7** (C-18), **120.9** (C-6), **127.9** (C-5), **135.7** (C-4), **136.9** (C-7), **139.4** (C-17), **172.0** (C-16), **175.9** (C-9).

$^{31}\text{P}$ -NMR (203 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **23.8** (P-2).

MS (ESI, pos., MeOH): für  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{Li}_2\text{N}_2\text{NaO}_8\text{P}_2$ : berechnet: 525.17; gefunden: 525.19.



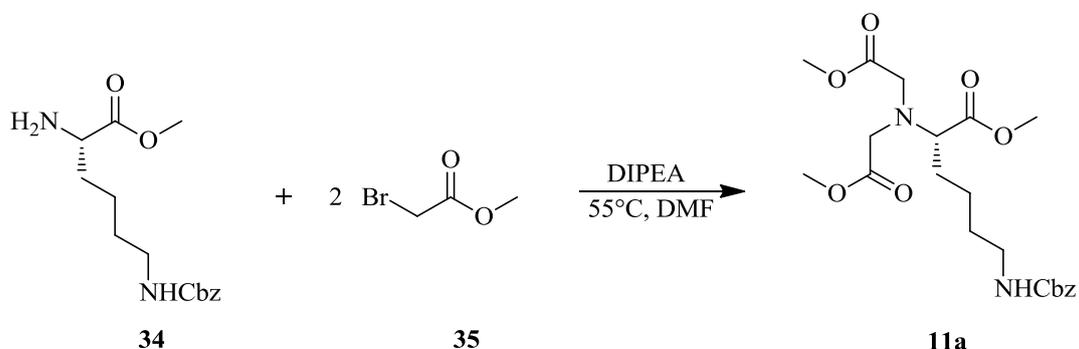
**Abb. 5.3.15:**  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von Dilithium-*N*-[3,5-bis(methoxyphosphorylmethyl)phenyl]6-methacrylsäureamidhexan **18**.



**Abb. 5.3.16:**  $^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von Dilithium-*N*-[3,5-bis(methoxyphosphorylmethyl)phenyl]6-methacrylsäureamidhexan **18**.

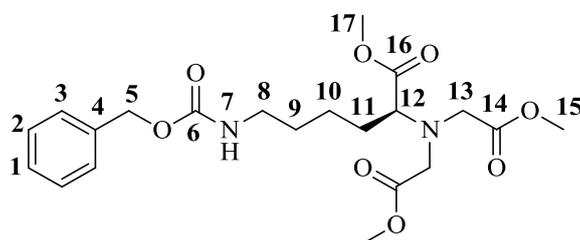
### 5.3.9 Synthese des NTA-Monomers (11)

#### 5.3.9.1 Darstellung von *N*<sup>ε</sup>-Benzyloxycarbonyl-*N*<sup>α</sup>-bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysinmethylester (11a)<sup>[122, 134]</sup>



2.0 g (6.05 mmol, 1.0 eq.) *N*-benzyloxycarbonyl-L-lysin **34** wurde in 50 mL Dimethylformamid gelöst, und tropfenweise mit 4.8 mL (3.6 g, 28 mmol, 4.6 eq.) DIPEA sowie 2.1 mL (3.3 g, 22 mmol, 3.6 eq.) Bromessigsäuremethylester **35** versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 55 °C erwärmt und 24 h bei Argon-Atmosphäre gerührt. Die braune Suspension wurde mittels Kondensation bei 60 °C vom Lösungsmittel befreit. Der Kolben-Rückstand wurde mehrfach mit 15 mL Essigester aufgeschlämmt und filtriert. Das Filtrat wurde bei vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch über Kieselgel (CH/EE = 1:1) gereinigt. Nach dem Einengen der Produktfraktionen konnte ein braunes Öl erhalten werden.

**Ausbeute:** 1.05 g (2.39 mmol, 40 %).  $R_F = 0.4$  (CH/EE = 1:1).

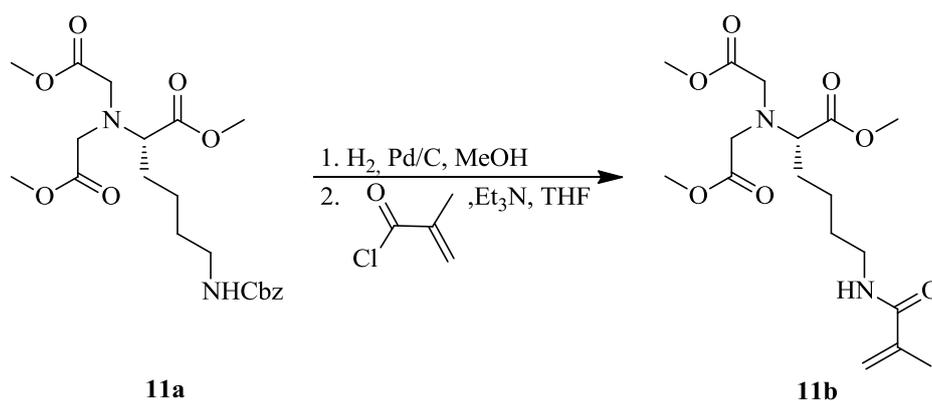


<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = **1.34–1.57** (m, 4H, H-9, H-10), **1.69** (m, 2H, H-11), **3.19** (m, 2H, H-8), **3.42** (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.7 Hz, 1H, H-12), **3.63** (s, 4H, H-13), **3.68** (s, 9H, H-15, H-17), **4.91** (sb, 1H, H-7), **5.09** (s, 2H, H-5), **7.30–7.37** (m, 5H, H-1, H-2, H-3).

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = **23.1** (C-10), **29.5** (C-9), **30.1** (C-11), **40.9** (C-8), **51.6** (C-17), **51.8** (C-15), **52.6** (C-13), **64.7** (C-12), **66.7** (C-5), **128.2** (C-3), **128.6**, **128.6** (C-1, C-2), **136.8** (C-4), **156.6** (C-6), **171.9** (C-15), **173.2** (C-17).

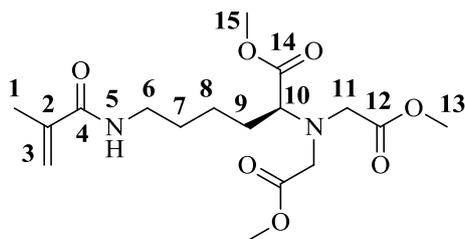
**MS** (ESI, pos., MeOH): für  $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{NaO}_8$ : berechnet: 461.19; gefunden: 461.23.

### 5.3.9.2 Darstellung von $N^{\beta}$ -(2-Methyl-1-oxopropenyl)- $N^{\alpha}$ -bis(2-ethoxy-2-oxomethyl)-L-lysinmethylester (**11b**)<sup>[122]</sup>



606 mg (1.38 mmol, 1.0 eq.) der Verbindung **11a** wurden in 10 mL Methanol gelöst, mit katalytischen Mengen Pd/C (10 % Pd) versetzt und 3 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Nach Umsatzkontrolle durch DC erfolgte die Entfernung des Katalysators mittels Filtration über Celite. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, unter Bildung eines goldfarbenen Öls. Zu einer Lösung, aus dem goldfarbenen Öl und 50 mL THF, wurden 380  $\mu\text{L}$  (279 mg, 2.76 mmol, 2.0 eq.) Triethylamin zugegeben. Diese wurde daraufhin tropfenweise mit einer Lösung aus 520  $\mu\text{L}$  (556 mg, 5.32 mmol, 3.9 eq.) Methacrylsäurechlorid **25** in 10 mL Tetrahydrofuran versetzt und nach vollständiger Zugabe 30 min bei 0 °C gerührt. Abschließend wurde 24 h bei RT gerührt. Die Suspension wurde filtriert und der Filtrückstand mit Tetrahydrofuran gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden bei vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit, und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (CH/EE = 2:1). Es wurde ein graufarbener Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 48.4 mg (0.13 mmol, 10 %).  $R_F$  = 0.2 (CH/EE = 1:2) mit CAM-Lösung.

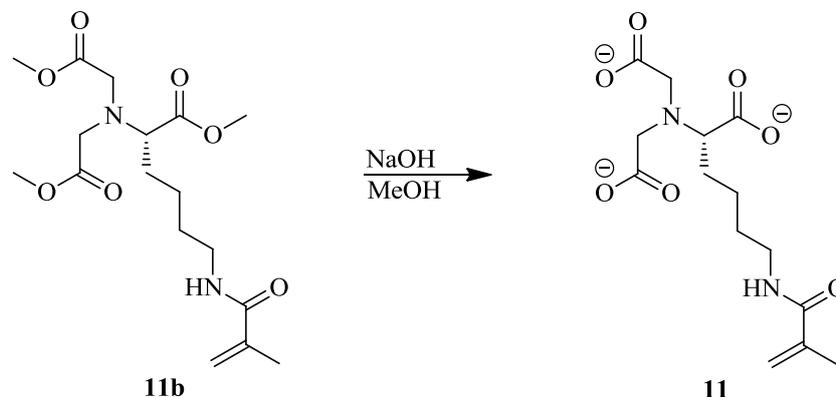


**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = **1.39–1.75** (m, 6H, H-7, H-8, H-9), **1.96** (s, 3H, H-1), **3.32** (m, 2H, H-6), **3.44** (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.6 Hz, 1H, H-10), **3.64** (s, 4H, H-11), **3.68** (s, 9H, H-13, H-15), **5.30** (s, 1H, H-3a), **5.69** (s, 1H, H-3b), **6.05** (sb, 1H, H-5).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = **18.8** (C-1), **23.2** (C-8), **28.8** (C-7), **29.9** (C-9), **39.5** (C-6), **51.8**, **51.8** (C-13, C15), **52.6** (C-11), **64.6** (C-10), **119.3** (C-3), **140.4** (C-2), **168.7** (C-4), **171.9** (C-12), **173.2** (C-14).

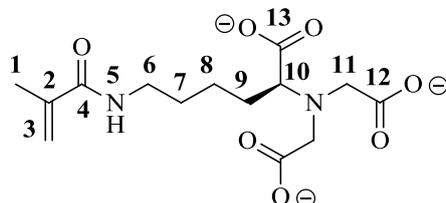
**MS (ESI, pos., MeOH):** für C<sub>17</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>7</sub>: berechnet: 395.18; gefunden: 395.19.

### 5.3.9.3 Darstellung von Trinatrium- $N^{\epsilon}$ -(2-Methyl-1-oxopropenyl)- $N^{\alpha}$ -bis-(carboxymethyl)-L-lysin (**11**)<sup>[122]</sup>



Eine Lösung aus 42.6 mg (114  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq.) der Substanz **11b** in 2.0 mL Aceton wurde mit 0.23 mL einer 2 M Natronlauge (460  $\mu\text{mol}$ , 4.0 eq.) versetzt und 12 h bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels mit Hilfe des Rotationsverdampfers sowie Resttrocknung an der Lyophylle, blieb ein beigefarbener Feststoff zurück.

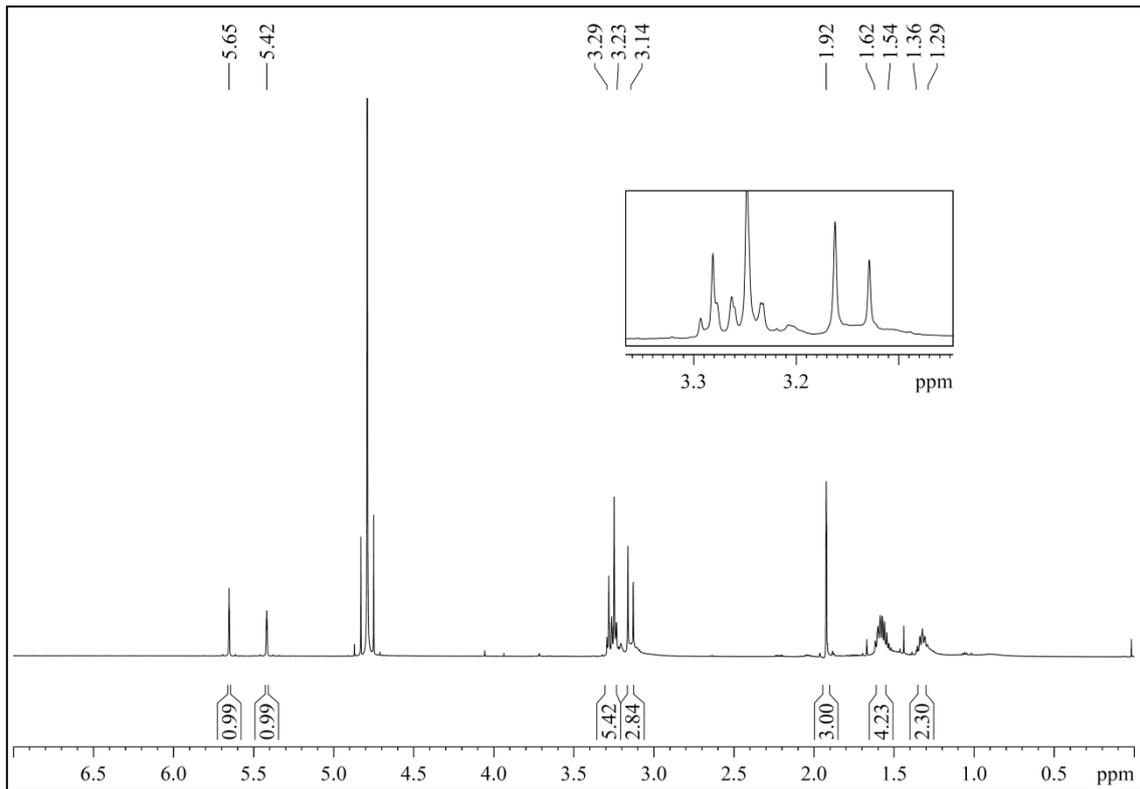
**Ausbeute:** Quantitativ.



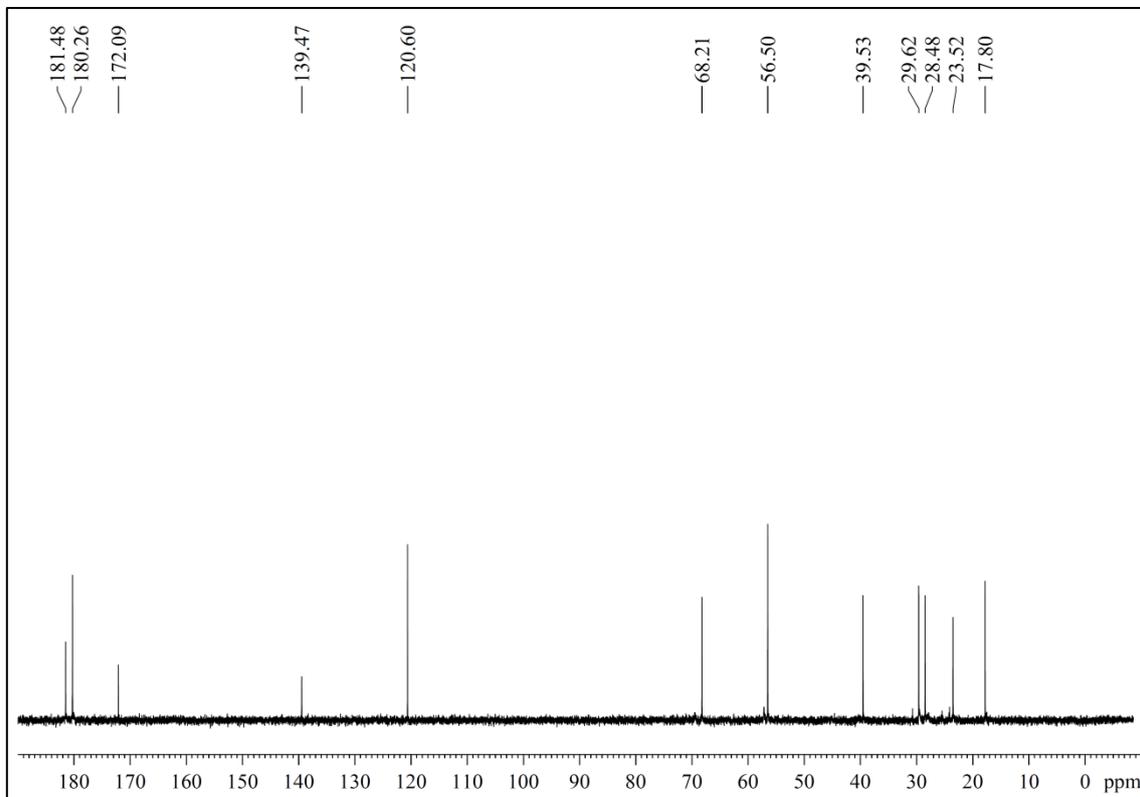
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **1.29-1.36** (m, 2H, H-8), **1.54-1.62** (m, 4H, H-7, H-9), **1.92** (s, 3H, H-1), **3.14** (d,  $^2J_{H,H} = 16.7$  Hz, 2H, H-11a), **3.23-3.29** (m, 5H, H-6, H-10, H-11b), **5.42** (s, 1H, H-3a), **5.65** (s, 1H, H-3b).

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **17.8** (C-1), **23.5** (C-8), **28.5** (C-7), **29.6** (C-9), **39.5** (C-6), **56.5** (C-11), **68.2** (C-10), **120.6** (C-3), **139.5** (C-2), **172.1** (C-4), **180.3** (C-12), **181.5** (C-13).

**MS (ESI, neg., MeOH):** für  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{NaO}_7$ : berechnet: 351.12; gefunden: 351.17.



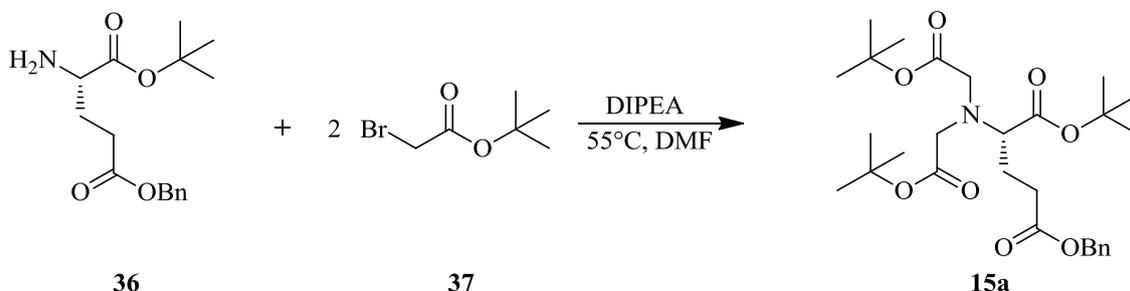
**Abb. 5.3.17:**  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von Trisodium- $N^\epsilon$ -(2-Methyl-1-oxopropenyl)- $N^\alpha$ -bis(carboxymethyl)-L-lysin **11**.



**Abb. 5.3.18:**  $^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von Trisodium- $N^\epsilon$ -(2-Methyl-1-oxopropenyl)- $N^\alpha$ -bis(carboxymethyl)-L-lysin **11**.

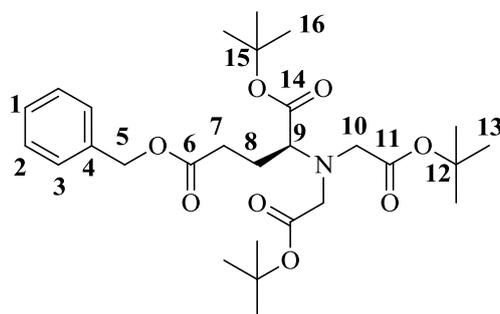
### 5.3.10 Synthese des NTA-Glu-Monomers (15)

#### 5.3.10.1 Darstellung von (2*S*)-2-(Bis-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-pentandisäure-5-benzylester-1-*tert*-butylester (15a)<sup>[142]</sup>



Unter Argon-Atmosphäre wurde eine Lösung aus 1.00 g (3.03 mmol, 1.0 eq.) L-Glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester- $\alpha$ -*tert*-butylester Hydrochlorid **36** und 25 mL Dimethylformamid mit 1.79 mL (2.36 g, 12.1 mmol, 4.0 eq.) Bromessigsäure-*tert*-butylester **37** und 2.61 mL (1.98 g, 15.3 mmol, 5.0 eq.) DIPEA versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 55 °C erwärmt und 18 h gerührt. Die Entfernung des Lösungsmittels erfolgte mittels Kondensation bei 60 °C. Der Rückstand wurde mit 15 mL Essigester suspendiert und filtriert. Die Kolbenrückstände wurden mehrmals mit 10 mL eines Lösungsmittelgemisches (CH/EE = 3:1) suspendiert und ebenfalls filtriert. Das Gesamtfiltrat wurde bei vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit, und das erhaltene ölige Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (CH/EE = 4:1). Es wurde ein gelbfarbendes Öl erhalten.

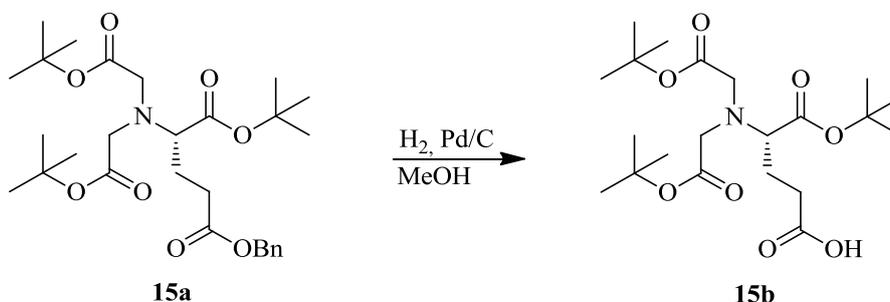
**Ausbeute:** 1.44 g (2.76 mmol, 91 %).  $R_F = 0.6$  (CH/EE = 4:1).



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = **1.40-1.50** (m, 27H, H-13, H-16), **1.85-2.07** (m, 2H, H-8), **2.50-2.76** (m, 2H, H-7), **3.34-3.49** (m, 5H, H-9, H-10), **5.11** (s, 2H, H-5), **7.27-7.38** (m, 5H, H-1, H-2, H-3).

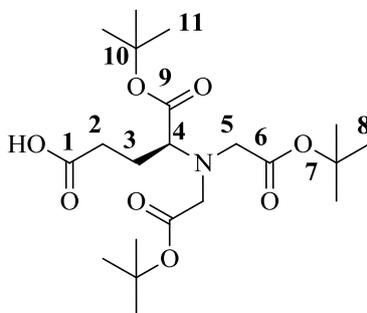
**HRMS (ESI, pos., MeOH):** für  $C_{28}H_{44}NO_8$ : berechnet: 522.3061; gefunden: 522.3319,  
für  $C_{28}H_{43}NNaO_8$ : berechnet: 544.2881; gefunden: 544.2941.

### 5.3.10.2 Darstellung von (2*S*)-2-(Bis-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-pentandisäure-1-*tert*-butylester (15b)<sup>[142]</sup>



1.40 g (2.68 mmol) **15a** wurden in 50 mL Methanol gelöst und mit 0.2 g (10 % Pd) Pd/C versetzt und 16 h unter Wasserstoff-Atmosphäre gerührt. Nach Umsatzkontrolle mittels DC erfolgte eine Filtration über Celite. Das Filtrat wurde unter verminderten Druck entfernt, unter Bildung eines gelbfarbenen Öls.

**Ausbeute:** 0.91 g (2.10 mmol, 78 %).

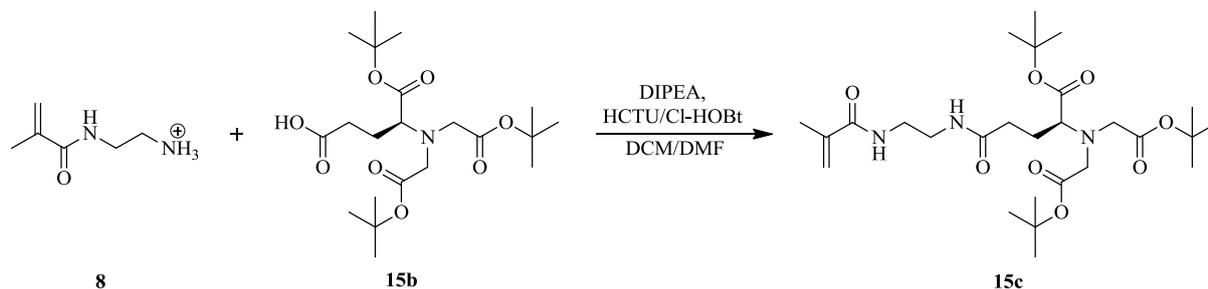


**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = **1.49** (s, 9H, H-8), **1.50** (s, 18H, H-11), **1.93-2.10** (m, 2H, H-3), **2.64-2.77** (s, 2H, H-2), **3.42-3.47** (m, 1H, H-4), **3.52** (s, 4H, H-5).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = **25.4** (C-3), **28.2** (C-8), **28.3** (C-11), **31.2** (C-2), **54.4** (C-5), **64.9** (C-4), **81.6, 82.0** (C-7, C-10), **170.5** (C-6), **171.3** (C-9), **176.3** (C-1).

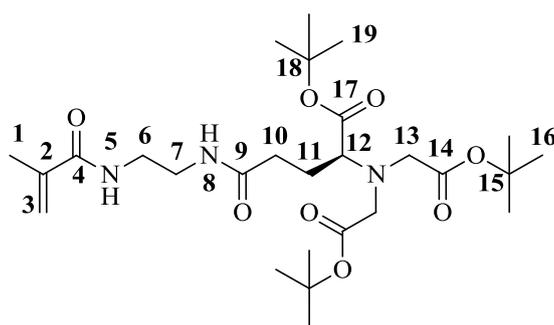
**HRMS (ESI, pos., MeOH):** für  $C_{21}H_{38}NO_8$ : berechnet: 432.2592; gefunden: 432.2676,  
für  $C_{21}H_{37}NNaO_8$ : berechnet: 454.2411; gefunden: 454.2490.

### 5.3.10.3 Darstellung von (2*S*)-2-(Bis-*tert*-butoxycarbonylmethyl-amino)-pentandisäure-5-(2-aminoethyl)methacrylamid-1-*tert*-butylester (15c)



2.54 g (5.89 mmol, 1.0 eq.) **15b** wurden in 125 mL DCM/DMF (4:1) gelöst. Unter rühren erfolgte die Zugabe von 6.17 mL (4.58 g, 35.4 mmol, 6.0 eq.) DIPEA, 2.69 g (6.49 mmol, 1.1 eq.) HCTU und 2.50 g (14.7 mmol, 2.5 eq.) Cl-HOBt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch tropfenweise mit einer Lösung aus 1.78 g (82 %, 8.88 mmol, 1.5 eq.) des Ethylendiamin-Monomers **8** und 25 mL DCM/DMF (4:1) versetzt. Die Suspension wurde 3 Tage unter Argon-Atmosphäre gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde weitestgehend vom Lösungsmittel befreit und der ölige Rückstand in 100 mL Dichlormethan gelöst. Die Lösung wurde 2-mal mit 100 mL ges. NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels bei vermindertem Druck wurde das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (EE). Es wurde ein gelb kristalliner Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 1.98 g (3.66 mmol, 62 %). **R<sub>F</sub>** = 0.3 (EE).

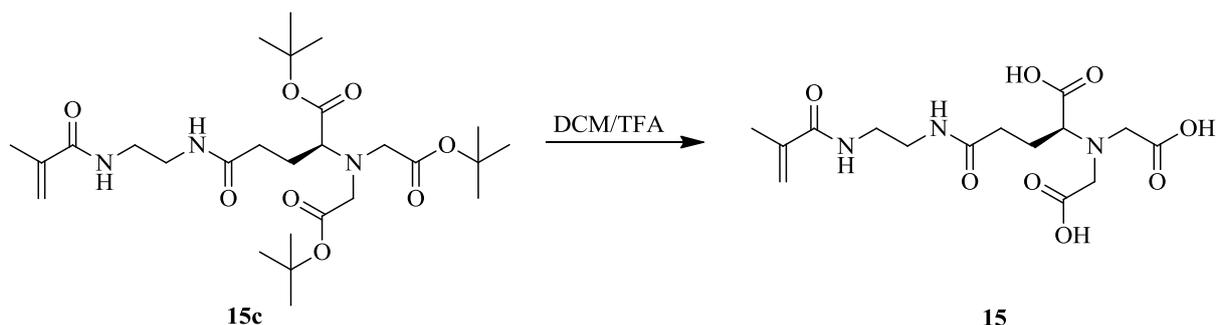


**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = **1.39** (sb, 27H, H-16, H-19), **1.73** (q, 2H, H-11), **1.84** (s, 3H, H-1), **2.09-2.25** (m, 2H, H-10), **3.11-3.15** (m, 4H, H-6, H-7), **3.23-3.44** (m, 5H, H-12, H-13), **5.31** (s, 1H, H-3a), **5.64** (s, 1H, H-3b), **7.83** (sb, 1H, NH), **7.90** (sb, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = **18.6** (C-1), **25.8** (C-11), **27.8, 27.8** (C-16, C-19), **31.6** (C-10), **38.2, 39.0** (C-6, C-7), **53.2** (C-13), **64.2** (C-12), **80.1, 80.1** (C-16, C-18) **119.1** (C-3), **139.9** (C-2), **167.6** (C-4), **171.3** (C-14), **172.1** (C-9).

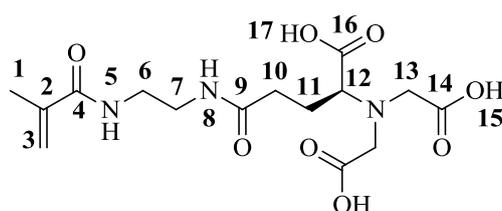
**HRMS** (ESI, pos., MeOH): für  $\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{NaO}_8$ : berechnet: 564.3255; gefunden: 564.3364.

#### 5.3.10.4 Darstellung von (2*S*)-2-[bis(carboxymethyl)amino]-5-(2-aminoethyl)-methacrylamid-5-oxopentansäure (**15**)



1.82 g (3.35 mmol, 1.0 eq.) **15c** wurden in 50 mL Dichlormethan gelöst und tropfenweise unter Eiskühlung mit 8.0 mL (11.9 g, 105 mmol, 31 eq.) TFA versetzt. Die Lösung wurde 16 h bei RT gerührt und die Umsetzung mittels DC geprüft. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt und überschüssiges TFA durch Hilfe von Benzol weitestgehend ausgetrieben. Es wurde ein beigefarbener Feststoff erhalten.

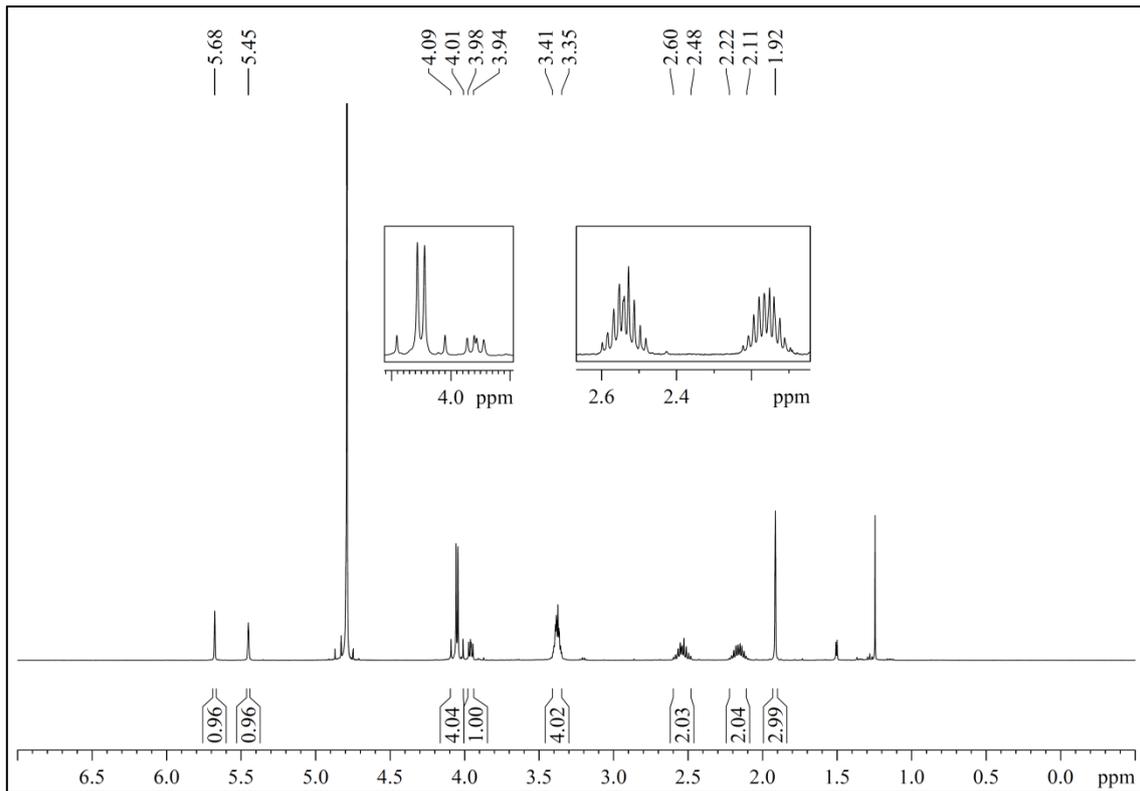
**Ausbeute:** Quantitativ mit Resten an TFA.



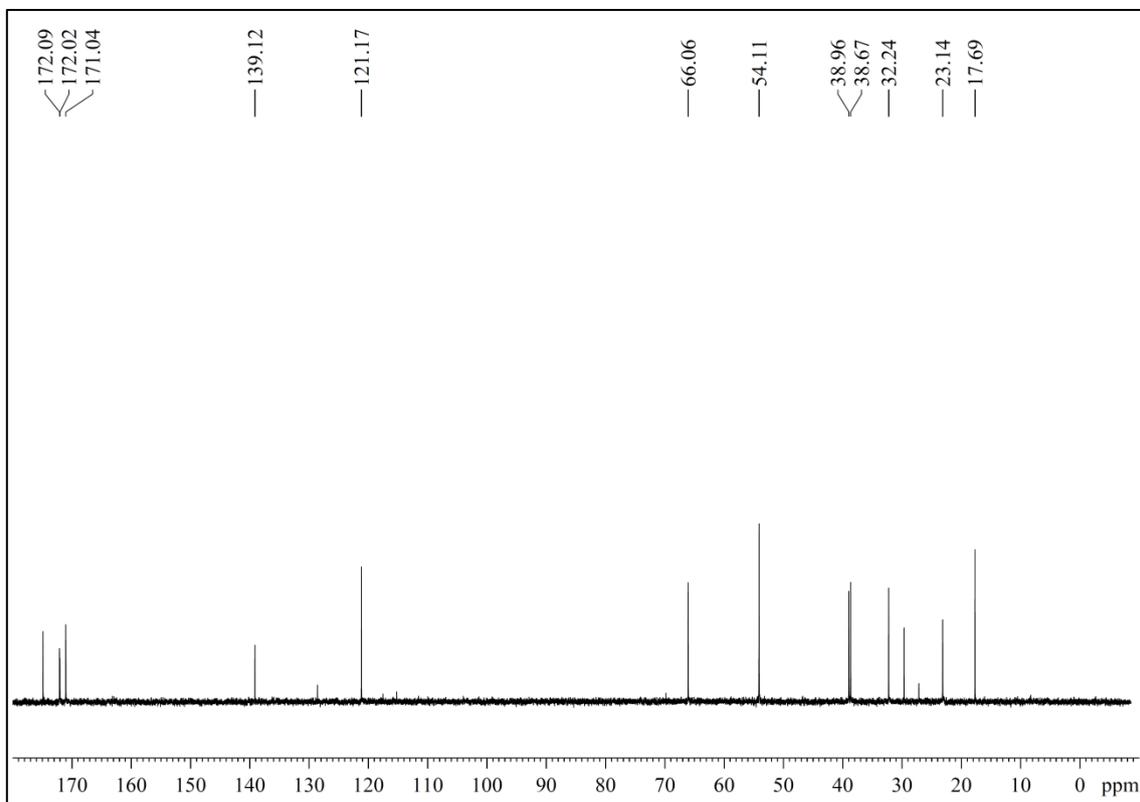
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **1.92** (s, 3H, H-1), **2.11-2.22** (m, 2H, H-11), **2.48-2.60** (m, 2H, H-10), **3.35-3.41** (m, 4H, H-6, H-7), **3.94-3.98** (m, 1H, H-12), **4.01-4.09** (m, 4H, H-13), **5.45** (s, 1H, H-3a), **5.68** (s, 1H, H-3b).

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **17.7** (C-1), **23.1** (C-11), **29.7** (C-10), **38.7** (C-7), **39.0** (C-6), **54.1** (C-13), **66.1** (C-12), **121.2** (C-3), **139.1** (C-2), **171.0** (C-14), **172.0** (C-16), **172.1** (C-4), **174.9** (C-9).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): für  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_8$ : berechnet: 374.1558; gefunden: 374.1641.



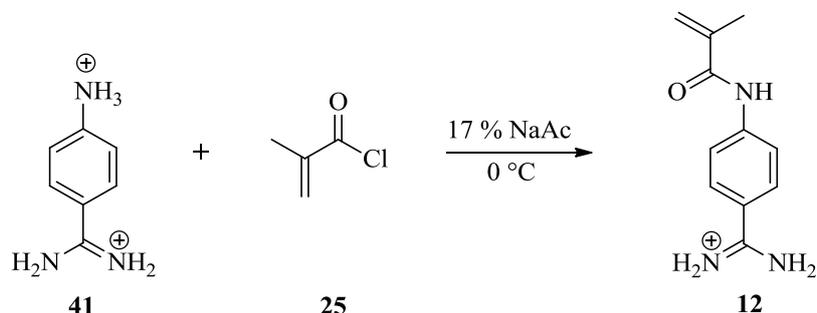
**Abb. 5.3.19:**  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von (2*S*)-2-[bis(carboxymethyl)amino]-5-(2-aminoethyl)-methacrylamid-5-oxopentansäure **15**.



**Abb. 5.3.20:**  $^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von (2*S*)-2-[bis(carboxymethyl)amino]-5-(2-aminoethyl)-methacrylamid-5-oxopentansäure **15**.

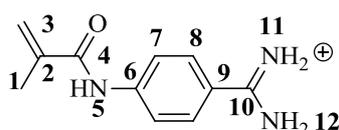
### 5.3.11 Synthese des Aminobenzamindin-Monomers (12)

#### 5.3.11.1 Darstellung von *N*-Methacryl-4-aminobenzidinnitrat (12)<sup>[123, 145]</sup>



2.00 g (9.61 mmol, 1.0 eq.) 4-Aminobenzamidin • 2 HCl **41** wurden in 200 mL 17 %iger Natriumacetat-Lösung gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der gekühlten Lösung wurden innerhalb von 30 min 5.1 mL (5.48 g, 53.0 mmol, 5.5 eq.) Methacrylsäurechlorid **25** zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 min gerührt und anschließend mit 2 M Salpetersäure auf einen pH-Wert von 4 eingestellt. Nach Filtration der Reaktionslösung wurde der Rückstand mit warmem VE-Wasser in ein separates Reaktionsgefäß gespült. Das Produkt wurde mit wenigen Tropfen 2 M Salpetersäure ausgefällt. Die resultierende Suspension wurde erneut filtriert und der kristalline Rückstand mit wenig kaltem VE-Wasser gewaschen. Die Resttrocknung des kristallinen Feststoffes erfolgte im Ölpumpenvakuum.

**Ausbeute:** 1.47 mg (5.51 mmol, 57 %).



**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = **1.96** (s, 3H, H-1), **5.61** (s, 1H, H-3a), **5.87** (s, 1H, H-3b), **7.80** (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.9 Hz, 2H, H-8), **7.91** (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 8.9 Hz, 2H, H-7), **8.76** (sb, 2H, H-11a, H-12a), **9.19** (sb, 2H, H-11b, H-12b), **10.20** (sb, 1H, H-5).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = **18.6** (C-1), **119.5** (C-7), **121.1** (C-3), **122.0** (C-9), **129.0** (C-8), **140.0** (C-6), **144.1** (C-2), **164.7**, **167.3** (C-2, C-4).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): für C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O: berechnet: 204.1131; gefunden: 204.1147.

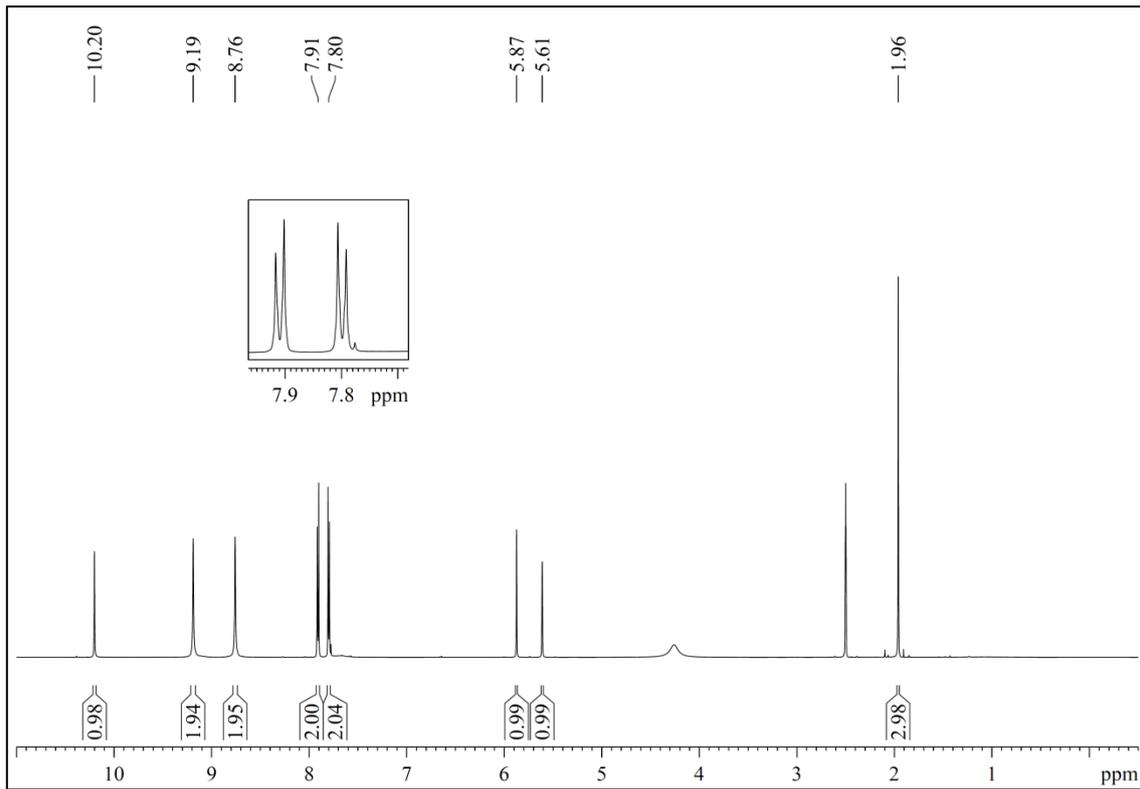


Abb. 5.3.21:  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) von *N*-Methacryl-4-aminobenzidinnitrat **12**.

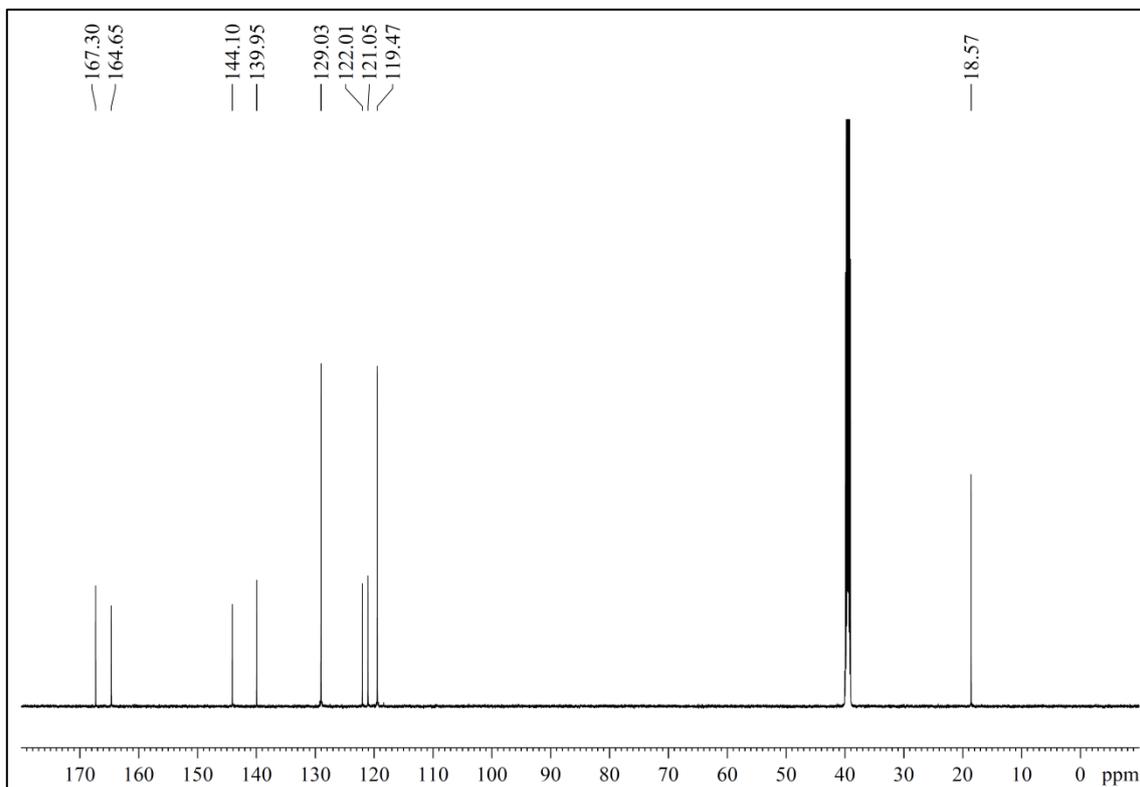
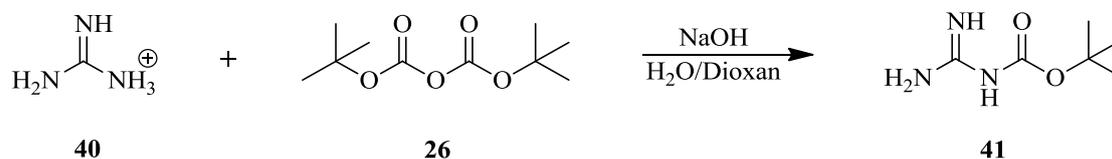


Abb. 5.3.22:  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) von *N*-Methacryl-4-aminobenzidinnitrat **12**.

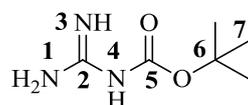
### 5.3.12 Synthese des CBS-Monomers (9)

#### 5.3.12.1 Darstellung von *N*-Boc-Guanidin (**41**)<sup>[144]</sup>



25.0 g (115 mmol, 1.0 eq.) (Boc)<sub>2</sub>O **26** wurden in 200 mL Dioxan gelöst. Diese Lösung wurde innerhalb von 7 h zu einer eisgekühlten Lösung aus 54.7 g (573 mmol, 5.0 eq.) Guanidiniumhydrochlorid **40** und Natronlauge (25.0 g, 63 mmol in 100 mL VE-Wasser) zugetropft. Die Zugabe erfolgt unter Eiskühlung. Das resultierende Reaktionsgemisch wurde 20 h bei RT nachgerührt und daraufhin mehrmals mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und bei vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Nach dem Einengen blieb ein beigefarbener Feststoff zurück.

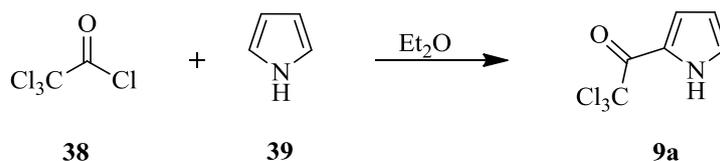
**Ausbeute:** 18.0 g (113 mmol, 98 %).



<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = **1.34** (s, 9H, H-7), **5.88-7.65** (m, 4H, H-1, H-3, H-4).

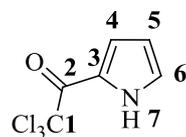
<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = **28.2** (C-7), **75.5** (C-6), **28.2** (C-7), **75.5** (C-6), **162.7**, **163.4** (C-2, C-5).

### 5.3.12.2 Darstellung von Trichloracetylpyrrol (**9a**)<sup>[144]</sup>



Zu einer Lösung resultierend aus 25.0 g (137 mmol, 1.1 eq.) Trichloroacetylchlorid **38** und 25 mL tr. Diethylether wurden innerhalb von 1.5 h 8.8 mL (8.54 g, 127 mmol, 1.0 eq.) frisch destilliertes Pyrrol **39** bei 0 °C zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde die violettfarbene Suspension 1 h bei RT nachgerührt und anschließend mit einer wäßrigen Kaliumcarbonatlösung (11.1 g Kaliumcarbonat, 80 mmol in 35 mL Wasser) neutralisiert. Das Reaktionsgemisch wurde mit 50 mL Cyclohexan versetzt, isoliert und der Nutschkuchen mehrmals mit wenig 40 °C warmen Cyclohexan gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet, mit Aktivkohle versetzt und über Celite filtriert. Nach Einengen des Filtrats wurde ein beigefarbener Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 19.5 g (91.8 mmol, 72 %).

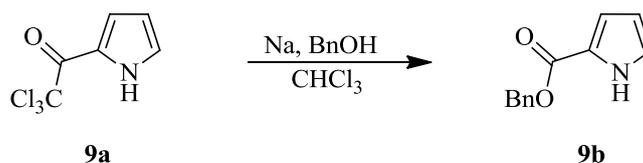


<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = **6.39** (m, 1H, H-5), **7.17** (m, 1H, H-4), **7.39** (m, 1H, H-6), **9.46** (sb, 1H, H-7).

<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = **95.1** (C-1), **112.0** (C-5), **121.3** (C-4), **123.1** (C-3), **127.1** (C-6), **173.3** (C-2).

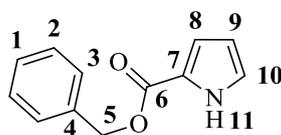
MS (ESI, neg., MeOH): für C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>NO: berechnet: 211.94; gefunden: 211.93.

### 5.3.12.3 Darstellung von Benzyl-2-pyrrolcarboxylat (19b)<sup>[144]</sup>



Aus 0.74 g (32.3 mmol, 0.2 eq.) Natrium und 18.3 mL (19.0 g, 176 mmol, 1.1 eq.) Benzylalkohol wurde ein Alkoholat gebildet. Das Alkoholat wurde innerhalb von 15 min zu einer Lösung aus 33.83 g (159 mmol, 1.0 eq.) Trichloroacetylpyrrol **9a** und 35 mL Chloroform zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde 1 h nachgerührt und daraufhin mit 32.3 mL (32.3 mmol, 0.2 eq.) 1 M Salzsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde Phasen getrennt. Nach mehrmaligem Waschen der organischen Phase mit VE-Wasser wurde diese über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und bei vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der resultierende Feststoff wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EE/DCM = 70:15:15). Es wurde ein gelbfarbener Feststoff erhalten.

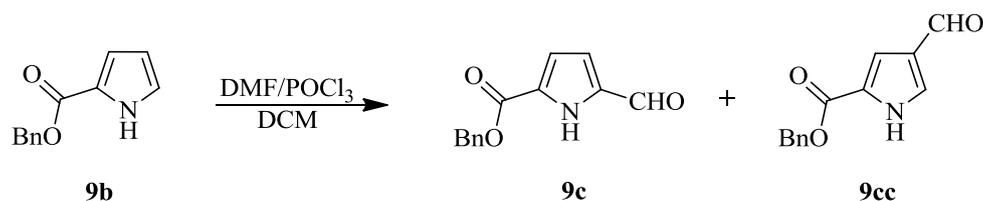
**Ausbeute:** 24.55 g (122 mmol, 77 %).  $R_F = 0.55$  (CH/EE/DCM = 70:15:15).



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = **5.32** (s, 2H, H-5), **6.25-6.29** (m, 1H, H-10), **6.93-7.00** (m, 2H, H-8, H-9), **7.30-7.46** (m, 5H, H-1, H-2, H-3), **9.22** (sb, 1H, H-11).

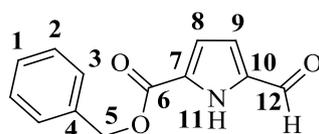
**MS (ESI, pos., MeOH):** für C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>NNaO<sub>2</sub>: berechnet: 224.07; gefunden: 224.04.

### 5.3.12.4 Darstellung von Benzyl-5-formyl-1*H*-pyrrol-2-carboxylat (**9c**)<sup>[144]</sup>



17.8 mL (16.8 g, 230 mmol, 5.0 eq.) Dimethylformamid wurden innerhalb von 5 min bei 5 - 10 °C mit 8.5 mL (13.9 g, 90.9 mmol, 2.0 eq.) Phosphorylchlorid versetzt. Das orangefarbene Vilsmeier-Haack-Reagenz wurde 15 min gerührt und anschließend tropfenweise zu einer Lösung aus 9.3 g (46.2 mmol, 1.0 eq.) **9b** und 180 mL Dichlormethan gegeben. Bei der Zugabe wurde die Temperatur zwischen -15 °C und -20 °C gehalten. Nach vollständiger Zugabe wurde das Reaktionsgemisch 3 h bei 0 °C und additiv 18 h bei RT gerührt. Das Gemisch wurde mit 75 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung versetzt und 15 min refluxiert. Nach abkühlen des Reaktionsgemisches auf RT wurde dieses filtriert. Die organische Phase wurde mehrmals mit 80 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und bei vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der resultierende braunfarbene Feststoff wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EE/DCM = 70:15:15). Es wurde ein beigefarbener Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 6.65 g (33.2 mmol, 63 %). **R<sub>F</sub>** = 0.38 (CH/EE/DCM = 70:15:15).

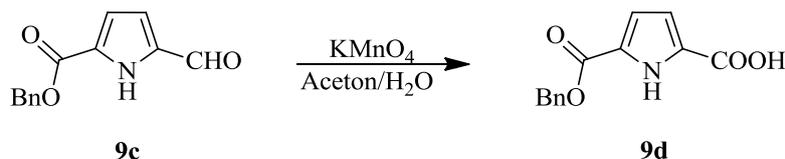


**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = **5.35** (s, 2H, H-5), **6.94** (m, 1H, H-8, H-9), **6.98** (m, 1H, H-8, H-9), **7.34-7.45** (m, 5H, H-8, H-1, H-2, H-3), **9.56** (s, 1H, H-12), **10.04** (s, 2H, H-11).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = **67.2** (C-5), **116.1** (C-8), **119.9** (C-9), **128.3** (C-7), **128.6**, **128.7**, **128.8** (C-1, C-2, C-3), **134.7** (C-10), **135.4** (C-4), **160.3** (C-6), **180.5** (C-12).

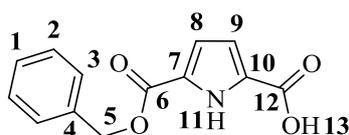
**MS (ESI, pos., MeOH):** für C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>NNaO<sub>3</sub>: berechnet: 252.06; gefunden: 252.03.

### 5.3.12.5 Darstellung von 1*H*-Pyrrol-2,5-dicarbonsäuremonobenzylester (**9d**)<sup>[144]</sup>



6.55 g (28.6 mmol, 1.0 eq.) **9c** werden in 45 mL Aceton gelöst. Die Lösung wurde mit 40 mL Aceton/Wasser (1:1) verdünnt und innerhalb von 1.5 h mit 10.57 g (66.9 mmol, 2.3 eq.) Kaliumpermanganat versetzt. Anschließend wurde die Suspension für 1.5 h auf 40 °C erwärmt und für 3 h bei RT gerührt. Nach Kontrolle auf vollständige Umsetzung mittels DC, wurde die Suspension mit 0.72 g Natriumdithionit versetzt, kurz nachgerührt und über Celite filtriert. Der Filtrerrückstand wurde mehrmals mit 50 mL 5 %iger Natronlauge gewaschen. Während des Waschvorgangs trübte sich das Filtrat. Daraufhin wurde das Filtrat tropfenweise mit 5 %iger Salzsäure versetzt, wobei sich der Niederschlag zunächst löste. Bei weiterer Zugabe der Salzsäure fiel erneut ein Feststoff aus. Nun wurde so lange Salzsäure nachgesetzt, bis keine weitere Fällung ersichtlich war. Der Niederschlag wurde isoliert und das Filtrat erneut mit Salzsäure versetzt. Nach erneuter Fällung des Filtrats, wurde dieses erneut filtriert. Beim Versetzen des erhaltenen Filtrats mit Salzsäure, konnte keine Trübung beobachtet werden. Die Filtrerrückstände wurden vereinigt und Ölpumpenvakuum getrocknet. Es wurde ein nahezu farbloser Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 1.28 g (5.2 mmol, 18 %).

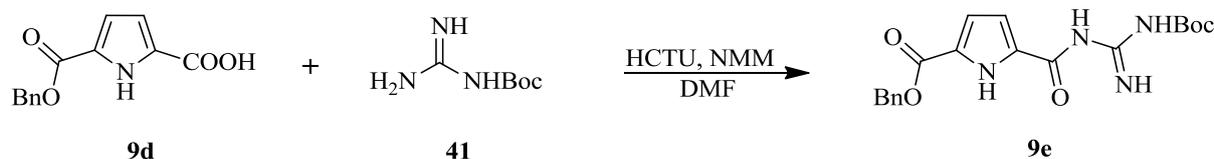


**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = **5.29** (s, 2H, H-5), **6.76** (d, 1H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 3.8 Hz, H-9), **6.84** (d, 1H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 3.8 Hz, H-8), **7.34** (t, 1H, H-1), **7.39** (t, 2H, H-2), **7.46** (d, 2H, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, H-3), **12.55** (sb, 1H, H-11), **12.83** (sb, 1H, H-13).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = **65.5** (C-5), **115.1** (C-9), **115.6** (C-8), **125.8** (C-10), **127.9**, **128.0**, **128.4** (C-1, C-2, C-3), **128.1** (C-7), **136.2** (C-4), **159.6** (C-6), **161.2** (C-12).

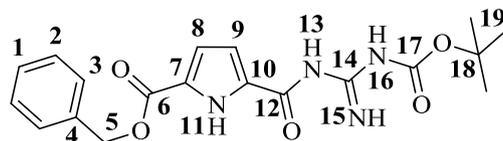
**MS (ESI, neg., MeOH):** für C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>4</sub>: berechnet: 244.06; gefunden: 244.05.

### 5.3.12.6 Darstellung von 1*H*-Pyrrol-5-*N*-Boc-guanidinocarbonyl-2-carbonsäurebenzylester (**9e**)<sup>[144]</sup>



4.82 g (19.7 mmol, 1.0 eq.) der Säure **9d** wurden in 90 mL Dimethylformamid gelöst und mit 4.8 mL (4.4 g, 43.7 mmol, 2.2 eq.) *N*-Methylmorpholin sowie 8.92 g (21.6 mmol, 1.1 eq.) HCTU versetzt. Die gelbfarbene Lösung wurde 15 min unter Argon-Atmosphäre gerührt mit 6.26 g (39.3 mmol, 2.0 eq.) Boc-Guanidin **41** versetzt und 16 h unter Schutzgas-Atmosphäre gerührt. Die orangefarbene Lösung wurde anschließend tropfenweise innerhalb von 1 h mit 300 mL VE-Wasser versetzt. Die Zugabe erfolgte dabei im Eisbad unter Fällung eines beigefarbenen Feststoffes. Die Suspension wurde filtriert, der Filtrerrückstand wurde mit wenig kaltem VE-Wasser gewaschen und anschließend bei vermindertem Druck getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (CH/EE = 2:1). Es wurde ein schwach beigefarbener Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 3.20 g (8.3 mmol, 42 %).  $R_F = 0.35$  (CH/EE = 2:1).

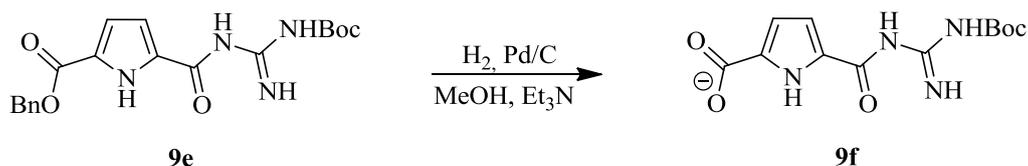


$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = **1.47** (s, 9H, H-19), **5.31** (s, 2H, H-5), **6.72-6.90** (m, 2H, H-8, H-9), **7.34** (t, 1H, H-1), **7.40** (t, 2H, H-2), **7.45** (d,  $^3J_{H,H} = 7.3$  Hz, 2H, H-3), **8.56** (sb, 1H, NH), **9.33** (sb, 1H, NH), **10.70** (sb, 1H, NH), **11.39** (sb, 1H, NH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = **27.7** (C-19), **65.5** (C-5), **115.8** (C-8, C-9), **127.9** (C-3), **128.0** (C-1), **128.5** (C-2), **136.2** (C-4), **159.8** (C-6).

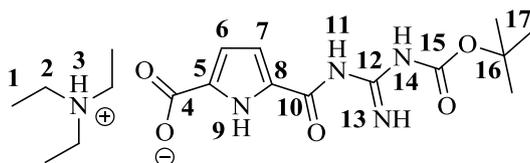
**MS (ESI, pos., MeOH):** für  $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{NaO}_5$ : berechnet: 409.15; gefunden: 409.15.

### 5.3.12.7 Darstellung von 1*H*-Pyrrol-5-*N*-Boc-guanidinocarbonyl-2-methanoat (**9f**)<sup>[144]</sup>



Eine Suspension bestehend aus 2.00 g (5.18 mmol, 1.0 eq.) **9e**, 1.07 mL (0.78 g, 7.72 mmol, 1.5 eq.) Triethylamin, 30 mL Methanol sowie 0.2 g des Katalysators (10 % Pd/C) wurden 24 h bei 40 °C unter Wasserstoff-Atmosphäre gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über Celite filtriert und der Rückstand mit insgesamt 30 mL Triethylamin (3 % Triethylamin in Methanol) gewaschen. Das Filtrat wurde vom Lösungsmittel unter Bildung eines gelbfarbenen Feststoffes befreit.

**Ausbeute:** 2.00 g (5.04 mmol, 97 %).

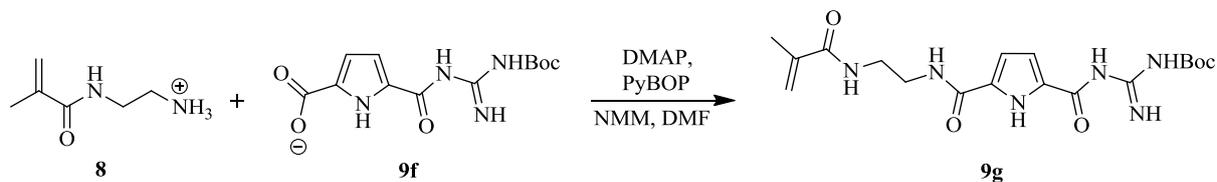


**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = **1.06** (t, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 9H, H-1), **1.45** (s, 9H, H-17), **2.76** (q, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 6H, H-2), **6.53** (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 3.6 Hz, 1H, H-6, H-7), **6.77** (d, <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> = 3.6 Hz, 1H, H-6, H-7), **8.57** (sb, 1H, NH), **9.33** (sb, 1H, NH), **10.95** (sb, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ [ppm] = **10.0** (C-1), **27.8** (C-17), **45.3** (C-2), **112.8**, **114.0** (C-6, C-7), **158.4**, **162.9** (C-4, C-10, C-12, C-15).

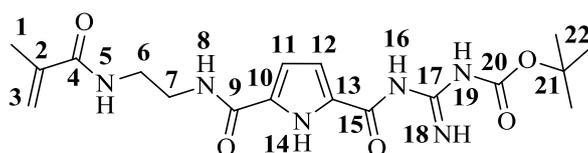
**MS (ESI, neg., MeOH):** für C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>: berechnet: 295.10; gefunden: 295.10.

### 5.3.12.8 Darstellung von 5-*N*-Boc-guanidinocarbonyl-2-*N*-(2-methacrylamidoethyl)-1*H*-pyrrol-2-carbonsäureamid (**9g**)<sup>[122]</sup>



Unter Argon-Atmosphäre wurden 2.00 g (5.03 mmol, 1.3 eq.) **9f** mit 100 mL Dimethylformamid 1.66 mL (1.53 g, 15.1 mmol, 3.0 eq.) *N*-Methylmorpholin, 1.56 g (12.8 mmol, 2.5 eq.) DMAP sowie 2.88 g (5.53 mmol, 1.1 eq.) PyBOP versetzt und 30 min gerührt. In die Reaktionsmischung wurde eine Suspension aus 1.08 g (82 %, 5.38 mmol, 1.1 eq.) des Ethylendiamin-Monomers **8** und 5 – 10 mL DMF eingetragen. Die Suspension wurde 7 Tage unter Schutzgas-Atmosphäre gerührt. Das Gemisch wurde anschließend mit 500 mL VE-Wasser verdünnt und 5-mal mit je 200 mL Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und bei vermindertem Druck mit Hilfe des Rotationsverdampfers vom Lösungsmittel weitestgehend befreit. Die Entfernung des mitgeführten Dimethylformamids erfolgte durch Kondensation bei 60 °C. Das ölige Rohprodukt wurde säulenchromatographisch vorgereinigt (EE/MeOH = 3:1, R<sub>F</sub>[Vorreinigung] = 0.8). Das erhaltene Produkt wurde erneut säulenchromatographisch gereinigt (EE). Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 755 mg (1.86 mmol, 37 %). **R<sub>F</sub>** = 0.13 (EE).

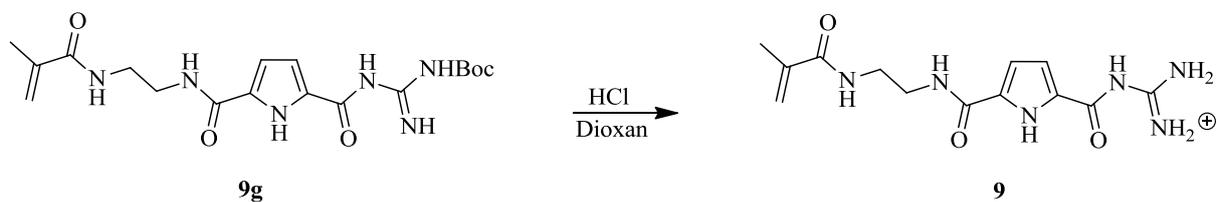


**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = **1.51** (s, 9H, H-22), **1.96** (s, 3H, H-1), **3.48-3.72** (m, 4H, H-6, H-7), **5.35** (s, 1H, H-3a), **5.76** (s, 1H, H-3b), **6.64** (s, 1H, H-11, H-12), **6.78** (s, 1H, NH), **6.91** (s, 1H, H-11, H-12), **7.22** (sb, 1H, NH), **8.53** (sb, 2H, NH), **10.26** (sb, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = **18.7** (C-1), **28.2** (C-22), **40.4**, **40.8** (C-6, C-7), **83.8** (C-21), **111.3**, **114.5** (C-11, C-12), **120.7** (C-3), **132.5** (C-10, C-13), **139.5** (C-2), **153.6**, **158.4**, **161.7**, **162.7** (C-9, C-15, C-17, C-20), **170.1** (C-4).

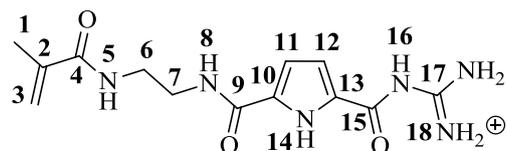
**MS (ESI, pos., MeOH):** für C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>5</sub>: berechnet: 429.19; gefunden: 429.20.

### 5.3.12.9 Darstellung von 5-Guanidinocarbonyl-2-*N*-(2-methacrylamidoethyl)-1*H*-pyrrol-2-carbonsäureamid Hydrochlorid (**9**)<sup>[122]</sup>



Eine Lösung aus 548 mg (1.35 mmol) **9g** und 39 mL Dioxan wurde tropfenweise mit 11.5 mL konzentrierter Salzsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 24 h gerührt und anschließend unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde ein beigefarbener Feststoff erhalten.

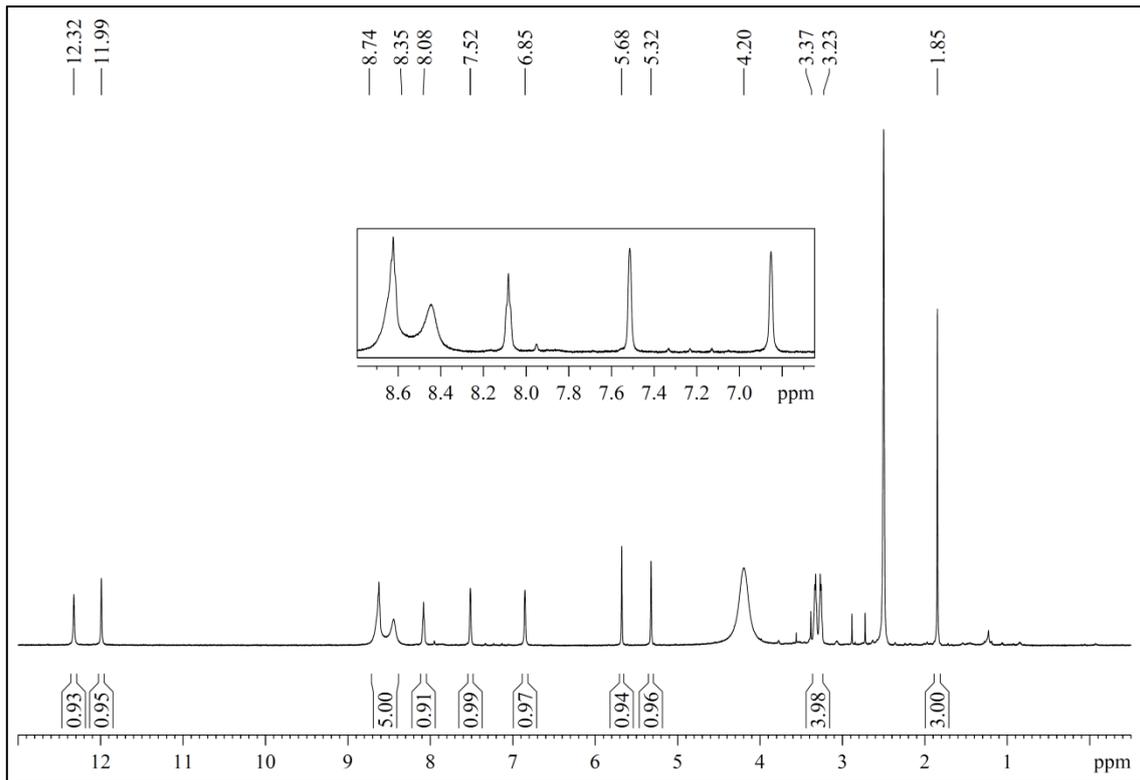
**Ausbeute:** Quantitativ mit Spuren von HCl.



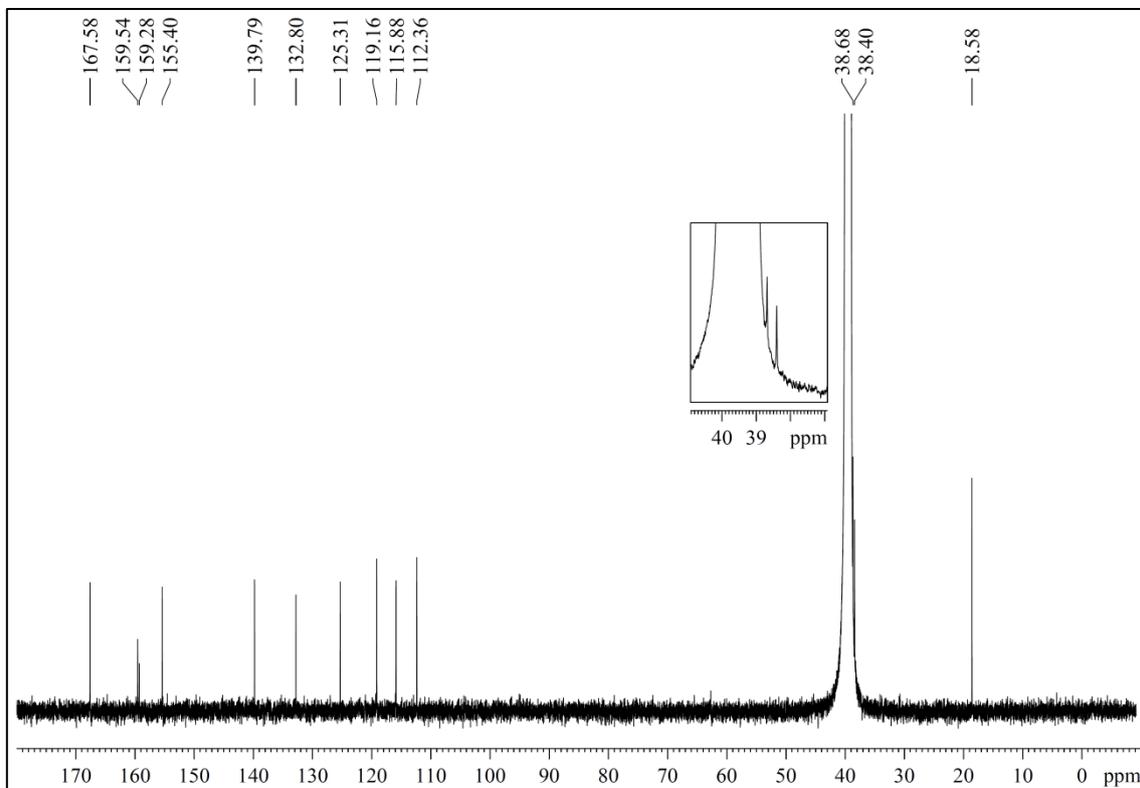
**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = **1.85** (s, 3H, H-1), **3.23-3.37** (m, 4H, H-6, H-7), **5.32** (s, 1H, H-3a), **5.68** (s, 1H, H-3b), **1.85** (s, 3H, H-1), **3.23-3.37** (m, 4H, H-6, H-7), **5.32** (s, 1H, H-3a), **5.68** (s, 1H, H-3b), **6.85** (s, 1H, H-11, H-12), **7.52** (s, 1H, H-11, H-12), **8.08** (s, 1H, H-5, H-8), **8.35-8.74** (m, 5H, H-5, H-8, H-18), **11.99** (s, 1H, H-16), **12.33** (s, 1H, H-14).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = **18.6** (C-1), **38.4**, **38.7** (C-6, C-7), **112.4**, **115.9** (C-11, C-12), **119.2** (C-3), **125.3**, **132.8** (C-10, C-13), **139.8** (C-2), **155.4**, **159.3**, **159.5** (C-9, C-15, C-17), **167.6** (C-4).

**MS (ESI, pos., MeOH):** für C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>: berechnet: 307.15; gefunden: 307.14,  
für C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>3</sub>: berechnet: 329.13; gefunden: 329.12.



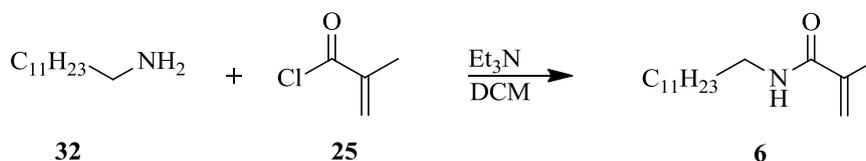
**Abb. 5.3.23:**  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) von 5-Guanidinocarbonyl-2-*N*-(2-methacrylamidoethyl)-1*H*-pyrrol-2-carbonsäureamid Hydrochlorid **9**.



**Abb. 5.3.24:**  $^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) von 5-Guanidinocarbonyl-2-*N*-(2-methacrylamidoethyl)-1*H*-pyrrol-2-carbonsäureamid Hydrochlorid **9**.

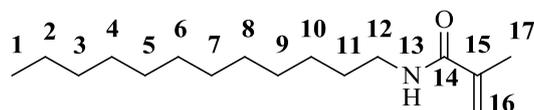
### 5.3.13 Synthese des Dodecyl-Monomers (6)

#### 5.3.13.1 Darstellung von Dodecylmethacrylamid (6)<sup>[121]</sup>



Eine eisgekühlte Lösung aus 3.00 g (16.2 mmol, 1.0 eq.) Dodecylamin **32**, 2.7 mL (1.97 g, 19.5 mmol, 1.2 eq.) Triethylamin und 200 mL Dichlormethan wurde tropfenweise mit einer Lösung aus 1.85 mL (1.98 g, 18.9 mmol, 1.2 eq.) Methacrylsäurechlorid **25** und 50 mL Dichlormethan versetzt. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionslösung 16 h bei RT gerührt und anschließend 3-mal mit 1 M Natronlauge sowie 3-mal mit 1 M Salzsäure gewaschen. Die organische Phase wurde über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet, und bei vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (CH/EE = 3:1). Nach der Aufreinigung wurde ein zart beigefarbener Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 2.39 g (9.4 mmol, 58 %).  $R_F = 0.27$  (CH/EE = 3:1) mit CAM-Lsg.



**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.88** (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$  Hz, 2H, H-1), **1.20-1.36** (m, 18H, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10), **1.48-1.56** (m, 2H, H-11), **1.96** (s, 3H, H-17), **3.30** (q, 2H, H-12), **5.30** (s, 1H, H-16a), **5.65** (s, 1H, H-16b), **5.79** (sb, 1H, H-13).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = **14.3** (C-1), **18.9** (C-17), **22.8** (C-2), **27.1**, **29.4**, **29.5**, **29.7**, **29.7**, **29.7**, **29.8**, **29.8** (C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10), **32.1** (C-11), **39.9** (C-12), **119.2** (C-16), **140.5** (C-15), **168.6** (C-14).

**MS (ESI, pos., MeOH):** für  $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{NNaO}$ : berechnet: 276.23; gefunden: 276.19.

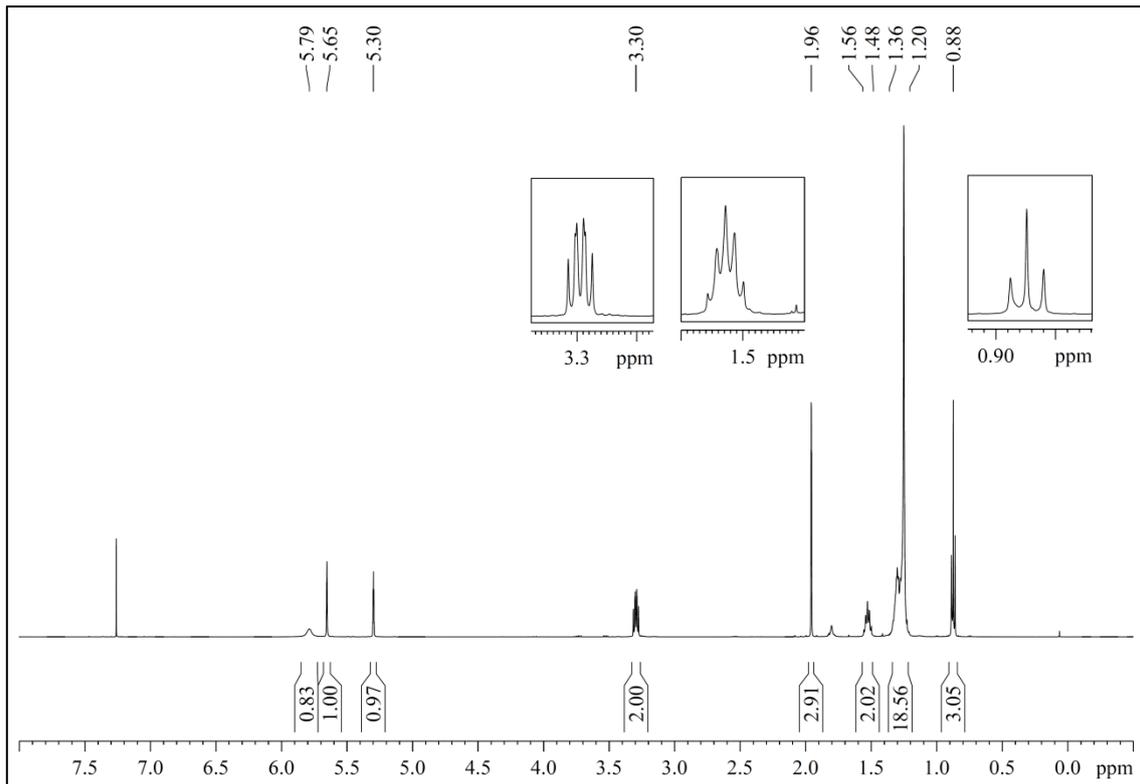


Abb. 5.3.25:  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von Dodecylmethacrylamid **6**.

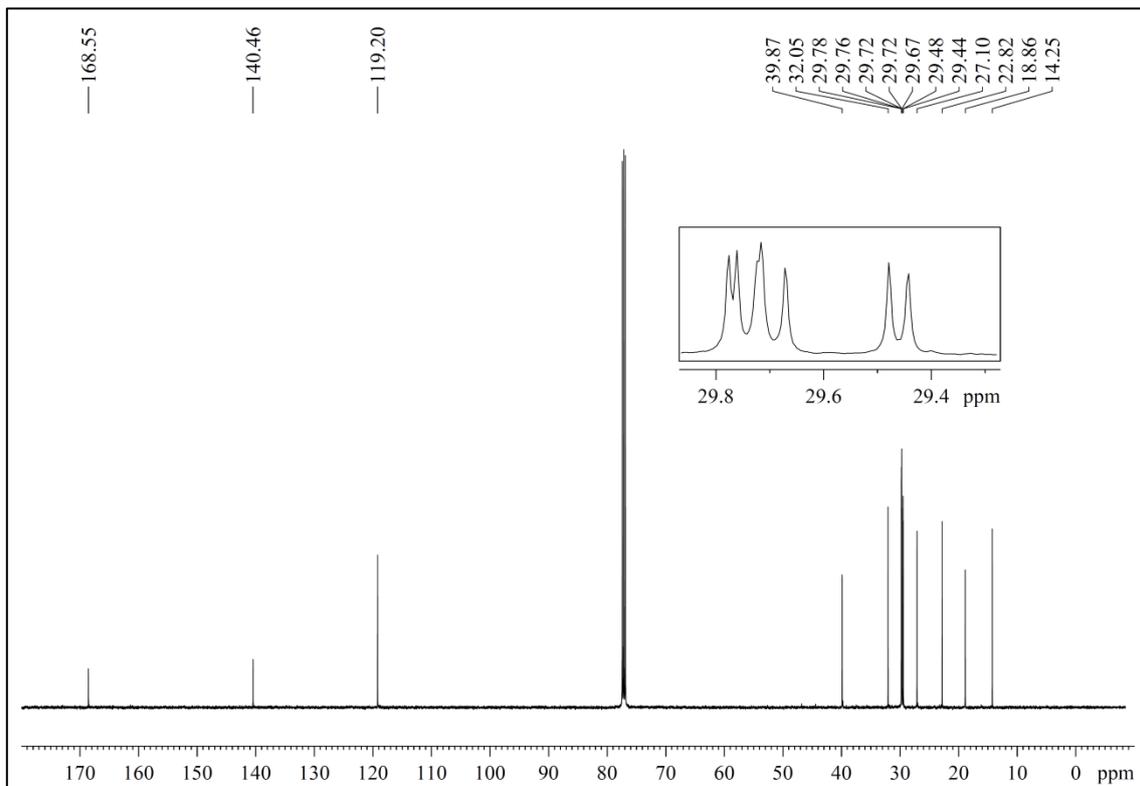
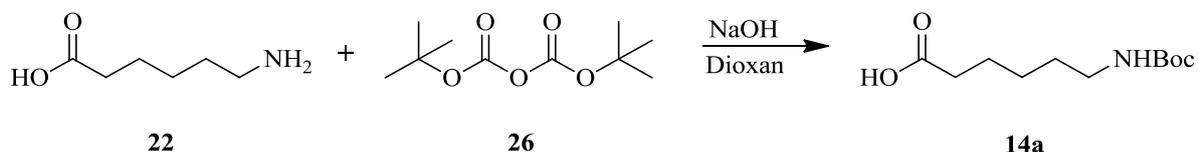


Abb. 5.3.26:  $^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von Dodecylmethacrylamid **6**.

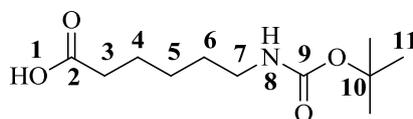
### 5.3.14 Synthese des C<sub>6</sub>-Anilin-Monomers (14)

#### 5.3.14.1 Darstellung von *N*-Boc-6-Aminocapriensäure (14a)<sup>[140]</sup>



Eine Lösung von 3.00 g (22.9 mmol, 1.0 eq.) 6-Aminoheptansäure **22** in 50.0 mL Dioxan/Wasser-Gemisch (2:1) wurde auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit 20.0 mL einer 1 M Natronlauge versetzt. Nach kurzer Nachrührzeit wurden der Lösung 5.50 g (25.2 mmol, 1.1 eq.) Boc<sub>2</sub>O **26** zugesetzt und 3 h bei RT gerührt. Die weitgehend von Dioxan befreite Flüssigkeit wurde in Essigester aufgenommen und die wässrige Phase mit 1 M Salzsäure auf pH 1-2 gestellt. Daraufhin wurde diese mehrmals mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels bei vermindertem Druck konnte ein farbloses Öl erhalten werden.

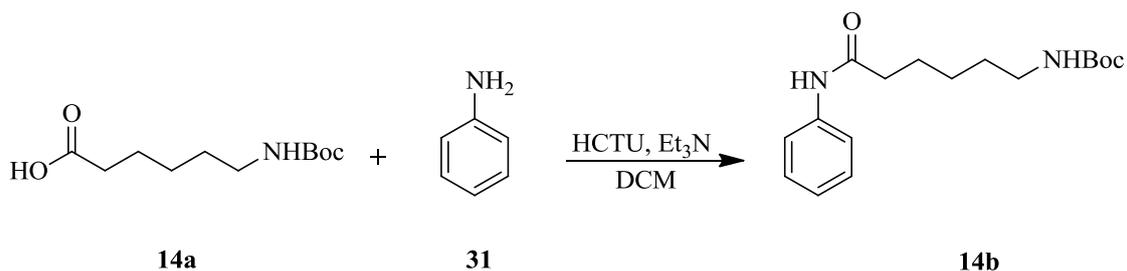
**Ausbeute:** 5.13 g (22.2 mmol, 97 %).



**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = **1.37** (m, 2H, H-5), **1.44** (s, 9H, H-11), **1.49** (m, 2H, H-6), **1.65** (m, 2H, H-4), **2.35** (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 2H, H-3), **3.11** (m, 2H, H-7), **4.56** (sb, 1H, H-8).

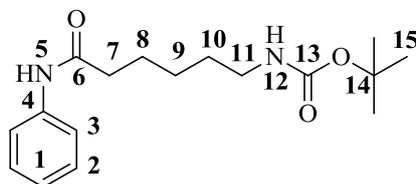
**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = **24.5** (C-4), **26.3** (C-5), **28.5** (C-11), **29.8** (C-6), **34.5** (C-3), **40.5** (C-7), **79.3** (C-10), **156.2** (C-9), **179.1** (C-2).

**HRMS (ESI, pos., MeOH):** für C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>NNaO<sub>4</sub>: berechnet: 254.1363; gefunden: 254.1379.

5.3.14.2 Darstellung von *N*-Boc-6-Aminocaprionanilid (**14b**)

Unter Argon-Atmosphäre wurden 1.54 g (6.66 mmol, 1.0 eq.) **14a** mit 50 mL Dichlormethan, 2.8 mL (2.04 g, 20.2 mmol, 3.0 eq.) Triethylamin sowie 3.00 g (7.25 mmol, 1.0 eq.) HCTU versetzt und 1 h gerührt. In die Reaktionsmischung wurden tropfenweise 1.2 mL (1.22 g, 13.2 mmol, 2.0 eq.) Anilin **31** eingetragen. Nach vollständiger Zugabe wurde das Gemisch 16 h unter Schutzgas-Atmosphäre gerührt. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Öl säulenchromatographisch gereinigt (CH/EE = 1:1). Es wurde ein weißer Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 1.67 g (5.45 mmol, 82 %).  $R_F = 0.4$  (CH/EE = 1:1).

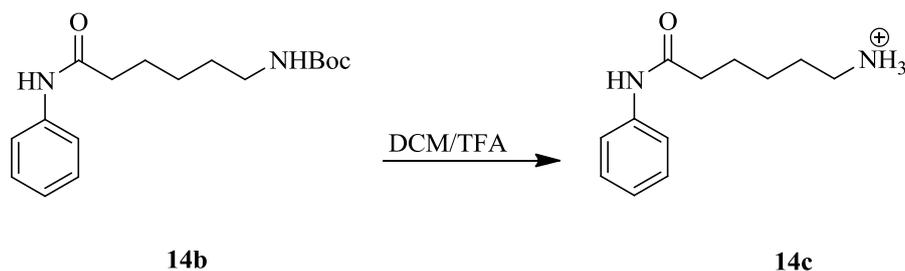


$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = **1.22-1.29** (m, 2H, H-9), **1.34-1.42** (m, 11H, H-10, H-15), **1.53-1.60** (m, 2H, H-8), **2.27** (t,  $^3J_{H,H} = 7.5$  Hz, 2H, H-7), **2.89** (q, 2H, H-11), **6.75** (sb, 1H, H-12), **7.01** (t, 1H, H-1), **7.27** (t, 2H, H-2), **7.57** (d,  $^3J_{H,H} = 7.7$  Hz, 2H, H-3), **9.84** (sb, 1H, H-5).

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = **25.0** (C-8), **26.1** (C-9), **28.3** (C-15), **29.3** (C-10), **36.4** (C-7), **39.8** (C-11), **77.4** (C-14), **119.1** (C-3), **123.0** (C-1), **128.7** (C-2), **139.4** (C-4), **155.7** (C-13), **171.3** (C-6).

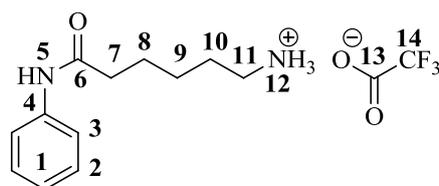
**HRMS** (ESI, pos., MeOH): für  $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{NaO}_3$ : berechnet: 329.1836; gefunden: 329.1847.

### 5.3.14.3 Darstellung von 6-Aminocapronanilidtrifluoracetat (14c)



10.0 g (32.6  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq.) **14b** wurden in 150 mL Dichlormethan gelöst und mit 25.0 mL (37.3 g, 327 mmol, 10.0 eq.) TFA versetzt. Die Reaktionslösung wurde 16 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt und überschüssiges TFA mit Benzol ausgetrieben. Es wurde ein gelbfarbener Feststoff erhalten.

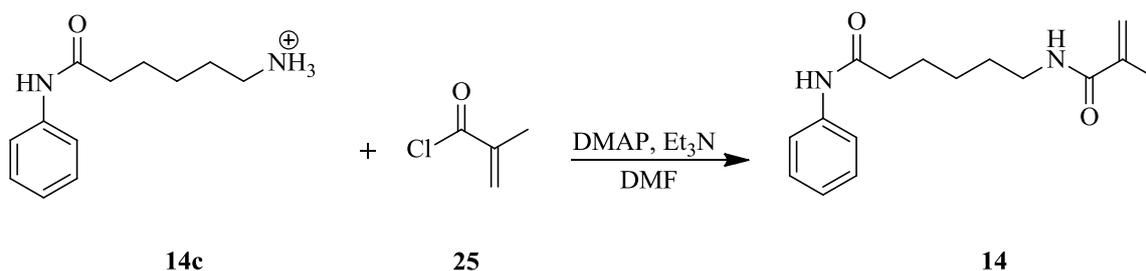
**Ausbeute:** Quantitativ mit Spuren von TFA.



**$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = **1.30-1.37** (m, 2H, H-9), **1.51-1.63** (m, 4H, H-8, H-10), **2.31** (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$  Hz, 2H, H-7), **2.75-2.82** (m, 2H, H-11), **7.02** (t,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$  Hz, 1H, H-1), **7.28** (t, 2H, H-2), **7.58** (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$  Hz, 2H, H-3), **7.69** (sb, 3H, H-12), **7.69** (s, 1H, H-5).

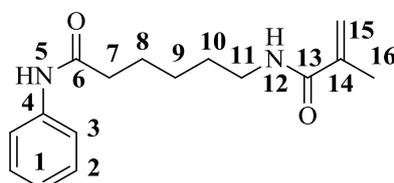
**$^{13}\text{C-NMR}$**  (126 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = **24.6** (C-8), **25.5** (C-9), **26.9** (C-10), **36.1** (C-7), **38.8** (C-11), **119.0** (C-3), **123.0** (C-1), **128.7** (C-2), **139.1** (C-4), **171.0** (C-6).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): für  $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}$ : berechnet: 207.1492; gefunden: 207.1458.

5.3.14.4 Darstellung von 6-Methacrylamid-Aminocaprionanilid (**14**)

Eine Lösung aus 100 mg (312  $\mu$ mol, 1.0 eq.) **14c**, 1.1 mL Dimethylformamid, katalytischen Mengen DMAP und 175  $\mu$ L (128 mg, 1.26 mmol, 4.0 eq.) Triethylamin wurde tropfenweise mit einer Lösung aus 45  $\mu$ L (48.2  $\mu$ g, 461  $\mu$ mol, 1.5 eq.) Methacrylsäurechlorid **25** und 1.1 mL Dimethylformamid versetzt. Nach vollständiger Zugabe wurde die Suspension 4 Tage bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde im Eisbad gekühlt und mit ca. 3 - 5 mL eisgekühltem VE-Wasser tropfenweise gefällt. Der weiße Niederschlag wurde filtriert und mit wenig eisgekühltem VE-Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Resttrocknung im Ölpumpenvakuum.

**Ausbeute:** 75.9 mg (277  $\mu$ mol, 89 %).



**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = **1.25-1.32** (m, 2H, H-9), **1.42-1.49** (m, 2H, H-10), **1.55-1.62** (m, 2H, H-8), **1.83** (s, 3H, H-16), **2.29** (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.6 Hz, 2H, H-7), **3.09** (q, 2H, H-11), **5.28** (s, 1H, H-15a), **5.61** (s, 1H, H-15b), **7.01** (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.3 Hz, 1H, H-1), **7.27** (t, 2H, H-2), **7.57** (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.7 Hz, 2H, H-3), **7.89** (s, 1H, H-12), **9.84** (s, 1H, H-5).

**<sup>13</sup>C-NMR** (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = **18.7** (C-16), **24.9** (C-8), **26.1** (C-9), **28.9** (C-10), **36.4** (C-7), **38.7** (C-11), **118.7** (C-15), **119.1** (C-3), **122.9** (C-1), **128.6** (C-2), **139.3** (C-4), **140.1** (C-14), **167.4** (C-13), **171.2** (C-6).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): für C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>2</sub>: berechnet: 297.1573; gefunden: 297.1591.

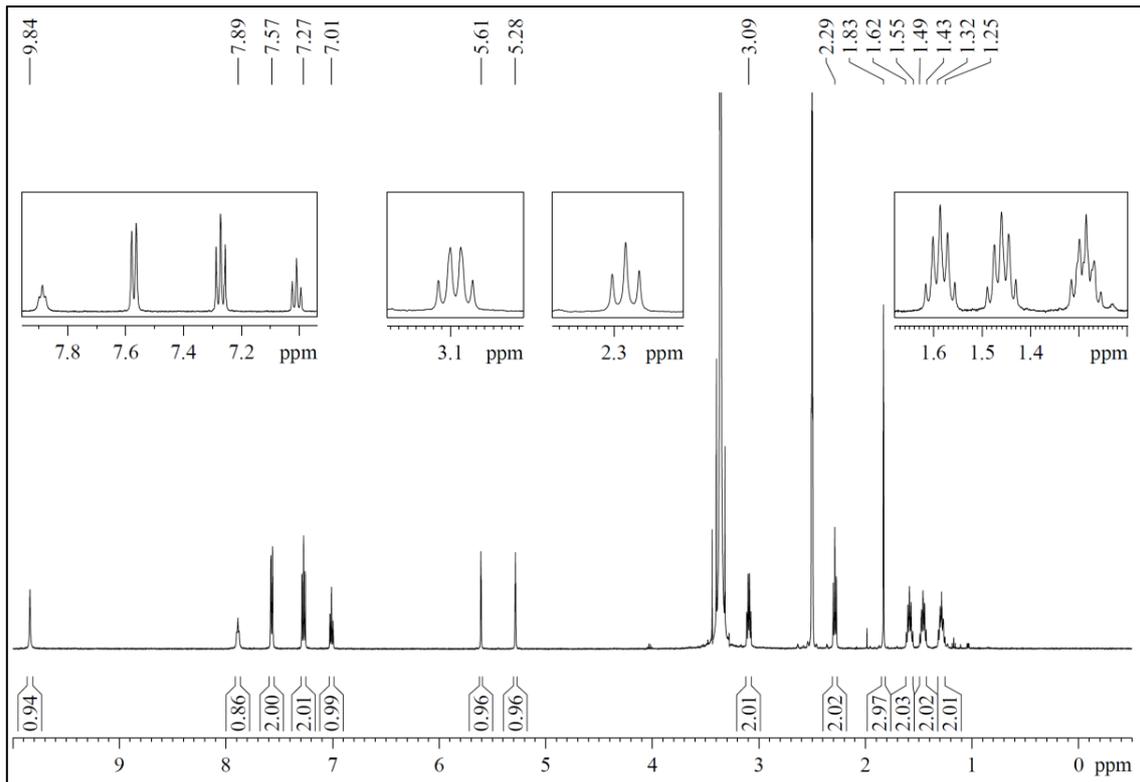


Abb. 5.3.27: <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) von 6-Methacrylamid-Aminocapronanilid **14**.

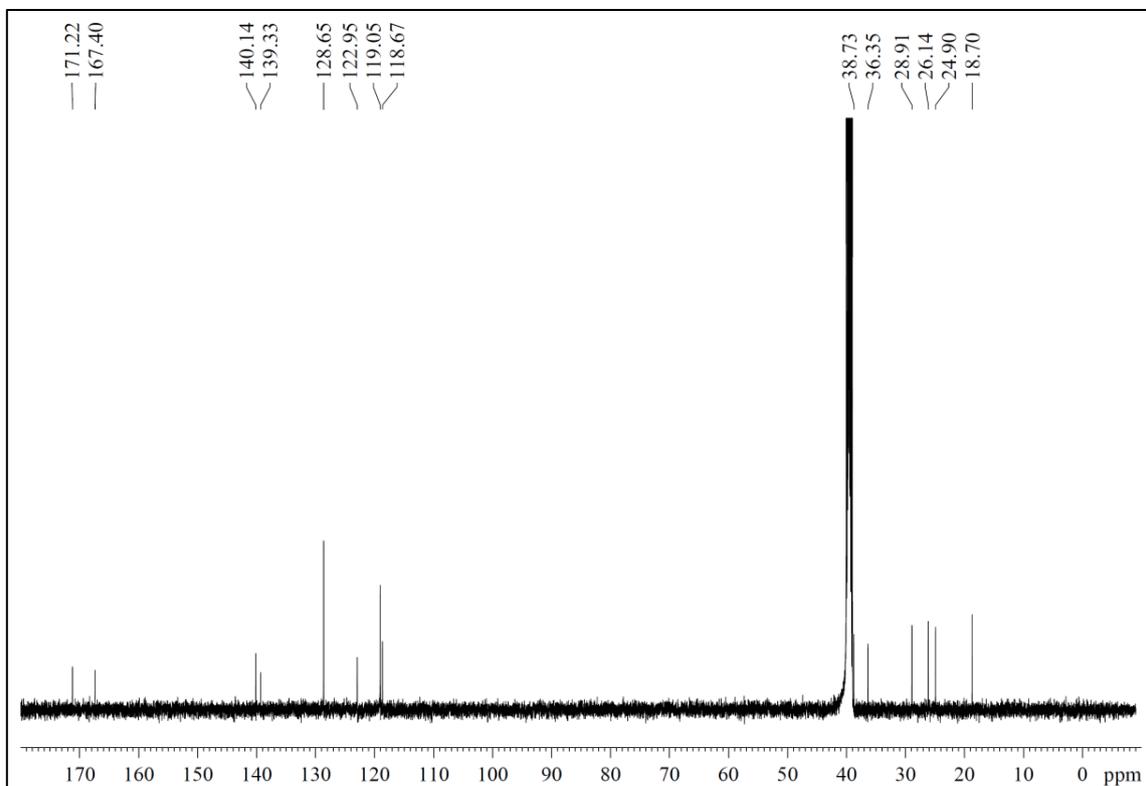
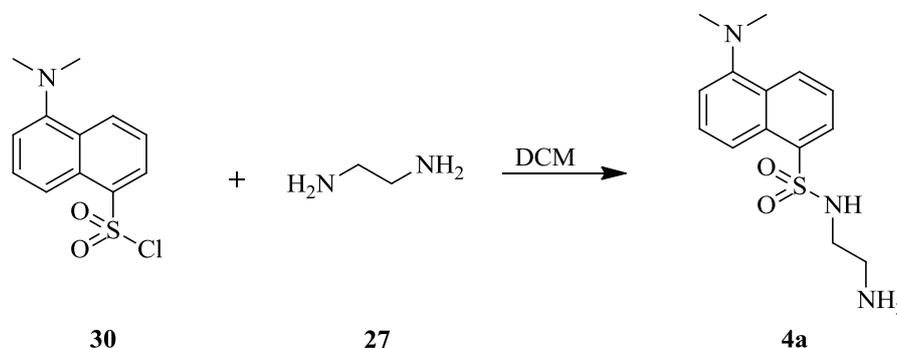


Abb. 5.3.28: <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) von 6-Methacrylamid-Aminocapronanilid **14**.

### 5.3.15 Synthese des Dansyl-Monomers (4)

#### 5.3.15.1 Darstellung *N*-[(5-*N,N*-Dimethylamino-naphthylsulfonylamino)-ethylamin

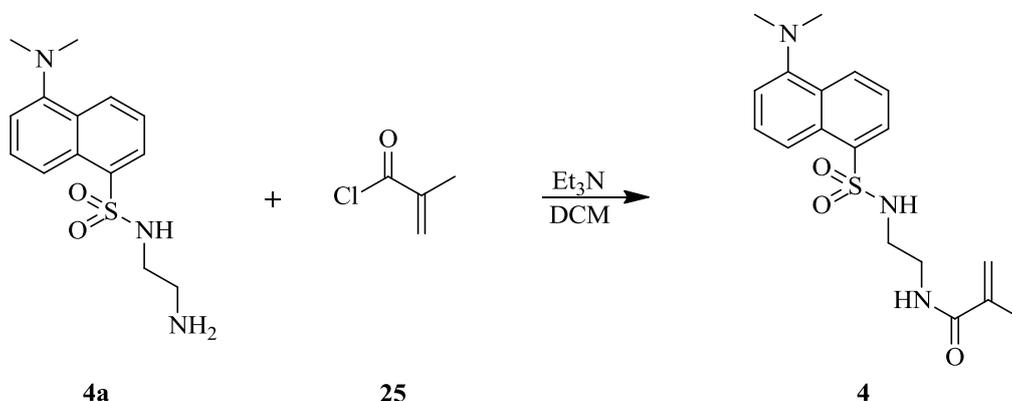
(**4a**)<sup>[121, 139]</sup>



2.5 g (9.3 mmol, 1.0 eq.) Dansylchlorid **30**, wurden in einem mit Aluminium-Folie verdunkeltem Kolben mit 40 mL Dichlormethan gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad tropfenweise mit einer Lösung aus 28.8 mL (25.9 g, 431 mmol, 47 eq.) Ethylendiamin **27** und 100 mL Dichlormethan versetzt. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionslösung 16 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit 400 mL 1 M Salzsäure angesäuert (pH = 12.4 => 2.5), hierbei wurde darauf geachtet das die Temperatur der Reaktionsmischung unterhalb von 25 °C blieb. Nach Phasentrennung wurde die wäßrige Phase 3-mal mit 25 mL Dichlormethan extrahiert. Die wäßrige Phase wurde mit ca. 100 mL 5 M KOH auf einem pH-Wert von 9 gestellt und erneut 3-mal mit 25 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und bei vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene gelbfarbene Feststoff wurde ohne Aufreinigung für den nächsten Syntheseschritt verwendet.

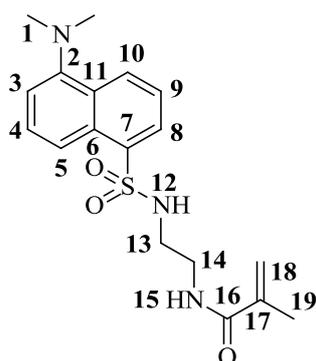
**Ausbeute:** 2.30 g (ca. 7.8 mmol).

### 5.3.15.2 Darstellung von *N*-[(5-*N,N*-Dimethylamino-naphthylsulfonylamino)ethyl]-2-methacrylamid (**4**)<sup>[121, 139]</sup>



1.00 g (ca. 3.4 mmol, 1.0 eq.) **4a** wurden mit 60 mL Dichlormethan und 0.52 mL (0.38 g, 3.8 mmol, 1.1 eq.) Triethylamin gelöst. Die Lösung wurde im Eisbad tropfenweise mit einer Lösung aus 0.36 mL (0.39 g, 3.7 mmol, 1.1 eq.) Methacrylsäurechlorid **25** und 20 mL Dichlormethan versetzt. Nach vollständiger Zugabe wurde die Reaktionslösung 5 h bei RT gerührt und anschließend weitestgehend vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (EE/CH = 1:1) gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde ein neon-gelber Feststoff erhalten.

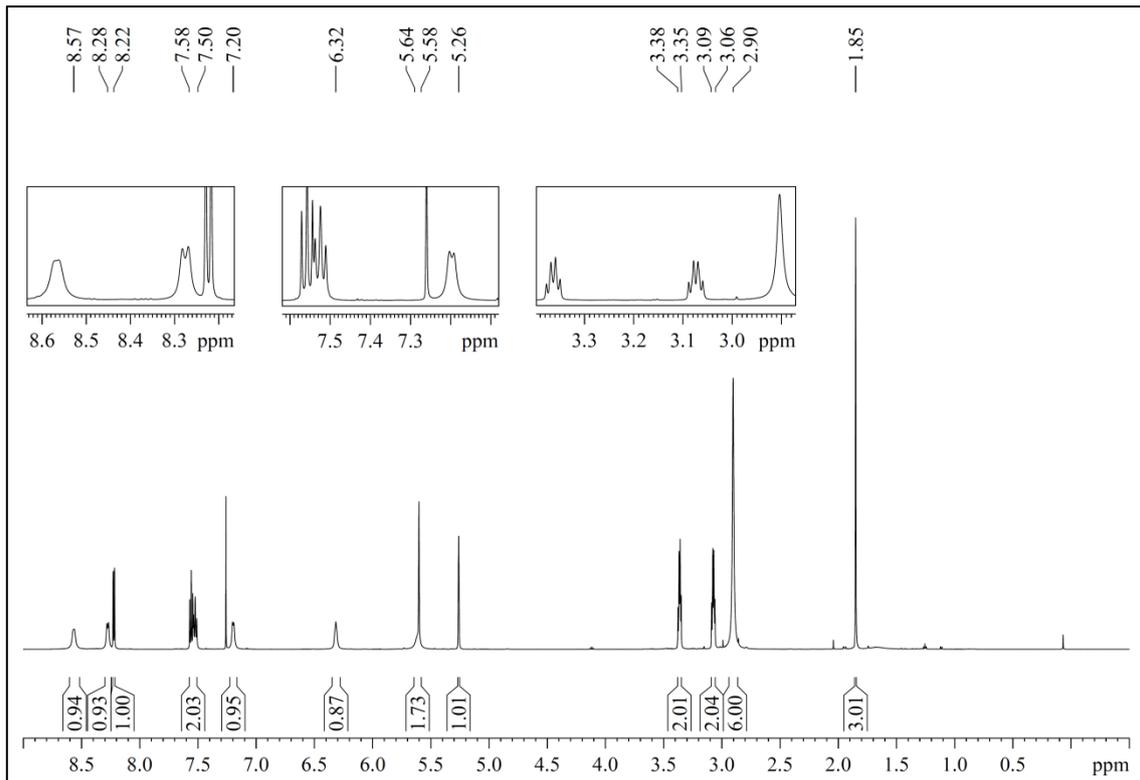
**Ausbeute:** 574 mg (1.59 mmol, 39 % bezogen auf 2 Stufen).  $R_F = 0.32$  (EE/CH = 2:1).



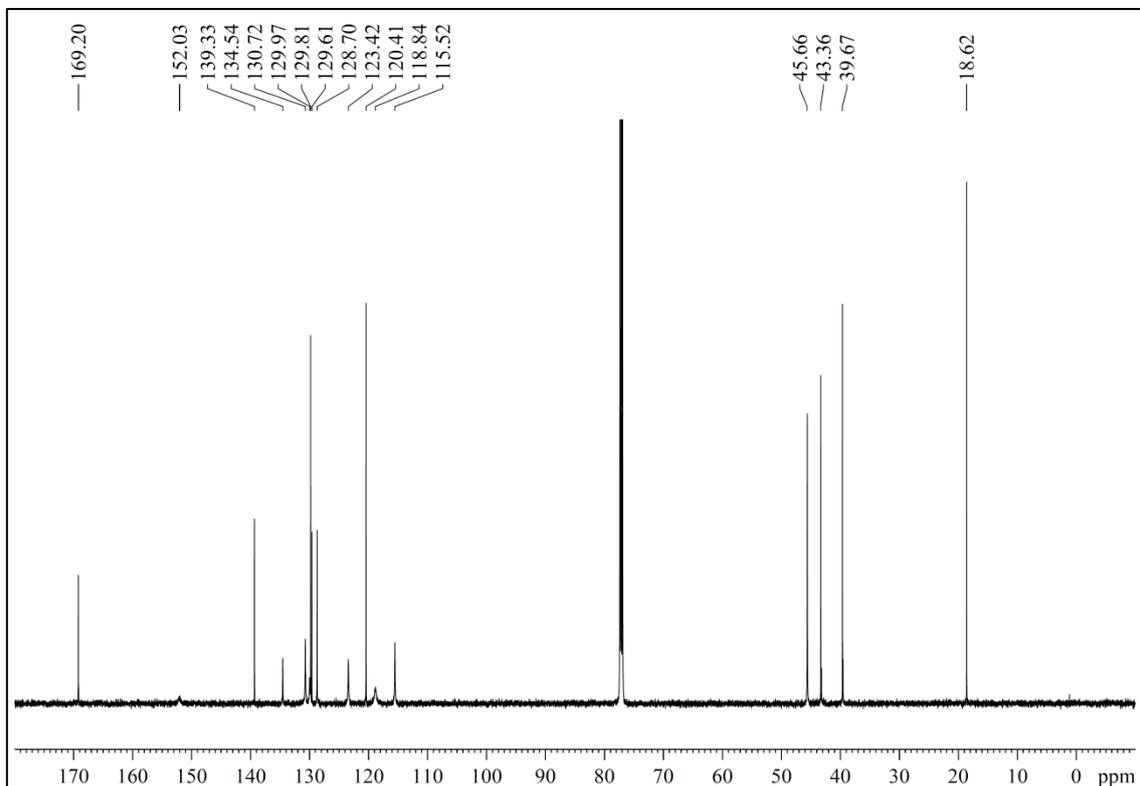
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = **1.85** (s, 3H, H-1), **2.90** (sb, 6H, H-1), **3.06-3.09** (m, 2H, H-13), **3.35-3.38** (m, 2H, H-14), **5.26** (s, 1H, H-19a), **5.58-5.64** (m, 2H, H-19b, H-15), **6.32** (sb, 1H, H-12), **7.20** (d,  $^3J_{H,H} = 6.8$  Hz, 1H, H-3), **7.50-7.58** (m, 2H, H-4, H-9), **8.22** (d,  $^3J_{H,H} = 7.3$  Hz, 1H, H-8), **8.28** (d,  $^3J_{H,H} = 8.1$  Hz, 1H, H-5), **8.57** (d,  $^3J_{H,H} = 5.6$  Hz, 1H, H-10).

**$^{13}\text{C}$ -NMR** (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = **18.6** (C-19), **39.7** (C-14), **43.4** (C-13), **45.7** (C-1), **115.5** (C-3), **118.8** (C-5), **120.4** (C-18), **123.4** (C-9), **128.7** (C-4), **129.6** (C-8), **129.8** (C-6), **130.0** (C-11), **130.7** (C-10), **134.5** (C-7), **139.3** (C-17), **152.0** (C-2), **169.2** (C-16).

**MS** (ESI, pos., MeOH): für  $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{NaO}_3\text{S}$ : berechnet: 384.14; gefunden: 384.13;  
(ESI, neg., MeOH): für  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ : berechnet: 360.14; gefunden: 360.16.



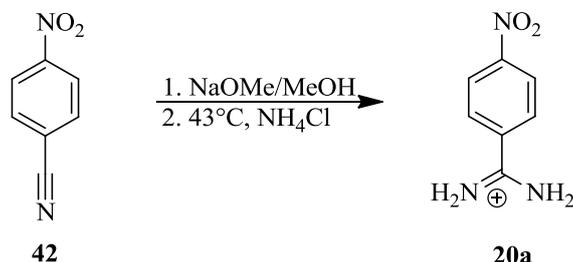
**Abb. 5.3.29:**  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von *N*-[(5-*N,N*-Dimethylamino-naphthylsulfonylamino)ethyl]-2-methacrylamid **4**.



**Abb. 5.3.30:**  $^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von *N*-[(5-*N,N*-Dimethylamino-naphthylsulfonylamino)ethyl]-2-methacrylamid **4**.

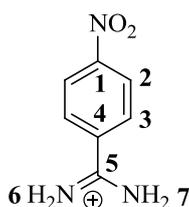
### 5.3.16 Synthese der C<sub>6</sub>-BA-Monomere (20, 21 [44])

#### 5.3.16.1 Darstellung von 4-Nitrobenzamidin Hydrochlorid (20a)<sup>[150]</sup>



600 mg (11.1 mmol, 1.0 eq.) Natriummethanolat wurden in 375 mL tr. Methanol gelöst und mit 15.0 g (101 mmol, 9.1 eq.) 4-Nitrobenzoesäurenitril **42** versetzt. Die Suspension wurde 1 h gerührt und anschließend vorsichtig erwärmt, bis sich eine klare Lösung bildete. Daraufhin wurde 16 h bei RT gerührt. Die orangefarbene Lösung wurde mit 5.4 g (101 mmol, 9.1 eq.) Ammoniumchlorid versetzt und auf 43 °C erwärmt. Nachdem die Reaktionslösung 16 h bei dieser Temperatur rührte, wurde sie im Eisbad abgekühlt. Der dabei ausgefallene Feststoff wurde filtriert und das Filtrat bei vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Der resultierende Feststoff wurde mit wenig Aceton suspendiert und filtriert. Nachdem der beigefarbene Filtrerrückstand mit Aceton gewaschen wurde, wurde dieser im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es wurde ein gelbfarbener Feststoff erhalten.

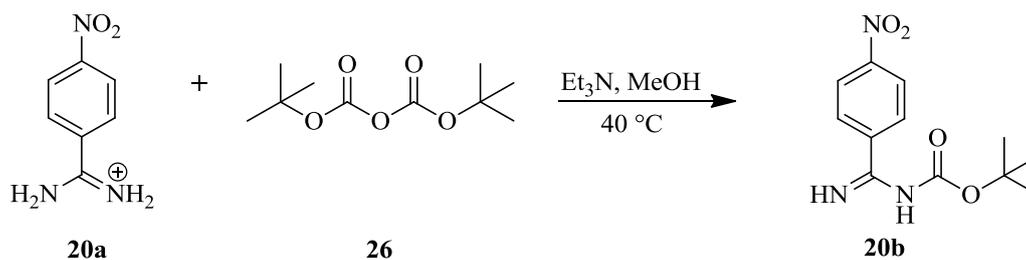
**Ausbeute:** 16.6 g (82.3 mmol, 82 %).



<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = **8.10** (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.8 Hz, 2H, H-2, H-3), **8.41** (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.8 Hz, 2H, H-2, H-3), **9.04** (sb, 4H, H-6, H-7).

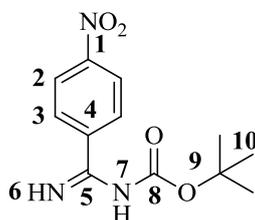
<sup>13</sup>C-NMR (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = **123.7**, **130.0** (C-2, C-3), **134.0** (C-4), **150.3** (C-1), **164.5** (C-5).

**HRMS (ESI, pos., MeOH):** für C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: berechnet: 166.0611; gefunden: 166.0628.

5.3.16.2a Darstellung von *N*-Boc-4-Nitrobenzamidin (**20b**)<sup>[151]</sup>

500 mg (2.48 mmol, 1.0 eq.) 4-Nitrobenzamidin • HCl **20a** wurden unter Argon-Atmosphäre in 60 mL tr. Methanol gelöst und mit 175  $\mu$ L (128 mg, 1.26 mmol, 0.5 eq.) Triethylamin sowie 488 mg (2.23 mmol, 0.9 eq.) Boc<sub>2</sub>O **26** versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf 40 °C erwärmt und bei dieser Temperatur für 4 h unter Schutzgas-Atmosphäre gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels bei vermindertem Druck wurde das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (EE/CH = 2:3). Es wurde ein weißer kristalliner Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 396 mg (1.49 mmol, 60 %). **R<sub>F</sub>** = 0.6 (EE/CH = 1:1).

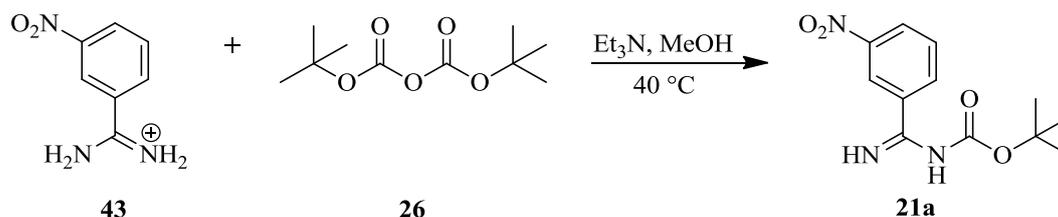


**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = **1.45** (s, 9H, H-10), **8.16** (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.7 Hz, 2H, H-3), **8.30** (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.7 Hz, 2H, H-2), **9.12** (sb, 2H, H-6, H-7).

**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = **27.9** (C-10), **78.2** (C-9), **123.3** (C-2), **129.1** (C-3), **140.6** (C-4), **149.2** (C-1), **163.1** (C-8), **164.1** (C-5).

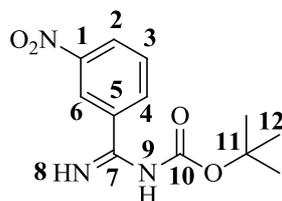
**HRMS** (ESI, neg., MeOH): für C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: berechnet: 264.0979; gefunden: 264.0964.

### 5.3.16.2b Darstellung von *N*-Boc-3-Nitrobenzamidin (**21a**)<sup>[151]</sup>



431 mg (2.14 mmol, 1.0 eq.) 3-Nitrobenzamidin • HCl **43** wurden unter Argon-Atmosphäre in 10 mL tr. Methanol gelöst und mit 150  $\mu$ L (110 mg, 1.08 mmol, 0.5 eq.) Triethylamin sowie 710 mg (3.25 mmol, 1.5 eq.) Boc<sub>2</sub>O **26** versetzt. Die Reaktionslösung wurde auf 40 °C erwärmt, und bei dieser Temperatur für 4 h unter Schutzgas-Atmosphäre gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels bei vermindertem Druck, wurde das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (EE/CH = 1:2). Es wurde ein weißer kristalliner Feststoff erhalten.

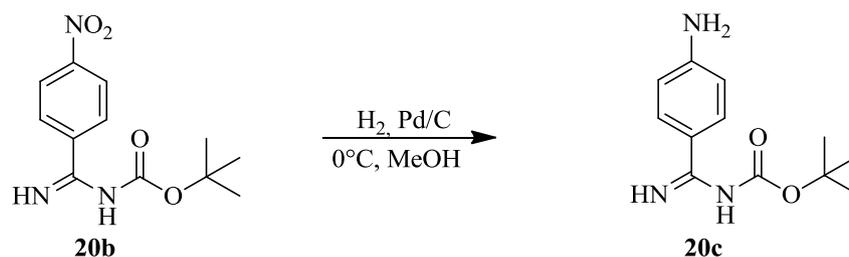
**Ausbeute:** 436 mg (1.64 mmol, 77 %). **R<sub>F</sub>** = 0.33 (EE/CH = 1:2).



**<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = **1.46** (s, 9H, H-12), **7.78** (t, 1H, H-3), **8.37-8.42** (m, 2H, H-2, H-4), **8.77** (s, 1H, H-6), **9.20** (sb, 2H, H-8, H-9).

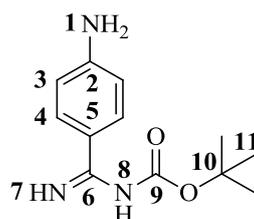
**<sup>13</sup>C-NMR** (151 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = **27.9** (C-12), **78.2** (C-11), **122.5** (C-6), **126.2**, **133.9** (C-2, C-4), **130.0** (C-3), **136.1** (C-5), **147.7** (C-1), **163.2**, **163.7** (C-7, C-10).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): für C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: berechnet: 266.1135; gefunden: 266.1158,  
für C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>4</sub>: berechnet: 288.0955; gefunden: 288.0973.

5.3.16.3a Darstellung von *N*-Boc-4-Aminobenzamidin (**20c**)

In einem Eisbad wurden 100 mg (377  $\mu\text{mol}$ ) **20b** in 50 mL tr. Methanol gelöst, mit katalytischen Mengen (10 % Pd) Pd/C versetzt und 1.0 h unter Wasserstoff-Atmosphäre gerührt. Anschließend erfolgte sofort die Entfernung des Katalysators mittels Filtration über Celite. Das Filtrat wurde unter verminderten Druck entfernt. Es wurde ein gelbfarbener Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 86.0 mg (365  $\mu\text{mol}$ , 97 %).

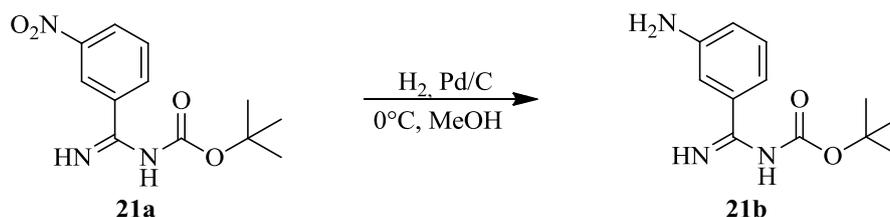


**$^1\text{H-NMR}$**  (600 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = **1.42** (s, 9H, H-11), **5.78** (sb, 2H, H-1), **6.54** (d,  $^3J_{H,H} = 8.8$  Hz, 2H, H-3), **7.71** (d,  $^3J_{H,H} = 8.8$  Hz, 2H, H-4), **8.29-9.30** (m, 2H, H-7, H-8).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (151 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = **28.1** (C-11), **77.0** (C-10), **112.5** (C-3), **120.3** (C-5), **129.2** (C-4), **152.5** (C-2), **163.9** (C-9), **166.2** (C-6).

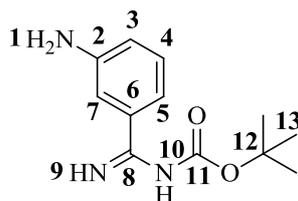
**HRMS** (ESI, pos., MeOH): für  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2$ : berechnet: 236.1394; gefunden: 236.1398,  
für  $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{NaO}_2$ : berechnet: 258.1213; gefunden: 258.1208.

### 5.3.16.3b Darstellung von *N*-Boc-3-Aminobenzamidin (21b)



In einem Eisbad wurden 50.0 mg (188  $\mu\text{mol}$ ) **21a** in 20 mL tr. Methanol gelöst, mit katalytischen Mengen (10 % Pd) Pd/C versetzt und 1.5 h unter Wasserstoff-Atmosphäre gerührt. Anschließend erfolgte sofort die Entfernung des Katalysators mittels Filtration über Celite. Das Filtrat wurde unter verminderten Druck entfernt. Es wurde ein gelbfarbener Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 44.0 mg (187  $\mu\text{mol}$ , 99 %).

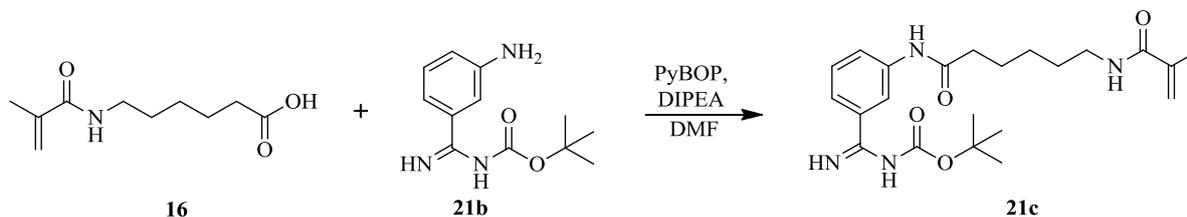


$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = **1.43** (s, 9H, H-13), **5.26** (sb, 2H, H-1), **6.71** (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$  Hz, 1H, H-3, H-5), **7.02** (d,  $^3J_{\text{H,H}} = 7.7$  Hz, 1H, H-3, H-5), **7.08** (t, 1H, H-4), **7.19** (s, 1H, H-7), **8.46-9.27** (m, 2H, H-9, H-10).

$^{13}\text{C-NMR}$  (151 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  [ppm] = **28.0** (C-13), **77.5** (C-12), **113.0** (C-7), **114.5**, **117.0** (C-3, C-5), **128.6** (C-4), **135.3** (C-6), **148.7** (C-2), **163.8**, **167.0** (C-8, C-11).

**HRMS** (ESI, pos., MeOH): für  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2$ : berechnet: 236.1394; gefunden: 236.1417,  
für  $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{NaO}_2$ : berechnet: 258.1213; gefunden: 258.1237.

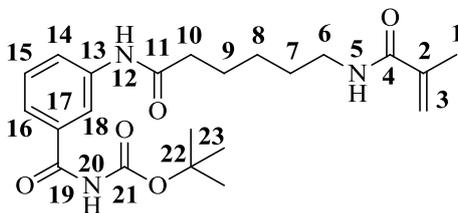
### 5.3.16.4 Darstellung von „*N*-Boc-3-(6-methacrylamido-1-hexanamido)-benzamidin“ (21c)



Unter Argon-Atmosphäre wurden 100 mg (425  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq.) **21b** in 10 mL Dimethylformamid gelöst und mit 150  $\mu\text{L}$  (111 mg, 861  $\mu\text{mol}$ , 2.0 eq.) DIPEA, 243 mg (467  $\mu\text{mol}$ , 1.1 eq.) PyBOP sowie 84.7 mg (425  $\mu\text{mol}$ , 1.0 eq.) des C<sub>6</sub>-Spacer-Monomers **16** versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 16 h gerührt. Die Entfernung des Lösungsmittels erfolgte mittels Kondensation. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (EE). Es wurde ein beigefarbener Feststoff erhalten.

**Ausbeute:** 60.9 mg (146  $\mu\text{mol}$ , 34 %).  $R_F = 0.3$  (EE).

Jedoch handelt es sich wohl bei der erhaltenen Verbindung um das Hydrolyse-Produkt **44a**.



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = **1.26-1.34** (m, 2H, H-8), **1.43-1.50** (m, 11H, H-7, H-23), **1.57-1.63** (m, 2H, H-9), **1.83** (s, 3H, H-1), **2.31** (t, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.4 Hz, 2H, H-10), **3.10** (q, 2H, H-6), **5.28** (s, 1H, H-3a), **5.61** (s, 1H, H-3b), **7.38** (t, 1H, H-15), **7.48** (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 7.7 Hz, 1H, H-16), **7.81** (d, <sup>3</sup>J<sub>H,H</sub> = 8.2 Hz, 1H, H-14), **7.89** (sb, 1H, H-5), **8.00** (s, 1H, H-18), **10.04** (s, 1H, H-12), **10.63** (s, 1H, H-20).

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  [ppm] = **18.7** (C-1), **24.8** (C-9), **26.1** (C-8), **27.7** (C-23), **28.9** (C-7), **36.3** (C-10), **38.7** (C-6), **80.7** (C-22), **118.6** (C-3), **118.9** (C-18), **122.5**, **122.6** (C-14, C-16), **128.6** (C-15), **134.2**, **139.3** (C-13, C-17), **140.1** (C-2), **150.3** (C-21), **166.1** (C-19), **167.3** (C-4), **171.4** (C-11).

**HRMS (ESI, pos., MeOH):** für C<sub>22</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>5</sub>: berechnet: 440.2156 (**44a**);  
gefunden: 440.2159.



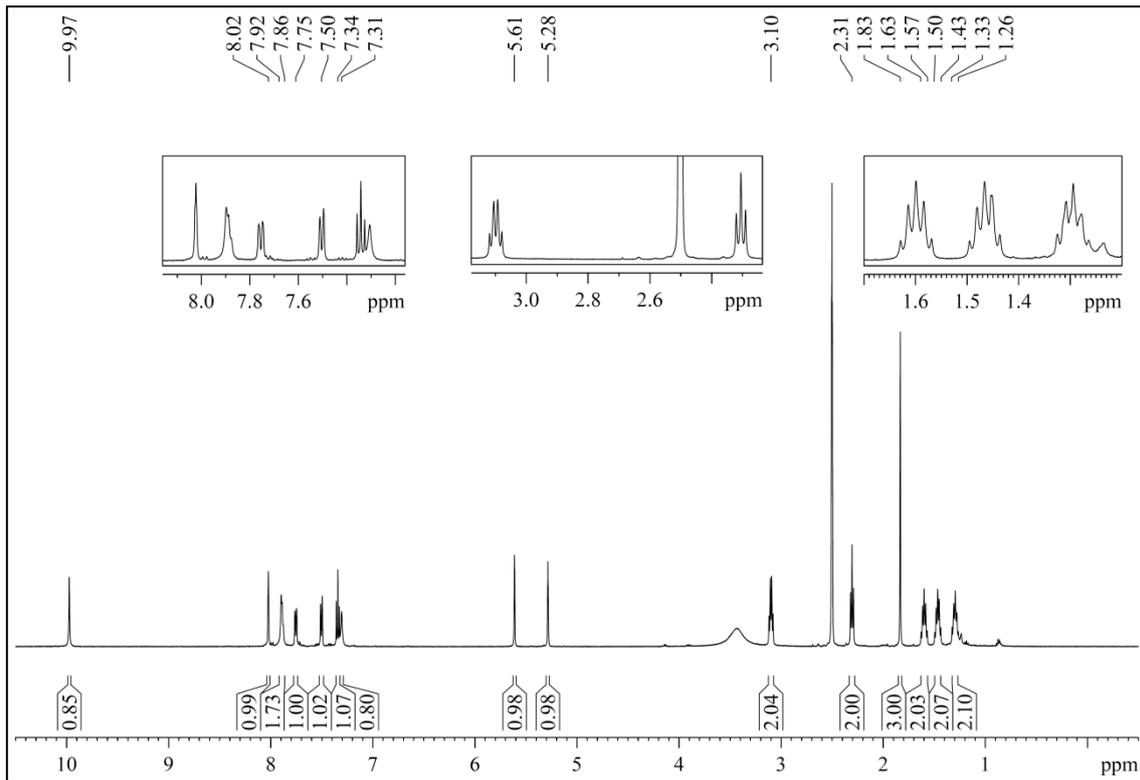


Abb. 5.3.31:  $^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) von 3-(6-methacrylamido-1-hexanamido)-benzoesäureamid **44**.

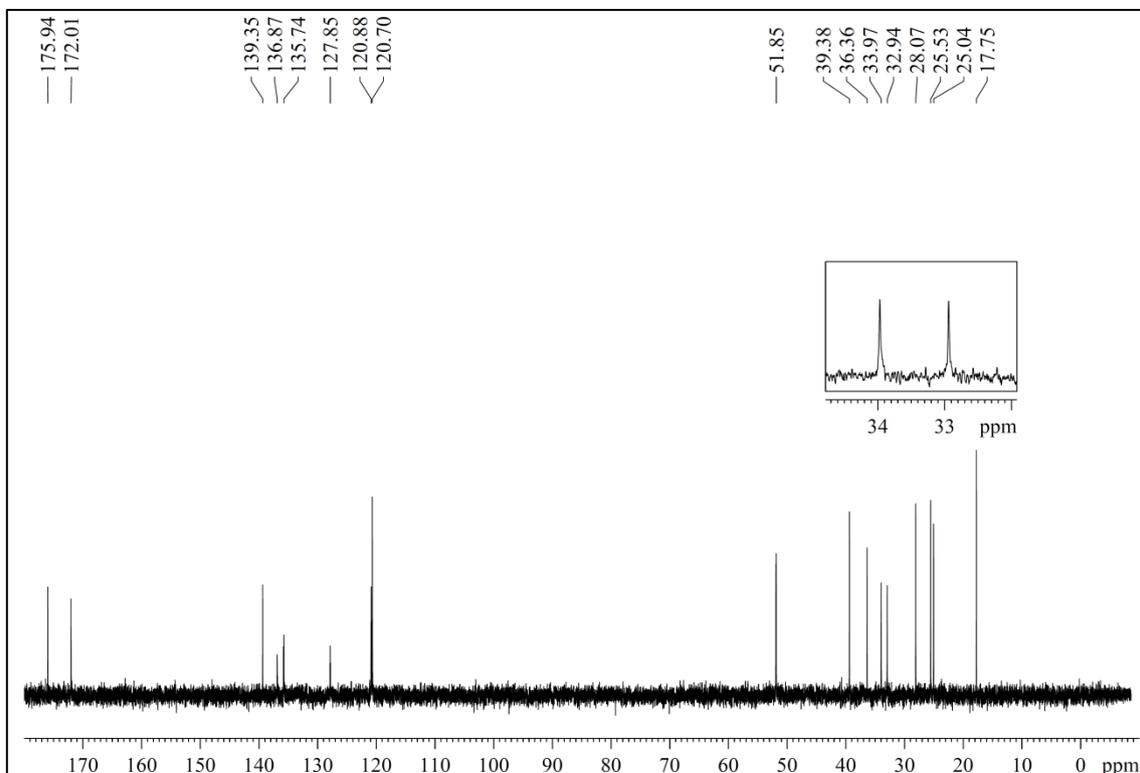


Abb. 5.3.32:  $^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) von 3-(6-methacrylamido-1-hexanamido)-benzoesäureamid **44**.

## 5.4 Synthese der Polymere

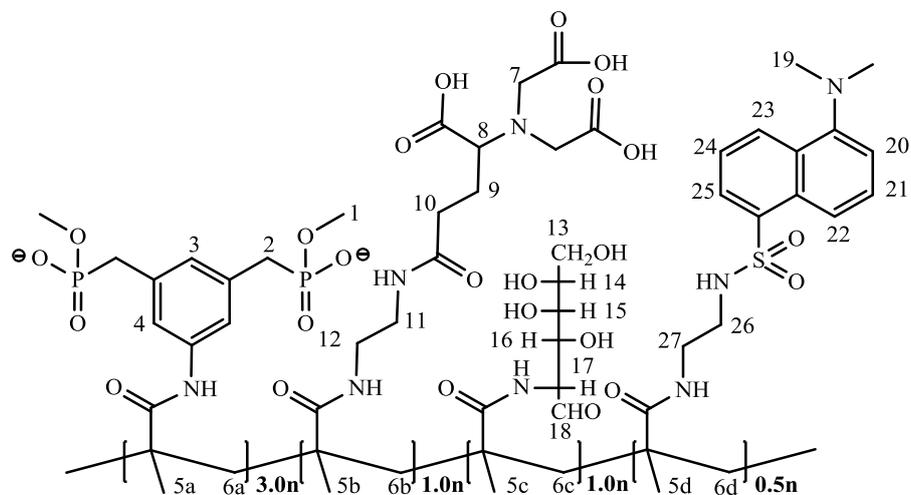
### 5.4.1 Multisynthese der Polymere

Stammlösungen der Monomere wurden nach dem „freeze-and-exhaust-Verfahren“ entgast. Unter Schutzgasatmosphäre wurden die jeweiligen entgasten Stammlösungen, in ein 2 mL Polymerisationsgefäß gegeben und mit 5 mol % AIBN versetzt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass das Gesamtreaktionsvolumen bei maximal 1300  $\mu$ L lag. Die Polymerisation wurde anschließend in einem „Thermomixer“ bei 70 °C und 600 rpm durchgeführt. Nach 24 - 30 h Reaktionszeit wurden die entstandenen Polymerisationslösungen durch Lyophilisierung in einem Spitzkolben weitestgehend vom Lösungsmittel befreit.

Das erhaltene Lyophylisat wurde mit wenig VE-Wasser gelöst/aufgeschlämmt und in ein „Ultrafiltrations-Tube“ überführt. Nach dreimaliger Ultrafiltration mit Hilfe einer Zentrifuge bei 4000 rpm und einer Dauer von 60 min, folgte eine vierte Ultrafiltration bei 4000 rpm und einer Gesamtzentrifugationszeit von 99 min. Das Monomer- und Oligomer-befreite Konzentrat, wurde zur Trocknung in ein 2 mL „Eppendorf-Tube“ überführt und lyophilisiert. Durch  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie wurde das „zumeist voluminöse und weißfarbende“ Lyophylisat untersucht. Neben der Umsatzkontrolle kann so zum Teil die Monomer-Stöchiometrie überprüft bzw. bestimmt werden. Dies war jedoch nicht immer genau möglich, da die für das Polymer charakteristischen breiten Signale oft überlappen. Zudem ist zu erwähnen, dass die aromatischen Protonen des Dansyl-Bausteins aufgrund des geringen Stoffmengenanteils und der breiten Signalaufspaltung nicht immer genau detektierbar waren. Ferner konnten die Polymere auf vollständige DMF-Befreiung mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie geprüft werden.

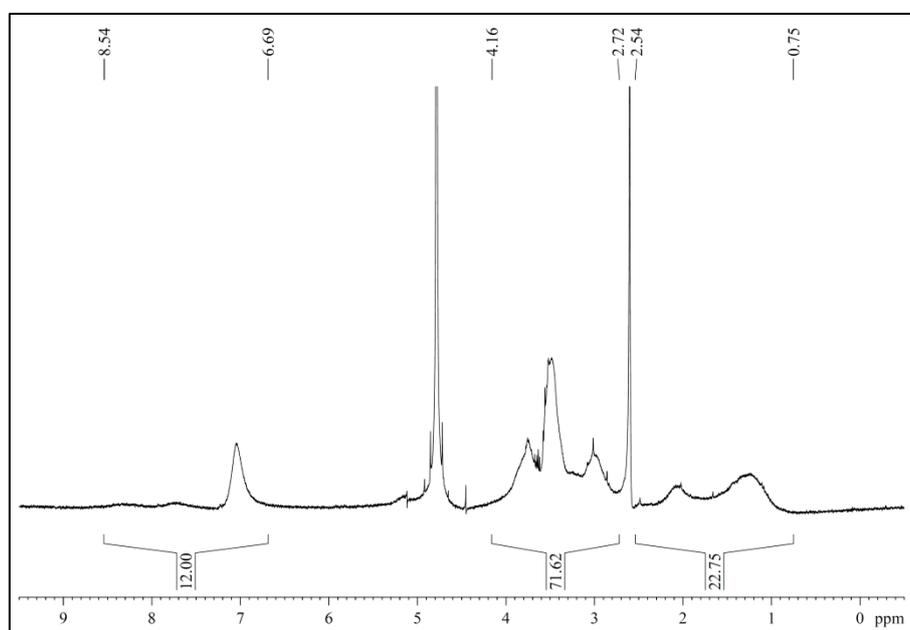
Die Molekulargewichtsverteilungen der Polymerisationsprodukte wurden durch Gelpermeationschromatographie von Frau *H. Wöll* bestimmt. Hierbei wurden für Polymere auf kationischer Basis zwei *HEMA-Bio-Linear* 300 x 80 mm Säulen verwendet. Hingegen wurden bei Polymeren auf kationischer Basis zwei *NOVEMA-Max* 300 x 80 mm Säulen genutzt.

## PPG17:



**Ausbeute:** 49.6 mg (55 %).

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.75-2.54** (m, 23.0H, H-5, H-6, H-9, H-10), **2.72-4.16** (m, 72.0H, H-1, H-2, H-7, H-8, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-19, H-26, H-27), **6.69-8.54** (m, 12.0H, H-3, H-4, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25).



**Abb.5.4.1:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG17.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 259\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 135\,000$  g/mol, PDI = 1.9.

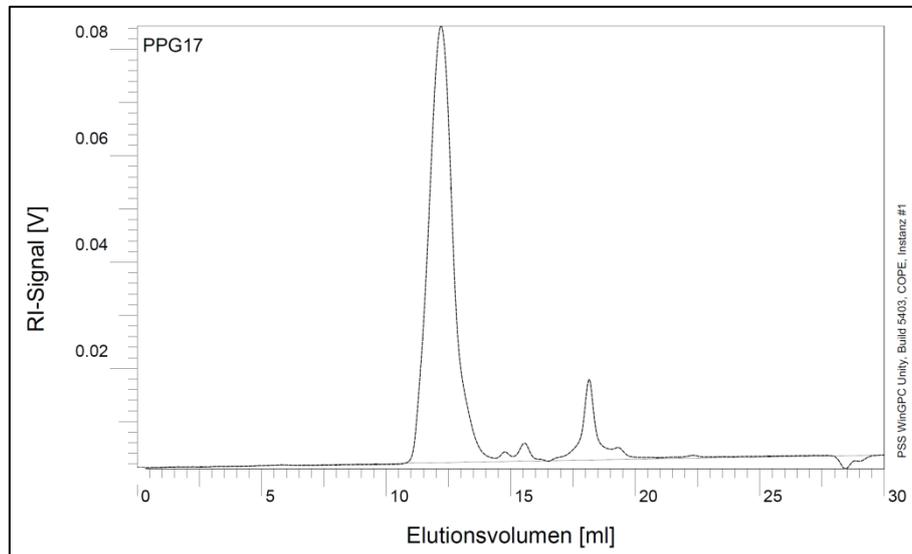
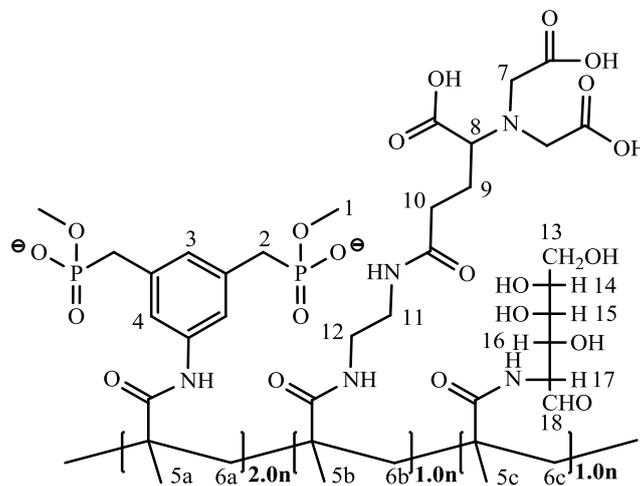


Abb.5.4.2: GPC-Chromatogramm von Polymer PPG17.

### PPG18:



**Ausbeute:** 34.2 mg (39 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.69-2.27** (m, 20H, H-5, H-6, H-9, H-10), **2.75-4.10** (m, 38H, H-1, H-2, H-7, H-8, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), **7.07** (sb, 6H, H-3, H-4, H-20).

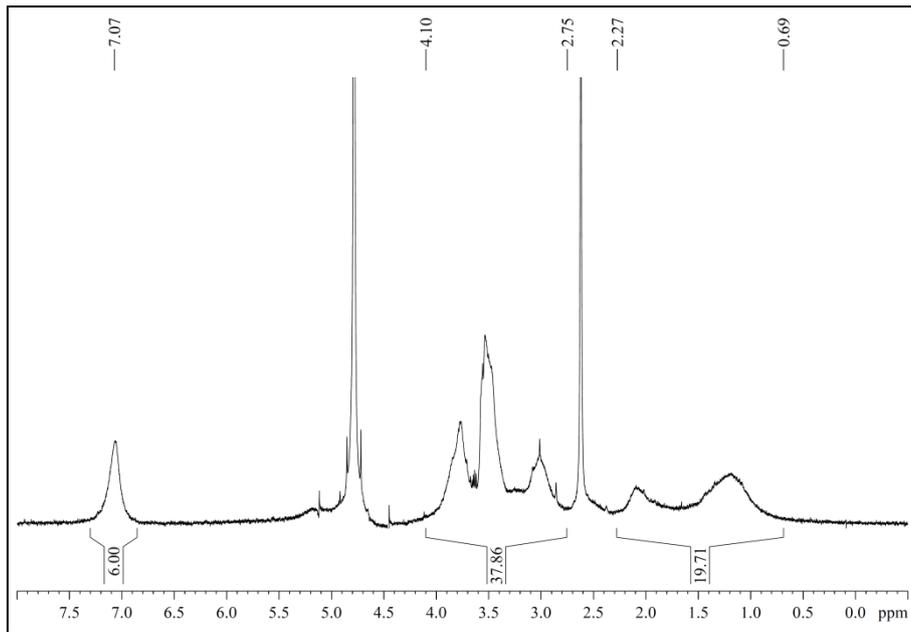


Abb.5.4.3:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG18.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 296\,000\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 139\,000\text{ g/mol}$ ,  $\text{PDI} = 2.1$ .

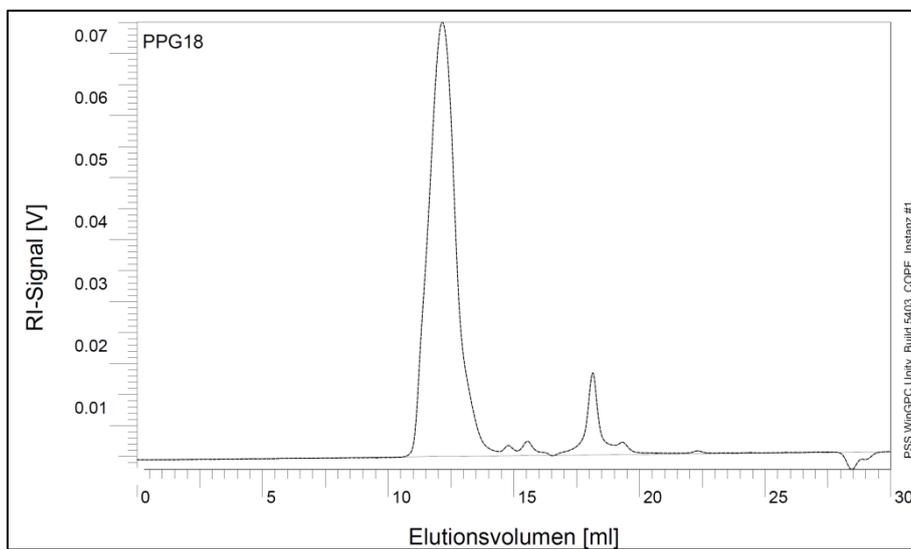
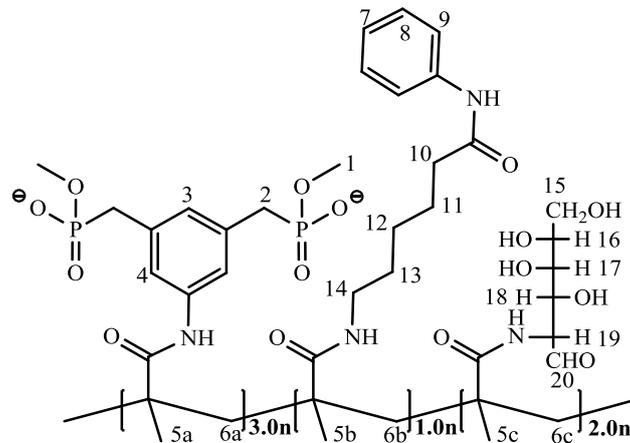


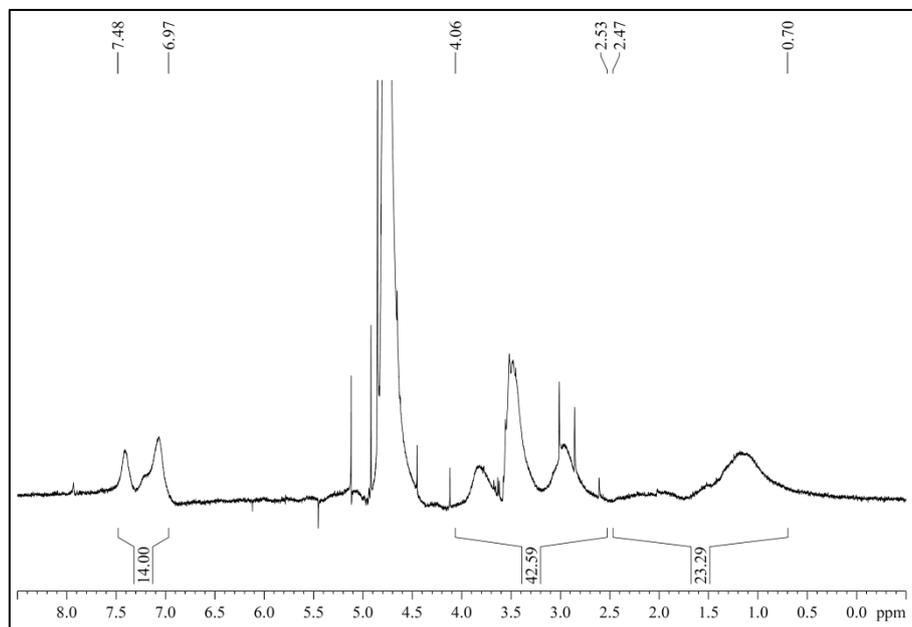
Abb.5.4.4: GPC-Chromatogramm von Polymer PG18.

## PPG19:



**Ausbeute:** 46.1 mg (51 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.70-2.47** (m, 23H, H-5, H-6, H-10, H-11, H-12, H-13), **2.53-4.06** (m, 43H, H-1, H-2, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19), **6.97-7.48** (m, 14H, H-3, H-4, H-7, H-8, H-9).



**Abb.5.4.5:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG19.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 248\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 122\,000$  g/mol, PDI = 2.0.

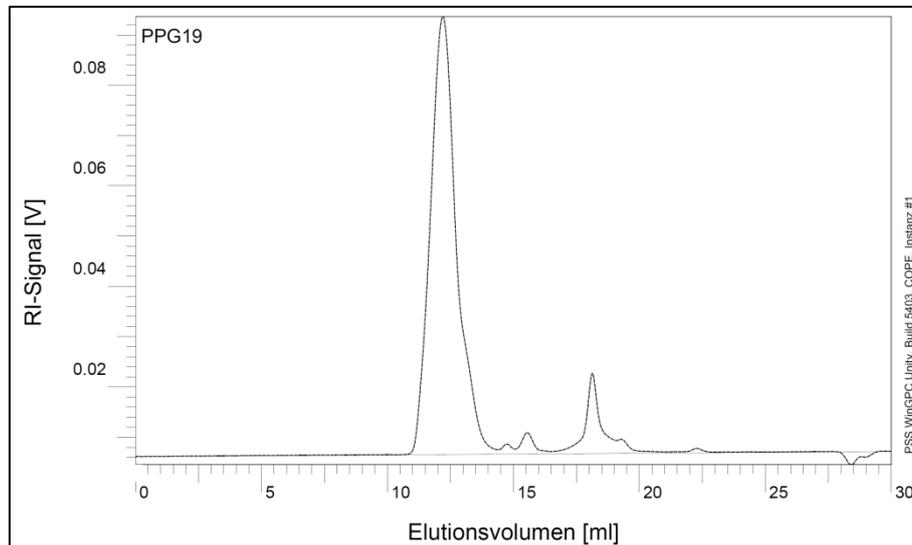
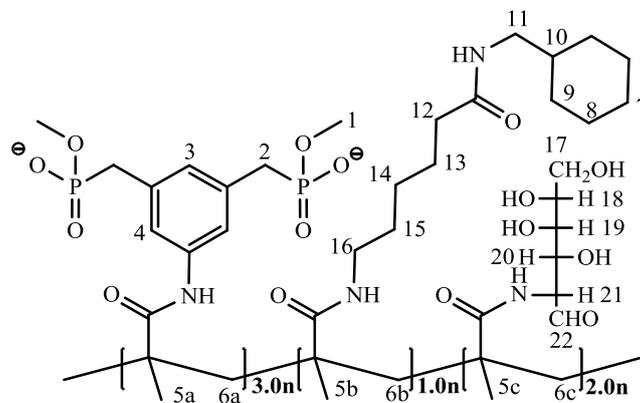


Abb.5.4.6: GPC-Chromatogramm von Polymer PG19.

### PPG20:



**Ausbeute:** 52.9 mg (58 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.68-2.33** (m, 48H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-12, H-13, H-14, H-15), **2.70-4.04** (m, 50H, H-1, H-2, H-11, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21), **7.07** (sb, 9H, H-3, H-4).

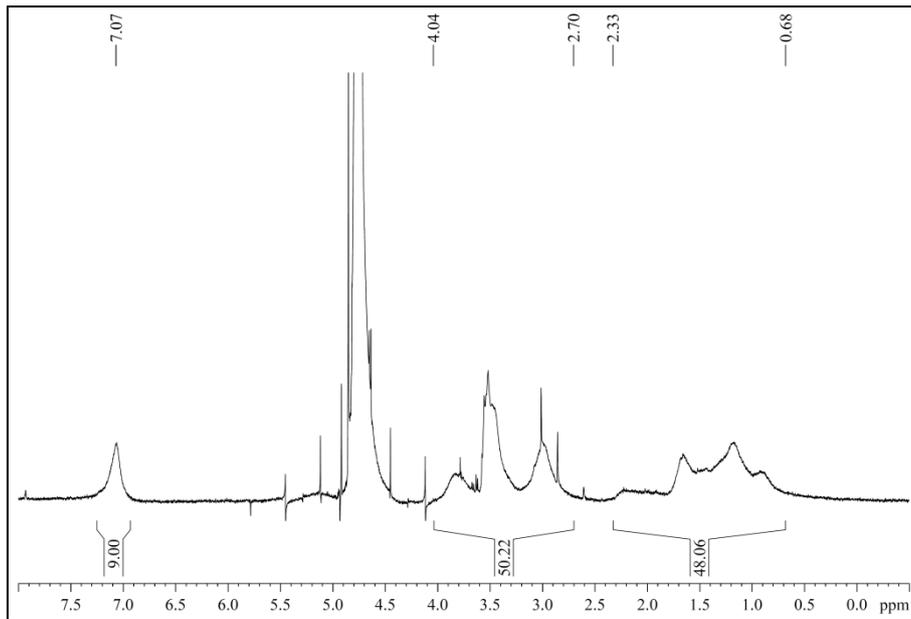


Abb.5.4.7:  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG20.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 441\,000\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 133\,000\text{ g/mol}$ , PDI = 3.0.

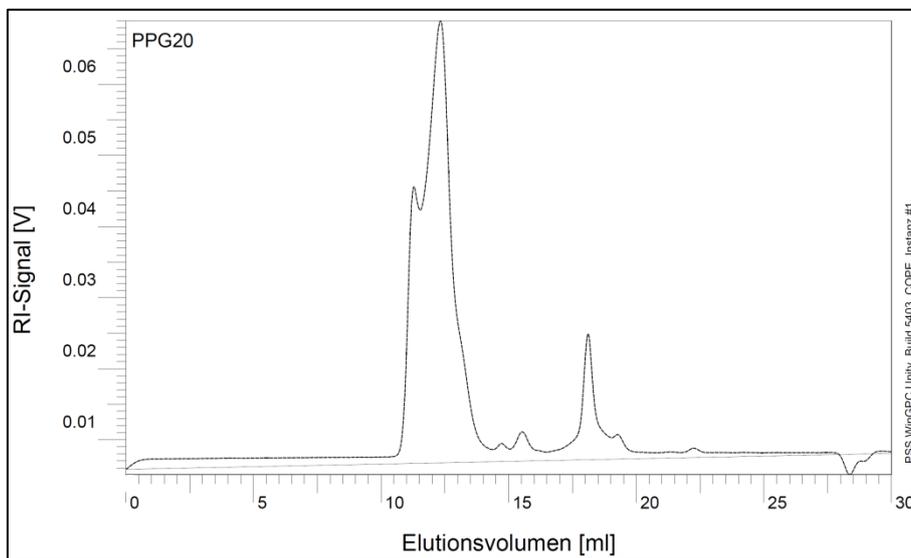
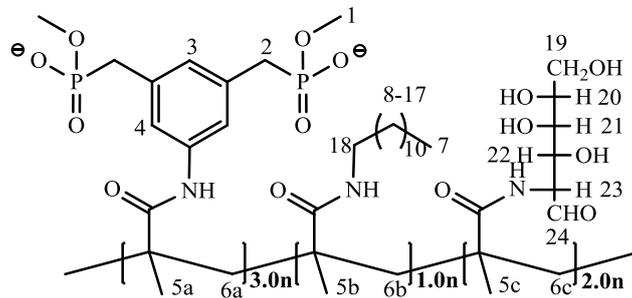


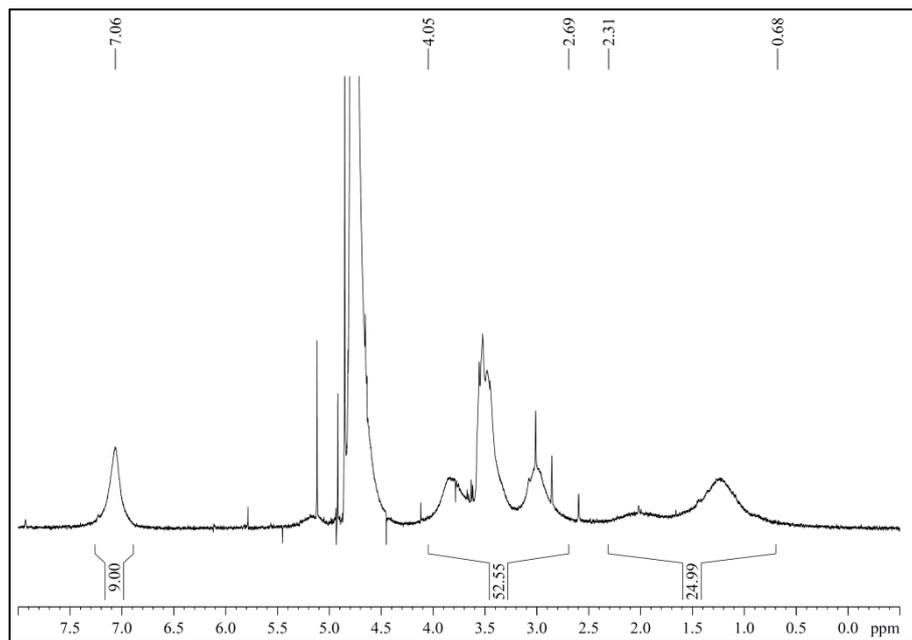
Abb.5.4.8: GPC-Chromatogramm von Polymer PG20.

## PPG21:



**Ausbeute:** 48.3 mg (54 %).

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.68-2.31** (m, 25H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), **2.69-4.05** (m, 53H, H-1, H-2, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23), **7.06** (sb, 9H, H-3, H-4).



**Abb.5.4.9:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG21.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 505\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 150\,000$  g/mol, PDI = 3.0.

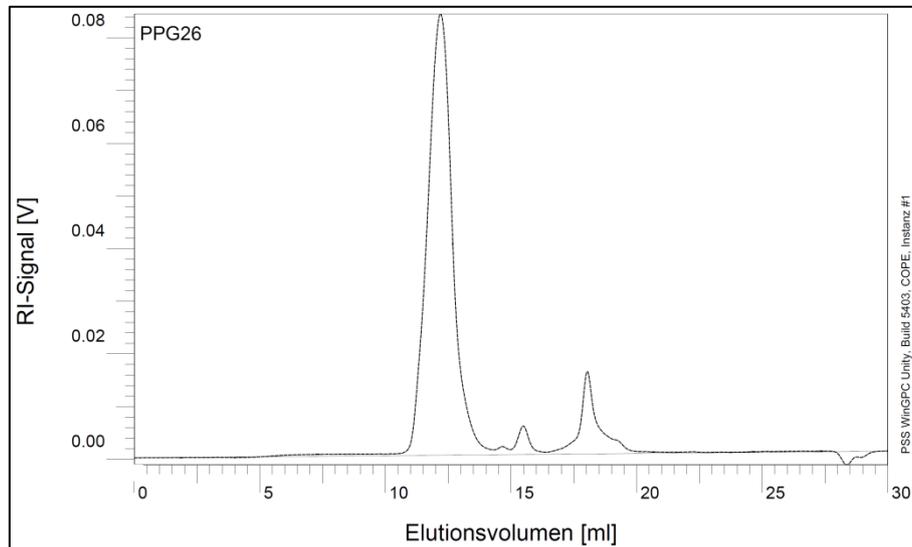
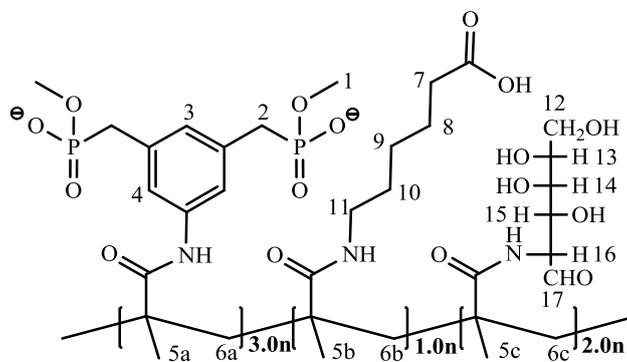


Abb.5.4.10: GPC-Chromatogramm von Polymer PG21.

### PPG22:



**Ausbeute:** 57.4 mg (66 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.69-2.39** (m, 21H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10), **2.46-4.04** (m, 48H, H-1, H-2, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16), **7.08** (sb, 9H, H-3, H-4).

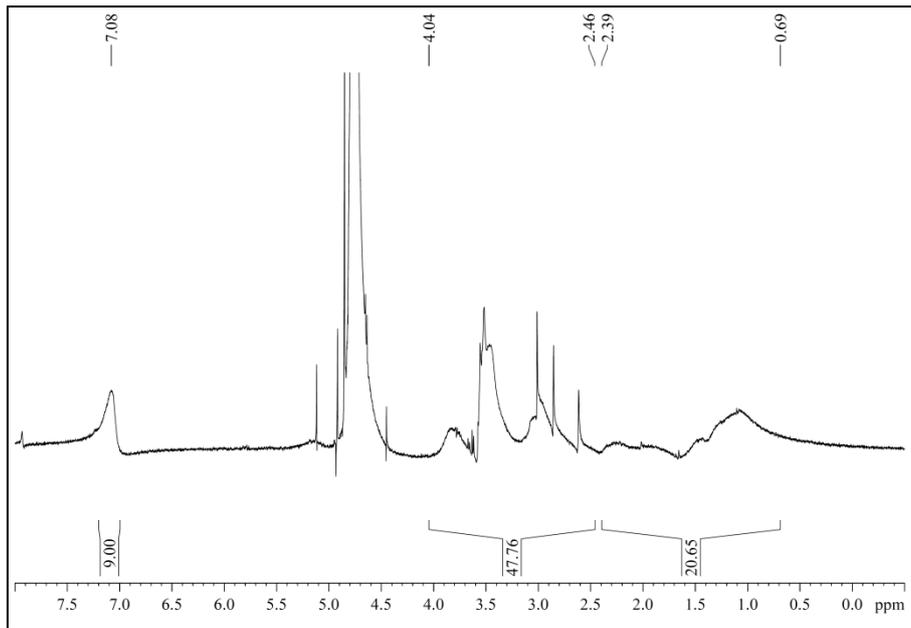


Abb.5.4.11:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG22.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 426\,000\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 158\,000\text{ g/mol}$ ,  $\text{PDI} = 2.7$ .

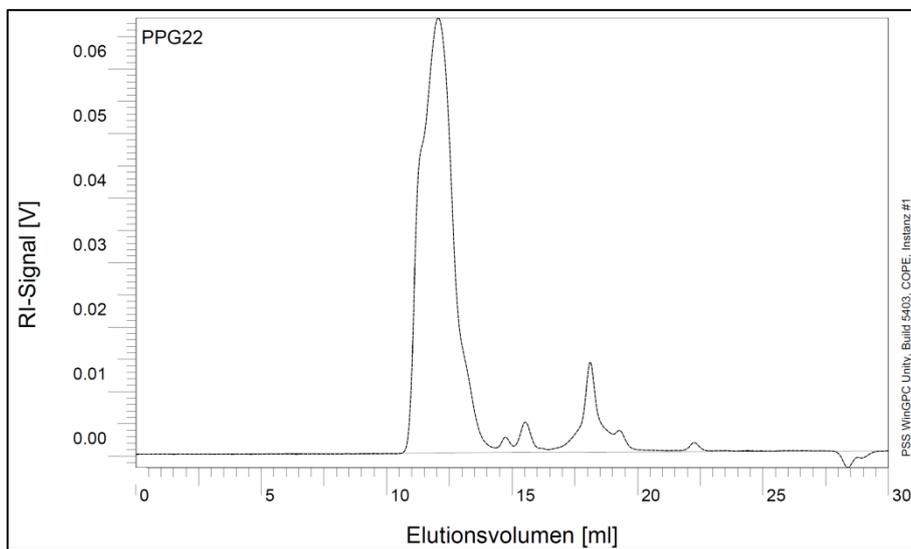
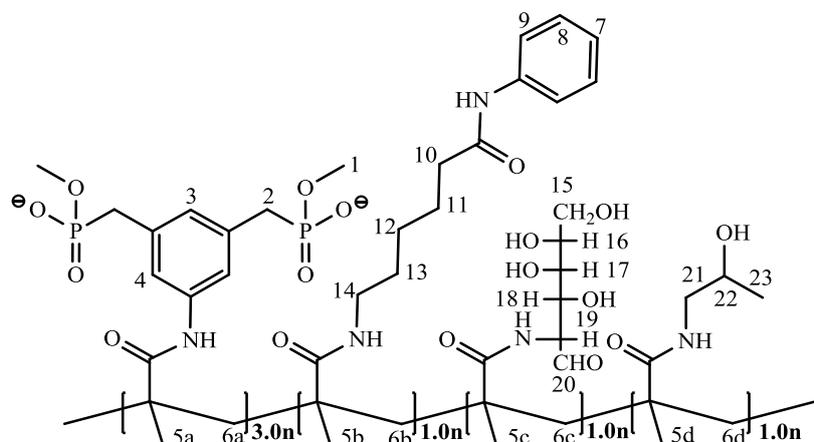


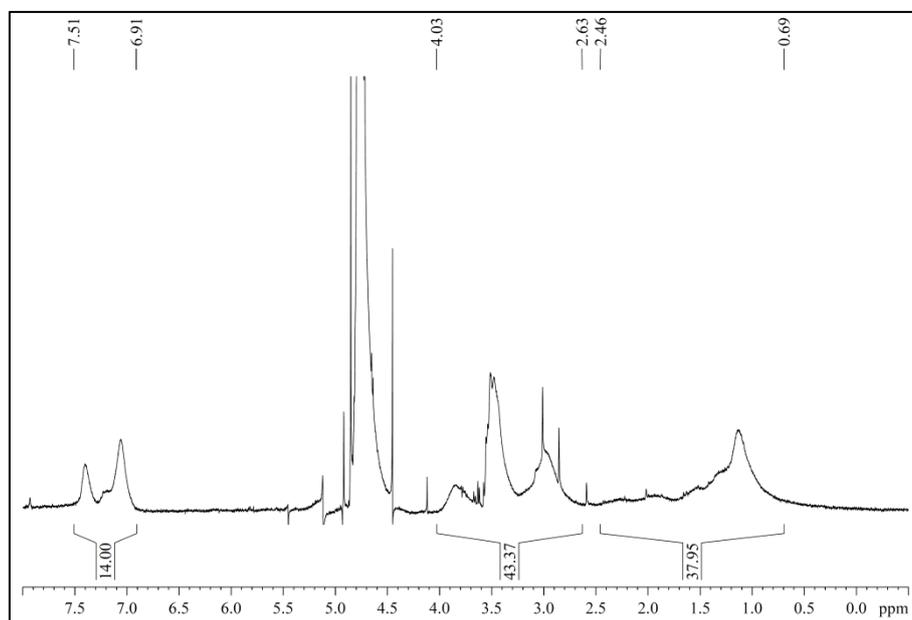
Abb.5.4.12: GPC-Chromatogramm von Polymer PG22.

## PPG23:



**Ausbeute:** 54.7 mg (61 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.69-2.46** (m, 38H, H-5, H-6, H-10, H-11, H-12, H-13, H-23), **2.63-4.03** (m, 43H, H-1, H-2, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-21, H-22), **6.91-7.51** (m, 14H, H-3, H-4, H-7, H-8, H-9).



**Abb.5.4.13:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG23.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 304\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 132\,000$  g/mol; PDI = 2.3.

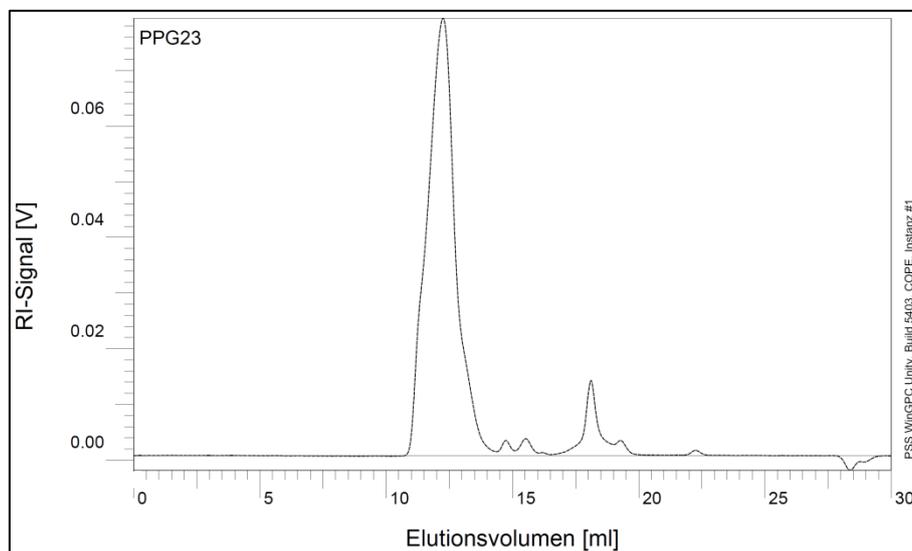
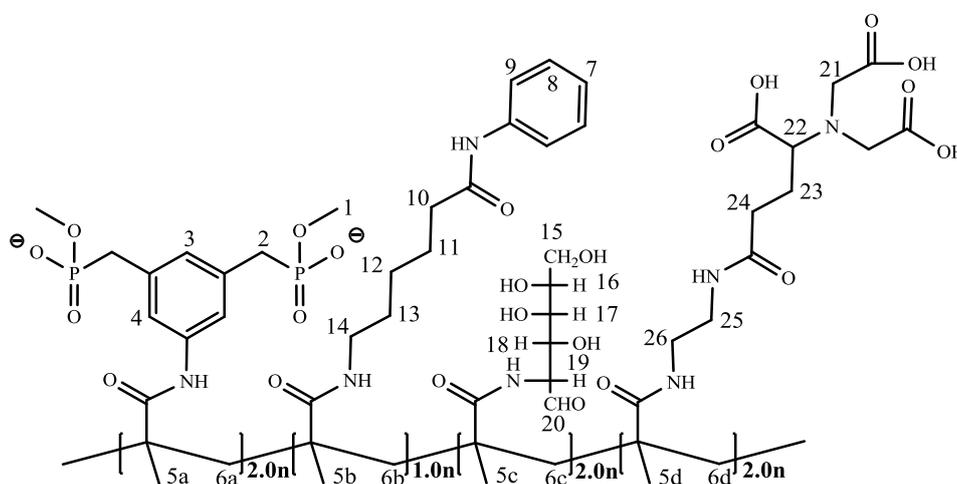


Abb.5.4.14: GPC-Chromatogramm von Polymer PG23.

### PPG24:



**Ausbeute:** 43.7 mg (51 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.65-2.52** (m, 45H, H-5, H-6, H-10, H-11, H-12, H-13, H-23, H-24), **2.72-4.04** (m, 56H, H-1, H-2, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-21, H-22, H-25, H-26), **5.08** (sb, 2H, H-20), **6.76-7.40** (m, 11H, H-3, H-4, H-7, H-8, H-9).

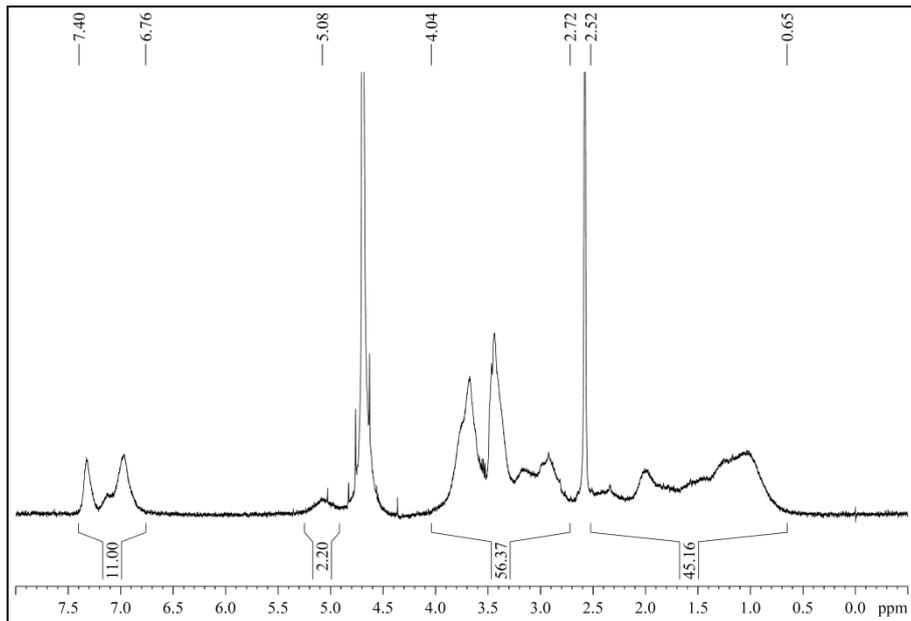


Abb.5.4.15:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG24.

#### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 255\,000\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 122\,000\text{ g/mol}$ ; PDI = 2.1.

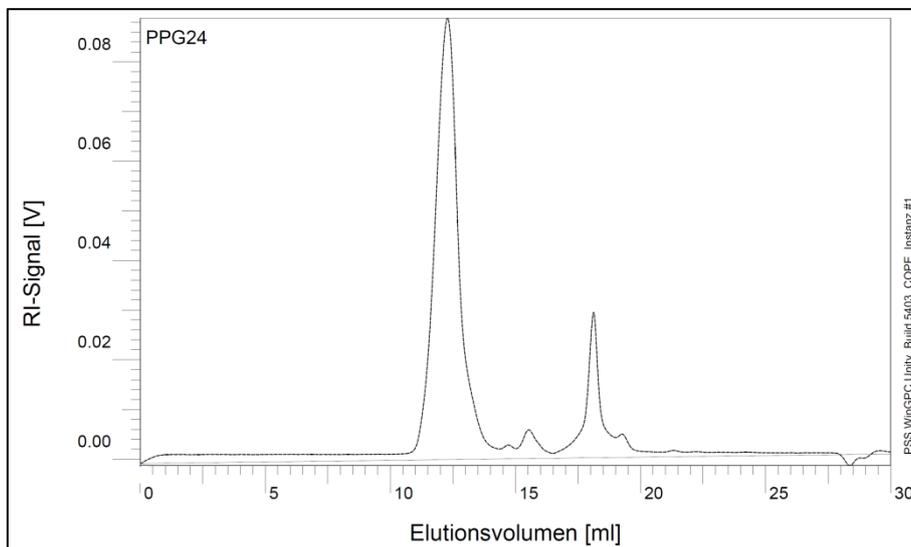
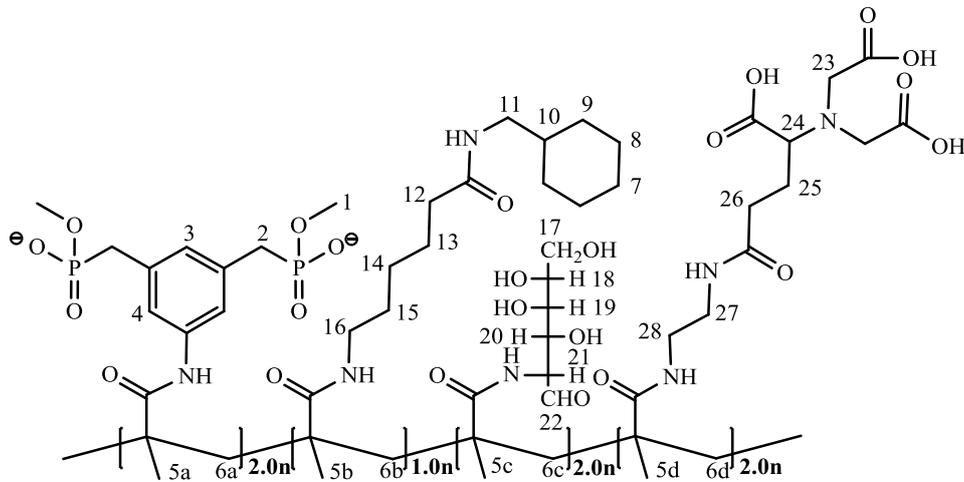
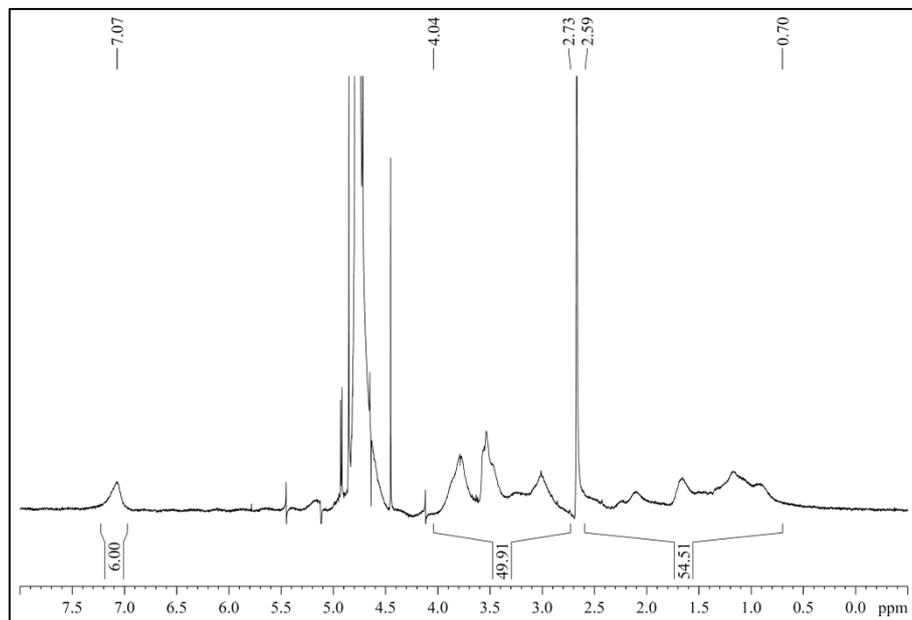


Abb.5.4.16: GPC-Chromatogramm von Polymer PG24.

**PPG25:**

**Ausbeute:** 44.8 mg (49 %).

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.70-2.59** (m, 55H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-12, H-13, H-14, H-15, H-25, H-26) **2.73-4.04** (m, 50H, H-1, H-2, H-11, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21, H-23, H-24, H-27, H-28), **7.07** (sb, 6H, H-3, H-4).



**Abb.5.4.17:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG25.

**Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):**

$\bar{M}_w = 305\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 142\,000$  g/mol; PDI = 2.1.

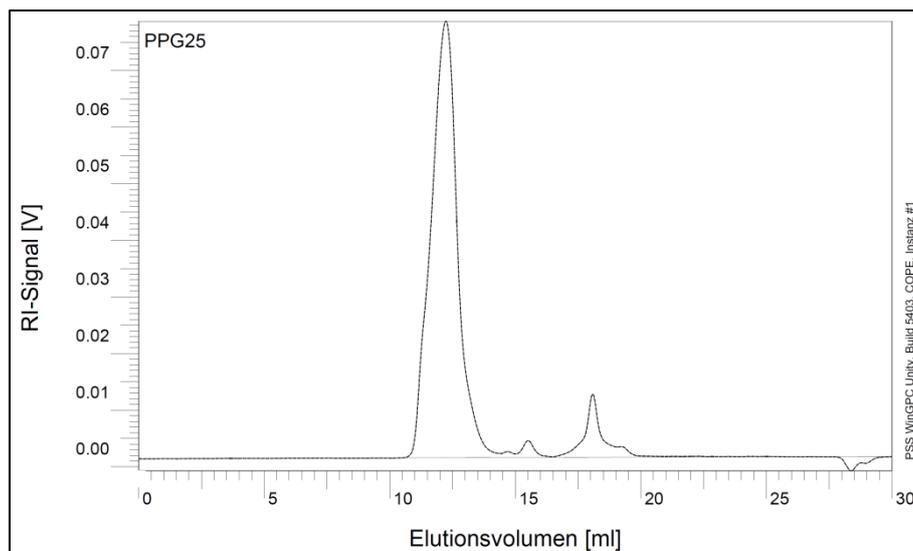
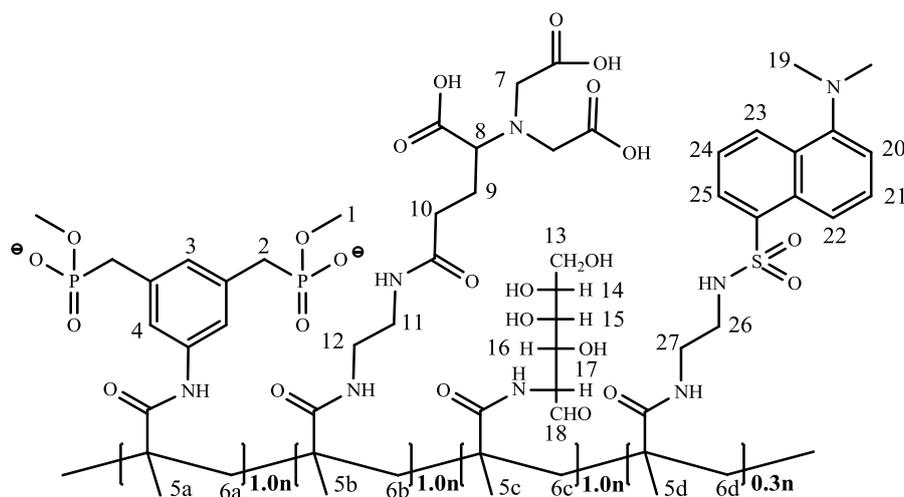


Abb.5.4.18: GPC-Chromatogramm von Polymer PPG25.

### PPG26:



**Ausbeute:** 46.0 mg (52 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.69-2.25** (m, 22.7H, H-5, H-6, H-9), **2.42-4.07** (m, 54.0H, H-1, H-2, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-19, H-26, H-27), **6.78-8.62** (m, 4.8H, H-3, H-4, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25).

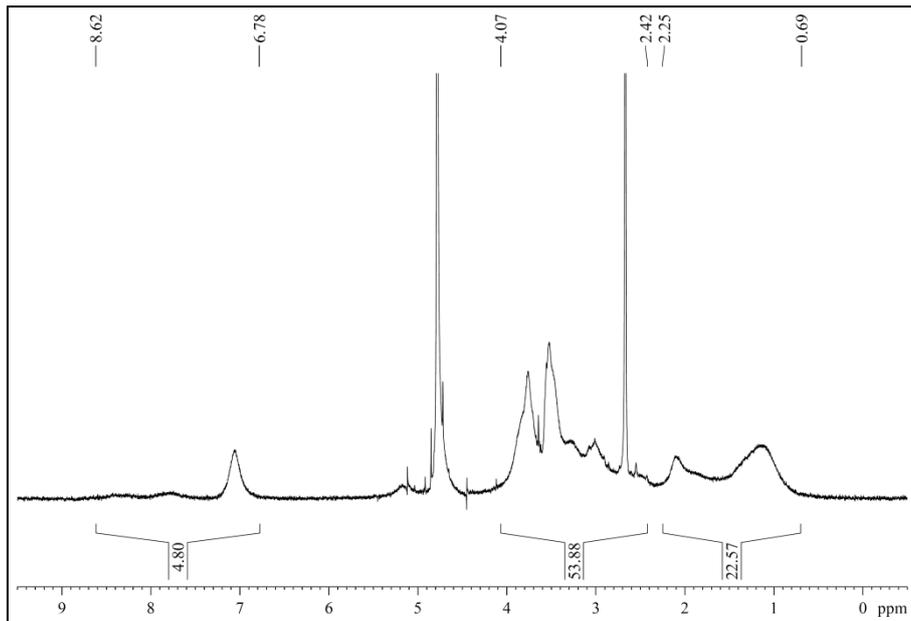


Abb.5.4.19:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG26.

#### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 289\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 145\,000$  g/mol; PDI = 2.0.

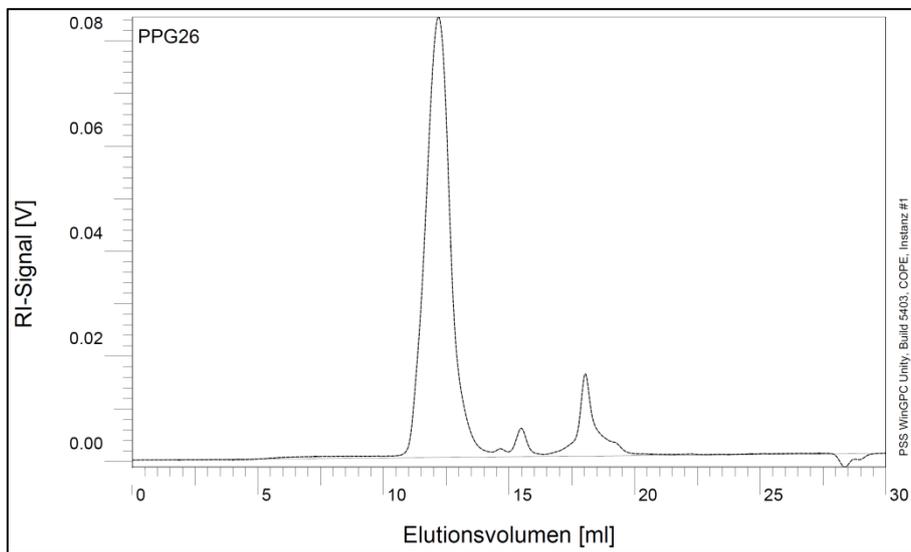
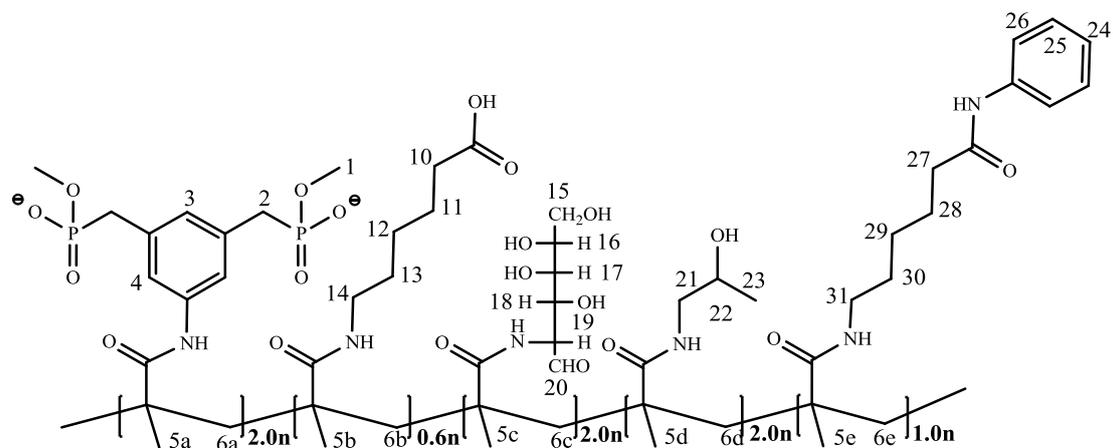


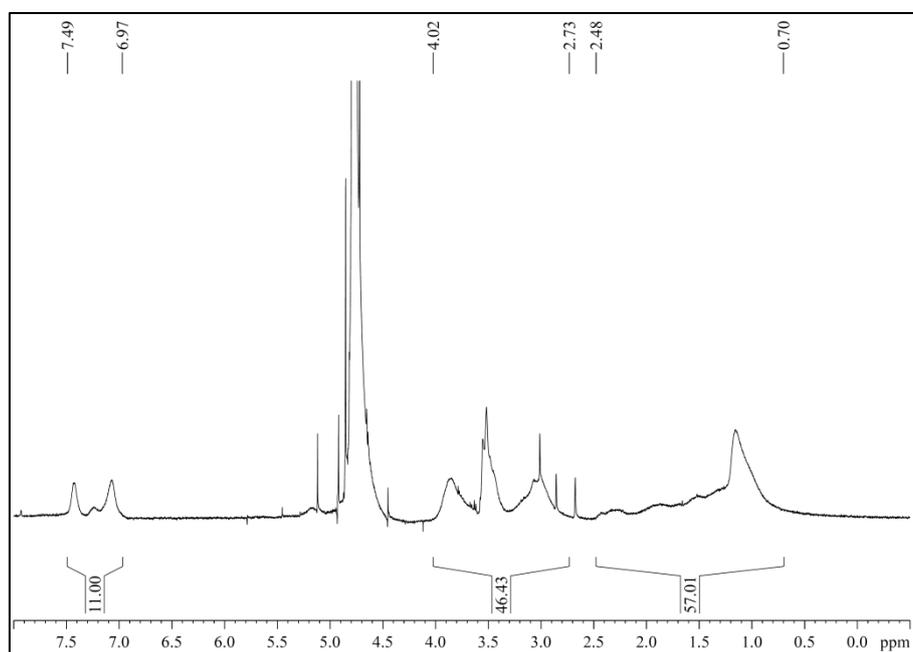
Abb.5.4.20: GPC-Chromatogramm von Polymer PG26.

## PPG27:



**Ausbeute:** 51.9 mg (55 %).

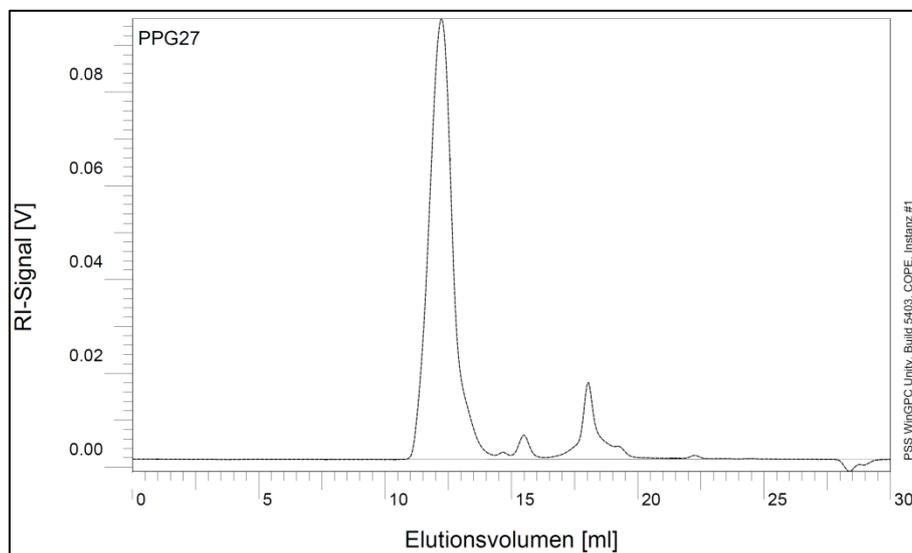
**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.70-2.48** (m, 57H, H-5, H-6, H-10, H-11, H-12, H-13, H-23, H-27, H-28, H-29, H-30), **2.73-4.02** (m, 46H, H-1, H-2, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-21, H-22, H-31), **6.85-7.35** (m, 11H, H-3, H-4, H-24, H-25, H-26).



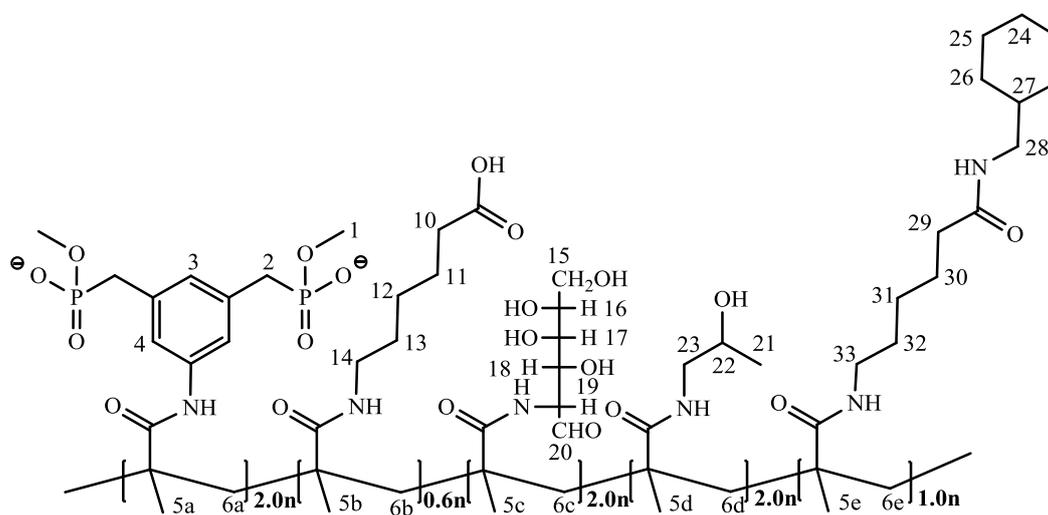
**Abb.5.4.21:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG27.

**Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):**

$\bar{M}_w = 248\,000 \text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 133\,000 \text{ g/mol}$ ; PDI = 1.9.



**Abb.5.4.22:** GPC-Chromatogramm von Polymer PG27.

**PPG28:**

**Ausbeute:** 54.9 mg (57 %).

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.70-2.40** (m, 75.0H, H-5, H-6, H-10, H-11, H-12, H-13, H-21, H-29, H-30, H-31, H-32), **2.74-4.02** (m, 50.4H, H-1, H-2, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-22, H-23, H-33), **7.08** (sb, 6.0H, H-3, H-4).

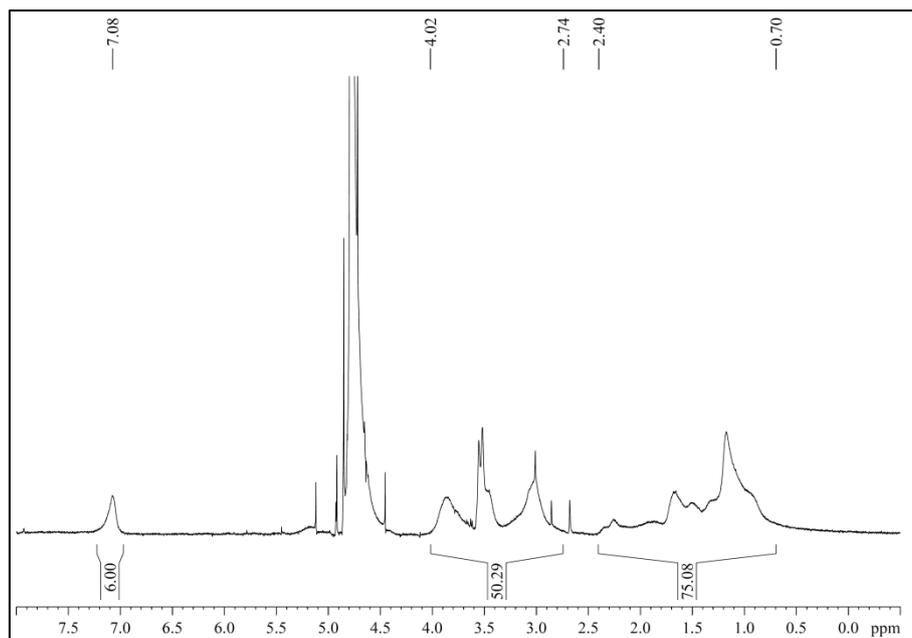


Abb.5.4.23:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG28.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 240\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 132\,000$  g/mol; PDI = 1.8.

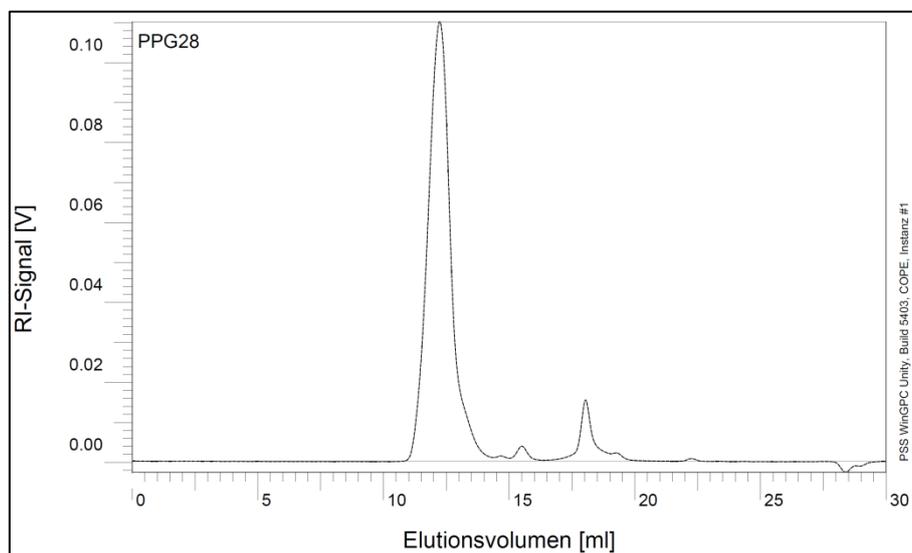
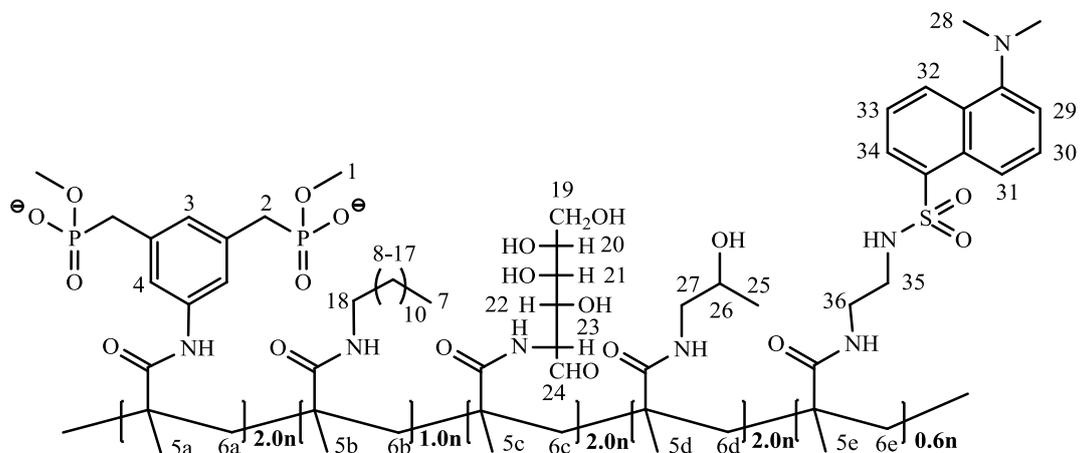


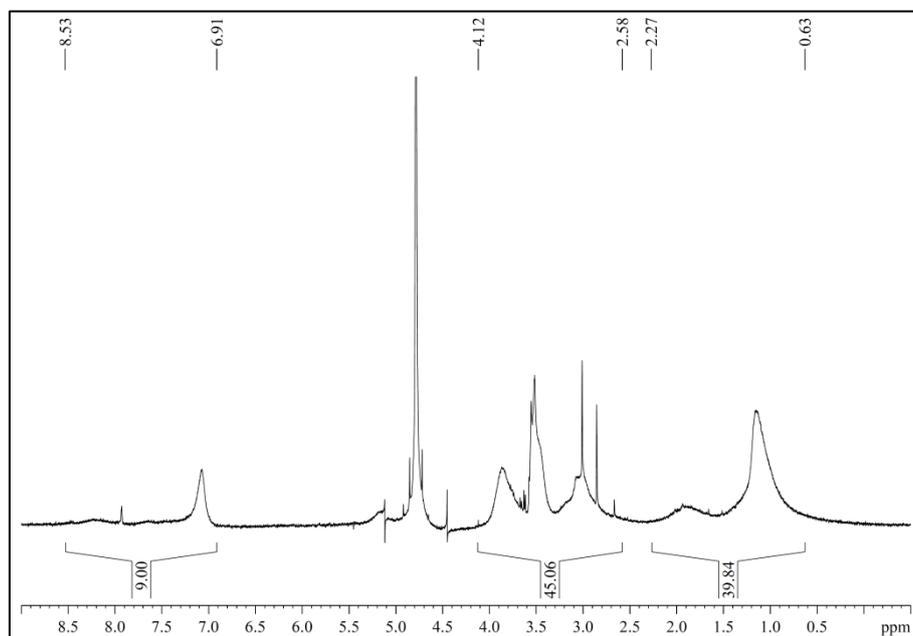
Abb.5.4.24: GPC-Chromatogramm von Polymer PG28.

## PPG29:



**Ausbeute:** 69.3 mg (70 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.63-2.27** (m, 39.6H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-25) **2.58-4.12** (m, 45.0H, H-1, H-2, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-26, H-27, H-28, H-35, H-36), **6.91-8.53** (m, 9.0H, H-3, H-4, H-29, H-30, H-31, H-32, H-33, H-34).



**Abb.5.4.25:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG29.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 408\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 124\,000$  g/mol; PDI = 3.3.

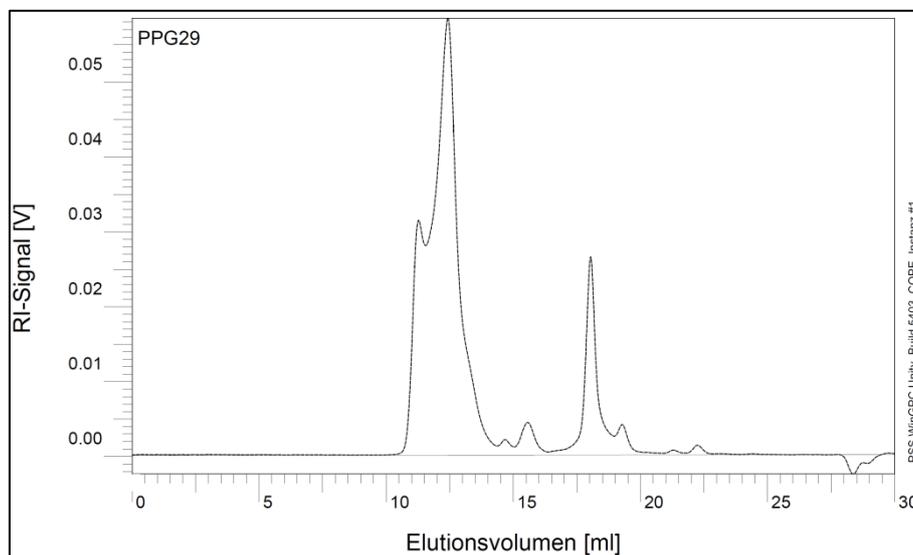
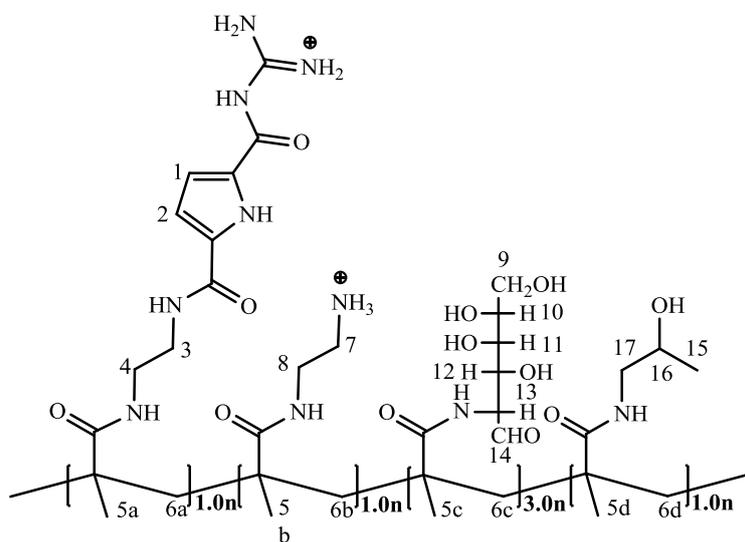


Abb.5.4.26: GPC-Chromatogramm von Polymer PPG29.

### PPG30:



**Ausbeute:** 54.6 mg (64 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.61-2.34** (m, 44H, H-5, H-6, H-15), **2.78-4.13** (m, 41H, H-3, H-4, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-16, H-17), **5.14** (sb, 3H, H-14), **6.63-7.24** (m, 2H, H-1, H-2).

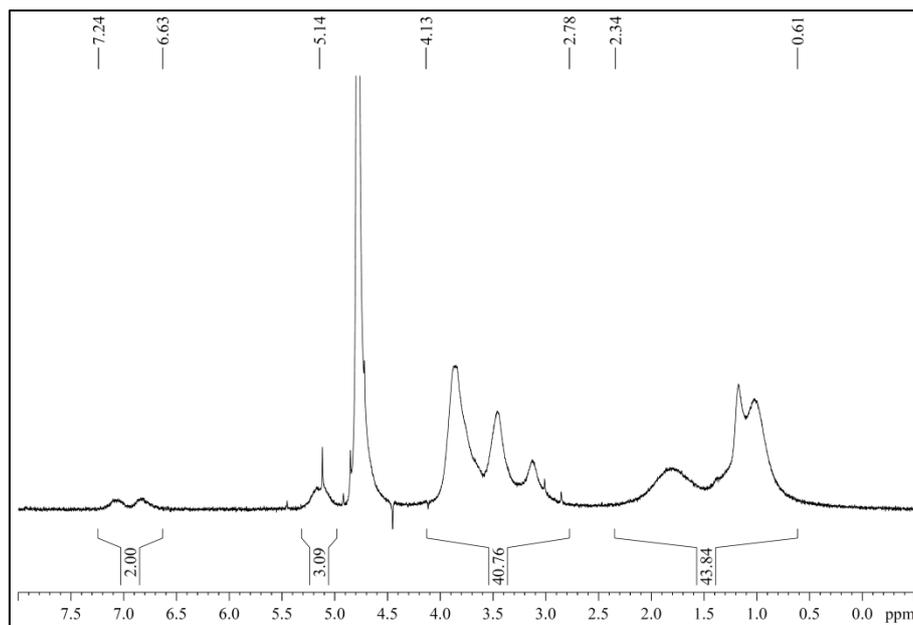


Abb.5.4.27:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG30.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 224\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 133\,000$  g/mol; PDI = 1.7.

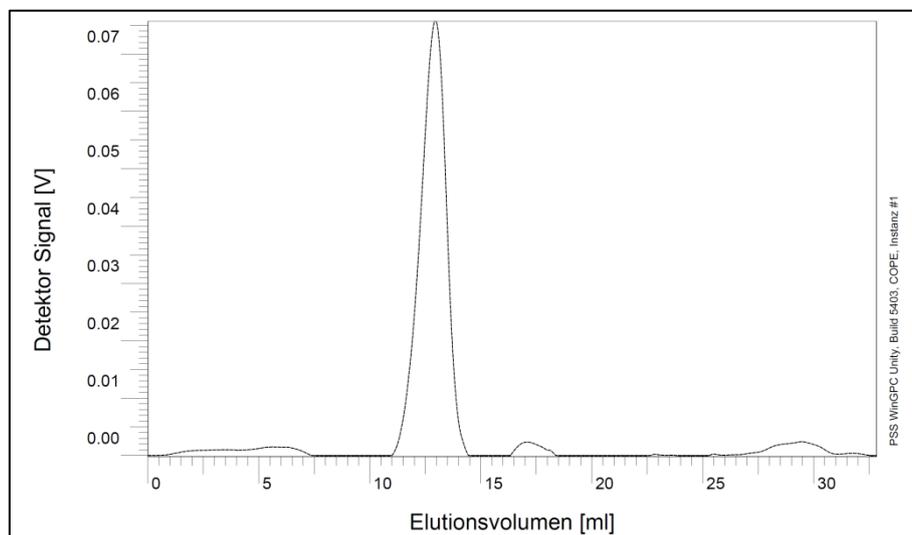
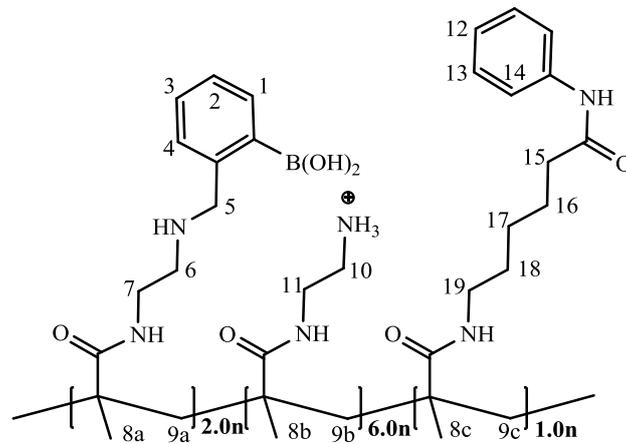
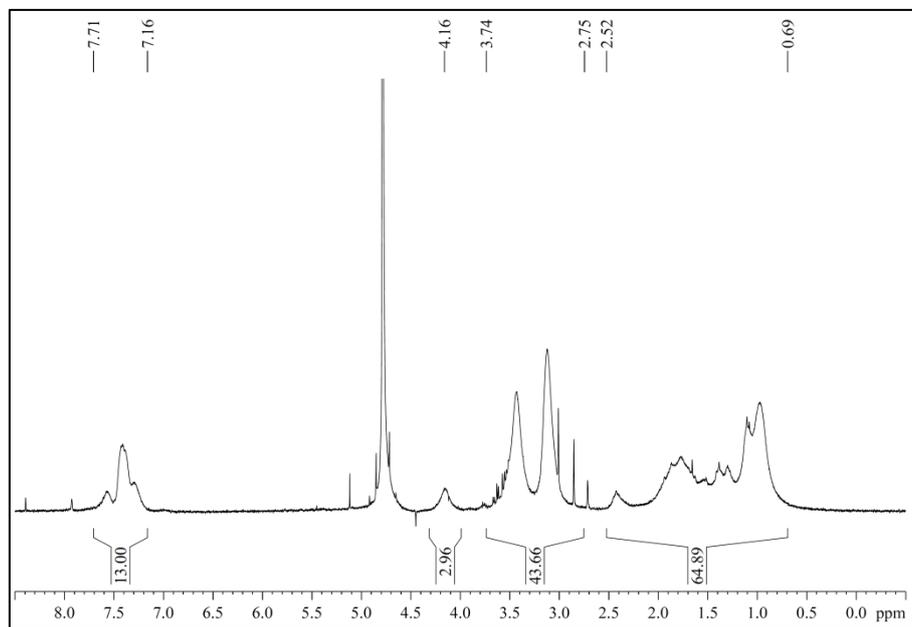


Abb.5.4.28: GPC-Chromatogramm von Polymer PG30.

**PPG31:**

**Ausbeute:** 65.9 mg (54 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.69-2.52** (m, 65H, H-8, H-9, H-15, H-16, H-17, H-18), **2.75-3.74** (m, 44H, H-6, H-7, H-10, H-11, H-19), **4.16** (sb, 3H, H-5), **7.16-7.71** (m, 13H, H-1, H-2, H-3, H-4, H-12, H-13, H-14).



**Abb.5.4.29:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG31.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 341\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 123\,000$  g/mol; PDI = 2.8.

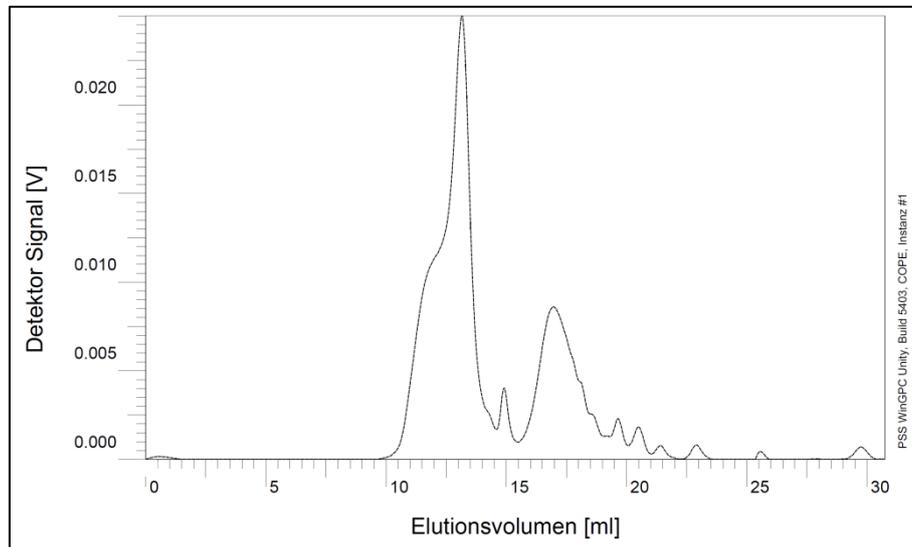
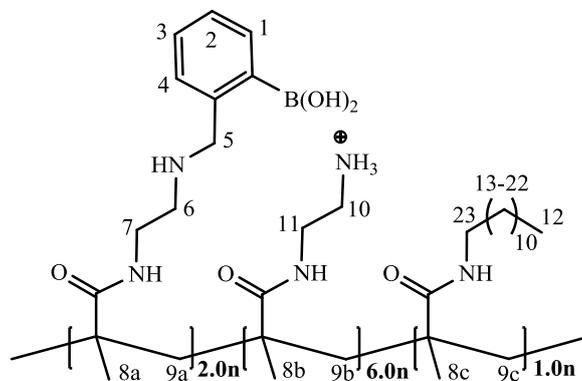


Abb.5.4.30: GPC-Chromatogramm von Polymer PG31.

### PPG32:



**Ausbeute:** 57.2 mg (48 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.66-2.23** (m, 53H, H-8, H-9, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22), **2.70-3.80** (m, 42H, H-6, H-7, H-10, H-11, H-23), **4.22** (sb, 3H, H-5), **7.22-7.82** (m, 8H, H-1, H-2, H-3, H-4).

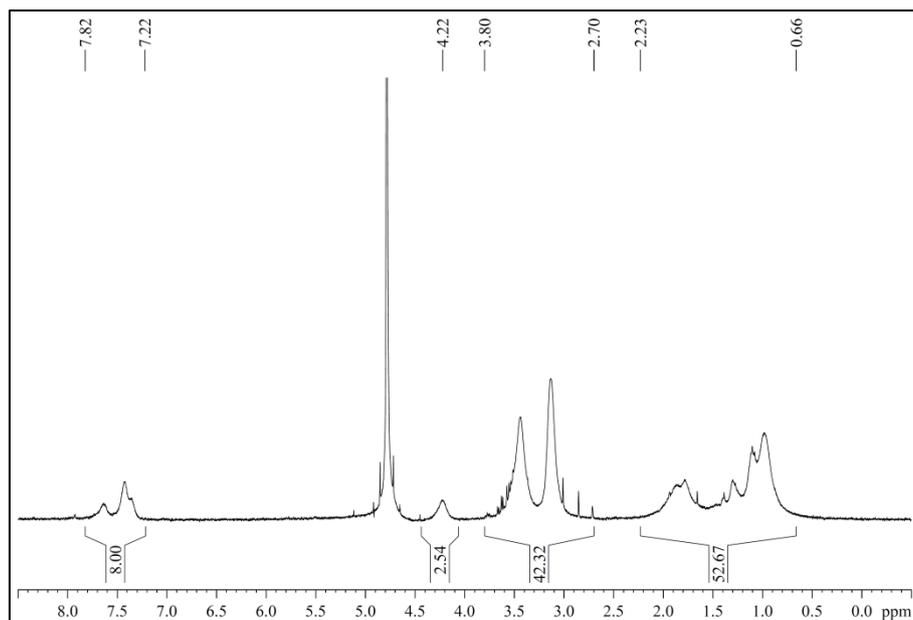


Abb.5.4.31:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG32.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 114\ 000\ \text{g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 81\ 000\ \text{g/mol}$ ; PDI = 1.4.

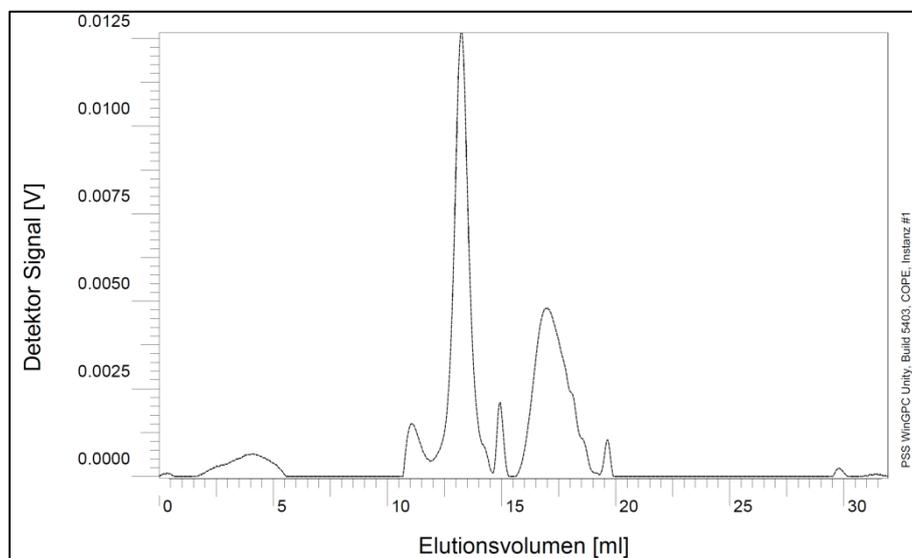
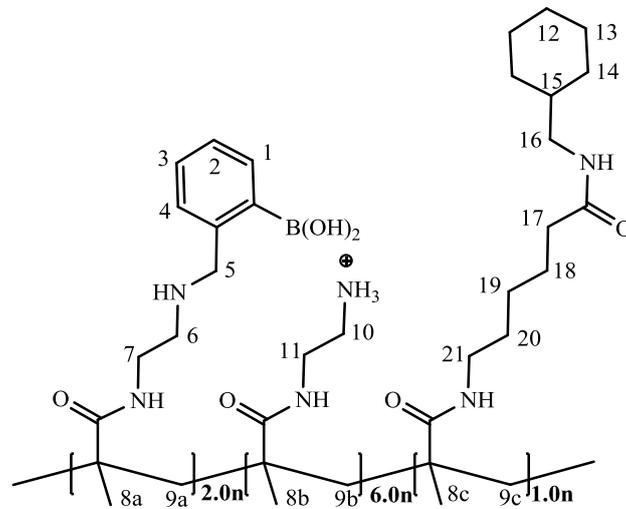


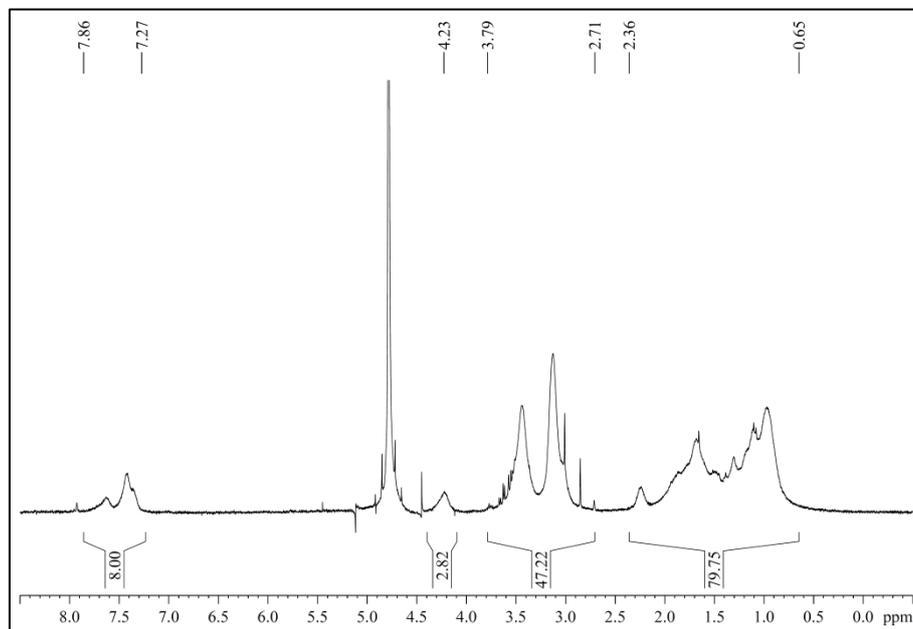
Abb.5.4.32: GPC-Chromatogramm von Polymer PG32.

## PPG33:



**Ausbeute:** 63.6 mg (52 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.66-2.23** (m, 80H, H-8, H-9, H-12, H-13, H-14, H-15, H-17, H-18, H-19, H-20), **2.71-3.79** (m, 47H, H-6, H-7, H-10, H-11, H-16, H-21), **4.23** (sb, 3H, H-5), **7.27-7.86** (m, 8H, H-1, H-2, H-3, H-4).

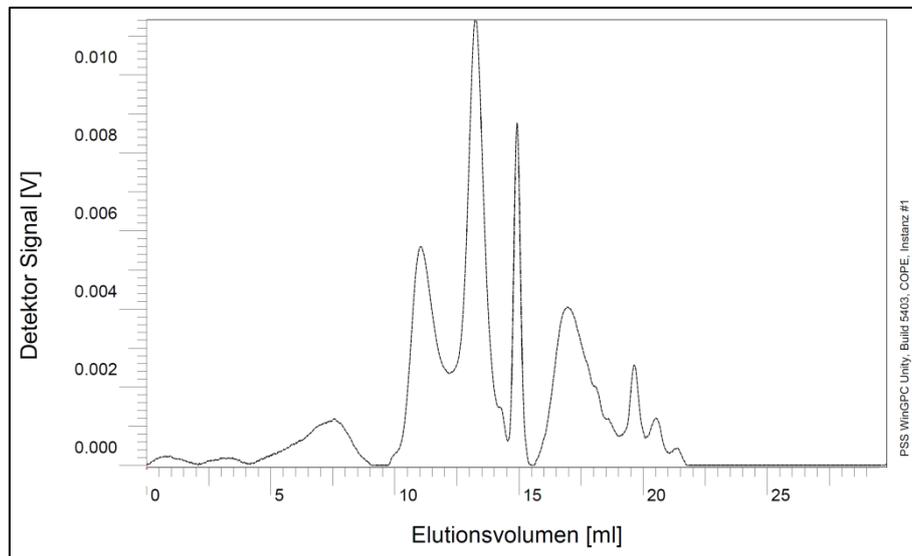


**Abb.5.4.33:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG33.

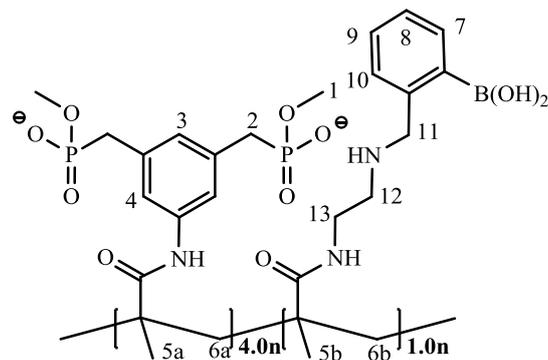
**Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):**

$\bar{M}_{w1} = 1\,078\,000$  g/mol,  $\bar{M}_{n1} = 920\,000$  g/mol; PDI<sub>1</sub> = 1.2;

$\bar{M}_{w2} = 131\,000$  g/mol,  $\bar{M}_{n2} = 78\,000$  g/mol; PDI<sub>2</sub> = 1.4.



**Abb.5.4.34:** GPC-Chromatogramm von Polymer PG33.

**PPG34:**

**Ausbeute:** 49.9 mg (55 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.67-2.38** (m, 23H, H-5, H-6), **2.58-4.12** (m, 48H, H-1, H-2, H-11, H-12, H-13), **6.84-7.54** (m, 16H, H-3, H-4, H-7, H-8, H-9, H-10).

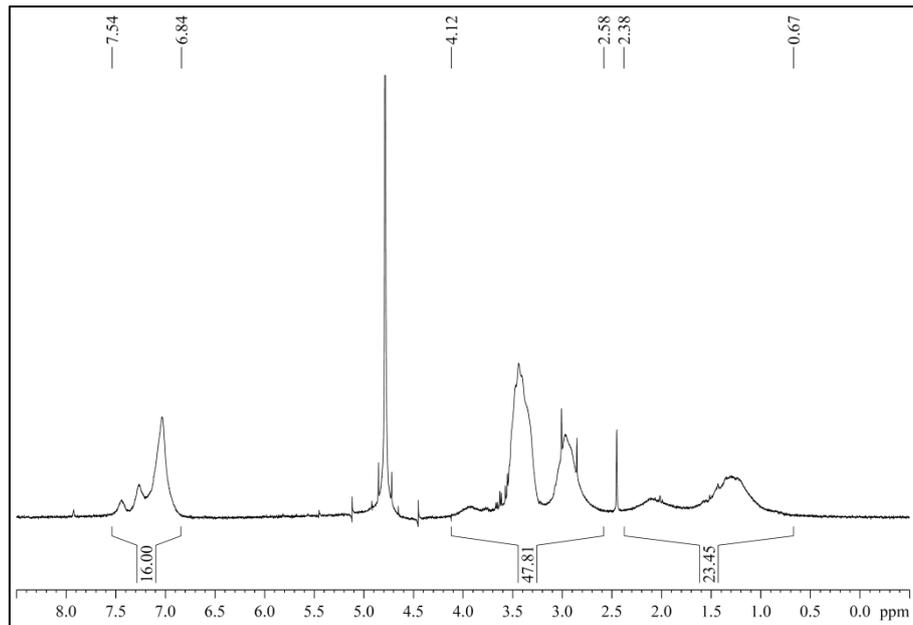


Abb.5.4.35:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG34.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 232\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 116\,000$  g/mol; PDI = 2.0.

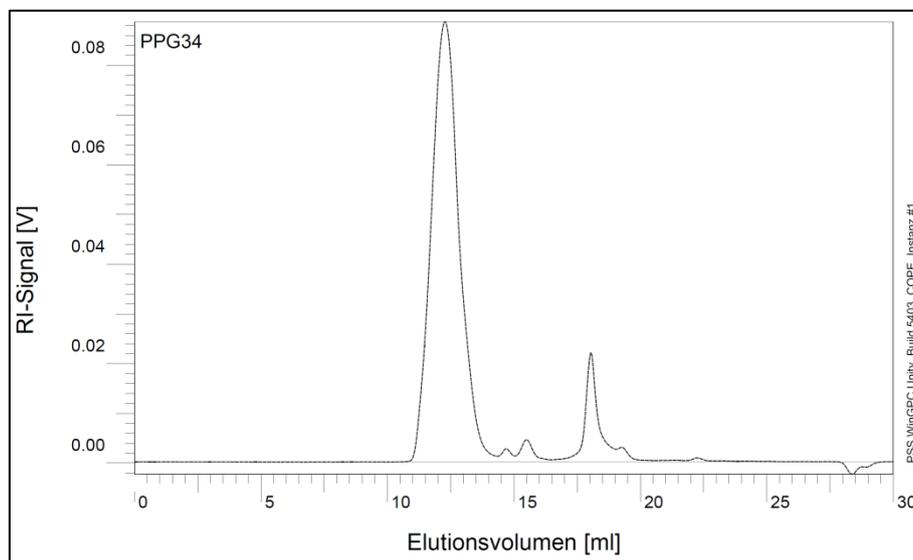
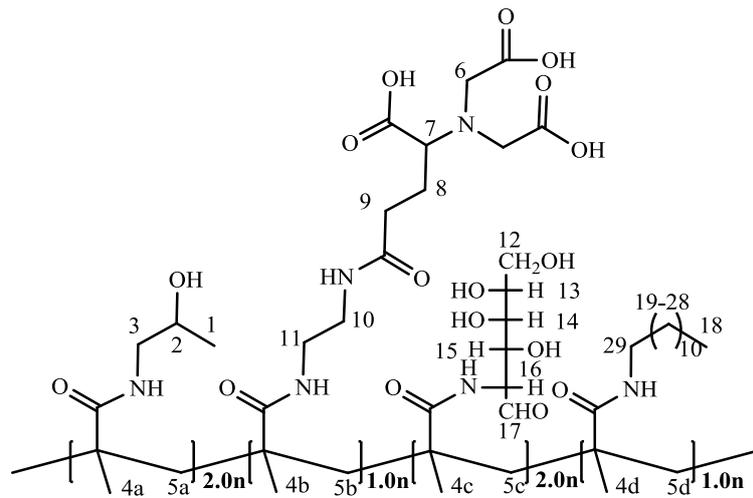


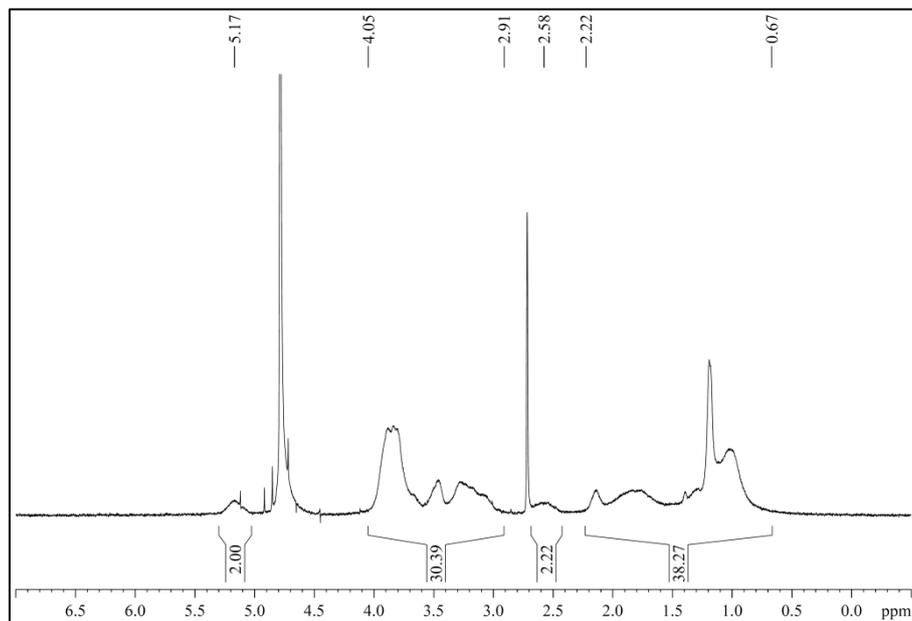
Abb.5.4.36: GPC-Chromatogramm von Polymer PG34.

## PPG35:



**Ausbeute:** 55.2 mg (58 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O): δ [ppm] = **0.67-2.22** (m, 38H, H-1, H-4, H-5, H-8, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28), **2.58** (sb, 2H, H-9), **2.91-4.05** (m, 30H, H-2, H-3, H-6, H-7, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-29), **5.17** (sb, 2H, H-17).



**Abb.5.4.37:** <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) von PPG35.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 180\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 71\,000$  g/mol; PDI = 2.5.

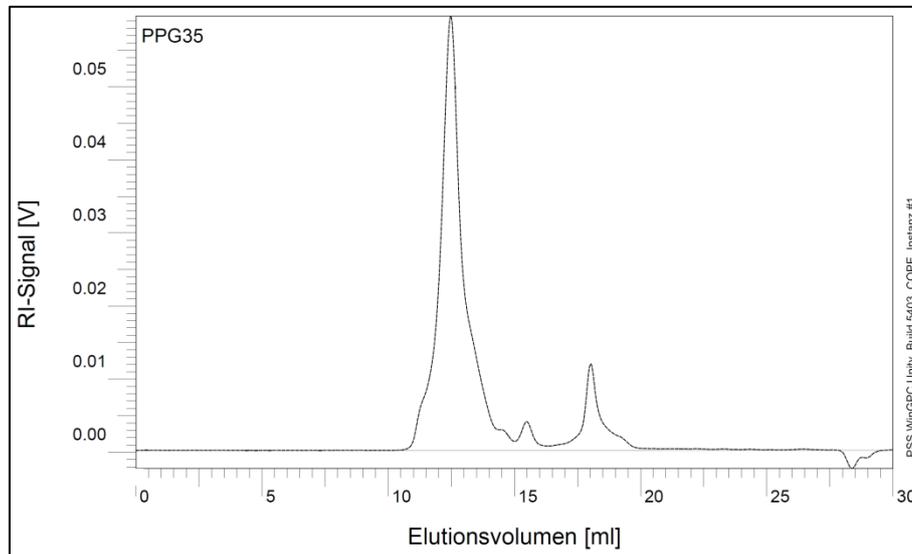
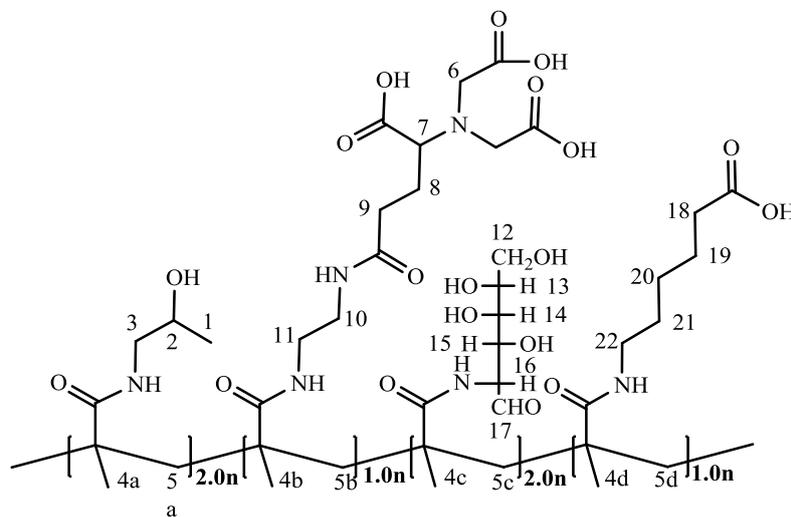


Abb.5.4.38: GPC-Chromatogramm von Polymer PG35.

### PPG36:



**Ausbeute:** 51.2 mg (56 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.67-2.67** (m, 53H, H-1, H-4, H-5, H-8, H-9, H-18, H-19, H-20, H-21), **2.82-4.02** (m, 35H, H-2, H-3, H-6, H-7, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-22), **5.17** (sb, 2H, H-17).

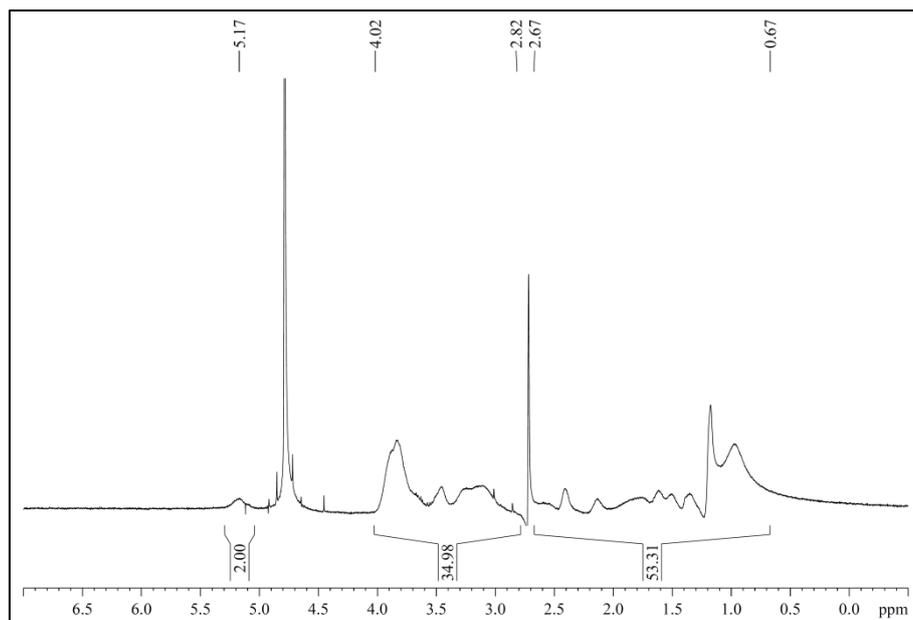


Abb.5.4.39:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG36.

#### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 254\,000\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 118\,000\text{ g/mol}$ ; PDI = 2.2.

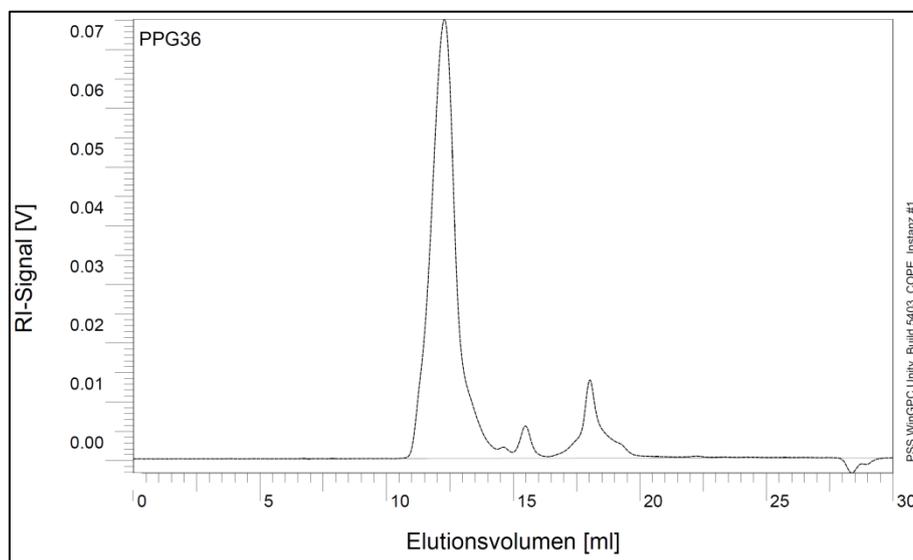
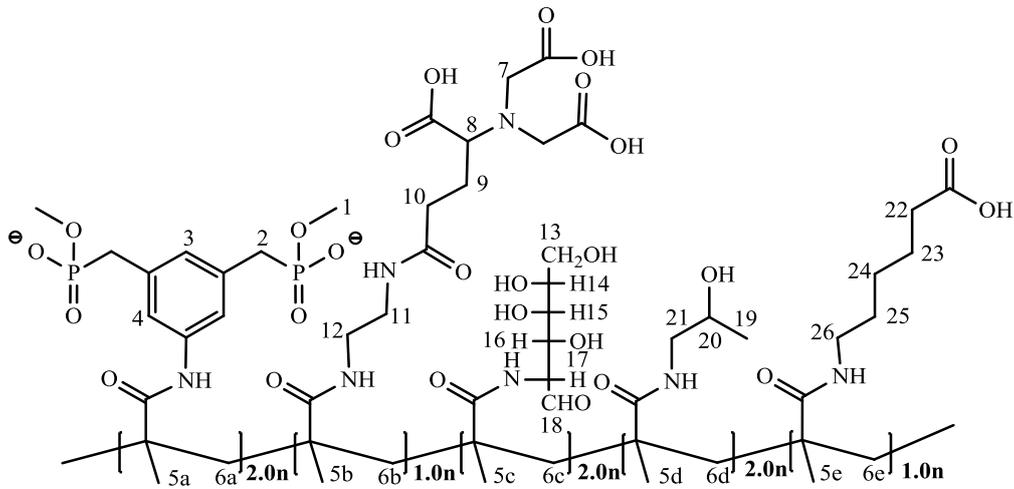


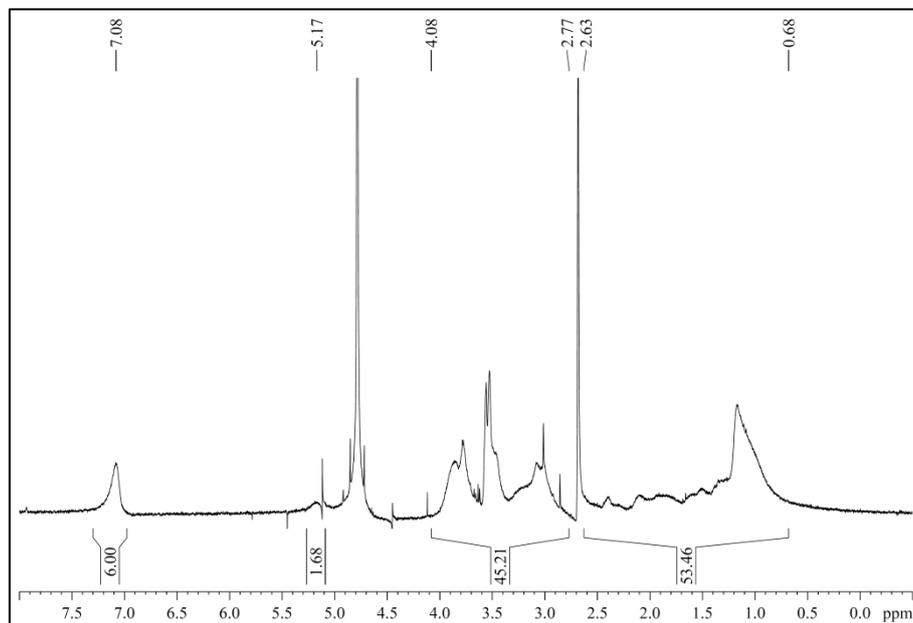
Abb.5.4.40: GPC-Chromatogramm von Polymer PG36.

## PPG37:



**Ausbeute:** 56.8 mg (61 %).

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.68-2.63** (m, 53H, H-5, H-6, H-9, H-10, H-19, H-22, H-23, H-24, H-25), **2.77-4.08** (m, 45H, H-1, H-2, H-7, H-8, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-20, H-21, H-26), **5.17** (sb, 2H, H-18), **7.08** (sb, 6H, H-3, H-4).



**Abb.5.4.41:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG37.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 341\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 158\,000$  g/mol; PDI = 2.2.

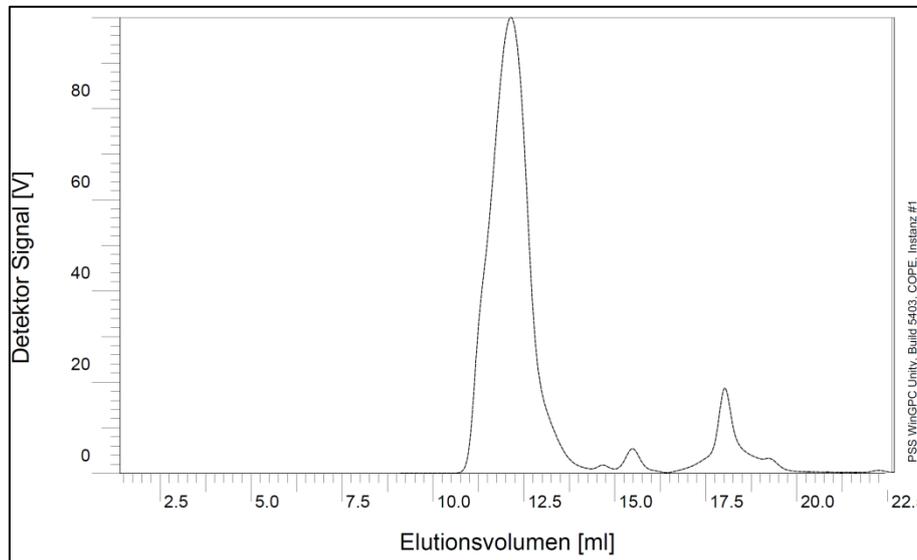
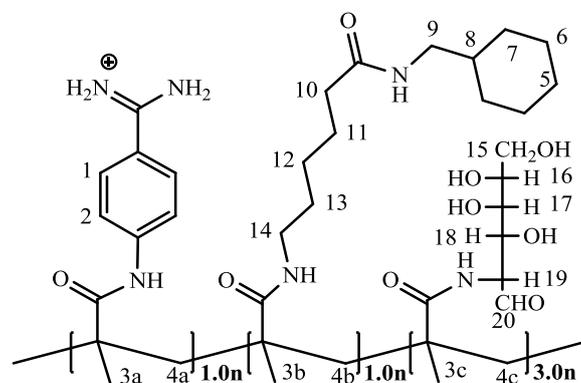


Abb.5.4.42: GPC-Chromatogramm von Polymer PG37.

### PPG38:



**Ausbeute:** 53.0 mg (50 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.58-2.37** (m, 39H, H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, H-10, H-11, H-12, H-13) **2.67-4.13** (m, 24H, H-9, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19), **7.35-8.03** (m, 4H, H-1, H-2).

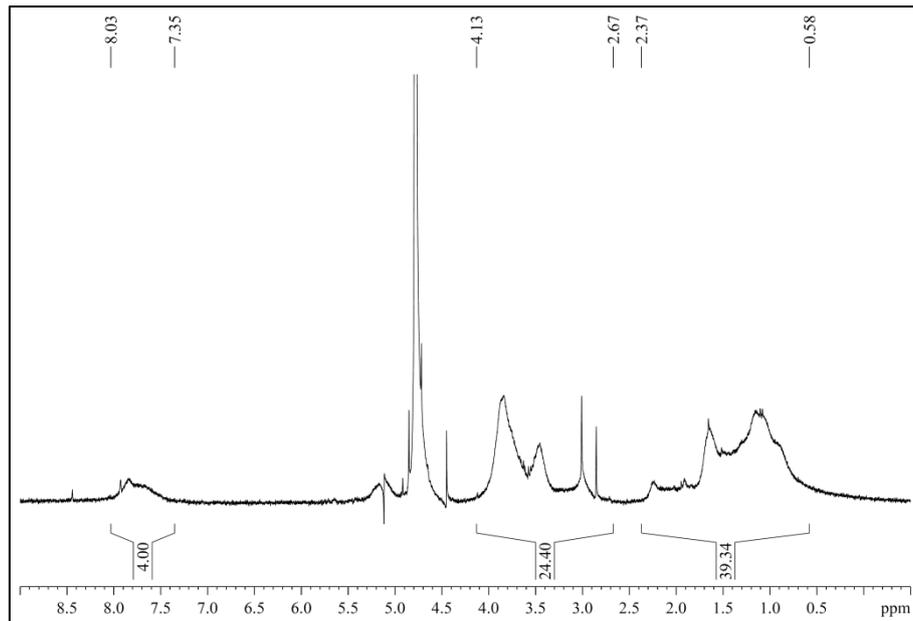


Abb.5.4.43:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG38.

#### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 534\,000\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 196\,000\text{ g/mol}$ ; PDI = 2.7.

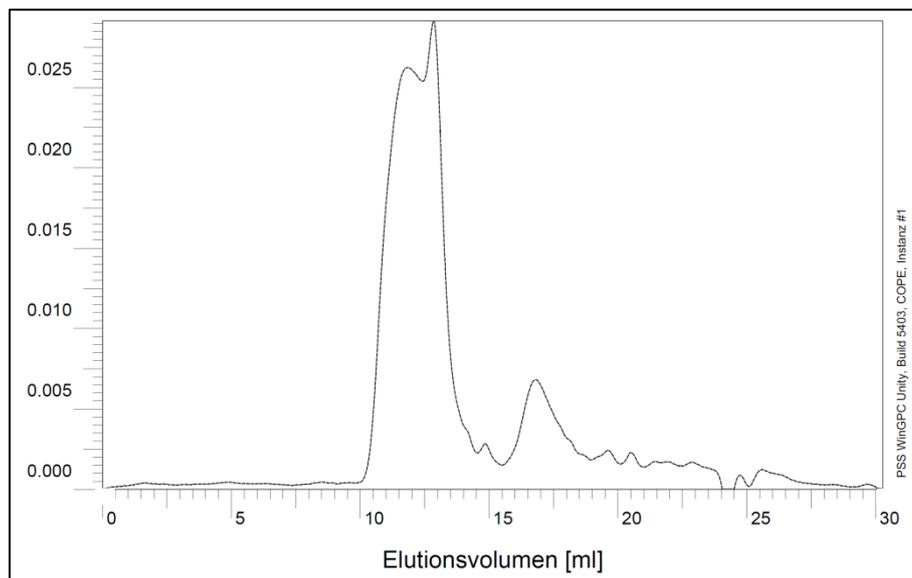
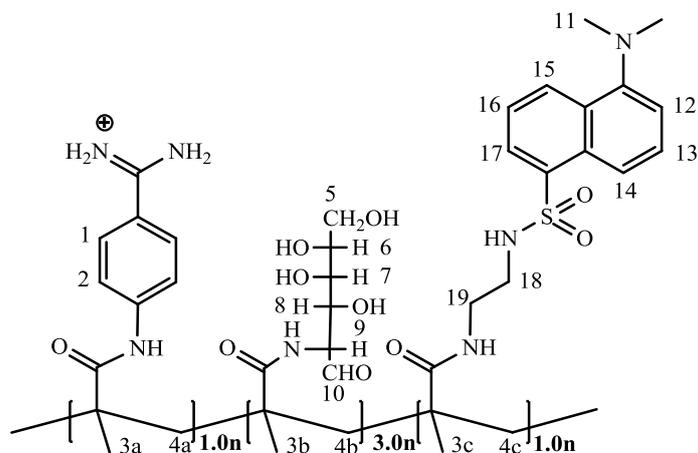


Abb.5.4.44: GPC-Chromatogramm von Polymer PG38.

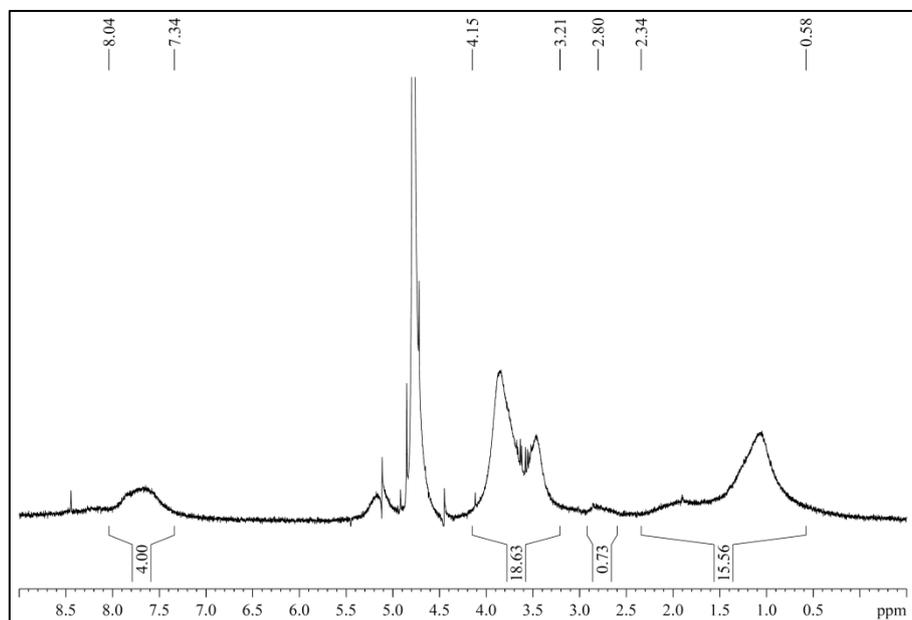
## PPG39:



**Ausbeute:** 18.3 mg (17 %).

Es konnten kaum/keine aromatische/n Dansyl-Protonen (H-12 - H-17) zugeordnet werden.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.58-2.37** (m, 16H, H-3, H-4), **2.80** (sb, 1H, H-11), **3.21-4.15** (m, 19H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-18, H-19), **7.34-8.04** (m, 4H, H-1, H-2).



**Abb.5.4.45:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG39.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 461\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 202\,000$  g/mol; PDI = 2.3.

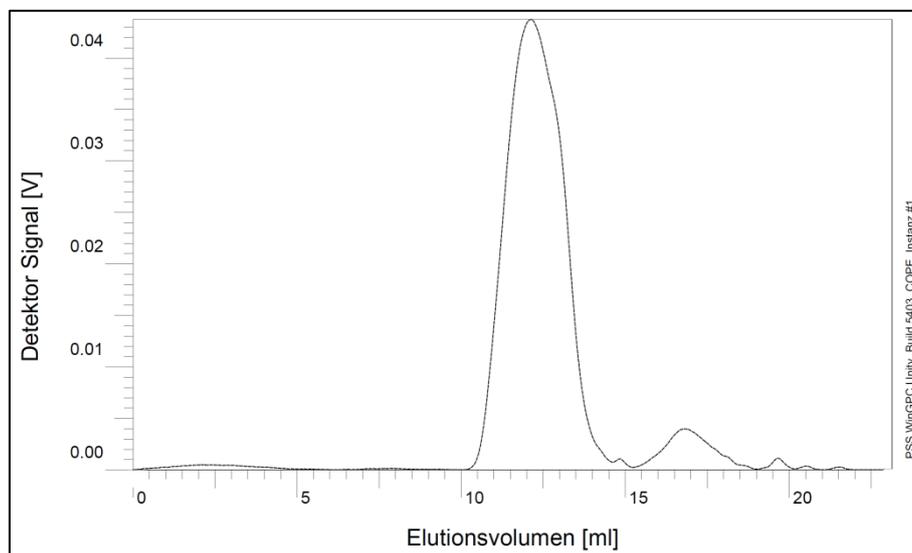
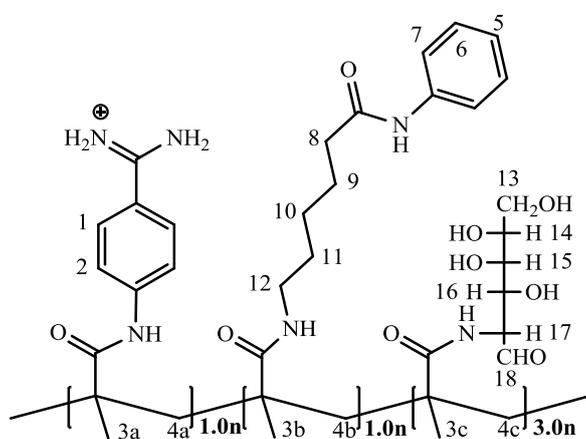


Abb.5.4.46: GPC-Chromatogramm von Polymer PG39.

### PPG40:



**Ausbeute:** 59.1 mg (65 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.61-2.50** (m, 31H, H-3, H-4, H-8, H-9, H-10, H-11), **2.75-4.11** (m, 19H, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), **5.16** (sb, 2H, H-18), **7.00-8.00** (m, 9H, H-1, H-2, H-5, H-6, H-7).

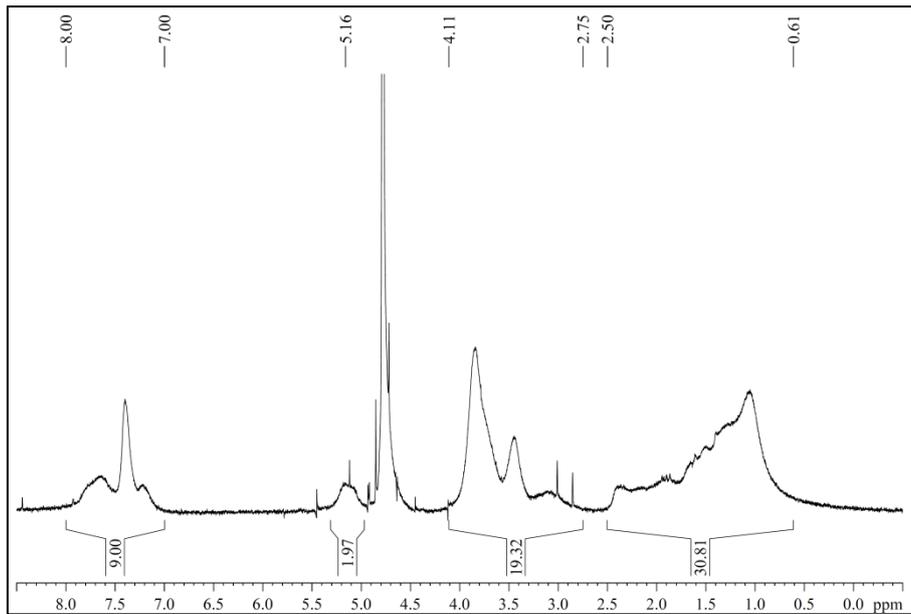


Abb.5.4.47:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG40.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_{w1} = 11\,890\,000\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n1} = 4\,432\,000\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_1 = 2.7$ ;

$\bar{M}_{w2} = 213\,000\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{n2} = 107\,000\text{ g/mol}$ ;  $\text{PDI}_2 = 2.0$ .

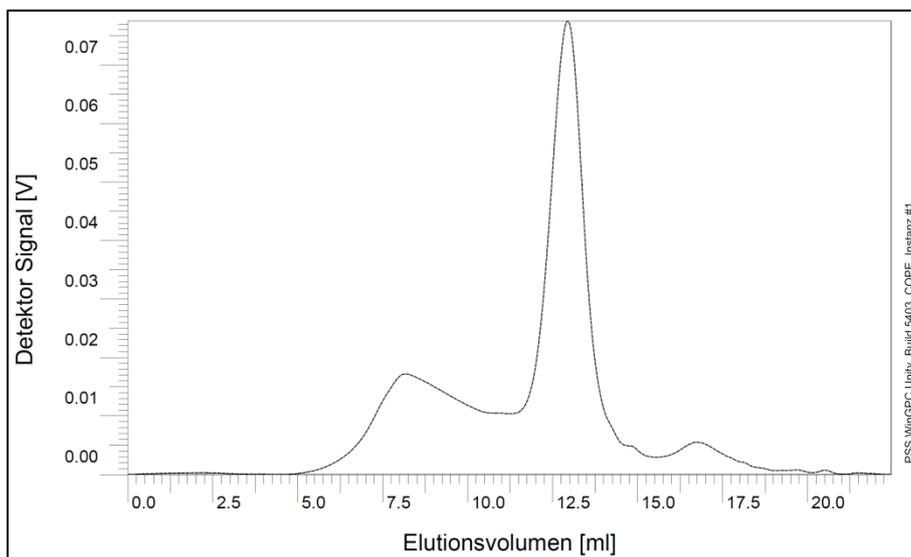
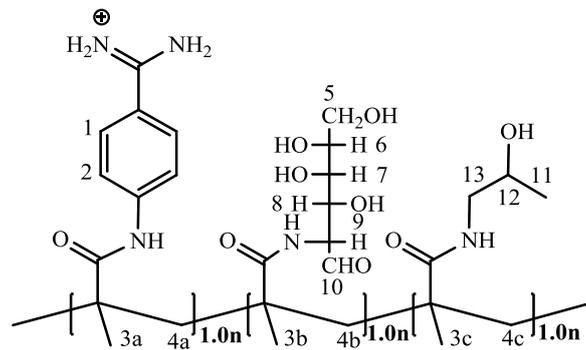


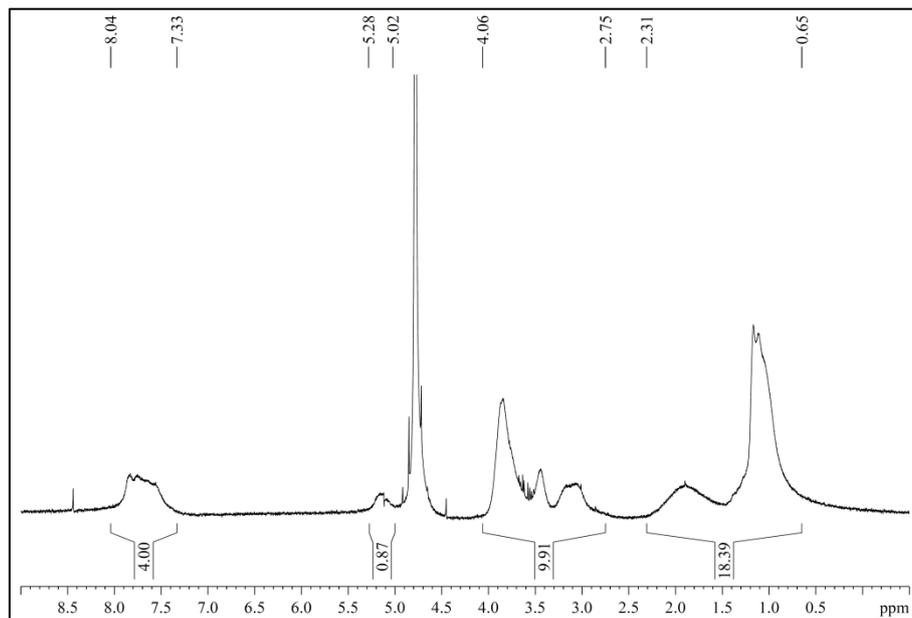
Abb.5.4.48: GPC-Chromatogramm von Polymer PG40.

## PPG41:



**Ausbeute:** 53.7 mg (52 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.65-2.31** (m, 18H, H-3, H-4, H-11), **2.75-4.06** (m, 10H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-12, H-13), **5.28** (sb, 1H, H-10), **7.33-8.04** (m, 4H, H-1, H-2).



**Abb.5.4.49:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG41.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 323\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 142\,000$  g/mol; PDI = 2.3.

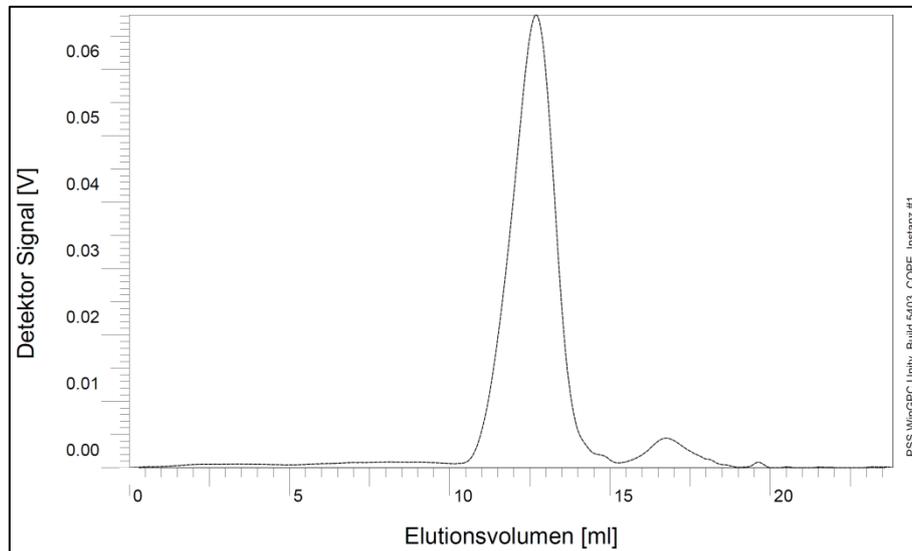
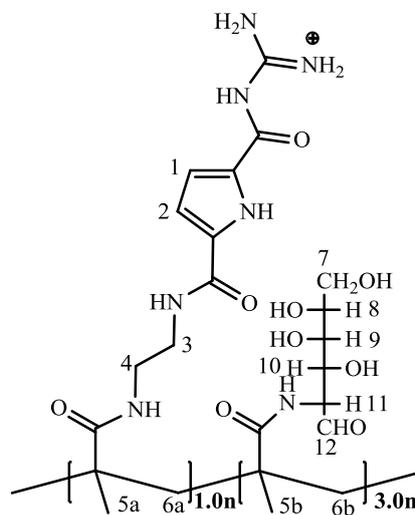


Abb.5.4.50: GPC-Chromatogramm von Polymer PG41.

### PPG42:



**Ausbeute:** 39.9 mg (48 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.63-2.40** (m, 18H, H-5, H-6), **3.22-4.16** (m, 21H, H-3, H-4, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11), **6.61-7.19** (m, 2H, H-1, H-2).

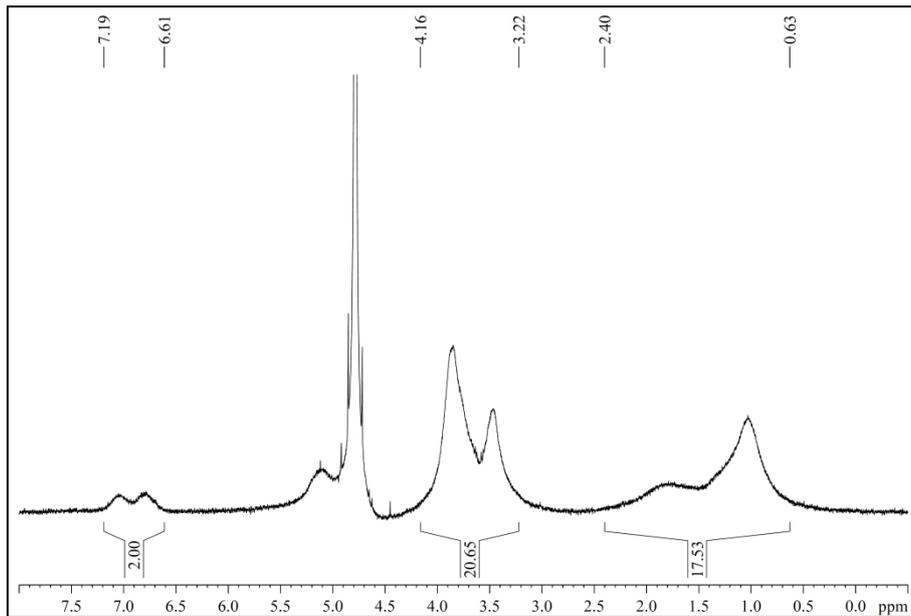


Abb.5.4.51:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG42.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 387\,000\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 180\,000\text{ g/mol}$ ; PDI = 2.2.

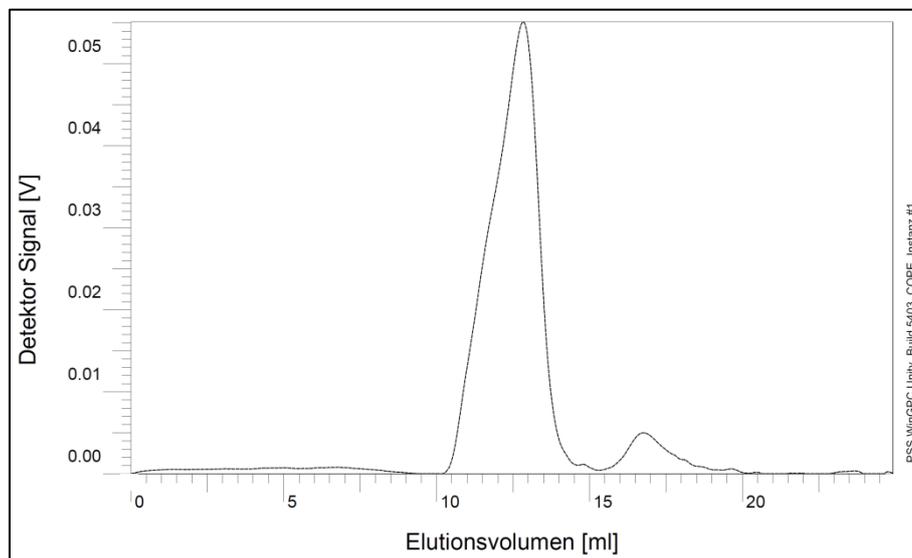
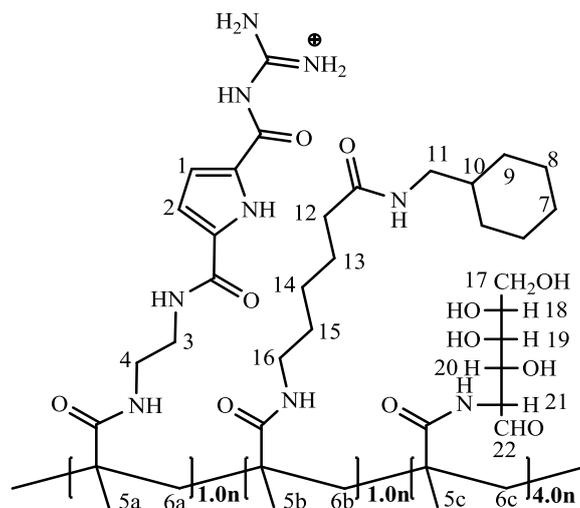


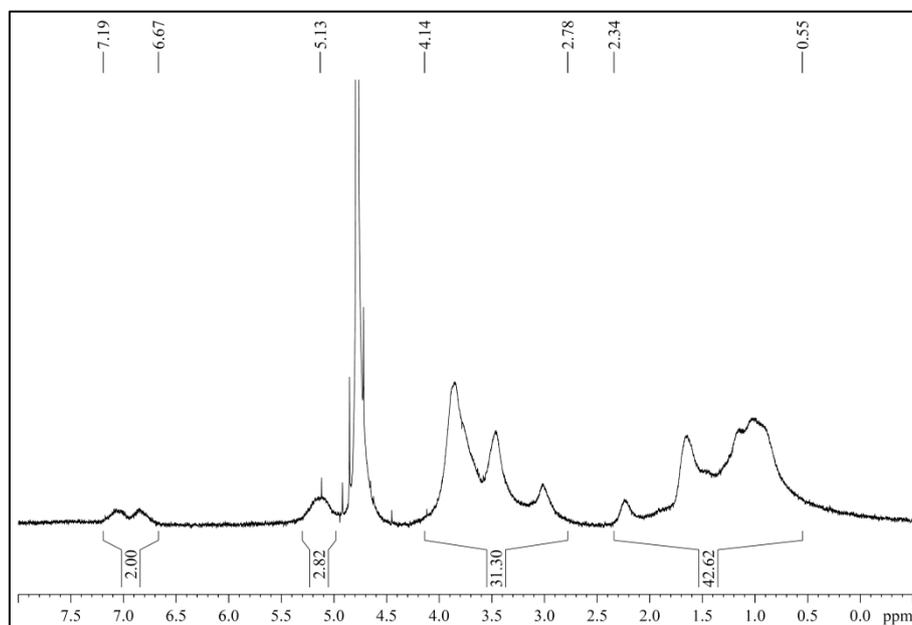
Abb.5.4.52: GPC-Chromatogramm von Polymer PG42.

## PPG43:



**Ausbeute:** 38.5 mg (47 %).

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = **0.55-2.34** (m, 43H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-12, H-13, H-14, H-15) **2.78-4.14** (m, 31H, H-3, H-4, H-11, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21), **5.13** (sb, 3H, H-22), **6.67-7.19** (m, 2H, H-1, H-2).



**Abb.5.4.53:** <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) von PPG43.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 388\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 147\,000$  g/mol; PDI = 2.6.

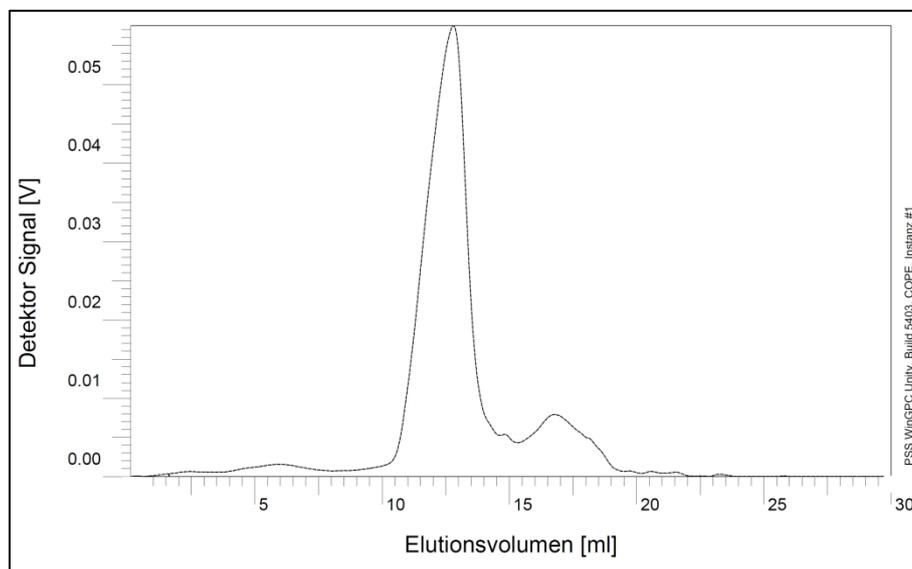
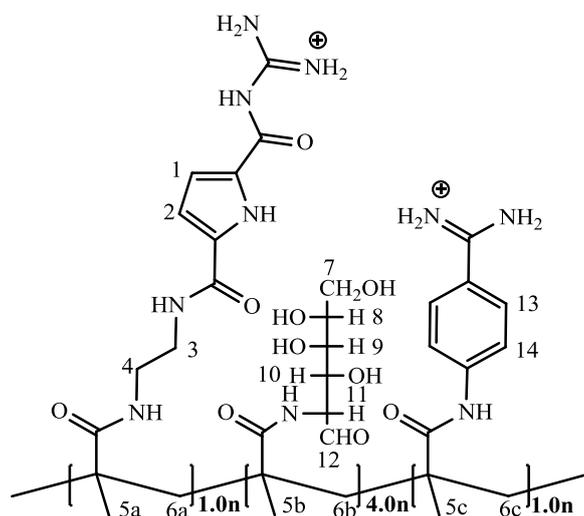


Abb.5.4.54: GPC-Chromatogramm von Polymer PG43.

### PPG44:



**Ausbeute:** 49.6 mg (56 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.56-2.21** (m, 26H, H-5, H-6), **2.29-4.12** (m, 33H, H-3, H-4, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11), **5.12** (sb, 2H, H-12), **6.61-7.20** (m, 2H, H-1, H-2), **7.31-8.06** (m, 2H, H-13, H-14).

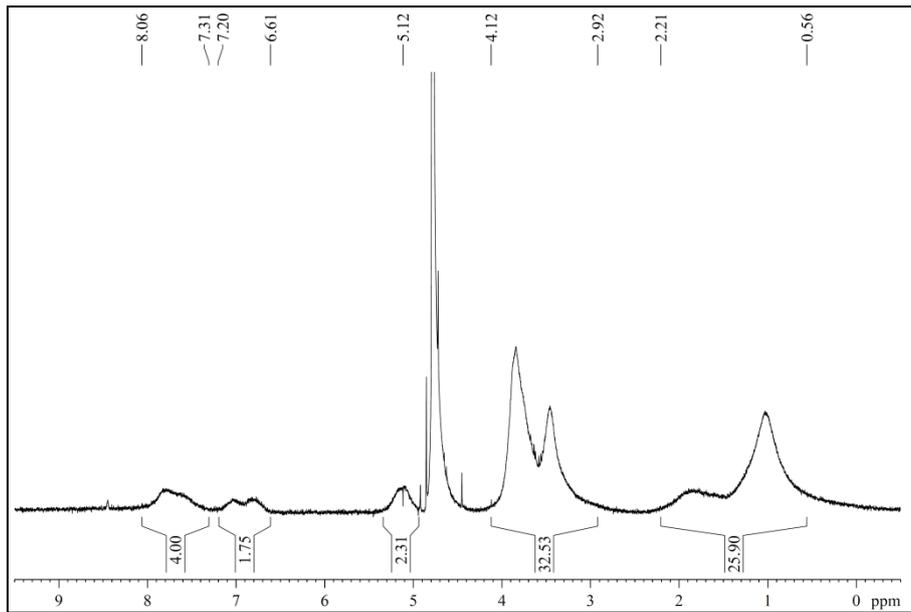


Abb.5.4.55:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG44.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 364\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 167\,000$  g/mol; PDI = 2.2.

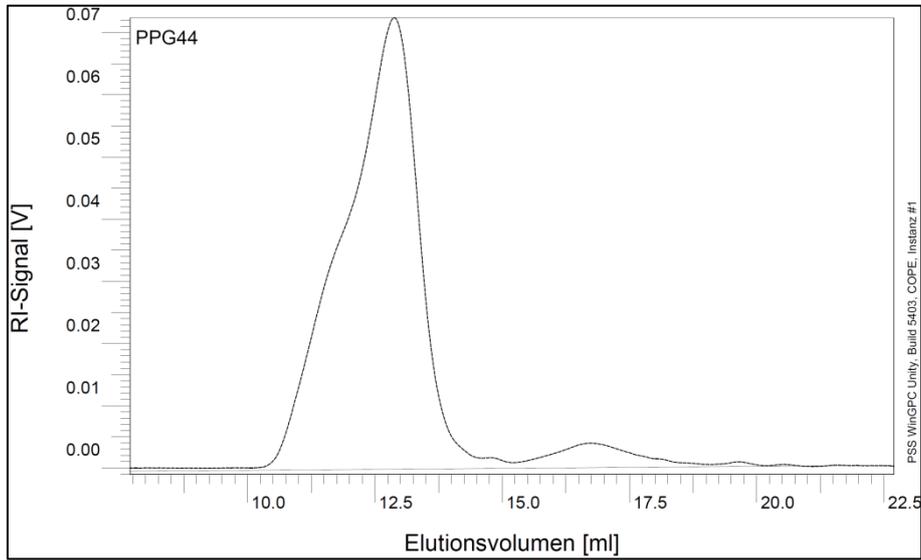
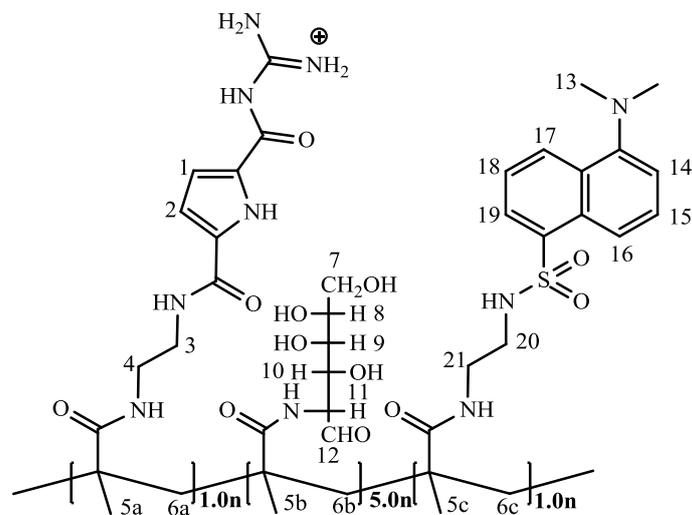


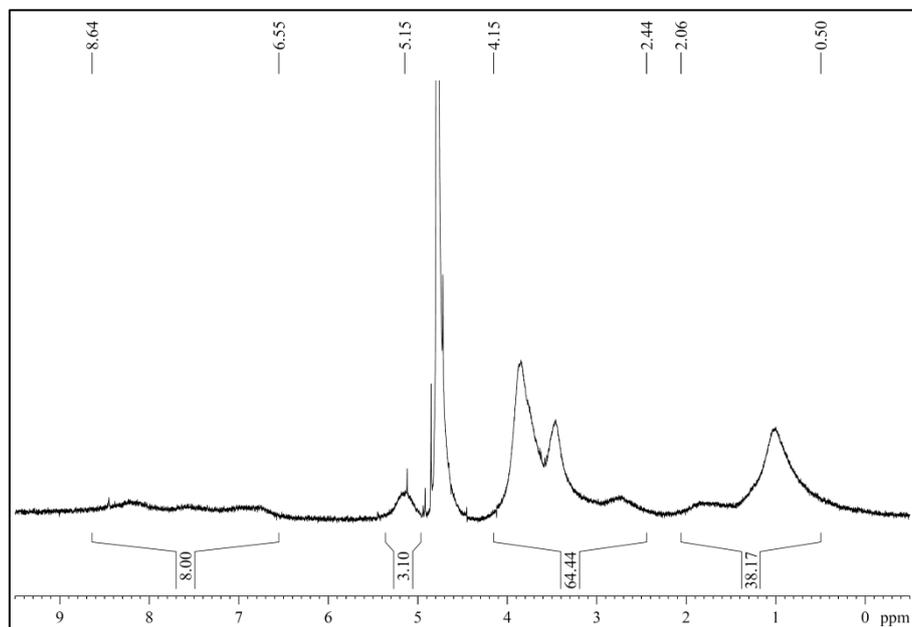
Abb.5.4.56: GPC-Chromatogramm von Polymer PPG44.

## PPG45:



**Ausbeute:** 48.8 mg (54 %).

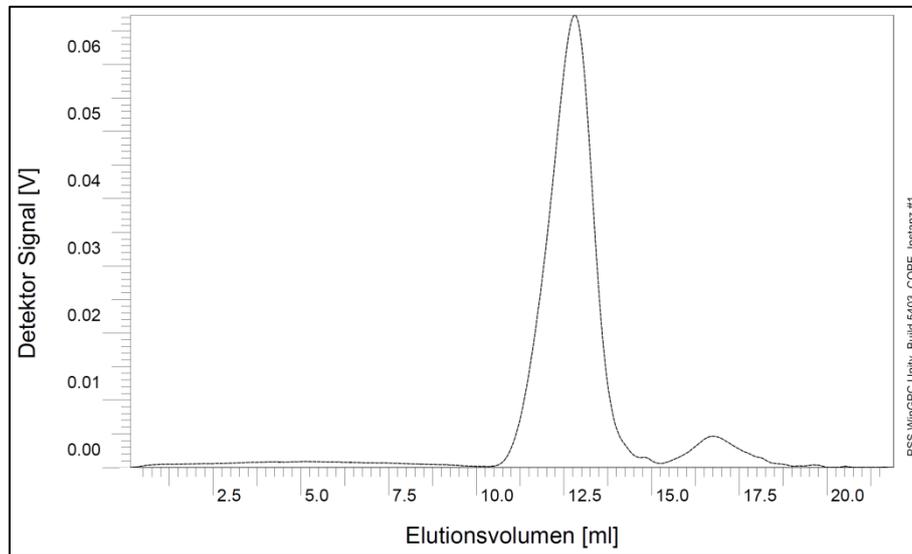
**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = **0.50-2.06** (m, 38H, H-5, H-6), **2.44-4.15** (m, 64H, H-3, H-4, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-13, H-20, H-21), **5.15** (sb, 3H, H-12), **6.55-8.64** (m, 8H, H-1, H-2, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19).



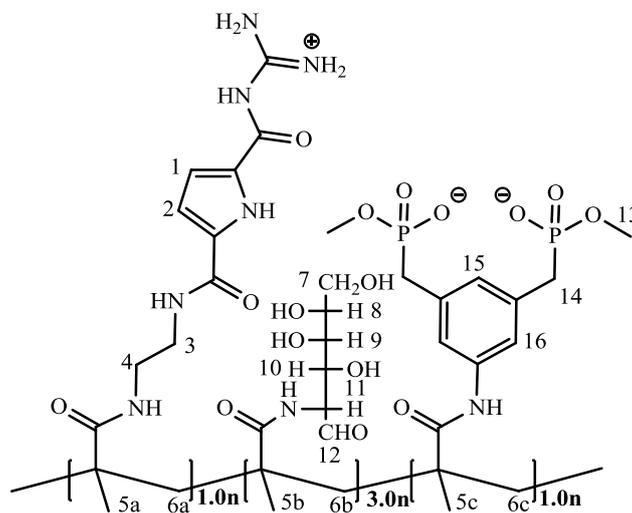
**Abb.5.4.57:** <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) von PPG45.

**Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):**

$\bar{M}_w = 287\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 148\,000$  g/mol; PDI = 1.9.



**Abb.5.4.58:** GPC-Chromatogramm von Polymer PG45.

**PPG46a:**

**Ausbeute:** 40.7 mg (51 %).

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.59-2.35** (m, 25H, H-5, H-6), **2.77-4.14** (m, 42H, H-3, H-4, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-13, H-14), **6.62-7.36** (m, 5H, H-1, H-2, H-15, H-16).

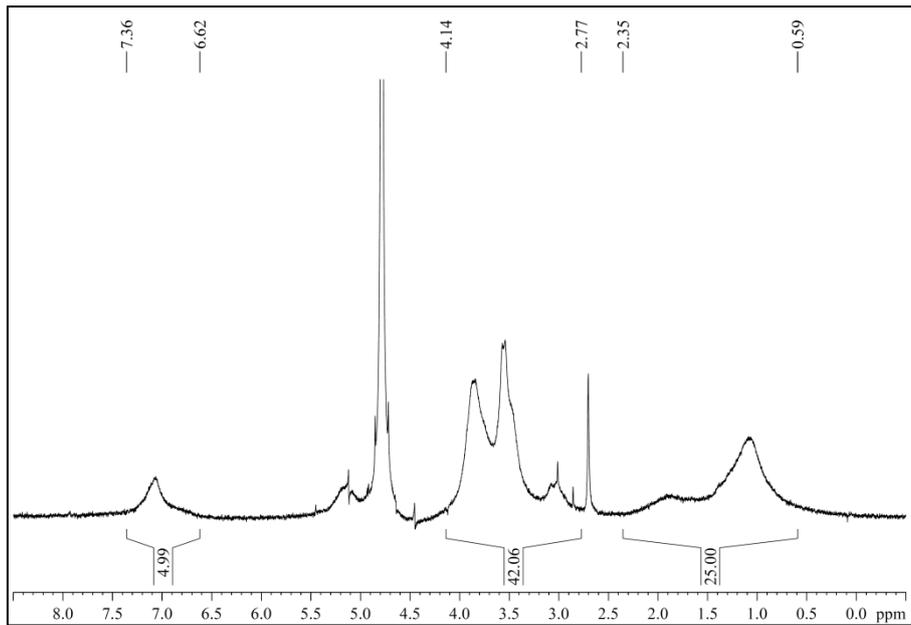


Abb.5.4.59:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG46a.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_{\text{wa}} = 440\,000\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{\text{na}} = 123\,000\text{ g/mol}$ ; PDI = 3.6, (anionische Säulen).

$\bar{M}_{\text{wk}} = 7\,900\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{\text{nk}} = 7\,400\text{ g/mol}$ ; PDI = 1.1. (kationische Säulen).

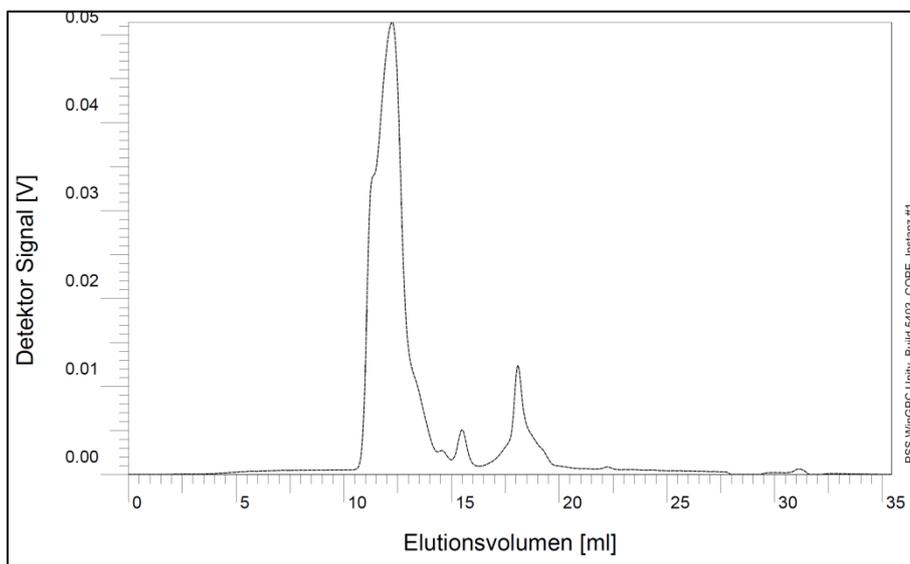
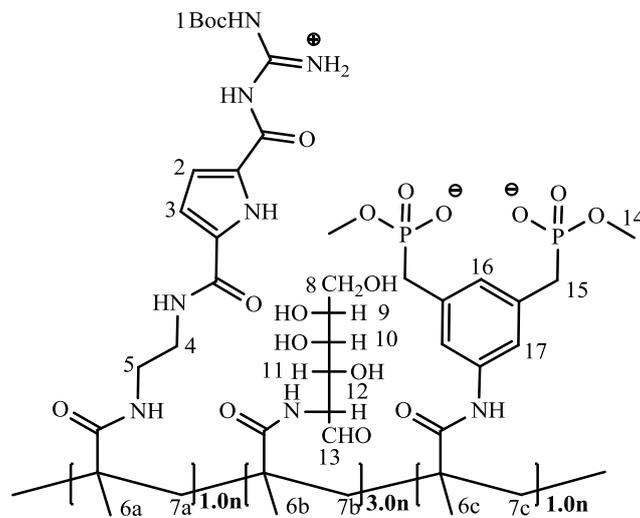
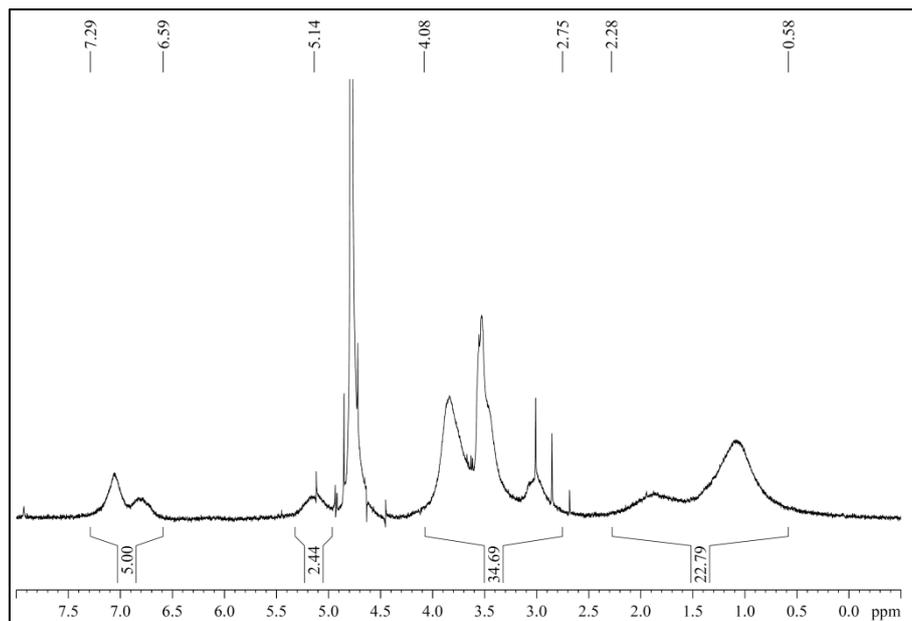


Abb.5.4.60: GPC-Chromatogramm von Polymer PG46a, (anionische Säule).

## PPG46b:



**Ausbeute:** 39.2 mg (48 %).



**Abb.5.4.61:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG46b.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.58-2.28** (m, 23H, H-1, H-6, H-7), **2.75-4.08** (m, 35H, H-4, H-5, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-14, H-15), **5.14** (sb, 2H, H-13), **6.59-7.29** (m, 5H, H-2, H-3, H-16, H-17).



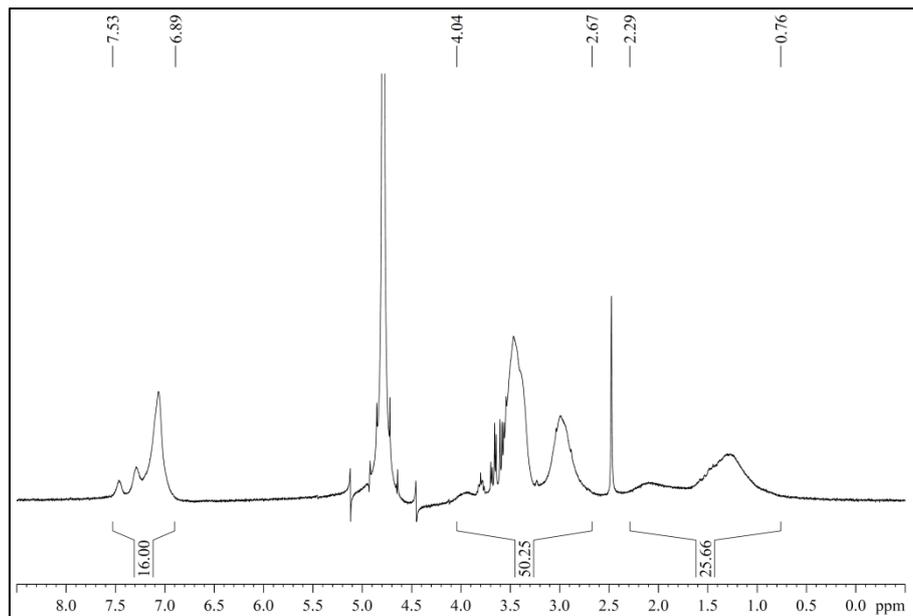


Abb.5.4.63:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG47.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 256\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 134\,000$  g/mol; PDI = 1.9.

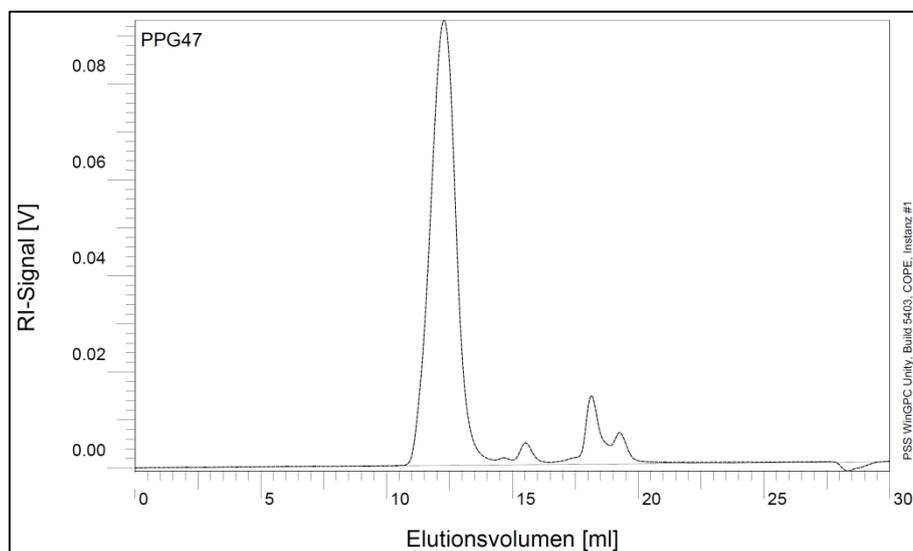
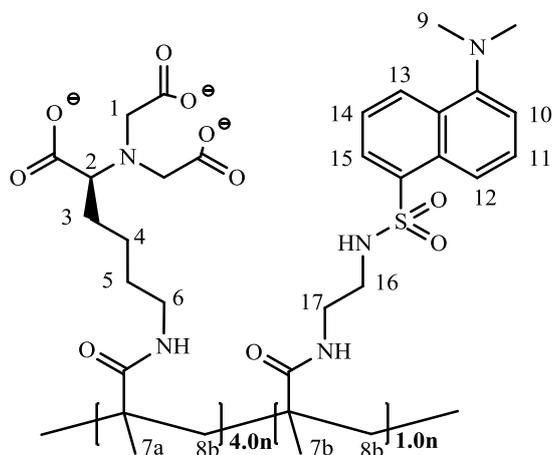
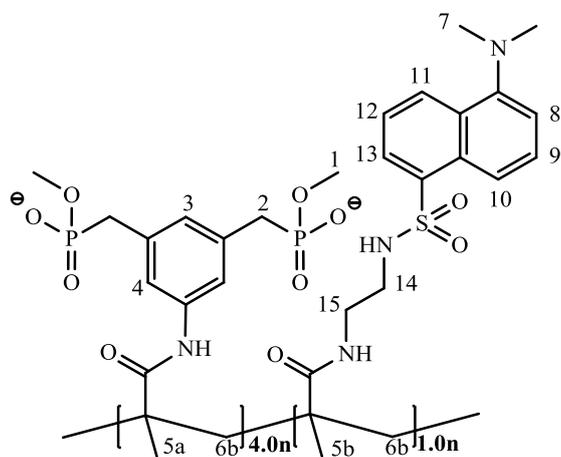


Abb.5.4.64: GPC-Chromatogramm von Polymer PPG47.

**PPG48:**

**Ausbeute:** 30.7 mg (28 %).

Polymer 48 zeichnete sich als wasserunlöslich aus. Bei der  $^1\text{H-NMR}$ -Messung der Suspension (in  $\text{D}_2\text{O}$ ), konnte nachgewiesen werden, dass sich jeweils nur das Homopolymer, der eingesetzten Monomere bildete.

**PPG49:**

**Ausbeute:** 41.7 mg (40 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.59-4.14** (m, 84H, H-1, H-2, H-5, H-6, H-7, H-14, H-15), **6.68-8.44** (m, 18H, H-3, H-4, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13).

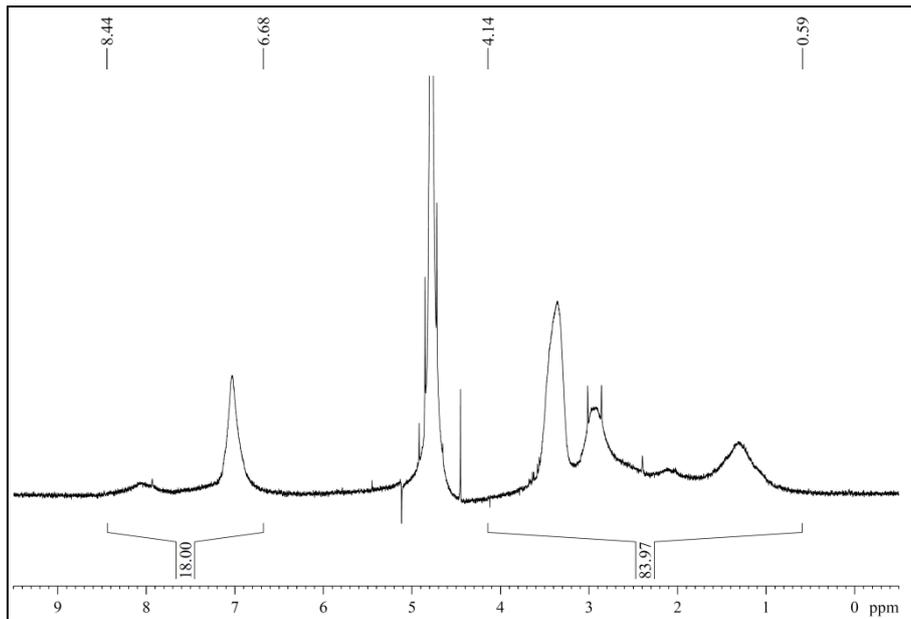


Abb.5.4.65:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPG49.

#### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 224\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 120\,000$  g/mol; PDI = 1.9.

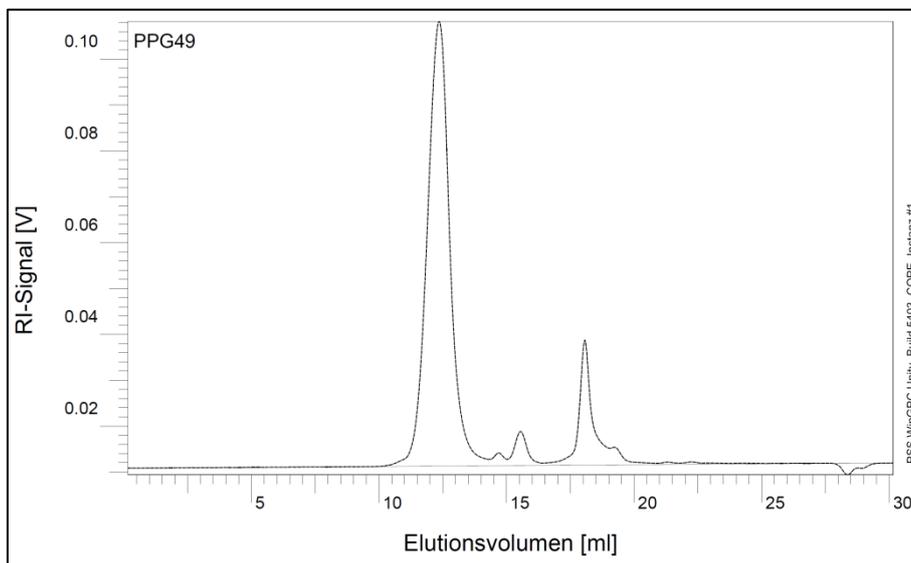
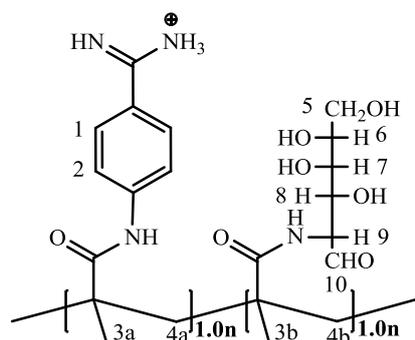


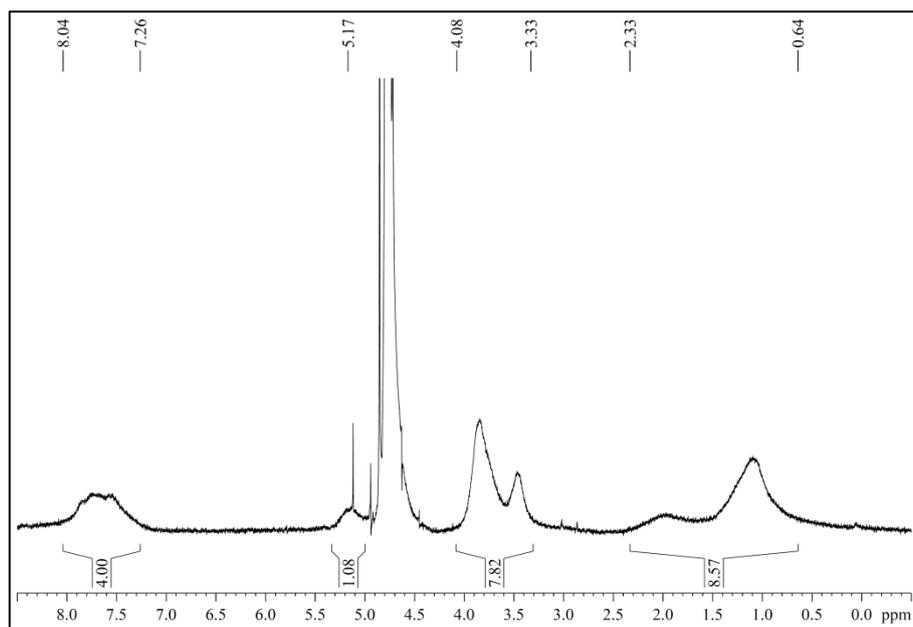
Abb.5.4.66: GPC-Chromatogramm von Polymer PG49.

## PPGBA4.2:



**Ausbeute:** 68.0 mg (60 %).

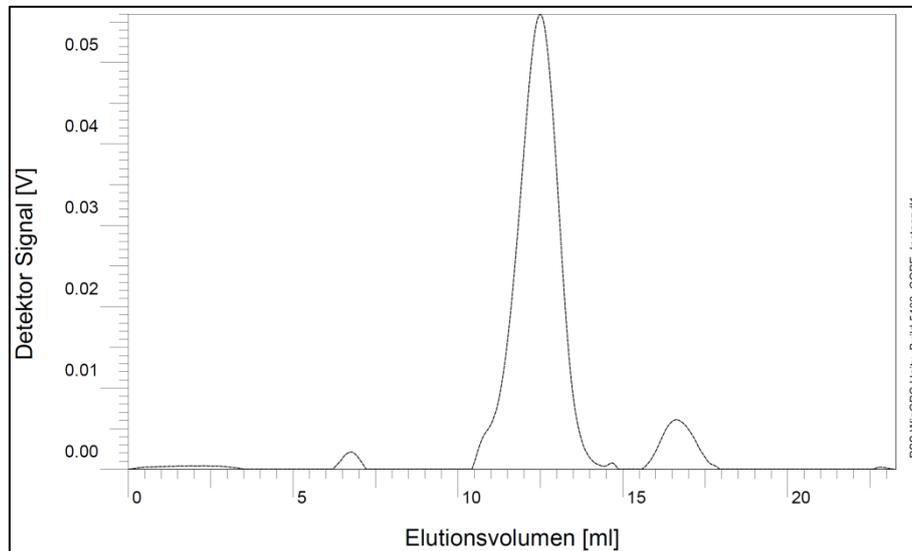
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.64-2.33** (m, 9H, H-3, H-4), **2.33-3.33** (m, 8H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9), **5.17** (sb, 1H, H-10), **7.04-8.04** (m, 4H, H-1, H-2).



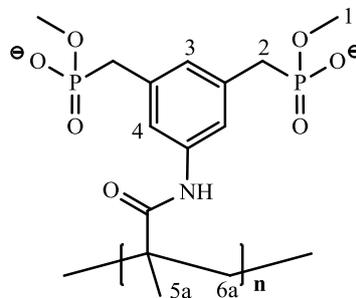
**Abb.5.4.67:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPGBA4.2.

**Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):**

$\bar{M}_w = 378\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 222\,000$  g/mol; PDI = 1.7.



**Abb.5.4.68:** GPC-Chromatogramm von Polymer PGBA4.2.

**PPGBP:**

**Ausbeute:** 37.4 mg (44 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.77-2.37** (m, 5H, H-5, H-6), **2.65-3.58** (m, 10H, H-1, H-2), **7.04** (sb, 3H, H-3, H-4).

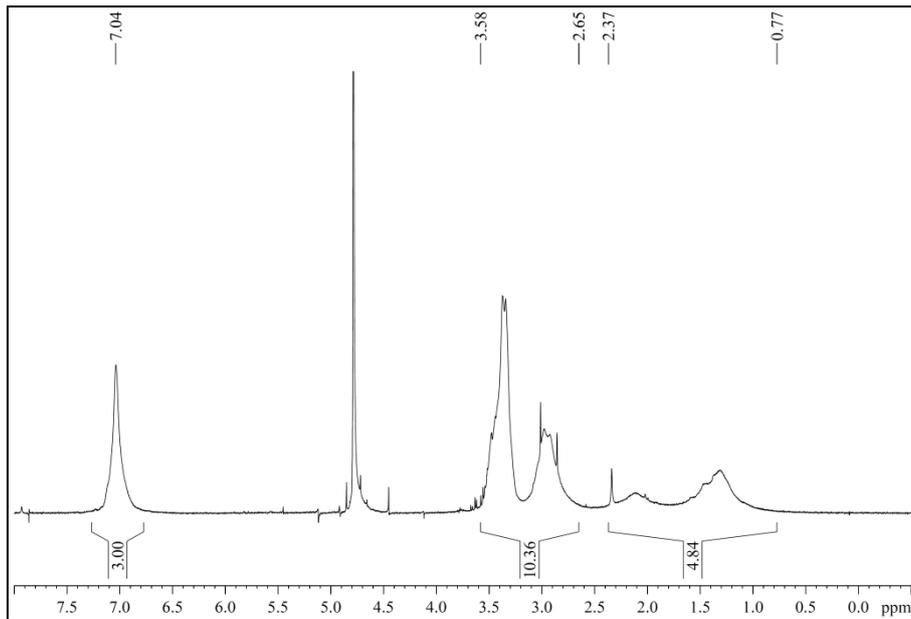


Abb.5.4.69:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PGPB.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 182\,000\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 103\,000\text{ g/mol}$ ; PDI = 1.8.

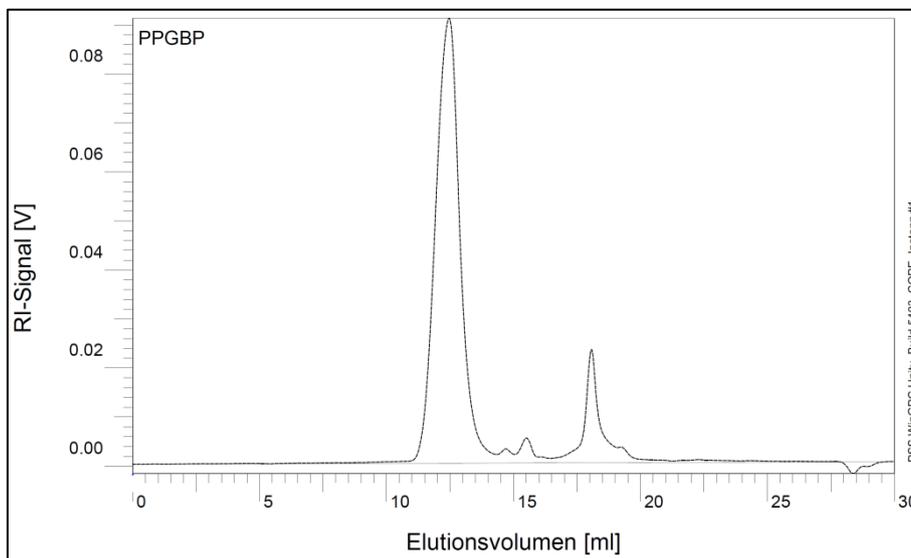


Abb.5.4.70: GPC-Chromatogramm von Polymer PGPB.



### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 324\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 155\,000$  g/mol; PDI = 2.1.

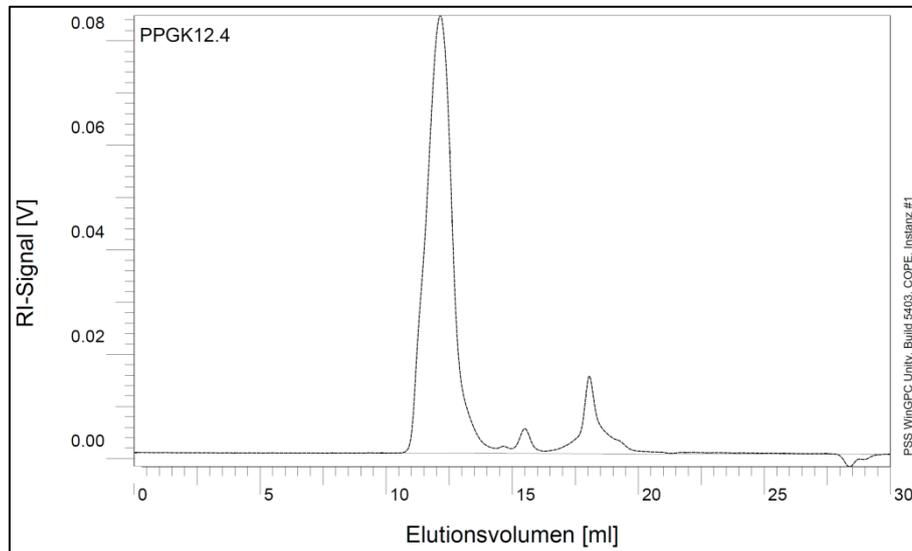
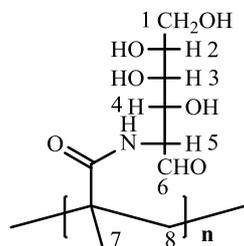


Abb.5.4.72: GPC-Chromatogramm von Polymer PGK12.4.

### PPGK14.5:



Bei Polymer PGKW14.5 handelt es sich um eine Vereinigung der Copolymerisationsprodukte von PPGK14.3 und PPGK14.4, welche durch Ultrafiltration aufgereinigt wurden sind.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.55-2.23** (m, 4H, H-7, H-8), **3.19-4.10** (m, 6H, H-1, H-2, H-3, H-4, H-5), **4.99-5.37** (sb, 1H, H-6).

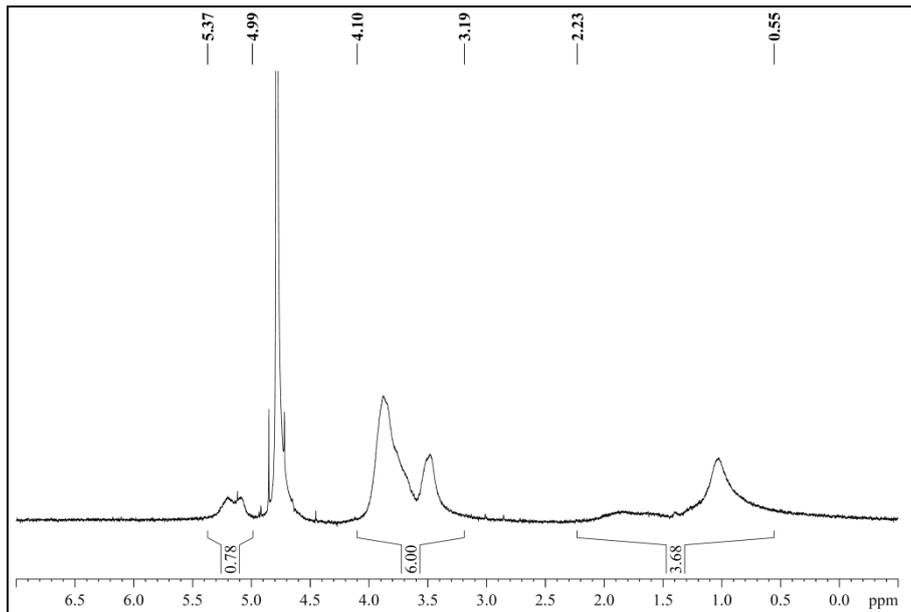


Abb.5.4.73:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPGK14.5.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_{\text{wa}} = 107\,000\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{\text{na}} = 37\,000\text{ g/mol}$ ; PDI = 2.8 (anionische Säulen);

$\bar{M}_{\text{wk}} = 56\,000\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_{\text{nk}} = 14\,000\text{ g/mol}$ ; PDI = 4.0 (kationische Säulen).

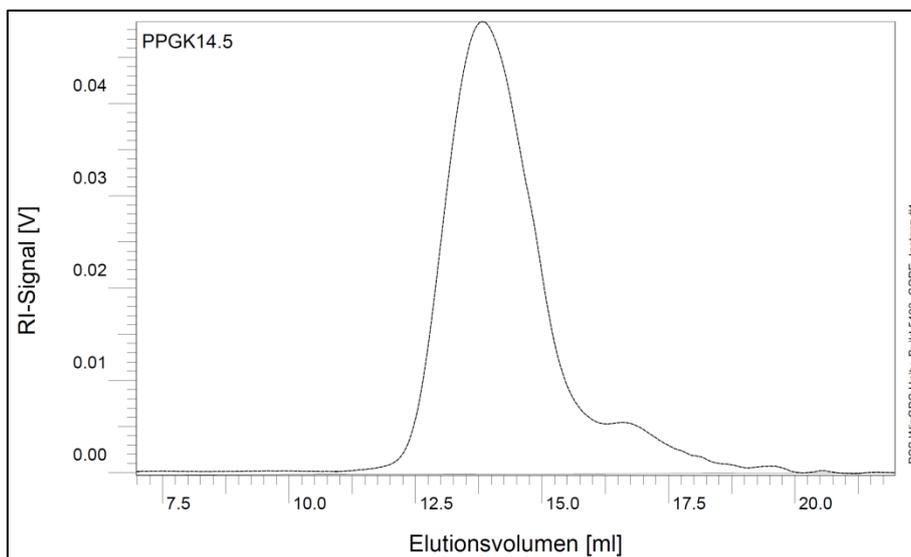
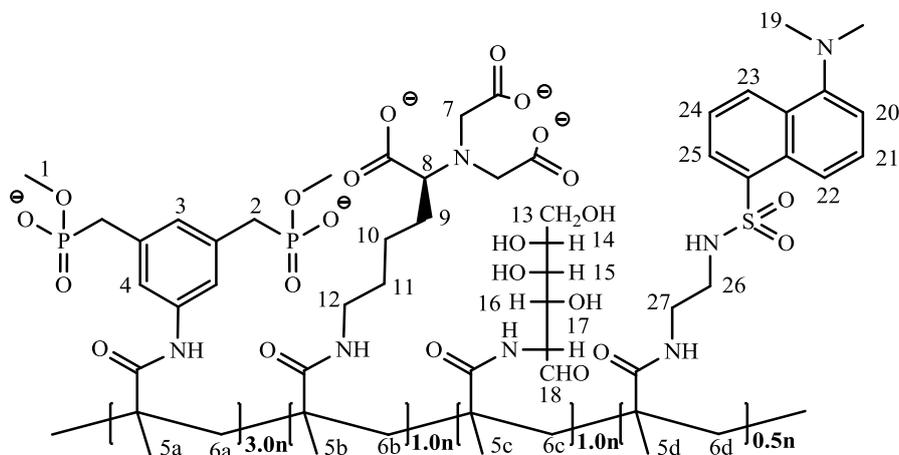


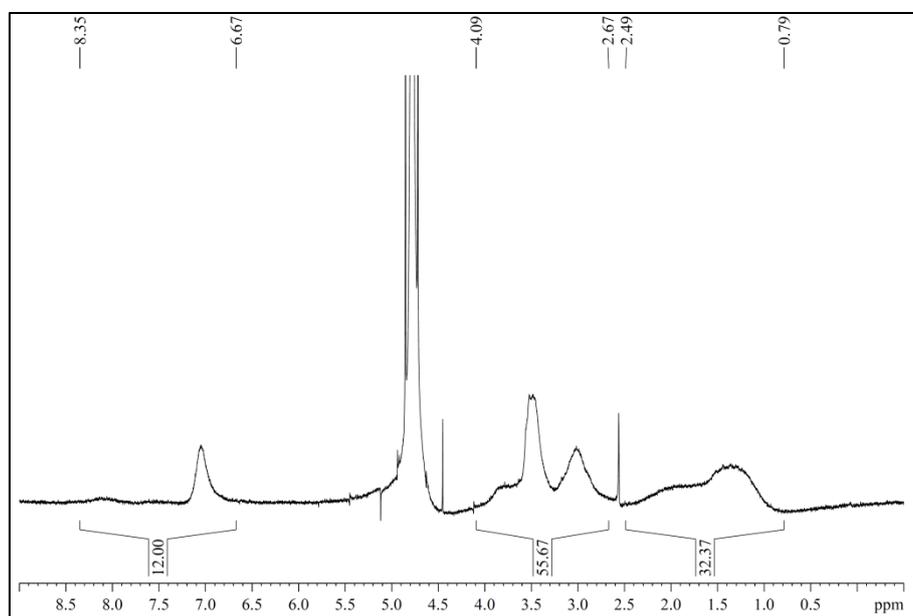
Abb.5.4.74: GPC-Chromatogramm von Polymer PPGK14.5 (anionische Säulen).

## PPGKW11.2:



**Ausbeute:** 33.1 mg (34 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.79-2.49** (m, 32.5H, H-5, H-6, H-9, H-10, H-11), **2.67-4.09** (m, 55.5H, H-1, H-2, H-7, H-8, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-19, H-26, H-27), **6.67-8.35** (m, 12.0H, H-3, H-4, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25).



**Abb.5.4.75:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPGKW11.2.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 157\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 100\,000$  g/mol; PDI = 1.6.

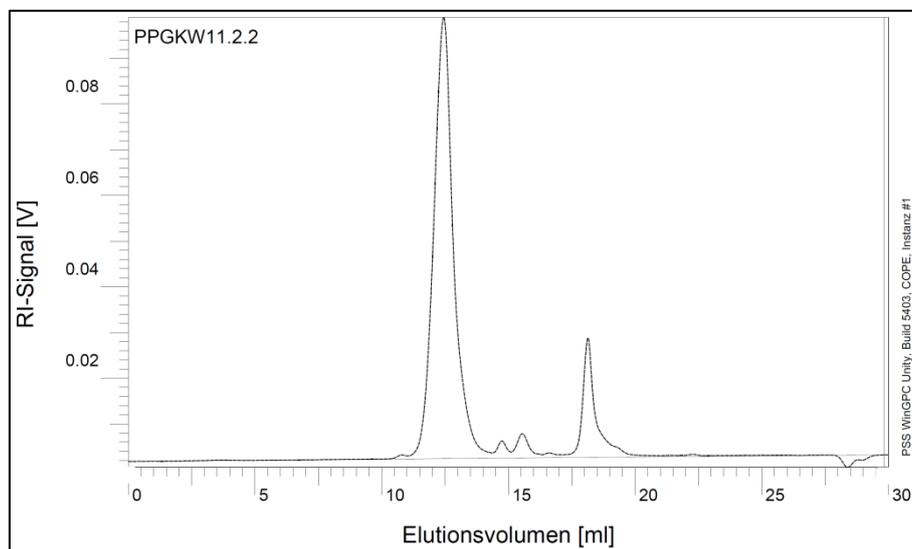
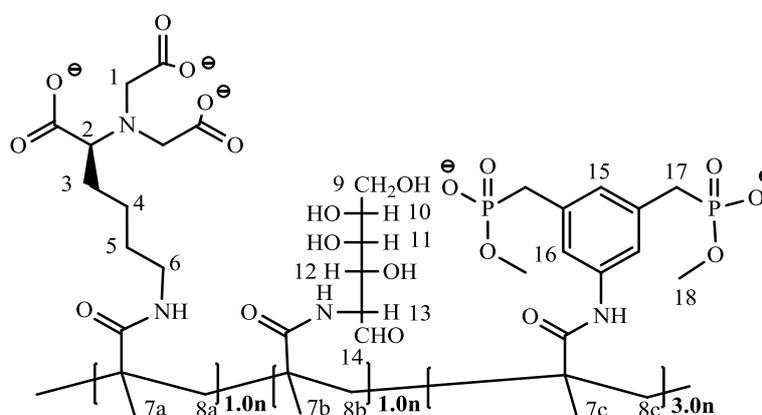


Abb.5.4.76: GPC-Chromatogramm von Polymer PPGKW11.2.

### PPGKW11.3:



**Ausbeute:** 37.7 mg (40 %).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.74-2.40** (m, 35H, H-3, H-4, H-5, H-7, H-8), **2.73-3.94** (m, 43H, H-1, H-2, H-6, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-17, H-18), **7.09** (sb, 9H, H-15, H-16).

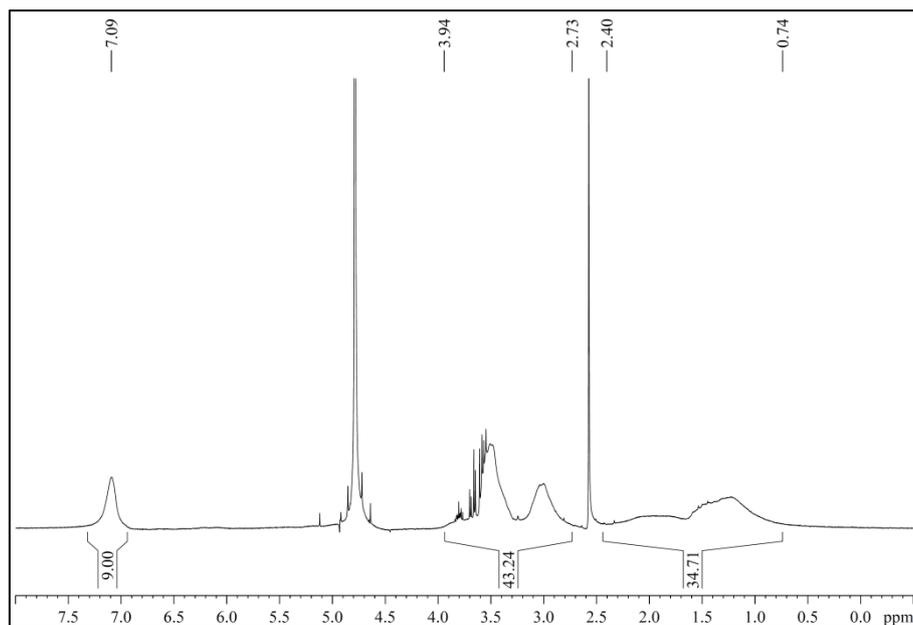


Abb.5.4.77:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPGKW11.3.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 175\,000\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 94\,000\text{ g/mol}$ ; PDI = 1.9.

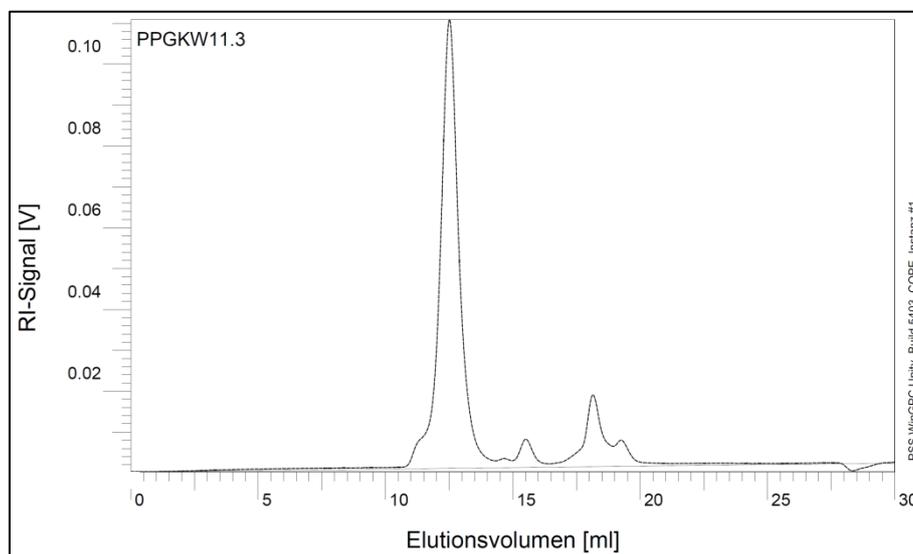
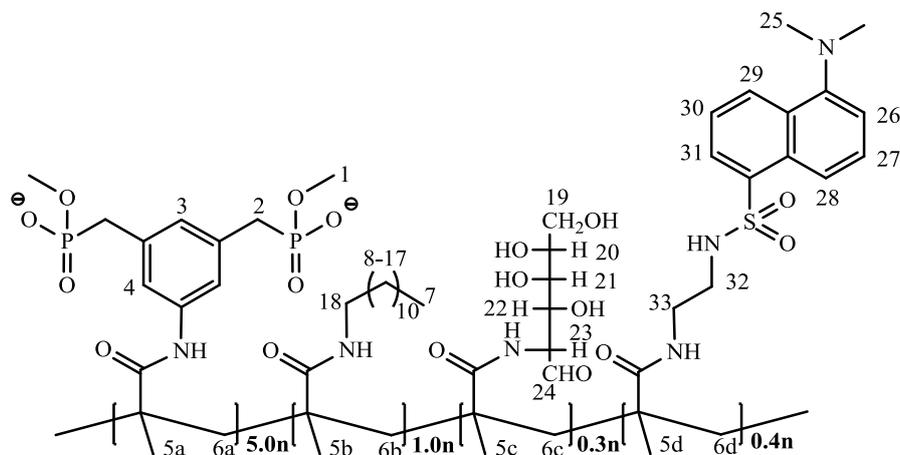


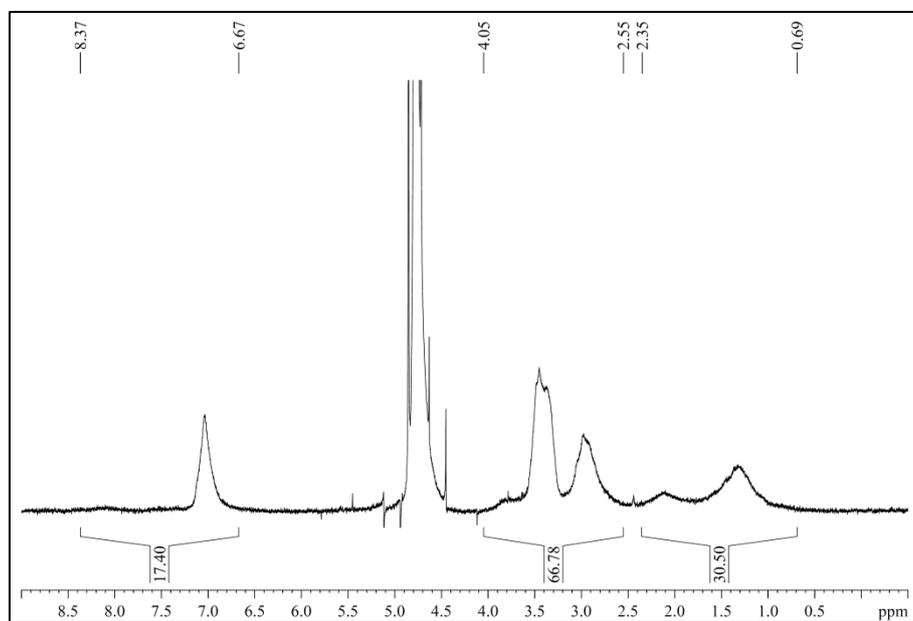
Abb.5.4.78: GPC-Chromatogramm von Polymer PPGKW11.3.

## PPGKW12.2:



**Ausbeute:** 41.2 mg (45 %).

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.69-2.35** (m, 30.6H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), **2.55-4.05** (m, 66.9H, H-1, H-2, H-18, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-25, H-32, H-33), **6.67-8.37** (m, 17.4H, H-3, H-4, H-26, H-27, H-28, H-29, H-30, H-31).



**Abb.5.4.79:**  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PPGKW12.2.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_{w1} = 3\,809\,000$  g/mol,  $\bar{M}_{n1} = 3\,247\,000$  g/mol;  $PDI_1 = 1.2$ .

$\bar{M}_{w1} = 190\,000$  g/mol,  $\bar{M}_{n2} = 103\,000$  g/mol;  $PDI_2 = 1.8$ .

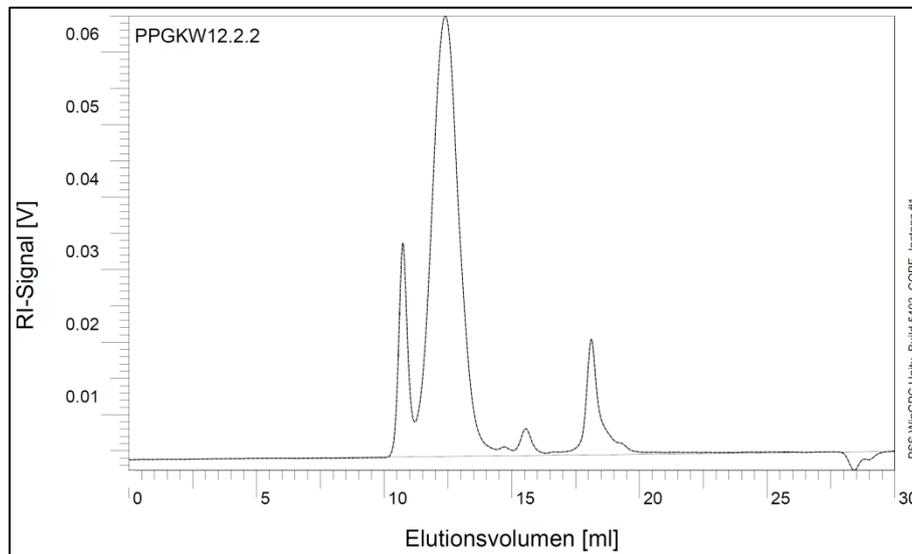
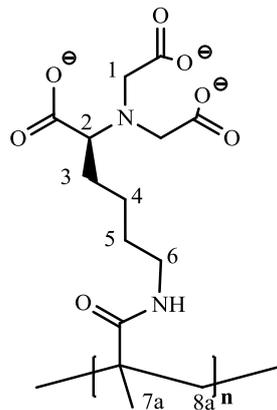


Abb.5.4.80: GPC-Chromatogramm von Polymer PGKW12.2.

PIS1:<sup>[141]</sup>



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.60-2.01** (m, 11H, H-3, H-4, H-5, H-7, H-8), **2.71-3.86** (m, 7H, H-1, H-2, H-6).

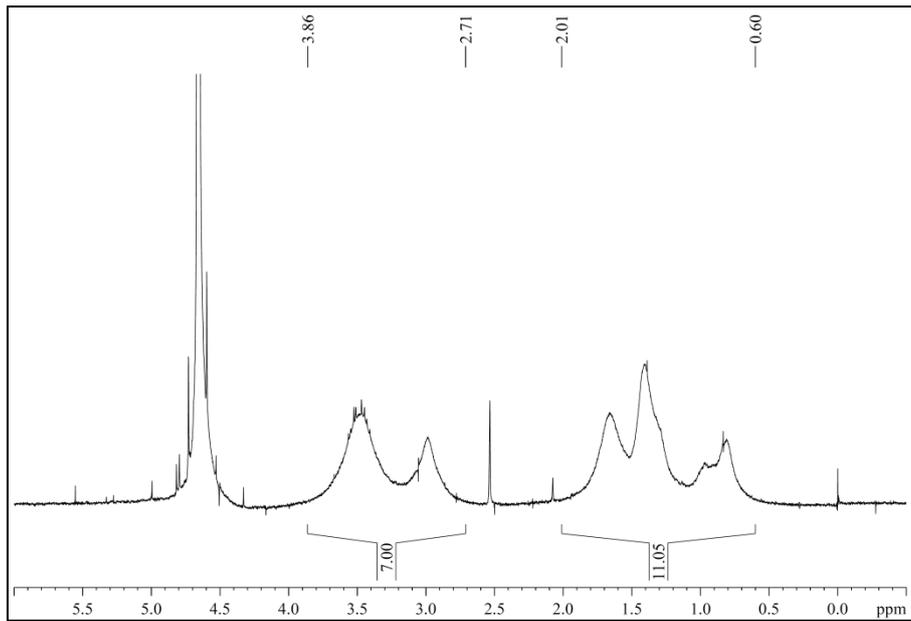


Abb.5.4.81:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PIS1.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 202\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 112\,000$  g/mol; PDI = 1.8.

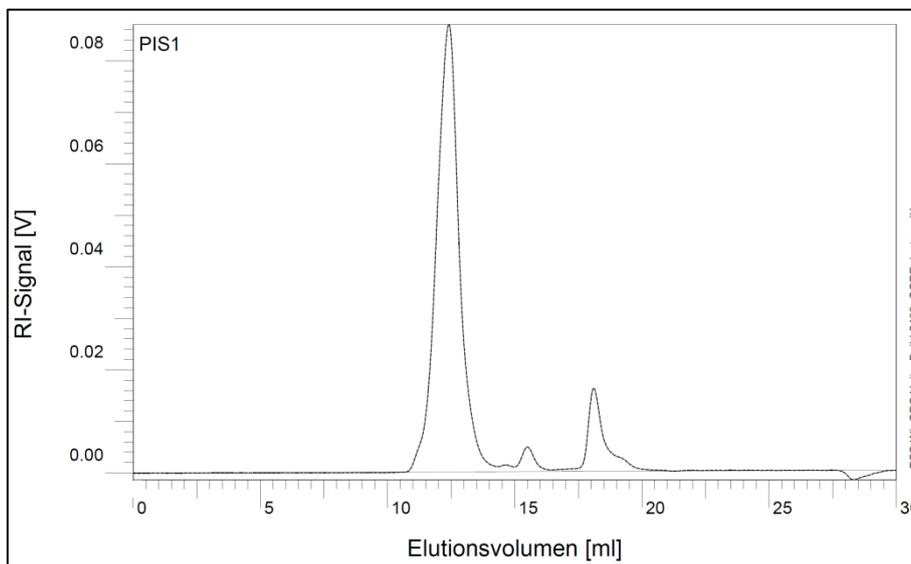
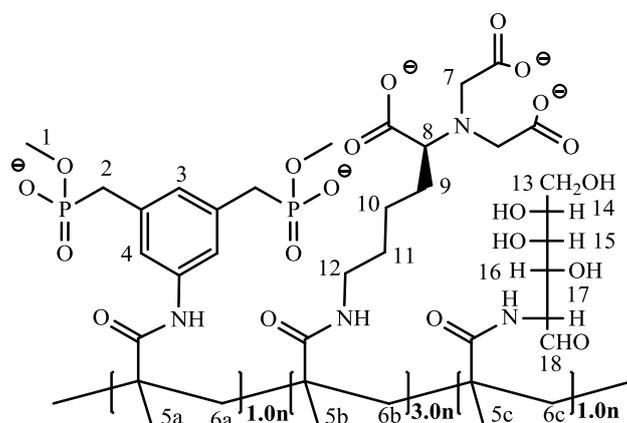


Abb.5.4.82: GPC-Chromatogramm von Polymer IS1.

PIS2:<sup>[141]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = **0.60-2.10** (m, 61H, H-5, H-6, H-9, H-10, H-11), **2.66-3.98** (m, 46H, H-1, H-2, H-7, H-8, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), **6.97** (sb, 3H, H-3, H-4).

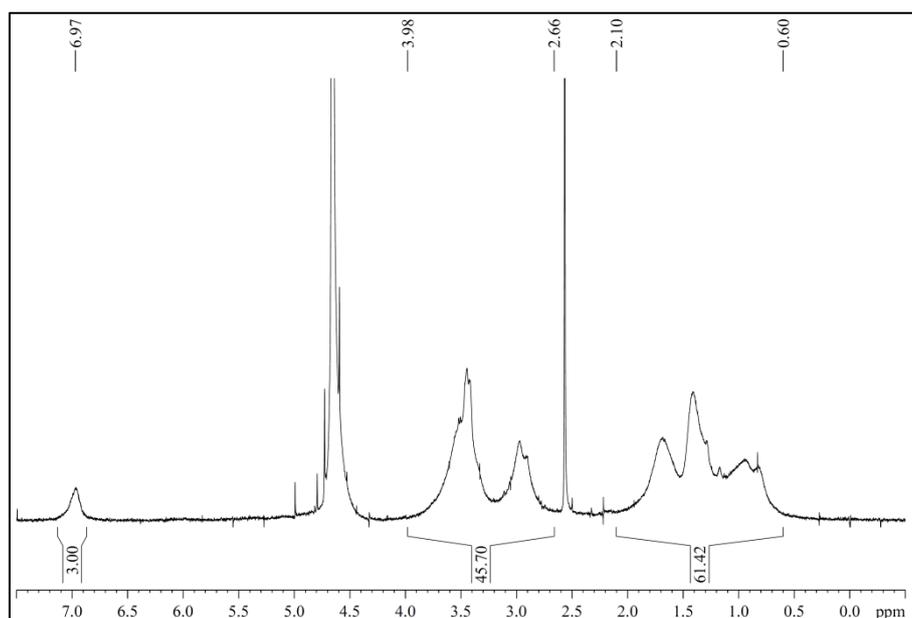


Abb.5.4.83: <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) von PIS2.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 107\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 83\,000$  g/mol; PDI = 1.2.

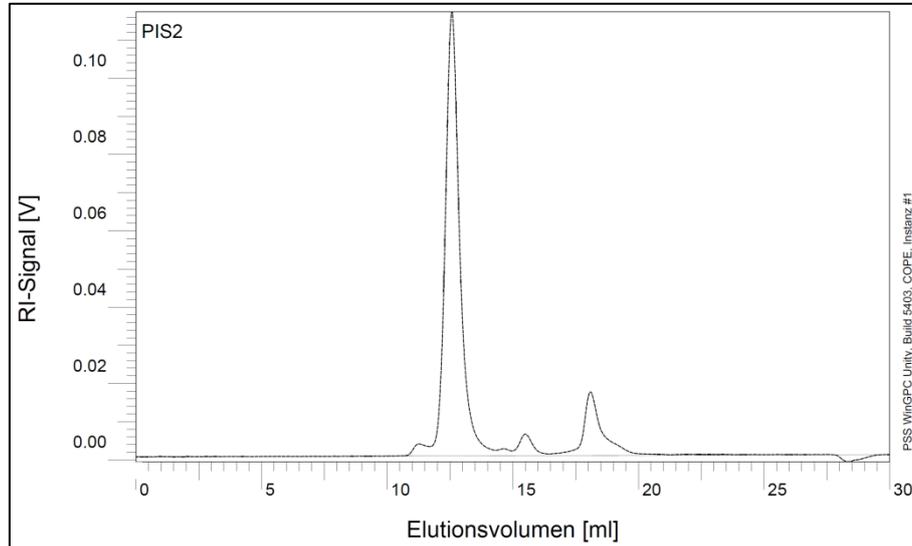
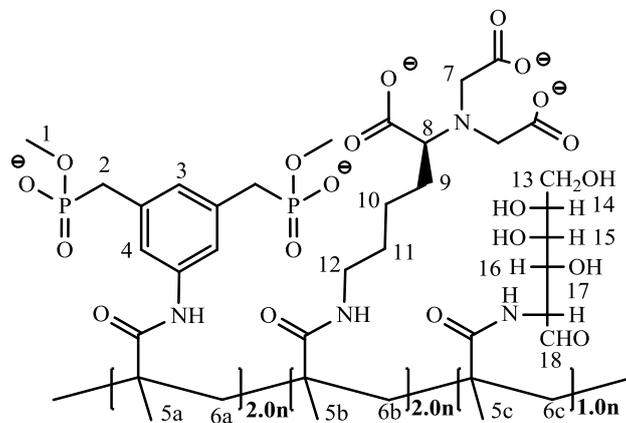


Abb.5.4.84: GPC-Chromatogramm von Polymer IS2.

PIS3:<sup>[141]</sup>



$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.69-2.30** (m, 36H, H-5, H-6, H-9, H-10, H-11), **2.61-3.99** (m, 41H, H-1, H-2, H-7, H-8, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), **6.95** (sb, 6H, H-3, H-4).

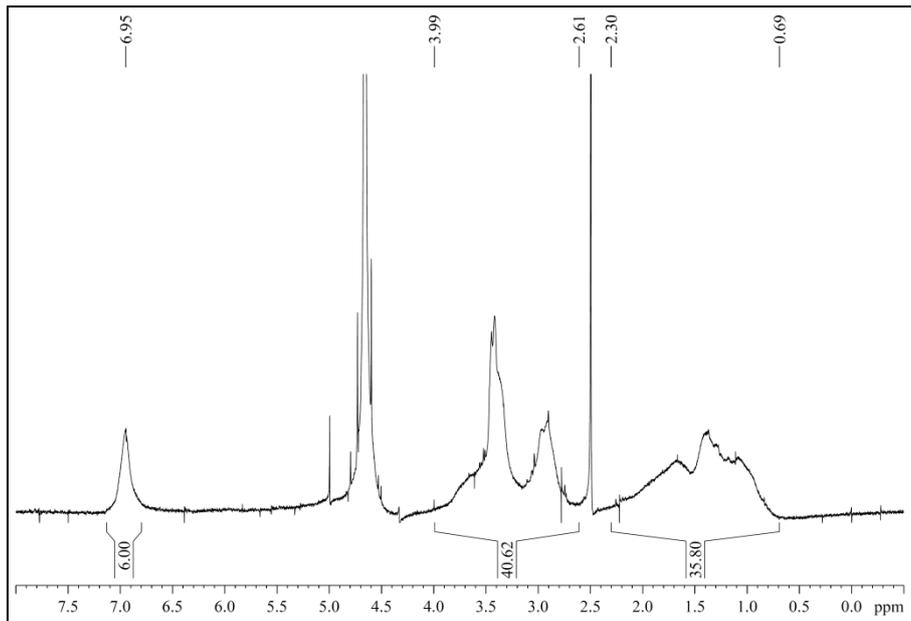


Abb.5.4.85:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PIS3.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 125\,000\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 92\,000\text{ g/mol}$ ; PDI = 1.4.

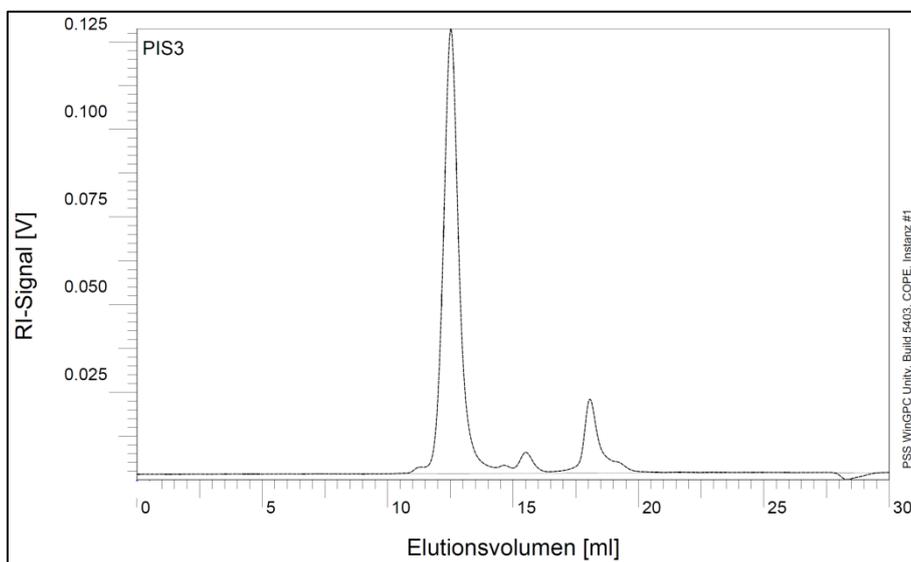
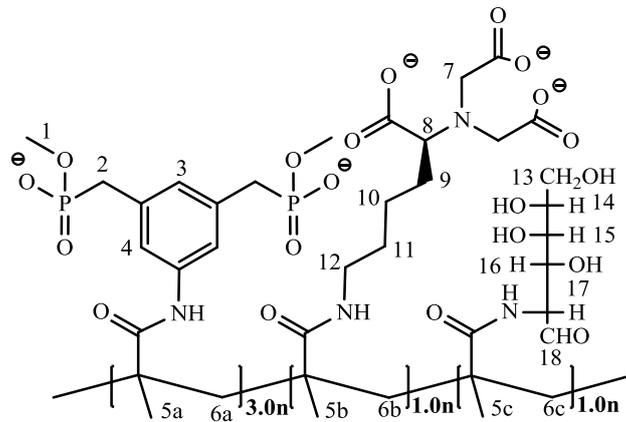


Abb.5.4.86: GPC-Chromatogramm von Polymer IS3.

PIS4:<sup>[141]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = **0.65-2.30** (m, 33H, H-5, H-6, H-9, H-10, H-11), **2.69-4.00** (m, 45H, H-1, H-2, H-7, H-8, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17), **7.07** (sb, 9H, H-3, H-4).

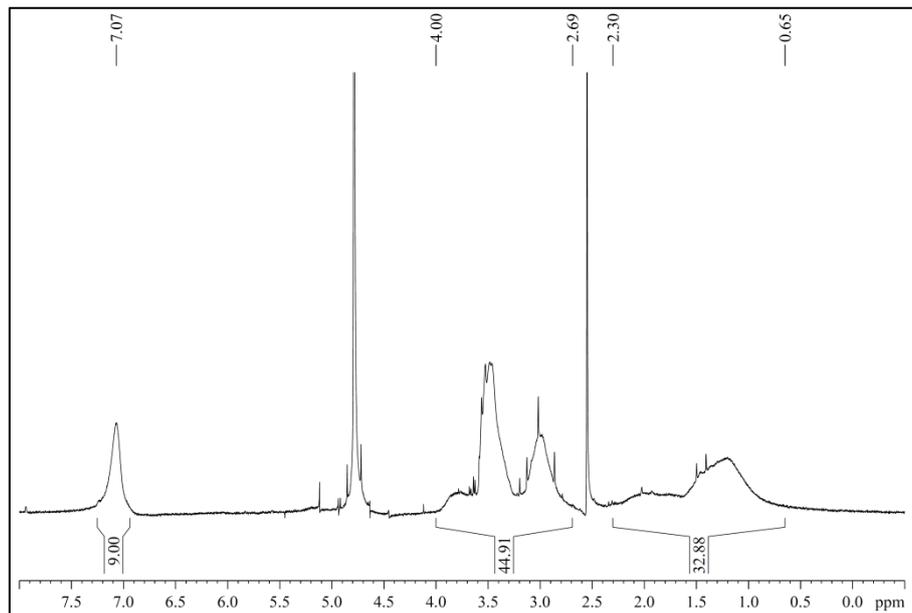


Abb.5.4.87: <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) von PIS4.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 156\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 104\,000$  g/mol; PDI = 1.5.

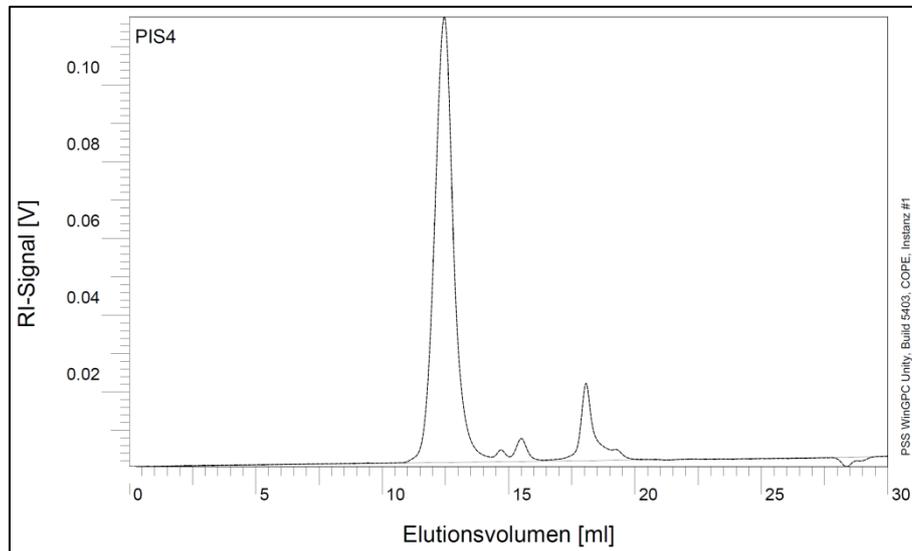
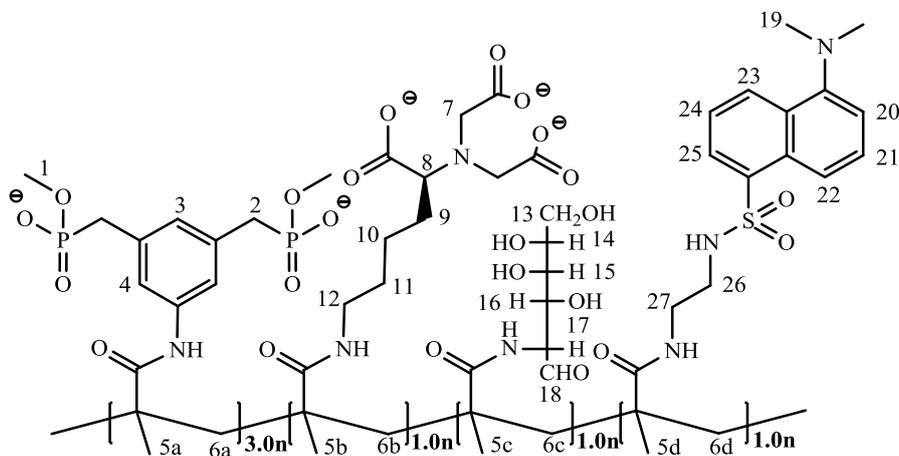


Abb.5.4.88: GPC-Chromatogramm von Polymer IS4.

PIS5:<sup>[141]</sup>



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = **0.56-2.13** (m, 30H, H-5, H-6, H-9, H-10, H-11), **2.58-3.98** (m, 47H, H-1, H-2, H-7, H-8, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-19, H-26, H-27), **6.62-8.35** (m, 15H, H-3, H-4, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25).

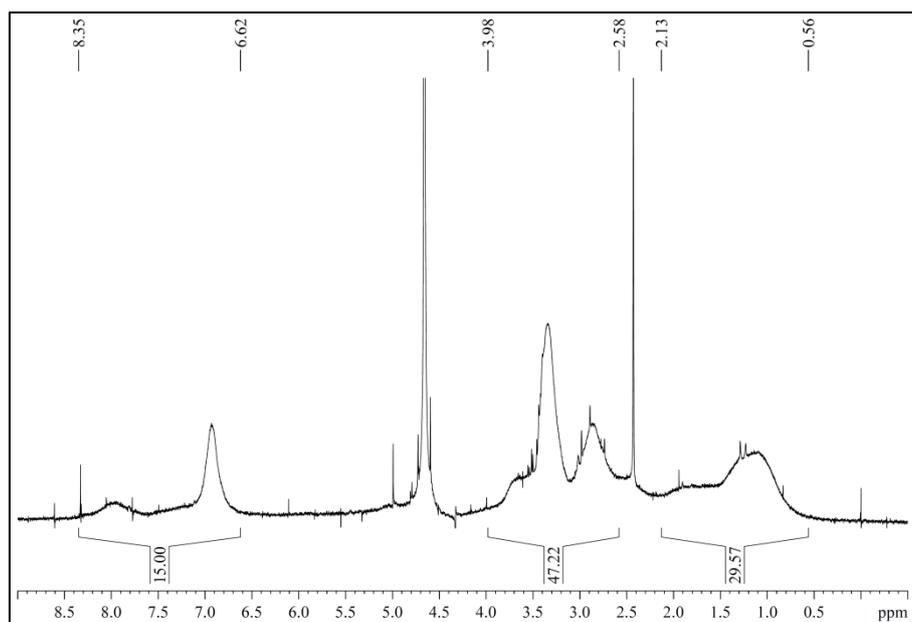


Abb.5.4.89:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PIS5.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 177\,000\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 119\,000\text{ g/mol}$ ; PDI = 1.5.

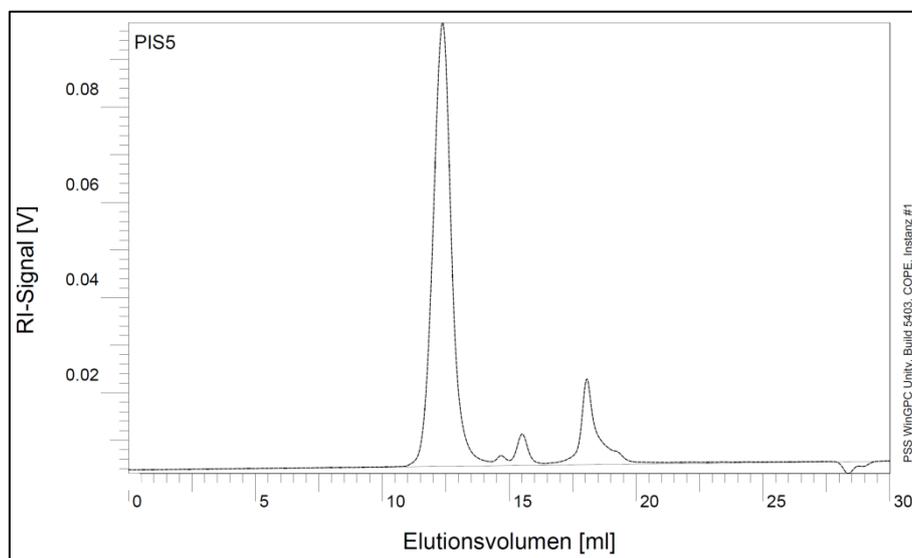
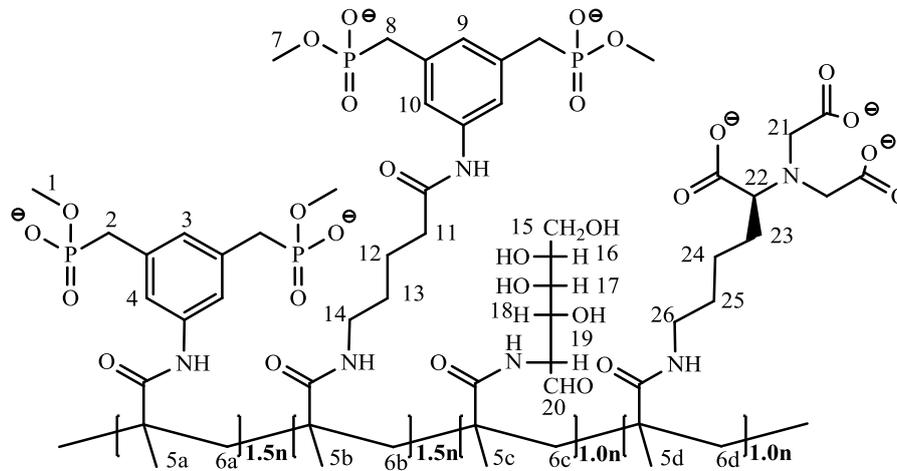


Abb.5.4.90: GPC-Chromatogramm von Polymer IS5.

PIS6:<sup>[141]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = **0.61-2.40** (m, 43H, H-5, H-6, H-11, H-12, H-13, H-23, H-24, H-25), **2.60-4.01** (m, 50H, H-1, H-2, H-7, H-8, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-21, H-22, H-26), **6.74-7.15** (m, 9H, H-3, H-4, H-9, H-10).

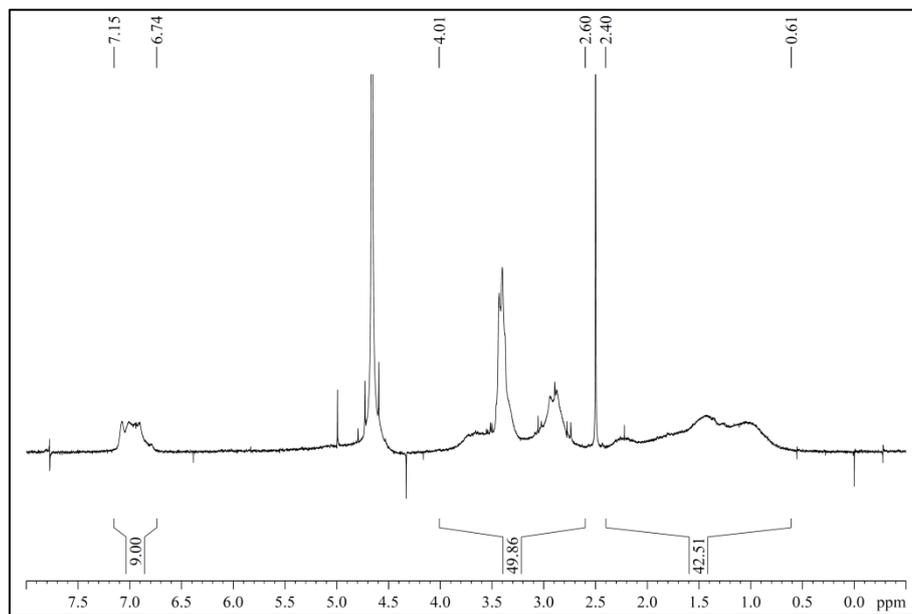


Abb.5.4.91: <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) von PIS6.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 148\ 000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 104\ 000$  g/mol; PDI = 1.4.

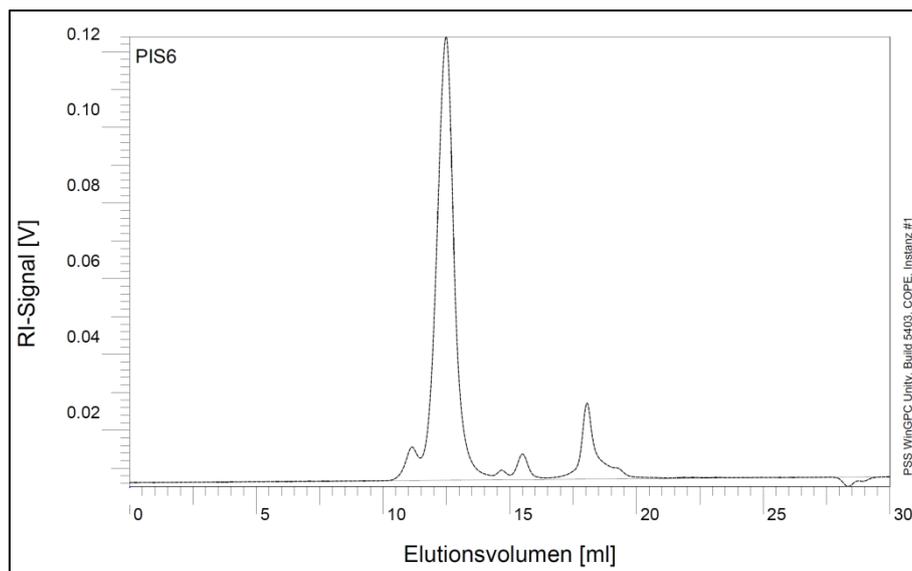
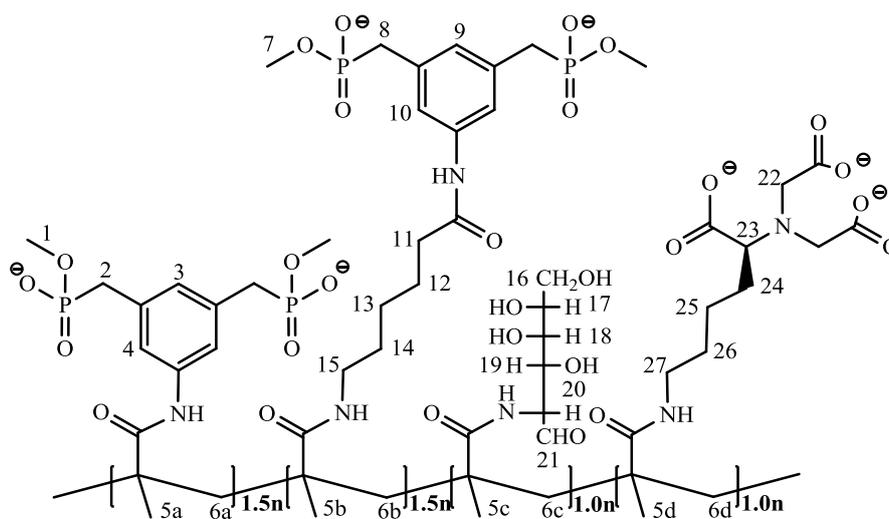


Abb.5.4.92: GPC-Chromatogramm von Polymer IS6.

PIS7:<sup>[14]</sup>



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = **0.56-2.36** (m, 41H, H-5, H-6, H-11, H-12, H-13, H-14, H-24, H-25, H-26), **2.57-4.01** (m, 45H, H-1, H-2, H-7, H-8, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-22, H-23, H-27), **6.75-7.22** (m, 9H, H-3, H-4, H-9, H-10).

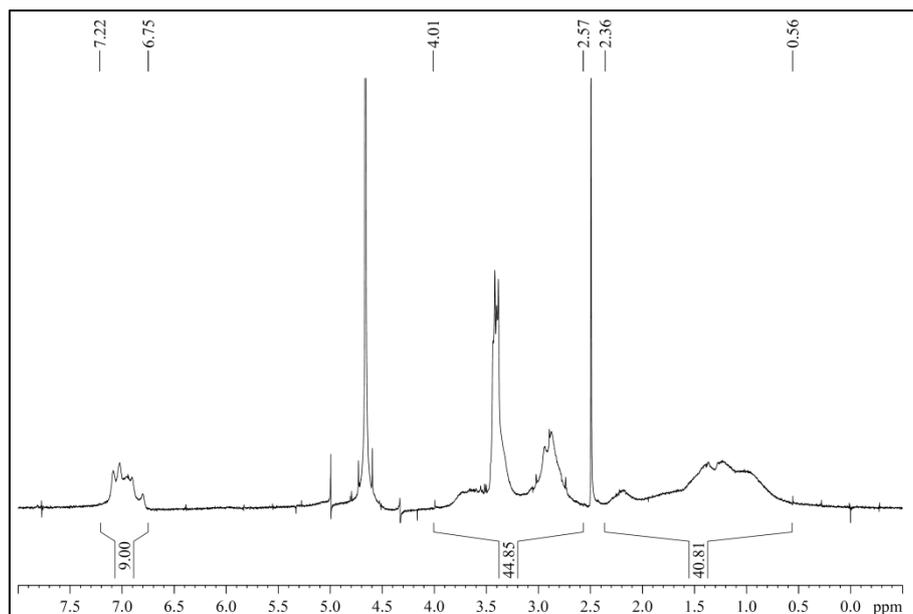


Abb.5.4.93:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PIS7.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 166\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 118\,000$  g/mol; PDI = 1.4.

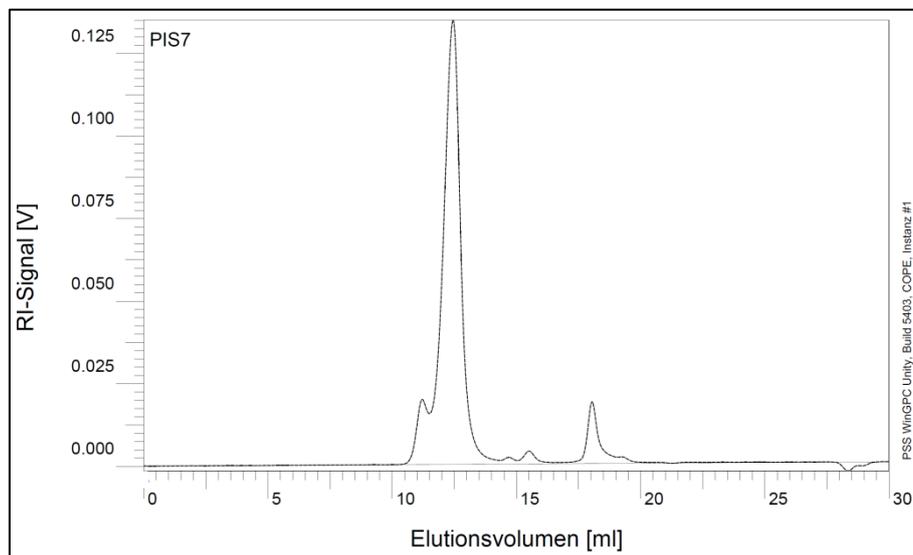
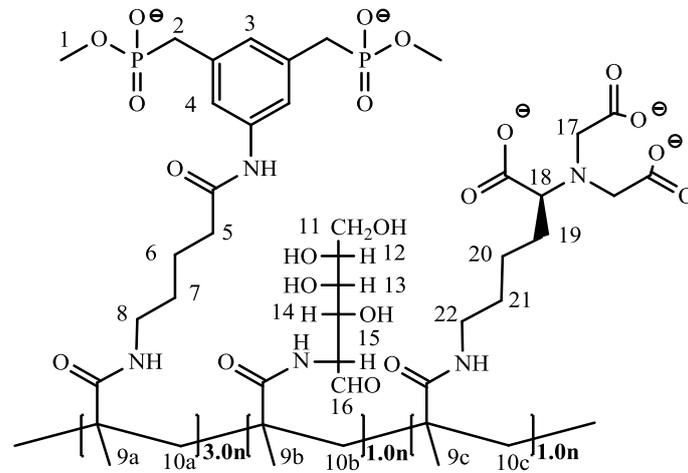


Abb.5.4.94: GPC-Chromatogramm von Polymer IS7.

PIS8:<sup>[141]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = **0.54-2.42** (m, 56H, H-5, H-6, H-7, H-9, H-10, H-19, H-20, H-21), **2.58-4.00** (m, 52H, H-1, H-2, H-8, H-11, H-12, H-13, H-14, H-15, H-17, H-18, H-22), **6.85** (sb, 3H, H-3), **7.05** (sb, 6H, H-4).

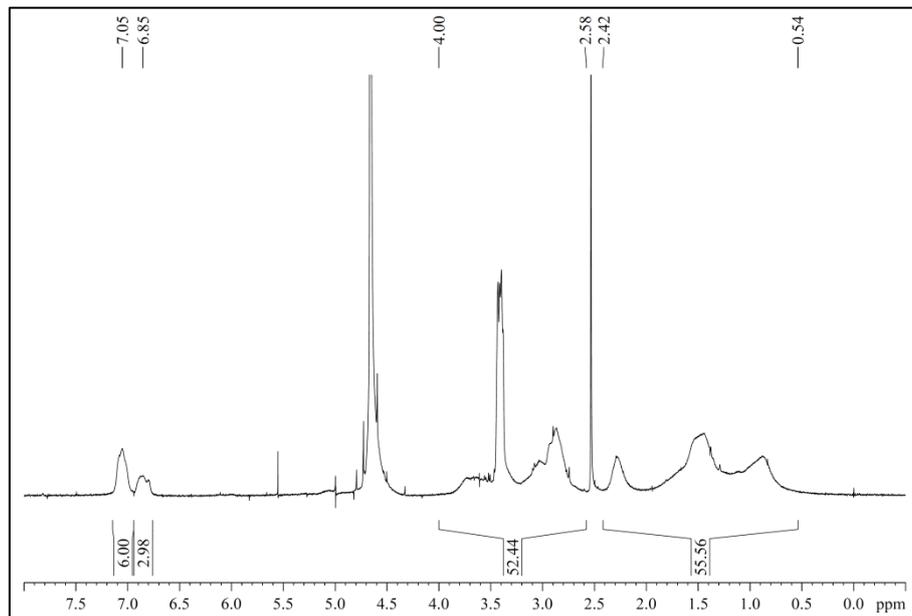


Abb.5.4.95: <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) von PIS8.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 127\,000$  g/mol,  $\bar{M}_n = 95\,000$  g/mol; PDI = 1.3.

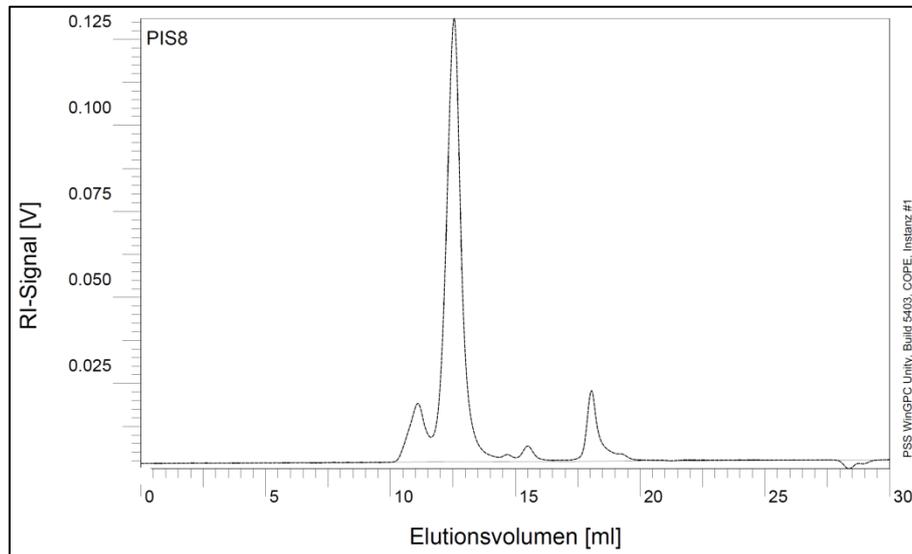
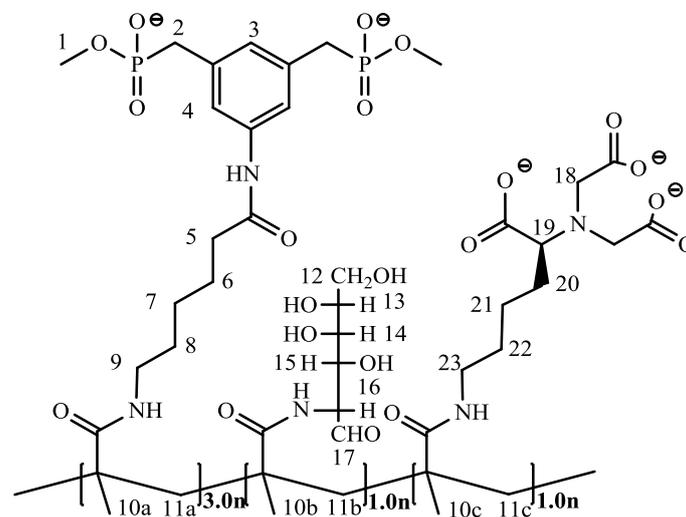


Abb.5.4.96: GPC-Chromatogramm von Polymer IS8.

PIS9:<sup>[141]</sup>



<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  [ppm] = **0.64-2.51** (m, 58H, H-5, H-6, H-7, H-8, H-10, H-11, H-20, H-21, H-22), **2.73-4.02** (m, 53H, H-1, H-2, H-9, H-12, H-13, H-14, H-15, H-16, H-18, H-19, H-23), **6.88-7.05** (m, 3H, H-3), **7.17** (sb, 6H, H-4).

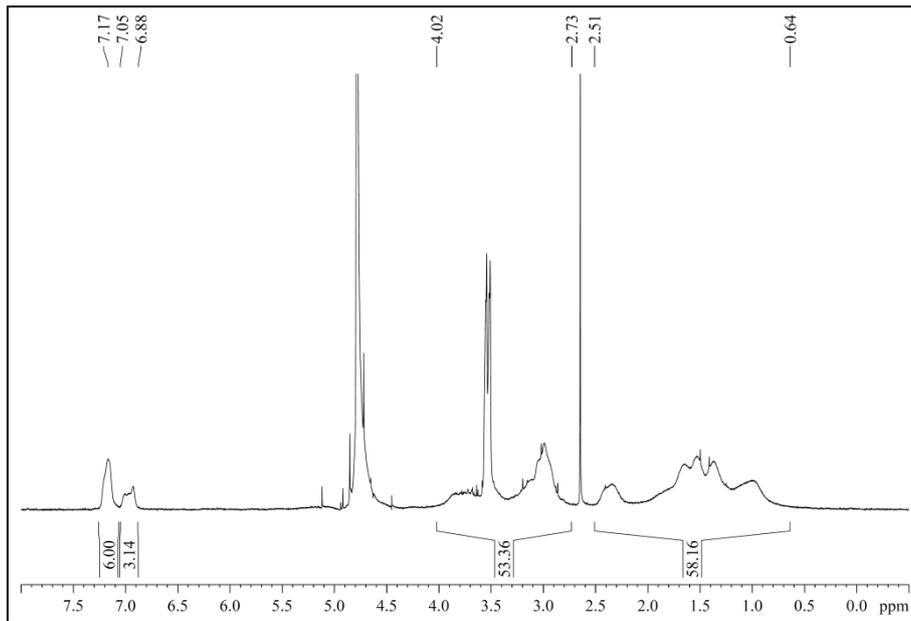


Abb.5.4.97:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PIS9.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_w = 167\,000\text{ g/mol}$ ,  $\bar{M}_n = 113\,000\text{ g/mol}$ ; PDI = 1.5.

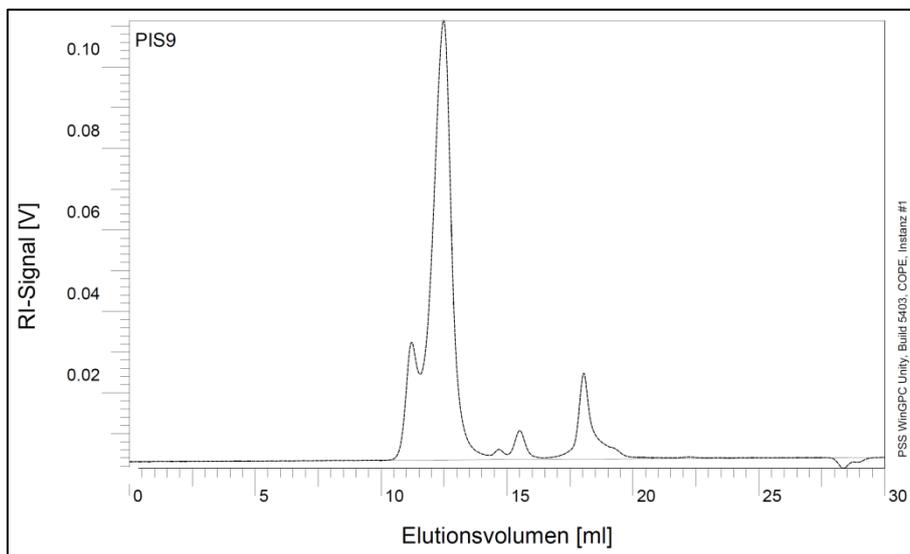
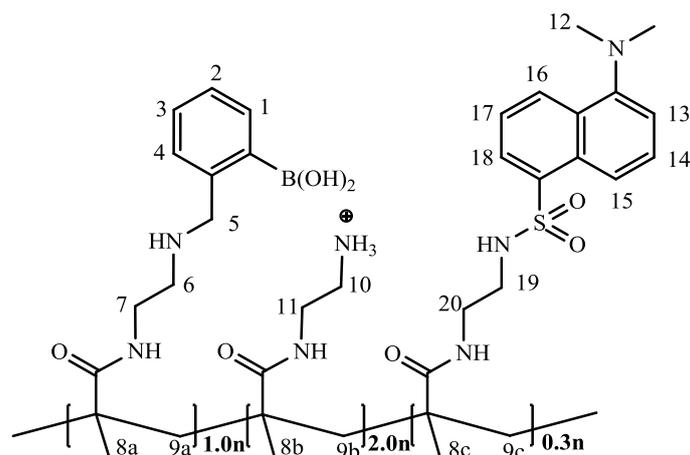


Abb.5.4.98: GPC-Chromatogramm von Polymer IS9.

### 5.4.2 Darstellung von PPGSUN2



Einsatz:

Ethyldiamin-Monomer ( <b>8</b> )	250 mg (1.52 mmol, 2.0 eq.),
Boronsäure-Monomer ( <b>13</b> )	200 mg (0.76 mmol, 1.0 eq.),
Dansyl-Monomer ( <b>4</b> )	84 mg (0.23 mmol, 0.3 eq.),
AIBN	25 mg (0.15 mmol, 5 mol %).

#### Durchführung:

In einem Stickstoffkolben wurden die verwendeten Monomere in 5 mL eines Lösungsmittelgemisches (VE-Wasser/DMF; 1:1) gelöst und nach dem „freeze-and-exhaust-Verfahren“ entgast. Unter Argon-Atmosphäre und stetigem Rühren wurden 5 mol % AIBN in die Monomer-Lösung eingetragen. Diese wurde anschließend auf 70 °C erwärmt und bei dieser Temperatur 7 Tage unter Schutzgas-Atmosphäre gerührt.

Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mittels Kondensation bei 60 °C vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Feststoff wurde in 15 mL Methanol aufgenommen und in 150 mL eisgekühltem Essigester getropft. Nach vollständiger Fällung, wurde das Polymer filtriert und mehrmals mit wenig eisgekühltem Essigester gewaschen. Nach Trocknung des Filtrerrückstandes wurde ein beigefarbender Feststoff erhalten.

Ausbeute: 353 mg (66 %).

Umsatzgrad: 95 - 96 % bezogen auf das Ethyldiamin-Monomer **8**.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = **0.60-2.17** (m, 18.3H, H-8, H-9), **2.48-3.76** (m, 23.4H, H-6, H-7, H-10, H-11, H-12, H-19, H-20), **6.69-8.58** (m, 5.8H, H-1, H-2, H-3, H-4, H-13, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18).

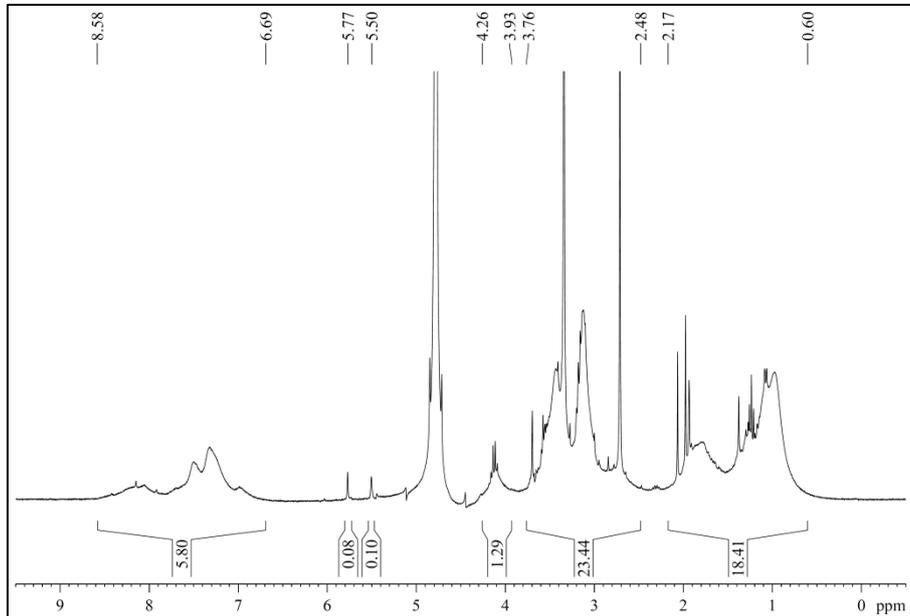


Abb.5.4.99:  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) von PGSUN2.

### Gelpermeationschromatographie (Pullulan-Standard):

$\bar{M}_{w1} = 90\,000$  g/mol,  $\bar{M}_{n1} = 67\,000$  g/mol; PDI = 1.3;

$\bar{M}_{w2} = 9\,000$  g/mol,  $\bar{M}_{n2} = 7\,000$  g/mol; PDI = 1.3.

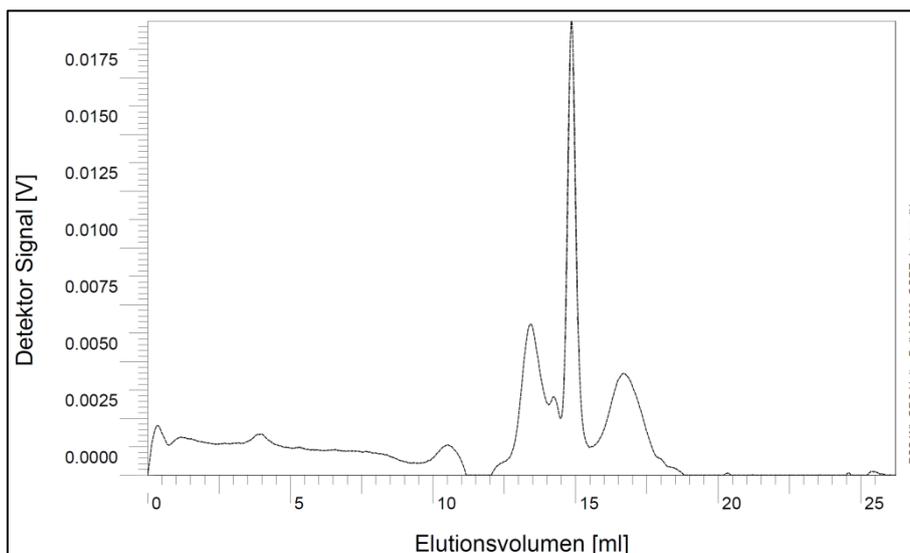


Abb.5.4.100: GPC-Chromatogramm von Polymer PGSUN2.

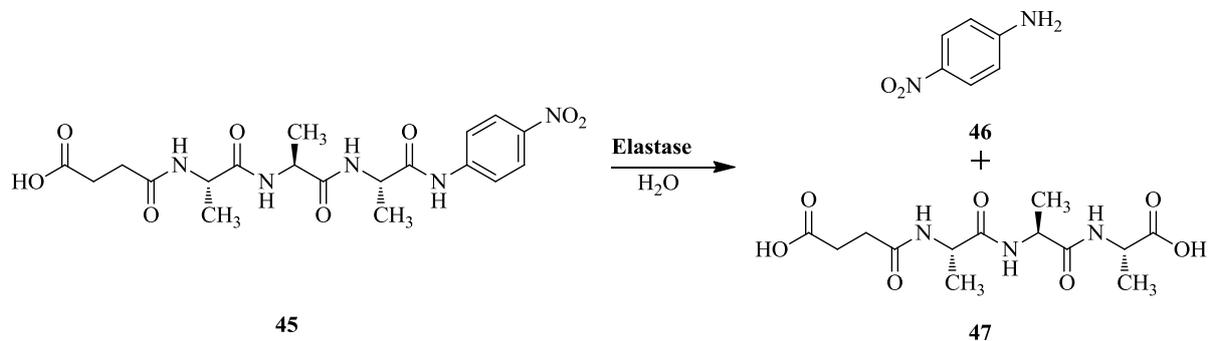
## 5.5 Durchgeführte Enzym-Assays

Die eingesetzten Substrat- und Enzym-Lösungen wurden an jedem Messtag frisch angesetzt und während der Messungen unter Eiskühlung verwahrt. Die Massenkonzentration der Polymer-Stammlösungen betrug, wenn nicht anders angegeben, 20 mg/mL, wobei bidest. Wasser als Lösungsmittel fungierte. Durchgeführt wurden die Messungen in 96-well Mikrotiterplatten. Bei jedem Enzym-Assay wurde jeweils ein Absorptionsspektrum von Substrat, Enzym und Chromophor aufgenommen. Dies diente zum einen um das Absorptionsmaxima des freigesetzten Chromophors zu bestimmen, zum anderen um zu überprüfen ob, weder das Enzym noch das Substrat eine Eigenabsorption bei der zu messenden Wellenlänge besaß.

Zusätzlich wurde zur Bestätigung der Messmethode, ein literaturbekannter Hemmstoff für das jeweilige Enzym getestet und sofern möglich der  $IC_{50}$ -Wert des Inhibitors bestimmt. Die Wirksamkeit der Polymere wurde in Form eines Screenings ermittelt, dabei fungierten bei jeder Messreihe mindestens zwei Kontrollansätze als Vergleich. Zusätzlich wurde jedes NTA-Baustein-haltige Polymer mit 50 %  $Ni^{2+}$ -Ionen, bezogen auf die Stoffmenge im Polymer vermessen. Nachdem einem Polymer eine positive Wirksamkeit gegenüber einem Enzym zugeordnet werden konnte, erfolgte die Aufnahme eines  $IC_{50}$ -Wertes. Bei diesem Vorgang wurden zehn verschiedene Polymerkonzentrationen verwendet. Die Enzymhemmung in Abhängigkeit der Inhibitorkonzentration erfolgte über eine 3- bzw. 2-fach Bestimmung.

### 5.5.1 Elastase Assay

Bei dem durchgeführten Assay fungierte Suc-(Ala)<sub>3</sub>-pNA als künstliches Substrat **45**.<sup>[165]</sup>



**Abb. 5.5.1:** Hydrolytische Spaltung von Suc-(Ala)<sub>3</sub>-pNA **45** unter Freisetzung von *p*-Nitroanilin **46**.<sup>[165]</sup>

#### Verwendete Lösungen:

Elastase Puffer: 100 mM TRIZMA-Base, pH = 8.0.

Elastase-Lösung: 100 µg Elastase (23.9 U / mg) wurden in 1.0 mL Elastase-Puffer gelöst.

Substrat-Lösung: 350 µg Suc-(Ala)<sub>3</sub>-pNA wurden in 1 mL Elastase- Puffer gelöst.

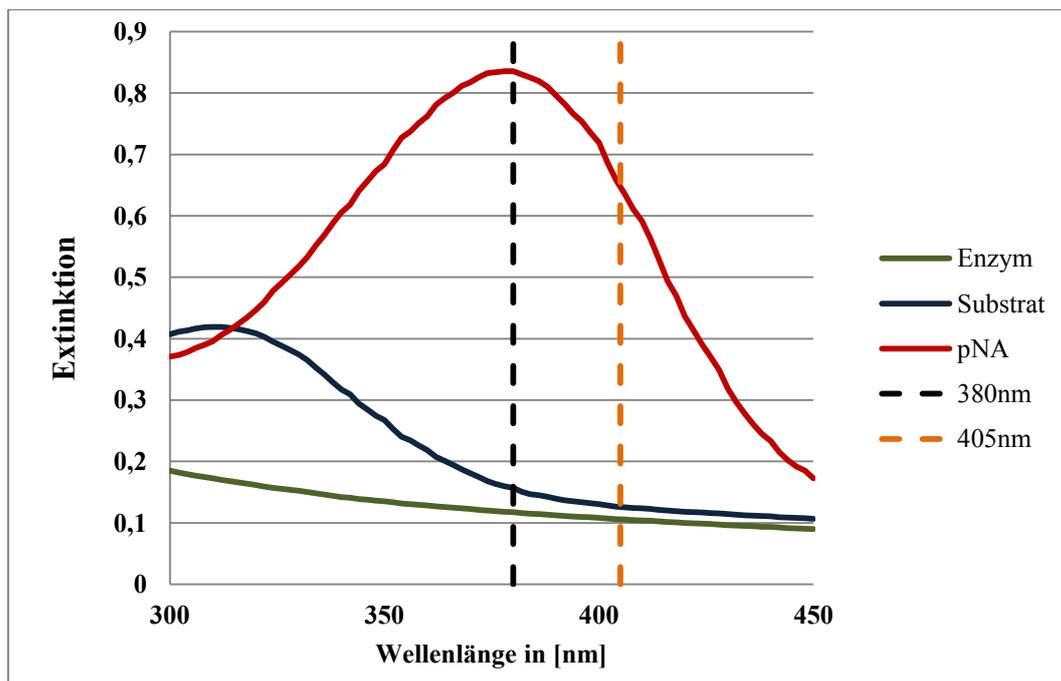
#### Durchführung:

10 µL Enzym-Lösung wurden mit 10 µL Polymer-Stammlösung versetzt und für 30 min inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von 60 µL Puffer sowie 20 µL Substrat-Lösung. Das Reaktionsgemisch wurde daraufhin sofort vermessen.

Vor der Messung wurde die 96-well Mikrotiterplatte 10 s lang geschüttelt. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Temperatur von 25 °C und bei einer Wellenlänge von 380 nm. Nach 30 s erfolgte die Aufnahme des Messwertes. Bei einer Gesamtmesszeit von 30 min. Vor jeder Messwertaufnahme wurde die Mikrotitrierplatte 2 s geschüttelt.

**Tab. 5.5.1:** Tabellarische Zusammenfassung des Elastase Assays.

Verwendete Lösungen	Volumen	Konzentration	Konzentration im Assay
Enzym	10 $\mu\text{L}$	$4.0 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$	$4.0 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$
Polymer bzw. Wasser	10 $\mu\text{L}$	20.0 mg/mL	2.0 mg/mL
30 min Inkubation bei 25 °C			
Puffer	60 $\mu\text{L}$	-	-
Substrat	20 $\mu\text{L}$	$7.9 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$	$1.6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$
Gesamtvolumen	100 $\mu\text{L}$		

Absorptionsspektrum:**Abb. 5.5.2:** Absorptionsübersicht des Enzyms, Substrats und Chromophors im Elastase Assay.

### Inhibitionstest mit literaturbekanntem Hemmstoff:

Die Kontrollmessung wurde mit Diisopropylfluorophosphat (DIFP) durchgeführt.

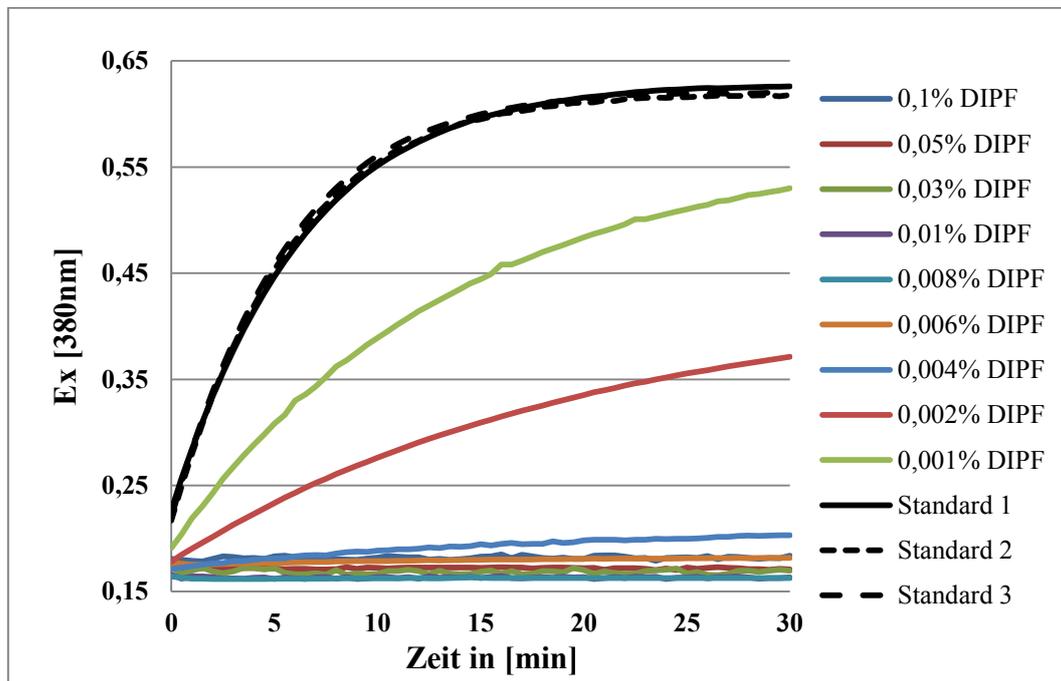


Abb. 5.5.3: Elastase Inhibitionstest mit 0,1 - 0,001 %iger DIFP-Lösung.

### Screening der Polymere:

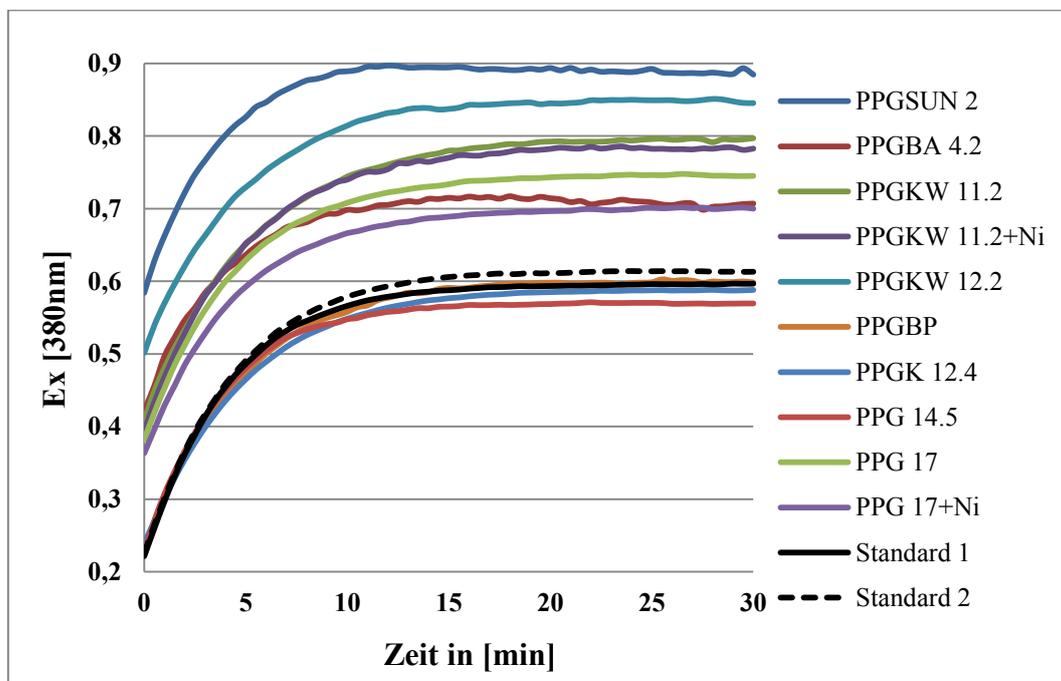
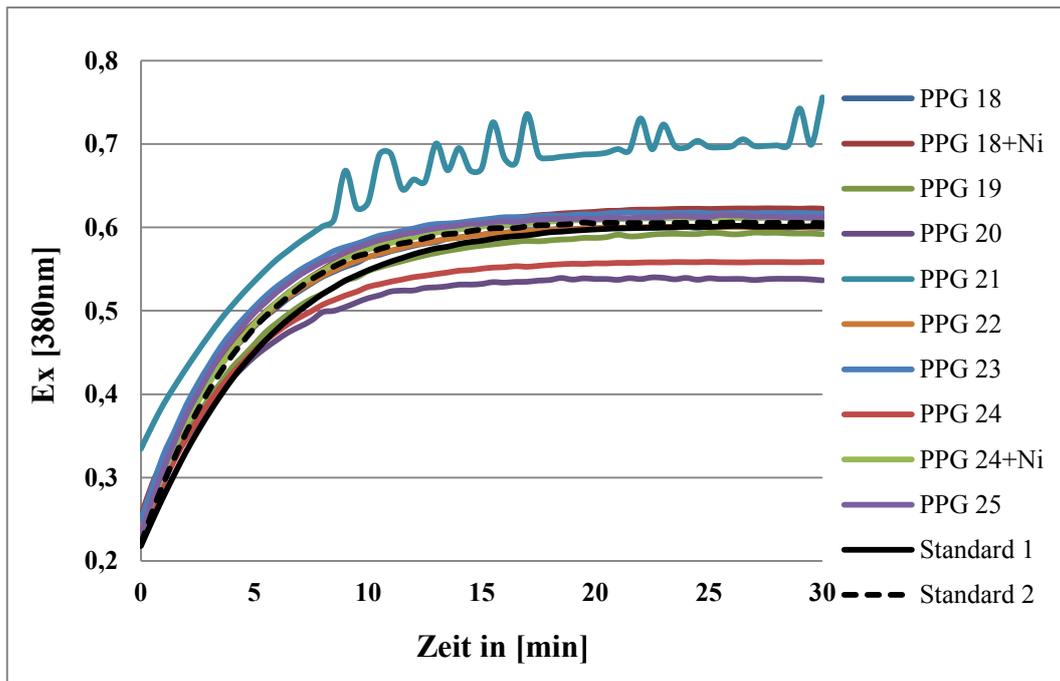
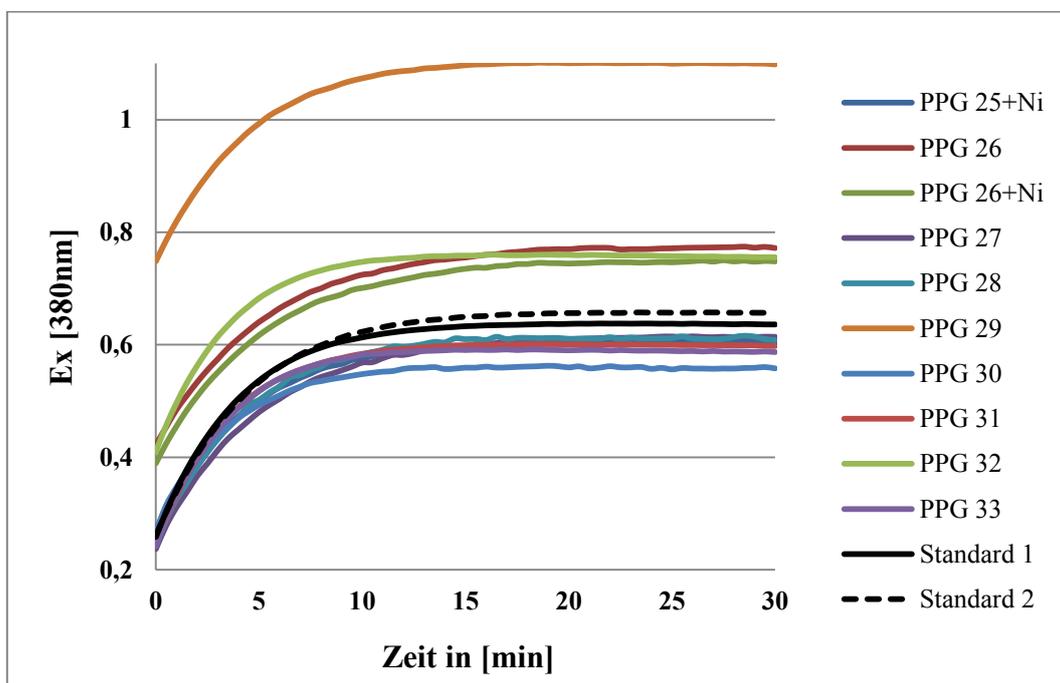


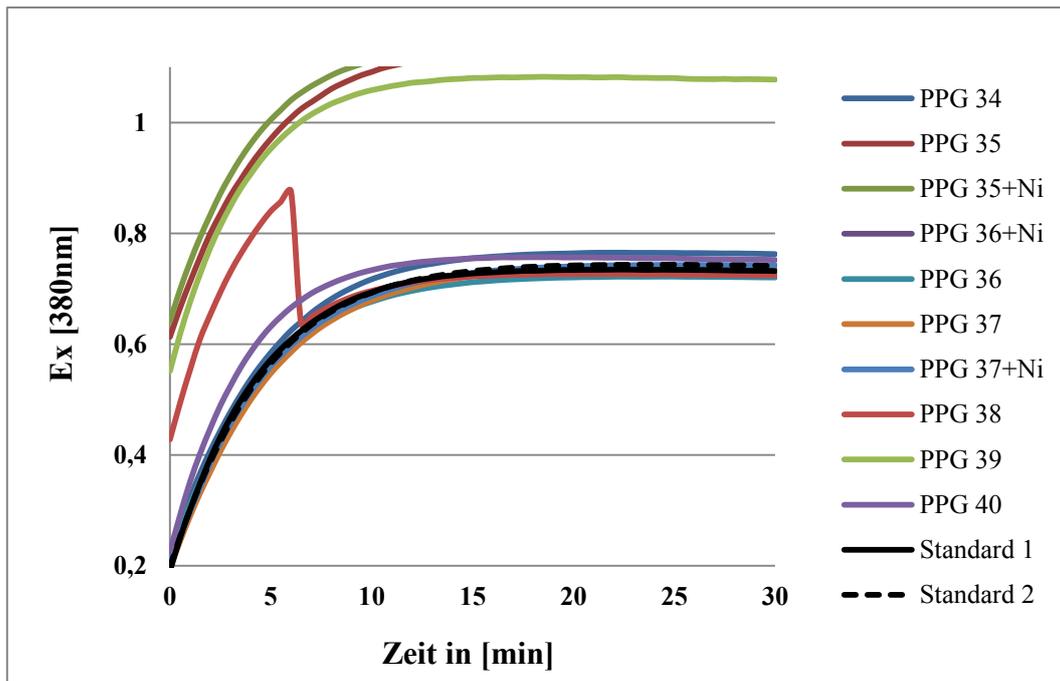
Abb. 5.5.4: Screening der 1. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Elastase zugeordnet werden.



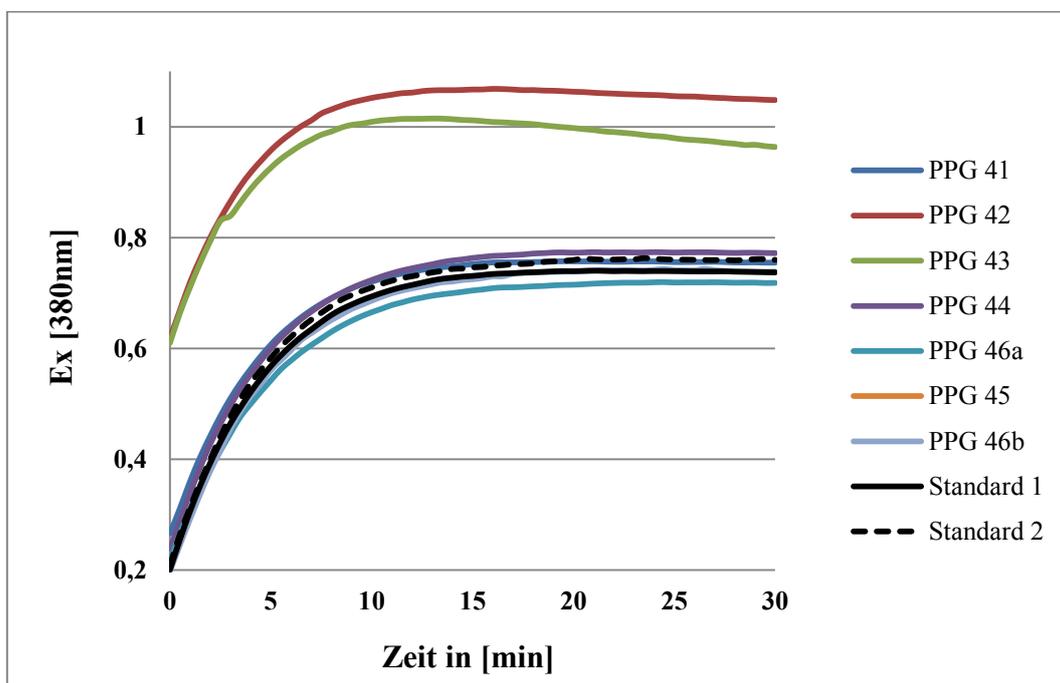
**Abb. 5.5.5:** Screening der 2. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Elastase zugeordnet werden.



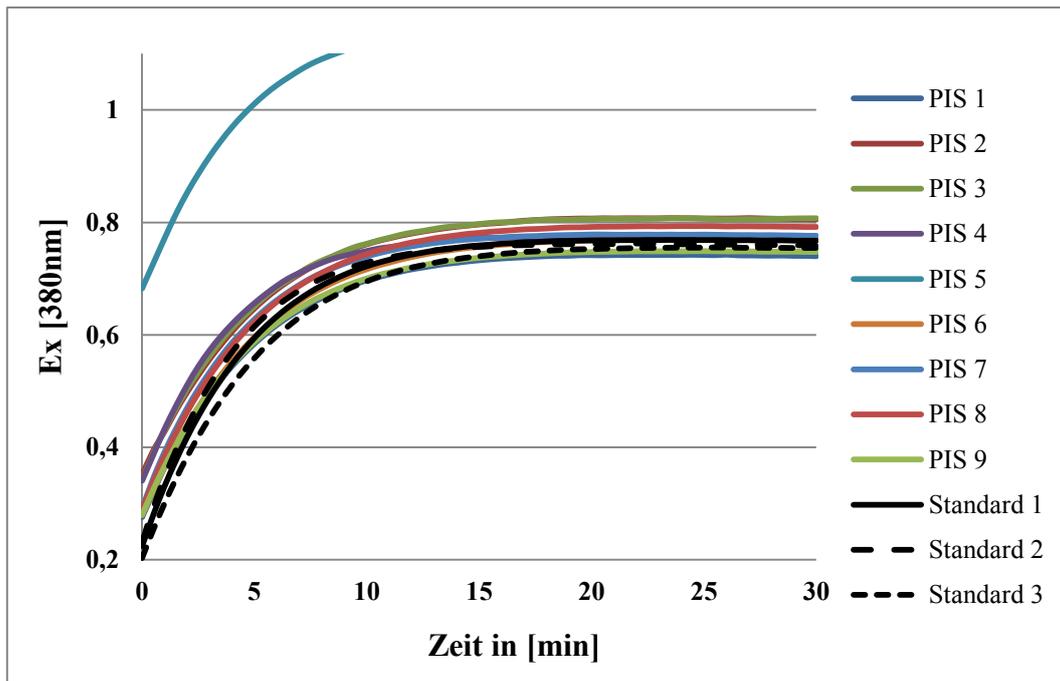
**Abb. 5.5.6:** Screening der 3. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Elastase zugeordnet werden.



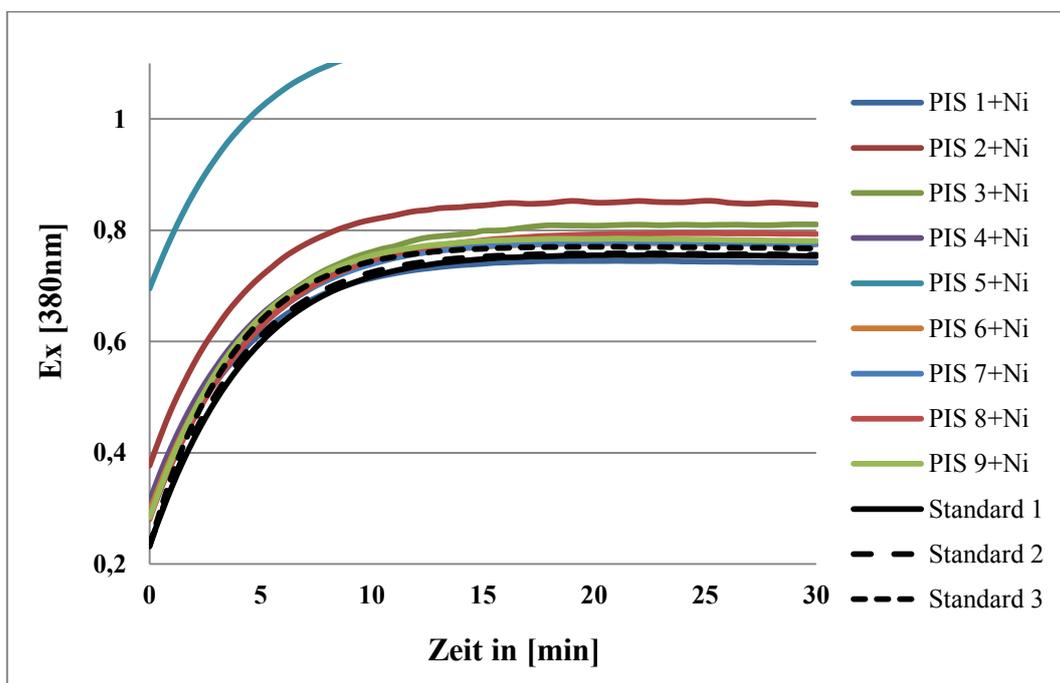
**Abb. 5.5.7:** Screening der 4. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Elastase zugeordnet werden.



**Abb. 5.5.8:** Screening der 5. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Elastase zugeordnet werden.



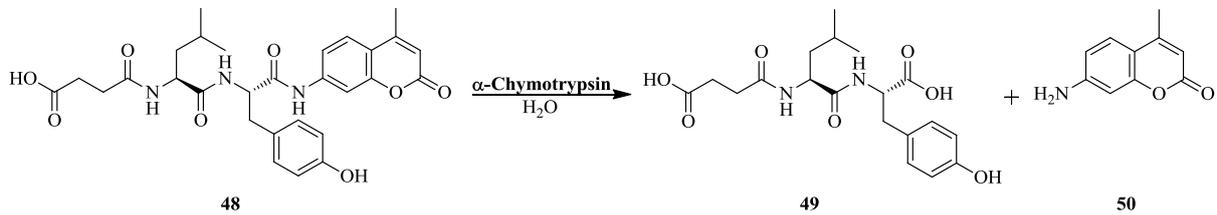
**Abb. 5.5.9:** Screening der 6. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Elastase zugeordnet werden.<sup>[141]</sup>



**Abb. 5.5.10:** Screening der 7. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Elastase zugeordnet werden.<sup>[141]</sup>

### 5.5.2 $\alpha$ -Chymotrypsin Assay

Bei dem durchgeführten Assay fungierte Suc-Leu-Tyr-AMC als künstliches Substrat **48**.<sup>[217]</sup>



**Abb. 5.5.11:** Hydrolytische Spaltung von Suc-Leu-Tyr-AMC **48** unter Freisetzung AMC **50**.<sup>[169]</sup>

#### Verwendete Lösungen:

- $\alpha$ -Chymotrypsin-Puffer: 50 mM TRIZMA-Base, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH = 8.0.
- $\alpha$ -Chymotrypsin-Lösung: 250  $\mu$ g  $\alpha$ -Chymotrypsin ( $\geq 40$  U / mg) wurden in 1.0 mL  $\alpha$ -Chymotrypsin-Puffer gelöst.
- Substrat-Stock-Lösung: 275.8  $\mu$ g Suc-Leu-Tyr-AMC wurden in 1.0 mL DMSO gelöst.
- Substrat -Lösung: 25  $\mu$ L Substrat-Stock-Lösung, 475  $\mu$ L DMSO und 500  $\mu$ L  $\alpha$ -Chymotrypsin Puffer bilden die Substrat Lösung.

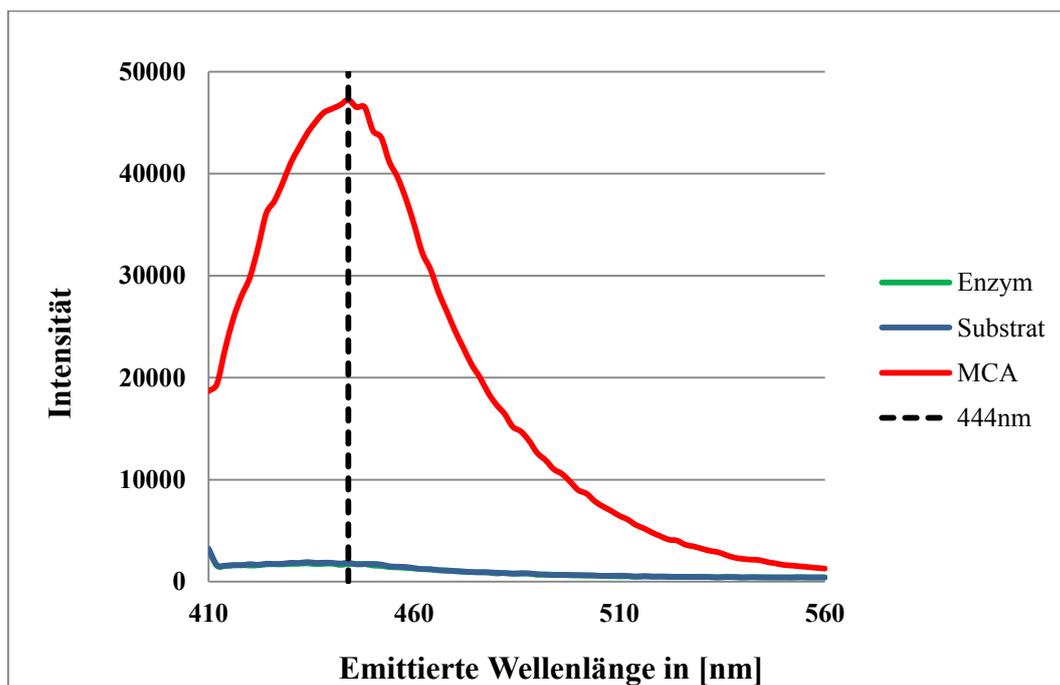
#### Durchführung:

10  $\mu$ L Enzym-Lösung wurden mit 10  $\mu$ L Polymer-Stammlösung versetzt. Anschließend folgte die Zugabe von 160  $\mu$ L Puffer, sowie 20  $\mu$ L Substrat-Lösung. Das Reaktionsgemisch wurde daraufhin sofort vermessen.

Vor der Messung wurde die „schwarze“ 96-well Mikrotiterplatte 60 s lang geschüttelt. Die Messung erfolgte bei einer Temperatur von 25 °C und bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm und einer Emissionswellenlänge von 444 nm. Nach 60 s erfolgte die Aufnahme des Messwertes. Bei einer Gesamtmesszeit von 30 min. Vor jeder Messwertaufnahme wurde die Mikrotiterplatte 20 s geschüttelt.

**Tab. 5.5.2:** Tabellarische Zusammenfassung des  $\alpha$ -Chymotrypsin Assays.

Verwendete Lösungen	Volumen	Konzentration	Konzentration im Assay
Enzym	10 $\mu$ L	$10^{-5}$ mol/L	$5.0 \cdot 10^{-7}$ mol/L
Polymer bzw. Wasser	10 $\mu$ L	20.0 mg/mL	1.0 mg/mL
Puffer	160 $\mu$ L		
keine Vorinkubation			
Substrat	20 $\mu$ L	$12.5 \cdot 10^{-6}$ mol/L	$12.5 \cdot 10^{-7}$ mol/L
Gesamtvolumen	200 $\mu$ L		

Absorptionsspektrum:**Abb. 5.5.12:** Übersichtsspektrum des Enzyms, Substrats und Fluorophors im  $\alpha$ -Chymotrypsin Assay.

### Inhibitionstest mit literaturbekannten Hemmstoff:

Die Kontrollmessung wurde mit Aprotinin durchgeführt.

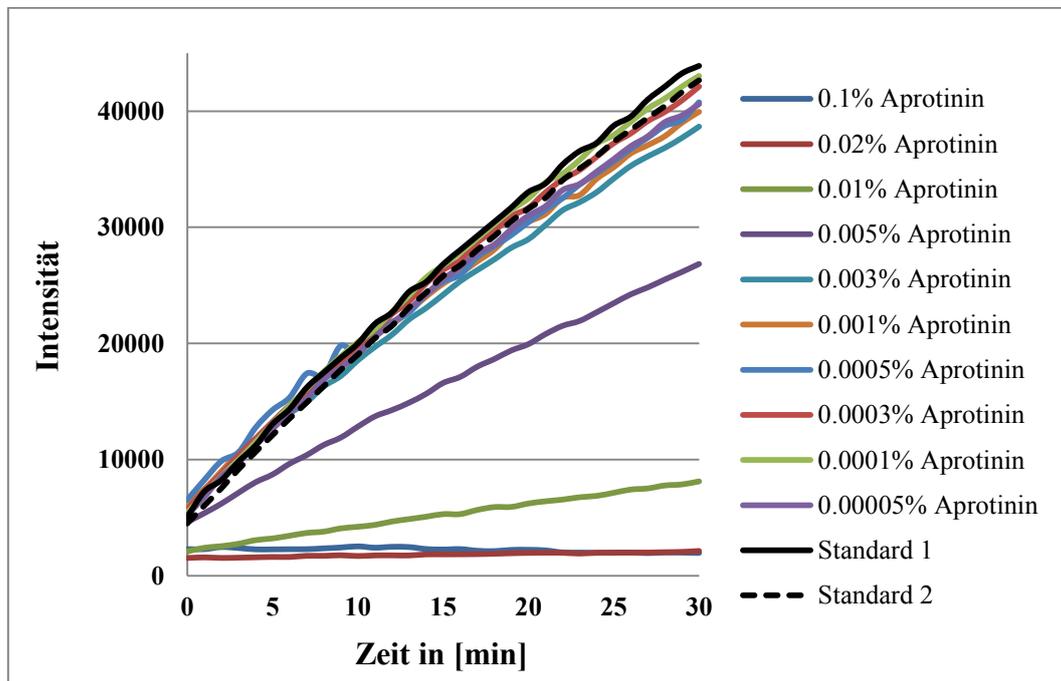


Abb. 5.5.13:  $\alpha$ -Chymotrypsin Inhibitionstest mit mit 0.1 - 0.00005 %iger Aprotinin-Lösungen.

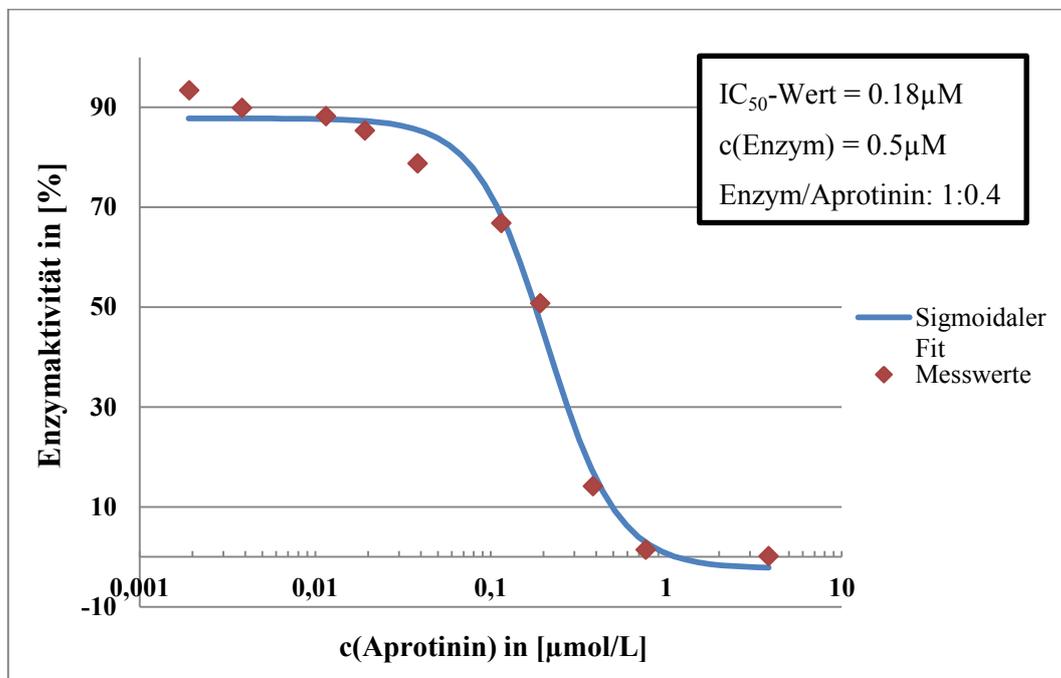
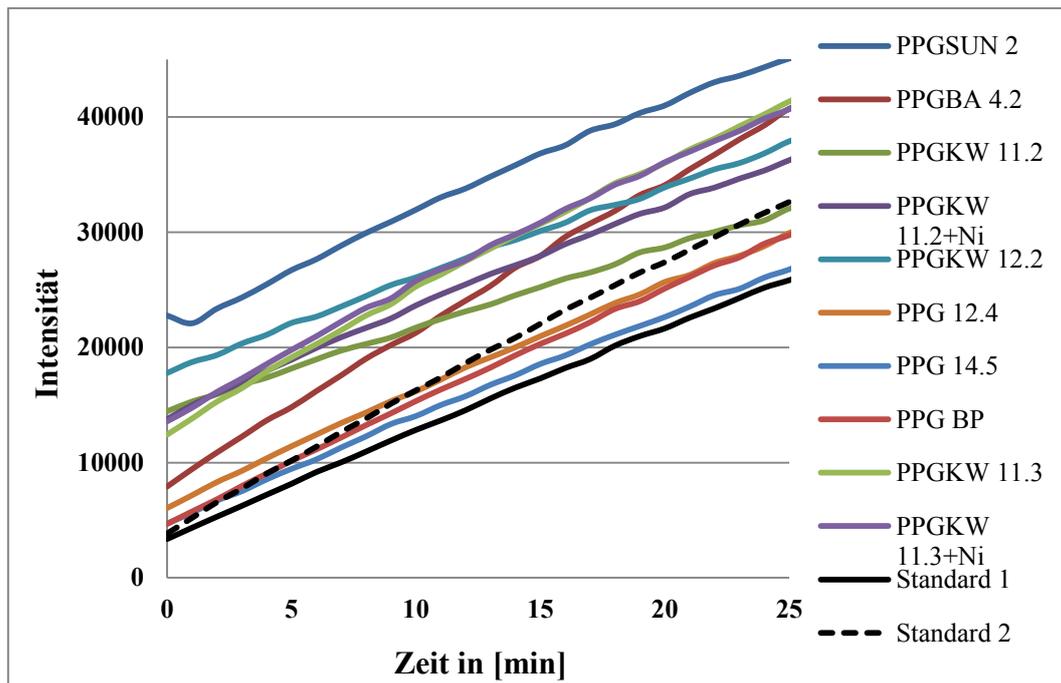
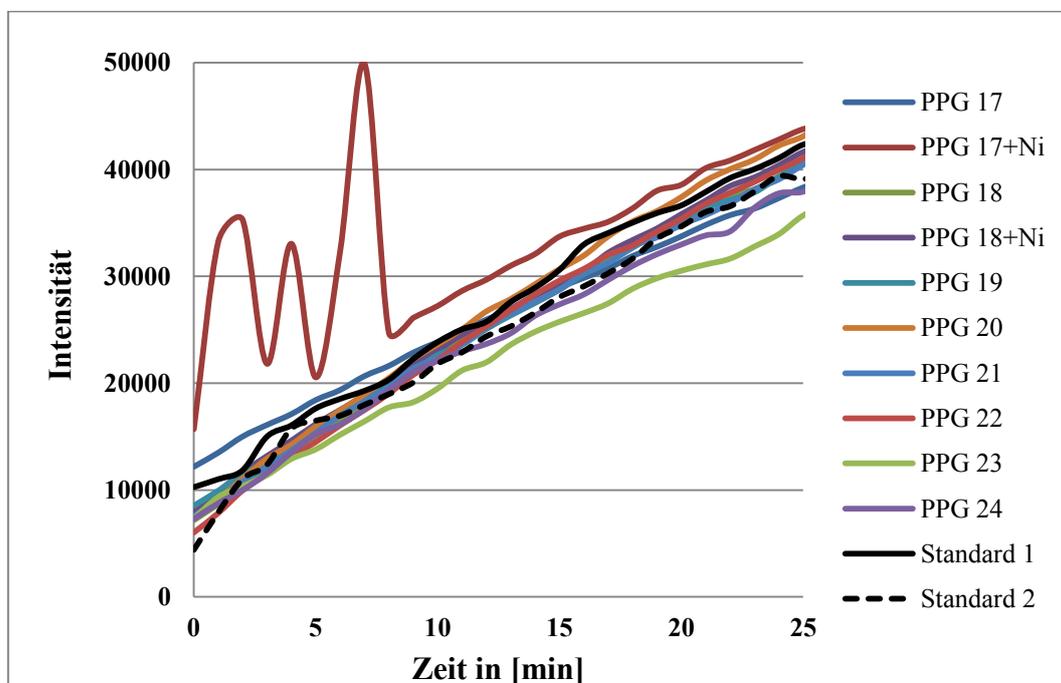


Abb. 5.5.14: Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von Aprotinin zur Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes ( $0.18 \mu\text{M}$  bei einer  $0.5 \mu\text{M}$  Enzymkonzentration).

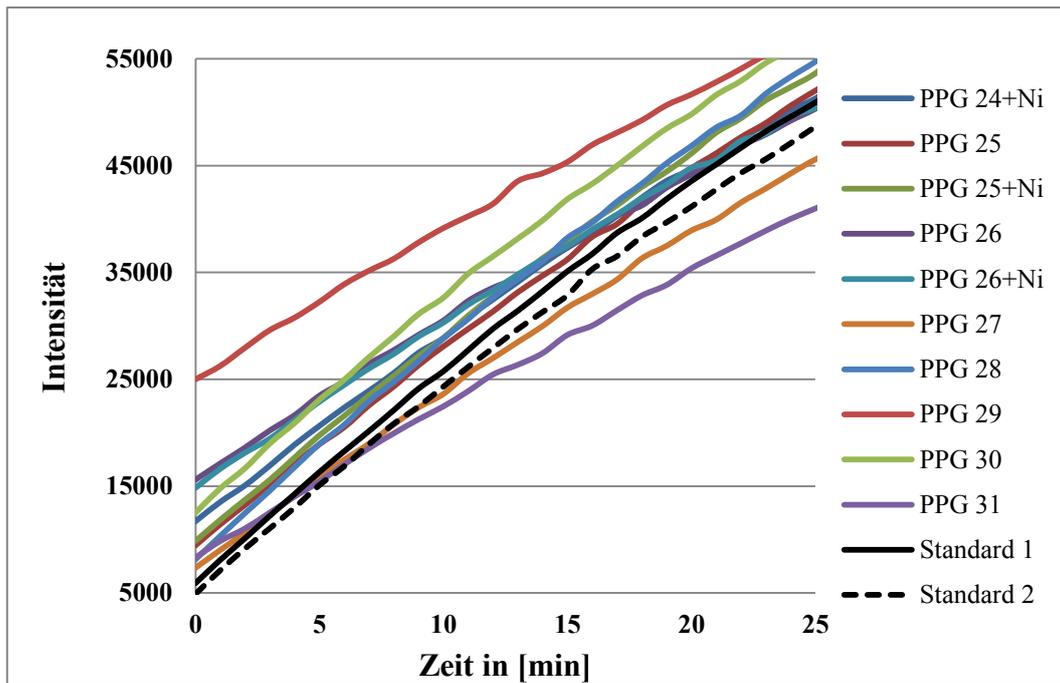
Screening der Polymere:



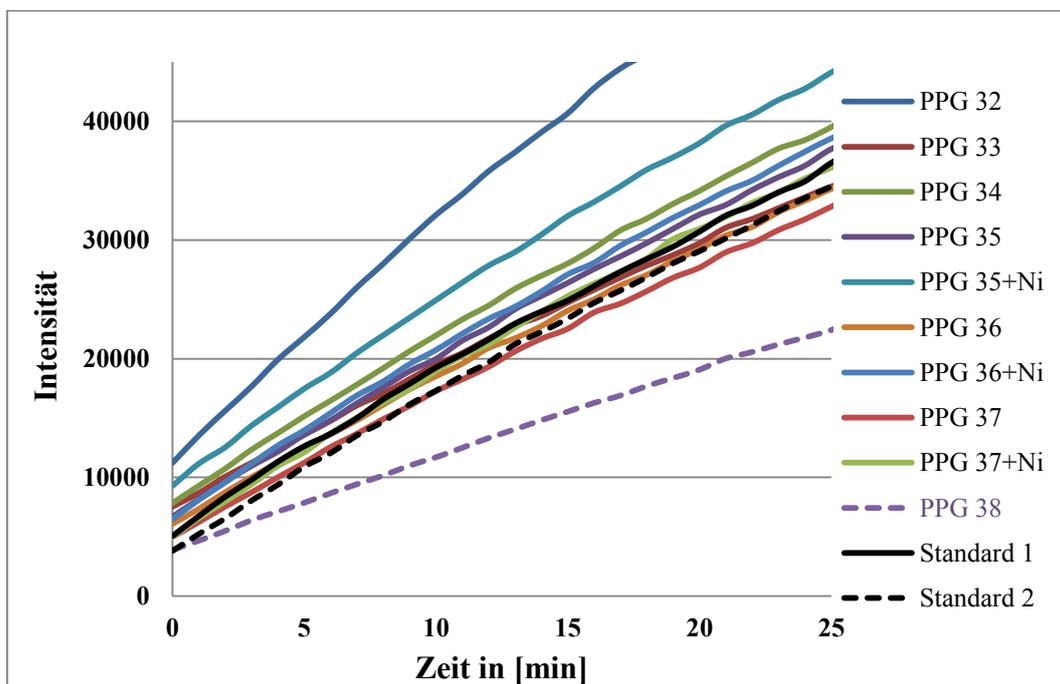
**Abb. 5.5.15:** Screening der 1. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber  $\alpha$ -Chymotrypsin zugeordnet werden.



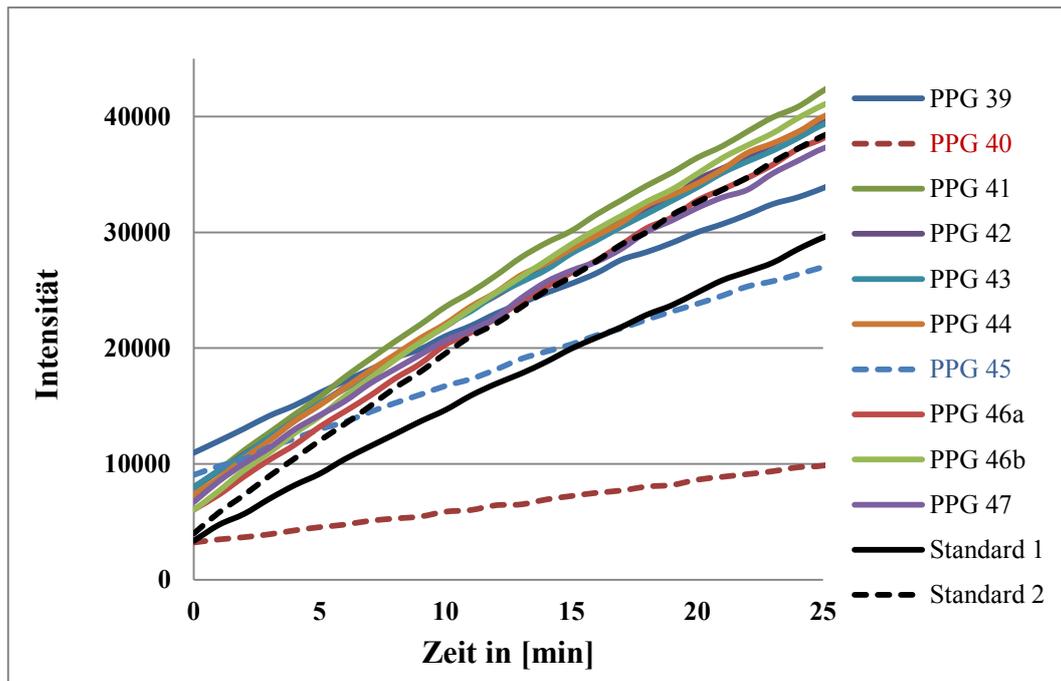
**Abb. 5.5.16:** Screening der 2. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber  $\alpha$ -Chymotrypsin zugeordnet werden.



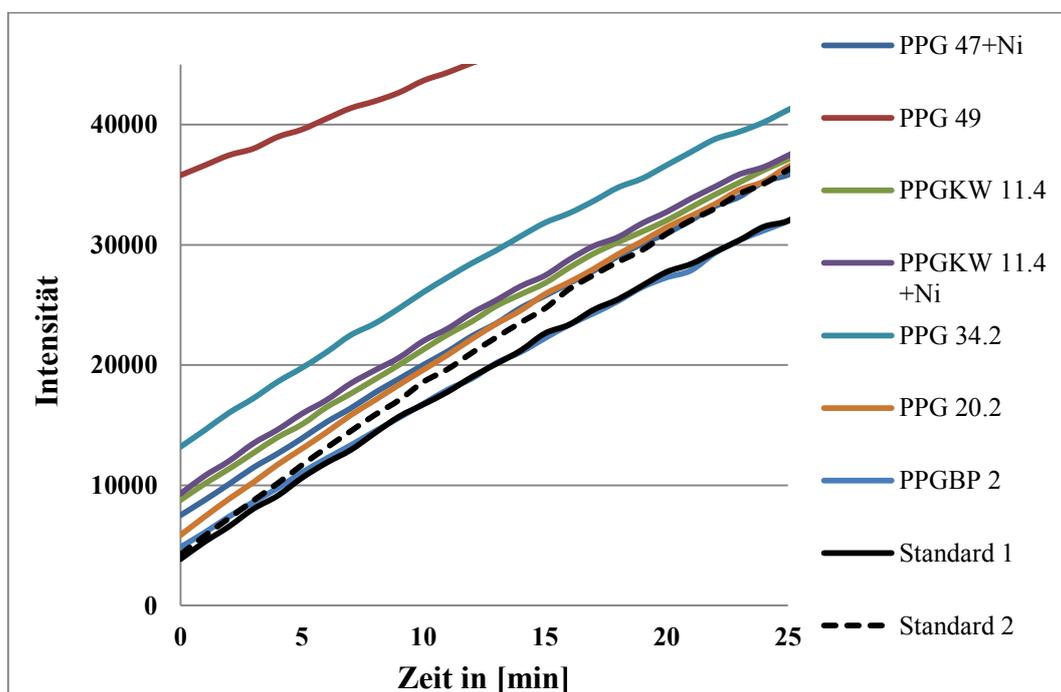
**Abb. 5.5.17:** Screening der 3. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber  $\alpha$ -Chymotrypsin zugeordnet werden.



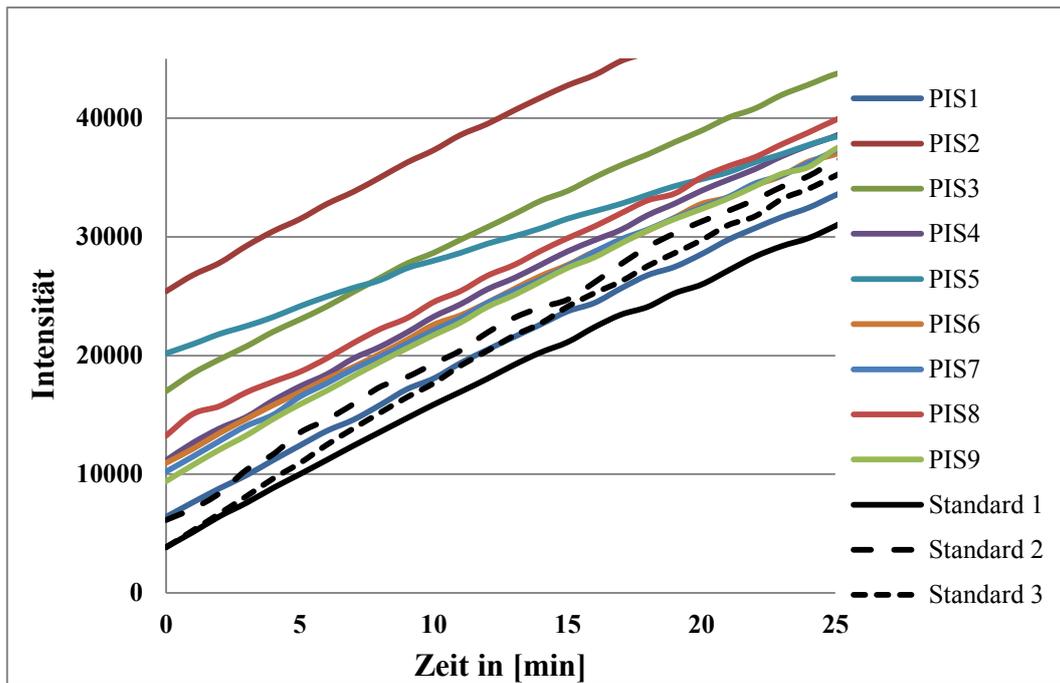
**Abb. 5.5.18:** Screening der 4. Polymerreihe. Es konnte lediglich Polymer 38 eine geringfügige inhibitorische Eigenschaft gegenüber  $\alpha$ -Chymotrypsin zugeordnet werden.



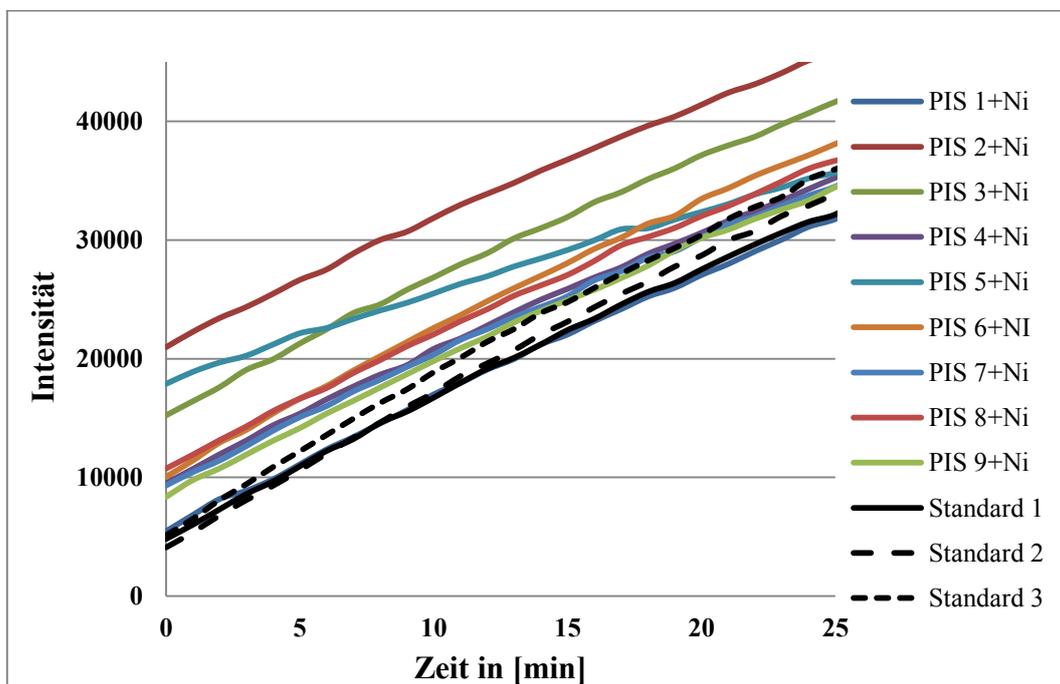
**Abb. 5.5.19:** Screening der 5. Polymerreihe. Polymer PG45 zeigte eine geringfügige inhibitorische Eigenschaft gegenüber  $\alpha$ -Chymotrypsin. Polymer PG40 hingegen erwies sich als starker  $\alpha$ -Chymotrypsin Hemmstoff.



**Abb. 5.5.20:** Screening der 6. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber  $\alpha$ -Chymotrypsin zugeordnet werden. Ferner konnte gezeigt werden das die nachgezogenen Polymere ebenfalls keine Wirksamkeit aufwiesen (PGKW11.4, PG20.2, PG34.2 und PGBP2).

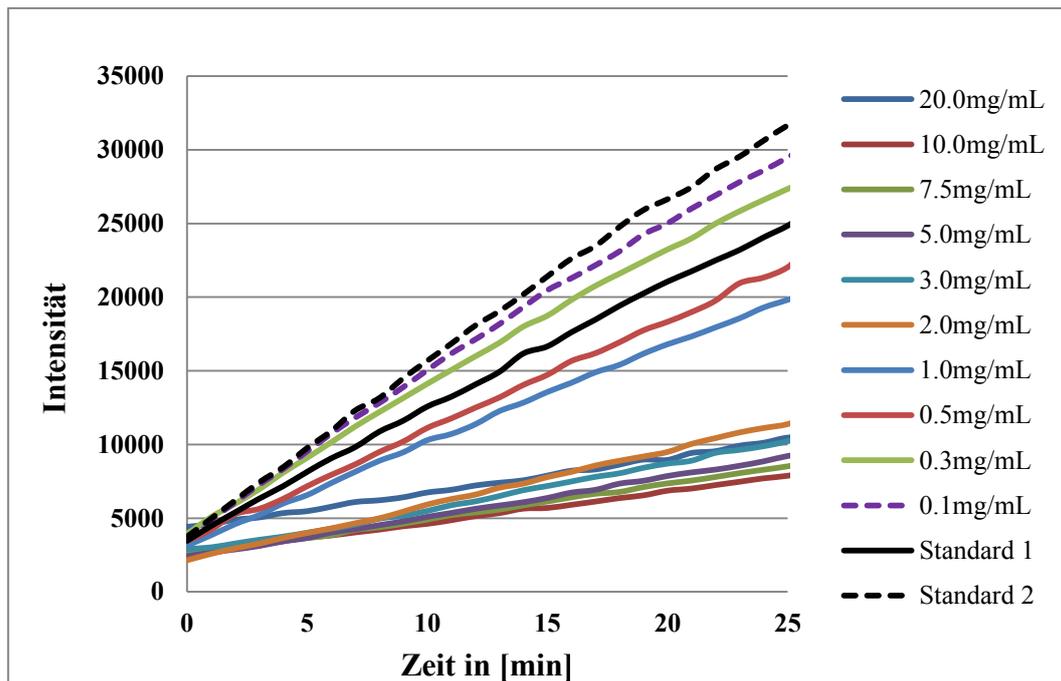


**Abb. 5.5.21:** Screening der 7. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber  $\alpha$ -Chymotrypsin zugeordnet werden.

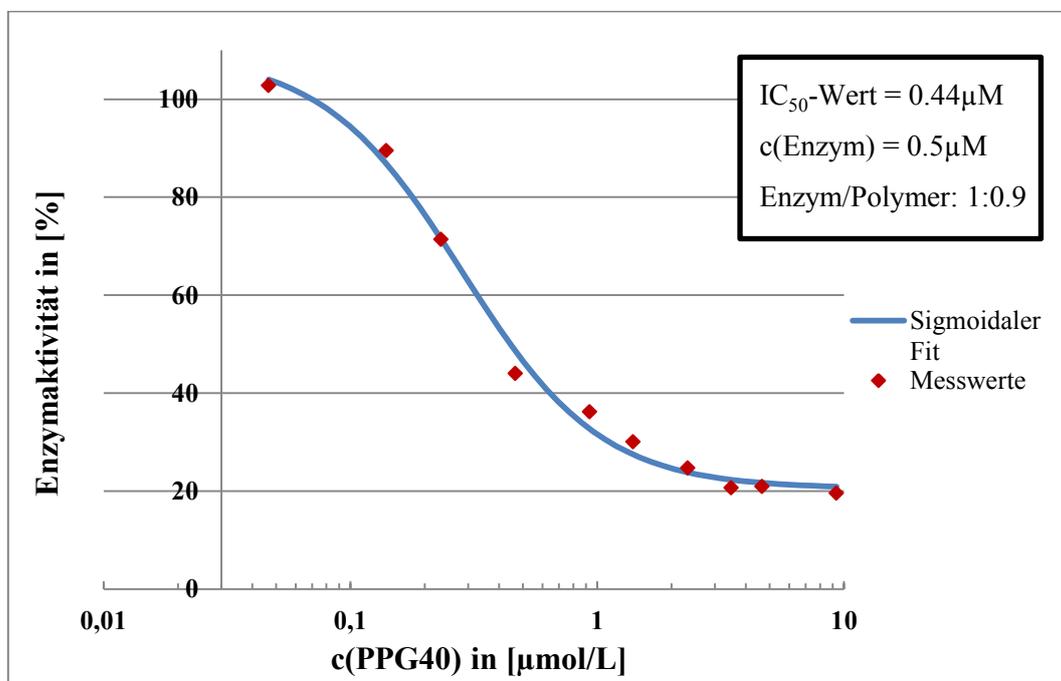


**Abb. 5.5.22:** Screening der 8. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber  $\alpha$ -Chymotrypsin zugeordnet werden.

Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte der wirksamen Polymere:



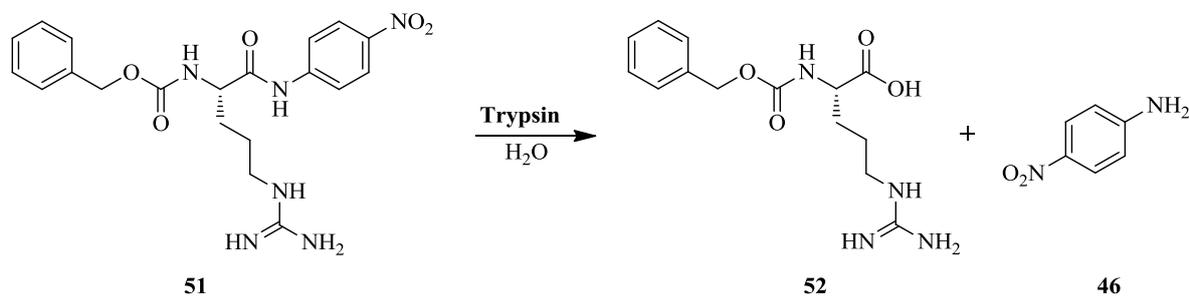
**Abb. 5.5.23:** Inhibition von  $\alpha$ -Chymotrypsin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PPG40. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 20.0 - 0.1 mg/mL.



**Abb. 5.5.24:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG40 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes ( $0.44 \mu\text{M}$  bei einer  $0.5 \mu\text{M}$  Enzymkonzentration).

### 5.5.3 Trypsin Assay

Bei dem durchgeführten Assay fungierte BAPNA **51** als künstliches Substrat.<sup>[122]</sup>



**Abb. 5.5.25:** Hydrolytische Spaltung von BAPNA **51** unter Freisetzung von *p*-Nitroanilin **46**.<sup>[175]</sup>

#### Verwendete Lösungen 1:

Trypsin-Puffer: 75 mM TRIZMA-Base, 75 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 8.0.

Trypsin-Lösung: 500 – 1000 µg Trypsin (9000 U / mg) wurden in 1.0 mL 1 mM HCl gelöst.

Substrat -Lösung: 134 - 150 µg BAPNA • HCl wurden in 200 µL DMSO und 800 µL Trypsin-Puffer gelöst.

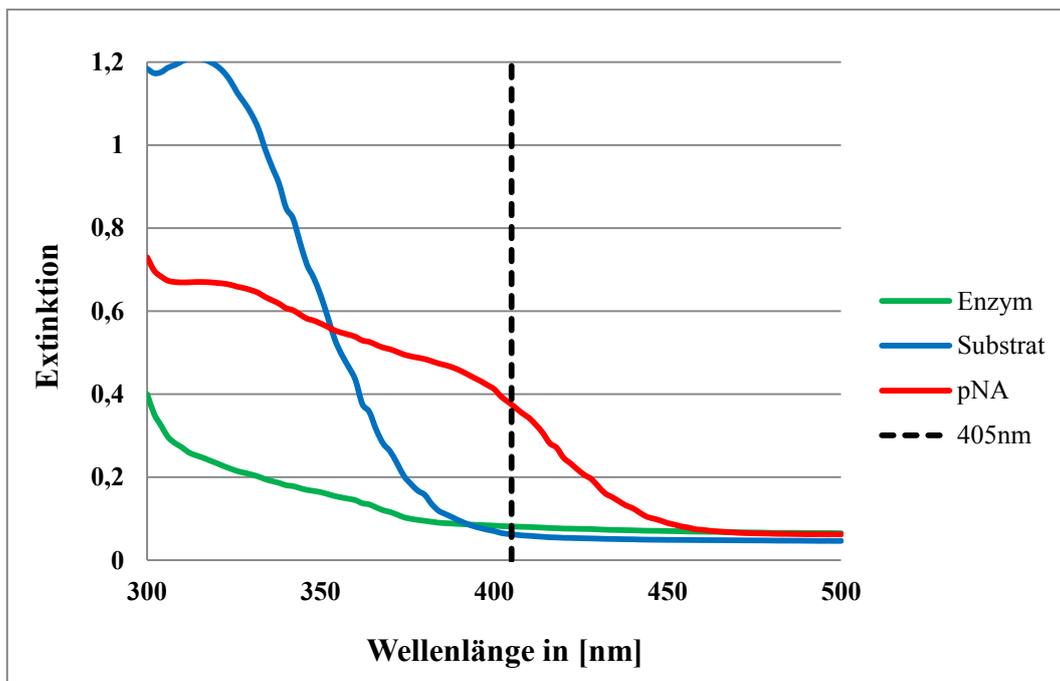
#### Durchführung 1:

5 µL Enzym-Lösung wurden mit 5 µL Polymer-Stammlösung versetzt und für 30 min inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von 100 µL Substrat-Lösung. Das Reaktionsgemisch wurde daraufhin sofort vermessen.

Vor der Messung wurde die 96-well Mikrotiterplatte 10 s lang geschüttelt. Die Messung erfolgte bei einer Temperatur von 25 °C und bei einer Wellenlänge von 405 nm. Nach 30 s erfolgte die Aufnahme des Messwertes. Bei einer Gesamtmesszeit von 30 min. Vor jeder Messwertaufnahme wurde die Mikrotitrierplatte 4 s geschüttelt.

**Tab. 5.5.3:** Tabellarische Zusammenfassung des 1. Trypsin Assays.

Verwendete Lösungen	Volumen	Konzentration	Konzentration im Assay
Enzym	5 $\mu\text{L}$	$2.2 - 4.3 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$	$1.0 - 2.0 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$
Polymer bzw. Wasser	5 $\mu\text{L}$	20.0 mg/mL	0.9 mg/mL
30 min Vorinkubation			
Substrat	100 $\mu\text{L}$	$3.1 - 3.4 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$	$2.8 - 3.1 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$
Gesamtvolumen	110 $\mu\text{L}$		

Absorptionsspektrum:**Abb. 5.5.26:** Absorptionsübersicht des Enzyms, Substrats und Chromophors im Trypsin Assay.

### Inhibitionstest mit literaturbekannten Hemmstoff:

Die Kontrollmessung wurde mit 4-Aminobenzamidin (4-ABA) durchgeführt.

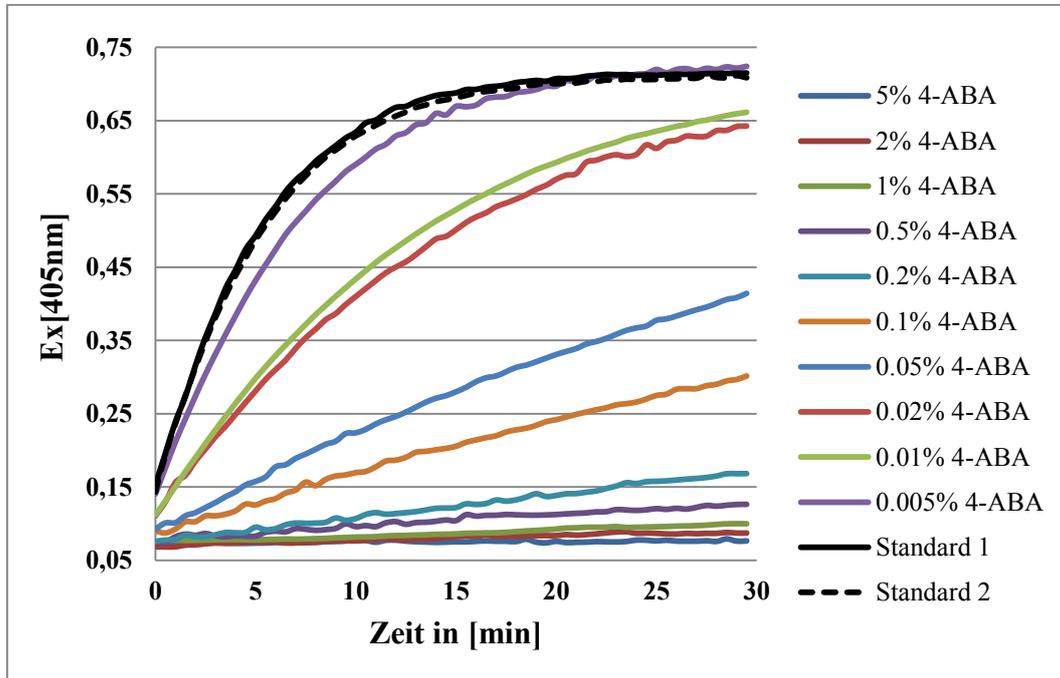


Abb. 5.5.27: Trypsin Inhibitionstest mit 5 - 0,005% iger 4-ABA-Lösung.

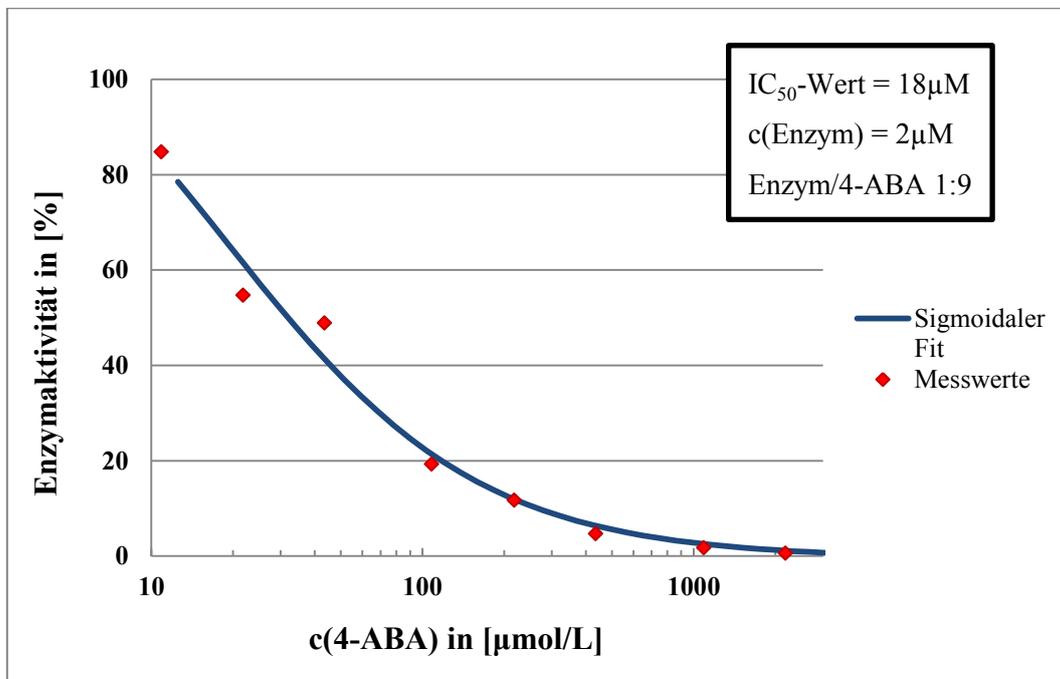
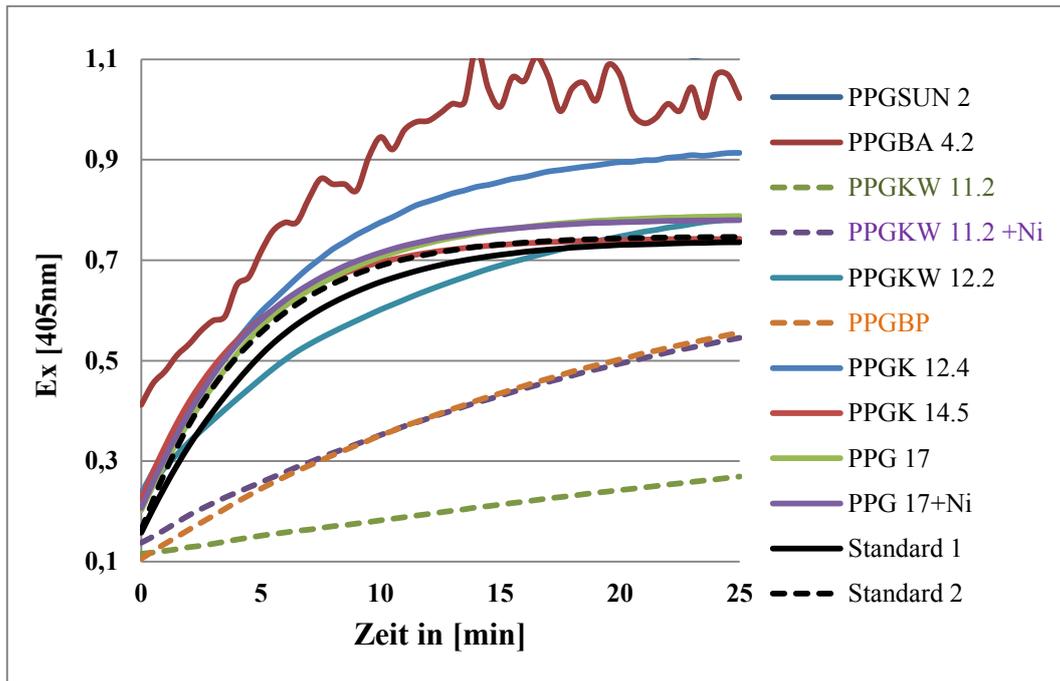
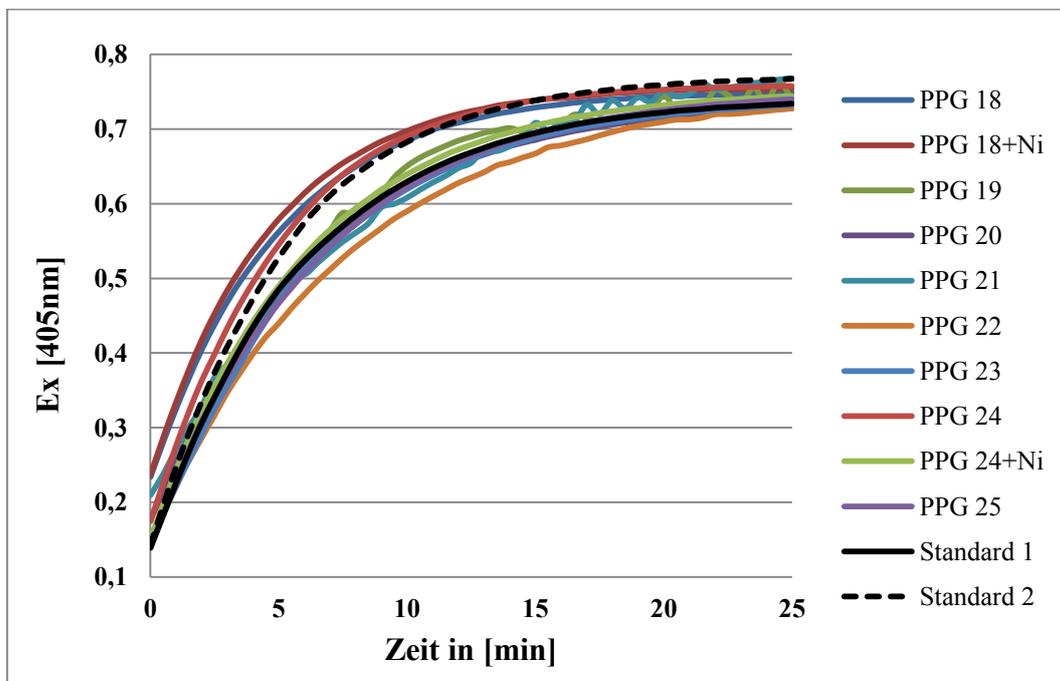


Abb. 5.5.28: Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von 4-ABA zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes ( $18 \mu\text{M}$  bei einer  $2 \mu\text{M}$  Enzymkonzentration).

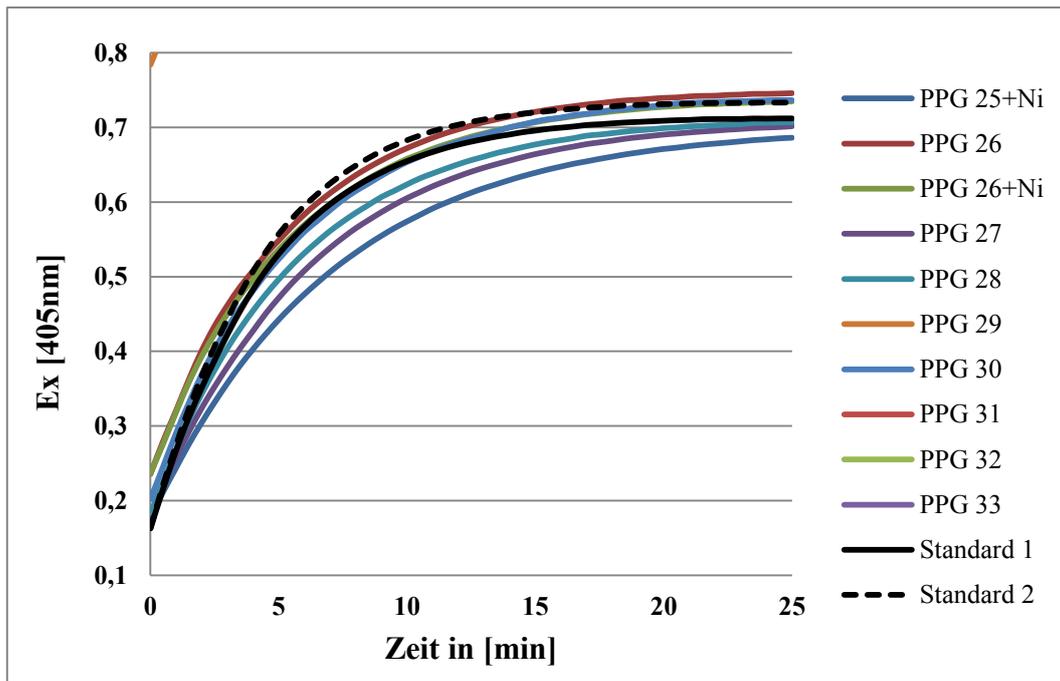
Screening der Polymere 1:



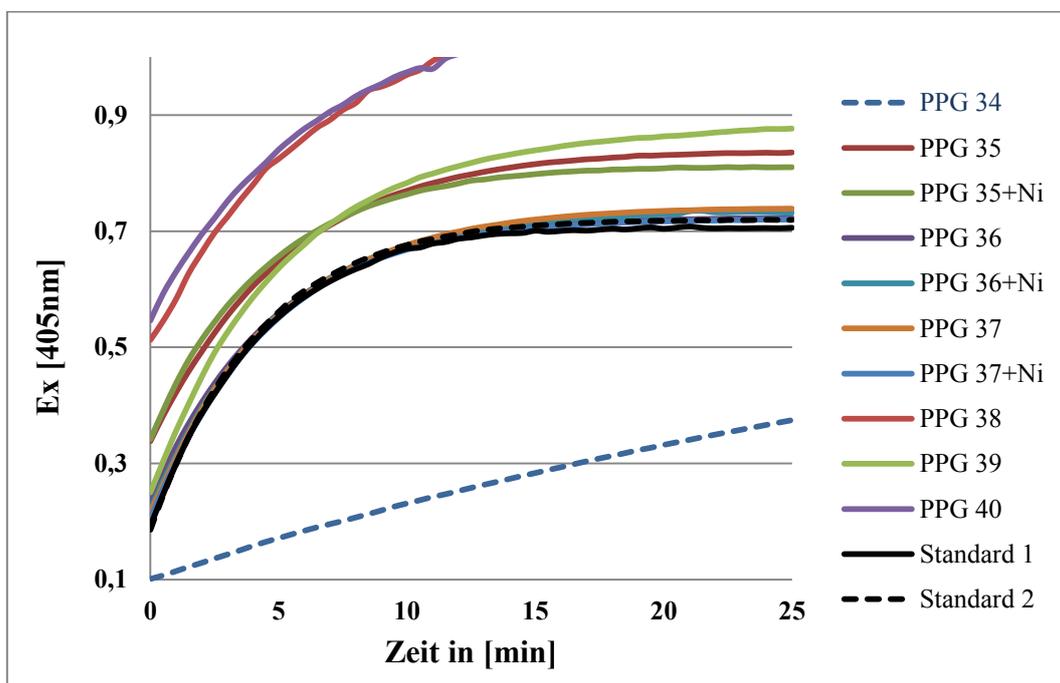
**Abb. 5.5.29:** Screening der 1. Polymerreihe. Polymer PGBP zeigte eine geringfügige inhibitorische Eigenschaft gegenüber Trypsin. Polymer PGKW11.2 hingegen erwies sich als starker Hemmstoff, ohne Zusatz von Nickel-Ionen.



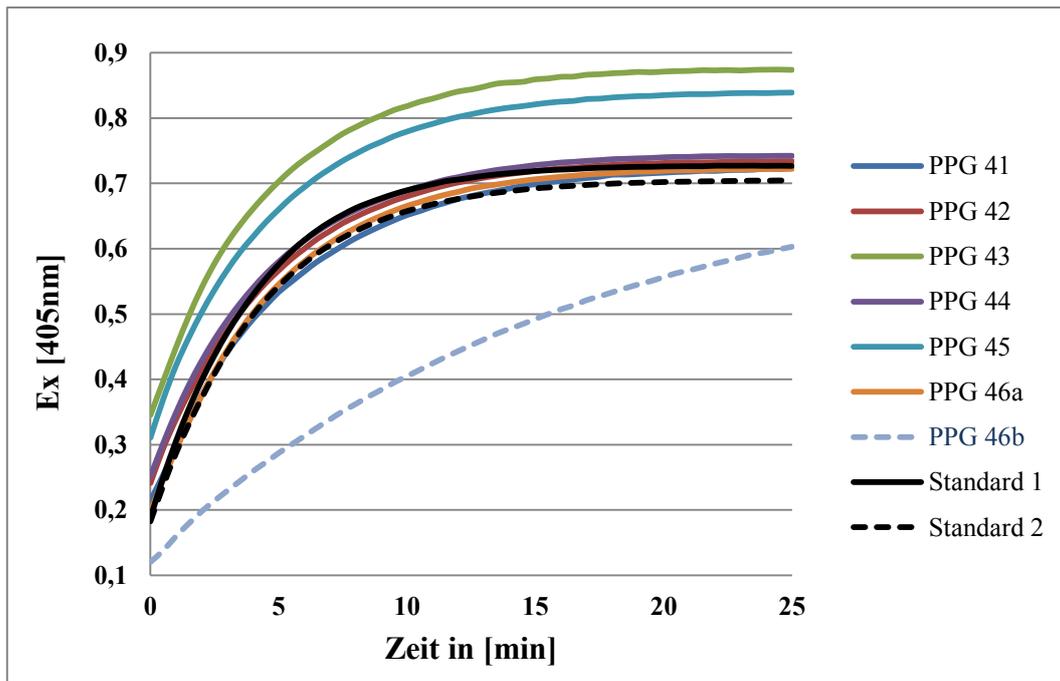
**Abb. 5.5.30:** Screening der 2. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Trypsin zugeordnet werden.



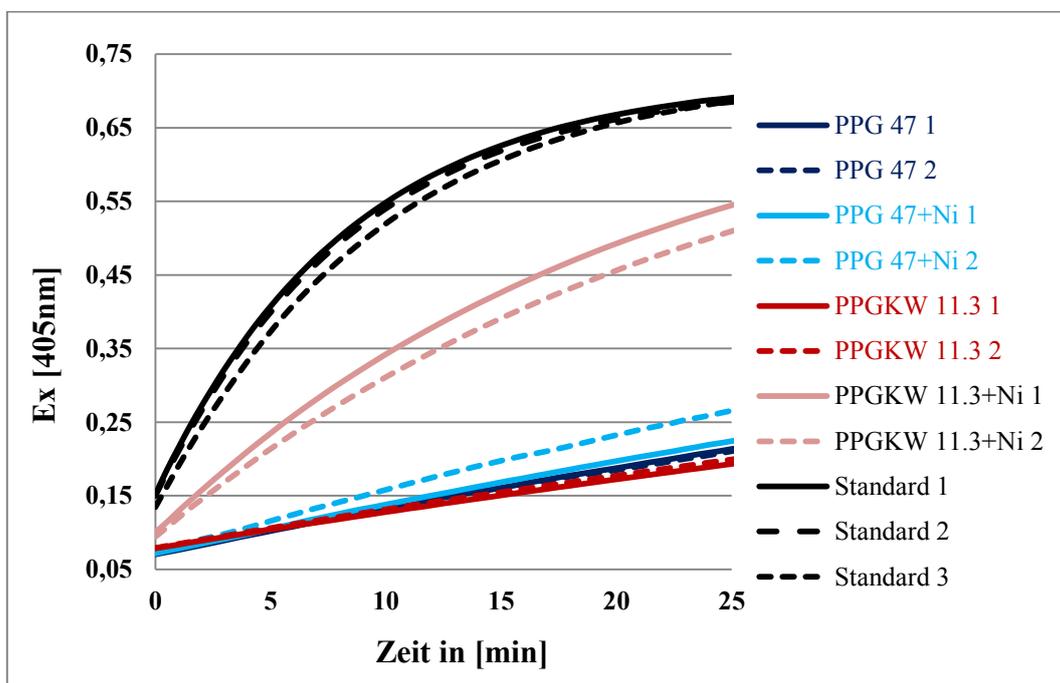
**Abb. 5.5.31:** Screening der 3. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Trypsin zugeordnet werden.



**Abb. 5.5.32:** Screening der 4. Polymerreihe. Lediglich Polymer PG34 zeigte eine gute Hemmung gegenüber Trypsin.

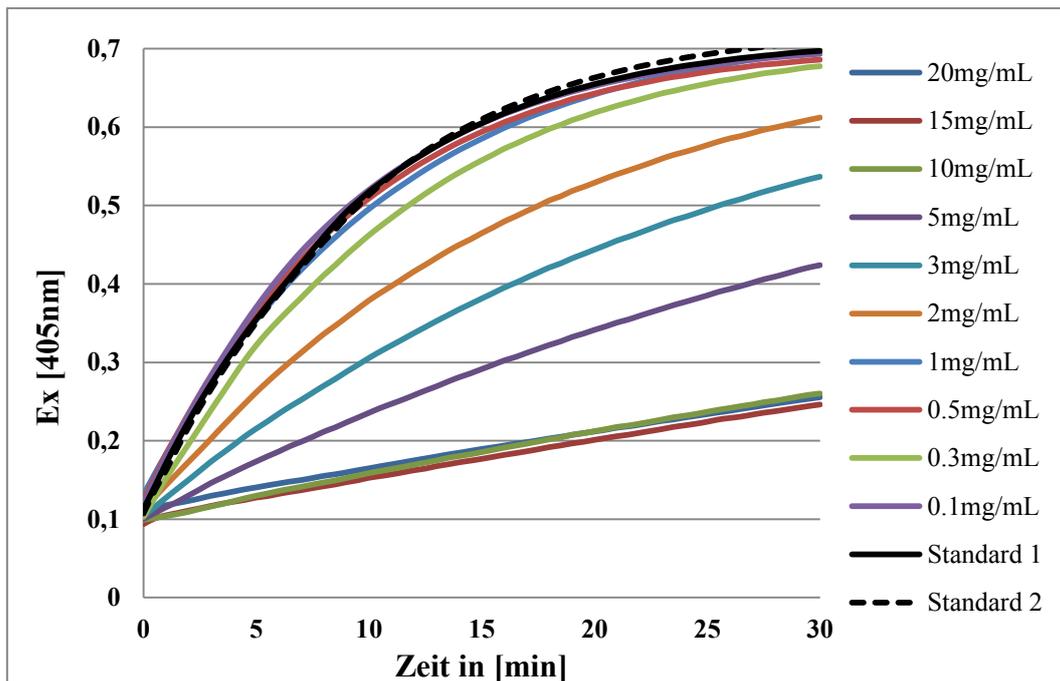


**Abb. 5.5.33:** Screening der 5. Polymerreihe. Lediglich Polymer PG46b zeigte eine geringfügige inhibitorische Eigenschaft gegenüber Trypsin.

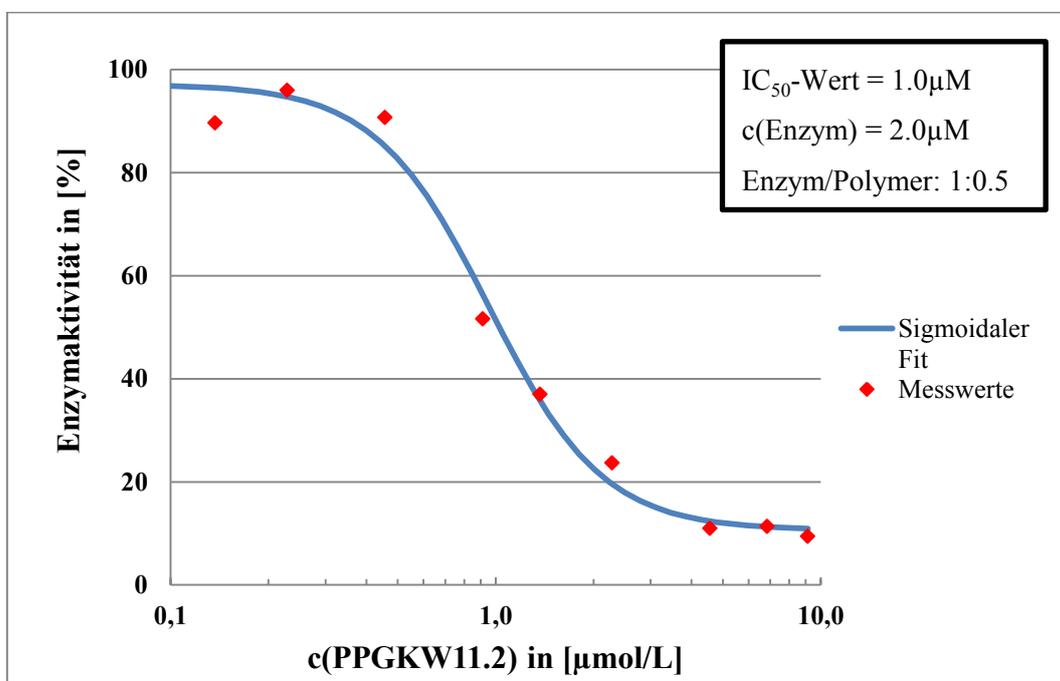


**Abb. 5.5.34:** Screening der 6. Polymerreihe. Polymer PG47 erwies sich als starker Hemmstoff. Ebenfalls zeigte PPGKW11.3 eine Inhibition gegenüber Trypsin, jedoch nur in Abwesenheit von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen.

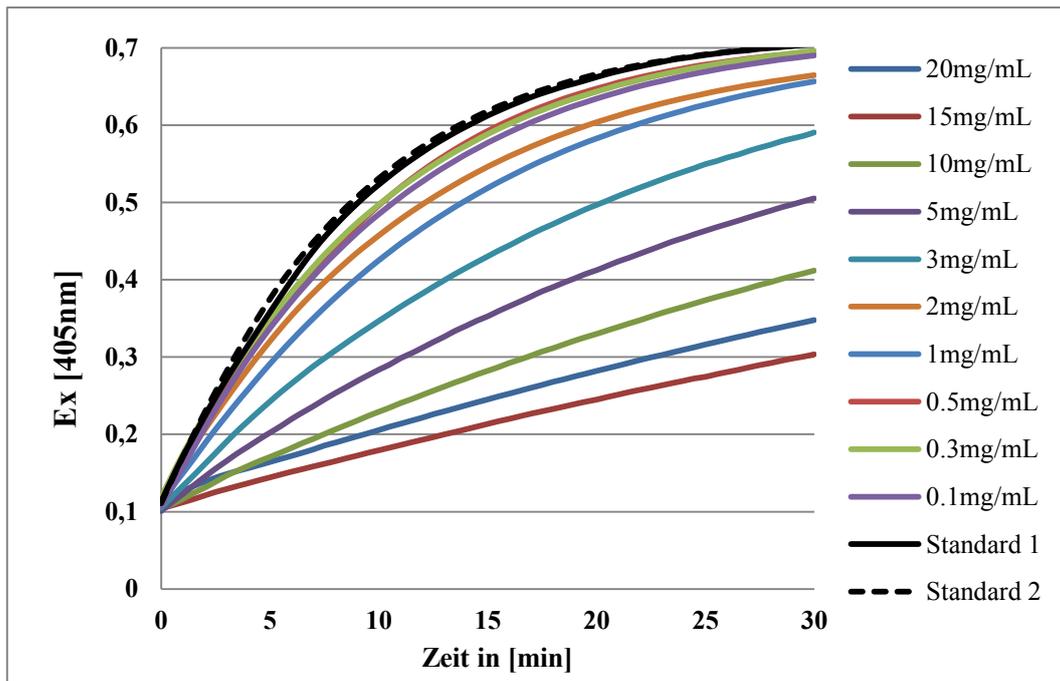
Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte der wirksamen Polymere 1:



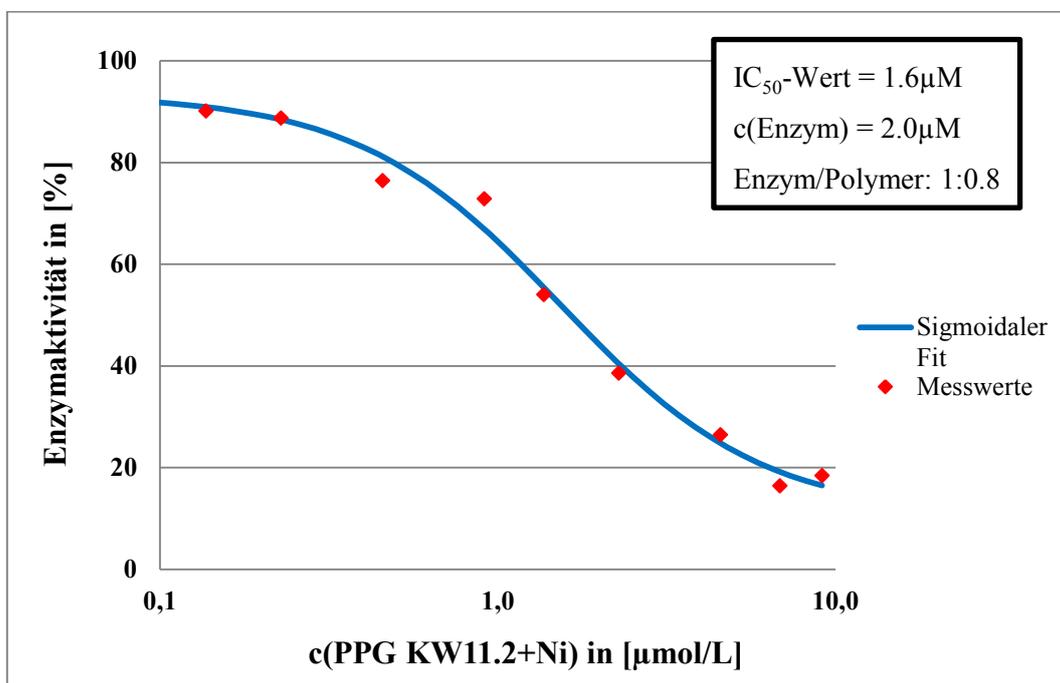
**Abb. 5.5.35:** Inhibition von Trypsin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PGKW11.2. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 20.0 - 0.1 mg/mL.



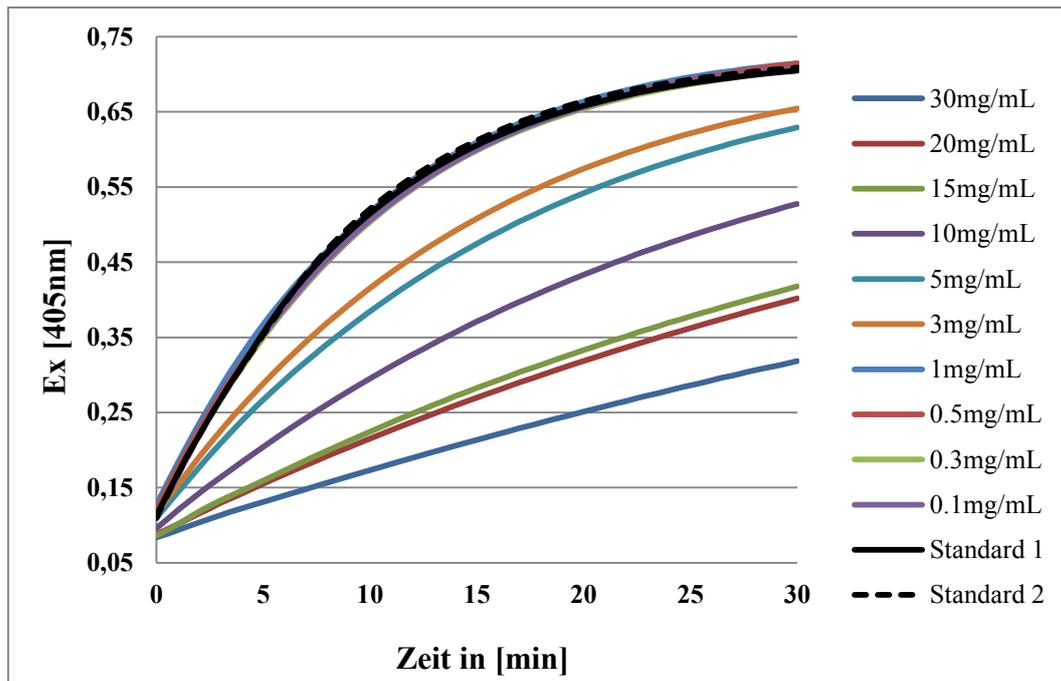
**Abb. 5.5.36:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PGKW11.2 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (1.0  $\mu\text{M}$  bei einer 2.0  $\mu\text{M}$  Enzymkonzentration).



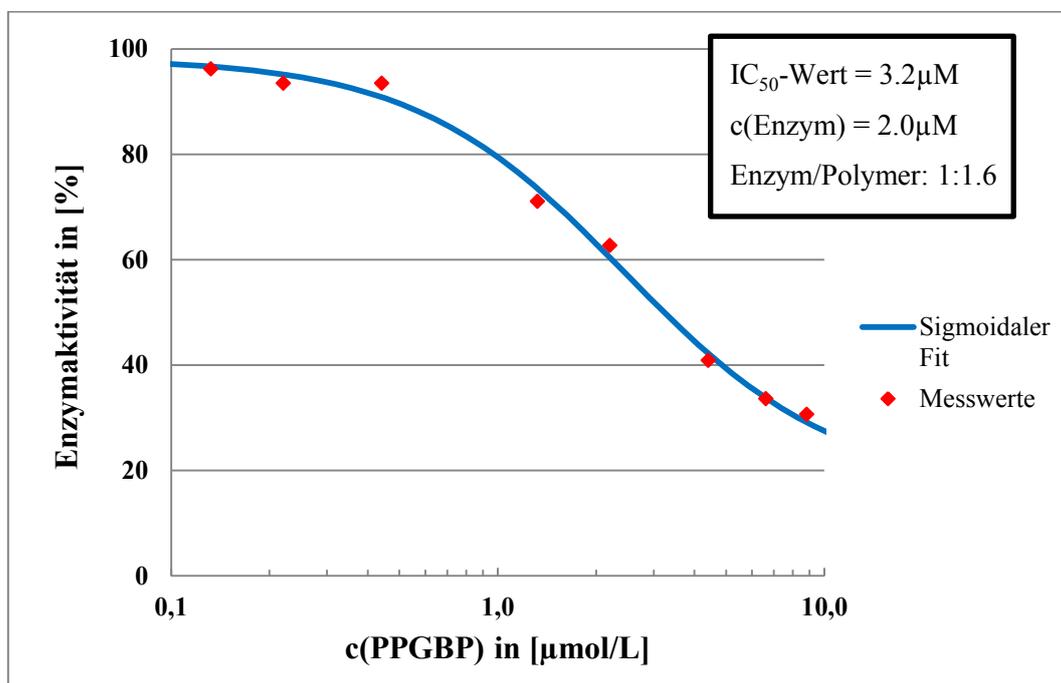
**Abb. 5.5.37:** Inhibition von Trypsin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PGKW11.2+Ni. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 20.0 - 0.1 mg/mL.



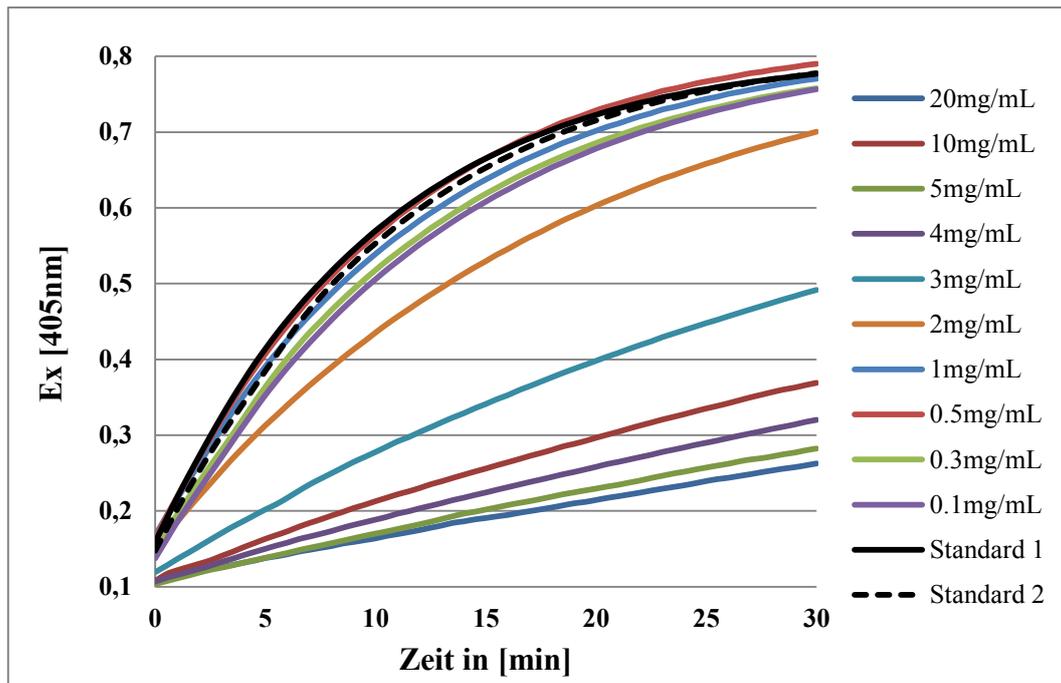
**Abb. 5.5.38:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPGKW11.2+Ni zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (1.6  $\mu$ M bei einer 2.0  $\mu$ M Enzymkonzentration).



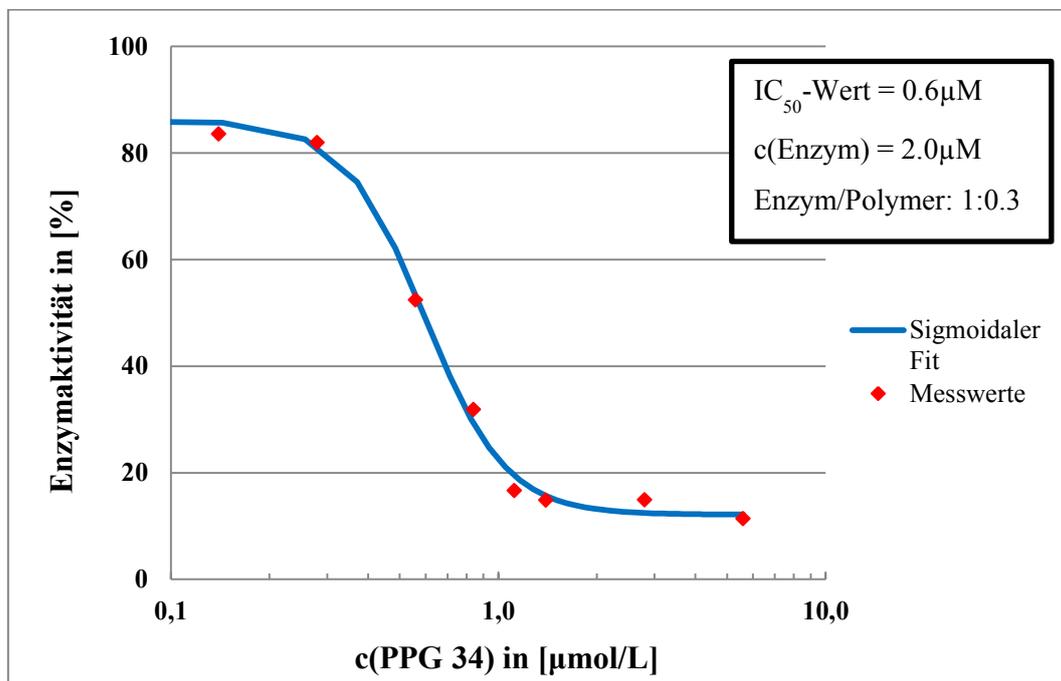
**Abb. 5.5.39:** Inhibition von Trypsin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PGBP. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 30,0 - 0,1 mg/mL.



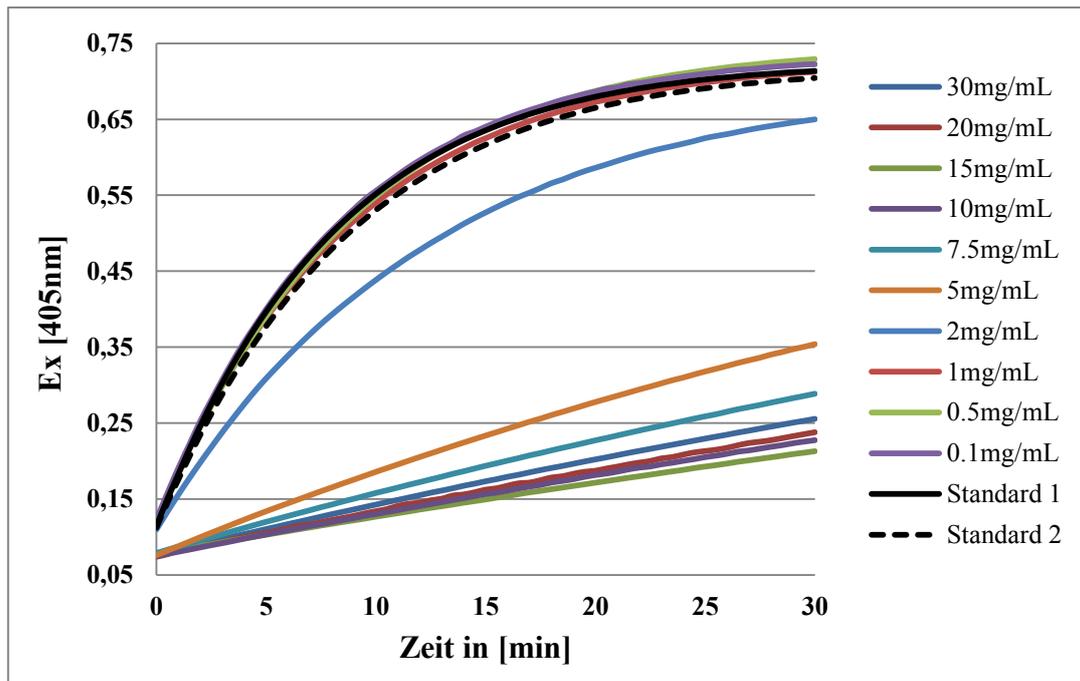
**Abb. 5.5.40:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PGBP zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes ( $3,2 \mu\text{M}$  bei einer  $2,0 \mu\text{M}$  Enzymkonzentration).



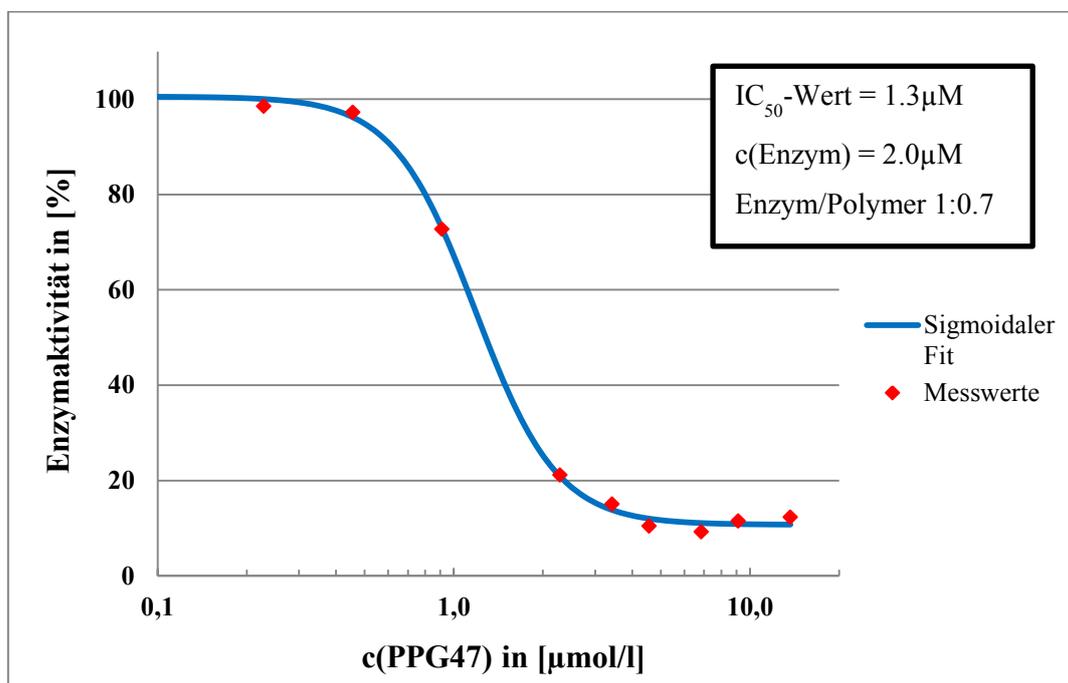
**Abb. 5.5.41:** Inhibition von Trypsin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PG34. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 20.0 - 0.1 mg/mL.



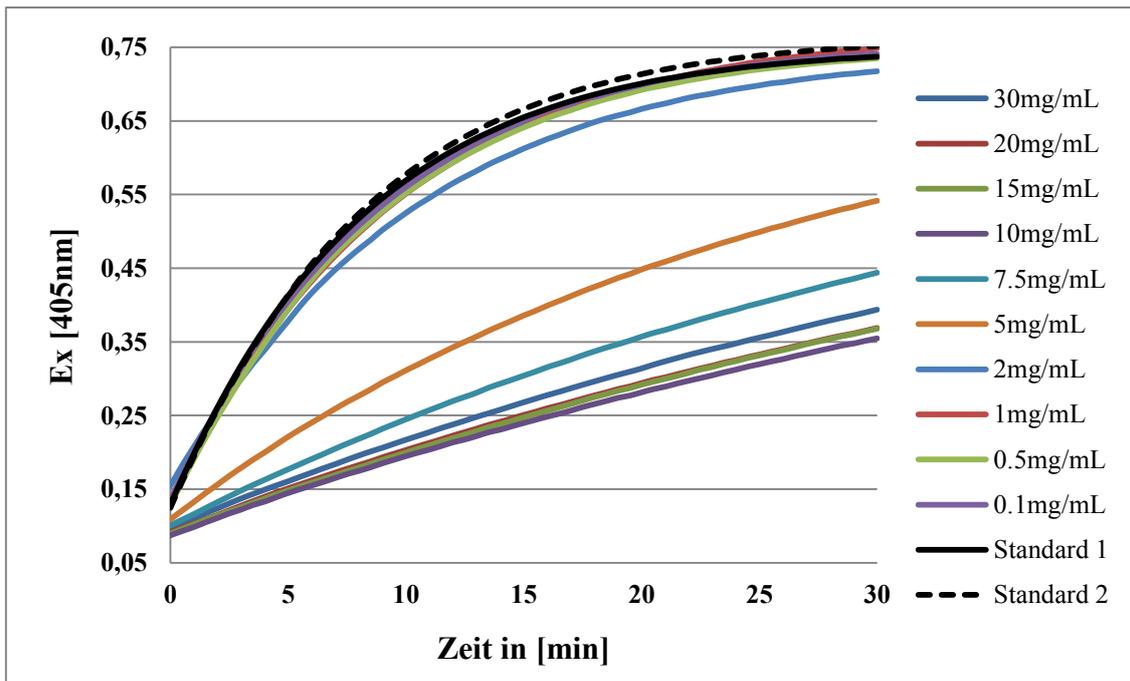
**Abb. 5.5.42:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG34 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (0.6  $\mu$ M bei einer 2.0  $\mu$ M Enzymkonzentration).



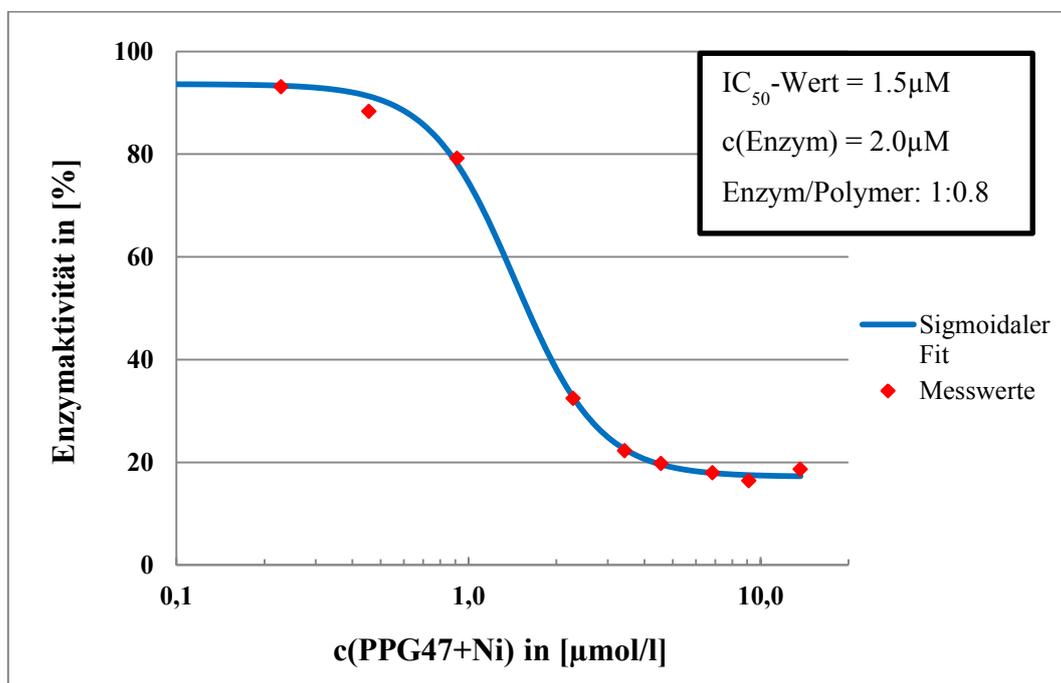
**Abb. 5.5.43:** Inhibition von Trypsin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PPG47. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 30.0 - 0.1 mg/mL.



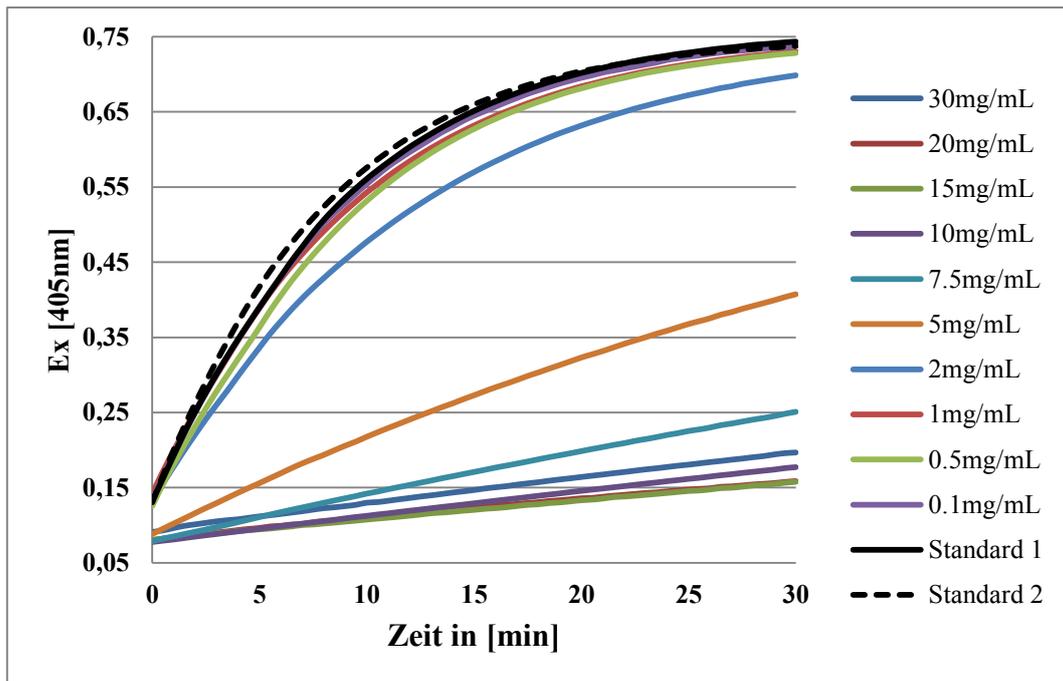
**Abb. 5.5.44:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG47 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes ( $1.3 \mu\text{M}$  bei einer  $2.0 \mu\text{M}$  Enzymkonzentration).



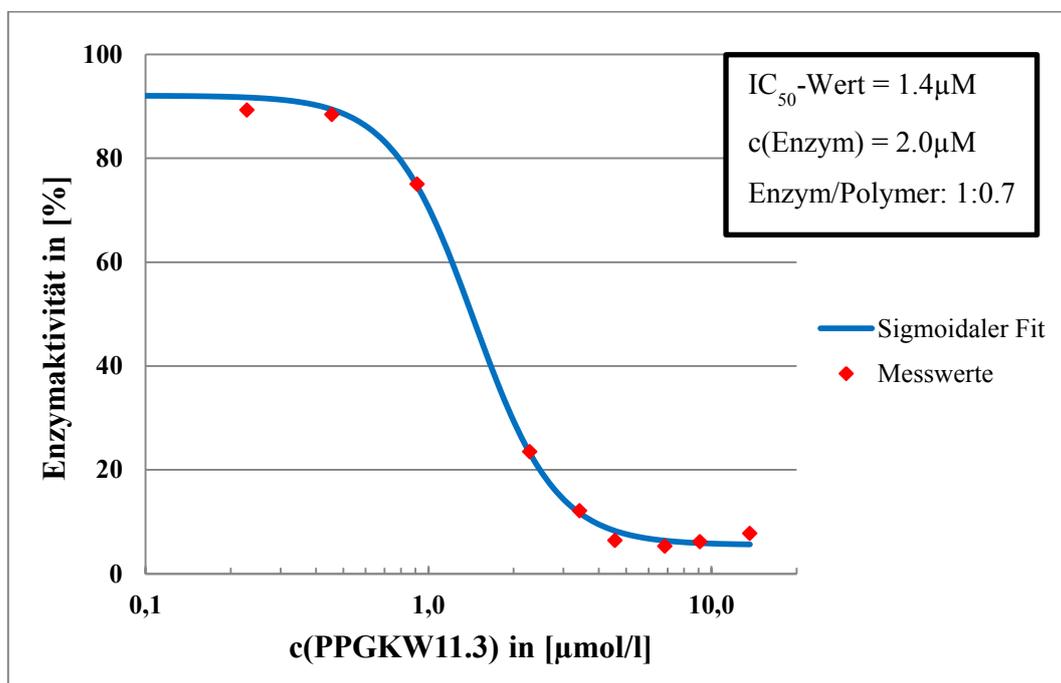
**Abb. 5.5.45:** Inhibition von Trypsin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PPG47+Ni. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 30.0 - 0.1 mg/mL.



**Abb. 5.5.46:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG47+Ni zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (1.5 µM bei einer 2.0 µM Enzymkonzentration).



**Abb. 5.5.47:** Inhibition von Trypsin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PPGKW11.3. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 30.0 - 0.1 mg/mL.



**Abb. 5.5.48:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPGKW11.3 zur Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$ -wertes ( $1.4\mu\text{M}$  bei einer  $2.0\mu\text{M}$  Enzymkonzentration).

Verwendete Lösungen 2:<sup>[141]</sup>

Trypsin-Puffer:	75 mM TRIZMA-Base, 75 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH = 8.0.
Trypsin-Lösung:	250 µg Trypsin (9000 U / mg) wurden in 1.0 mL 1 mM HCl gelöst.
Substrat-Stock-Lösung:	6.0 mg BAPNA • HCl wurden in 1.0 mL DMSO gelöst.
Substrat -Lösung:	37.5 µL Substrat-Stock-Lösung und 962.5 µL Trypsin-Puffer bilden die Substrat Lösung.

Durchführung 2:

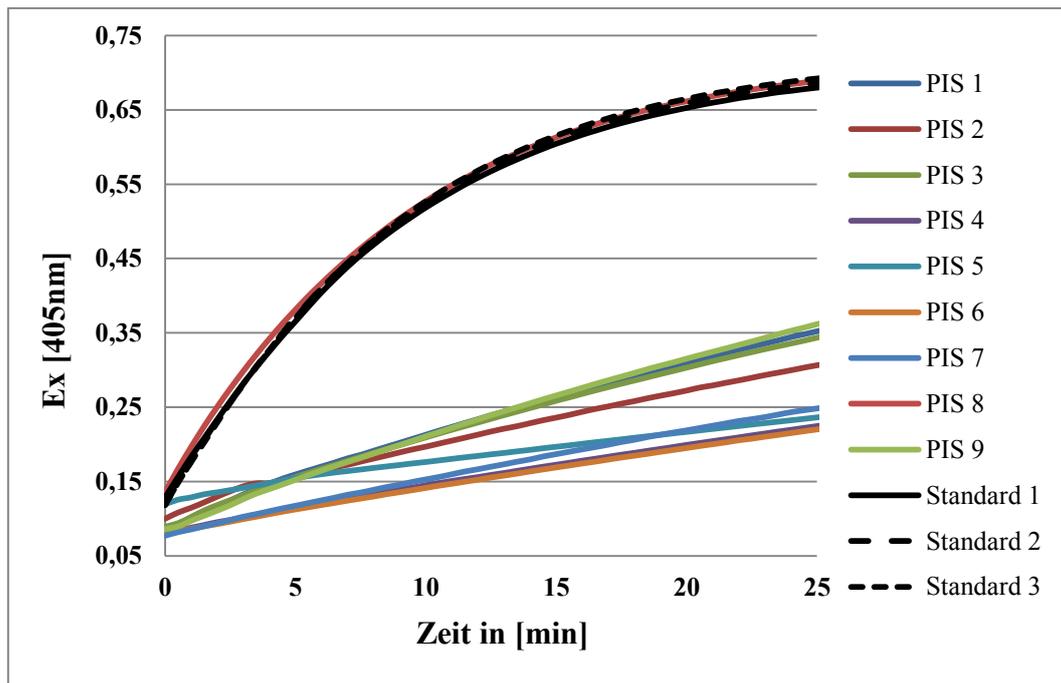
5 µL Enzym-Lösung wurden mit 5 µL Polymer-Stammlösung versetzt und für 30 min inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von 100 µL Substrat-Lösung. Das Reaktionsgemisch wurde daraufhin sofort vermessen.

Vor der Messung wurde die 96-well Mikrotiterplatte 10 s lang geschüttelt. Die Messung erfolgte bei einer Temperatur von 25 °C und bei einer Wellenlänge von 405 nm. Nach 30 s erfolgte die Aufnahme des Messwertes. Bei einer Gesamtmesszeit von 30 min. Vor jeder Messwertaufnahme wurde die Mikrotiterplatte 4 s geschüttelt.

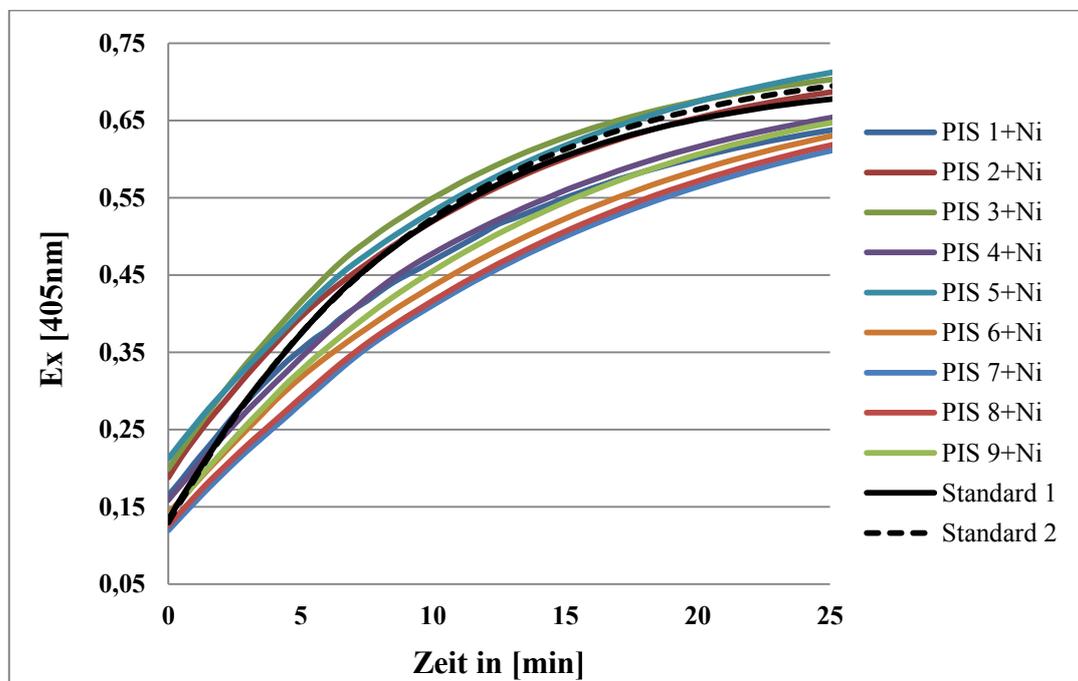
**Tab. 5.5.4:** Tabellarische Zusammenfassung des 2. Trypsin Assays.

Verwendete Lösungen	Volumen	Konzentration	Konzentration im Assay
Enzym	5 µL	$1.1 \cdot 10^{-5}$ mol/L	$4.9 \cdot 10^{-7}$ mol/L
Polymer bzw. Wasser	5 µL	20.0 mg/mL	0.9 mg/mL
30 min Vorinkubation			
Substrat	100 µL	$5.2 \cdot 10^{-4}$ mol/L	$4.7 \cdot 10^{-4}$ mol/L
Gesamtvolumen	110 µL		

### Screening der Polymere 2:

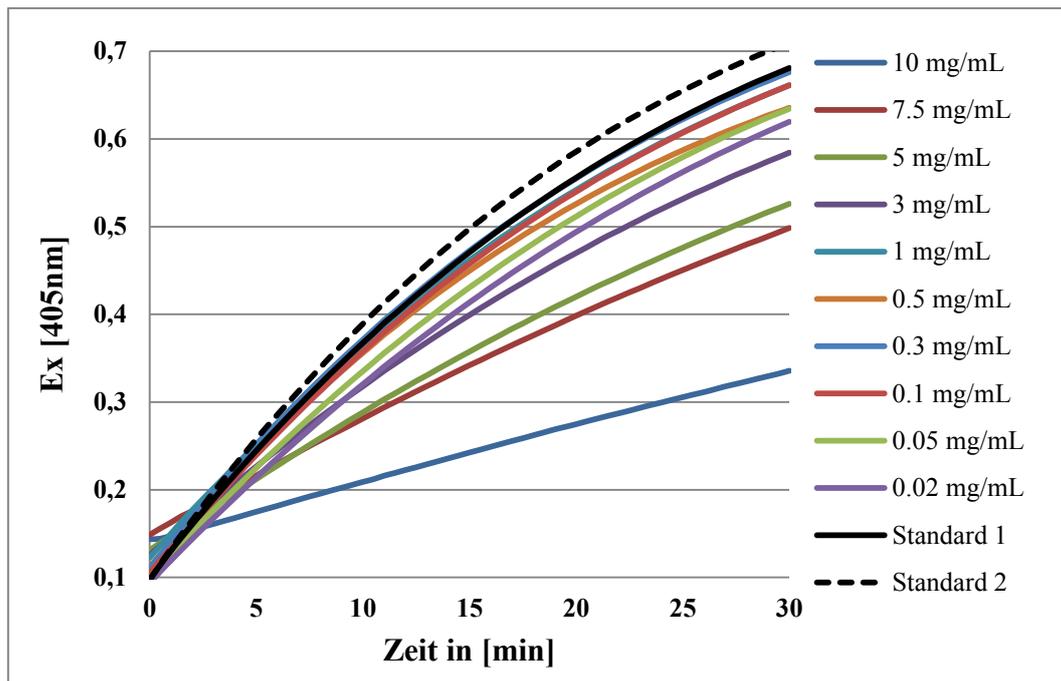


**Abb. 5.5.49:** Screening der 7. Polymerreihe. Alle Polymere zeigten starke inhibitorische Eigenschaften gegenüber Trypsin.<sup>[141]</sup>

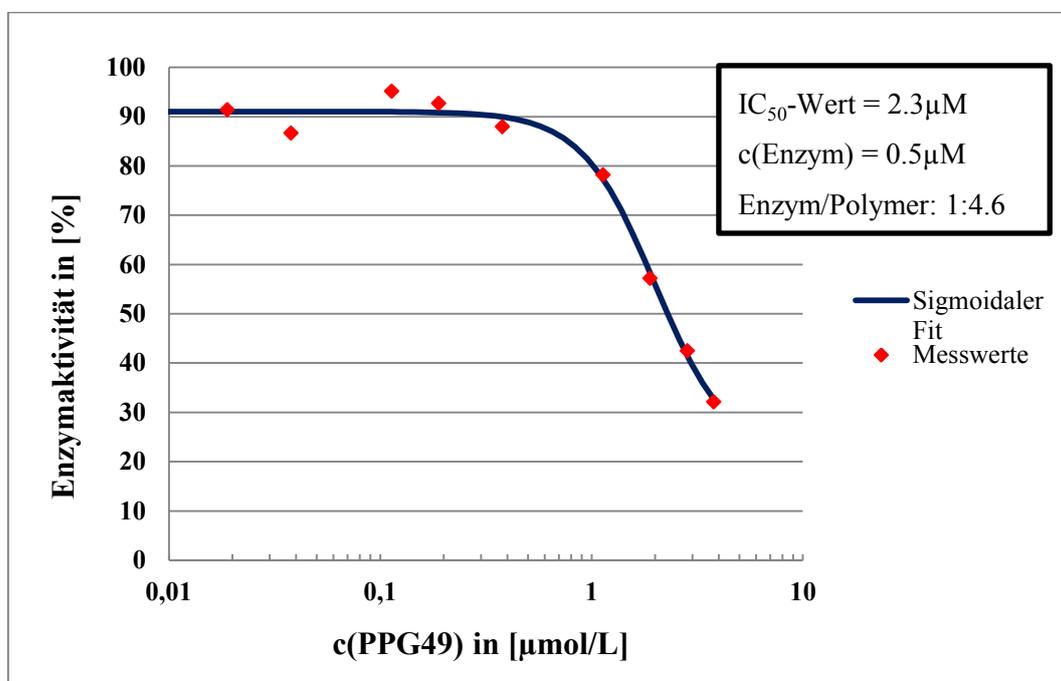


**Abb. 5.5.50:** Screening der 8. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Trypsin zugeordnet werden.<sup>[141]</sup>

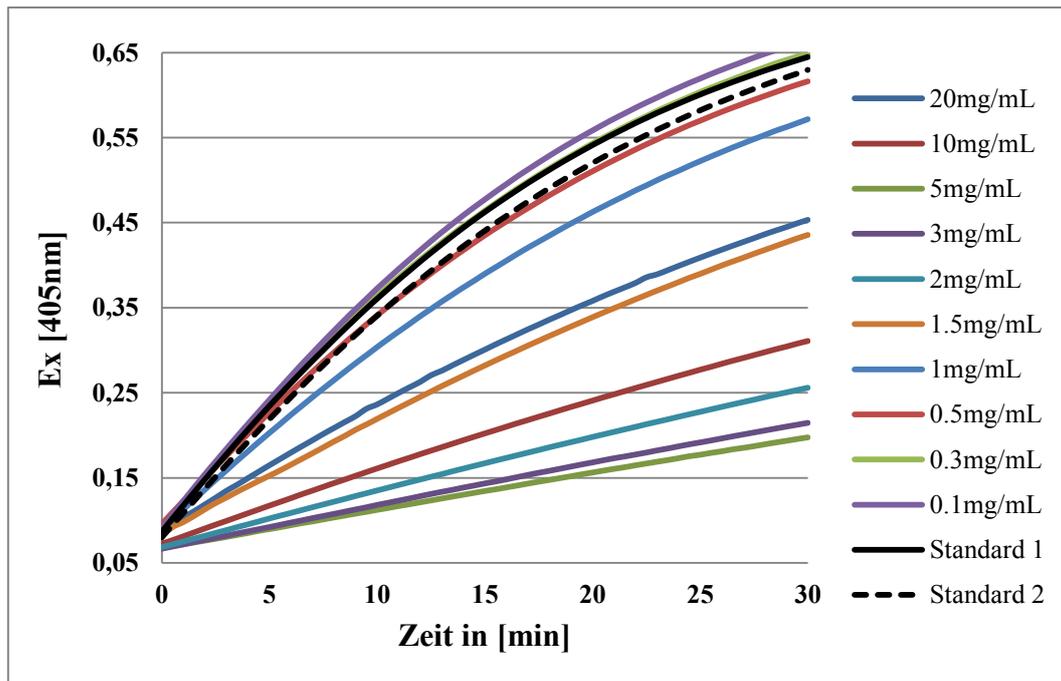
Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte der wirksamen Polymere 2:



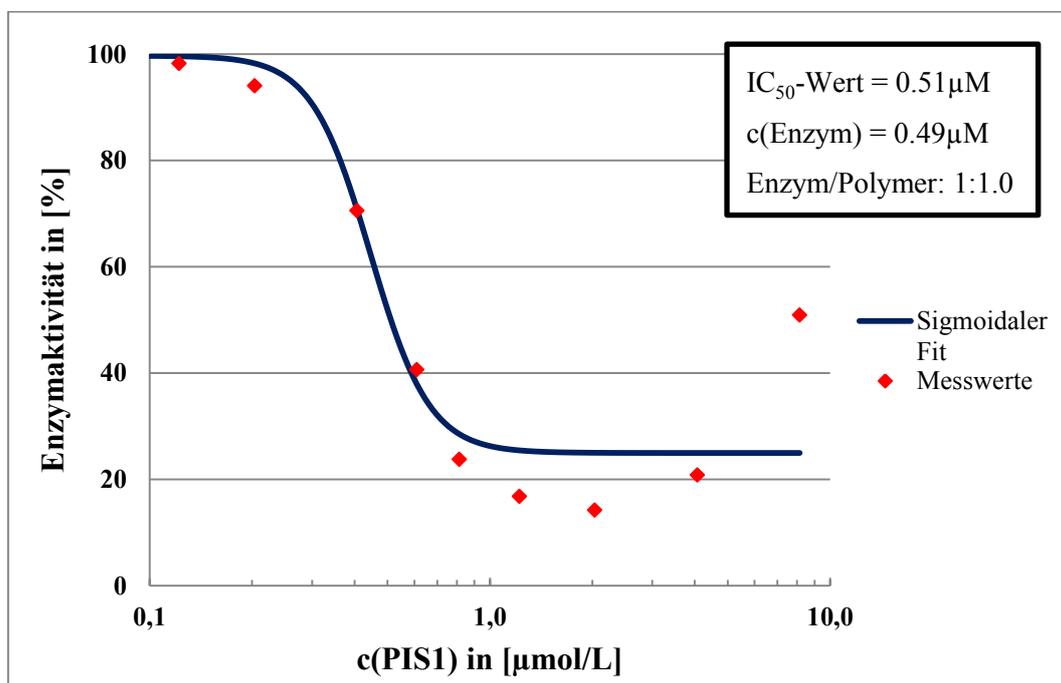
**Abb. 5.5.51:** Inhibition von Trypsin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PG49. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 10.0 - 0.02 mg/mL.



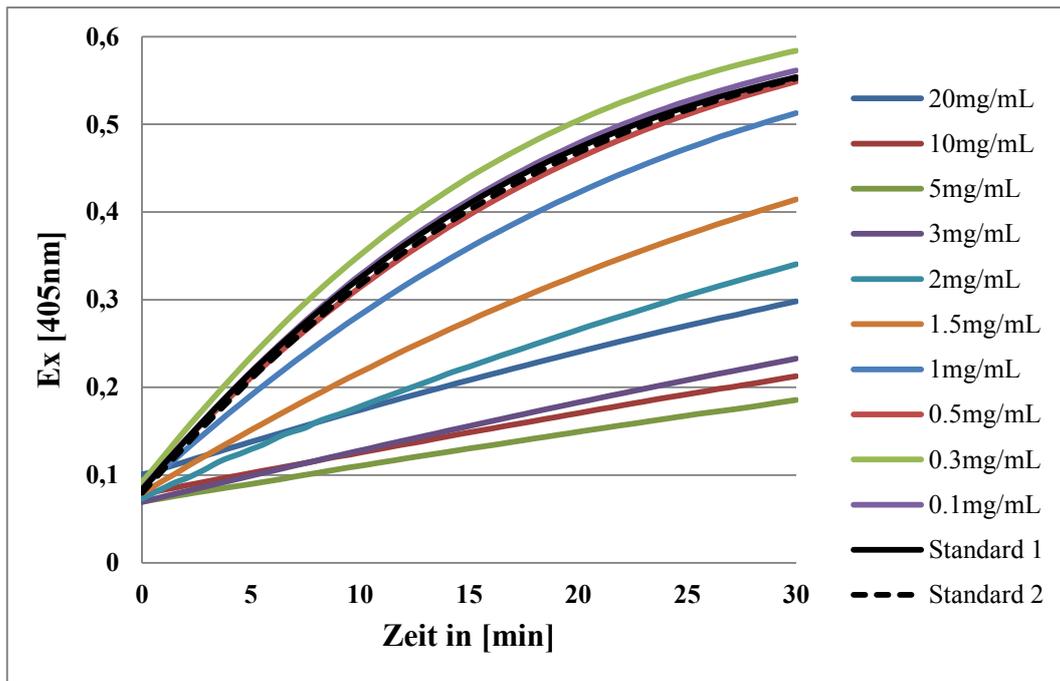
**Abb. 5.5.52:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG49 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (2.3  $\mu$ M bei einer 0.5  $\mu$ M Enzymkonzentration).



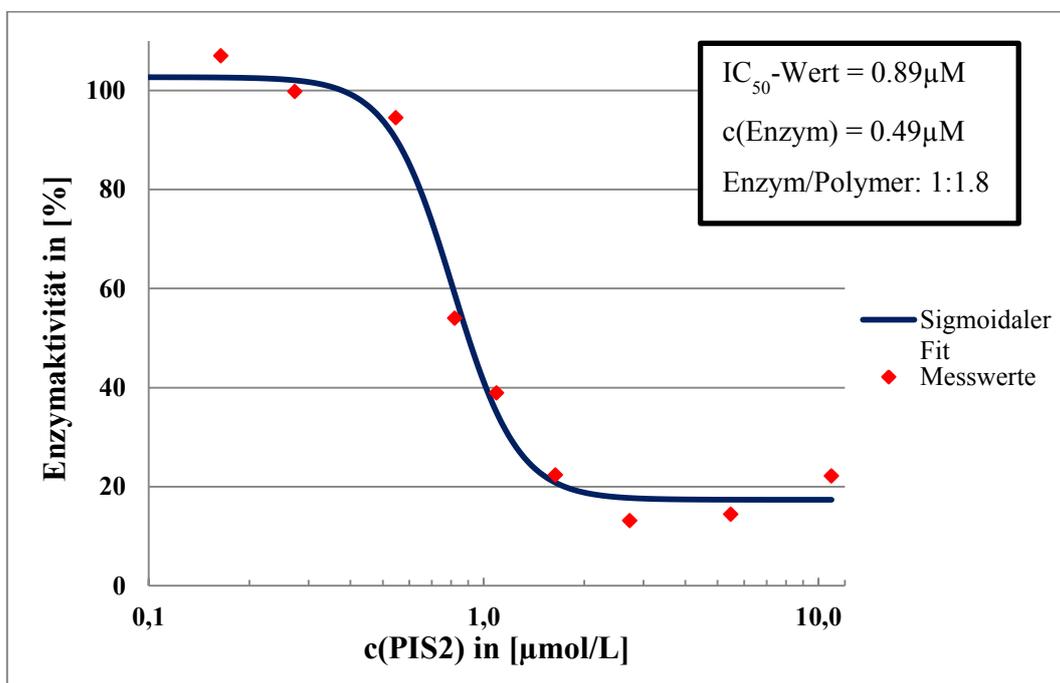
**Abb. 5.5.53:** Inhibition von Trypsin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von IS1. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 20,0 - 0,1 mg/mL.<sup>[141]</sup>



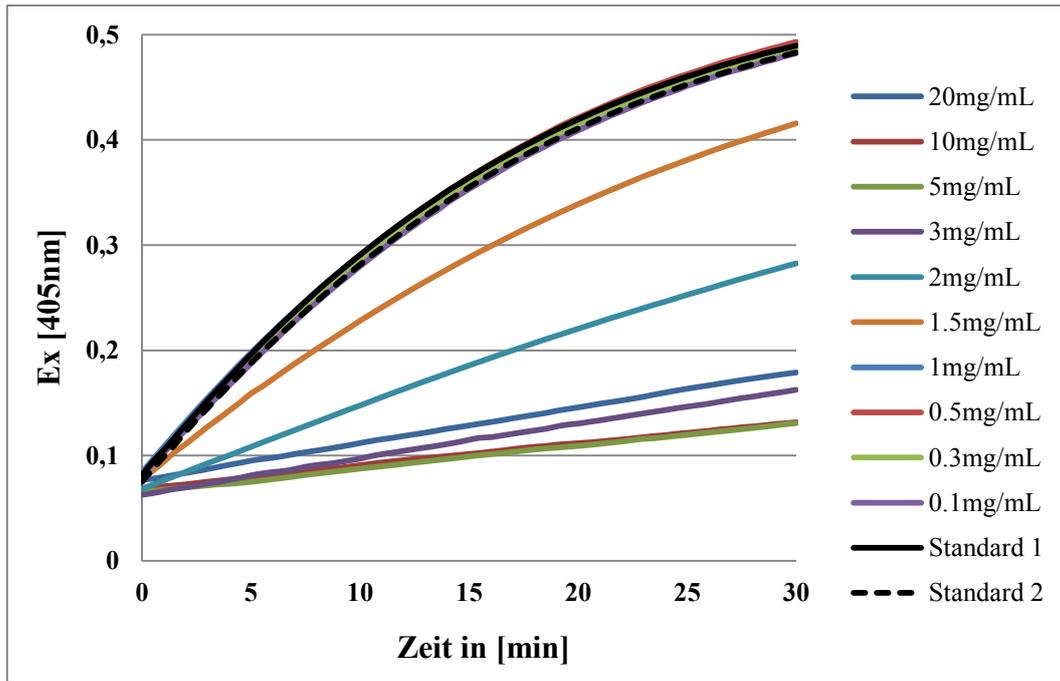
**Abb. 5.5.54:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PIS1 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes ( $0.51 \mu\text{M}$  bei einer  $0.49 \mu\text{M}$  Enzymkonzentration).<sup>[141]</sup>



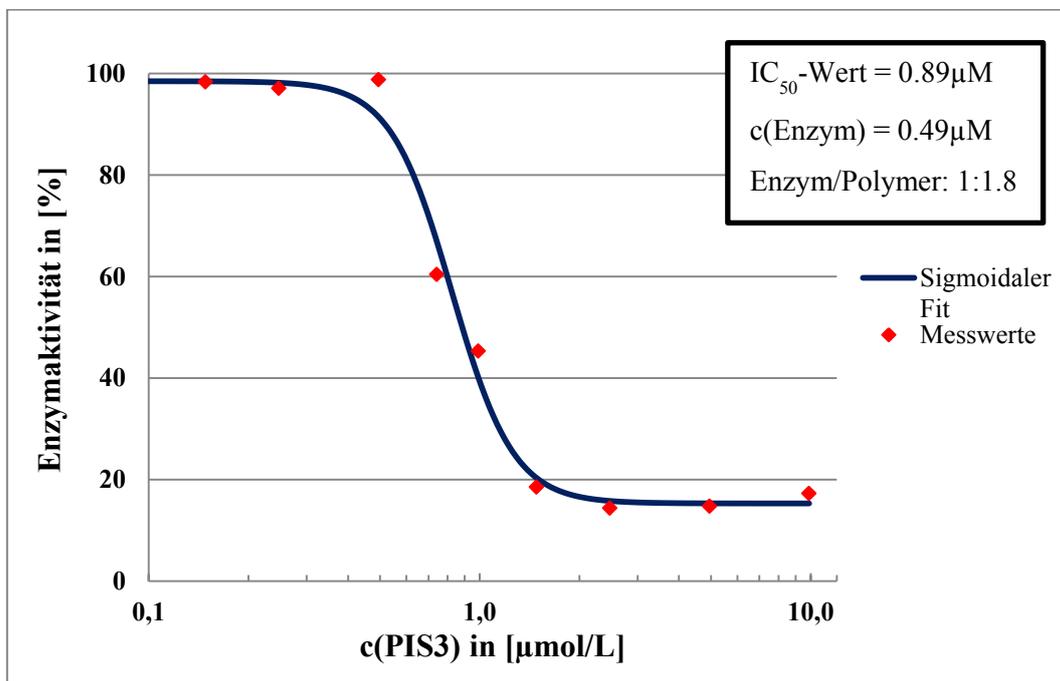
**Abb. 5.5.55:** Inhibition von Trypsin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von IS2. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 20.0 - 0.1 mg/mL.<sup>[141]</sup>



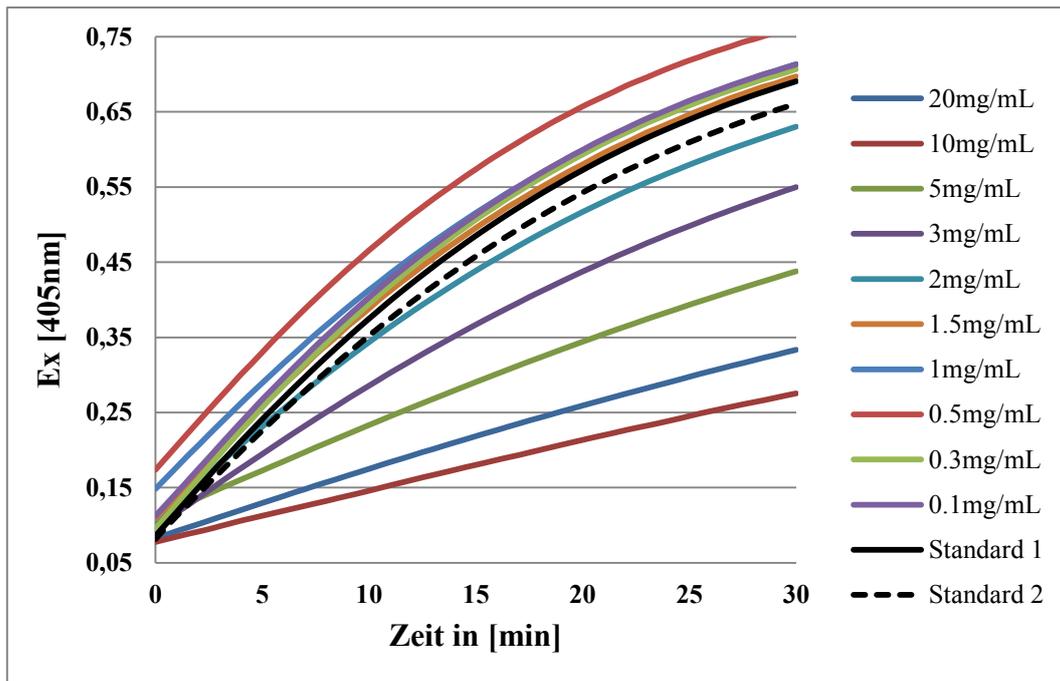
**Abb. 5.5.56:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PIS2 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes ( $0.89 \mu\text{M}$  bei einer  $0.49 \mu\text{M}$  Enzymkonzentration).<sup>[141]</sup>



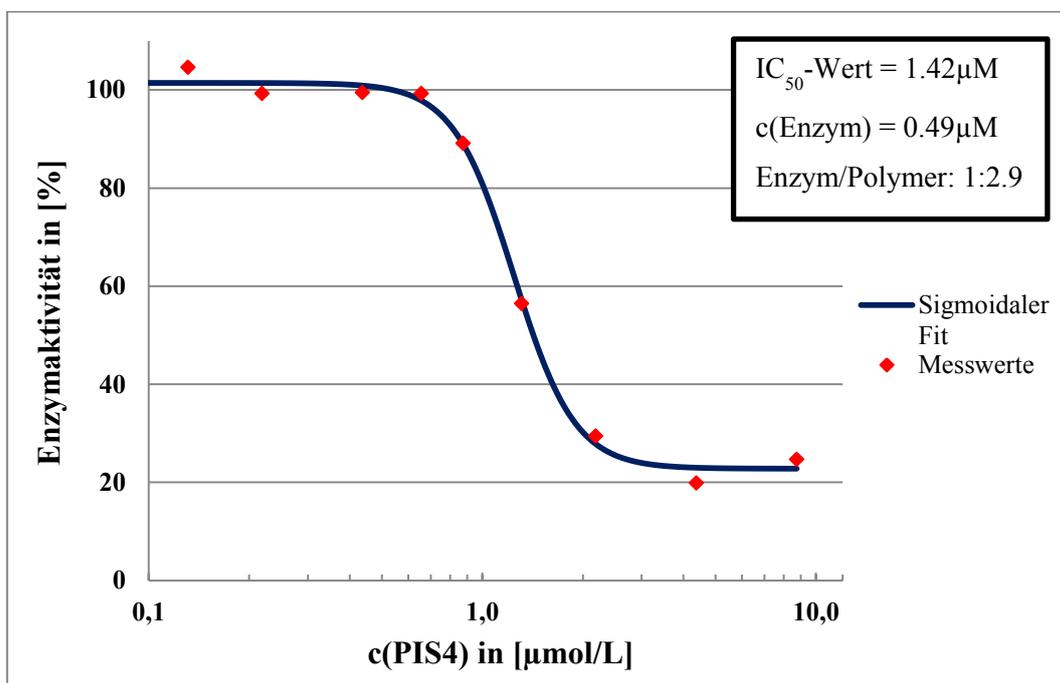
**Abb. 5.5.57:** Inhibition von Trypsin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von IS3. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 20.0 - 0.1 mg/mL.<sup>[141]</sup>



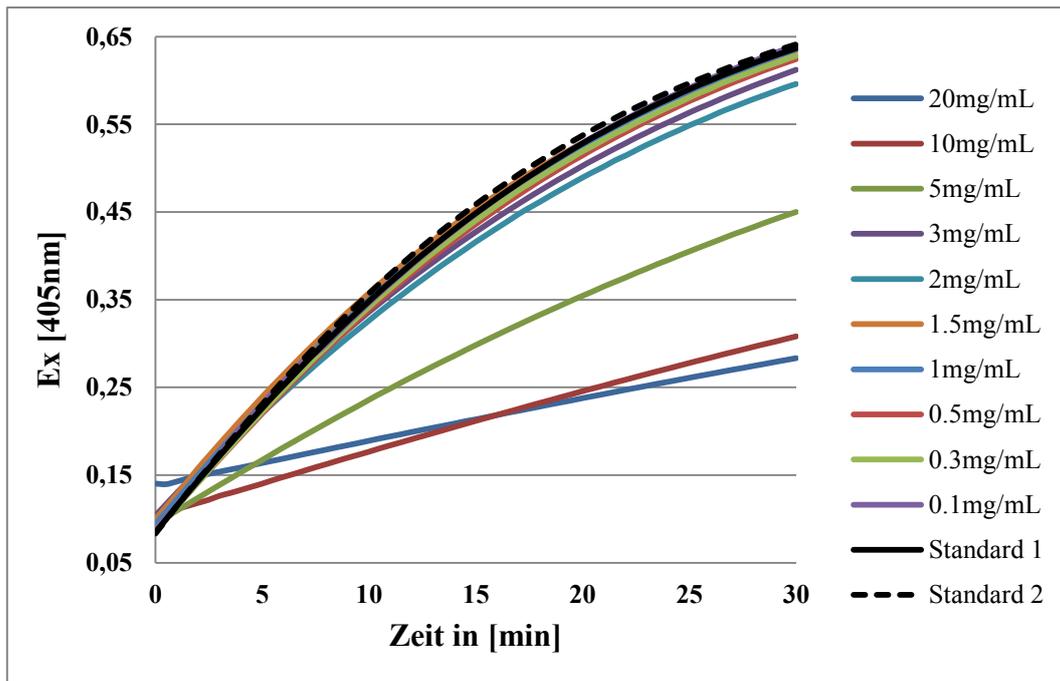
**Abb. 5.5.58:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PIS3 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes ( $0.89 \mu\text{M}$  bei einer  $0.49 \mu\text{M}$  Enzymkonzentration).<sup>[141]</sup>



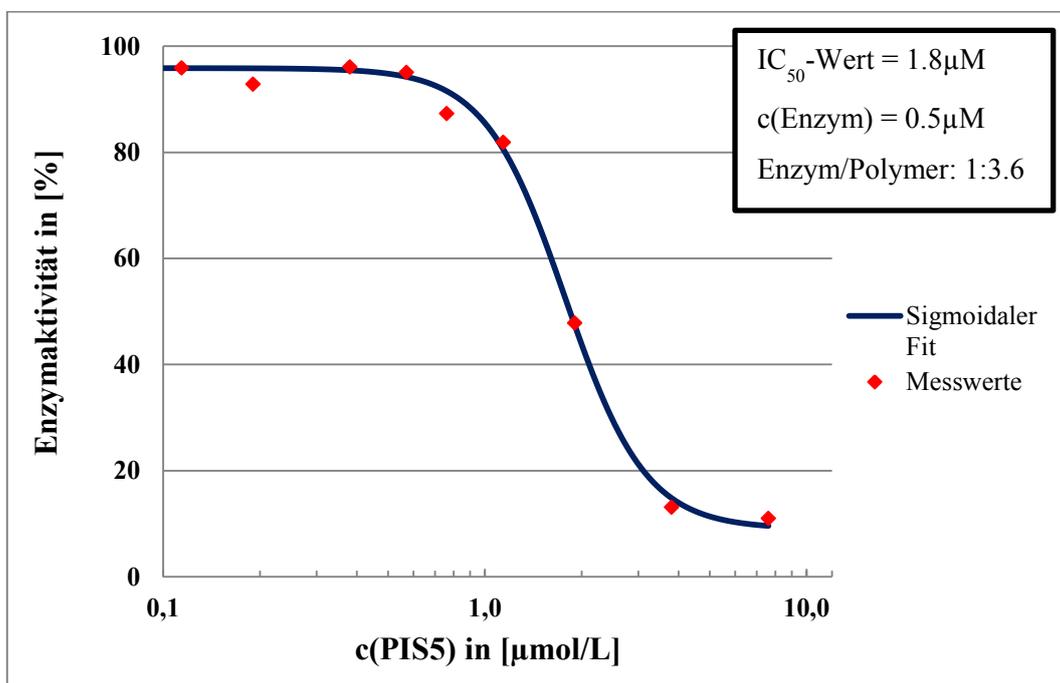
**Abb. 5.5.59:** Inhibition von Trypsin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von IS4. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 20,0 - 0,1 mg/mL.<sup>[141]</sup>



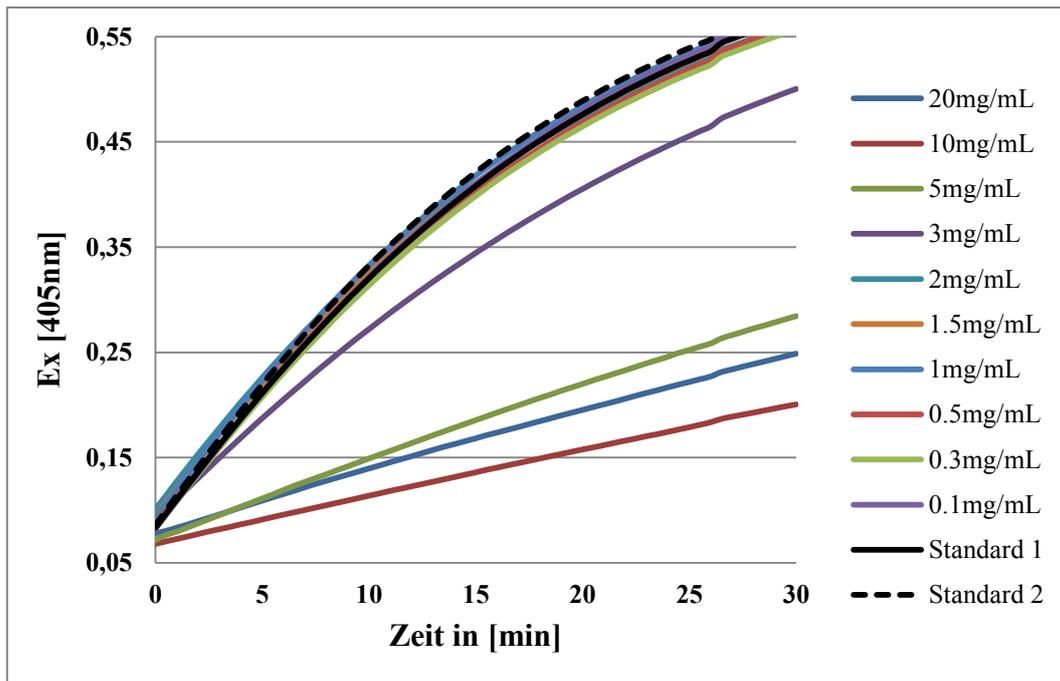
**Abb. 5.5.60:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PIS4 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (1,42  $\mu$ M bei einer 0,49  $\mu$ M Enzymkonzentration).<sup>[141]</sup>



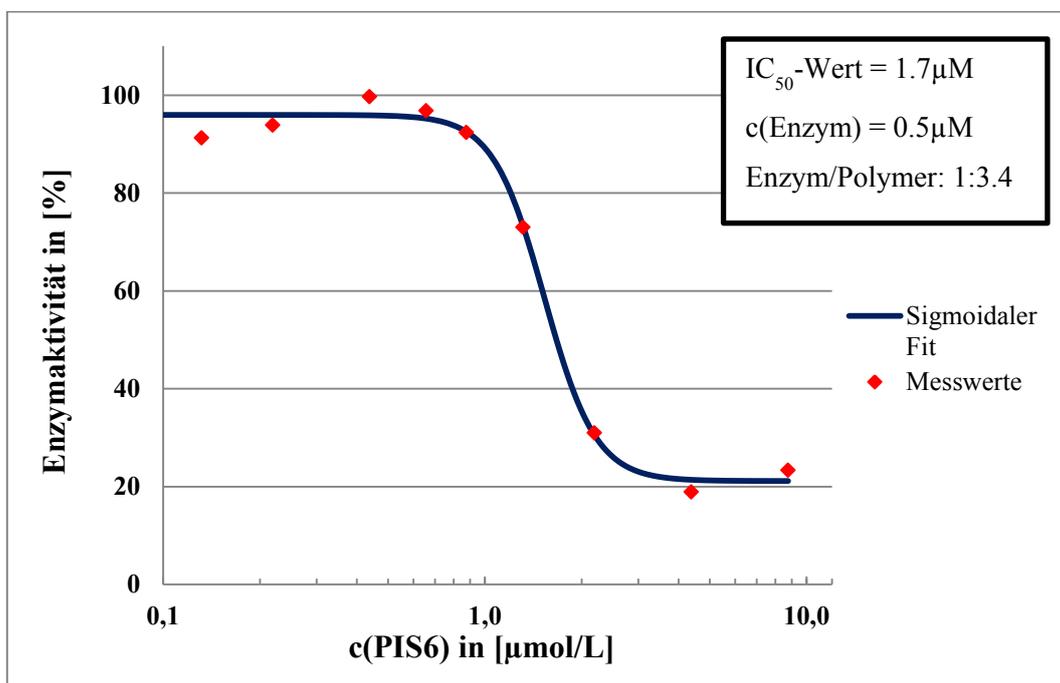
**Abb. 5.5.61:** Inhibition von Trypsin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von IS5. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 20.0 - 0.1 mg/mL.<sup>[141]</sup>



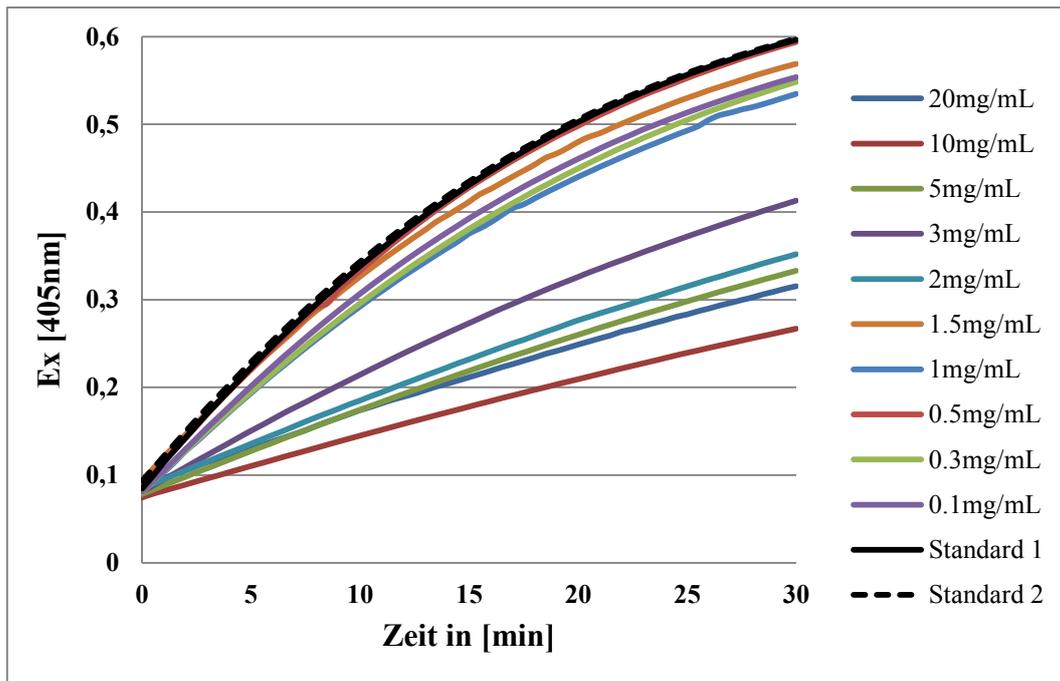
**Abb. 5.5.62:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PIS5 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (1.8  $\mu$ M bei einer 0.5  $\mu$ M Enzymkonzentration).<sup>[141]</sup>



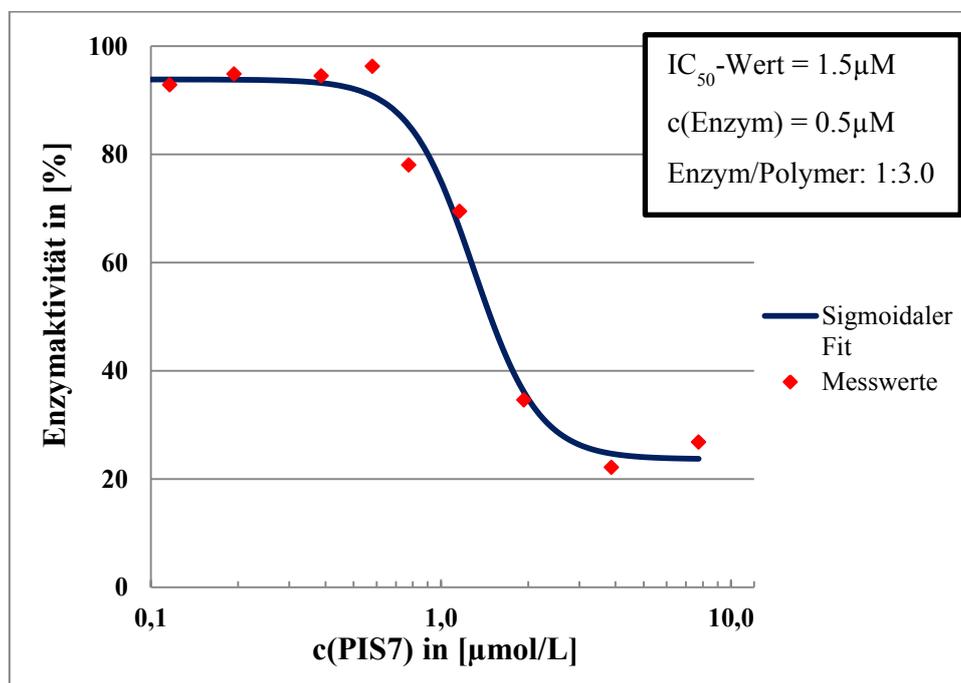
**Abb. 5.5.63:** Inhibition von Trypsin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von IS6. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 20.0 - 0.1 mg/mL.<sup>[141]</sup>



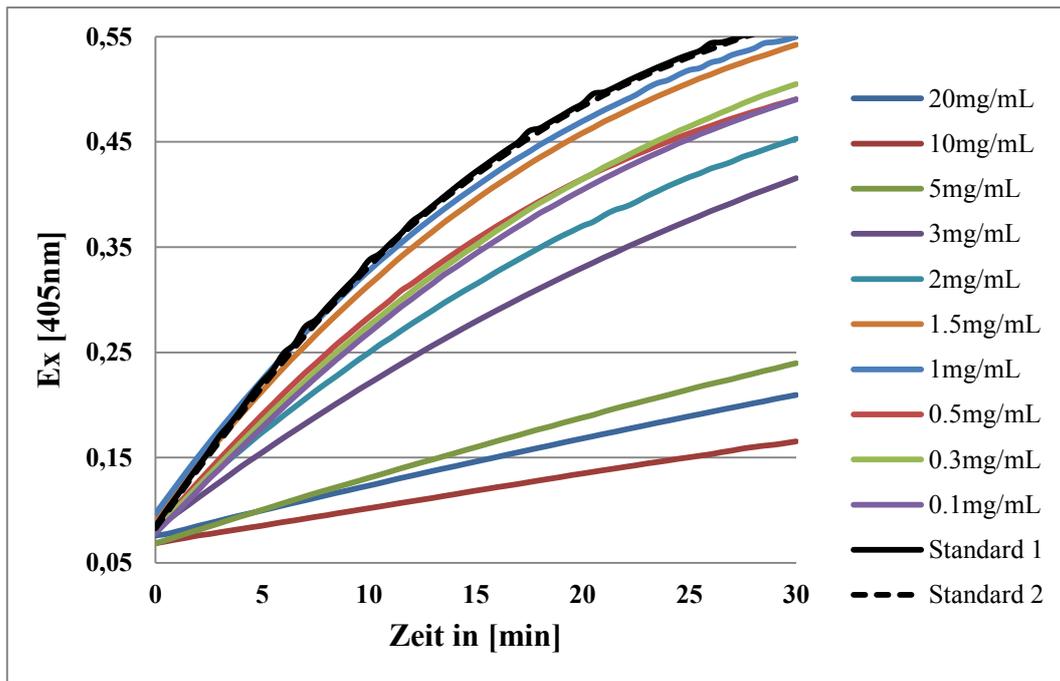
**Abb. 5.5.64:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PIS6 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes ( $1.7 \mu\text{M}$  bei einer  $0.5 \mu\text{M}$  Enzymkonzentration).<sup>[141]</sup>



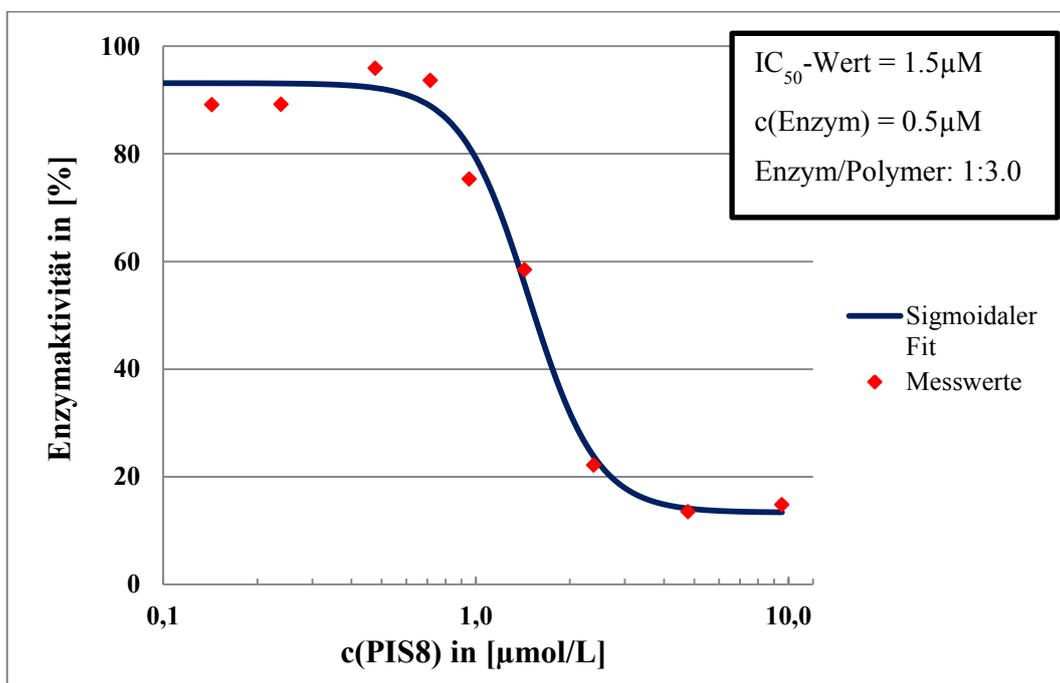
**Abb. 5.5.65:** Inhibition von Trypsin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von IS7. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 20.0 - 0.1 mg/mL.<sup>[141]</sup>



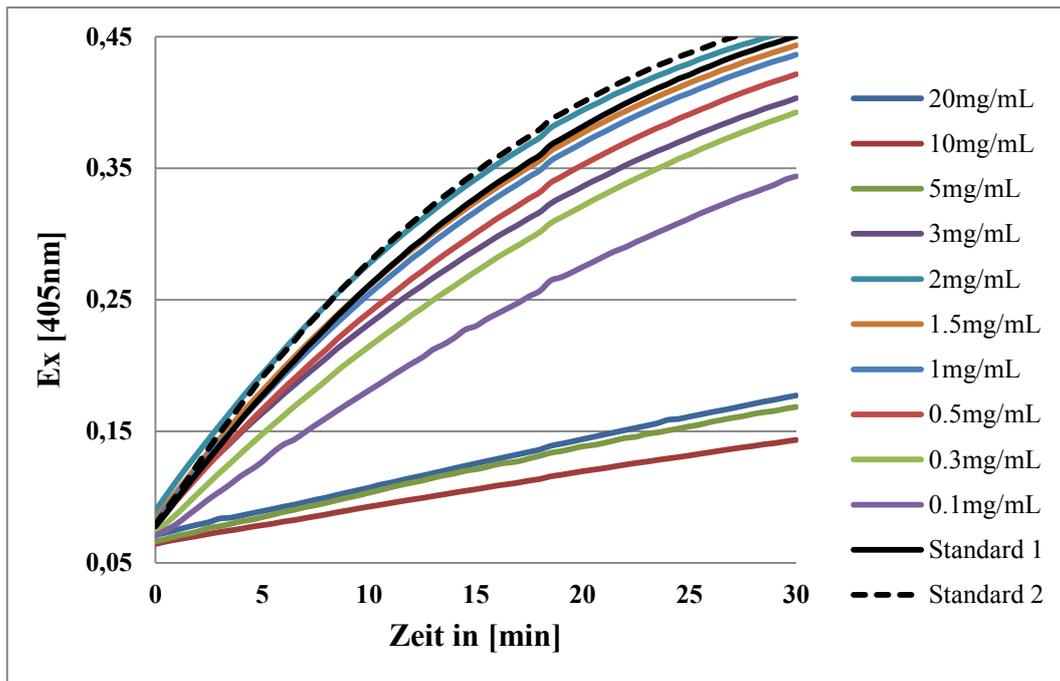
**Abb. 5.5.66:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PIS7 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (1.5 µM bei einer 0.5 µM Enzymkonzentration).<sup>[141]</sup>



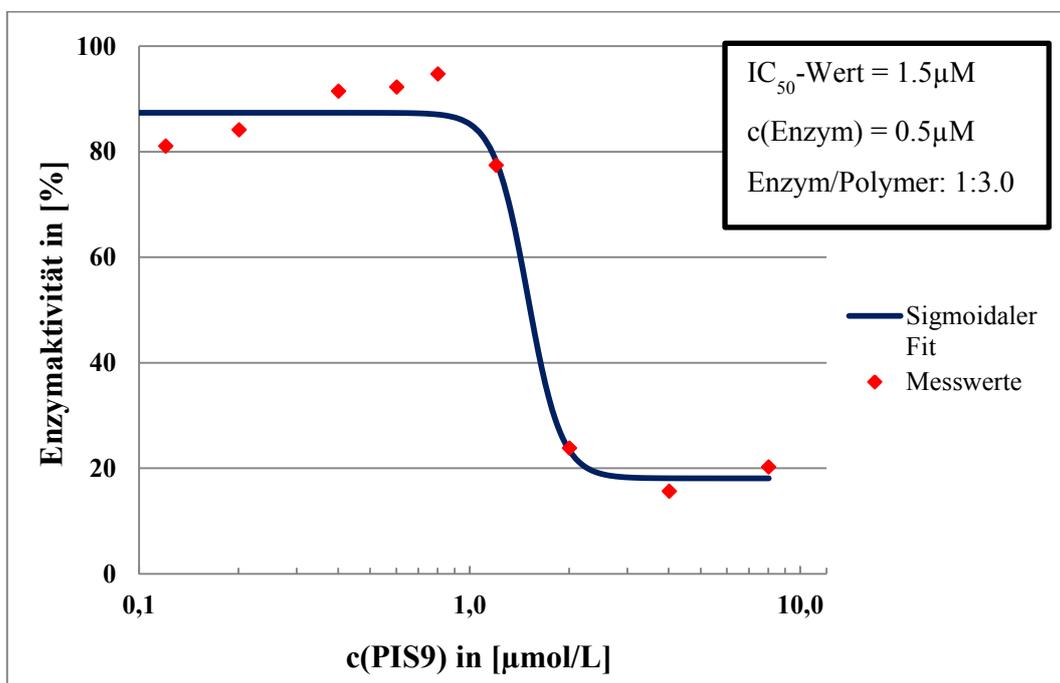
**Abb. 5.5.67:** Inhibition von Trypsin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von IS8. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 20,0 - 0,1 mg/mL.<sup>[141]</sup>



**Abb. 5.5.68:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PIS8 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (1,5  $\mu\text{M}$  bei einer 0,5  $\mu\text{M}$  Enzymkonzentration).<sup>[141]</sup>



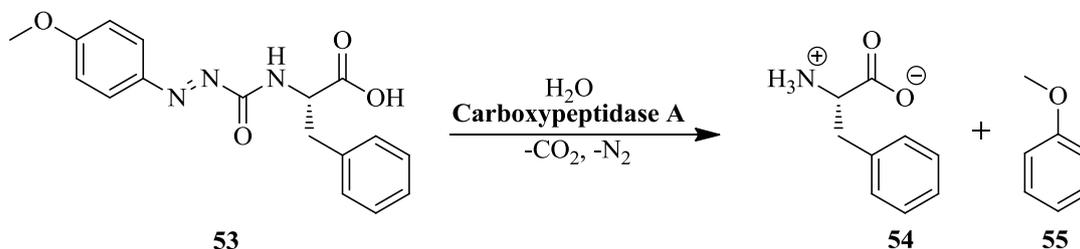
**Abb. 5.5.69:** Inhibition von Trypsin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von IS9. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 20,0 - 0,1 mg/mL.<sup>[141]</sup>



**Abb. 5.5.70:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PIS9 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (1,5  $\mu\text{M}$  bei einer 0,5  $\mu\text{M}$  Enzymkonzentration).<sup>[141]</sup>

### 5.5.4 Carboxypeptidase A Assay

Bei dem durchgeführten Assay fungierte *N*-(4-methoxyphenylazoformyl)-Phe-OH als künstliches Substrat **53**.



**Abb. 5.5.71:** Hydrolytische Spaltung von *N*-(4-methoxyphenylazoformyl)-Phe-OH **53** unter Freisetzung von Phe **54** und Methoxyphenyl **55**.<sup>[183]</sup>

Das verwendete Assay Kit wurde von *Sigma Aldrich* [CS1130] erworben.

#### Verwendete Lösungen:

Carboxypeptidase A Puffer:	Entspricht dem im Kit enthaltenen Puffer, pH $\approx$ 8.0.
Carboxypeptidase A-Lösung:	Enthalten im Assay Kit.
Substrat-Stock-Lösung:	Die <i>N</i> -(4-methoxyphenylazoformyl)-Phe-OH Lösung, war im Assay Kit enthalten.
Substrat -Lösung:	2 $\mu$ L Substrat-Stock-Lösung, 800 $\mu$ L bidest. Wasser und 200 $\mu$ L Puffer bilden die Substrat Lösung.

#### Durchführung:

89  $\mu$ L bzw. 97  $\mu$ L (Screening) bidest. Wasser wurden nacheinander mit 1  $\mu$ L Enzym-Lösung sowie mit 2  $\mu$ L (Screening) bzw. 10  $\mu$ L Polymer-Stammlösung versetzt. Anschließend folgte die Zugabe von 100  $\mu$ L Substrat-Lösung. Das Reaktionsgemisch wurde daraufhin sofort vermessen.

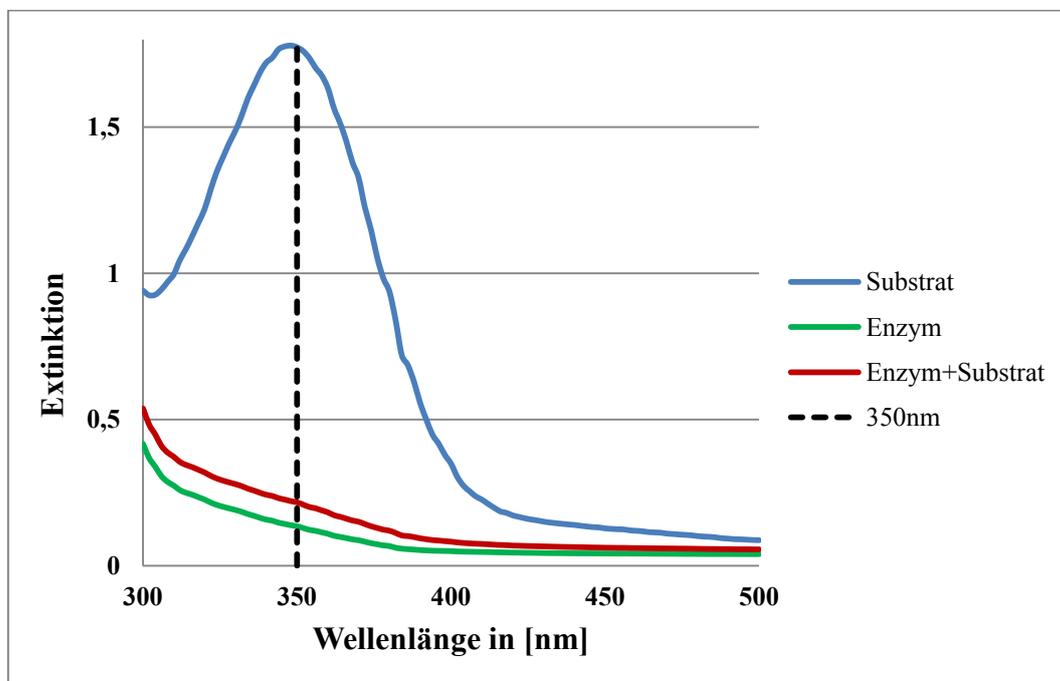
Vor der Messung wurde die 96-well Mikrotiterplatte 2 min lang geschüttelt. Die Messung erfolgte bei einer Temperatur von 25 °C und einer Wellenlänge von 350 nm. Nach 30 s

erfolgte die Aufnahme des Messwertes. Bei einer Gesamtmesszeit von 30 min. Vor jeder Messwertaufnahme wurde die Mikrotiterplatte 5 s geschüttelt.

**Tab. 5.5.5:** Tabellarische Zusammenfassung des Carboxypeptidase A Assays.

Verwendete Lösungen	Volumen	Konzentration	Konzentration im Assay
Enzym	1 $\mu\text{L}$	unbekannt	unbekannt
Polymer bzw. Wasser	2 bzw. 10 $\mu\text{L}$	20.0 mg/mL	0.2 bzw. 1.0 mg/mL
Bidest. Wasser	97 bzw. 89 $\mu\text{L}$	-	-
keine Vorinkubation			
Substrat	100 $\mu\text{L}$	unbekannt	unbekannt
Gesamtvolumen	200 $\mu\text{L}$		

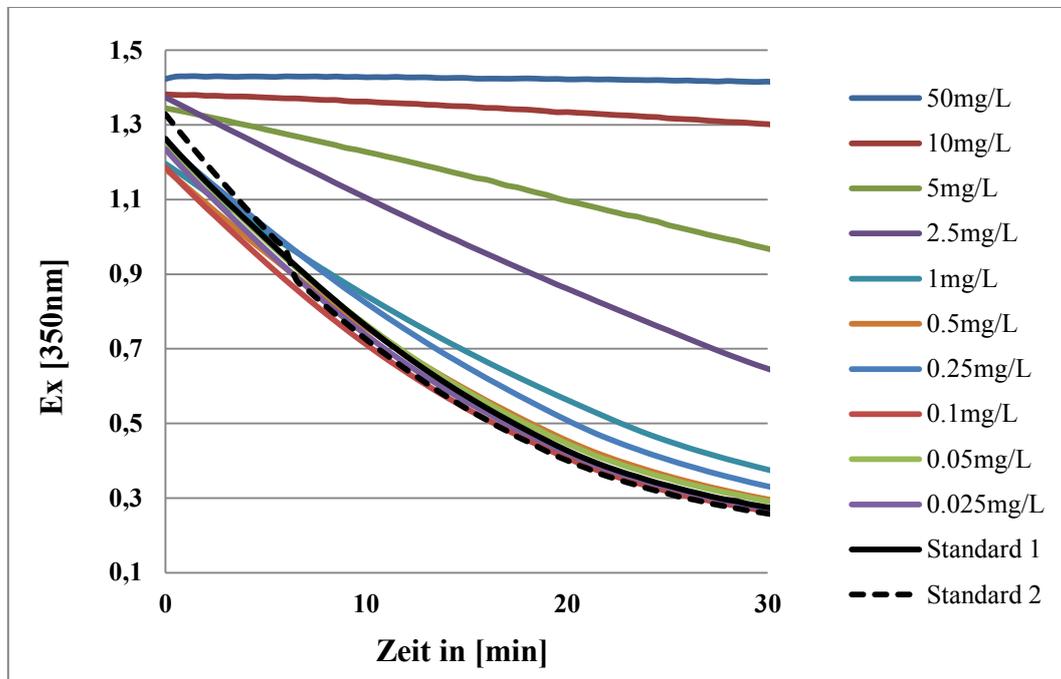
Absorptionsspektrum:



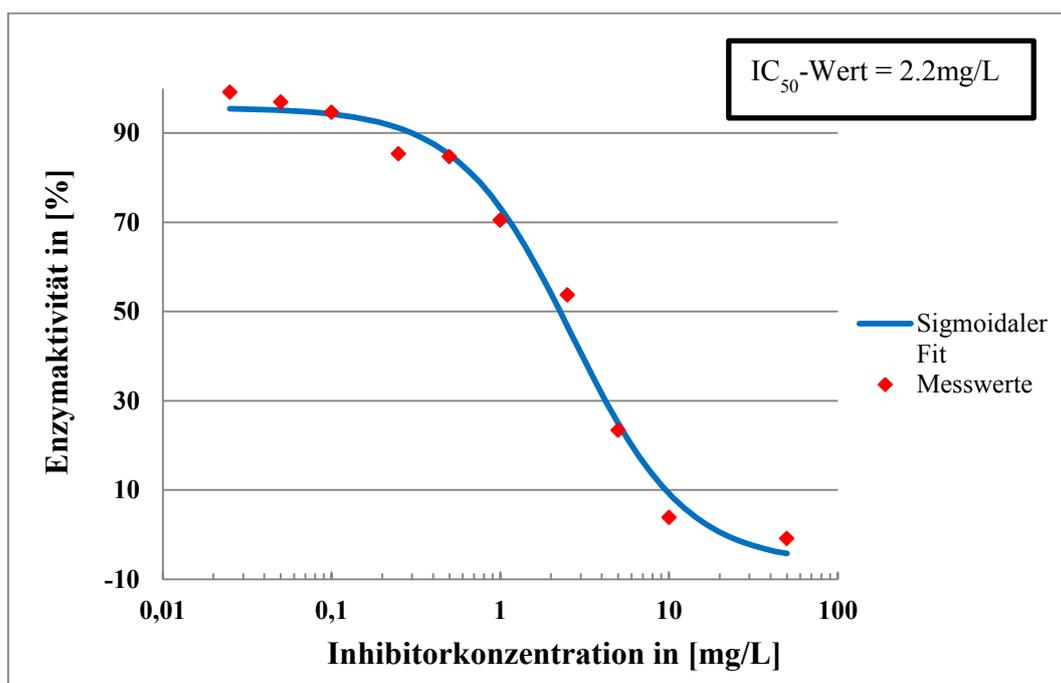
**Abb. 5.5.72:** Übersichtsspektrum des Enzyms, Substrats (Chromophor) und der Hydrolyse Produkte im Carboxypeptidase A Assay.

### Inhibitionstest mit literaturbekanntem Hemmstoff:

Die Kontrollmessung wurde mit einem Hemmstoff der aus der „Kartoffelknolle“ gewonnen wurde durchgeführt, welcher im Assay Kit als Referenz beilag.

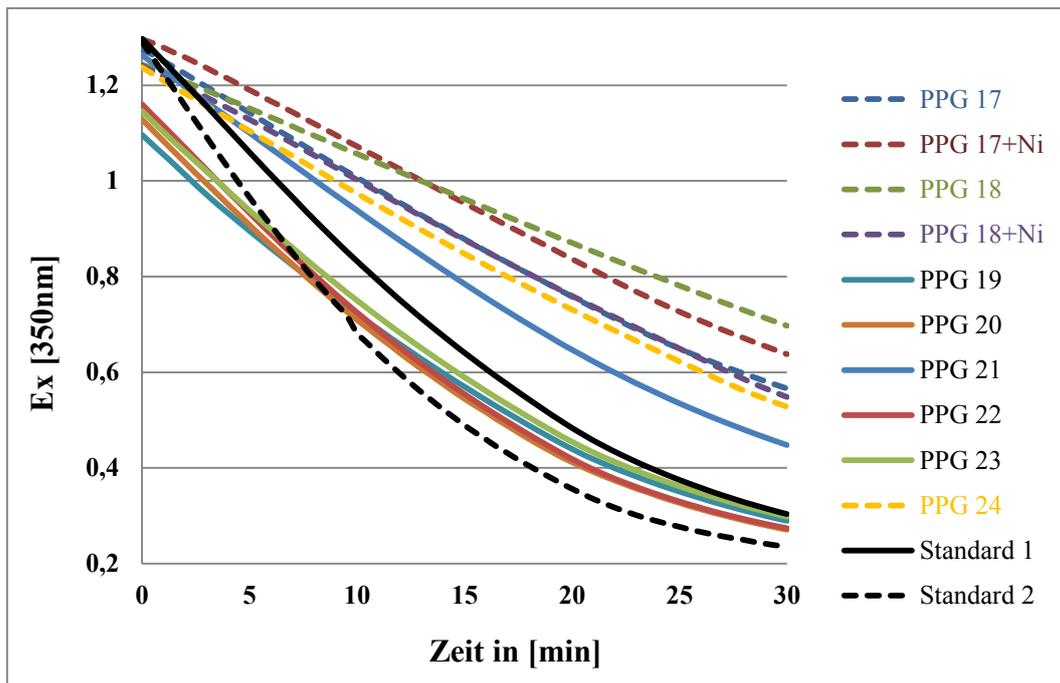


**Abb. 5.5.73:** Carboxypeptidase A Inhibitionstest mit Hemmstoff-Lösungen deren Massenkonzentrationen zwischen 0.025 - 50 mg/mL lagen.

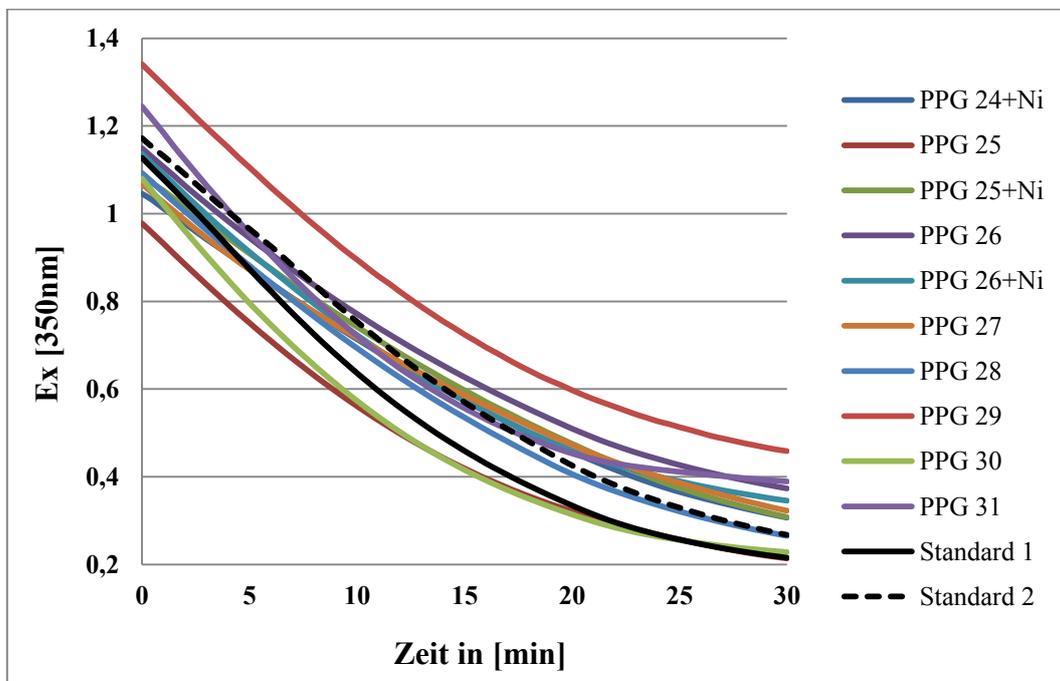


**Abb. 5.5.74:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung des im Assay Kit enthaltenen Hemmstoffes zur Ermittlung des IC<sub>50</sub>-Wertes (2.2 mg/L bei einer unbekanntem Enzymkonzentration).

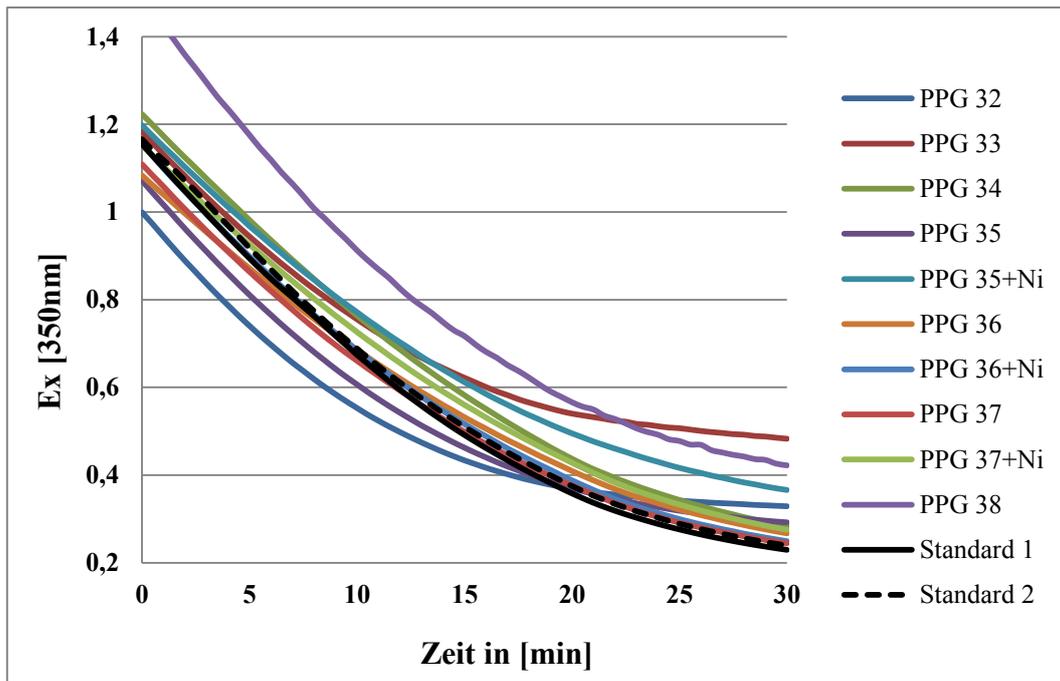
Screening der Polymere:



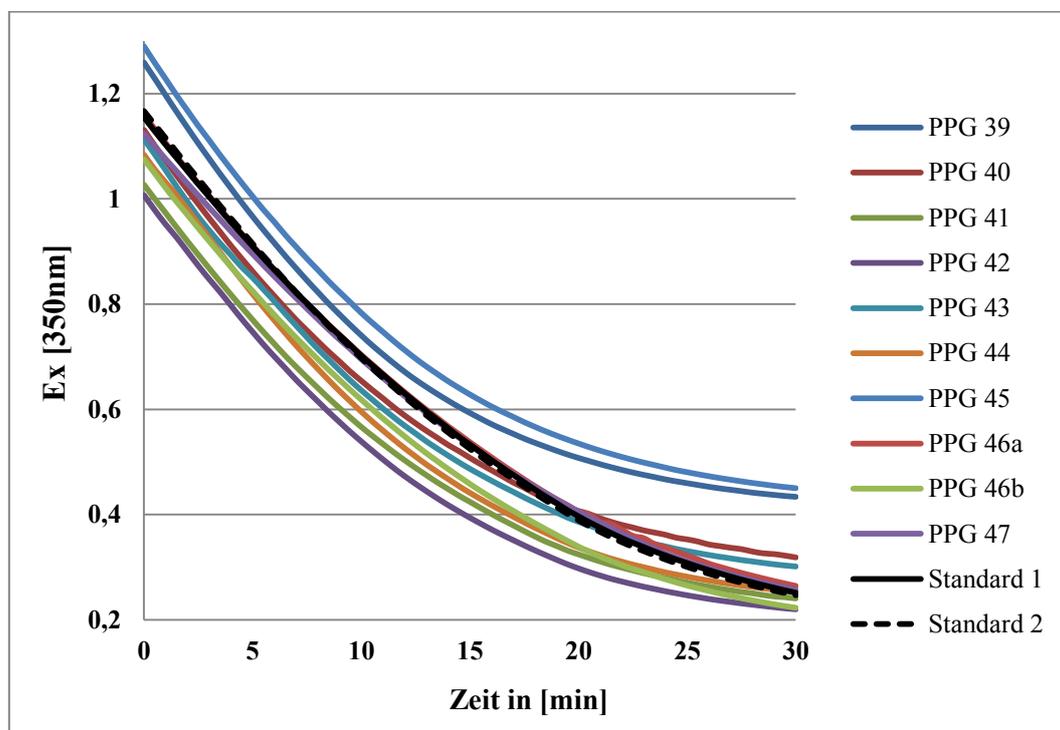
**Abb. 5.5.75:** Screening der 1. Polymerreihe. Polymer PG17 und Polymer PG18 zeigten mit und ohne Zusatz von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Carboxypeptidase A. Weiterhin zeigte Polymer PG24 eine hemmende Wirksamkeit gegenüber dem Enzym.



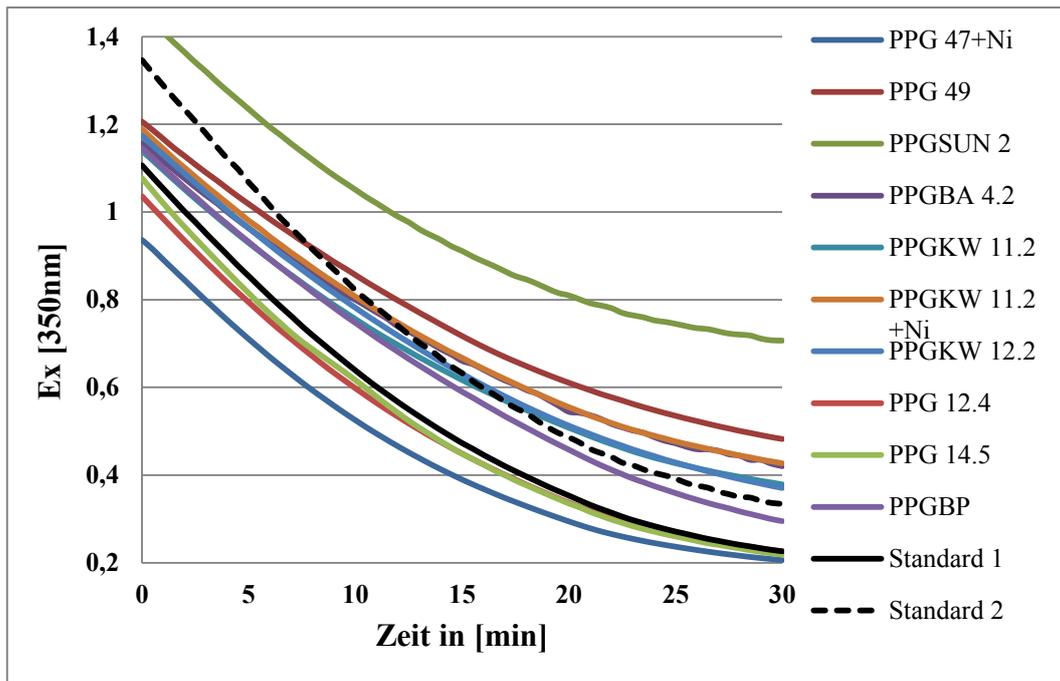
**Abb. 5.5.76:** Screening der 2. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Carboxypeptidase A zugeordnet werden.



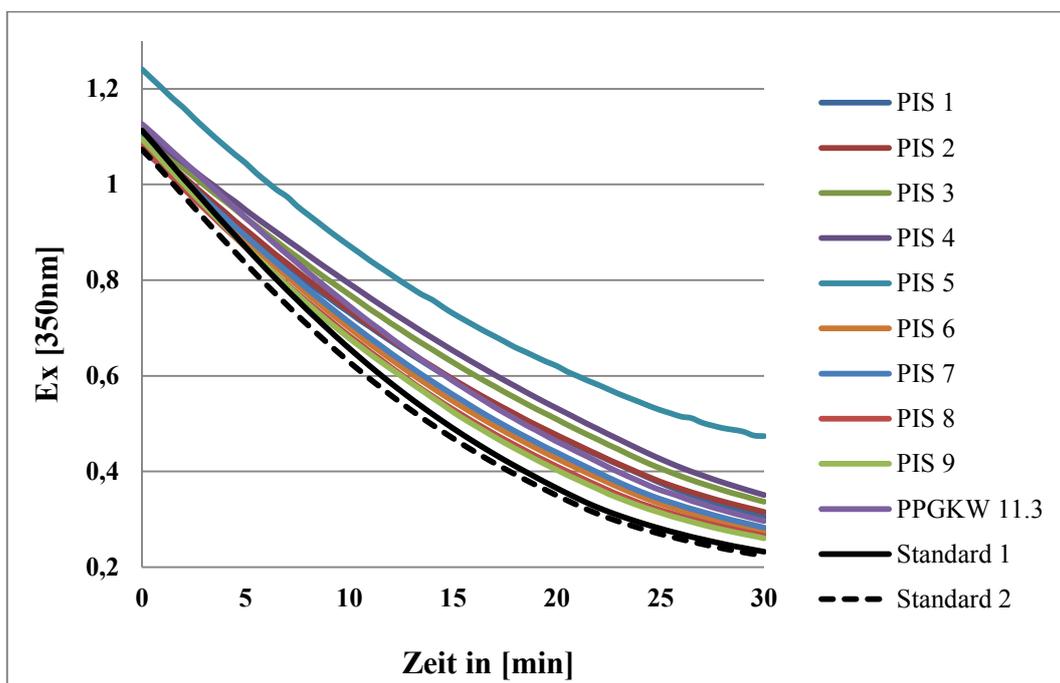
**Abb. 5.5.77:** Screening der 3. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Carboxypeptidase A zugeordnet werden.



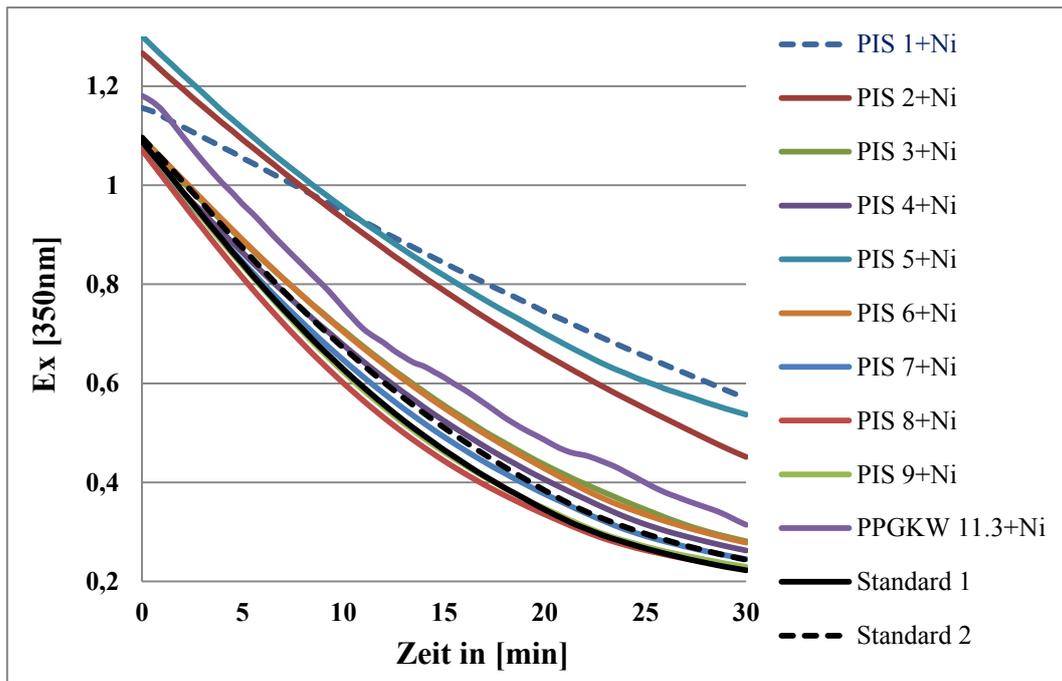
**Abb. 5.5.78:** Screening der 4. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Carboxypeptidase A zugeordnet werden.



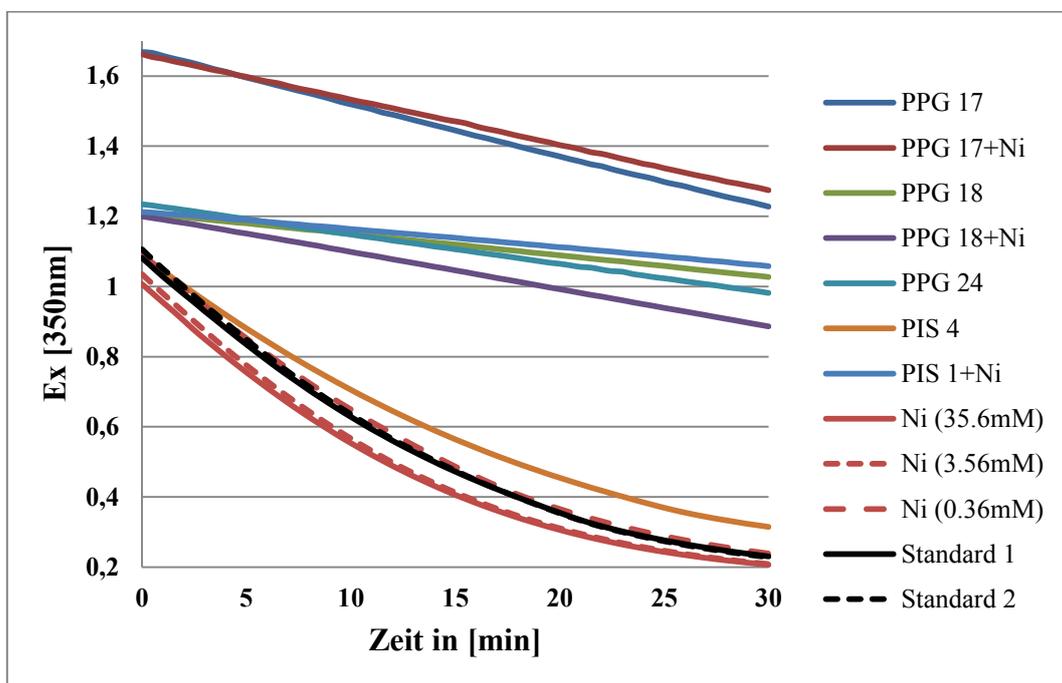
**Abb. 5.5.79:** Screening der 5. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Carboxypeptidase A zugeordnet werden.



**Abb. 5.5.80:** Screening der 6. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Carboxypeptidase A zugeordnet werden.

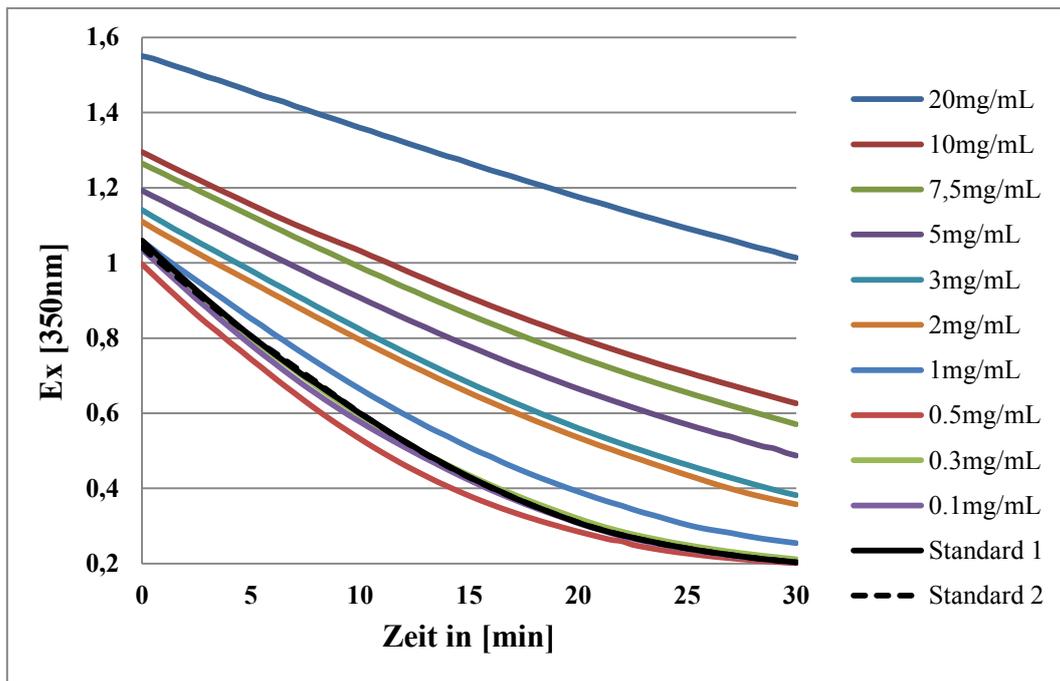


**Abb. 5.5.81:** Screening der 7. Polymerreihe. Lediglich Polymer IS1 zeigte durch Zusatz von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen einen inhibitorischen Effekt gegenüber Carboxypeptidase A.

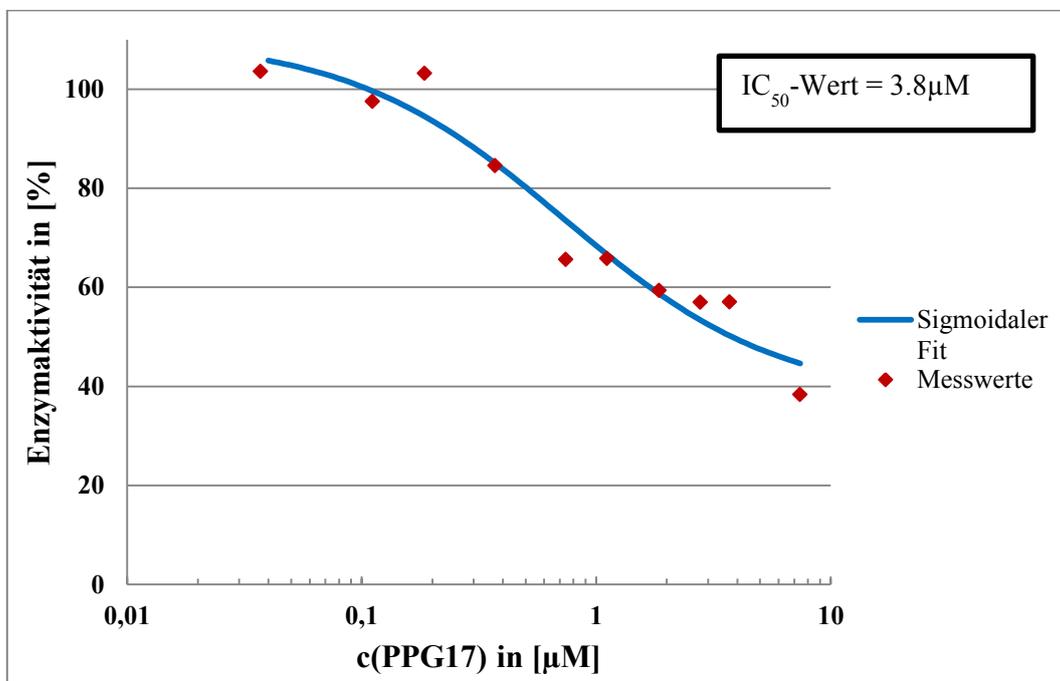


**Abb. 5.5.82:** Übersicht der wirksamen Polymere in fünffach erhöhter Konzentration. Weiterhin wurden als Blindproben verschieden konzentrierte  $\text{Ni}^{2+}$ -Lösungen sowie das im Screening unwirksame Polymer IS4 vermessen.

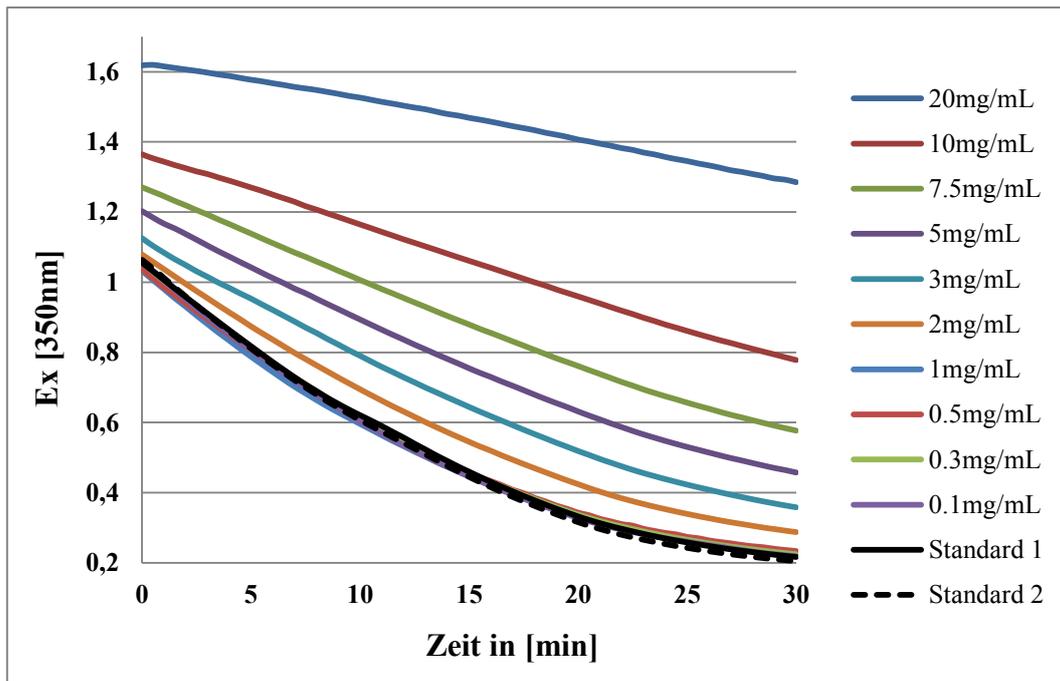
Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte der wirksamen Polymere:



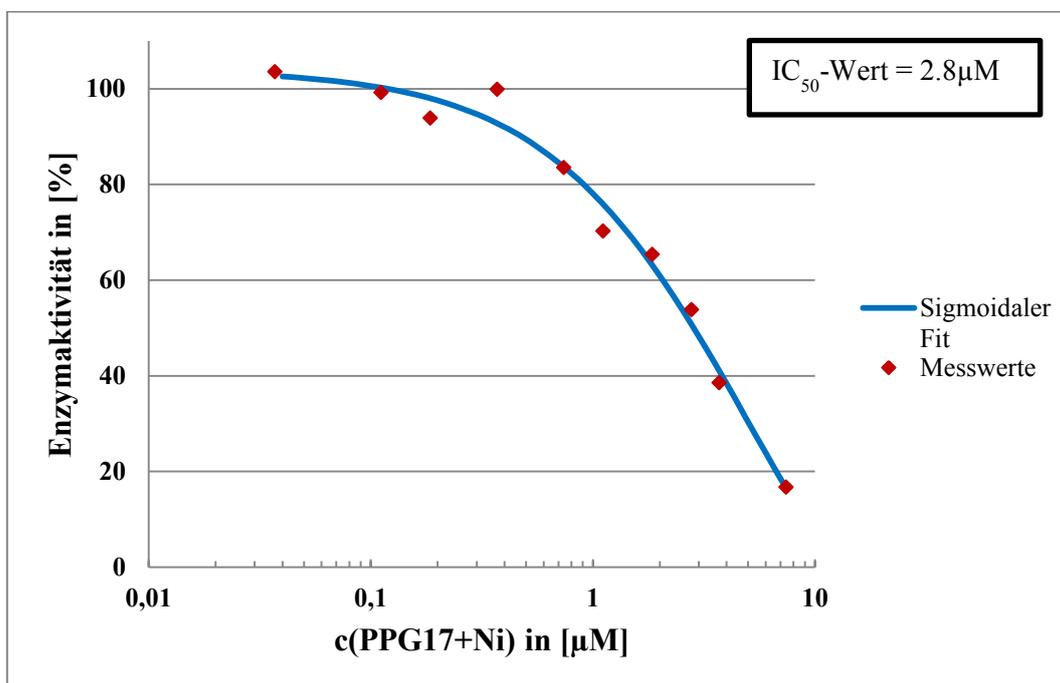
**Abb. 5.5.83:** Inhibition von Carboxypeptidase A in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PG17. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 20.0 - 0.1 mg/mL.



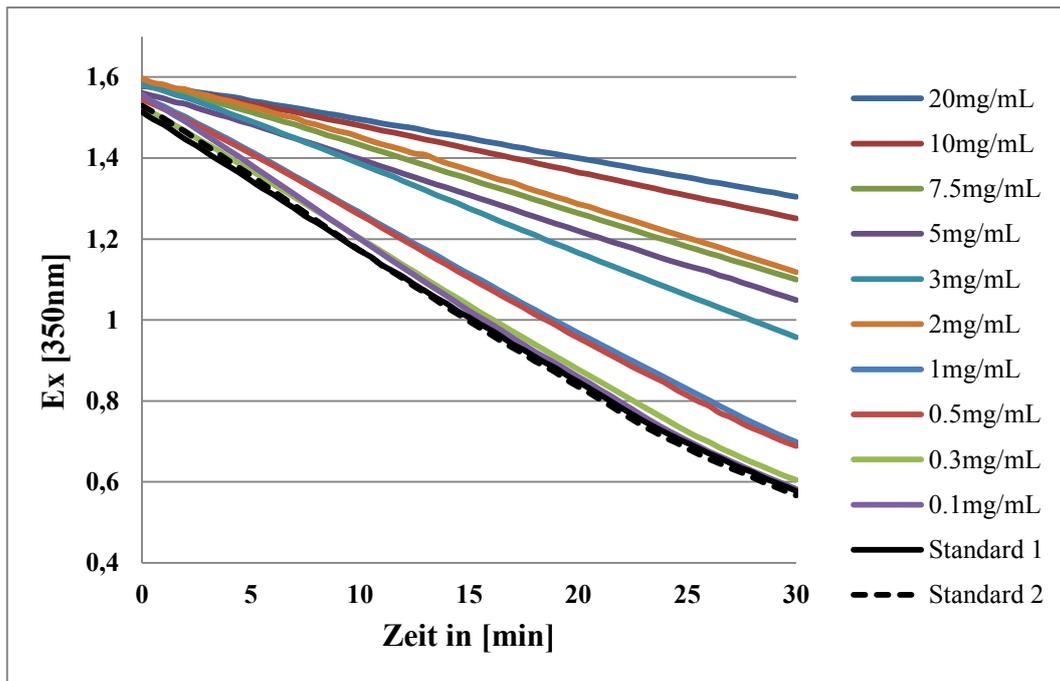
**Abb. 5.5.84:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG17 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes ( $3.8 \mu\text{M}$  bei einer unbekanntem Enzymkonzentration).



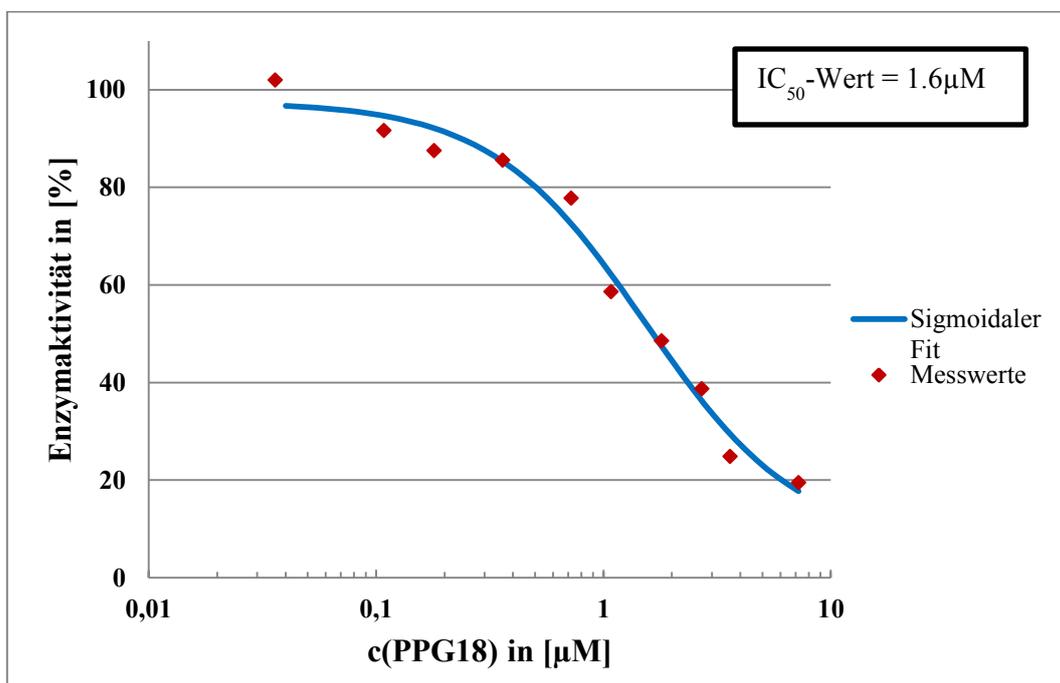
**Abb. 5.5.85:** Inhibition von Carboxypeptidase A in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PPG17+Ni. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 20.0 - 0.1 mg/mL.



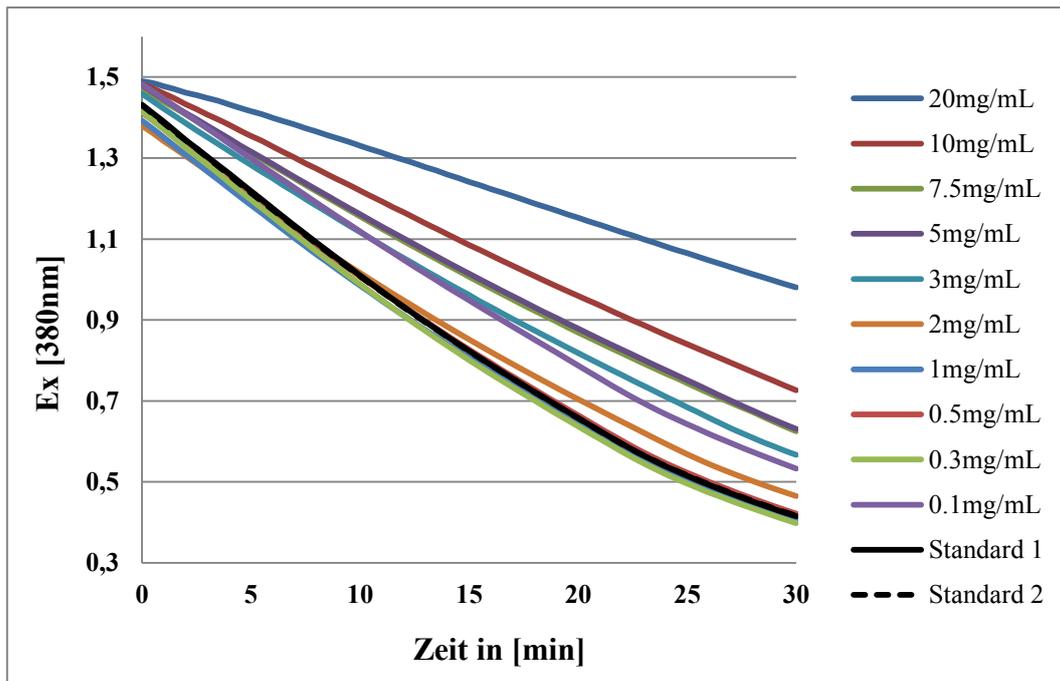
**Abb. 5.5.86:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG17+Ni zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (2.8 µM bei einer unbekanntem Enzymkonzentration).



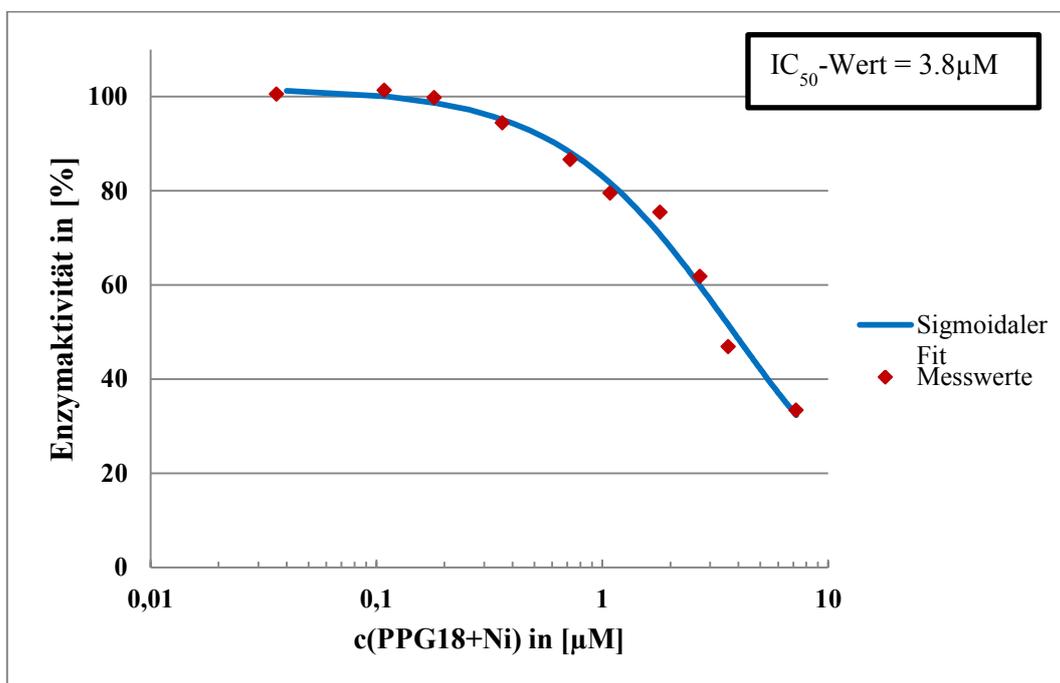
**Abb. 5.5.87:** Inhibition von Carboxypeptidase A in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PG18. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 20.0 - 0.1 mg/mL.



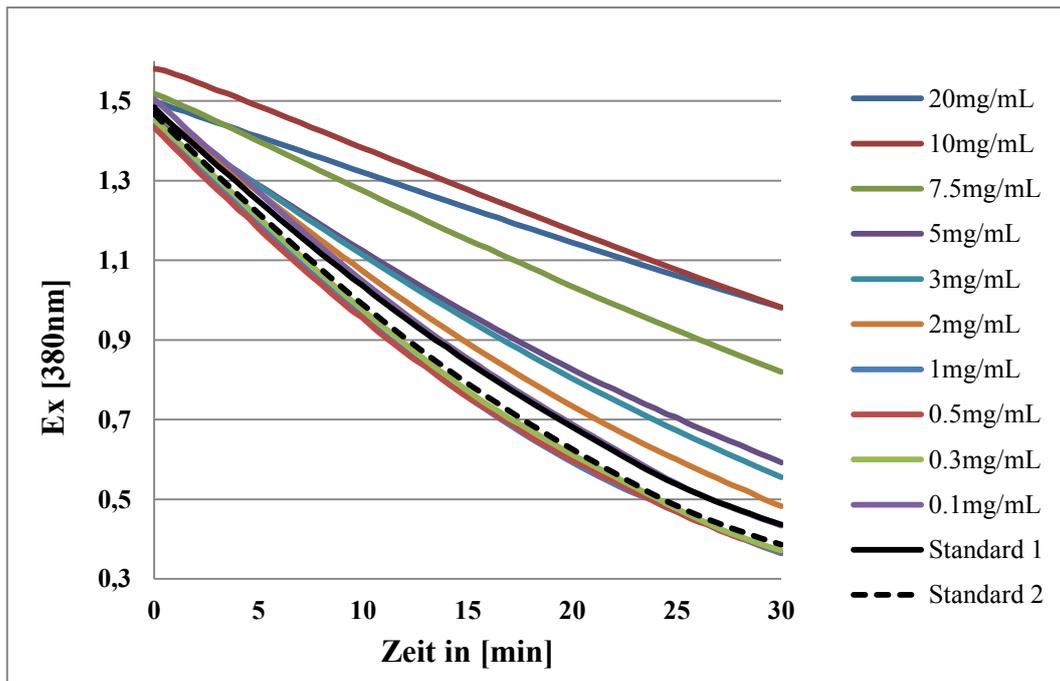
**Abb. 5.5.88:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG18 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes ( $1.6 \mu\text{M}$  bei einer unbekanntenen Enzymkonzentration).



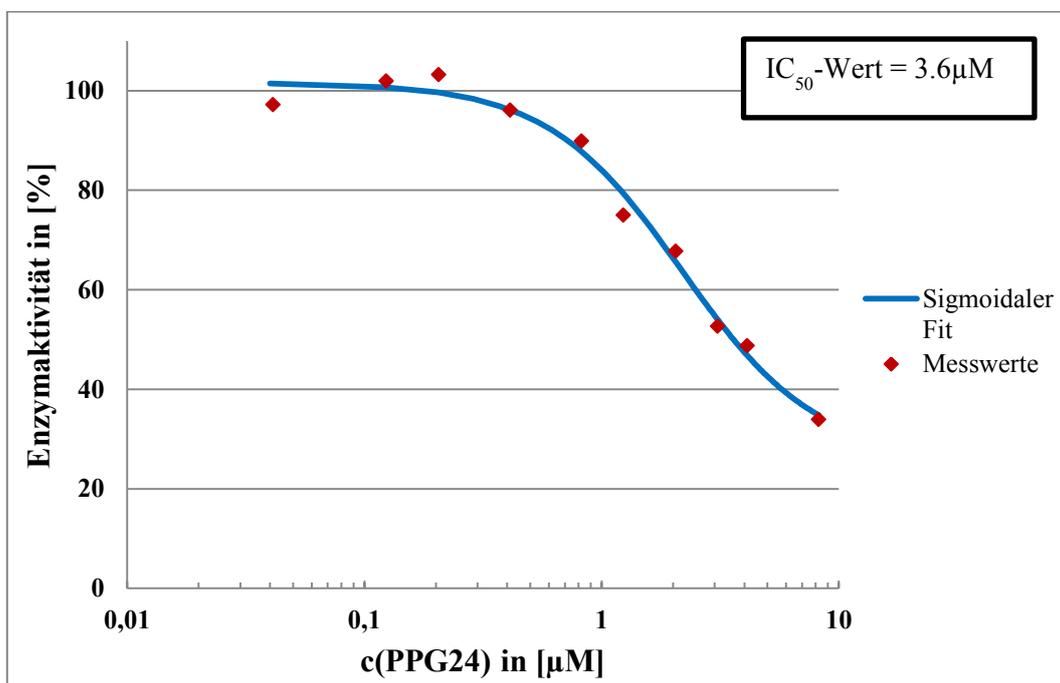
**Abb. 5.5.89:** Inhibition von Carboxypeptidase A in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PPG18+Ni. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 20.0 - 0.1 mg/mL.



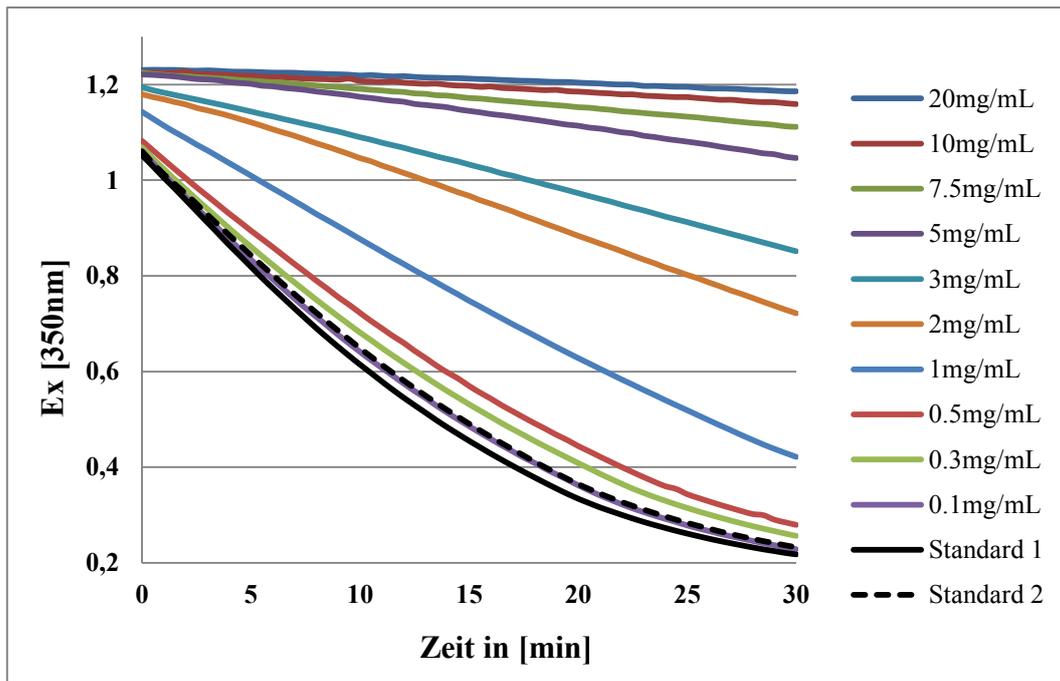
**Abb. 5.5.90:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG18+Ni zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes ( $3.8 \mu\text{M}$  bei einer unbekanntenen Enzymkonzentration).



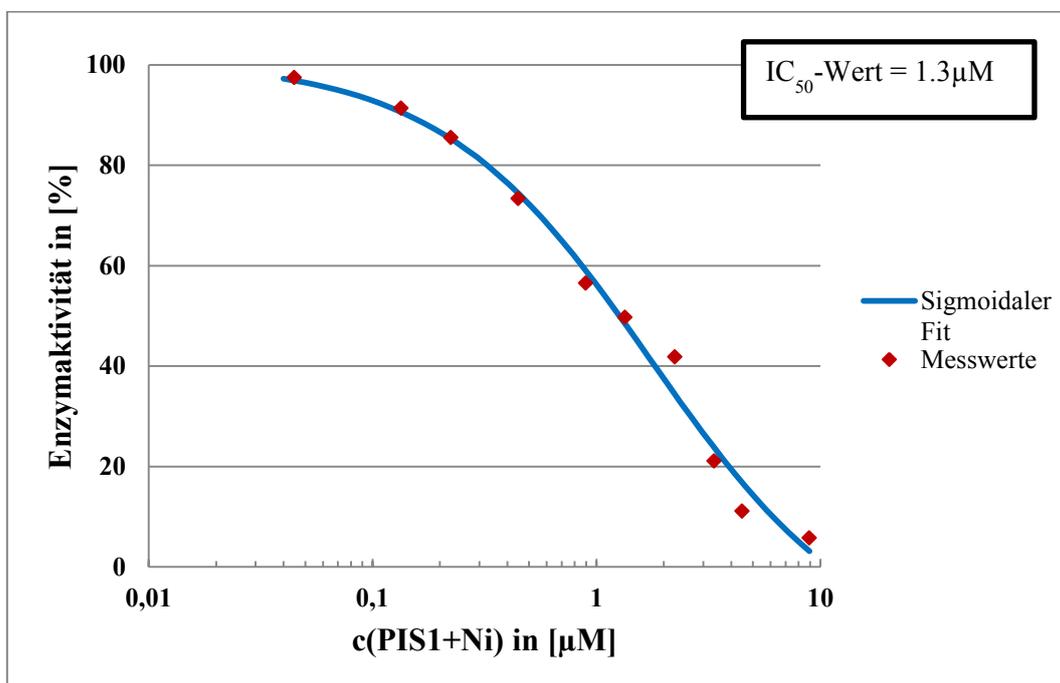
**Abb. 5.5.91:** Inhibition von Carboxypeptidase A in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PPG24. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 20.0 - 0.1 mg/mL.



**Abb. 5.5.92:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG24 zur Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes ( $3.6 \mu\text{M}$  bei einer unbekanntem Enzymkonzentration).



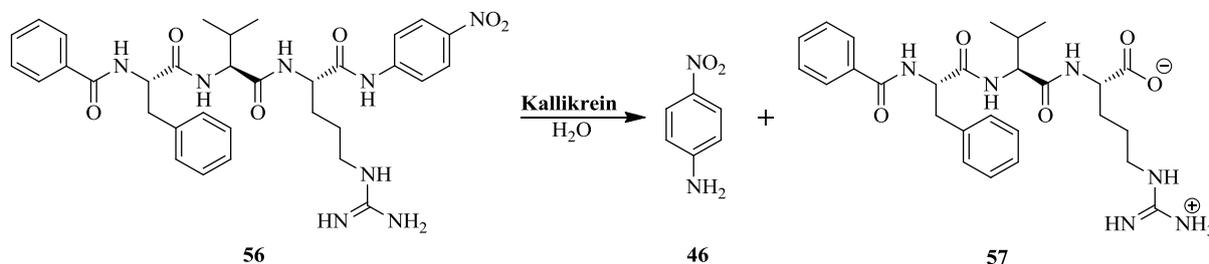
**Abb. 5.5.93:** Inhibition von Carboxypeptidase A in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von IS1+Ni. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 20.0 - 0.1 mg/mL.



**Abb. 5.5.94:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PIS1+Ni zur Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes (1.3 µM bei einer unbekanntem Enzymkonzentration).

### 5.5.5 Kallikrein Assay

Bei dem durchgeführten Assay fungierte Bz-Phe-Val-Arg-pNA als künstliches Substrat **56**.<sup>[218]</sup>



**Abb. 5.5.95:** Hydrolytische Spaltung von Bz-Phe-Val-Arg-pNA **56** unter Freisetzung von *p*-Nitroanilin **46**.<sup>[195]</sup>

#### Verwendete Lösungen:

Kallikrein Puffer: 20 mM TRIZMA-Base, 100 mM NaCl, pH = 7.8.

Kallikrein-Lösung: 1.0 mg Kallikrein (40.0 U / mg) wurden in 1 mL Kallikrein-Puffer gelöst.

Substrat-Stock-Lösung: 6.8 mg Bz-Phe-Val-Arg-pNA • HCl wurden in 1.0 mL DMSO gelöst.

Substrat-Lösung: 250 µL Substrat-Stock-Lösung und 750 µL Kallikrein Puffer bilden die Substrat Lösung.

#### Durchführung:

5 µL Enzym-Lösung wurden mit 5 µL Polymer-Stammlösung versetzt. Anschließend folgte die Zugabe von, 90 µL Puffer sowie 10 µL Substrat-Lösung. Das Reaktionsgemisch wurde daraufhin sofort vermessen.

Vor der Messung wurde die 96-well Mikrotiterplatte 15 min lang geschüttelt. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Temperatur von 25 °C und bei einer Wellenlänge von 380 nm. Nach 1 min erfolgte die Aufnahme des Messwertes. Bei einer Gesamtmesszeit von 60 min. Vor jeder Messwertaufnahme wurde die Mikrotiterplatte 30 s geschüttelt.

Tab. 5.5.6: Tabellarische Zusammenfassung des Kallikrein Assays.

Verwendete Lösungen	Volumen	Konzentration	Konzentration im Assay
Enzym	5 $\mu\text{L}$	$11.7 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$	$5.3 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$
Polymer bzw. Wasser	5 $\mu\text{L}$	20.0 mg/mL	0.9 mg/mL
Puffer	90 $\mu\text{L}$	-	-
keine Vorinkubation			
Substrat	10 $\mu\text{L}$	$2.5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$	$2.3 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$
Gesamtvolumen	110 $\mu\text{L}$		

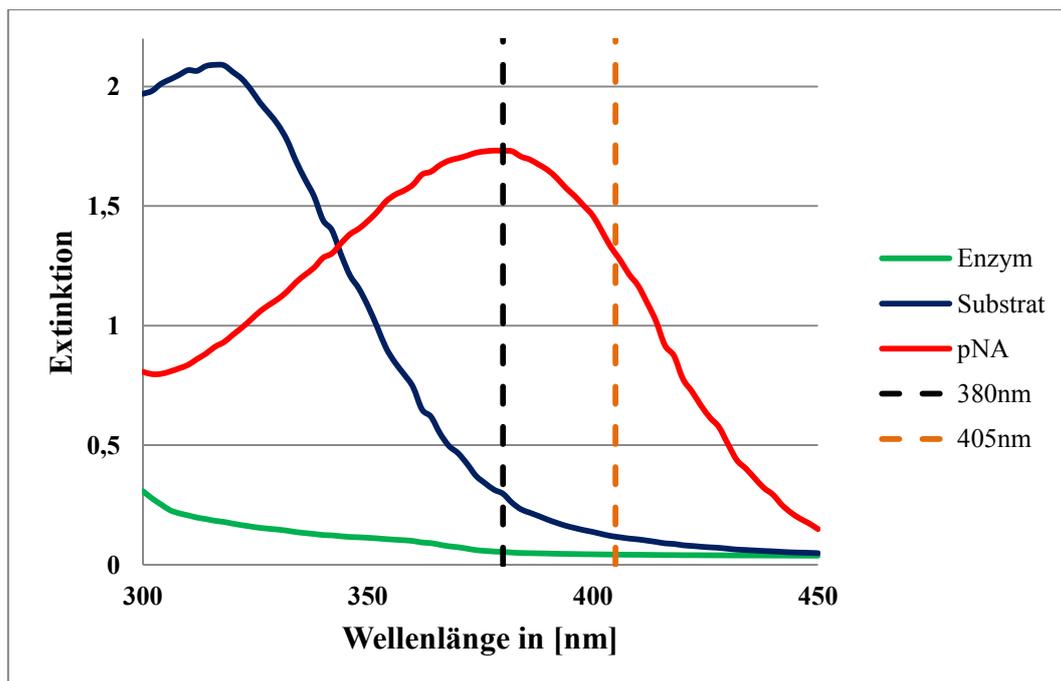
Absorptionsspektrum:

Abb. 5.5.96: Absorptionsübersicht des Enzyms, Substrats und Chromophors im Kallikrein Assay.

### Inhibitionstest mit literaturbekannten Hemmstoff:

Die Kontrollmessung wurde mit Aprotinin durchgeführt.

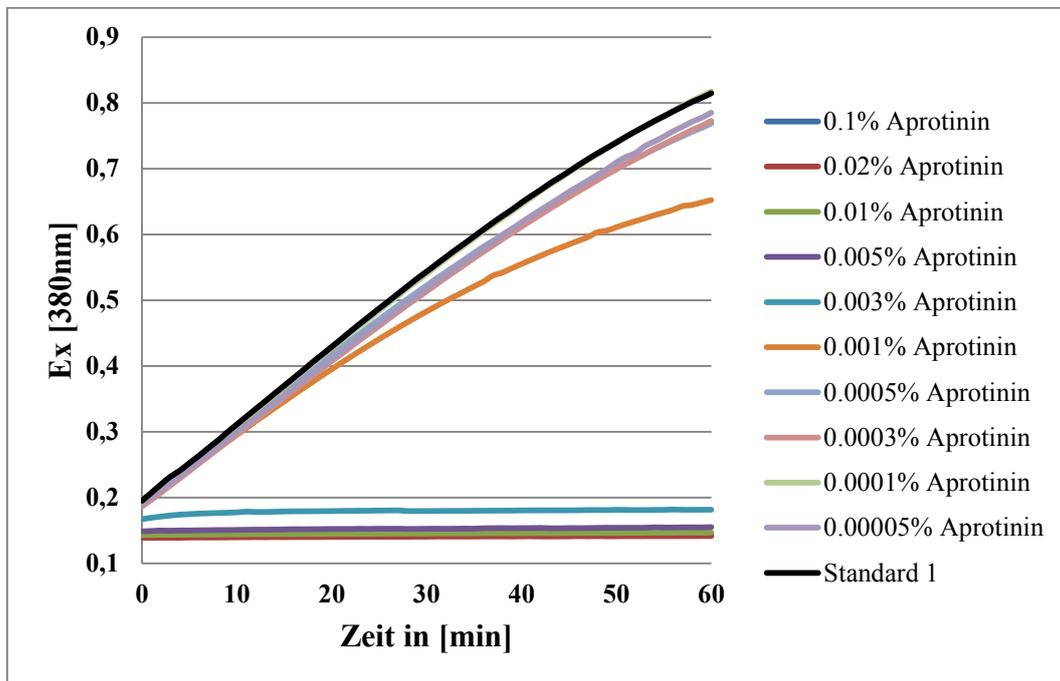


Abb. 5.5.97: Kallikrein Inhibitionstest mit  $10^{-1}$  -  $5 \cdot 10^{-5}$ % iger Aprotinin-Lösung.

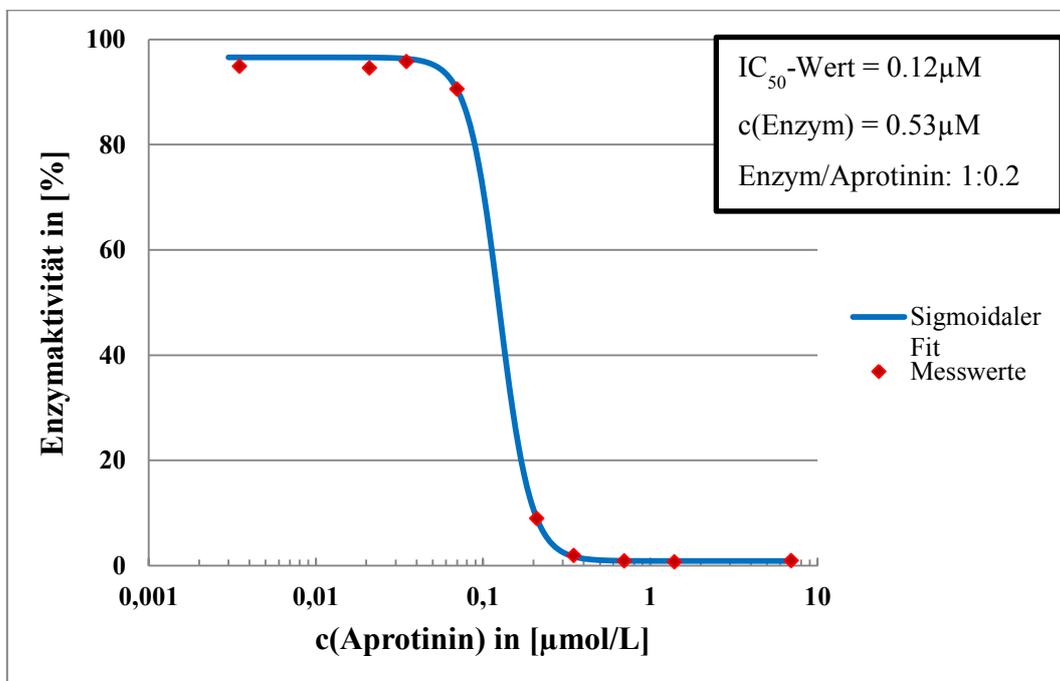
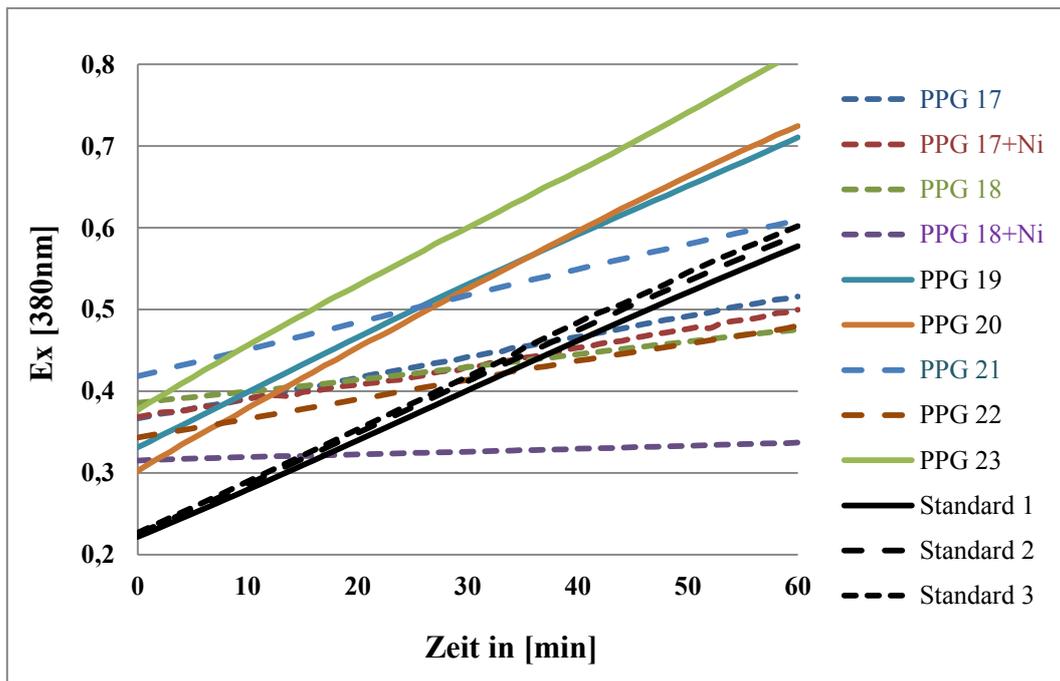
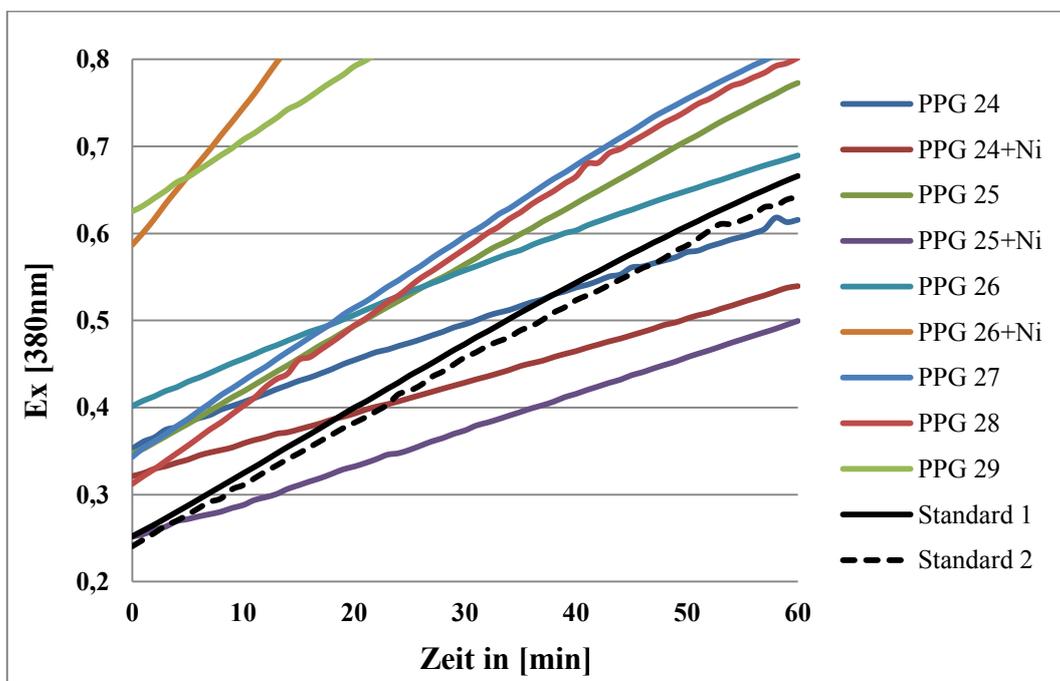


Abb. 5.5.98: Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von Aprotinin zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes ( $0.12 \mu\text{M}$  bei einer  $0.53 \mu\text{M}$  Enzymkonzentration).

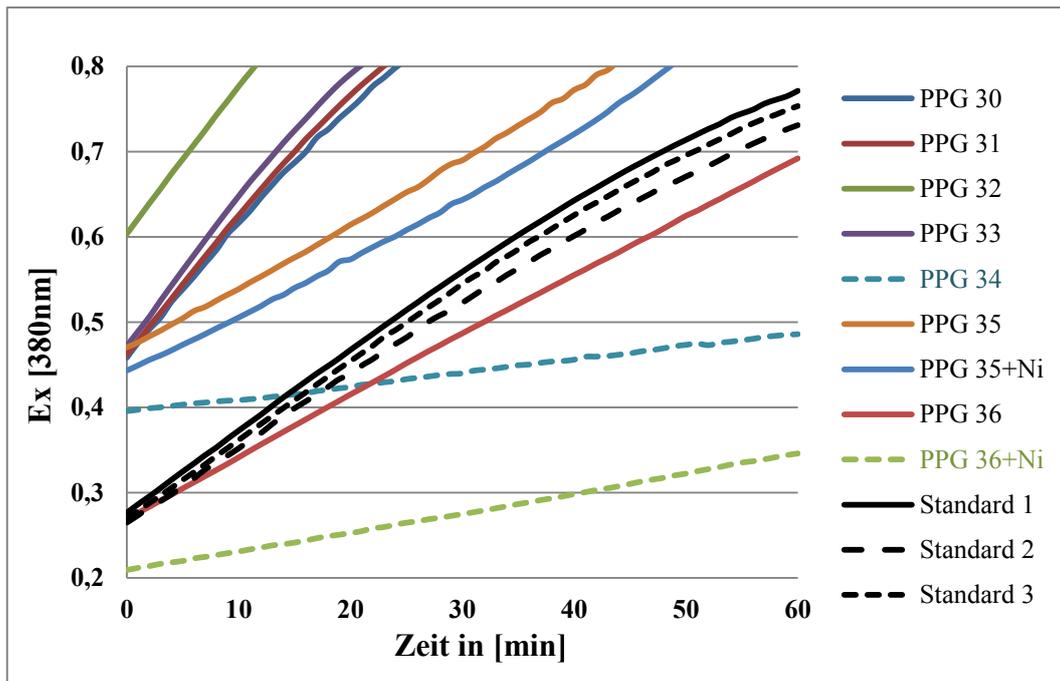
Screening der Polymere:



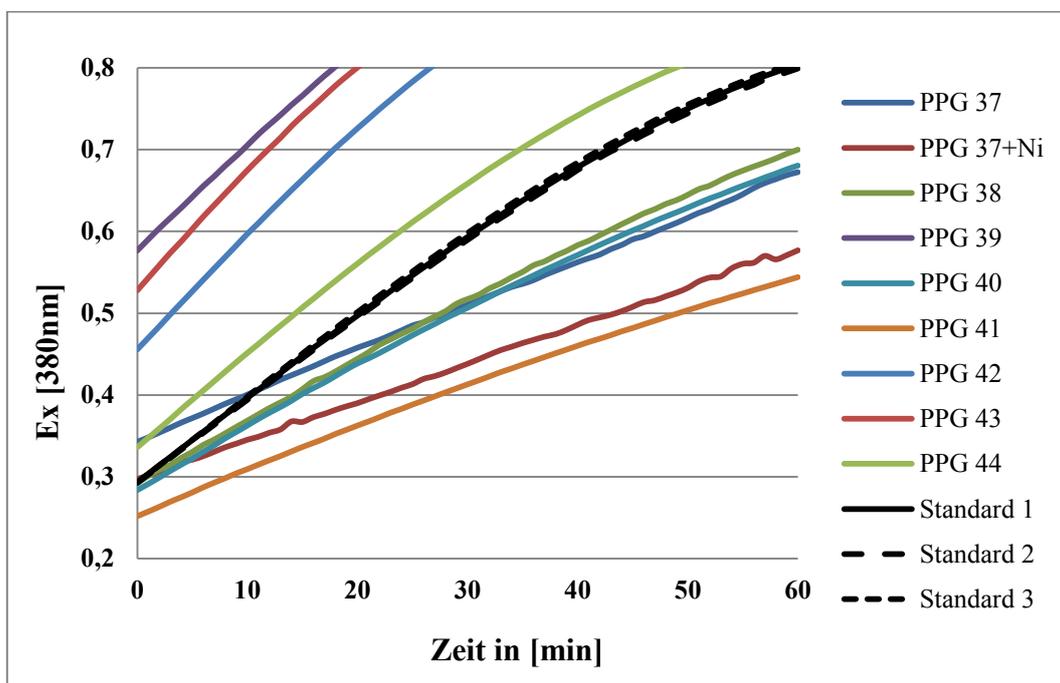
**Abb. 5.5.99:** Screening der 1. Polymerreihe. Polymer PG17 und Polymer PG18 zeigten mit und ohne Zusatz von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Kallikrein. Weiterhin zeigten die Polymere PG21 und PG22 eine etwas geringere Wirksamkeit gegenüber dem Enzym.



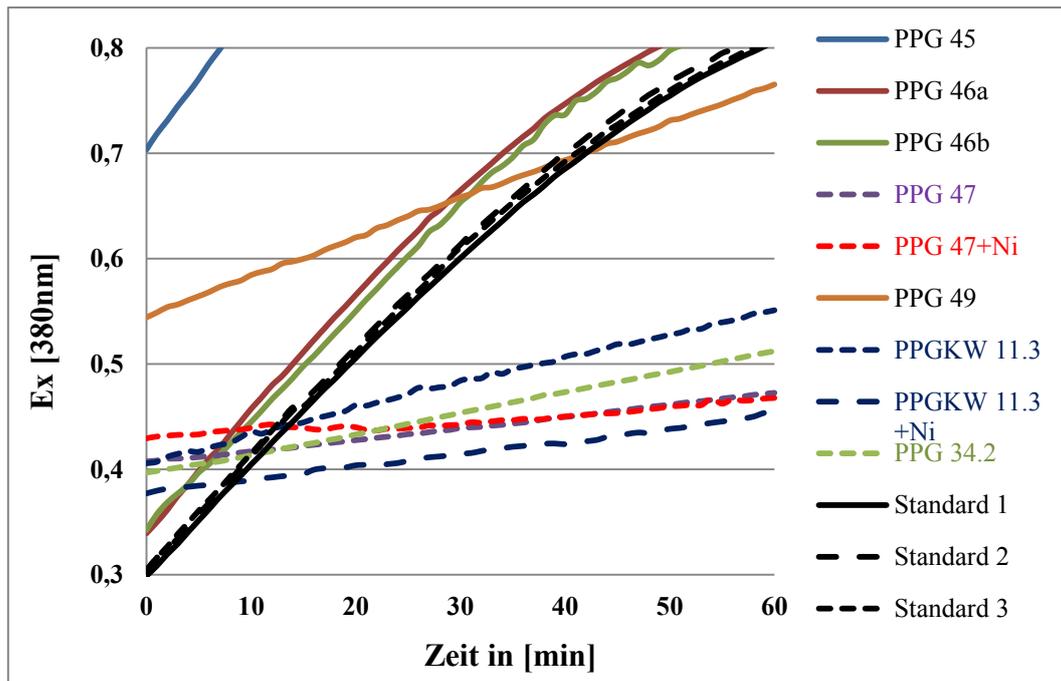
**Abb. 5.5.100:** Screening der 2. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Kallikrein zugeordnet werden.



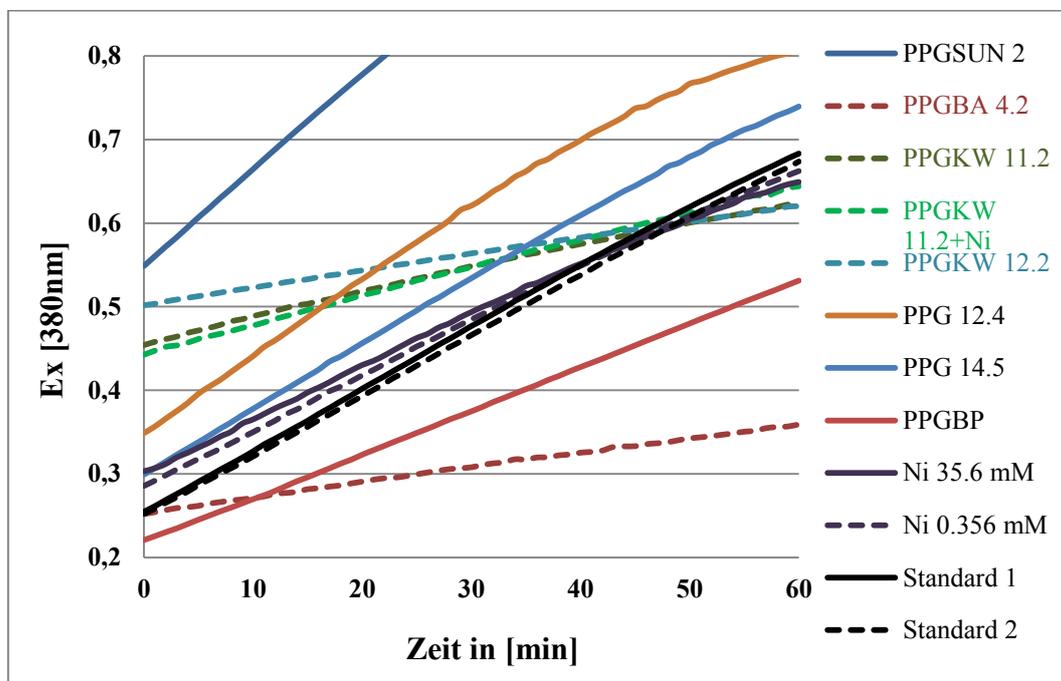
**Abb. 5.5.101:** Screening der 3. Polymerreihe. Polymer PG34 sowie Polymer PG36 in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen zeigten eine große inhibitorische Wirksamkeit gegenüber Kallikrein.



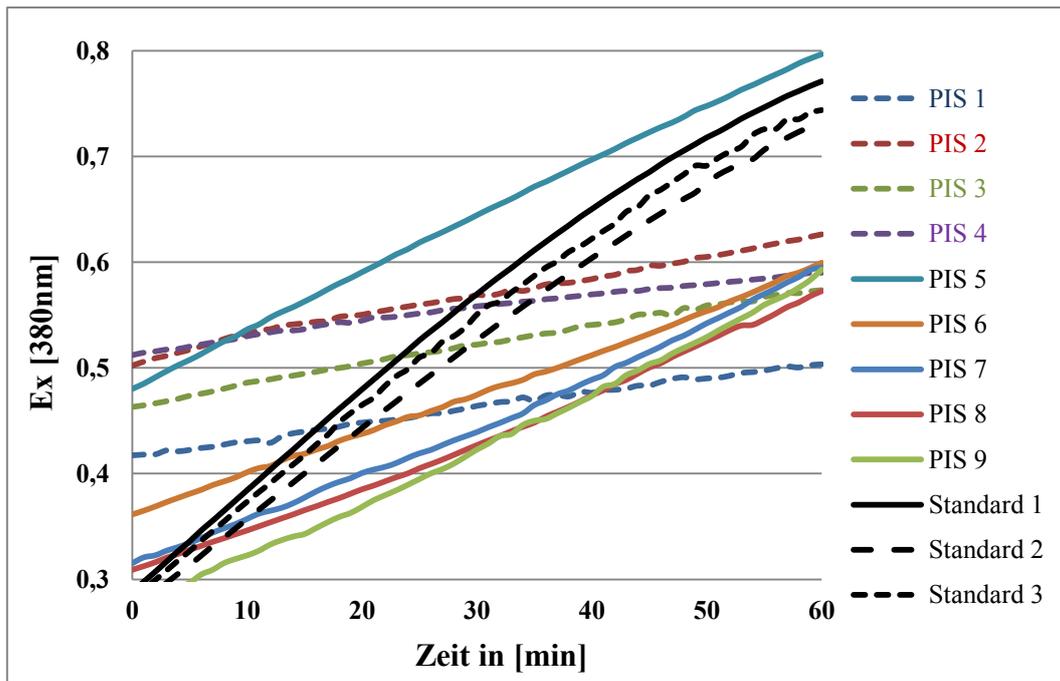
**Abb. 5.5.102:** Screening der 4. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Kallikrein zugeordnet werden.



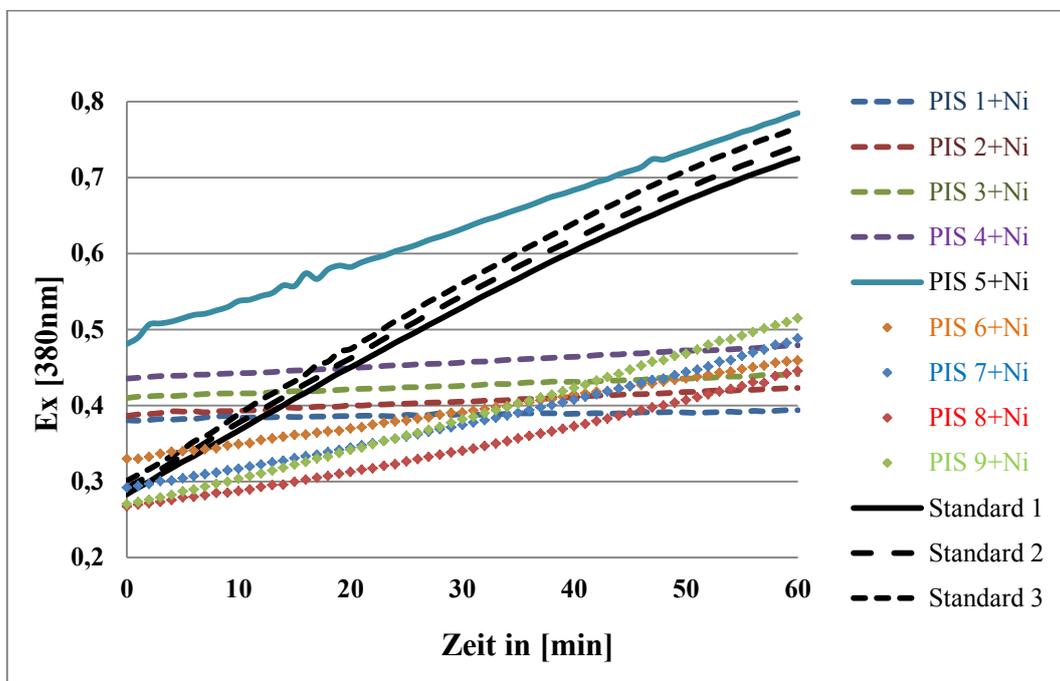
**Abb. 5.5.103:** Screening der 5. Polymerreihe. Polymer PG47 und Polymer PGKW11.3 zeigten mit und ohne Zusatz von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Kallikrein. Ebenfalls zeichnete sich das nachsynthetisierte Polymer PG34.2 durch eine starke Wirksamkeit gegenüber dem Enzym aus.



**Abb. 5.5.104:** Screening der 6. Polymerreihe. Polymer PGKW11.2 zeigt mit und ohne Zusatz von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Kallikrein. Ebenfalls zeichnen sich die Polymere PGBA4.2 sowie PPGKW12.2 durch eine starke Wirksamkeit gegenüber dem Enzym aus. Hingegen zeigen die unterschiedlich konzentrierten  $\text{Ni}^{2+}$ -Lösungen, welche als Blindprobe fungierten nur minimalistische Effekte.

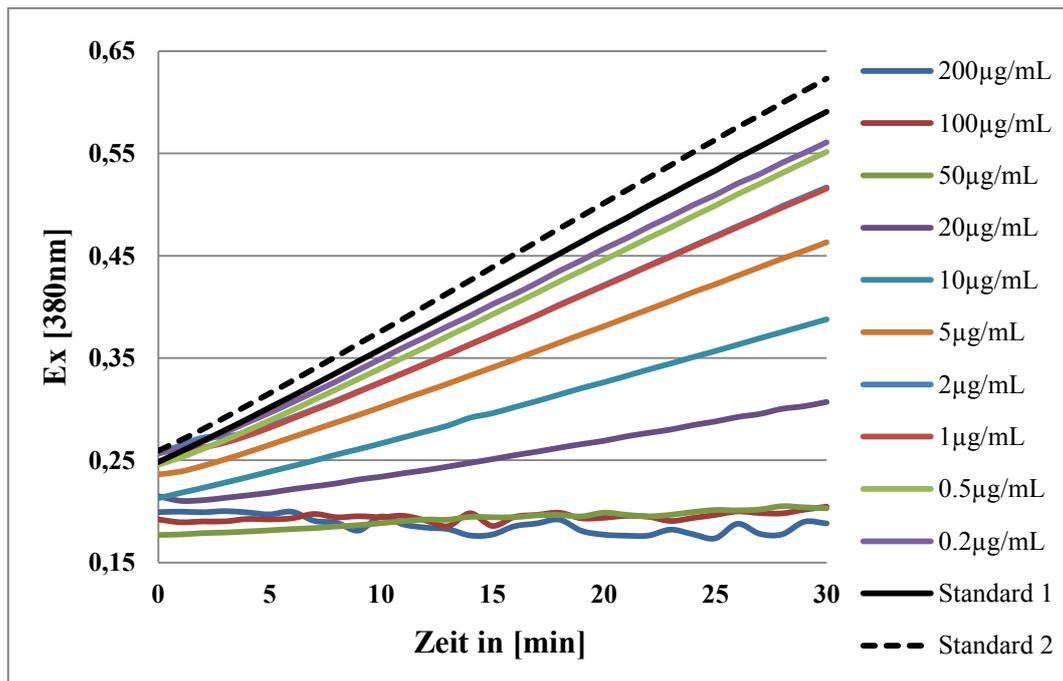


**Abb. 5.5.105:** Screening der 7. Polymerreihe. Die Polymere IS1 - 4 zeigten eine starke inhibitorische Wirksamkeit gegenüber Kallikrein. Hingegen zeichneten sich die Polymere IS6 - 9 als recht schwache Hemmstoffe aus.

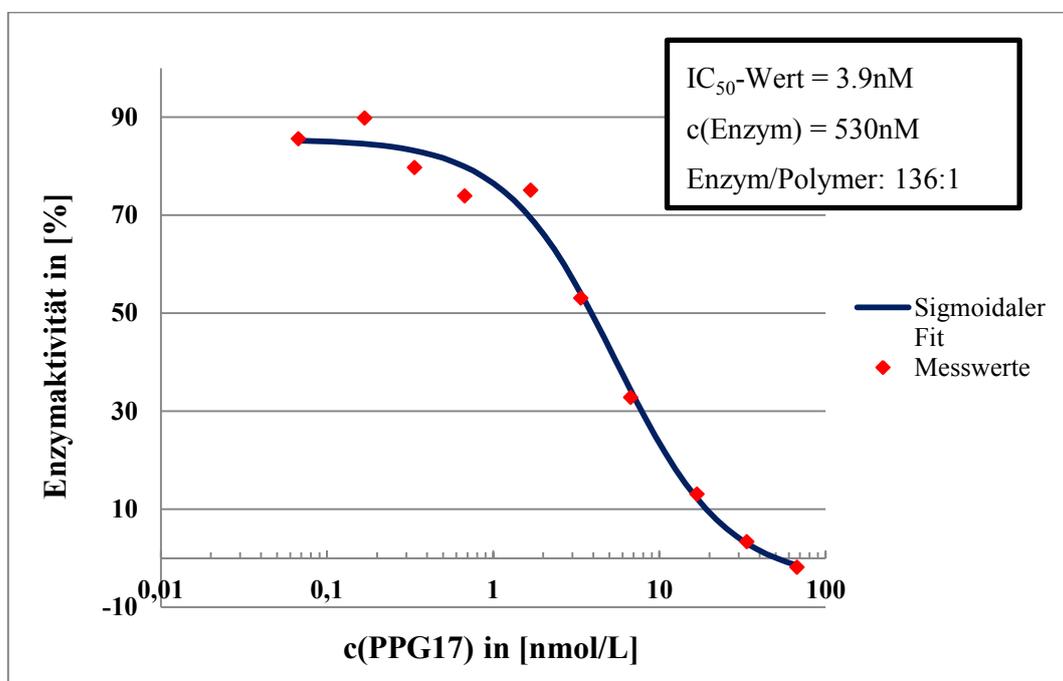


**Abb. 5.5.106:** Screening der 8. Polymerreihe. Die Polymere IS1 - 4 zeigten eine verstärkte inhibitorische Wirksamkeit gegenüber Kallikrein in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen. Die schwache Hemmwirkung der Polymere IS6 - 9 wurde ebenfalls durch Zugabe von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen erhöht.

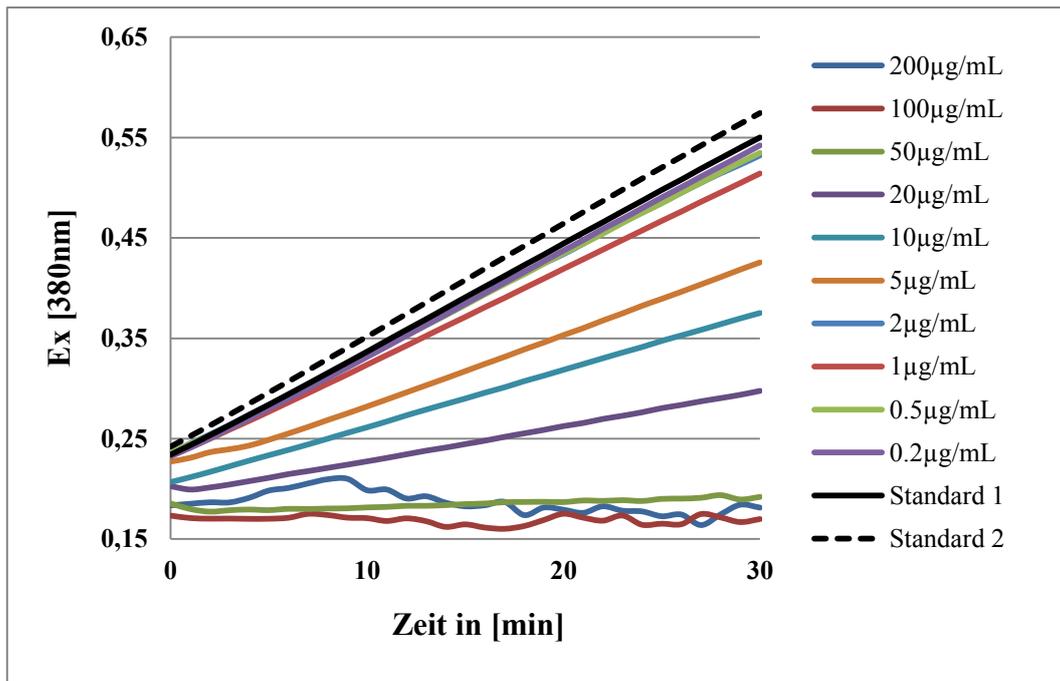
Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte der wirksamen Polymere:



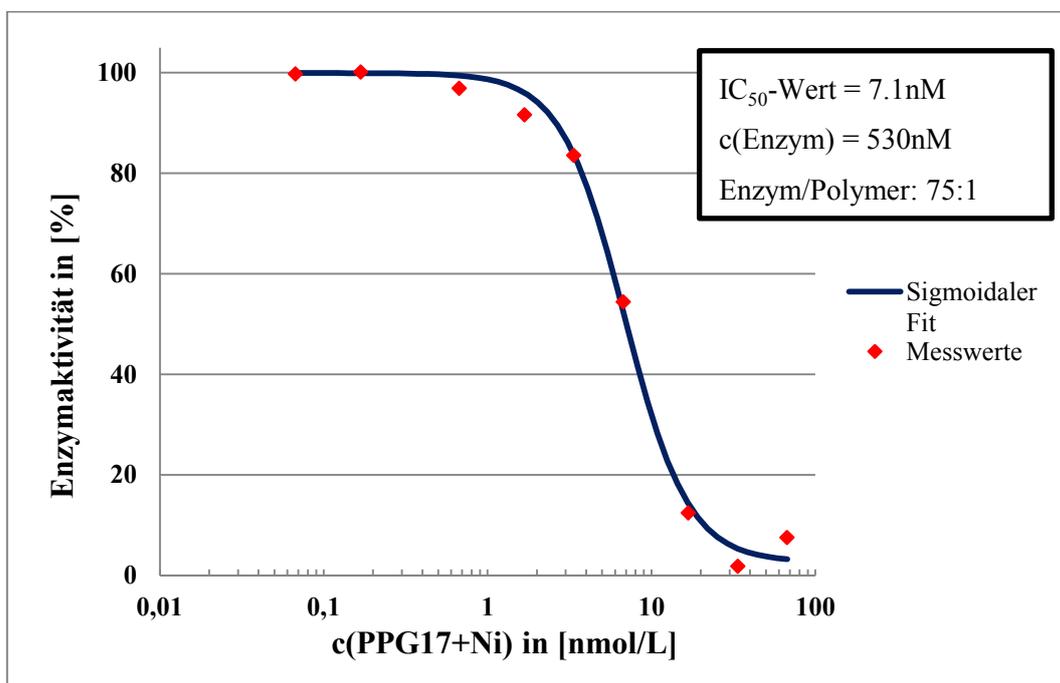
**Abb. 5.5.107:** Inhibition von Kallikrein in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PG17. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 200 - 0.2 µg/mL.



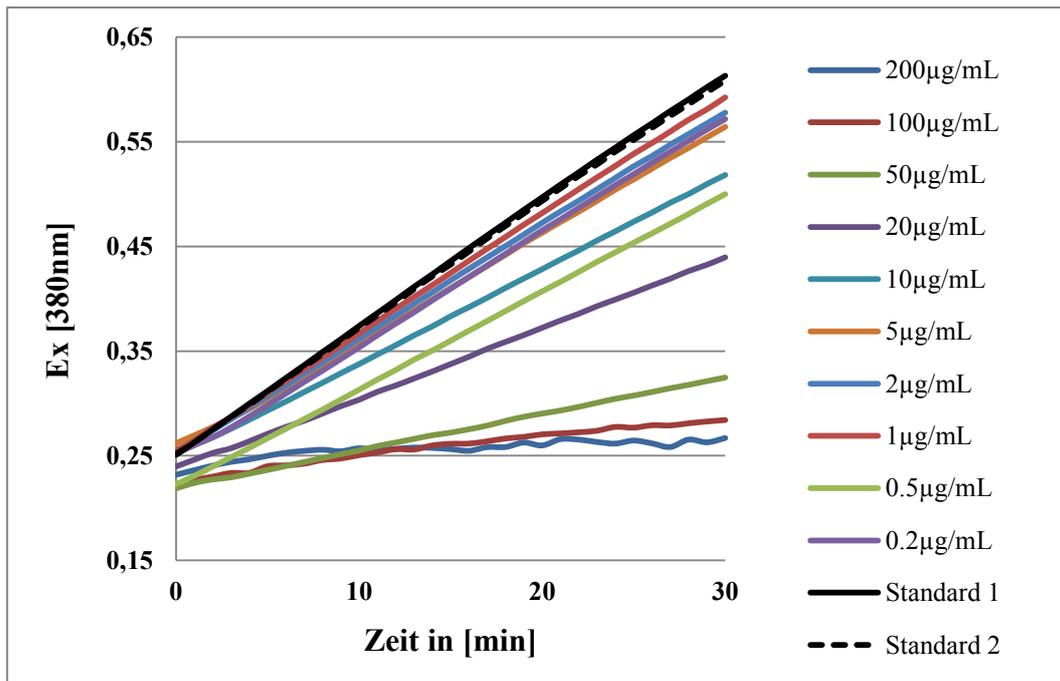
**Abb. 5.5.108:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG17 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (3.9 nM bei einer 530 nM Enzymkonzentration).



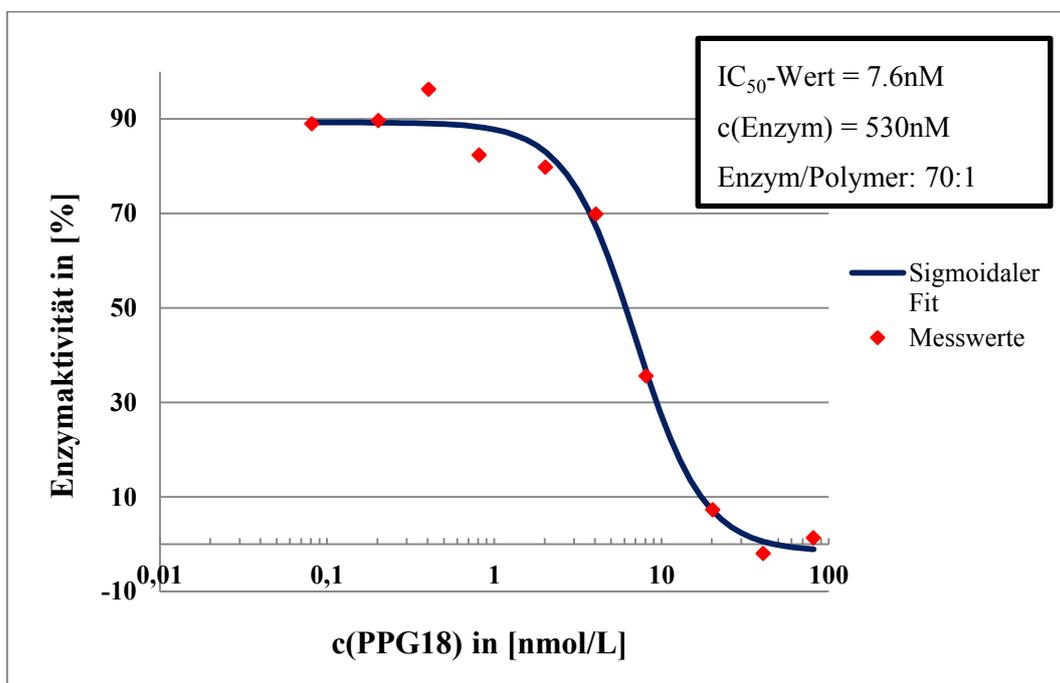
**Abb. 5.5.109:** Inhibition von Kallikrein in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PPG17+Ni. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 200 - 0.2 µg/mL.



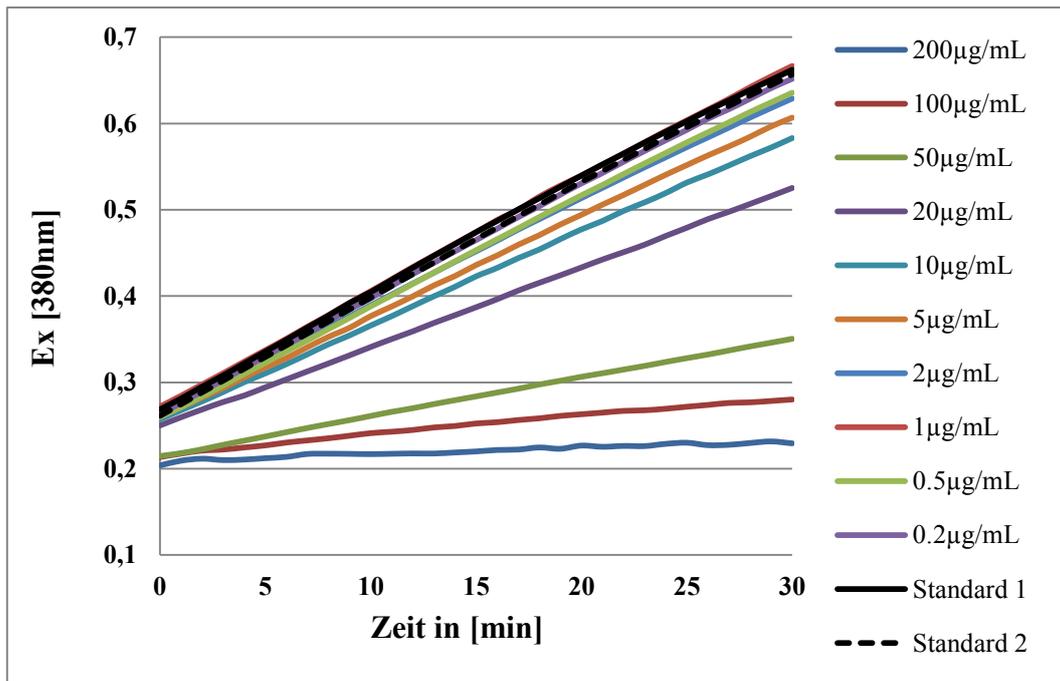
**Abb. 5.5.110:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG17+Ni zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (7.1 nM bei einer 530 nM Enzymkonzentration).



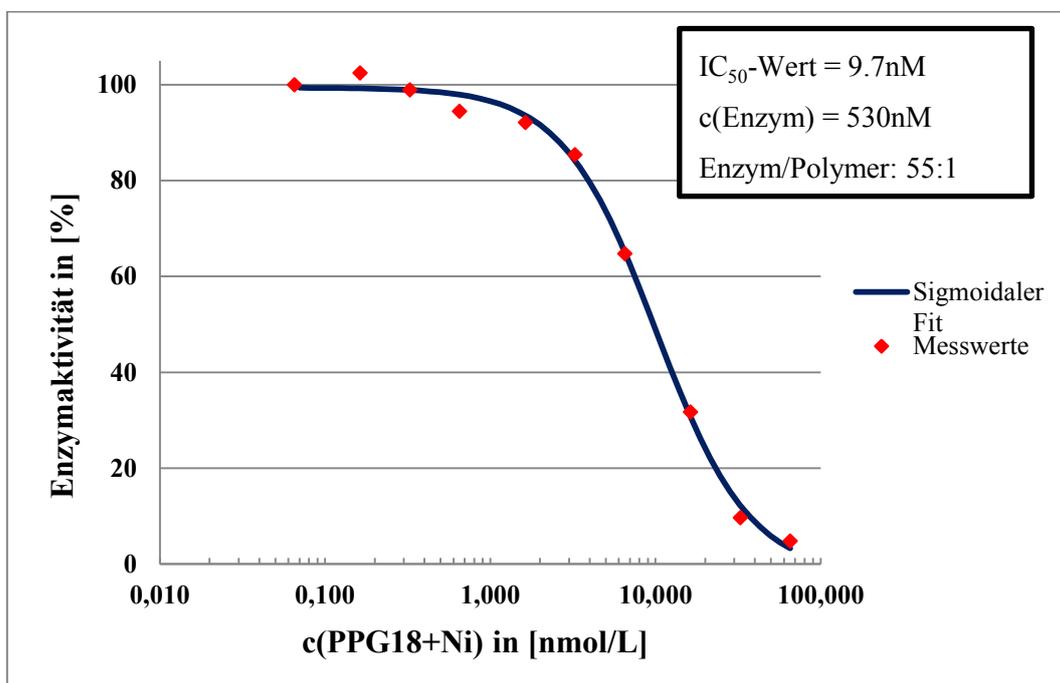
**Abb. 5.5.111:** Inhibition von Kallikrein in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PG18. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 200 - 0.2  $\mu\text{g/mL}$ .



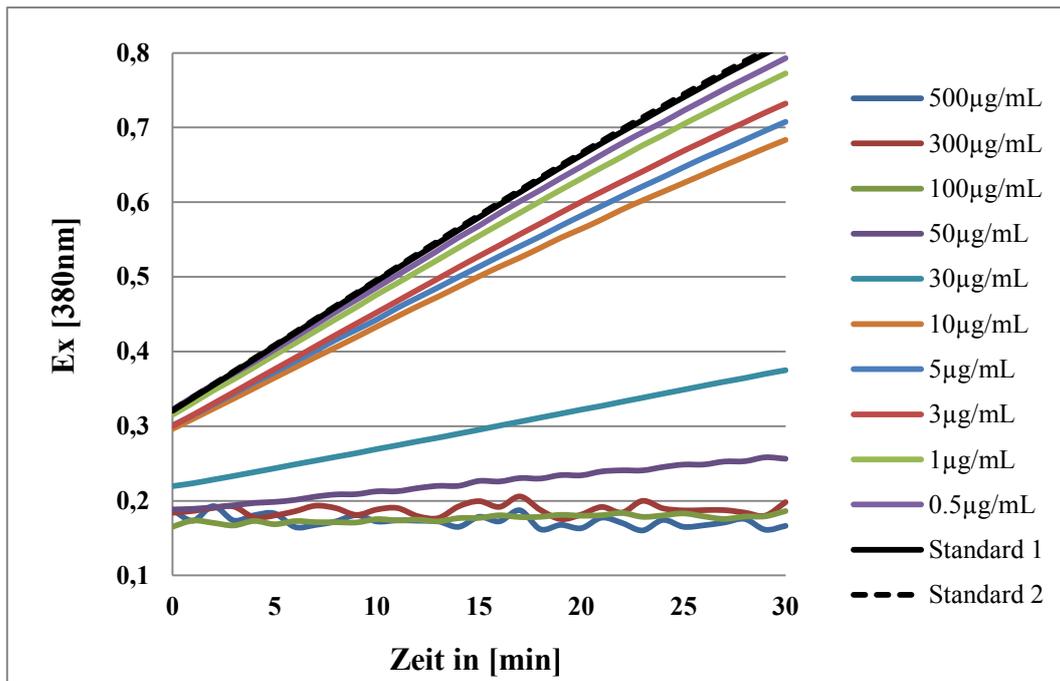
**Abb. 5.5.112:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG18 zur Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes (7.6 nM bei einer 530 nM Enzymkonzentration).



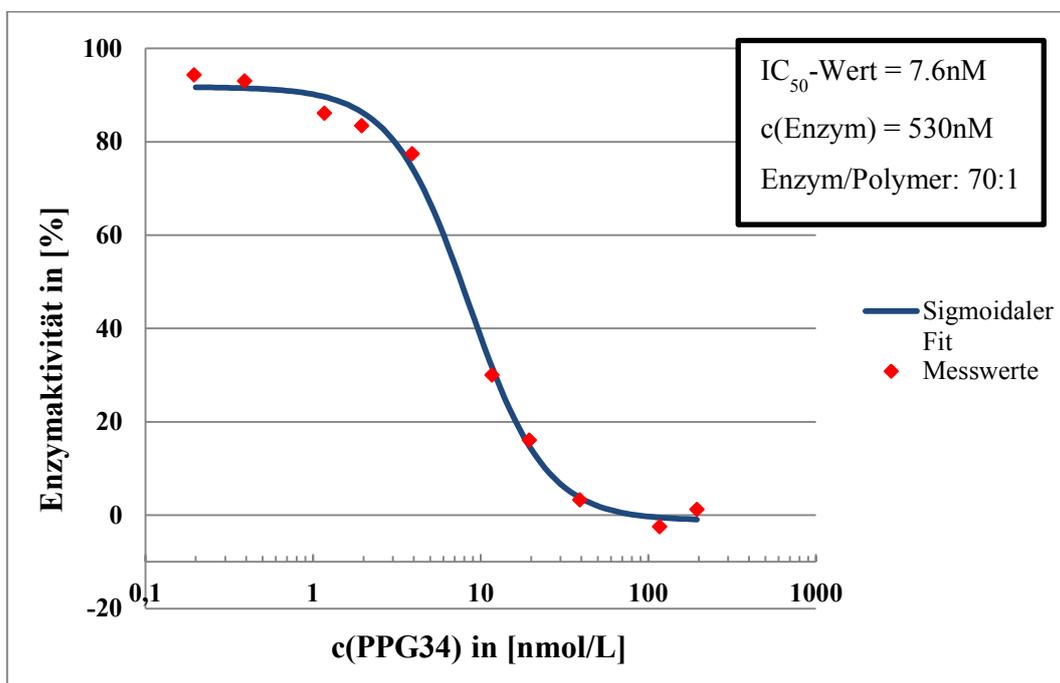
**Abb. 5.5.113:** Inhibition von Kallikrein in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PPG18+Ni. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 200 - 0.2 µg/mL.



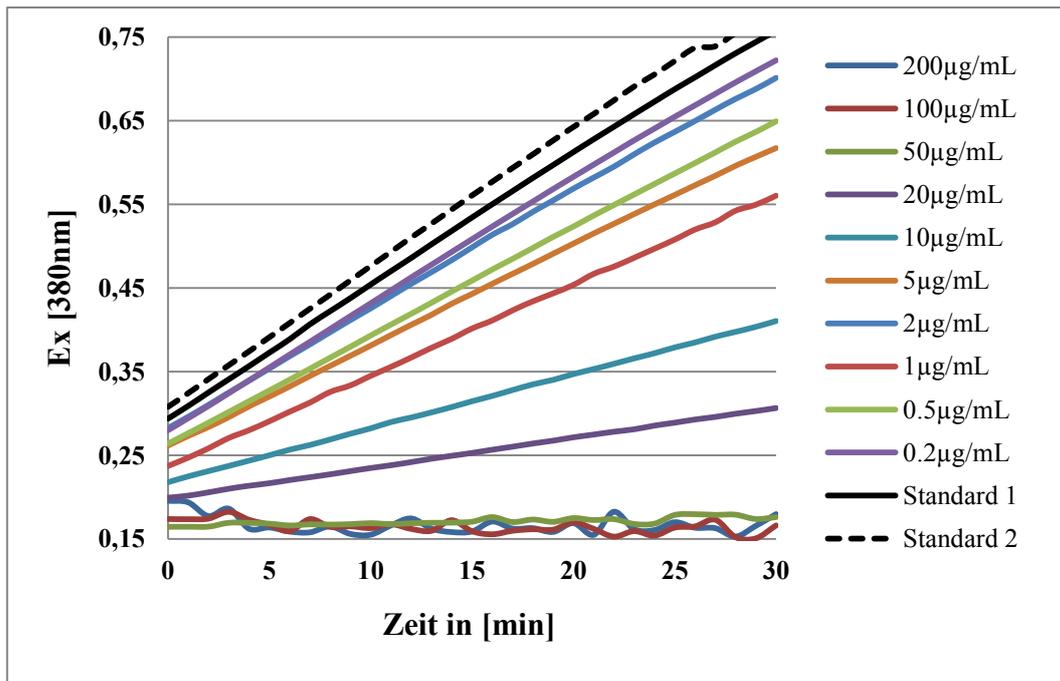
**Abb. 5.5.114:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG18+Ni zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (9.7 nM bei einer 530 nM Enzymkonzentration).



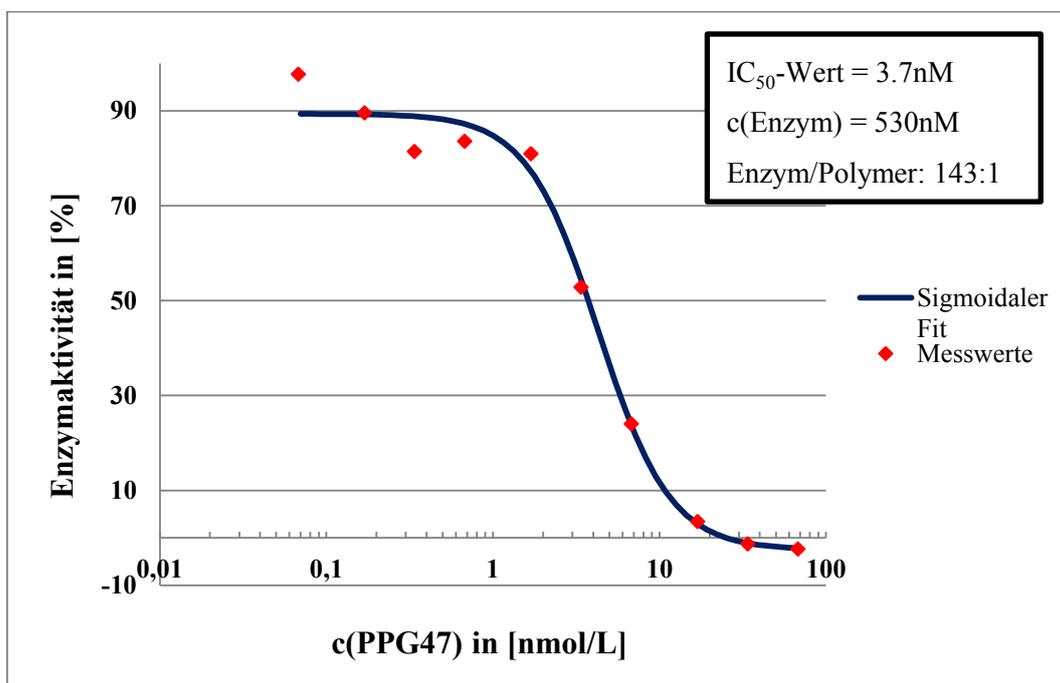
**Abb. 5.5.115:** Inhibition von Kallikrein in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PG34. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 500 - 0.5 µg/mL.



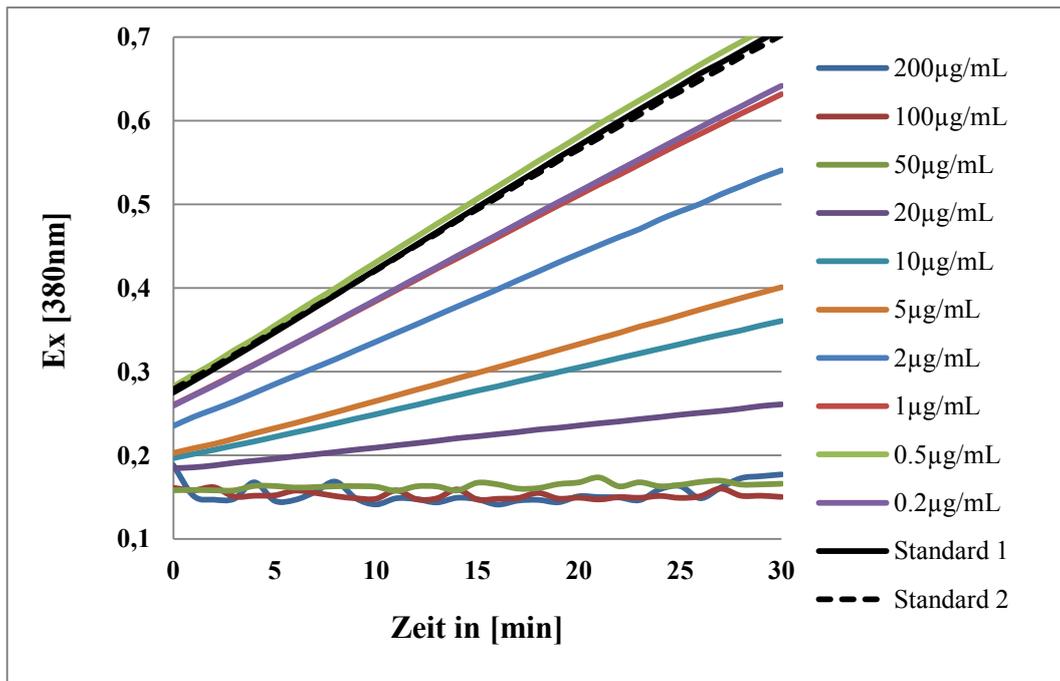
**Abb. 5.5.116:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG34 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (7.6 nM bei einer 530 nM Enzymkonzentration).



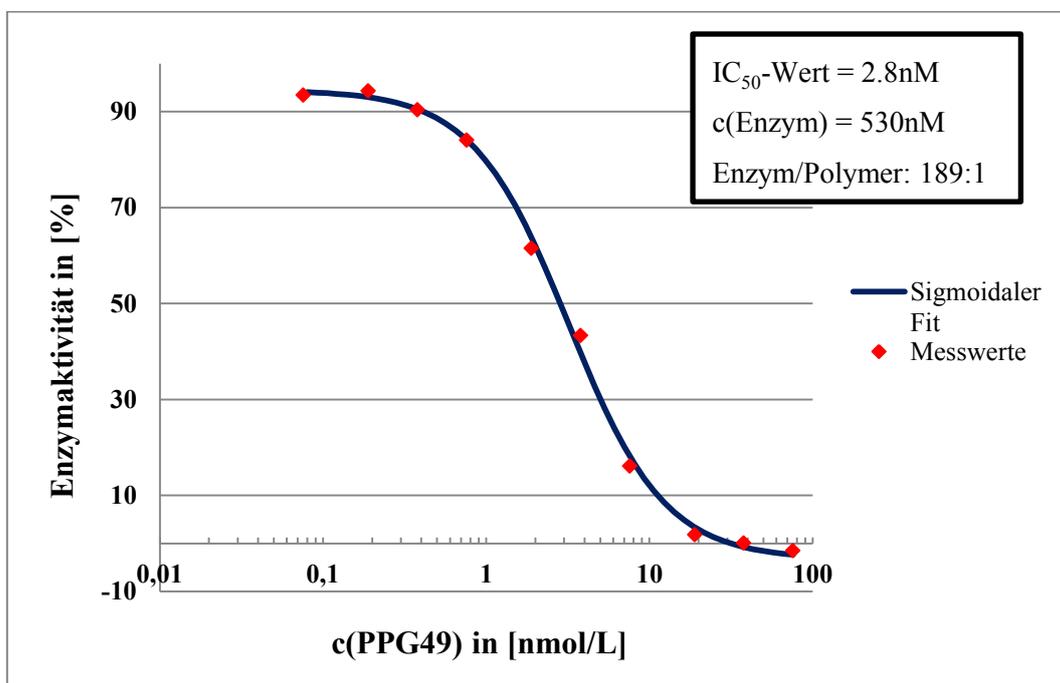
**Abb. 5.5.117:** Inhibition von Kallikrein in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PG47. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 200 - 0.2 µg/mL.



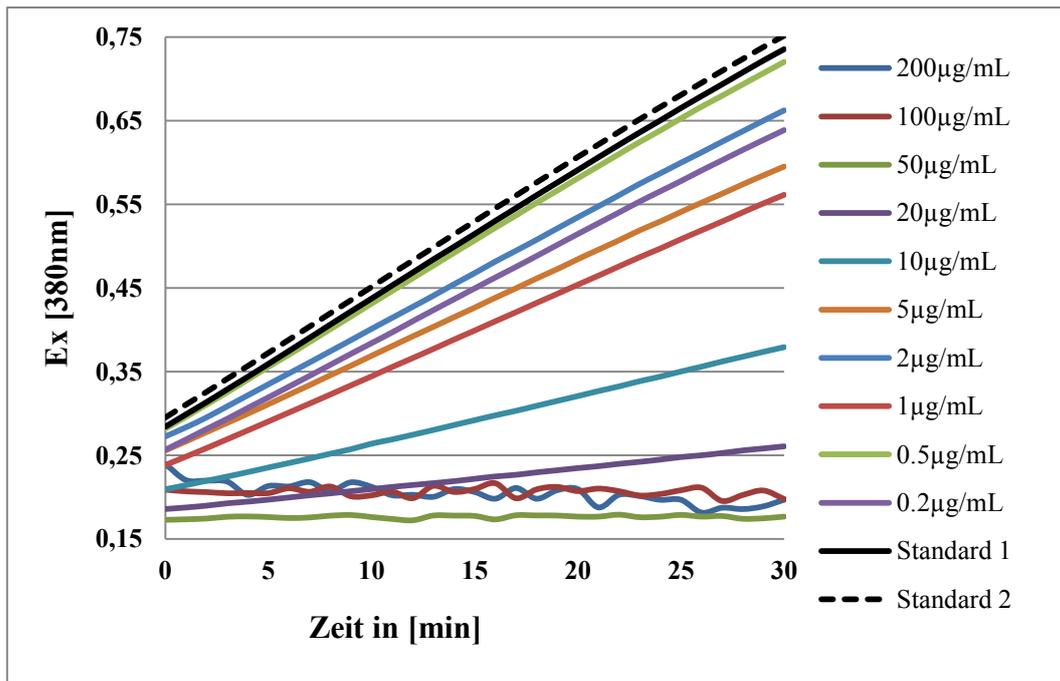
**Abb. 5.5.118:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG47 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (3.7 nM bei einer 530 nM Enzymkonzentration).



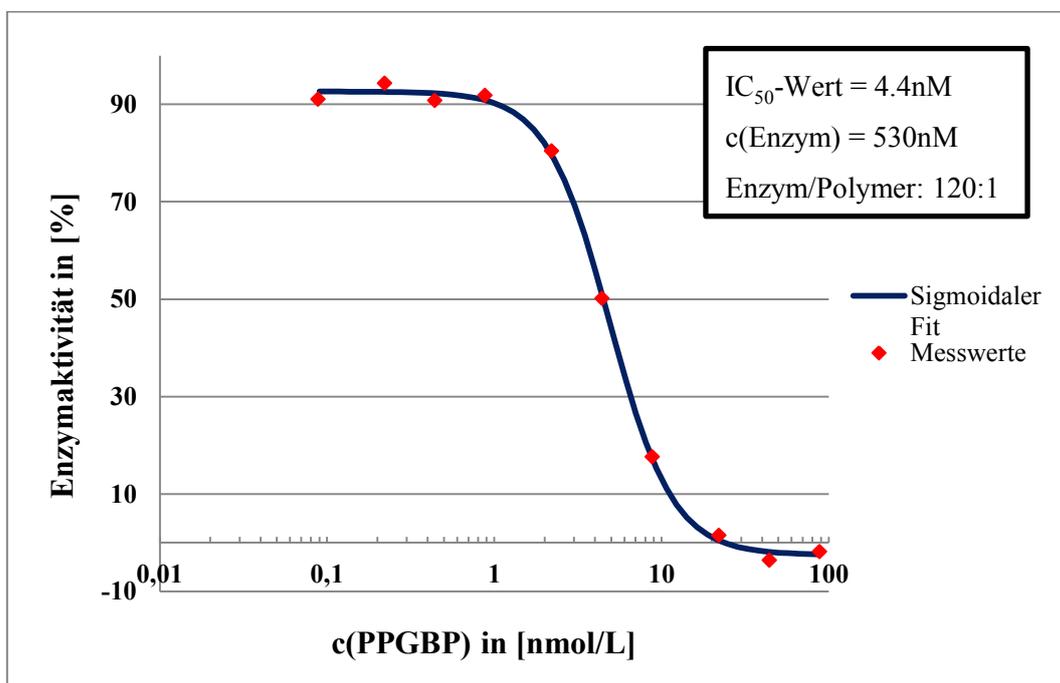
**Abb. 5.5.119:** Inhibition von Kallikrein in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PG49. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 200 - 0.2 µg/mL.



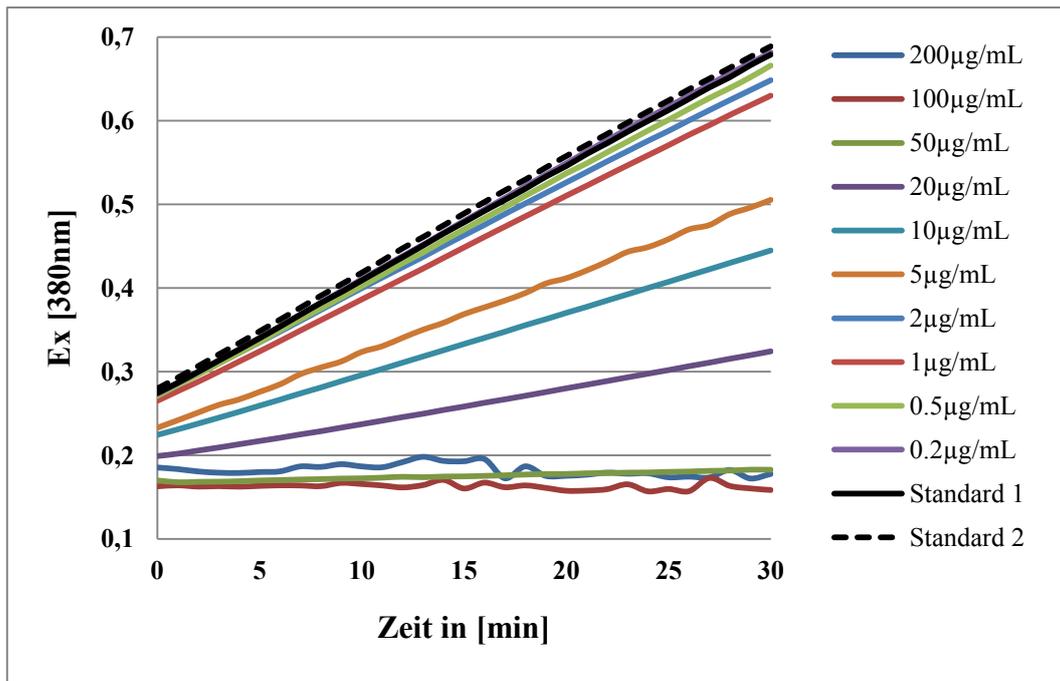
**Abb. 5.5.120:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG49 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (2.4 nM bei einer 530 nM Enzymkonzentration).



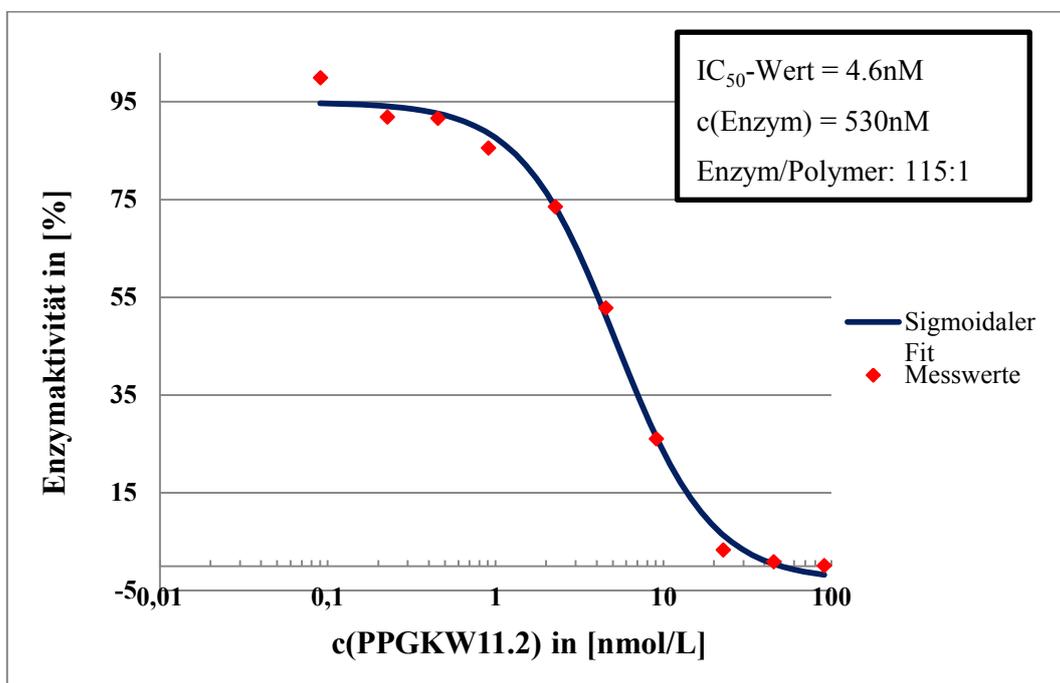
**Abb. 5.5.121:** Inhibition von Kallikrein in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PGBP. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 200 - 0.2  $\mu\text{g/mL}$ .



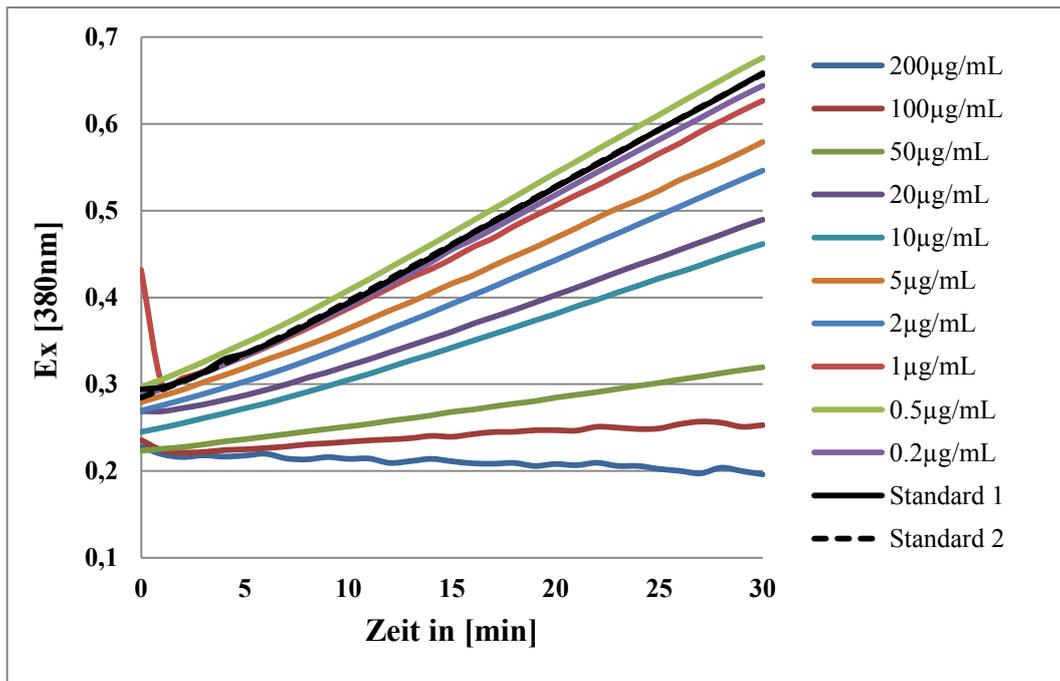
**Abb. 5.5.122:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPGBP zur Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes (4.4 nM bei einer 530 nM Enzymkonzentration).



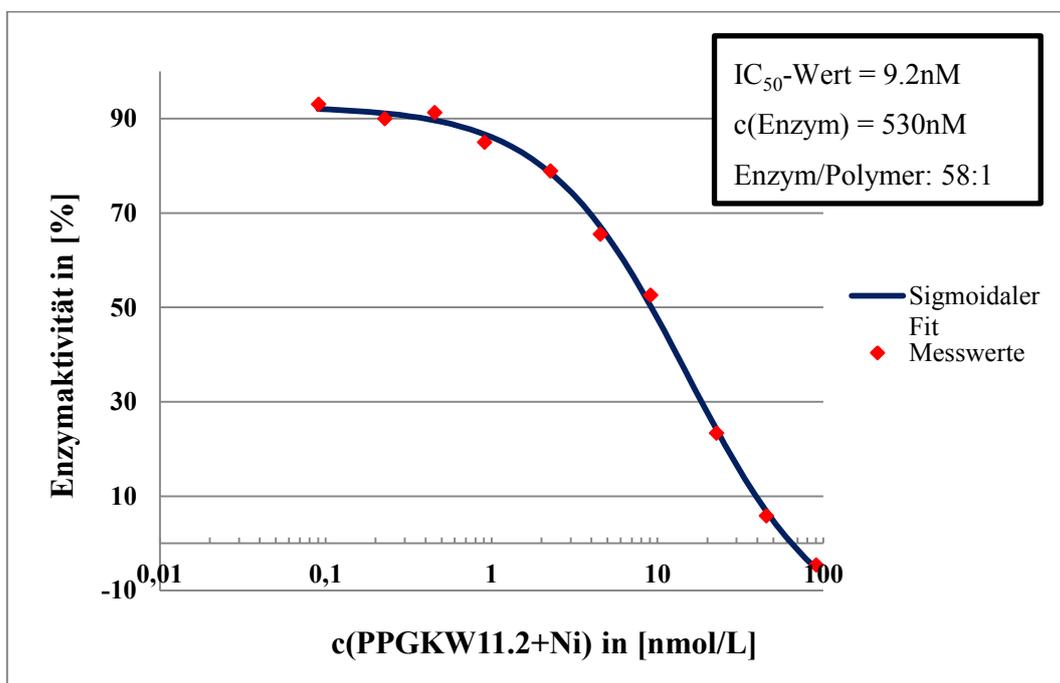
**Abb. 5.5.123:** Inhibition von Kallikrein in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PGKW11.2. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 200 - 0.2 µg/mL.



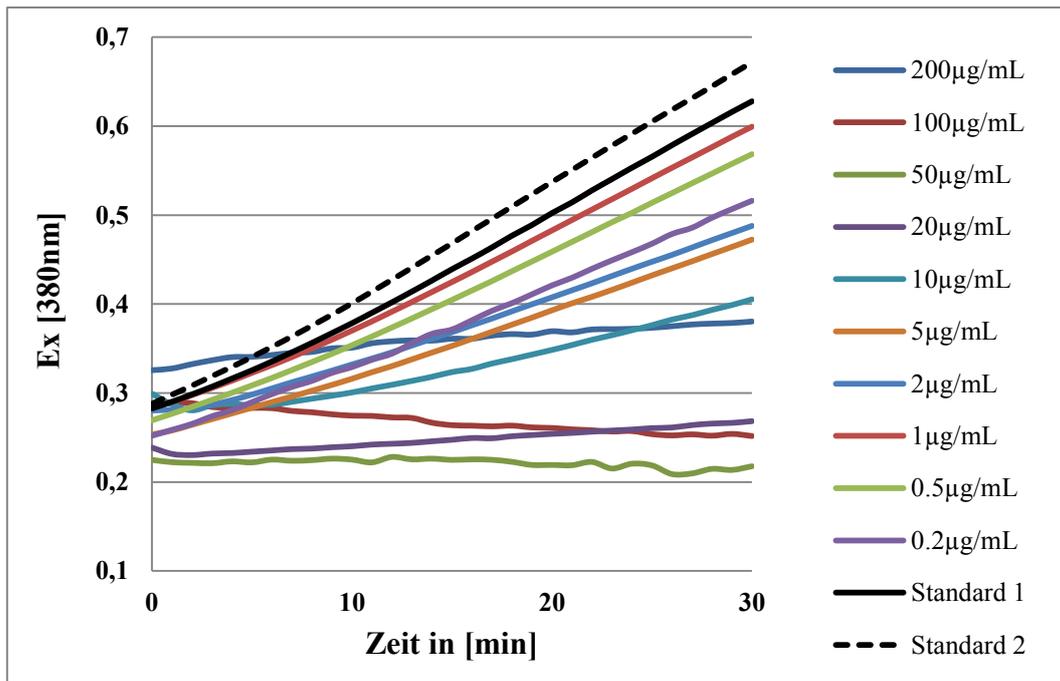
**Abb. 5.5.124:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPKW11.2 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (4.6 nM bei einer 530 nM Enzymkonzentration).



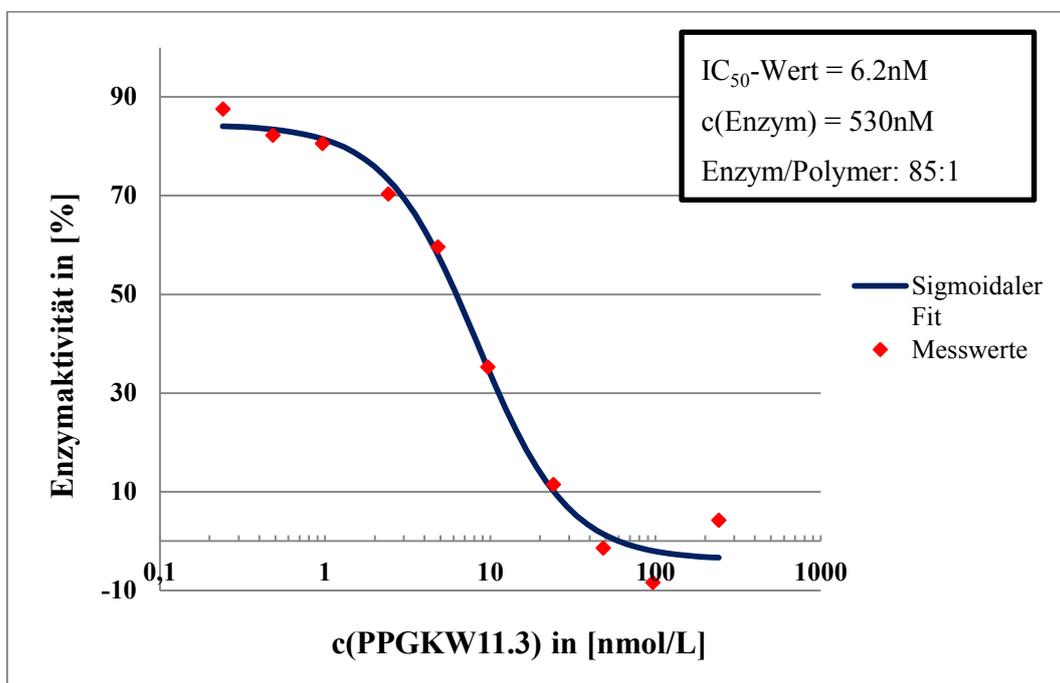
**Abb. 5.5.125:** Inhibition von Kallikrein in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PPGKW11.2+Ni. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 200 - 0.2 µg/mL.



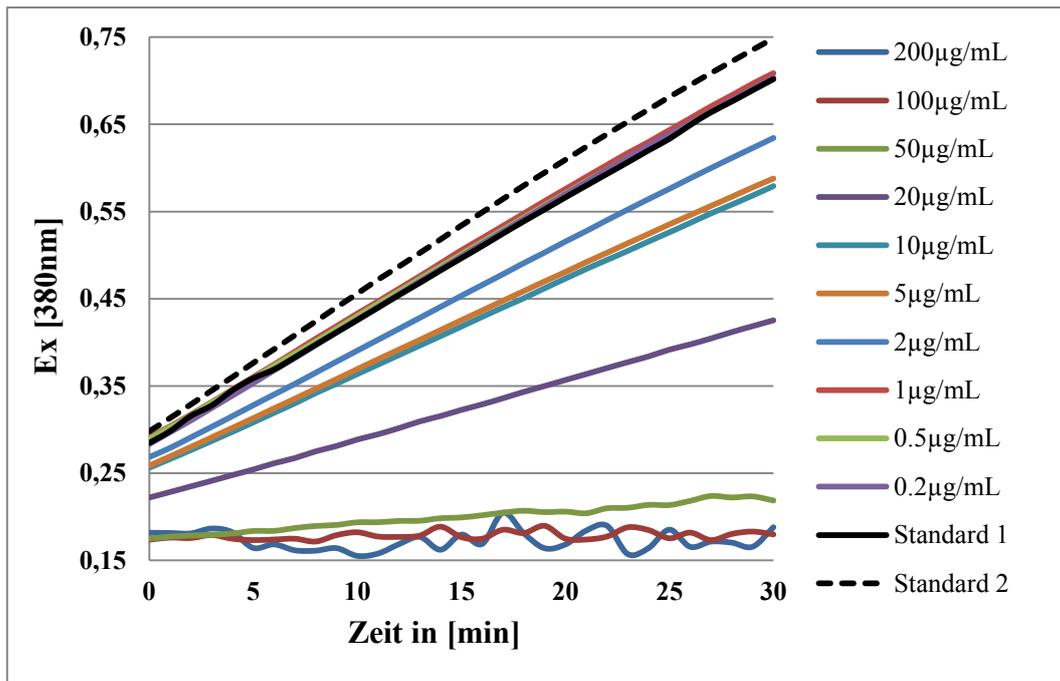
**Abb. 5.5.126:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPGKW11.2+Ni zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (9.2 nM bei einer 530 nM Enzymkonzentration).



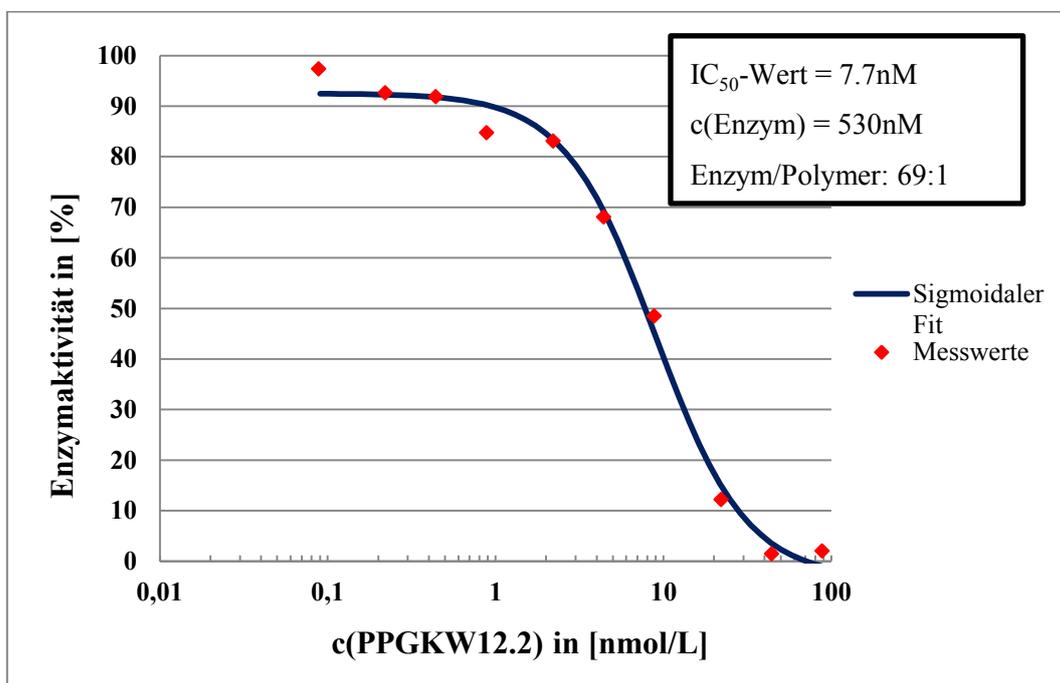
**Abb. 5.5.127:** Inhibition von Kallikrein in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PGKW11.3. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 200 - 0.2 µg/mL.



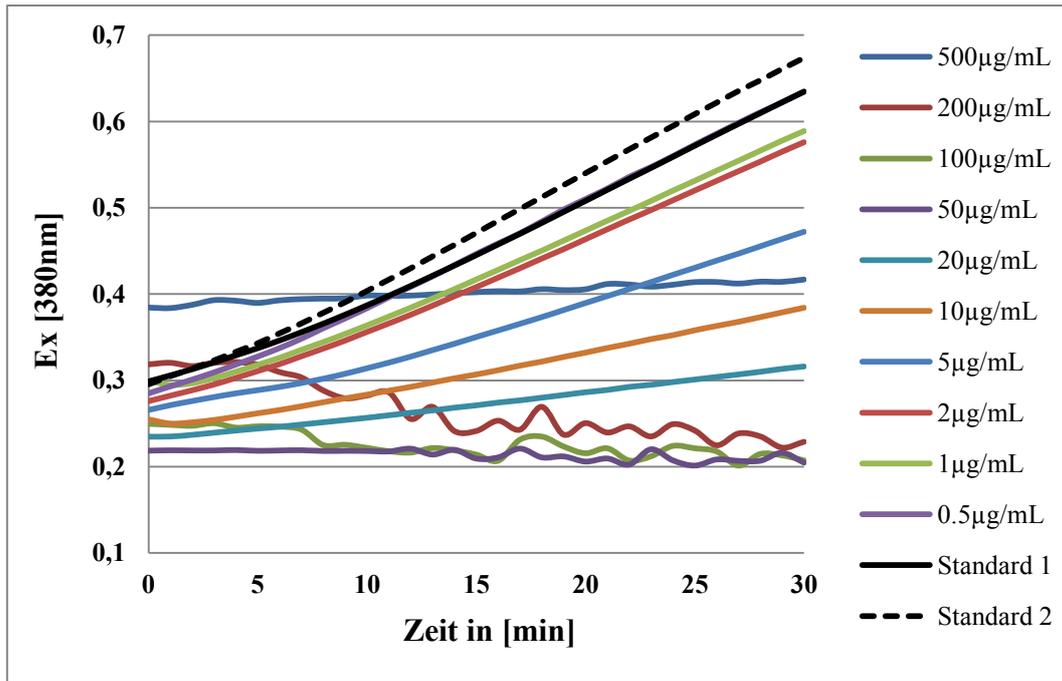
**Abb. 5.5.128:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPGKW11.3 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (6.2 nM bei einer 530 nM Enzymkonzentration).



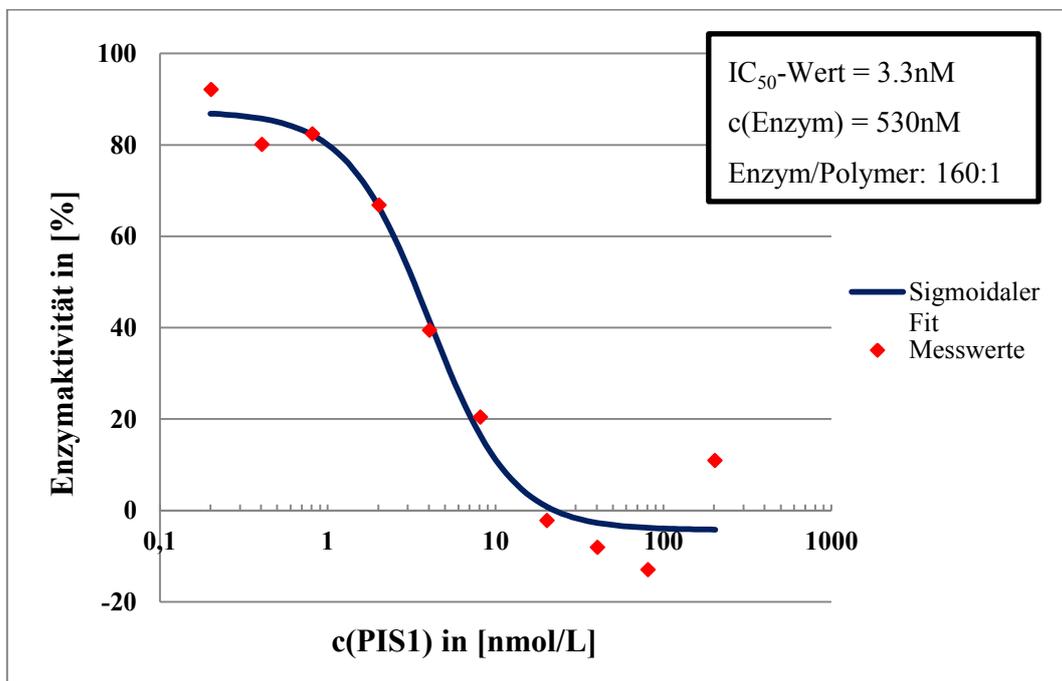
**Abb. 5.5.129:** Inhibition von Kallikrein in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PPGKW12.2. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 200 - 0.2 µg/mL.



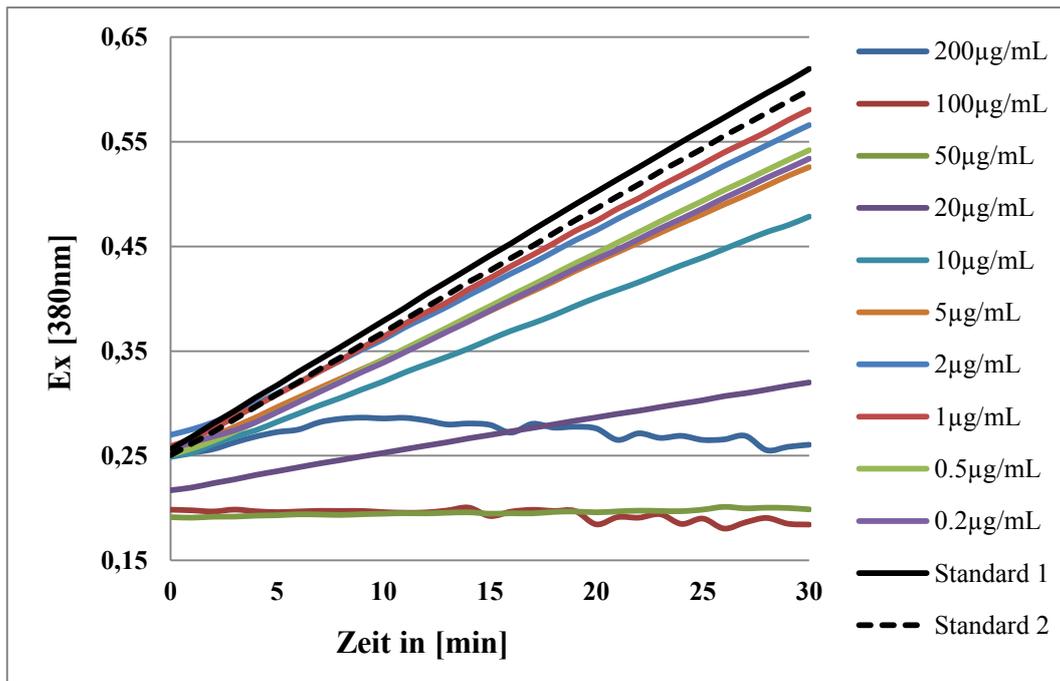
**Abb. 5.5.130:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPGKW12.2 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (7.7 nM bei einer 530 nM Enzymkonzentration).



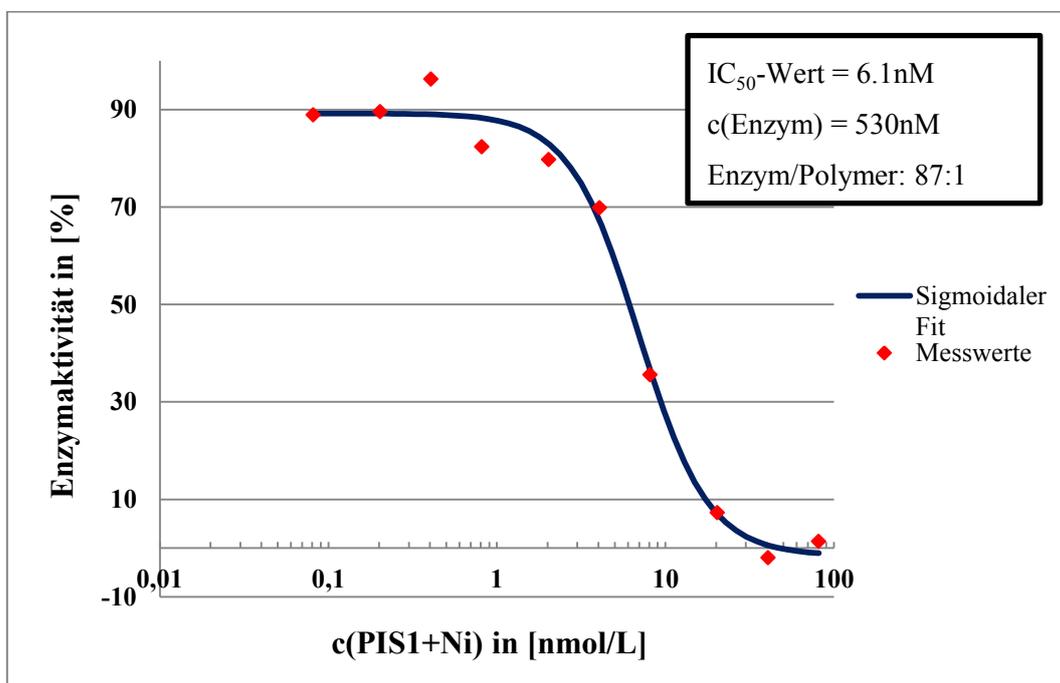
**Abb. 5.5.131:** Inhibition von Kallikrein in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von IS1. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 500 - 0.5 µg/mL.



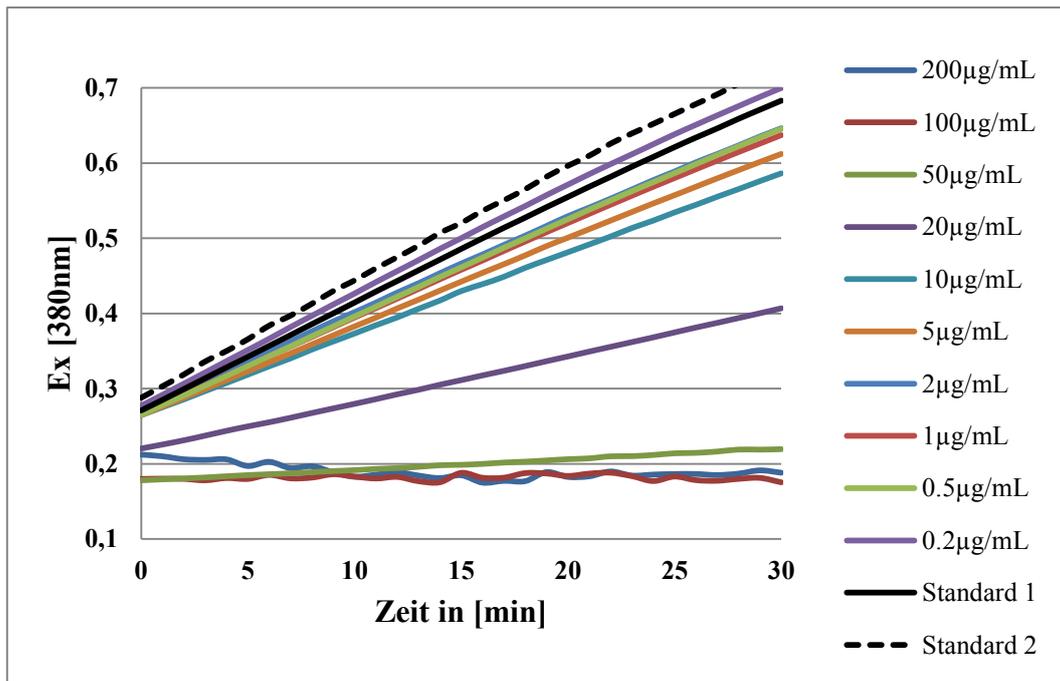
**Abb. 5.5.132:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PIS1 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (3.3 nM bei einer 530 nM Enzymkonzentration).



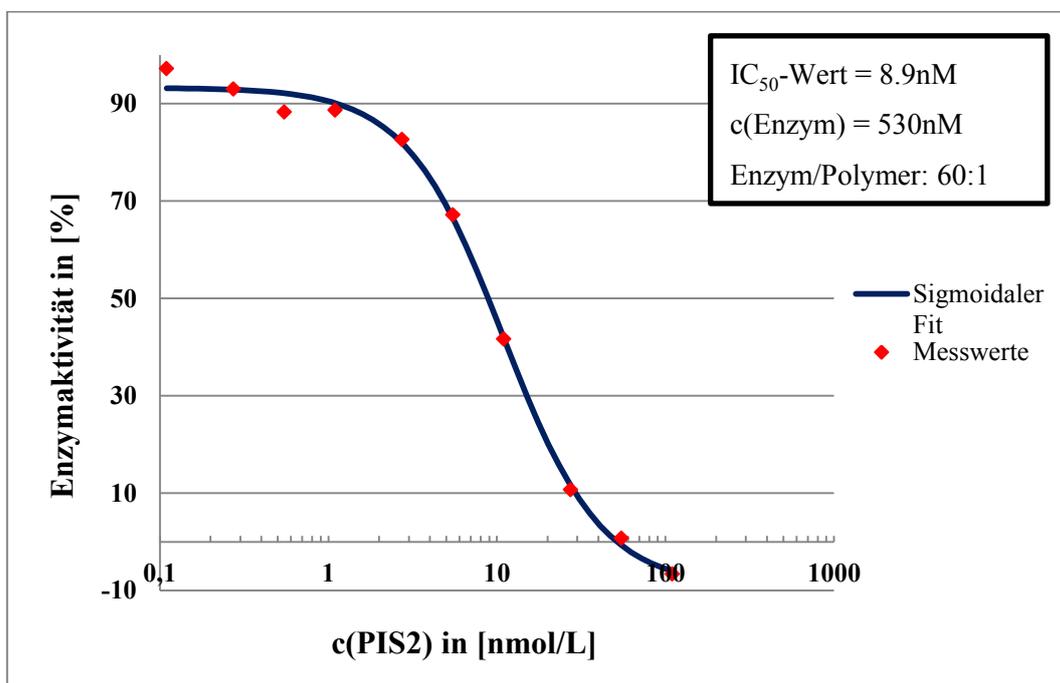
**Abb. 5.5.133:** Inhibition von Kallikrein in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von IS1+Ni. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 200 - 0,2 µg/mL.



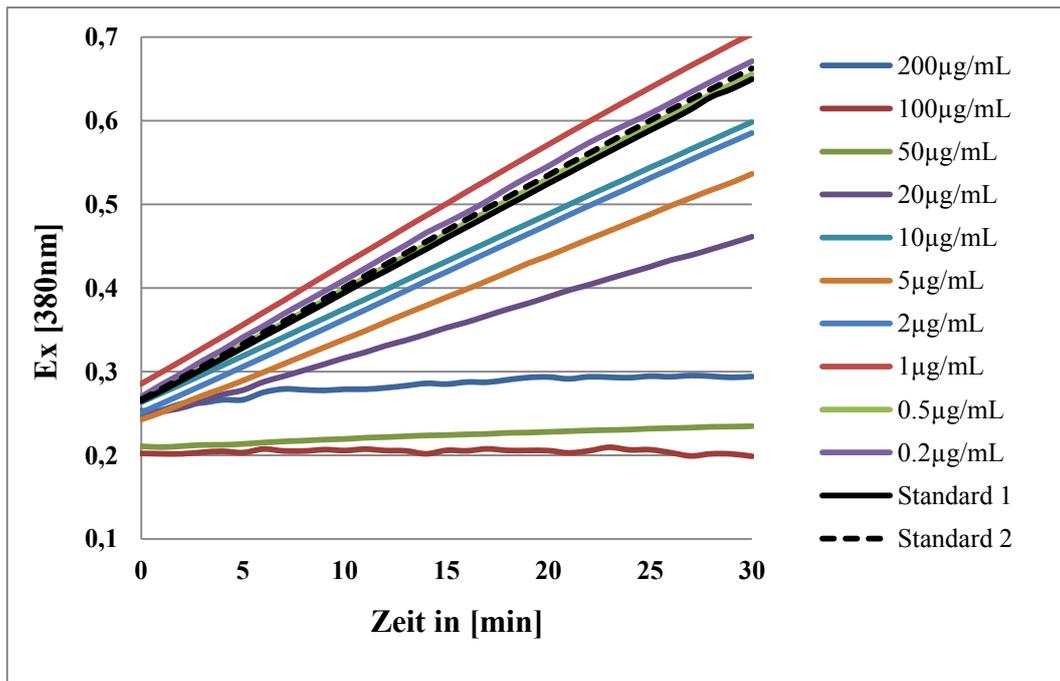
**Abb. 5.5.134:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PIS1+Ni zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (6,1 nM bei einer 530 nM Enzymkonzentration).



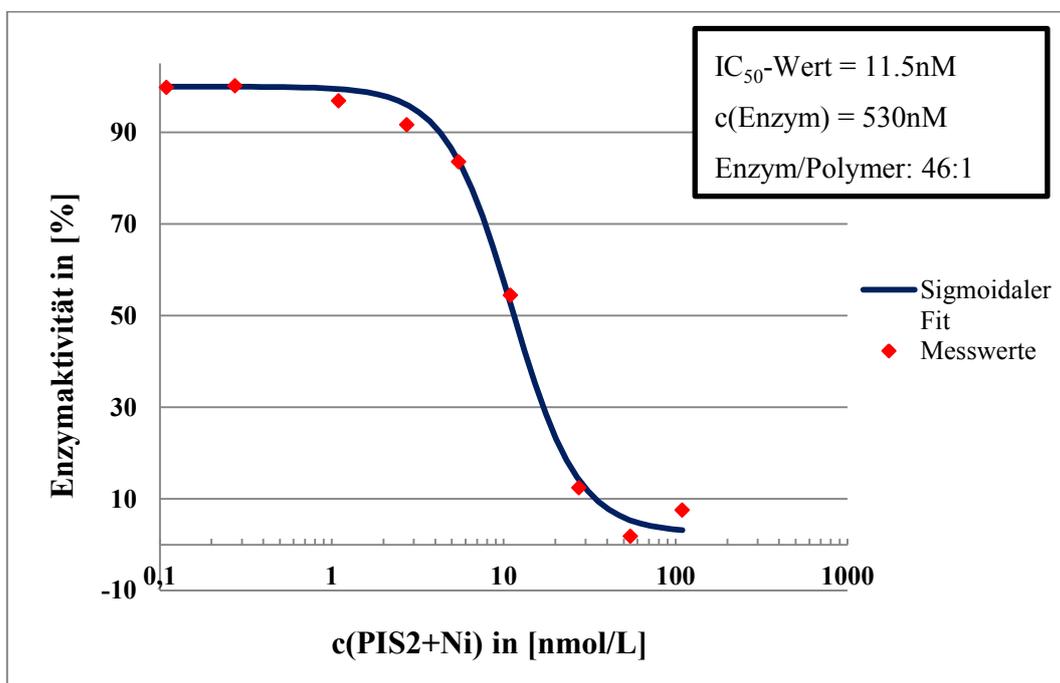
**Abb. 5.5.135:** Inhibition von Kallikrein in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von IS2. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 200 - 0.2 µg/mL.



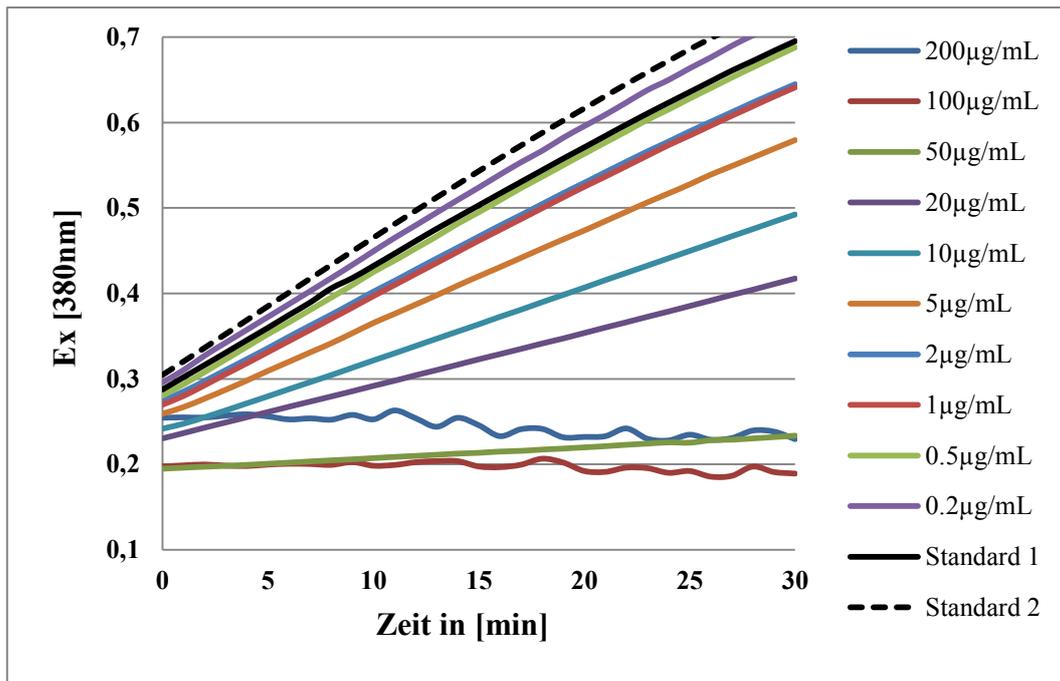
**Abb. 5.5.136:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PIS2 zur Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes (8.9 nM bei einer 530 nM Enzymkonzentration).



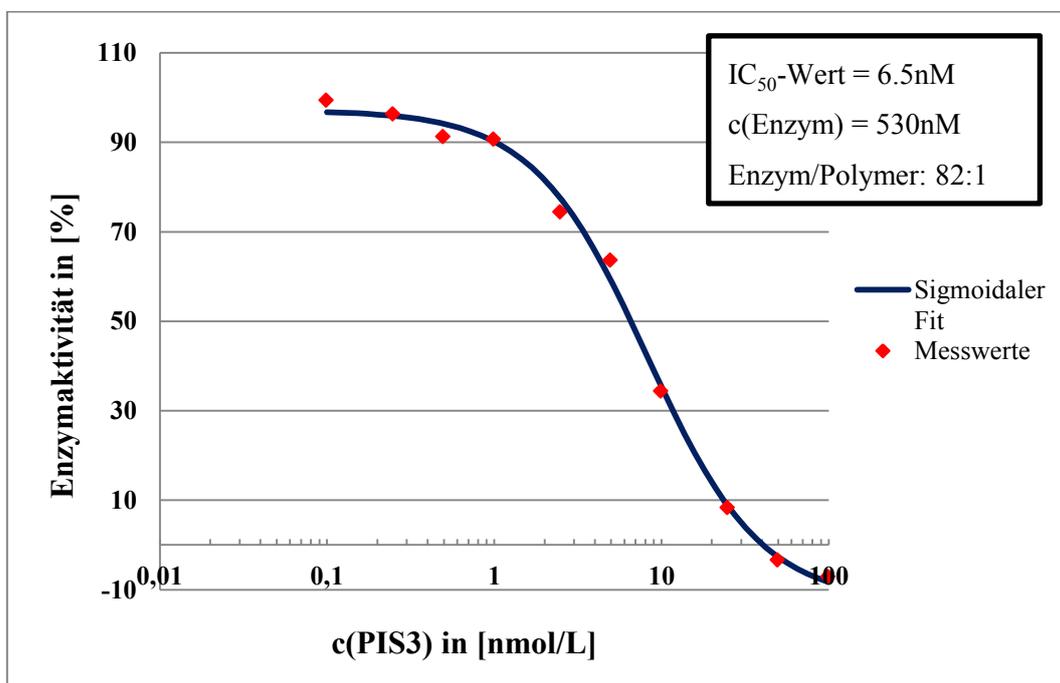
**Abb. 5.5.137:** Inhibition von Kallikrein in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von IS2+Ni. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 200 - 0.2 µg/mL.



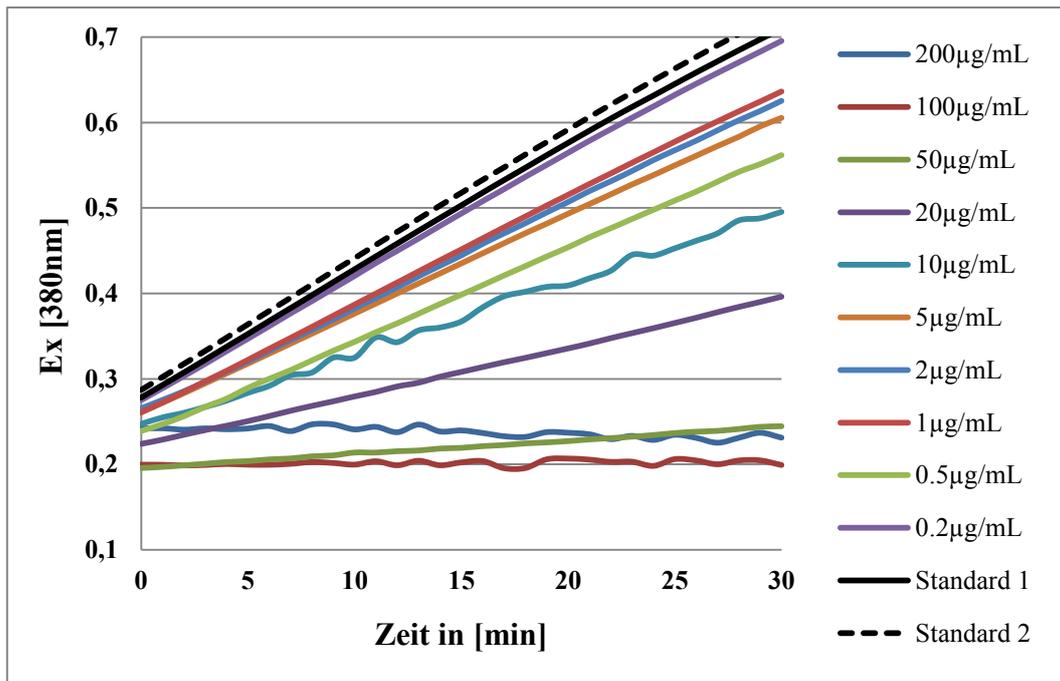
**Abb. 5.5.138:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PIS2+Ni zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (11.5 nM bei einer 530 nM Enzymkonzentration).



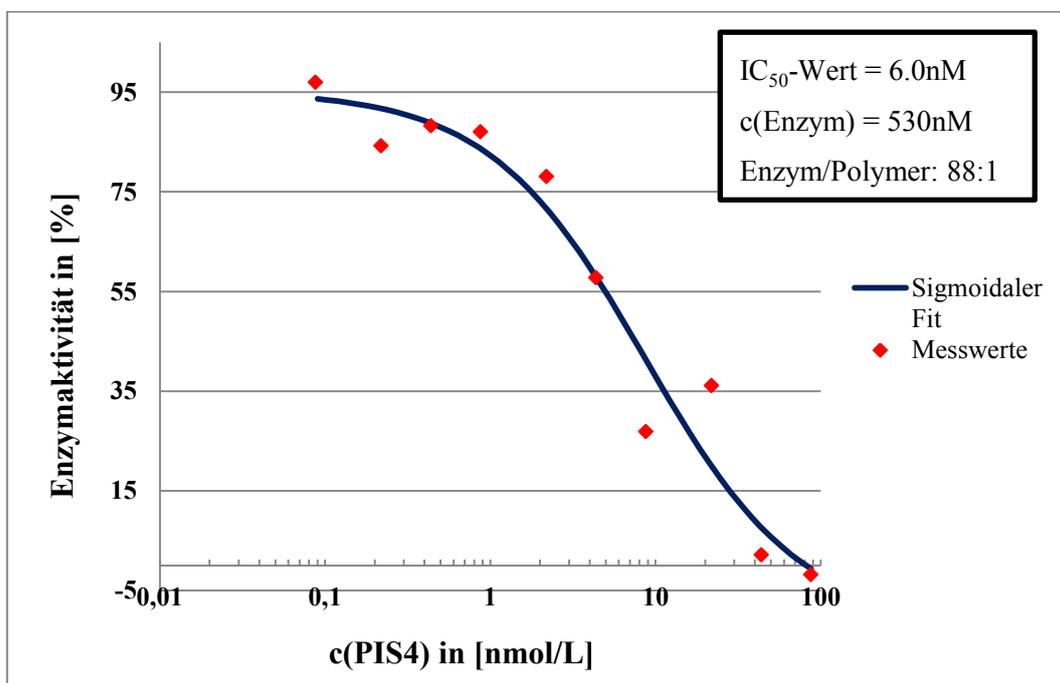
**Abb. 5.5.139:** Inhibition von Kallikrein in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von IS3. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 200 - 0.2 µg/mL.



**Abb. 5.5.140:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PIS3 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (6.5 nM bei einer 530 nM Enzymkonzentration).



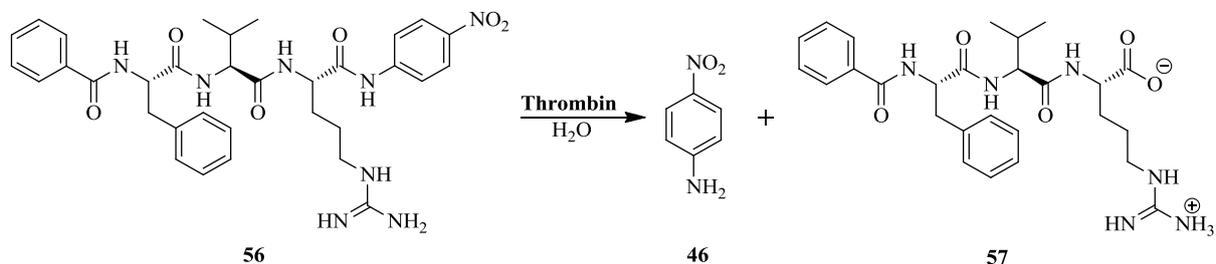
**Abb. 5.5.141:** Inhibition von Kallikrein in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von IS4. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 200 - 0.2 µg/mL.



**Abb. 5.5.142:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PIS4 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (6.0 nM bei einer 530 nM Enzymkonzentration).

### 5.5.6 Thrombin Assay

Bei dem durchgeführten Assay fungierte Bz-Phe-Val-Arg-pNA als künstliches Substrat **56**.<sup>[122]</sup>



**Abb. 5.5.143:** Hydrolytische Spaltung von Bz-Phe-Val-Arg-pNA **56** unter Freisetzung von *p*-Nitroanilin **46**.<sup>[195]</sup>

#### Verwendete Lösungen:

Thrombin-Puffer: 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH = 7.5.

Thrombin-Stock-Lösung: 100 U (1 U = 0.324 µg) Thrombin wurden in 1.0 mL 0.1% Albumin-Lösung gelöst (32.4 mg/L; 900 nM).

Thrombin-Lösung: 100 µL Thrombin-Stock-Lösung wurden in 900 µL Thrombin-Puffer gelöst.

Substrat-Lösung: 2.725 mg Bz-Phe-Val-Arg-pNA • HCl wurden in 1.0 mL DMSO gelöst.

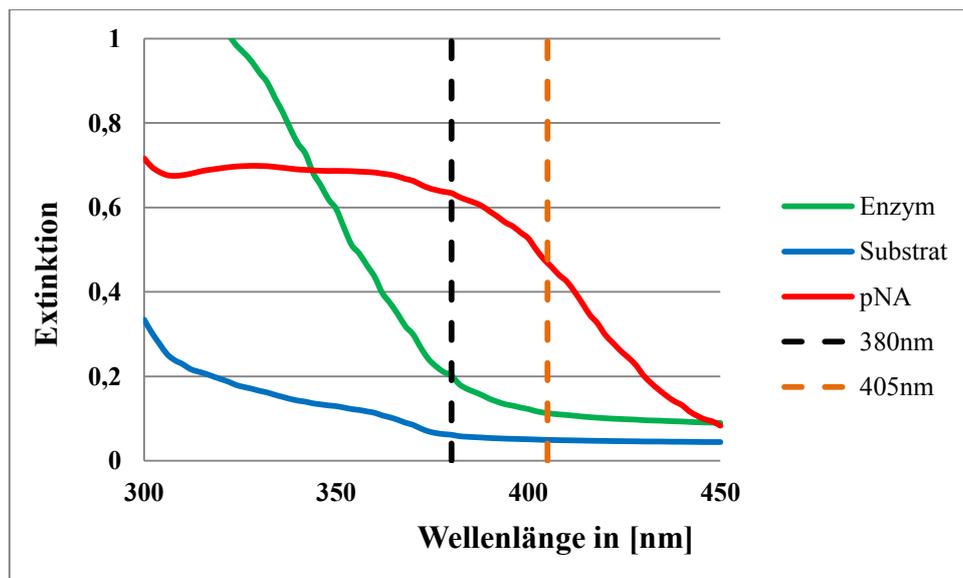
#### Durchführung:

80 µL Puffer wurden mit 10 µL Enzym-Lösung sowie mit 5 µL Polymer-Stammlösung versetzt. Anschließend folgte die Zugabe von 5 µL Substrat-Lösung. Das Reaktionsgemisch wurde daraufhin sofort vermessen.

Vor der Messung wurde die 96-well Mikrotiterplatte 10 min lang geschüttelt. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Temperatur von 25 °C und bei einer Wellenlänge von 380 nm. Nach 1 min erfolgte die Aufnahme des Messwertes. Bei einer Gesamtmesszeit von 60 min. Vor jeder Messwertaufnahme wurde die Mikrotiterplatte 30 s geschüttelt.

**Tab. 5.5.7:** Tabellarische Zusammenfassung des Kallikrein Assays.

Verwendete Lösungen	Volumen	Konzentration	Konzentration im Assay
Puffer	80 $\mu\text{L}$	-	-
Enzym	10 $\mu\text{L}$	$9.0 \cdot 10^{-8} \text{ mol/L}$	$9.0 \cdot 10^{-9} \text{ mol/L}$
Polymer bzw. Wasser	5 $\mu\text{L}$	1.0 mg/mL	50 $\mu\text{g/mL}$
keine Vorinkubation			
Substrat	5 $\mu\text{L}$	$4.0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$	$2.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$
Gesamtvolumen	100 $\mu\text{L}$		

Absorptionsspektrum:**Abb. 5.5.144:** Absorptionsübersicht des Enzyms, Substrats und Chromophors im Thrombin Assay.

### Inhibitionstest mit literaturbekannten Hemmstoff:

Die Kontrollmessung wurde mit Argatroban durchgeführt.

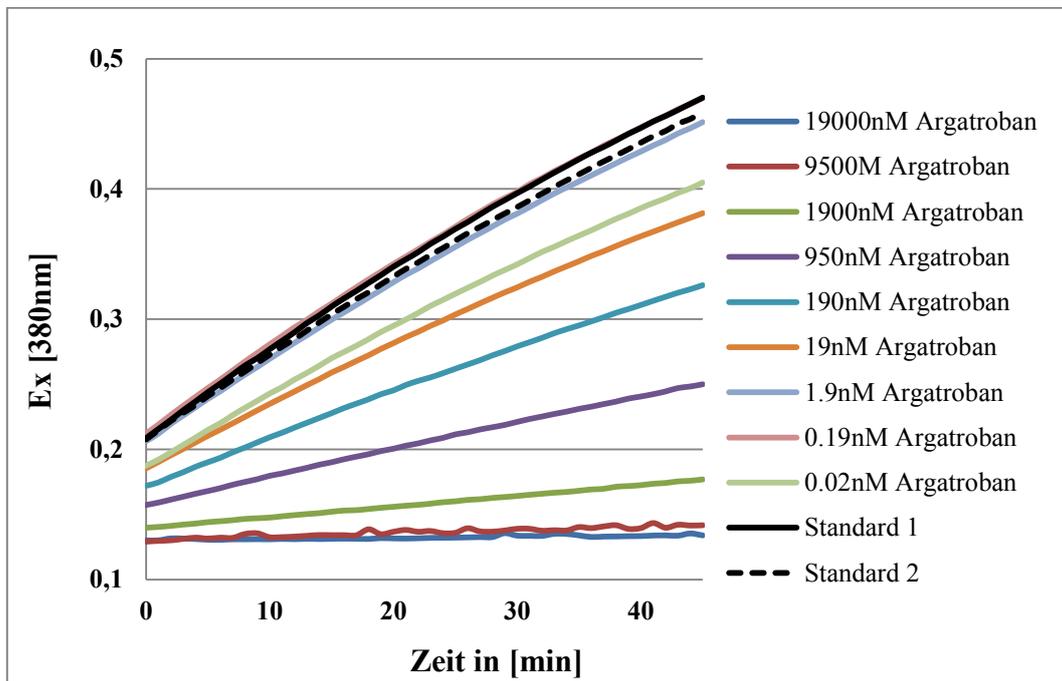


Abb. 5.5.145: Thrombin Inhibitionstest mit  $1.9 \cdot 10^4$  -  $2 \cdot 10^{-2}$  nM Argatroban-Lösung.

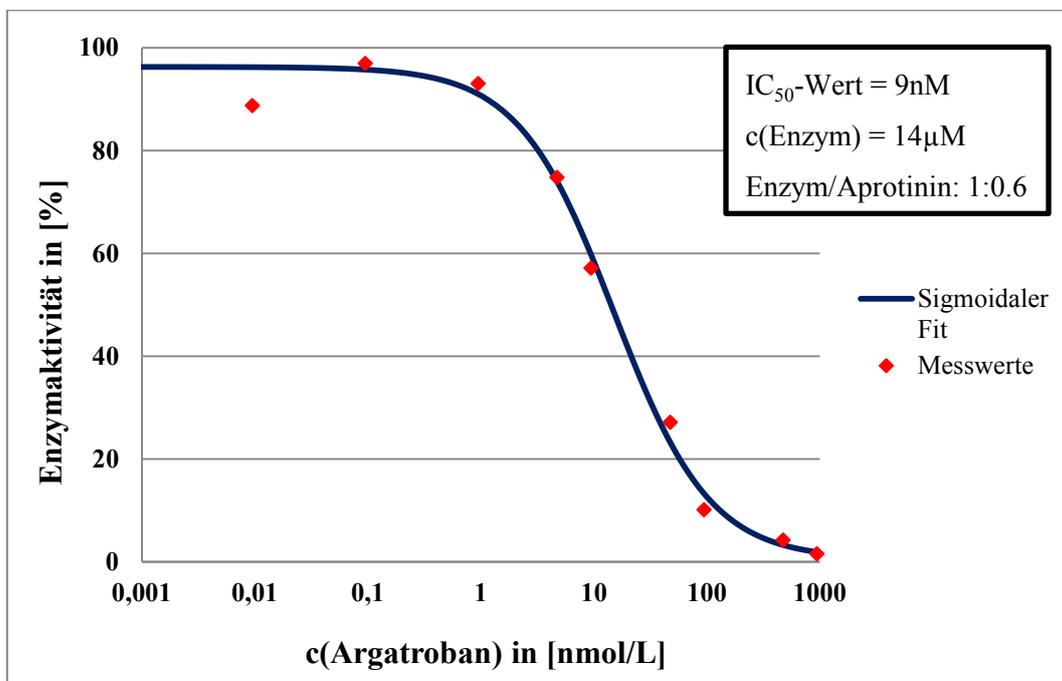
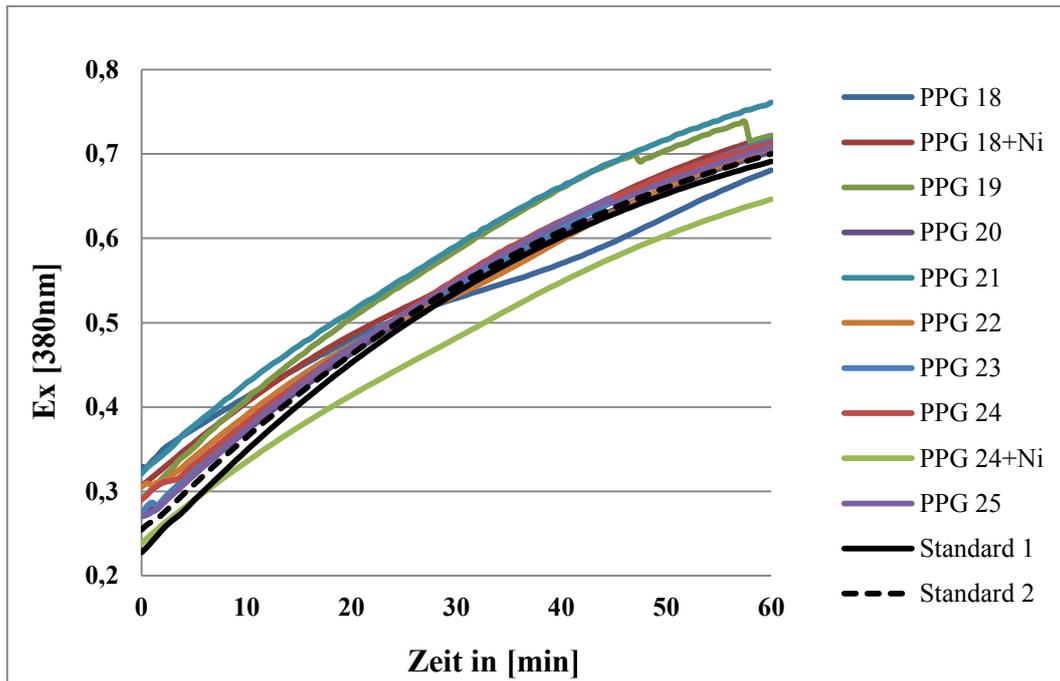
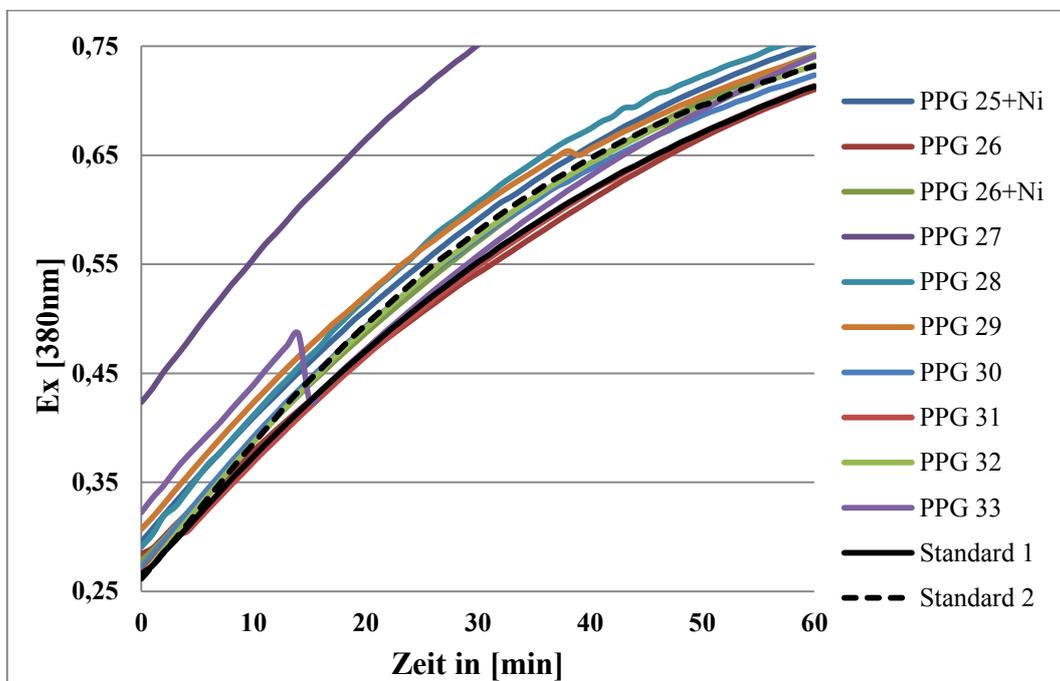


Abb. 5.5.146: Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von Argatroban zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (9 nM bei einer 14 nM Enzymkonzentration).

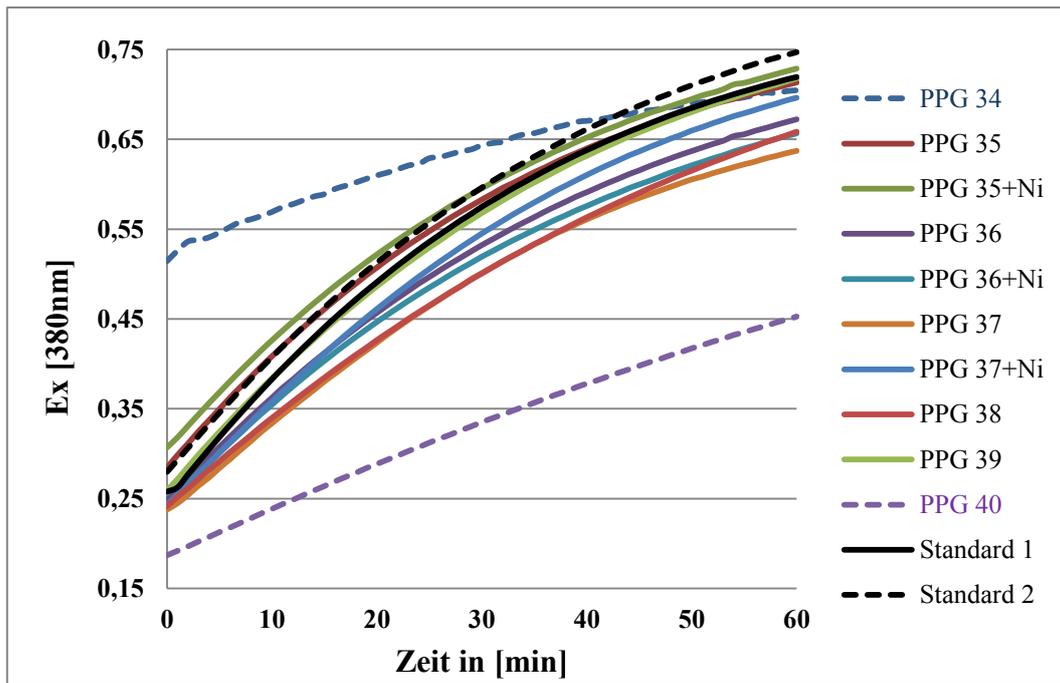
Screening der Polymere:



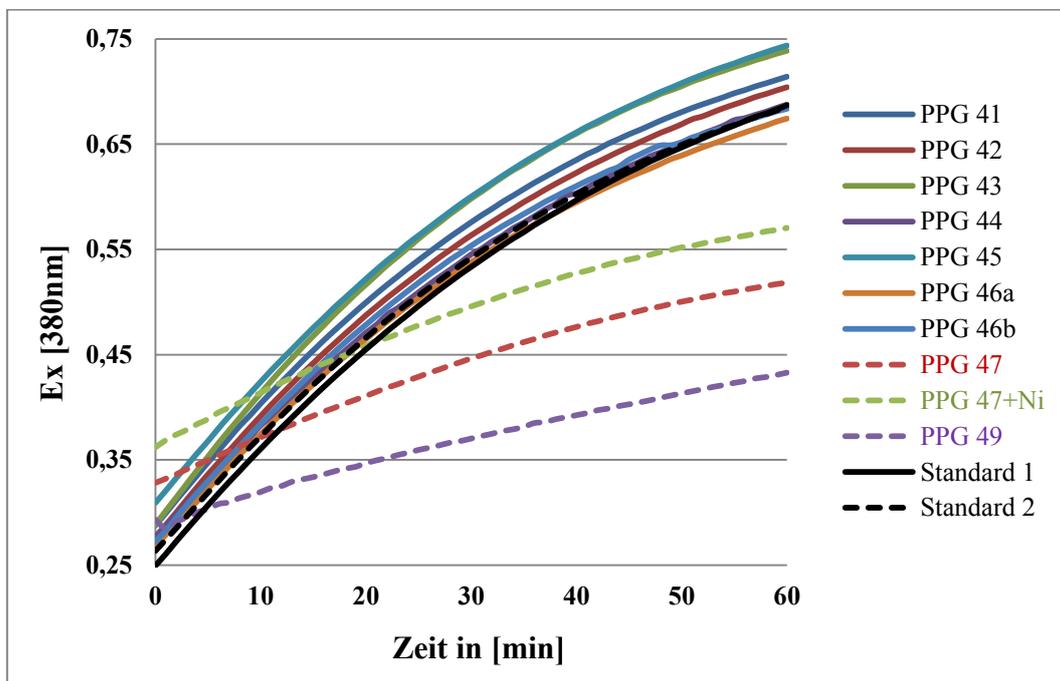
**Abb. 5.5.147:** Screening der 1. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Thrombin zugeordnet werden.



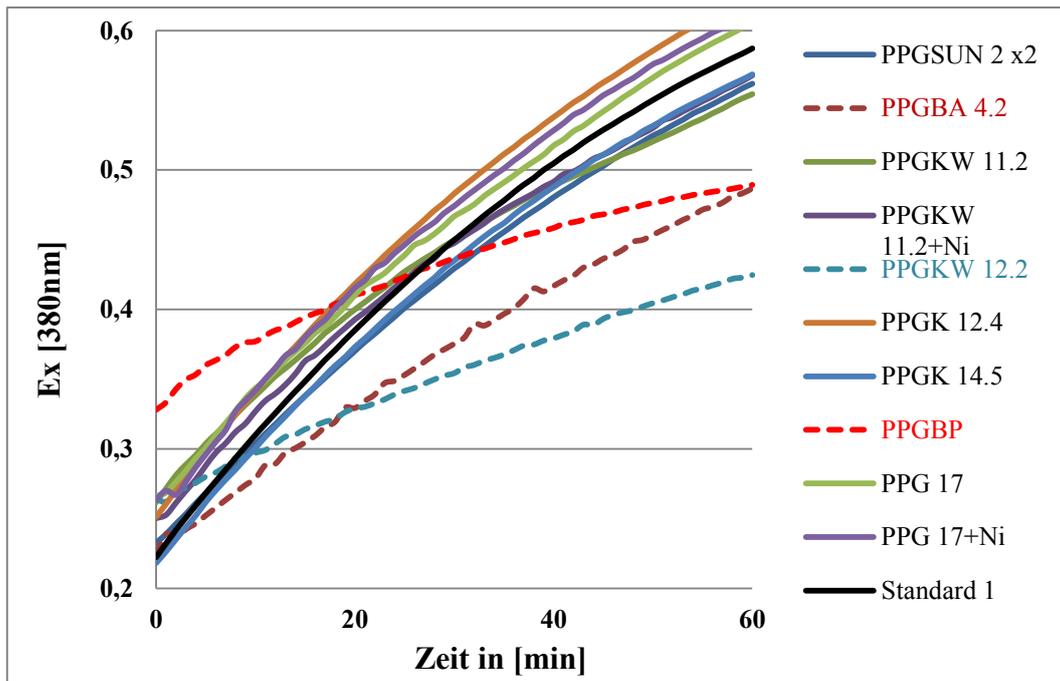
**Abb. 5.5.148:** Screening der 2. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Thrombin zugeordnet werden.



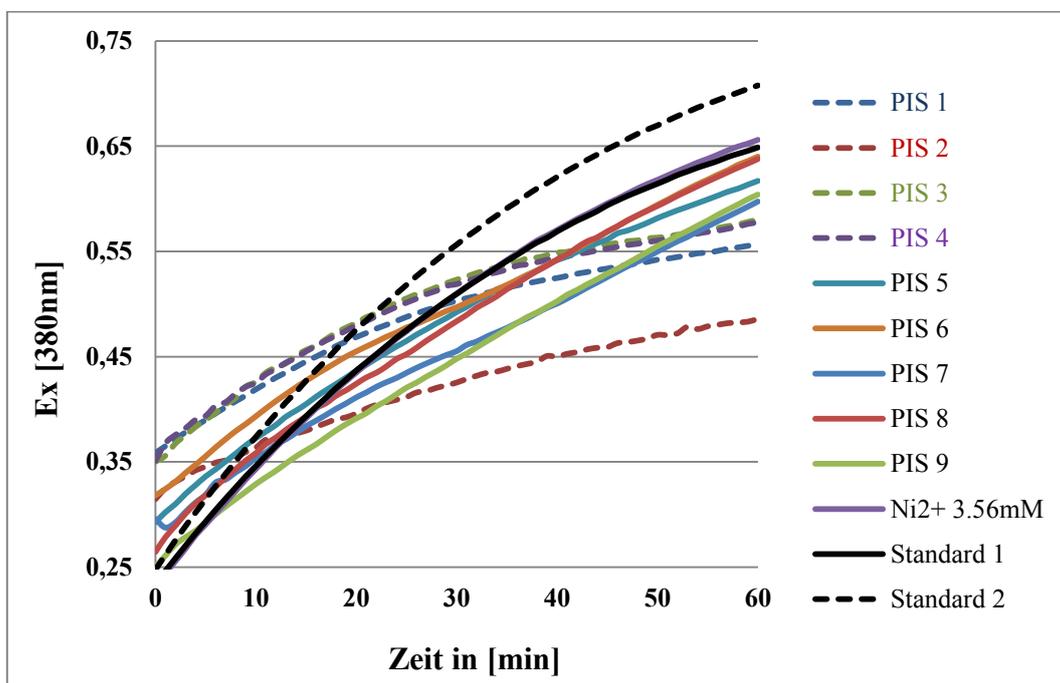
**Abb. 5.5.149:** Screening der 3. Polymerreihe. Polymere PG34 und PG40 zeigten eine inhibitorische Wirksamkeit gegenüber Thrombin.



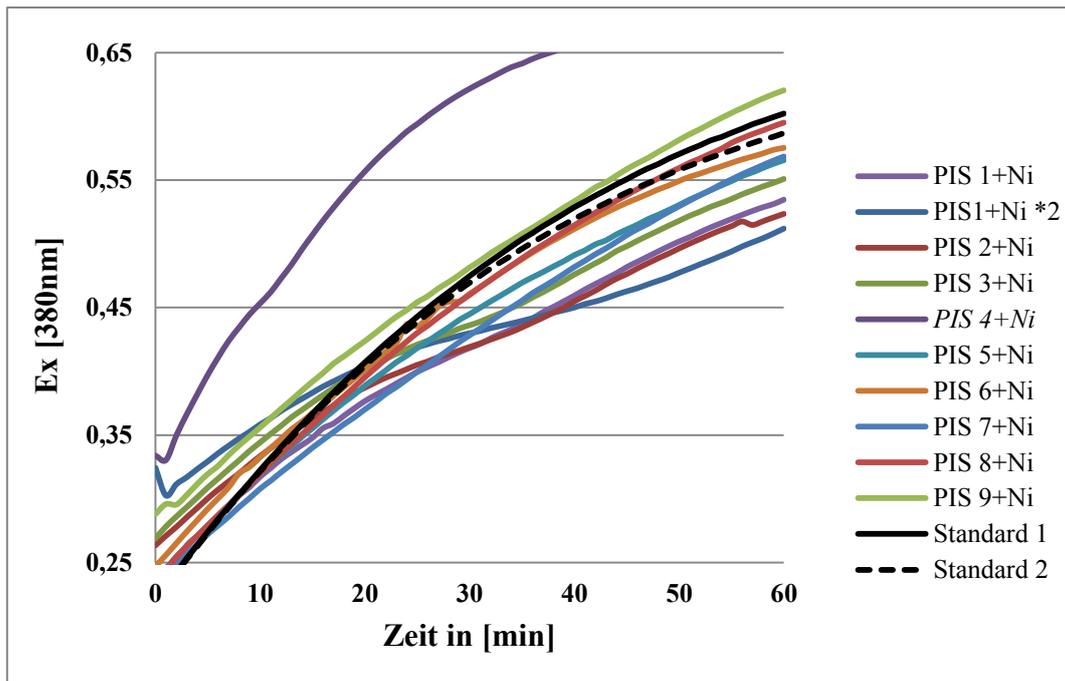
**Abb. 5.5.150:** Screening der 4. Polymerreihe. Polymer PG47 zeigt mit und ohne Zusatz von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Thrombin. Polymer PG49 konnte ebenfalls eine Enzym Wirksamkeit zugeordnet werden.



**Abb. 5.5.151:** Screening der 5. Polymerreihe. Polymere PGBA4.2, PGKW12.2 und PGBP zeigten eine inhibitorische Wirksamkeit gegenüber Thrombin.

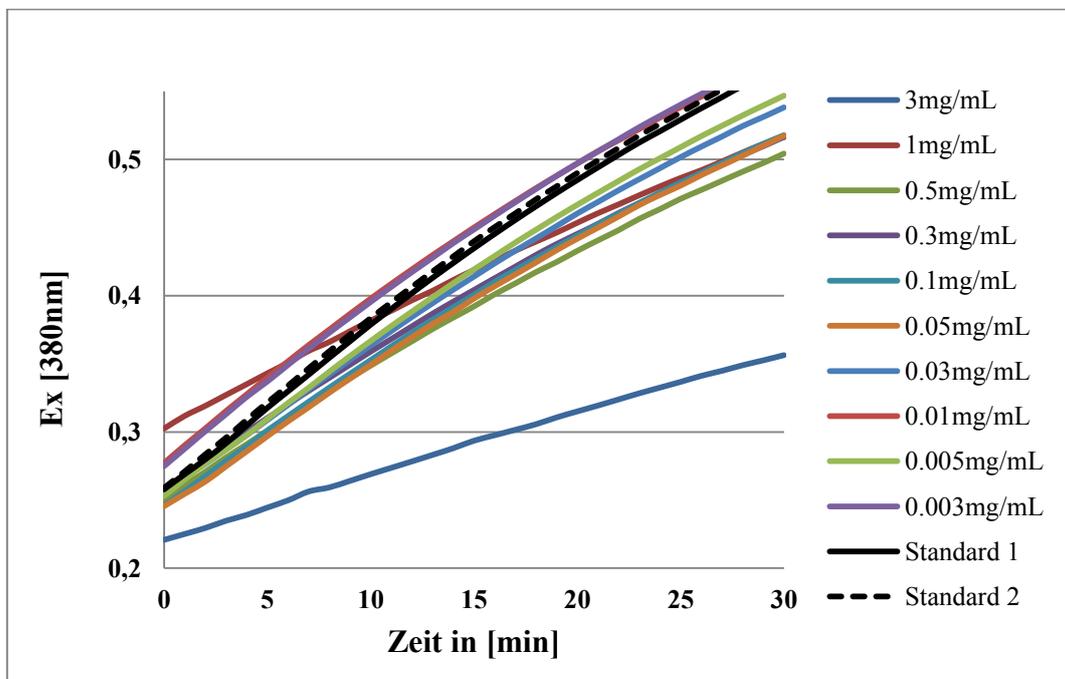


**Abb. 5.5.152:** Screening der 6. Polymerreihe. Polymere IS1 - 4 zeigten eine inhibitorische Wirksamkeit gegenüber Thrombin, wobei Polymer PIS1 die größte Wirksamkeit besaß.

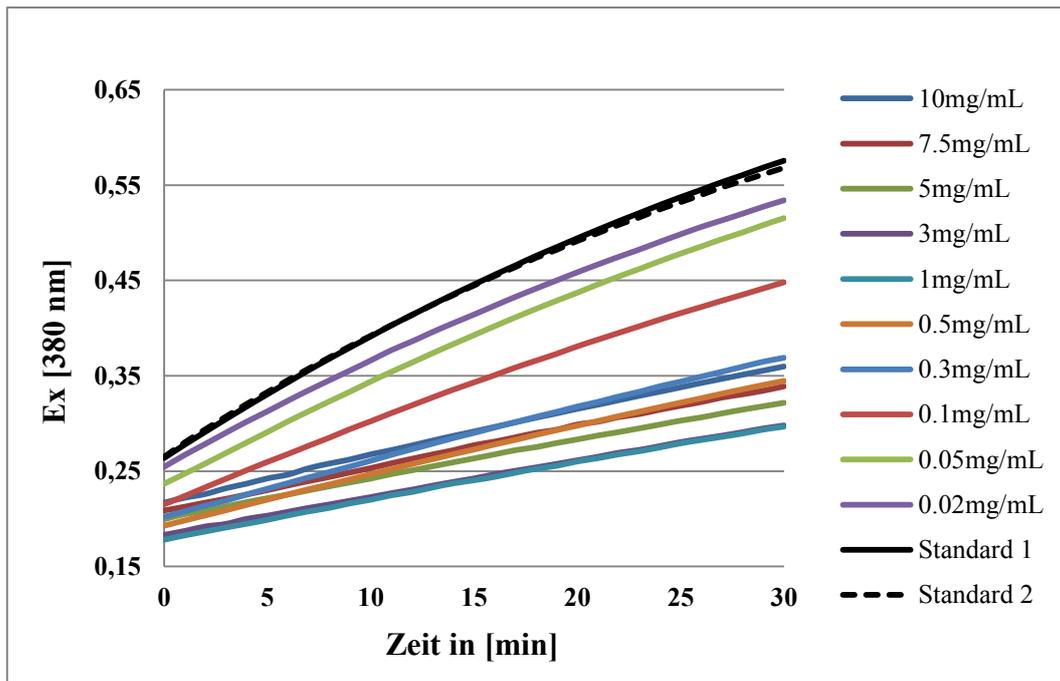


**Abb. 5.5.153:** Screening der 7. Polymerreihe. Es konnte keinem Polymer in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen eine inhibitorische Eigenschaft gegenüber Thrombin zugeordnet werden. Bei Polymer IS4 wurde versehentlich die doppelte Enzymmenge verwendet. Polymer IS1 wurde in einfacher und doppelter Konzentration vermessen.

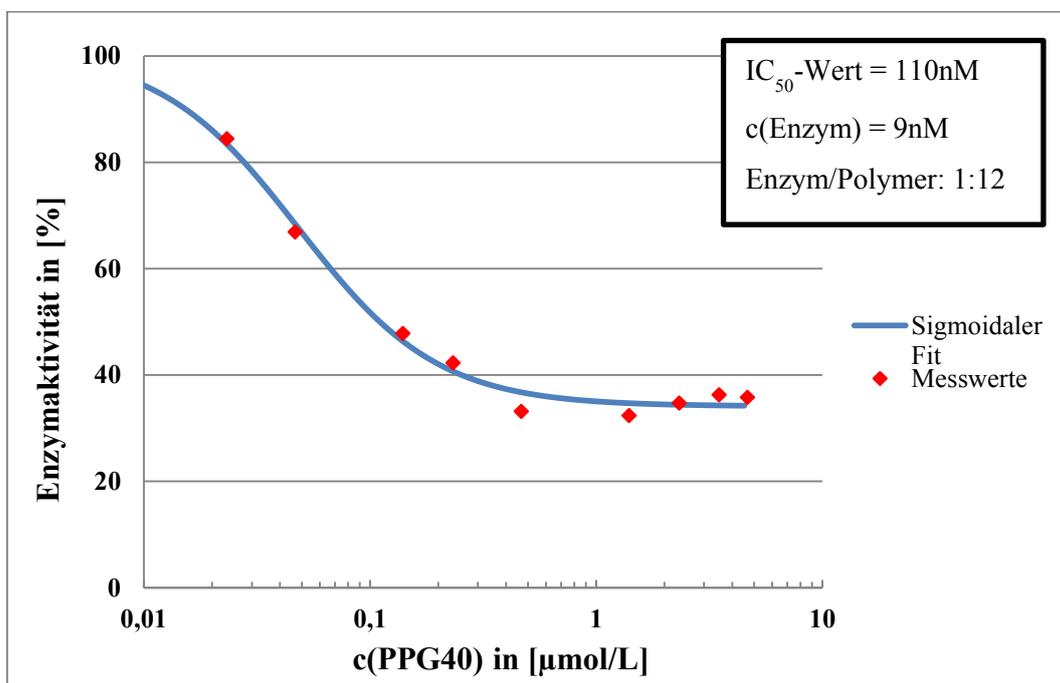
Bestimmung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte der wirksamen Polymere:



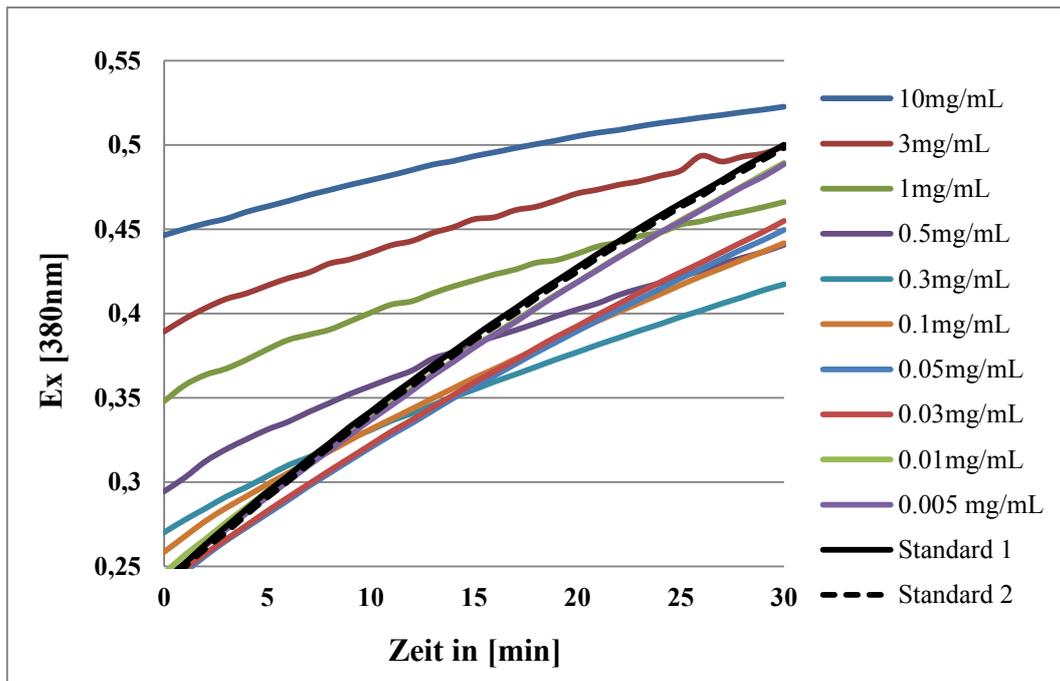
**Abb. 5.5.154:** Inhibition von Thrombin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PGBA4.2. Polymere PGBA4.2 und IS1+2 reduzieren die Enzymwirksamkeit um ca. 50 % bei der maximal Konzentration der Stammlösungen (3 mg/mL) was einem „ $\text{IC}_{50}$ -Wert“ im „ $\mu\text{M}$ -Bereich“ entsprechen würde.



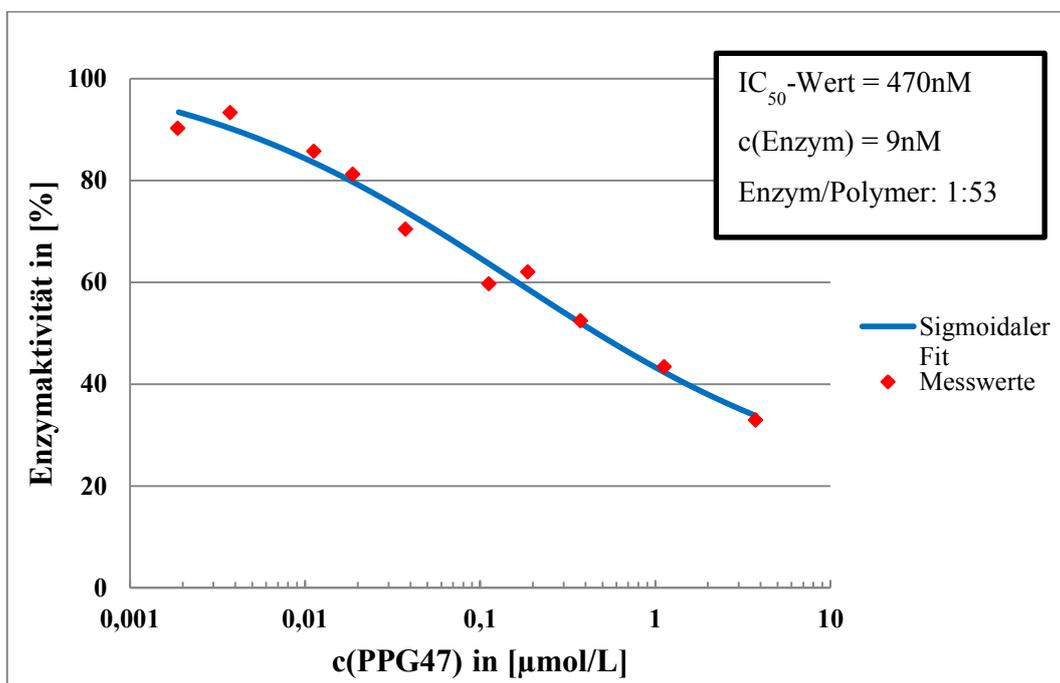
**Abb. 5.5.155:** Inhibition von Thrombin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PPG40. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 10 - 0,02 mg/mL.



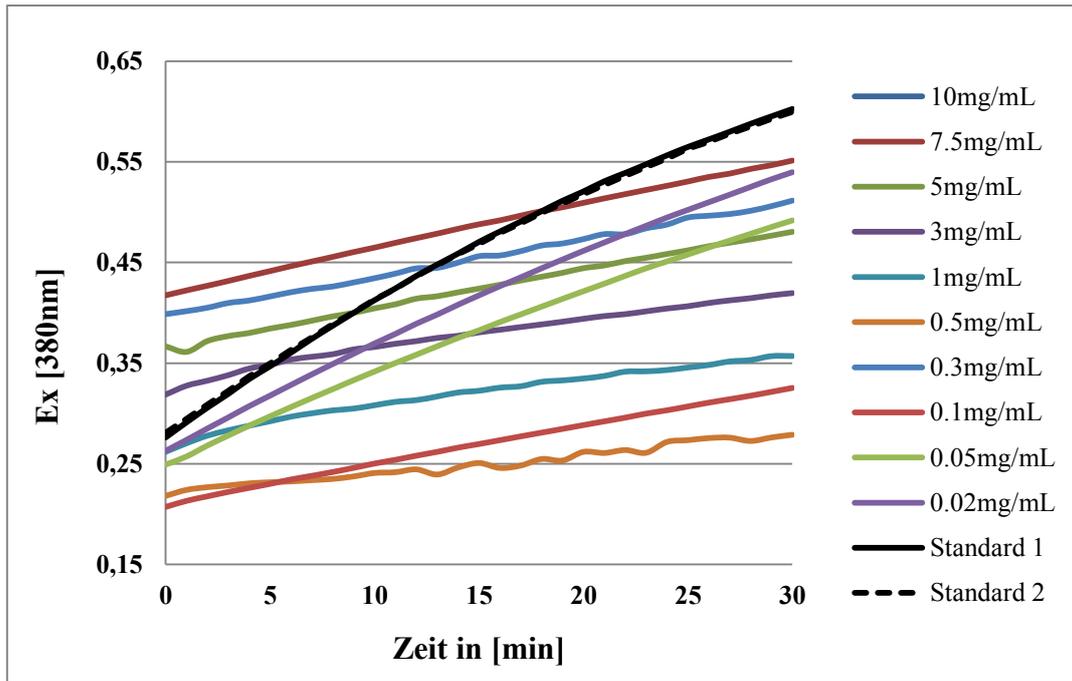
**Abb. 5.5.156:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG40 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (110 nM bei einer 9 nM Enzymkonzentration).



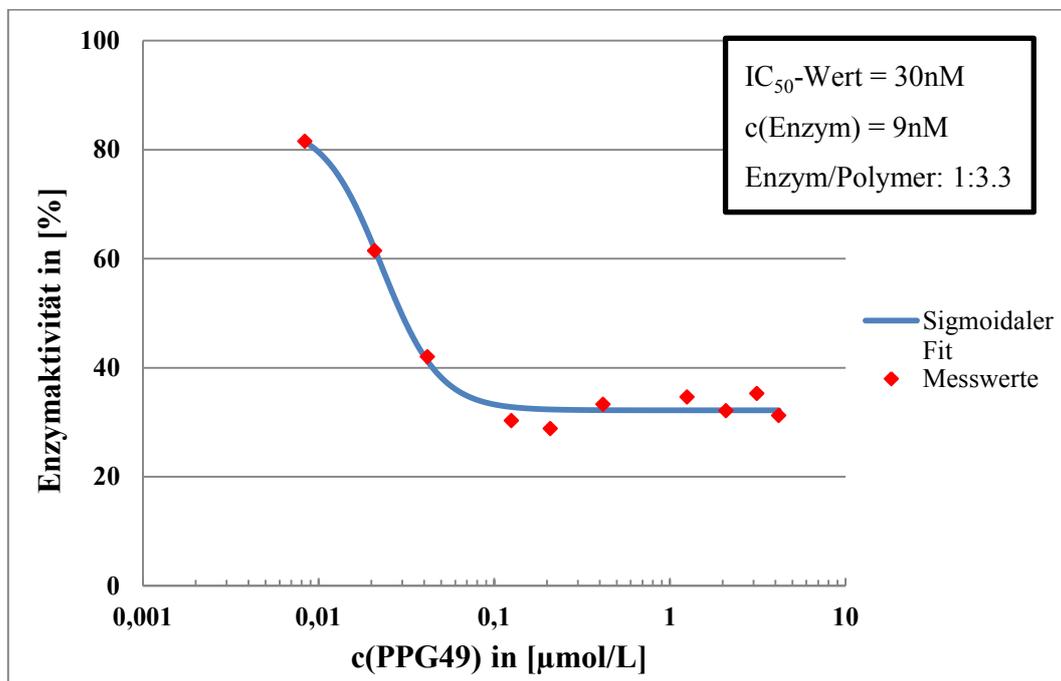
**Abb. 5.5.157:** Inhibition von Thrombin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PG47. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 10 - 0.005 mg/mL.



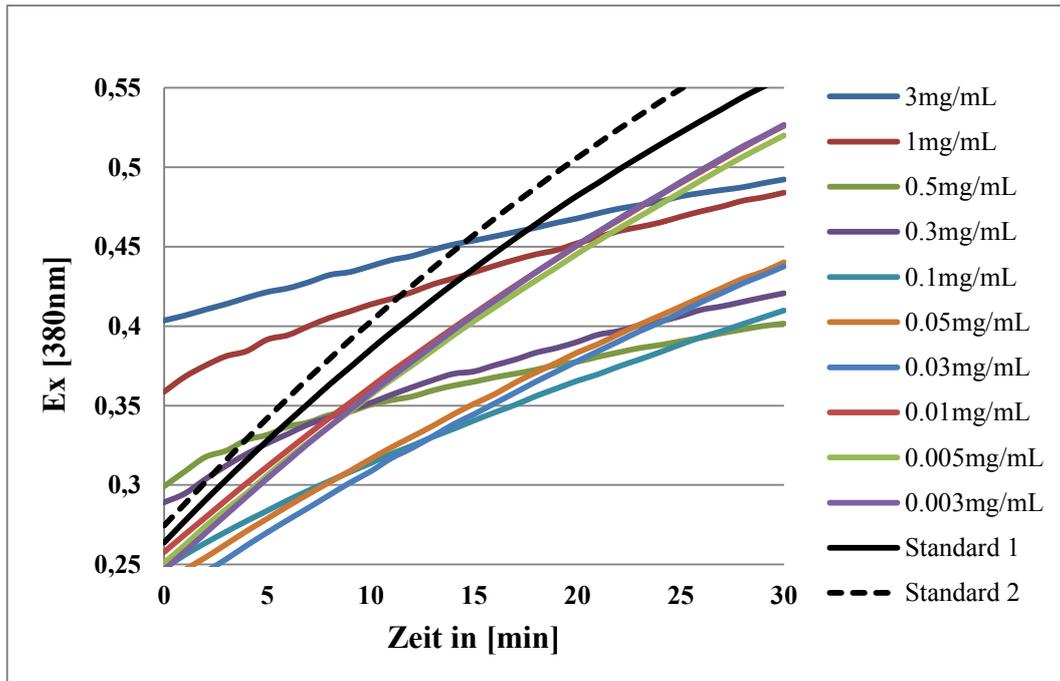
**Abb. 5.5.158:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG47 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (470 nM bei einer 9 nM Enzymkonzentration).



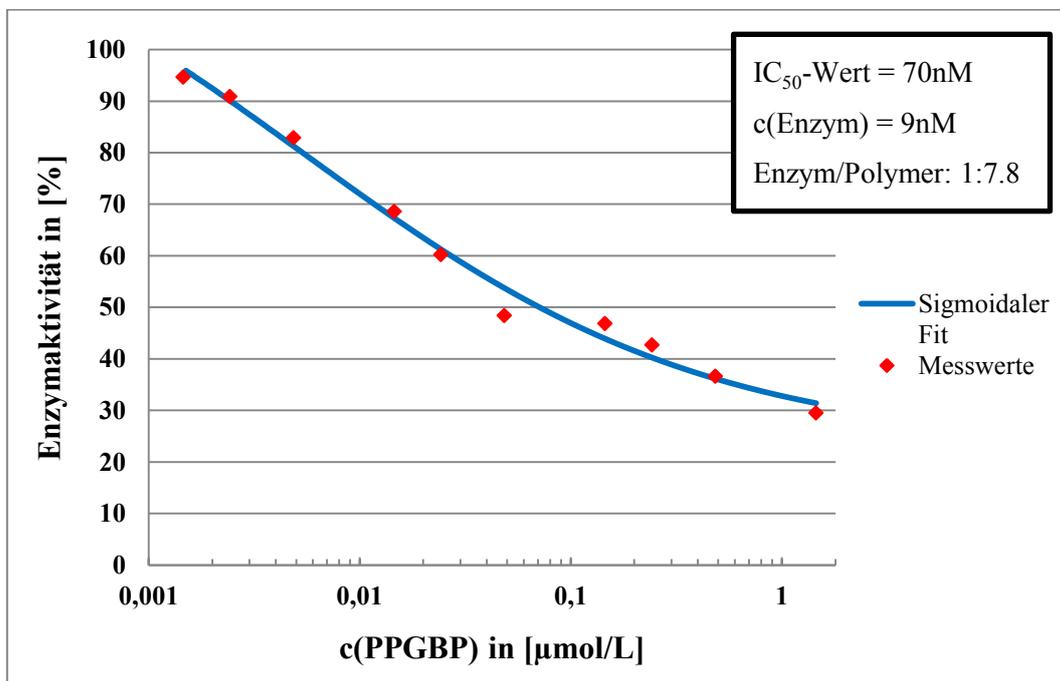
**Abb. 5.5.159:** Inhibition von Thrombin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PG49. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 10 - 0.02 mg/mL.



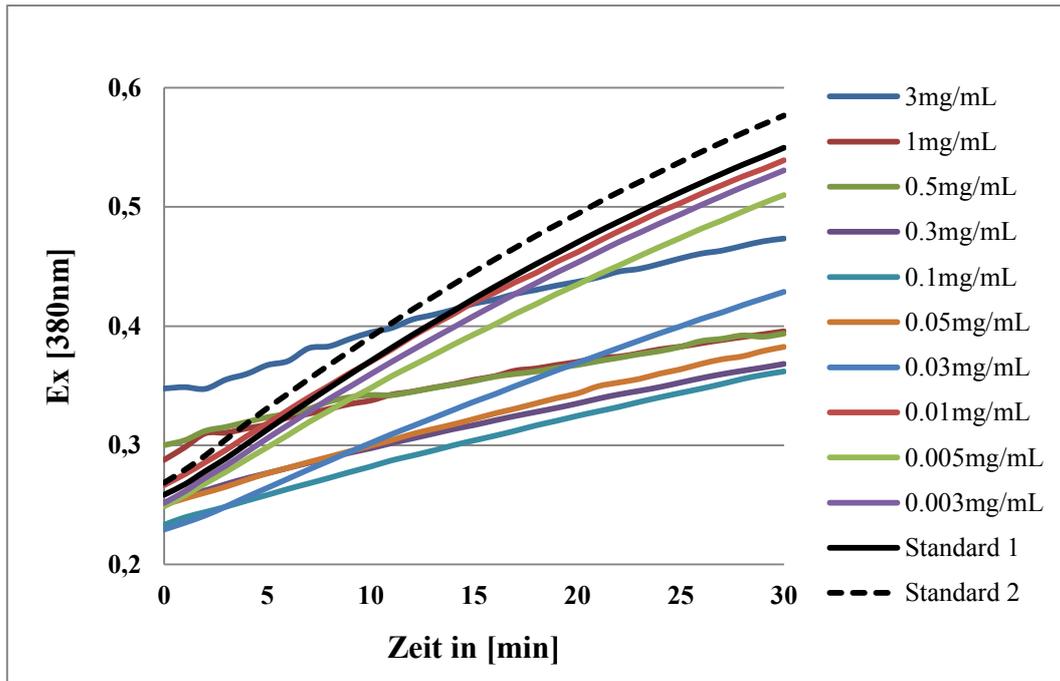
**Abb. 5.5.160:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG49 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (30 nM bei einer 9 nM Enzymkonzentration).



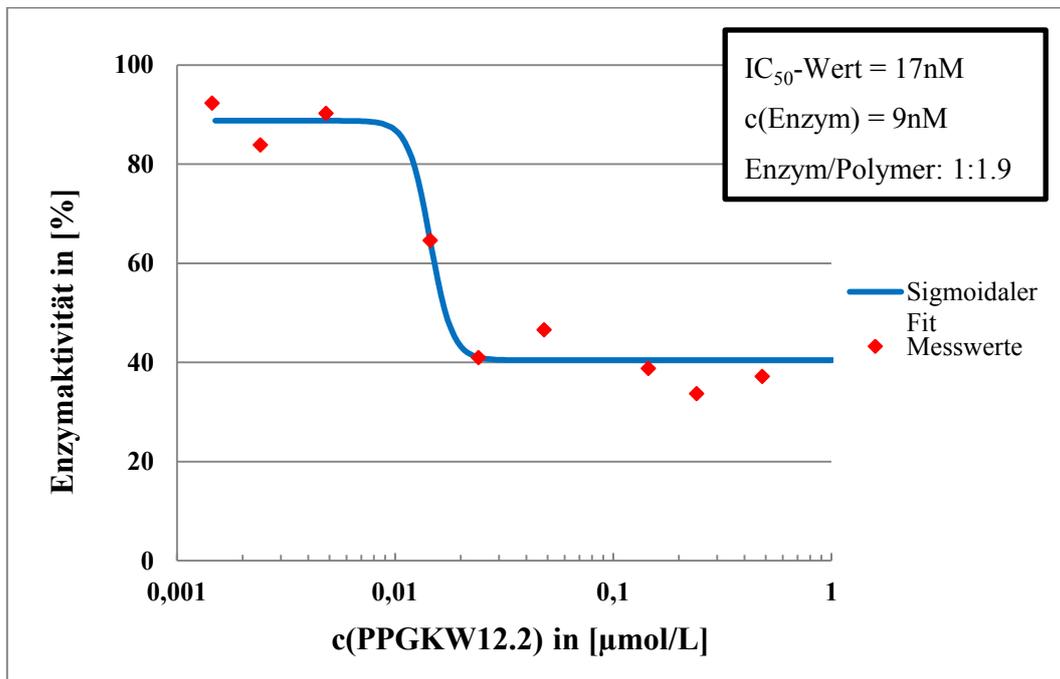
**Abb. 5.5.161:** Inhibition von Thrombin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PGBP. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 3 - 0.003 mg/mL.



**Abb. 5.5.162:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPGBP zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (70 nM bei einer 9 nM Enzymkonzentration).



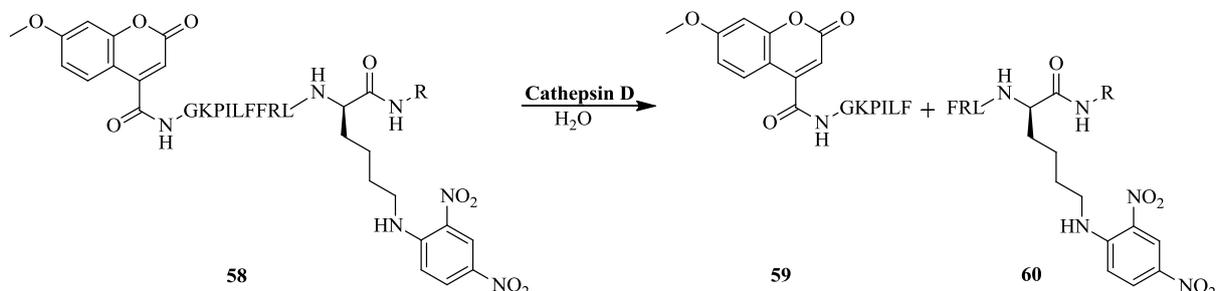
**Abb. 5.5.163:** Inhibition von Thrombin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PGKW12.2. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 3 - 0.003 mg/mL.



**Abb. 5.5.164:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPGKW12.2 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes (17 nM bei einer 9 nM Enzymkonzentration).

### 5.5.7 Cathepsin D Assay

Bei dem durchgeführten Assay fungierte das intramolekular gequentschte MCA-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(DNP)-D-Arg-NH<sub>2</sub> als künstliches Substrat **58**.



**Abb. 5.5.165:** Hydrolytische Spaltung des Substrates **58** unter Freisetzung des fluoreszenzaktiven Coumarine Derivats **59** und dem Dinitrophenyl Derivats **60**.<sup>[213]</sup>

Das verwendete Assay Kit wurde von *Sigma Aldrich* [CS0800] erworben.

#### Verwendete Lösungen:

Verdünnungs-Puffer: 975  $\mu$ L Assay-Puffer wurden mit 25  $\mu$ L 0.1 %iger Albumin-Lösung verdünnt.

Cathepsin D-Stock-Lösung: Das vorhandene Cathepsin D (5 Units) wurde in 0.5 mL bidest. Wasser gelöst (0.7 mg/mL)

Cathepsin D-Lösung: 10  $\mu$ L Cathepsin D-Stock-Lösung wurden mit 90  $\mu$ L Verdünnungs-Puffer verdünnt. 10  $\mu$ L dieser Lösung wurden nun mit 290  $\mu$ L Verdünnungs-Puffer erneut verdünnt (2.3  $\mu$ g/mL).

Substrat-Lösung: Die MCA-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(DNP)-D-Arg-NH<sub>2</sub>-Lösung (in DMSO), war im Assay Kit enthalten.

#### Durchführung:

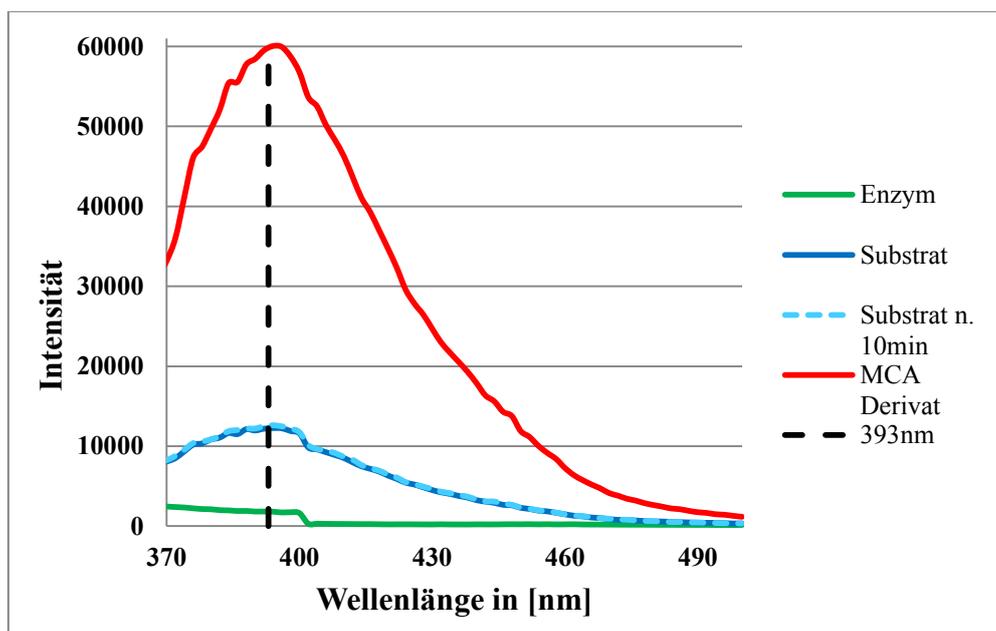
5  $\mu$ L Enzym-Lösung wurden mit 20  $\mu$ L Assay-Puffer, 73  $\mu$ L bidest. Wasser und 5  $\mu$ L Polymer-Stammlösung versetzt. Danach erfolgte bei 37 °C eine 10 minütige Vorinkubation unter Schütteln im Reader. Anschließend erfolgt die Zugabe von 2  $\mu$ L Substrat-Lösung. Das Reaktionsgemisch wurde daraufhin sofort vermessen.

Vor der Messung wurde die „schwarze“ 96-well Mikrotiterplatte 30 s lang geschüttelt. Die Messung erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C und bei einer Anregungswellenlänge von 328 nm und einer Emissionswellenlänge von 393 nm. Nach 30 s erfolgte die Aufnahme des Messwertes. Bei einer Gesamtmesszeit von 30 min. Vor jeder Messwertaufnahme wurde die Mikrotiterplatte 5 s geschüttelt.

**Tab. 5.5.8:** Tabellarische Zusammenfassung des Cathepsin D Assays.

Verwendete Lösungen	Volumen	Konzentration	Konzentration im Assay
Enzym	5 µL	$5.2 \cdot 10^{-8}$ mol/L	$2.5 \cdot 10^{-9}$ mol/L
Assay-Puffer	20 µL	-	-
Bidest. Wasser	73	-	-
Polymer bzw. Wasser	5 µL	1.0 mg/mL	48 µg/mL
10 min Vorinkubation unter Schütteln bei 37 °C			
Substrat	2 µL	$1.0 \cdot 10^{-3}$ mol/L	$4.8 \cdot 10^{-5}$ mol/L
Gesamtvolumen	105 µL		

### Absorptionsspektrum:



**Abb. 5.5.166:** Absorptionsübersicht des Enzyms, Substrats und Chromophors im Cathepsin D Assay.

Inhibitionstest mit literaturbekannten Hemmstoff:

Die Kontrollmessung wurde mit Pepstatin A, welches im Assay Kit enthalten war durchgeführt.

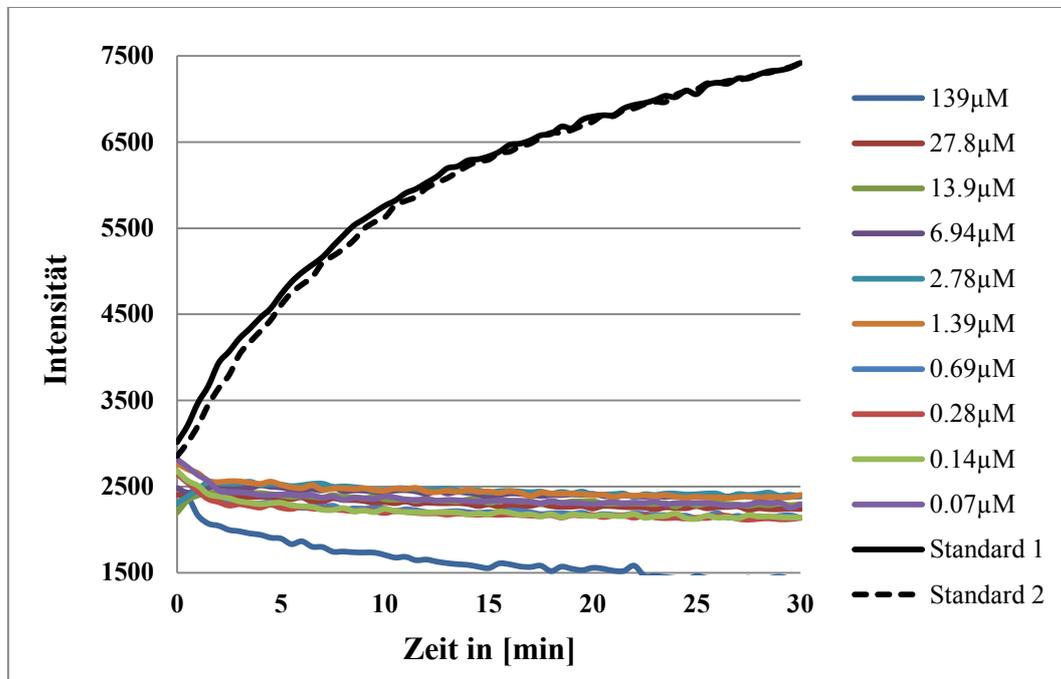
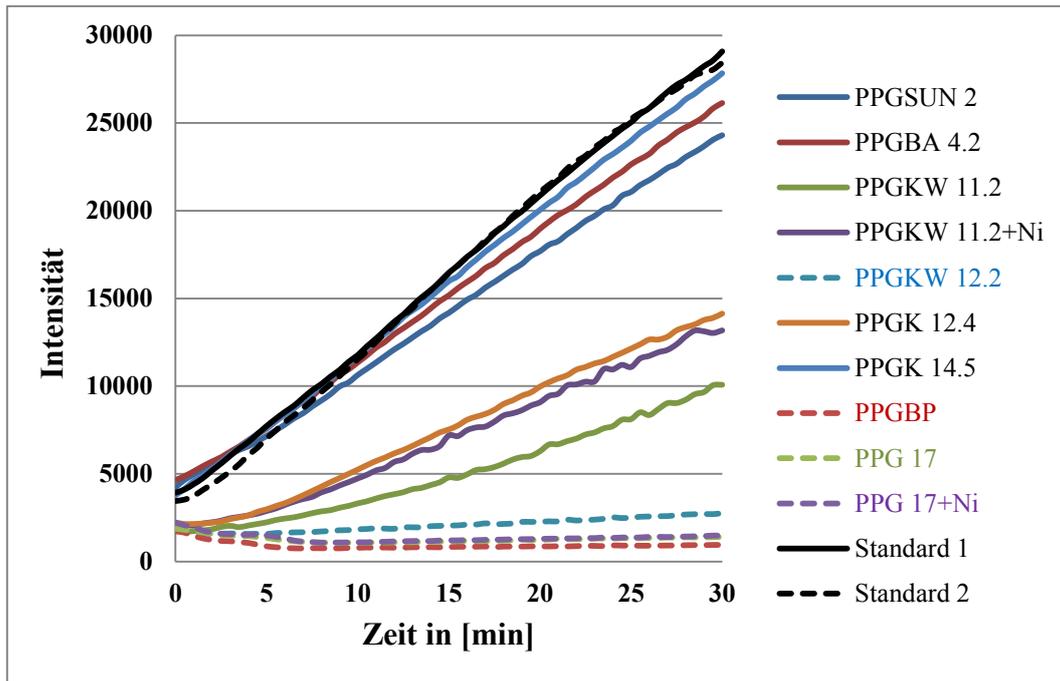
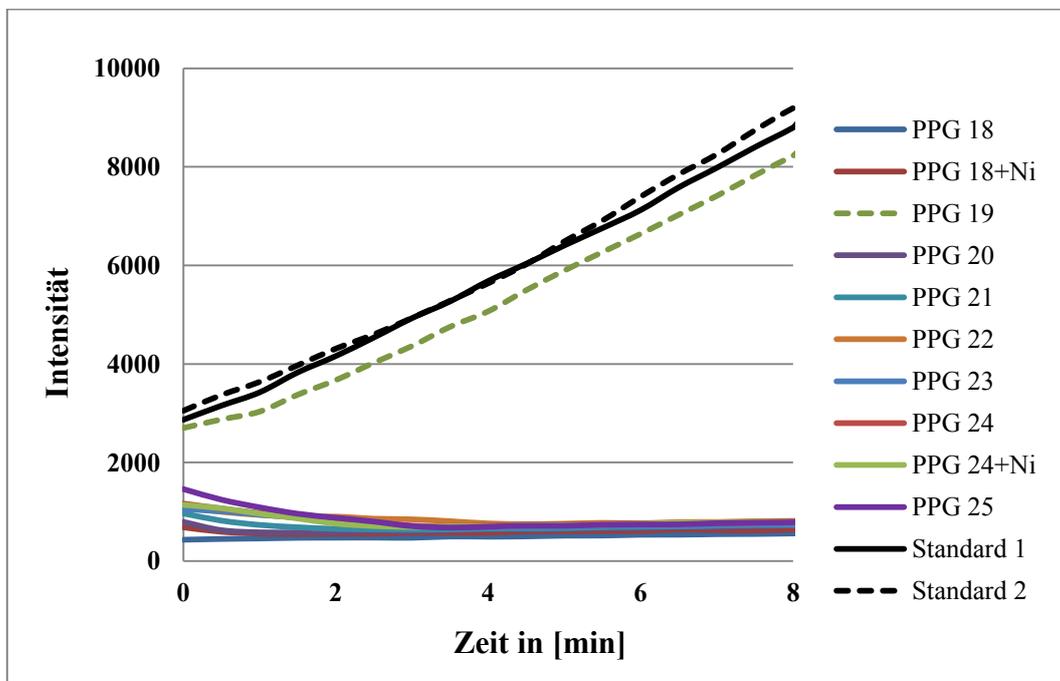


Abb. 5.5.167: Cathepsin D Inhibitionstest mit  $1.4 \cdot 10^5$  -  $7 \cdot 10^2$  nM Pepstatin A-Lösung.

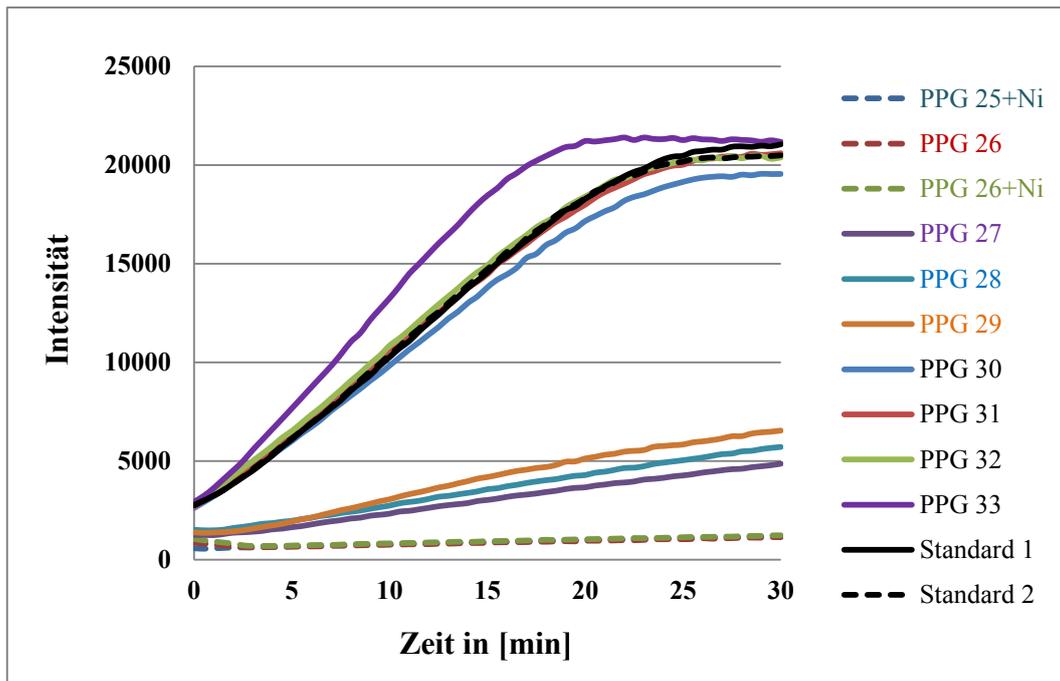
Screening der Polymere:



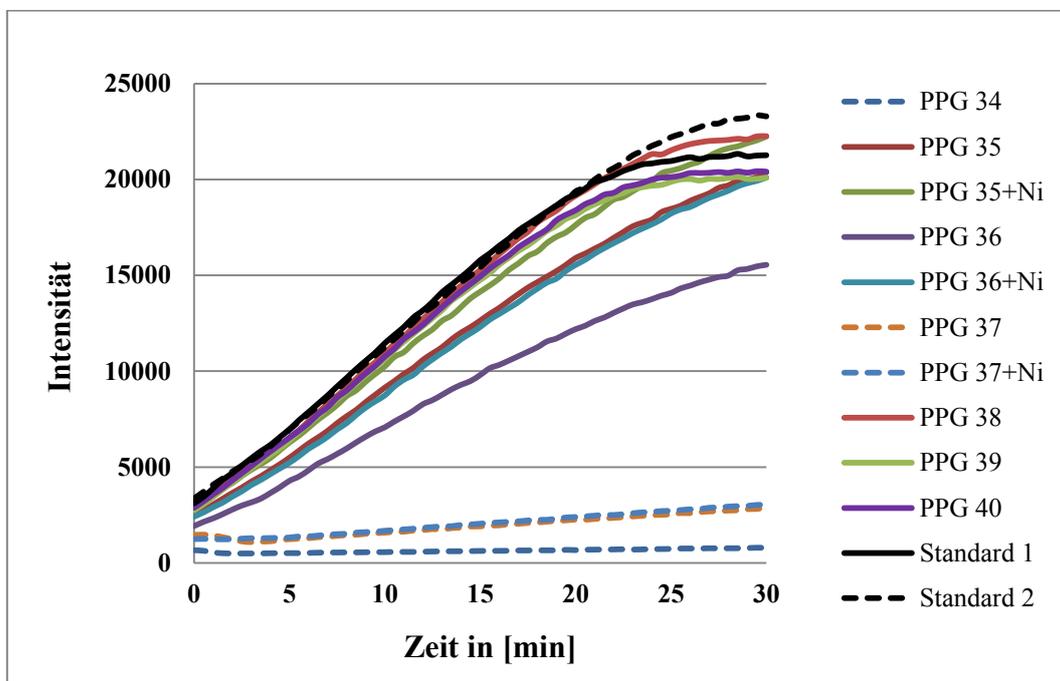
**Abb. 5.5.168:** Screening der 1. Polymerreihe. Polymere PGKW12.2, PGBP und PG17 zeigten eine starke inhibitorische Wirksamkeit gegenüber Cathepsin D. Hingegen war der hemmende Effekt bei den Polymeren PGKW11.2 und PGK12.4 deutlich geringer.



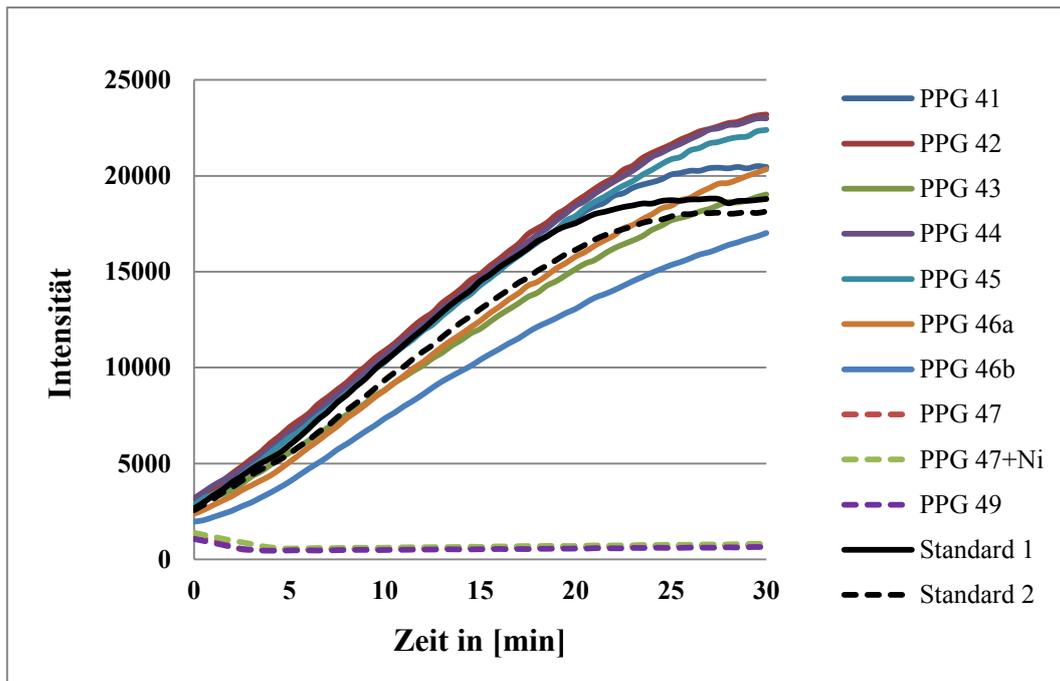
**Abb. 5.5.169:** Screening der 2. Polymerreihe. Außer Polymer PG19 zeigten alle Polymere eine starke inhibitorische Wirksamkeit gegenüber Cathepsin D.



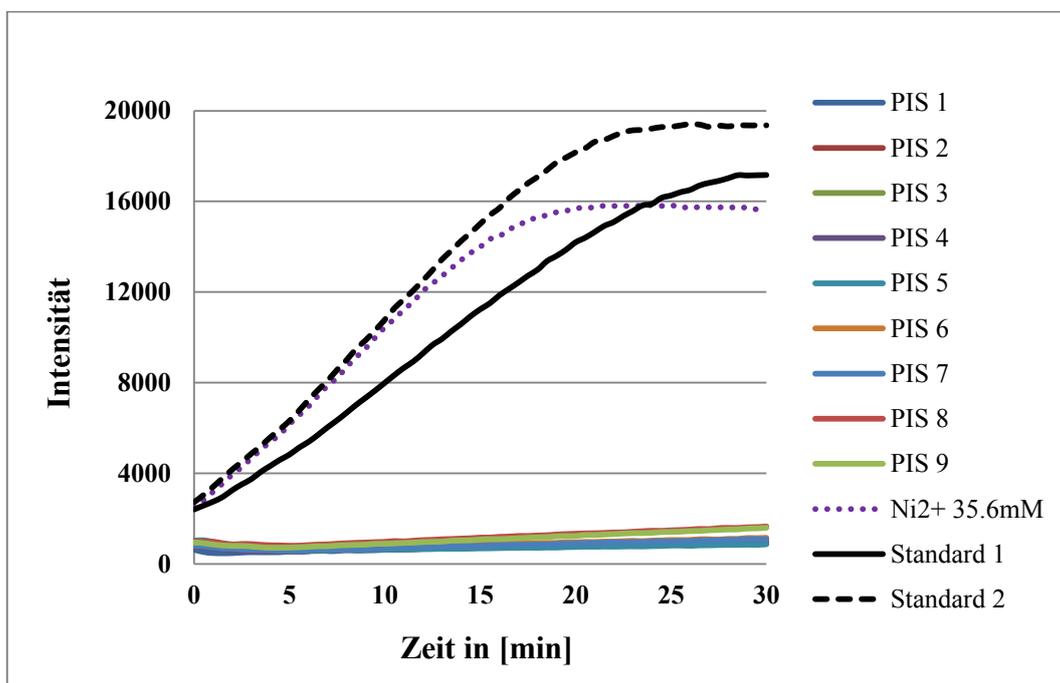
**Abb. 5.5.170:** Screening der 3. Polymerreihe. Polymere PG25 und PG26 zeigten eine starke inhibitorische Wirksamkeit gegenüber Cathepsin D. Hingegen war der hemmende Effekt bei den Polymeren PG27 - 29 geringer.



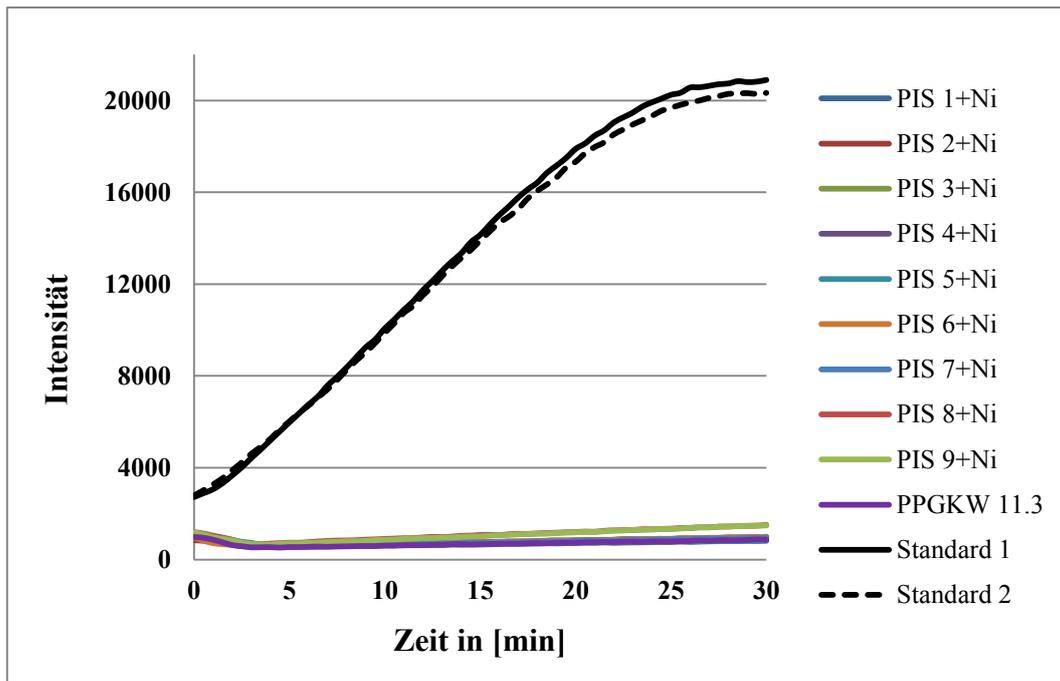
**Abb. 5.5.171:** Screening der 4. Polymerreihe. Polymere PG34 und PG37 zeigten eine starke inhibitorische Wirksamkeit gegenüber Cathepsin D.



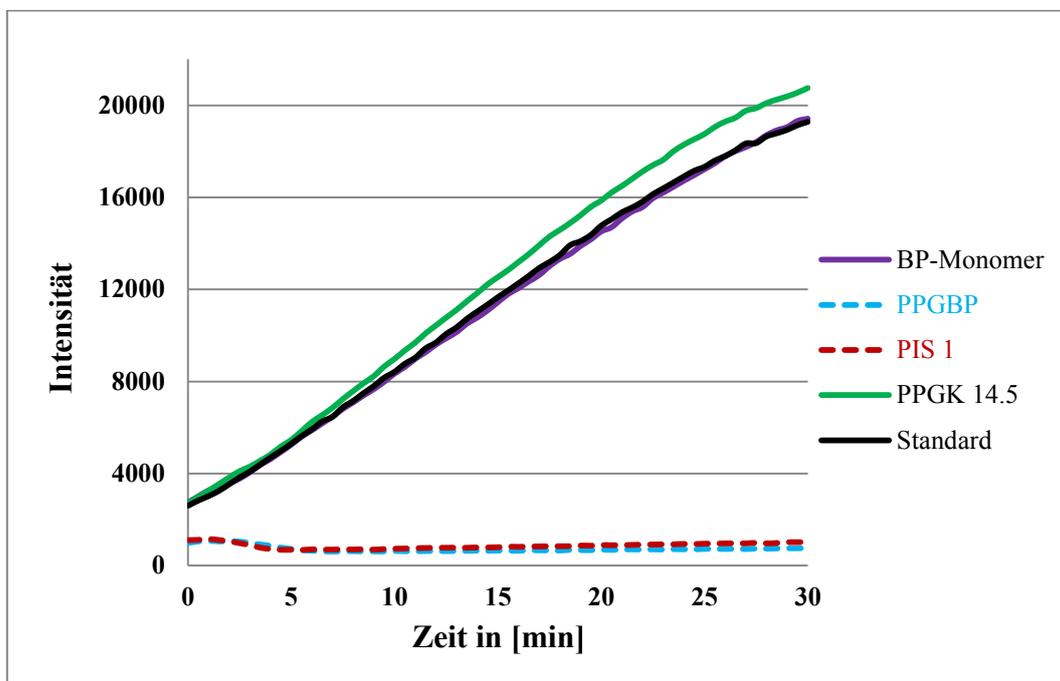
**Abb. 5.5.172:** Screening der 5. Polymerreihe. Polymere PG47 und PG49 zeigten eine starke inhibitorische Wirksamkeit gegenüber Cathepsin D.



**Abb. 5.5.173:** Screening der 6. Polymerreihe. Alle Polymere zeigten eine starke inhibitorische Wirksamkeit gegenüber Cathepsin D. Ni<sup>2+</sup>-Ionen welche als Blindprobe fungierten, zeigten keine Hemmwirkung.



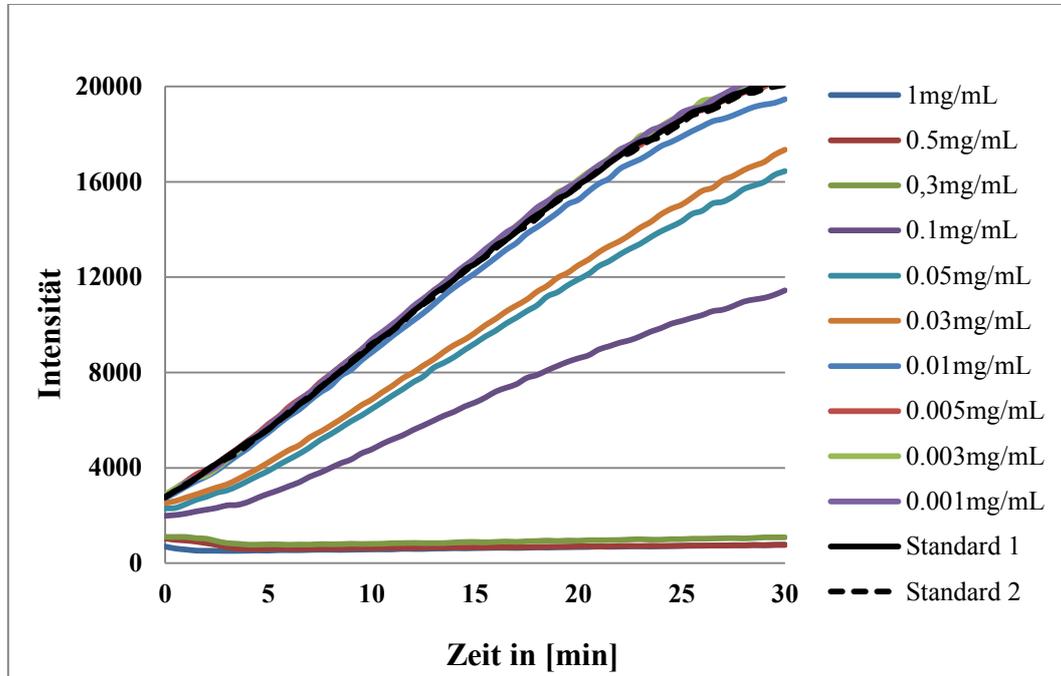
**Abb. 5.5.174:** Screening der 7. Polymerreihe. Alle Polymere zeigten mit Zusatz von Ni<sup>2+</sup>-Ionen ebenfalls eine starke inhibitorische Wirksamkeit gegenüber Cathepsin D. Desweiteren zeichnete sich das Polymer PGKW11.3 als hervorragender Cathepsin D Hemmstoff aus.



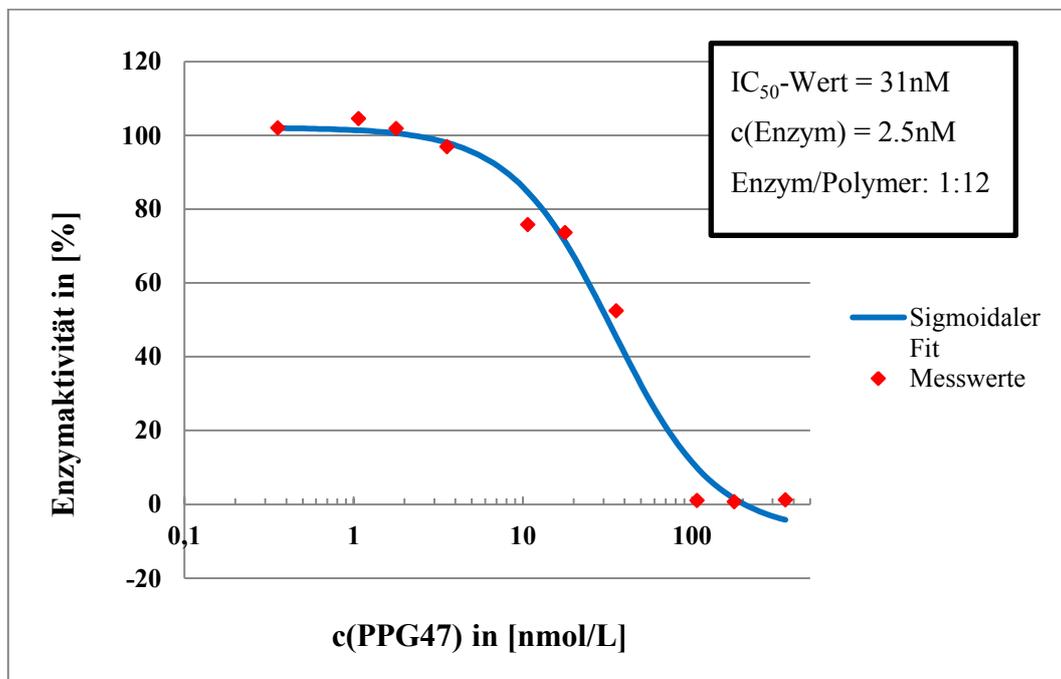
**Abb. 5.5.175:** Inhibitionsvergleich der vorhandenen Homopolymere inklusive dem BP-Monomer. Das BP-Monomer zeigte keine Hemmwirkung, hingegen zeichnete sich das analoge Homopolymer PGBP als starker Inhibitor aus. PIS1 welches ein NTA-Homopolymer darstellt, zeigte eine sehr starke Hemmwirkung gegenüber Cathepsin D. Das auf Basis des Glucose-Monomers dargestellte Homopolymer PGK14.5, zeigt keine Inhibition.

### Bestimmung der $IC_{50}$ -Werte der wirksamen Polymere:

Da die Anzahl der positiv getesteten Inhibitoren zu hoch war (alle NTA- und BP-haltigen Copolymere), wurde lediglich ein  $IC_{50}$ -Wert als Referenz bestimmt.



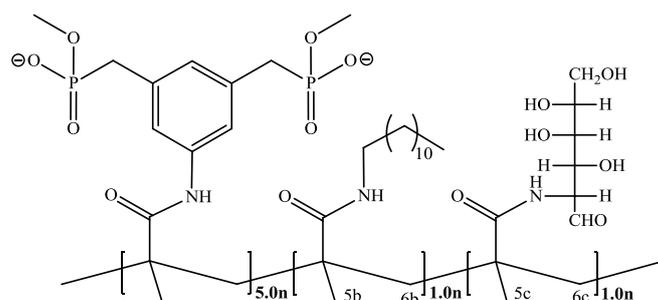
**Abb. 5.5.176:** Inhibition von Thrombin in Abhängigkeit der Polymerkonzentration von PG47. Bei der Messung wurden Polymerlösungen verwendet mit Massenkonzentrationen von 1 - 0.001 mg/mL.



**Abb. 5.5.177:** Sigmoidale Auftragung der konzentrationsabhängigen Hemmung von PPG47 zur Bestimmung des  $IC_{50}$ -wertes (31 nM bei einer 2.5 nM Enzymkonzentration).

## 5.6 Lineweaver-Burk-Auftragung

Zur Aufklärung bzw. zum besseren Verständnis des Wirkungsmechanismus der Polymere, wurde eine Lineweaver-Burk-Auftragung durchgeführt. Im speziellen wurde die Serinprotease Trypsin untersucht. Als Hemmstoff fungierte das von *Wenk* dargestellte „Polymer 3“ (Abb. 5.6.1).<sup>[122]</sup>



**Abb. 5.6.1:** Das von *K. Wenck* dargestellte Polymer 3 besteht aus 5 eq. Bisphosphonat-M, 1 eq. Dodecyl-M sowie 1 eq. Glucose-M.<sup>[122]</sup>

### Verwendete Lösungen 1:

- Trypsin-Puffer: 75 mM TRIZMA-Base, 75 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 8.0.
- Trypsin-Lösung: 2.00 mg Trypsin (9000 U / mg) wurden in 1.0 mL 1 mM HCl gelöst.
- Substrat -Lösung: Eine 150 µg/mL BAPNA • HCl (20 % DMSO und 80 % Trypsin-Puffer) Stammlösung diente zum erstellen der 140-60 µg/mL BAPNA • HCl (20 % DMSO und 80 % Trypsin-Puffer) Substrat-Lösungen.

### Durchführung:

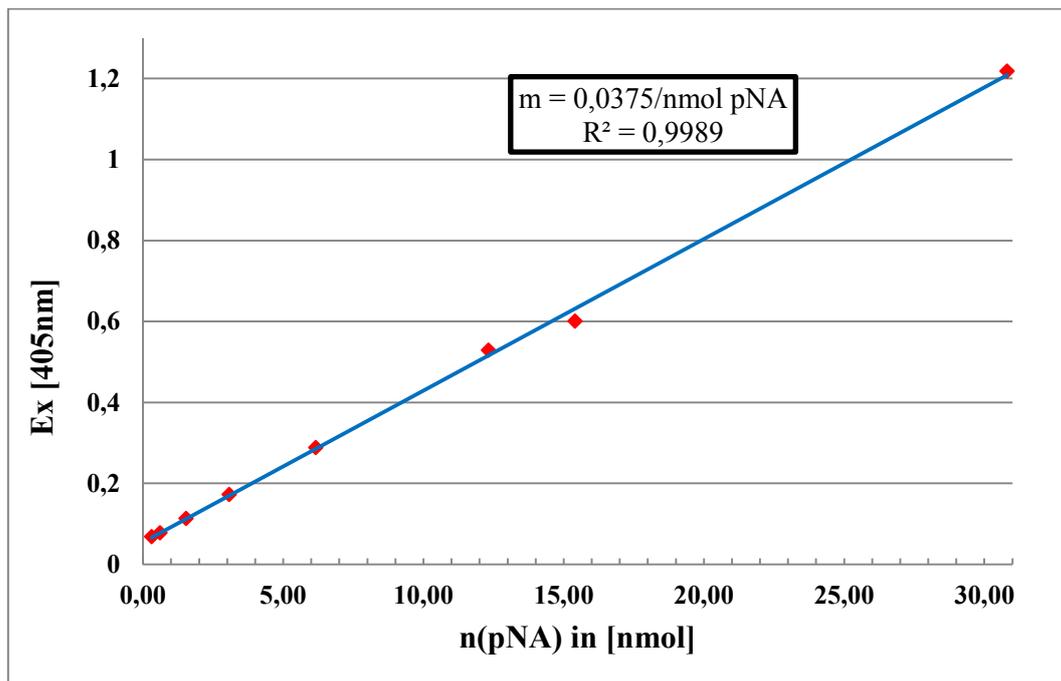
5 µL Enzym-Lösung wurden mit 5 µL Polymer-Stammlösung versetzt und für 30 min inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von 100 µL Substrat-Lösung. Das Reaktionsgemisch wurde daraufhin sofort vermessen.

Vor der Messung wurde die 96-well Mikrotiterplatte 4 s lang geschüttelt. Die Messung erfolgte bei einer Temperatur von 25 °C und bei einer Wellenlänge von 405 nm. Nach 30 s erfolgte die Aufnahme des Messwertes. Bei einer Gesamtmesszeit von 7 min. Vor jeder Messwertaufnahme wurde die Mikrotitrierplatte 4 s geschüttelt.

Durchgeführte Messungen:

Alle Messergebnisse wurden durch eine 3-fach Bestimmung ermittelt. Innerhalb einer Messreihe, wurden nur die Messwerte welche sich innerhalb des „steady-states-Zustandes“ befanden zur Auswertung genutzt.

Zur Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeit „r“ des Enzymatischen Abbaus während des „steady-states-Zustandes“, wurde das freigesetzte Chromophor (pNA) unter Assay-Bedingungen in verschiedenen Konzentrationen vermessen.



**Abb. 5.6.2:** Extinktionsanstieg in Abhängigkeit der verwendeten pNA-Menge.

Aus der Graphischen Auftragung konnte ermittelt werden, dass bei einem Extinktionsanstieg von 0.0375, 1 nmol Chromophor freigesetzt wird. Somit ist es möglich aus den folgenden Proportionalitäten (Gl. 15 und 16) die Reaktionsgeschwindigkeit zu berechnen:

$$\Delta Ex \sim dc(pNA) \sim dc(\text{Substrat}) \quad (15)$$

$$dc(\text{Subtrat})/dt = r \quad (16)$$

Die erste Messung erfolgte ohne Zusatz von Hemmstoff, hierbei wurde der Enzymatische Substratabbau in Abhängigkeit der Substratkonzentration aufgenommen.

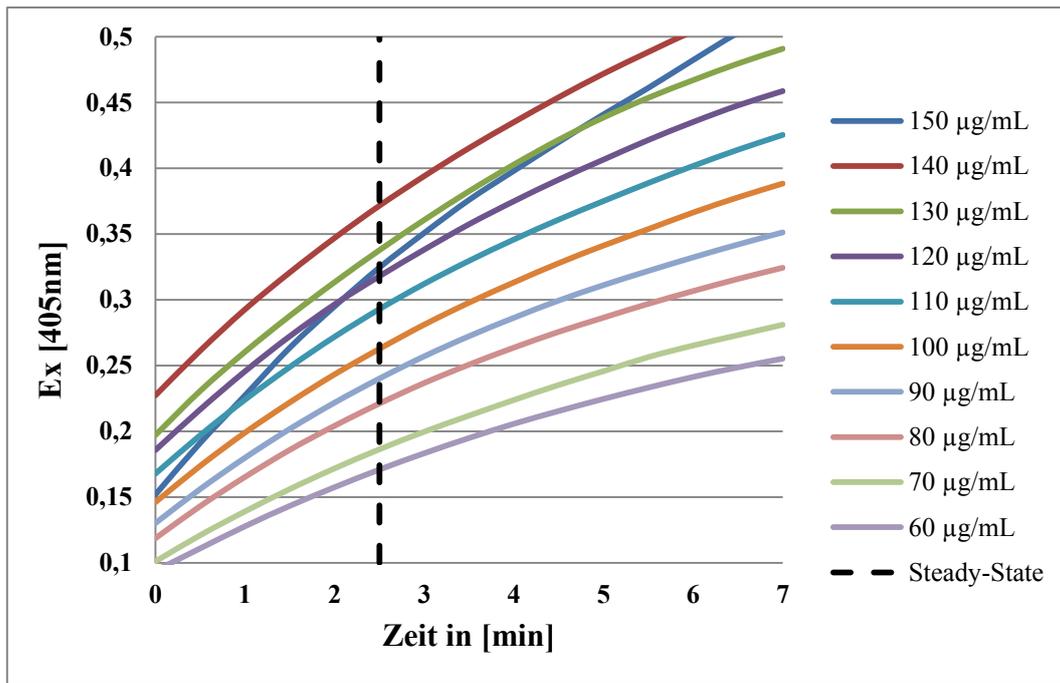


Abb. 5.6.3: Enzymatischer Substartabbau von Trypsin bei variabler Substratkonzentration.

Nachdem die Reaktionsgeschwindigkeiten bestimmt wurden, konnte durch graphische Auftragung der reziproken Reaktionsgeschwindigkeiten „ $r^{-1}$ “ gegen die reziproken Substratkonzentrationen „ $c^{-1}$ “ folgender Graph erhalten werden.

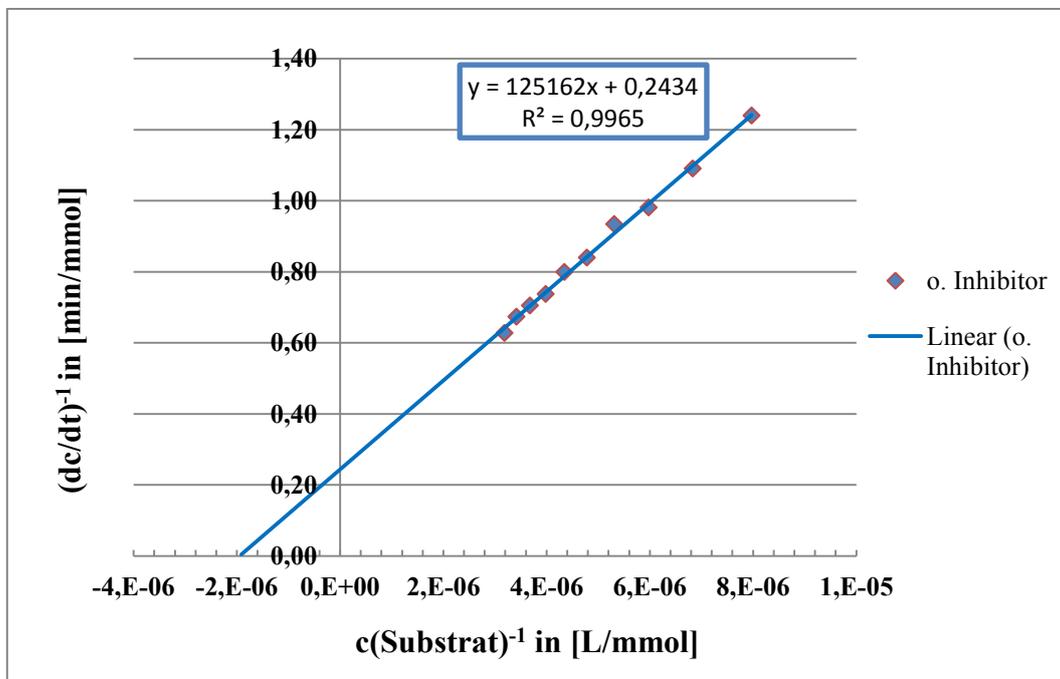


Abb. 5.6.4: Lineweaver-Burk-Darstellung ohne Zusatz des Inhibitors.

Weiterhin wurden zwei Messreihen mit einer 2.6  $\mu\text{M}$ , sowie einer 5.0  $\mu\text{M}$  Konzentrationen von Polymer 3 (4.2 g/L und 8.0 g/L Stammlösungen) durchgeführt.

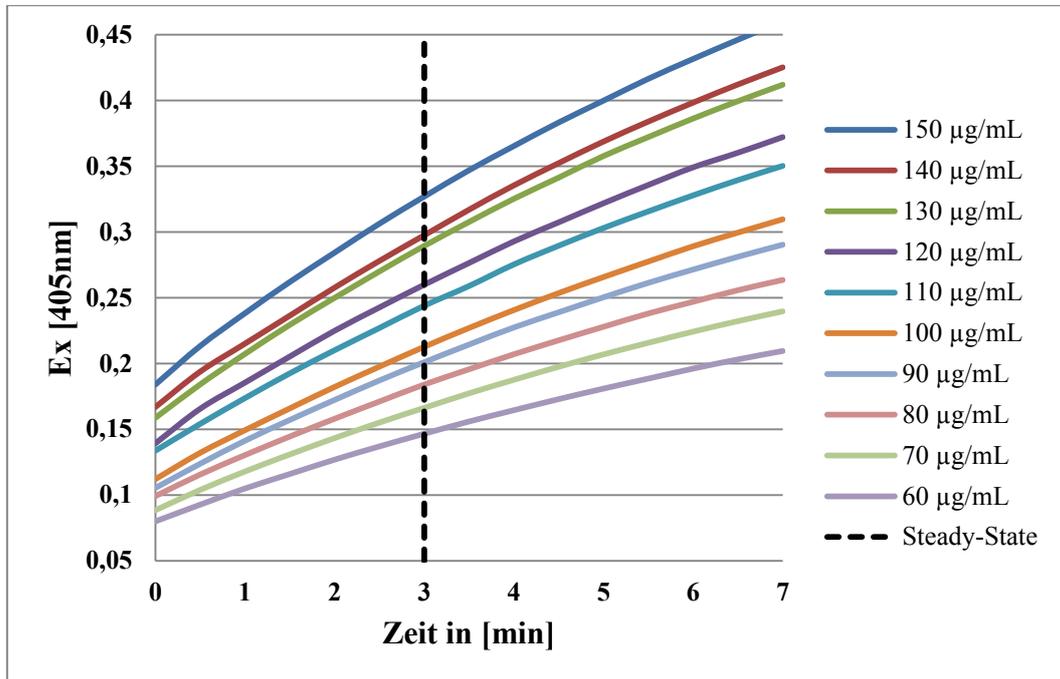


Abb. 5.6.5: Enzymatischer Substratabbau von Trypsin bei variabler Substratkonzentration und einer 2.6  $\mu\text{M}$  Polymerkonzentration.

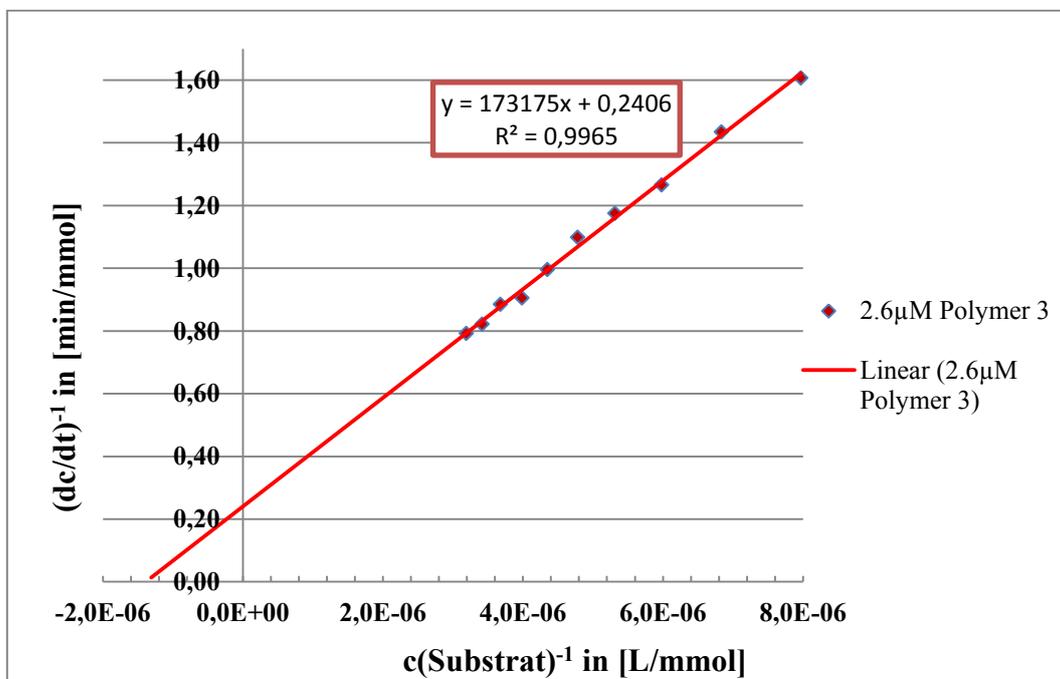


Abb. 5.6.6: Lineweaver-Burk-Darstellung bei einer 2.6  $\mu\text{M}$  Konzentration von Polymer 3.

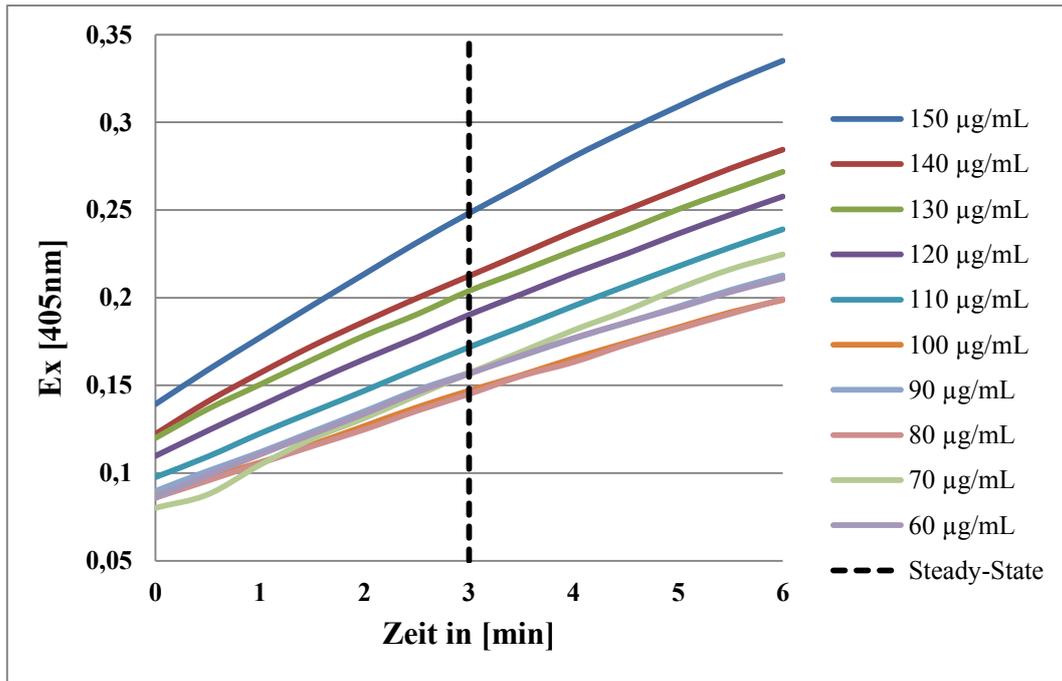


Abb. 5.6.7: Enzymatischer Substartabbau von Trypsin bei variabler Substratkonzentration und einer 5.0 µM Polymerkonzentration.

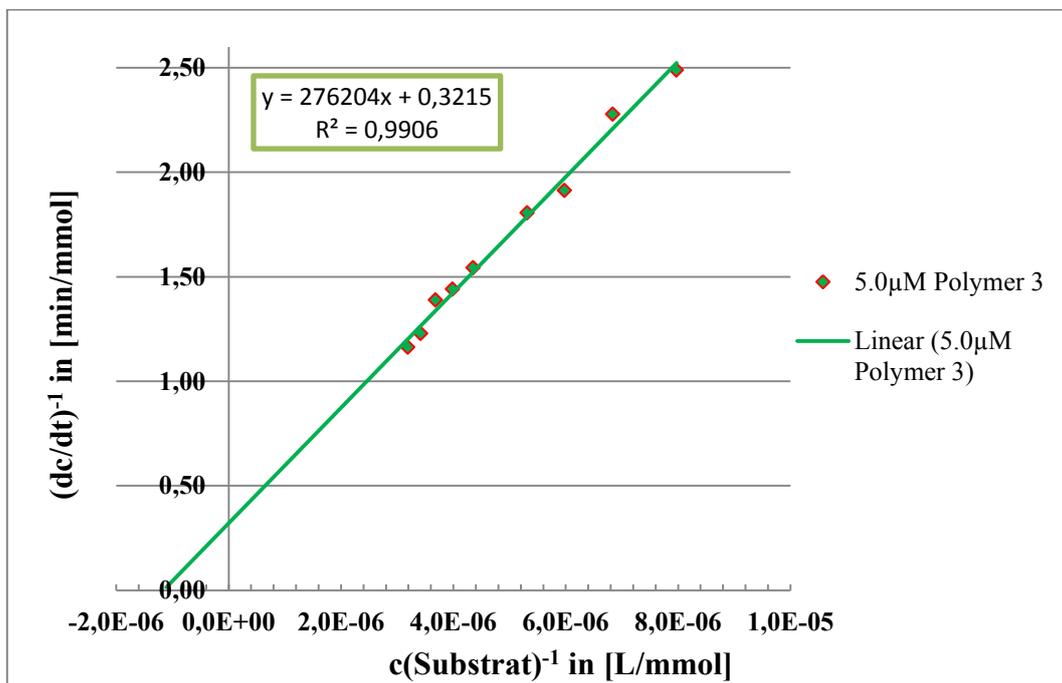


Abb. 5.6.8: Lineweaver-Burk-Darstellung bei einer 5.0 µM Konzentration von Polymer 3.

Durch das Überführen der drei Lineweaver-Burk-Diagramme in eine gemeinsame Auftragung (Abb. 5.6.9), ist ersichtlich, dass sich alle Graphen an der y-Achse schneiden. Daher handelt es sich bei der Inhibition von Trypsin durch Polymer 3 um eine kompetitive Hemmung, was bedeutet, dass das Polymer mit dem Substrat um die Bindungsstelle am aktiven Zentrum des Enzyms konkurriert.

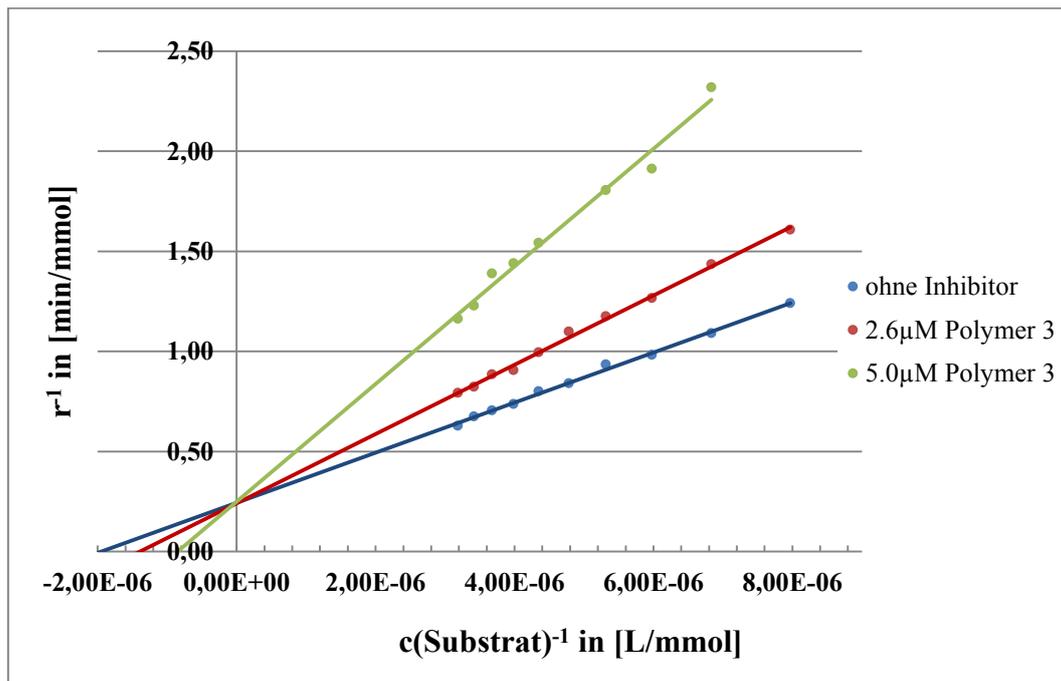


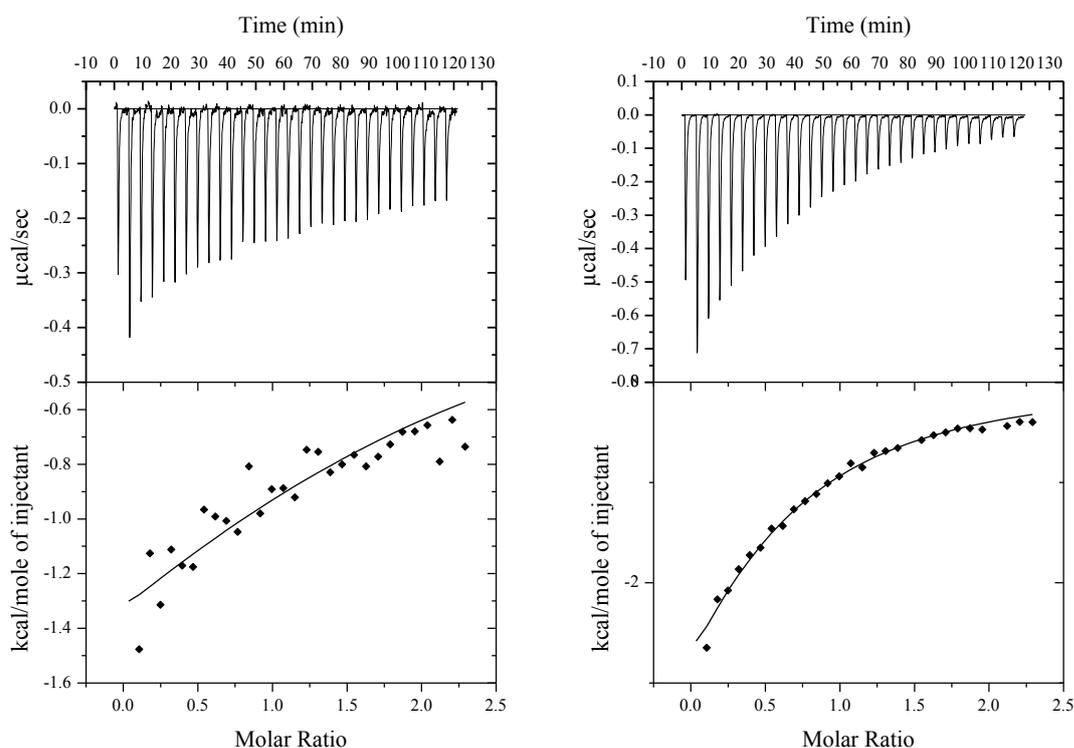
Abb. 5.6.9: Lineweaver-Burk-Darstellung bei unterschiedlichen Konzentrationen von Polymer 3.

## 5.7 Isotherme Mikrokolorimetrie (ITC)

Die durchgeführten ITC Untersuchungen erfolgten an Trypsin.

ITC-Titration des NTA-Monomers **11** (1 mM) bzw. des NTA-Homopolymer „PIS1“ (1 mM bezogen auf einen Monomer-Baustein) gegen Trypsin (0.1 mM) in 75 mM TRIZMA-Base und 75 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH = 8.0).

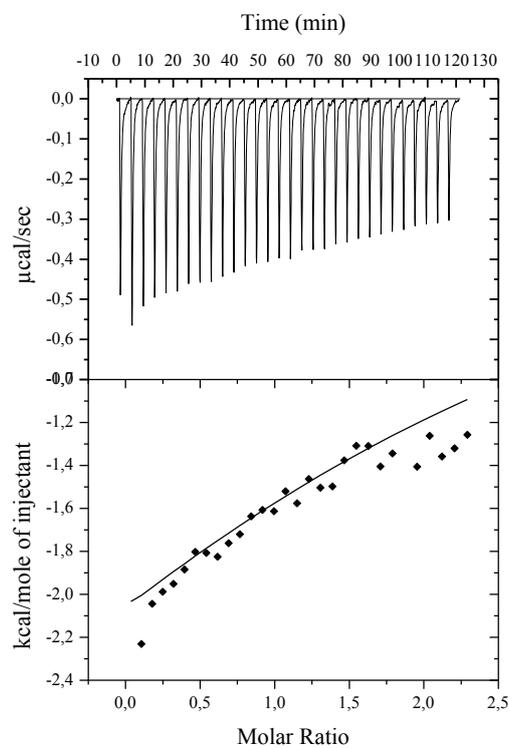
	$K_a$ [M <sup>-1</sup> ]	n	$\Delta H$ [kcal/mol]	T $\Delta S$ [kcal/mol]	$\Delta G$ [kcal/mol]
NTA-M.	4310 ± 5400	2.19 ± 0.63	-2.69 ± 2.14	-2.26	-0.43
PIS1	11600 ± 2000	0.485 ± 0.10	-7.28 ± 1.84	-1.74	-5.54



**Abb. 5.7.2:** Aus der Auswertung ist ersichtlich, dass bei den ITC-Messungen minimale Effekte zwischen den NTA-Monomer (links) und Trypsin bestehen. Dies kann daran liegen das, dass Monomer zum Teil polymerisiert ist. Wesentlich stärkere Effekte treten bei der Titration des NTA-Homopolymers (rechts) gegen Trypsin auf.

ITC-Titration des NTA-Homopolymers „PIS1“ (1 mM bezogen auf einen Monomer-Baustein) inklusive 50%  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen (0.5 mM) gegen Trypsin (0.1 mM) in 75 mM TRIZMA-Base und 75 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH = 8.0).

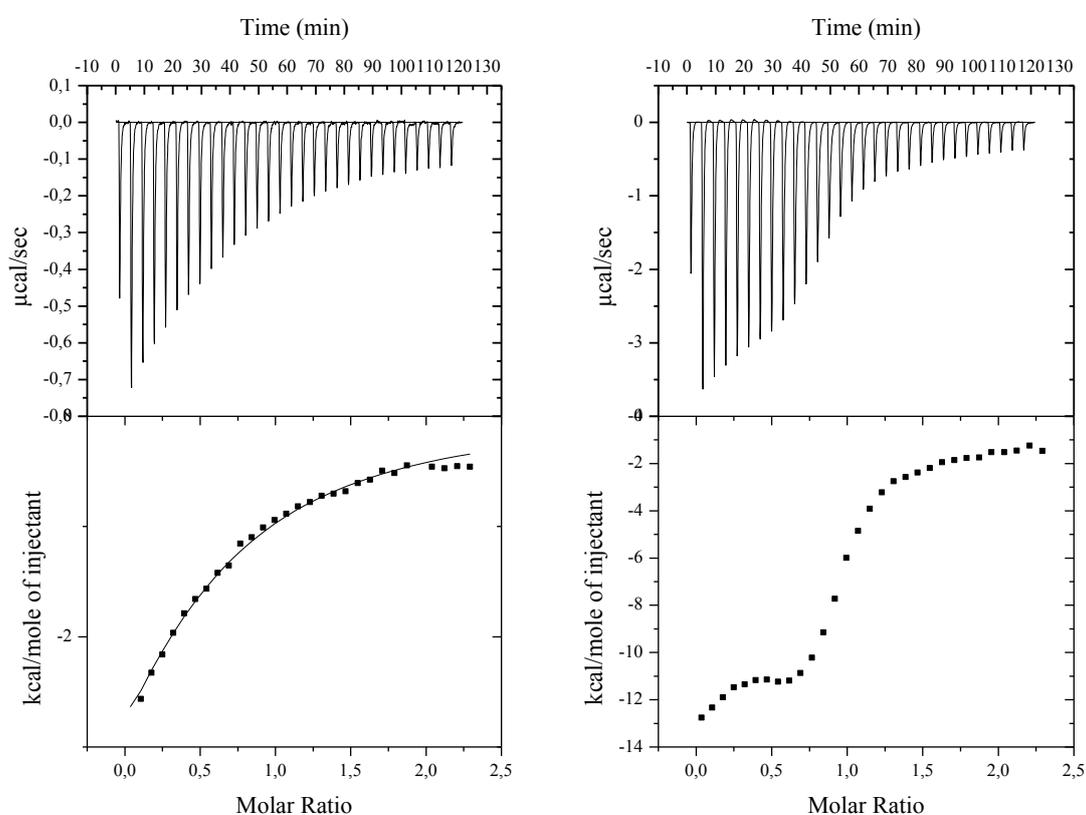
	$K_a$ [ $\text{M}^{-1}$ ]	n	$\Delta H$ [kcal/mol]	T $\Delta S$ [kcal/mol]	$\Delta G$ [kcal/mol]
PIS1+ $\text{Ni}^{2+}$	$2640 \pm 4400$	$3.27 \pm 0.51$	$-4.407 \pm 4.140$	-0.261	-4.146



**Abb. 5.7.3:** Aus der Auswertung ist ersichtlich, dass bei den ITC-Messungen ein geringerer Effekt zwischen den NTA-Homopolymers (inklusive  $\text{Ni}^{2+}$ ) gegenüber Trypsin vorliegt, als ohne  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen.

ITC-Titration des NTA- Homopolymer „PIS1“ (1 mM) (1 mM bezogen auf einen Monomer-Baustein) gegen Trypsin (0.1 mM) in 75 mM TRIZMA-Base und 75 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH = 8.0). Anschließende Verdrängungstitration des überschüssigen Protein-Polymer-Komplexes mit  $\text{NiSO}_4$ -Lösung (1 mM).

	$K_a$ [ $\text{M}^{-1}$ ]	n	$\Delta H$ [kcal/mol]	T $\Delta S$ [kcal/mol]	$\Delta G$ [kcal/mol]
PIS1	$11400 \pm 1400$	$0.50 \pm 0.08$	$-7.309 \pm 1.580$	-1.773	-5.535



**Abb. 5.7.4:** Komplexierung von Trypsin durch das NTA-Homopolymer IS1 als Titrant (links). Verdrängungstitration des übertitrierten Polymer-Trypsin-Komplexes.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Ala	(A)	Alanin
Arg	(R)	Arginin
Asn	(N)	Asparagin
Asp	(D)	Asparaginsäure
Cys	(C)	Cystein
Gln	(Q)	Glutamin
Glu	(E)	Glutaminsäure
Gly	(G)	Glycin
His	(H)	Histidin
Ile	(I)	Isoleucin
Leu	(L)	Leucin
Lys	(K)	Lysin
Met	(M)	Methionin
Phe	(F)	Phenylalanin
Pro	(P)	Prolin
Ser	(S)	Serin
Tre	(T)	Threonin
Trp	(W)	Tryptophan
Tyr	(Y)	Tyrosin
Val	(V)	Valin
PIS		Polymer Inga Stratmann
PPG		Polymer Patrick Gilles
PPGKW		Polymer Patrick Gilles/Kirstin Wenck
PPGSUN		Polymer Patrick Gilles/Sun Wei

abs.	absolut
AIBN	Azoisobutyronitril
AMC	7-Amino-4-methylcumarin
BA	Benzamidin
BAPNA	Benzoylarginin- <i>p</i> -nitroanilid
bidest.	zweifach destilliertes
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BP	Bisphosphonat
Bz	Benzoyl
CBS	Carboxylatbindungsstelle
Cbz	Carbonylbenzyloxy-Zerwas
CH	Cyclohexan
Cl-HOBt	6-Chloro-1-hydroxibenzotriazol
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DIFP	Diisopropylfluorophosphat
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EE	Essigsäureethylester
eq.	Äquivalente
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	und andere
HCTU	5-Chloro-1-[bis(dimethylamino)methylen]-1 <i>H</i> -benzotriazolium-3-oxid
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>

---

kDa	Kilodalton
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
M <sub>n</sub>	Zahlenmittel des Molekulargewichts
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
M <sub>w</sub>	Gewichtsmittel des Molekulargewichts
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NTA	Nitrilotriacetat
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
PDI	Polydispersitätsindex
pI	isoelektrischer Punkt
pNA	4-Nitroanilin
ppm	<i>parts per million</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
Suc	Succinimid
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
tr.	trockenem
TRIS/TRIZMA	<i>Tris</i> (hydroxymethyl)-aminomethan
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] H.-K. Biesalski, P. Grimm, *Taschenatlas der Ernährung*, 5. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, **2011**.
- [2] W. Lenkeit, *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, **1933**, 35, 573 - 631.
- [3] G. Löffler, *Basiswissen Biochemie: mit Pathobiochemie*, 6. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, **2005**.
- [4] A. C. Guyton, J. E. Hall, *Textbook of Medical Physiology*, 11. Auflage, Elsevier Saunders, Philadelphia, **2005**.
- [5] F. Horn, G. Lindenmeier, I. Moc, C. Grillhösl, S. Berghold, N. Schneider, B. Münster, *Biochemie des Menschen*, 3. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart, **2005**.
- [6] R. F. Schmidt, F. Lang, M. Heckmann, *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*, 31. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg, **2010**.
- [7] J. Schwegler, *Der Mensch - Anatomie und Physiologie*, 4. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, **2006**.
- [8] R. Klinke, H.-C. Pape, S. Silbernagl, *Physiologie*, 5. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**.
- [9] M. Sarner, P. B. Cotton, *Gut*, **1984**, 25, 756 - 759.
- [10] M. V. Singer, K. Gyr, H. Sarles, *Gastroenterology*, **1985**, 85, 683 - 685.
- [11] H. Sarles, G. Adler, R. Dani, C. Frey, L. Gullo, H. Harada, E. Martin, M. Norohna, L. A. Scuro, *Digestion*, **1989**, 43, 234 - 236.
- [12] M.W. Büchler, W. Uhl, P. Malfertheiner, *Pankreaserkrankungen*, 1. Auflage, Karger-Verlag, Basel, **1996**.
- [13] J. Treacy, A. Williams, R. Bais, K. Willson, C. Worthley, J. Reece, J. Bessell, D. Thomas, *ANZ J Surg*, **2001**, 71, 577 - 582.
- [14] D. Yadav, N. Agarwal, C. S. Pitchumoni, *Am. J. Gastroenterol.*, **2002**, 97, 1309 - 1318.
- [15] A. C. de Beaux, K. R. Palmer, D. C. Carter, *Gut*, **1995**, 37, 121 - 126.
- [16] M. L. Jacobs, W. M. Daggett, J. M. Civette, M. A. Vasu, D. W. Lawson, A. L. Warshaw, G. L. Nardi, M. K. Bartlett, *Ann Surg*, **1977**, 185, 43 - 51.
- [17] P. G. Lankisch, S. Burchard-Reckert, M. Petersen, D. Lehnick, C. A. Schirren, H. Kohler, F. Stockmann, H. J. Peiper, W. Creutzfeldt, *Z Gastroenterol*, **1996**, 34, 371 - 377.
- [18] M. Runzi, P. Layer, M.W. Büchler, H. G. Beger, C. Ell, U. R. Folsch, H. Goebell, U. T. Hopt, P. G. Lankisch, W. E. Schmidt, W. Schmiegel, J. Scholmerich, *Z Gastroenterol*, **2000**, 38, 571 - 581.

- [19] J. Ockenga, *Med Klin Intensivmed Notfmed*, **2013**, *108*, 401 - 407.
- [20] M. S. Petrov, S. Shanbhag, M. Chakraborty, A. R. J. Phillips, J. A. Windsor, *Gastroenterology*, **2010**, *139*, 813 - 820.
- [21] J. -L. Frossard, M. L. Steer, C. M. Pastor, *Lancet*, **2008**, *371*, 143 - 152.
- [22] P. Layer, J. Keller, M. Kahl, U. Rosien, *DoctorConsult - The Journal. Wissen für Klinik und Praxis*, **2011**, *2*, 57 - 61.
- [23] T. M. Gress, F. Mueller-Pillasch, M. M. Lerch, H. Friess, M. Buechler, H. G. Beger, G. Adler, *Z Gastroenterol*, **1994**, *32*, 221 - 225.
- [24] A. Hoffmeister, J. Mayerle, K. Dathe, J. Mossner, M. M. Lerch, *Z Gastroenterol*, **2012**, *50*, 1125 - 1136.
- [25] R. Meier, C. Beglinger, P. Layer, L. Gullo, V. Keim, R. Laugier, H. Friess, M. Schweitzer, J. Macfie, P. E. Ballmer, C. Bassi, G. A. Miquel, L. Harsanyi, M. Hiesmayr, C. W. Imrie, J. P. Neoptolemos, M. E. Plauth, *Clinical Nutrition*, **2002**, *21*, 173 - 183.
- [26] F. Yi, L. Ge, J. Zhao, Y. Lei, F. Zhou, Z. Chen, Y. Zhu, B. Xia, *Intern Med*, **2012**, *51*, 523 - 530.
- [27] J. R. Siewert, V. Schumpelick, M. Rothmund, *Praxis der Viszeralchirurgie: Gastroenterologische Chirurgie*, 3. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, **2011**.
- [28] J. F. Zhu, X. H. Fan, X. H. Zhang, *Surg Endosc*, **2001**, *12*, 146 - 148.
- [29] J. Toouli, M. Brooke-Smith, C. Bassi, D. Carr-Locke, J. Telford, P. Freeny, C. Imrie, R. Tandon, *JGH*, **2002**, *17*, 15 - 39.
- [30] N. Teich, J. Mössner, *Der Gastroenterologe*, **2007**, *2*, 271 - 284.
- [31] J. Barnert, H. Messmann, *Intensivmed Notfallmed*, **2009**, *46*, 200 - 210.
- [32] W. Uhl, M. W. Buchler, P. Malfertheiner, H. G. Beger, G. Adler, W. Gaus, *Gut*, **1999**, *45*, 97 - 104.
- [33] H. Goebell, R. Ammann, C. Herfarth, J. Horn, J. Hotz, M. Knoblauch, M. Schmid, M. Jaeger, A. Akovbiantz, E. Linder, K. Abt, E. Nuesch, E. Barth, *Scand J Gastroenterol*, **1979**, *14*, 881 - 889.
- [34] M. R. C., *Lancet*, **1977**, *2*, 632 - 635.
- [35] A. Andriulli, G. Leandro, R. Clemente, V. Festa, N. Caruso, V. Annese, G. Lezzi, E. Lichino, F. Bruno, F. Perri, *Aliment Pharmacol Ther*, **1998**, *12*, 237 - 245.
- [36] M. Buchler, P. Malfertheiner, W. Uhl, J. Scholmerich, F. Stockmann, G. Adler, W. Gaus, K. Rolle, H. G. Beger, *Gastroenterology*, **1993**, *104*, 1165 - 1170.
- [37] G. Weckbecker, I. Lewis, R. Albert, H. A. Schmid, D. Hoyer, C. Bruns, *Nat Rev Drug Discov.*, **2003**, *2*, 999 - 1017.
- [38] <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/life-science/enzymes-enzyme-explorer/aprotinin.gif> Stand: 25.09.2013.

- [39] A. Laupacis, D. Fergusson, *Anesth Analg*, **2007**, *85*, 1258 - 1267.
- [40] P. A. Carless, A. J. Moxey, B. J. Stokes, D. A. Henry, *BMC Cardiovasc Disord*, **2005**, *5*, 1 - 19.
- [41] R. G. H. Speekenbrink, A. B. A. Vonk, C. R. H. Wildevuur, L. Eijnsman, *Ann Thorac Surg*, **1995**, *59*, 438 - 442.
- [42] V. Casati, D. Guzzon, M. Oppizzi, F. Bellotti, A. Franco, C. Gerli, M. Cossolini, G. Torri, G. Calori, S. Benussi, O. Alfieri, *J Thorac Cardiovasc Surg*, **2000**, *120*, 520 - 527.
- [43] K. Hekmat, T. Zimmermann, S. Kampe, S. M. Kasper, H. J. Weber, H. J. Geissler, U. Mehlhorn, *Curr Med Res Opin*, **2004**, *20*, 121 - 126.
- [44] S. C. Pugh, A. K. Wielogorski, *J Cardiothorac Vasc Anesth*, **1995**, *9*, 240 - 244.
- [45] B. I. Wong, R. F. McLean, S. E. Fremes, K. A. Deemar, E. M. Harrington, G. T. Christakis, B. S. Goldman, *Ann Thorac Surg*, **2000**, *69*, 808 - 816.
- [46] K. Karkouti, W. S. Beattie, K. M. Dattilo, S. A. McCluskey, M. Ghannam, A. Hamdy, D. N. Wijeyesundera, L. Fedorko, T. M. Yau, *Transfusion*, **2006**, *46*, 327 - 338.
- [47] F. Bernet, T. Carrel, G. Marbet, K. Skarvan, P. Stulz, *J Card Surg*, **1999**, *14*, 92 - 97.
- [48] C. Jámbor, K. Görlinger, *Anästhesiologie Intensivmedizin*, **2007**, *48*, 167 - 173.
- [49] D. A. Henry, P. A. Carless, A. J. Moxey, D. O'Connell, B. J. Stokes, D. A. Fergusson, K. Ker, *Cochrane Database Syst Rev*, **2011**, (3), CD001886.
- [50] S. Alban, *Eur J Clin Invest*, **2005**, *35*, 12 - 20.
- [51] S. Alban, *Hämostaseologie*, **2008**, *28*, 400 - 420.
- [52] H. Nüllen, U. Kamphausen, T. Noppeney, *Gefäßchirurgie*, **2009**, *14*, 396 - 400.
- [53] I. D. Kuntz, *Science*, **1992**, *257*, 1078 - 1082.
- [54] H. Kubinyi, *Pharm Acta Helv*, **1995**, *69*, 259 - 269.
- [55] H.-J. Böhm, G. Klebe, *Angew. Chem.*, **1996**, *108*, 2750 - 2778.
- [56] H. Gohlke, G. Klebe, *Angew. Chem.*, **2002**, *114*, 2764 - 2798.
- [57] R. Breinbauer, I. R. Vetter, H. Waldmann, *Angew. Chem.*, **2002**, *114*, 3002 - 3015.
- [58] G. Klebe, *Drug Discov Today*, **2006**, *11*, 580 - 594.
- [59] J. M. Lehn, *Angew. Chem.*, **1988**, *100*, 91 - 116.
- [60] J. M. Lehn, *Angew. Chem.*, **1990**, *102*, 1347 - 1362.
- [61] M. Mammen, S. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.*, **1998**, *110*, 2908 - 2953.
- [62] C. Schmuck, *Chem uns Zeit*, **2001**, *35*, 356 - 366.
- [63] J. L. Atwood, J. W. Steed, *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, 1. Auflage, Marcel Dekker Inc., London, **2004**.

- [64] D. H. Williams, E. Stephens, D. P. O'Brien, M. Zhou, *Angew. Chem.*, **2004**, *116*, 6760 - 6782.
- [65] U. Obst, V. Gramlich, F. Diederich, L. Weber, D. W. Banner, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, *34*, 1739 - 1742.
- [66] U. Obstl, D. W. Banner, L. Weber, F. Diederich, *Chem. Biol.*, **1997**, *4*, 287 - 295.
- [67] F. Hof, F. Diederich, *Chem. Commun.*, **2004**, *40*, 477 - 480.
- [68] E. Schweizer, A. Hoffmann-Röder, J. A. Olsen, P. Seiler, U. Obst-Sander, B. Wagner, M. Kansy, D. W. Banner, F. Diederich, *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, *4*, 2364 - 2375.
- [69] E. Meggers, *Angew. Chem.*, **2011**, *123*, 2490 - 2497.
- [70] H. Umezawa, T. Aoyagi, H. Morishima, S. Kunimoto, M. Matsuzaki, M. Hamada, T. Takeuchi, *J. Antibiot.*, **1970**, *23*, 425 - 427.
- [71] G. Feinstein, C. J. Malemud, *Biochim Biophys Acta*, **1976**, *3*, 925 - 932.
- [72] P. Libby, A. L. Goldberg, *Biochem. J.*, **1980**, *188*, 213 - 220.
- [73] T. Murakami, T. Hattori, K. Takatsuki, *Biochim Biophys Acta*, **1991**, *1079*, 279 - 284.
- [74] H. Ohno, T. Saheki, J. Awaya, A. Nakagawa, S. Niur, *J. Antibiot.*, **1978**, *31*, 1116 - 1123.
- [75] R. W. Spencer, L. J. Copp, J. R. Pfister, *J. Med. Chem.*, **1985**, *28*, 1828 - 1832.
- [76] L. Cook, B. Ternai, P. Ghosh, *J. Med. Chem.*, **1987**, *30*, 1017 - 1023.
- [77] H. -U. Demuth, A. Schierhorn, P. Bryan, R. Höfke, H. Kirschke, D. Brömme, *BBA*, **1996**, *1295*, 179 - 186.
- [78] M. H. McAdoo, A. M. Dannenberg Jr., C. J. Hayes, S. P. James, J. H. Sanner, *Infect Immun*, **1973**, *7*, 655 - 665.
- [79] H. Umezawa, L. Laszlo, *Methods Enzymol*, **1976**, *45*, 678 - 695.
- [80] I. Katoh, Katoh, Iyoko, T. Yasunaga, Y. Ikawa, Y. Yoshinaka, *Nature*, **1987**, *329*, 654 - 656.
- [81] J. -P. Felber, T. L. Coombs, B. L. Vallee, *Biochemistry*, **1962**, *1*, 231 - 238.
- [82] S. M. Goldstein, C. E. Kaempfer, J. T. Kealey, B. U. Wintroub, *J. Clin. Invest.*, **1989**, *83*, 1630 - 1636.
- [83] L. D. Byers, R. Wolfenden, *J Biol Chem*, **1972**, *247*, 606 - 608.
- [84] A. C. Hausrath, B. W. Matthews, *J Biol Chem*, **1994**, *269*, 18839 - 18842.
- [85] U. Matern, L. Oberer, R. A. Falchetto, M. Erhard, W. A. König, M. Herdman, J. Weckesser, *Phytochemistry*, **2001**, *58*, 1087 - 1095.
- [86] U. Matern, C. Schleberger, S. Jelakovic, J. Weckesser, G. E. Schulz, *Chem Biol*, **2003**, *10*, 997 - 1001.

- [87] J. -P. Bidouard, N. Duval, Z. Kapui, J. -M. Herbert, S. E. O'Connor, P. Janiak, *Eur. J. Pharmacol.*, **2003**, *461*, 49 - 52.
- [88] M. Varga, Z. Kapui, S. Bátori, L. T. Nagy, L. Vasvári-Debreczy, E. Mikus, K. Urbán-Szabó, P. Arányi, *Eur. J. Med. Chem.*, **2003**, *38*, 421 - 425.
- [89] Z. Kapui, M. Varga, K. Urbán-Szabó, E. Mikus, T. Szabó, J. Szeredi, S. Bátori, O. Finance, P. Arányi, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2003**, *305*, 451 - 459.
- [90] P. C. Amrein, T. P. Stossel, *Blood*, **1980**, *56*, 442 - 447.
- [91] J. L. Tsang, J. C. Parodo, J. C. Marshall, *J Inflamm*, **2010**, *7*, 1 - 9.
- [92] H. Fritz, G. Wunderer, *Arzneim.-Forsch.*, **1983**, *33*, 479 - 494.
- [93] G. Hewlett, *Biotechnology*, **1990**, *8*, 565 - 568.
- [94] R. S. K. Nagampalli, N. S. A. Krushna, R. B. Narayanan, S. S. Rajan, K. Gunasekaran, *J Enzyme Inhib Med Chem*, **2013**, *28*, 1054 - 1060.
- [95] R. S. K. Nagampalli, K. Gunasekaran, R. B. Narayanan, A. Peters, R. Bhaskaran, *PLoS Negl Trop Dis*, **2014**, *8*, 1 - 13.
- [96] F. Markwardt, H. Landmann, *Eur. J. Biochem.*, **1968**, *6*, 502 - 506.
- [97] C. M. Kam, M. A. Hernandez, G. S. Patil, T. Ueda, W. H. Simmons, V. J. Braganza, J. C. Powers, *Arch Biochem Biophys.*, **1995**, *316*, 808 - 814.
- [98] N. C. Berry, C. Girardot, C. Lecoffre, C. Lunven, *Thromb Haemost.*, **1994**, *72*, 381 - 386.
- [99] A. Koster, K. -G. Fischer, S. Harder, F. Mertzluft, *Biol. Targets Ther.*, **2007**, *1*, 105 - 112.
- [100] J. M. Berg, J. T. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemie*, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2003**.
- [101] J. Dervede, A. Rausch, M. Weinhart, S. Enders, R. Tauber, K. Licha, M. Schirner, U. Zügel, A. von Bonin, R. Haag, *PNAS*, **2011**, *107*, 19679 - 19684.
- [102] H. Takashima, S. Shinkai, I. Hamachi, *Chem. Commun.*, **1999**, *35*, 2345 - 2346.
- [103] J. Ohkanda, R. Satohb, N. Katoa, *Chem. Commun.*, **2009**, *45*, 6949 - 6951.
- [104] J. Muldoon, A. E. Ashcroft, A. J. Wilson, *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 100 - 103.
- [105] M. H. Filby, J. Muldoon, S. Dabb, N. C. Fletcher, A. E. Ashcroft, A. J. Wilson, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 559 - 561.
- [106] Y. Yamaguchi, N. Kato, H. Azuma, T. Nagasaki, J. Ohkanda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, *22*, 2354 - 2358.
- [107] G. Wulff, A. Sarhan, *Angew. Chem.*, **1972**, *84*, 364.
- [108] G. Wulff, A. Sarhan, K. Zabrocki, *Tetrahedron Lett.*, **1973**, *14*, 4329 - 4332.

- [109] A. Cutivet, C. Schembri, J. Kovensky, K. Haupt, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 14699 - 14702.
- [110] H. Zhang, J. Jiang, H. Zhang, Y. Zhang, P. Sun, *Macro Lett.*, **2013**, *2*, 566 - 570.
- [111] T. Schrader, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1996**, *35*, 2649 - 2651.
- [112] T. Schrader, *Chem. Eur. J.*, **1997**, *3*, 1537 - 1541.
- [113] S. Rensing, M. Arendt, A. Springer, T. Grawe, T. Schrader, *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 5814 - 5821.
- [114] T. Schrader, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 517 - 520.
- [115] D. Rupprecht, *Dissertation*, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2006**.
- [116] M. Arendt, W. Sun, J. Thomann, X. Xie, T. Schrader, *Chem. Asia J.*, **2006**, *1*, 544 - 554.
- [117] C. Renner, J. Piehler, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 620 - 628.
- [118] S. J. Koch, C. Renner, X. Xie, T. Schrader, *Angew. Chem.*, **2006**, *118*, 6500 - 6503.
- [119] K. Wenck, S. Koch, C. Renner, W. Sun, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 16015 - 16019.
- [120] S. Koch, *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg, **2006**.
- [121] S. Wei, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, **2009**.
- [122] K. Wenck, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, **2010**.
- [123] P. Gilles, *Diplomarbeit*, Universität Duisburg-Essen, **2010**.
- [124] P. Latza, *Dissertation*, Universität Duisburg-Essen, **2013**.
- [125] B. J. Calnan, B. Tidor, S. Biancalana, D. Hudson, A. D. Frankel, *Science*, **1991**, *252*, 1167 - 1171.
- [126] G. M. Pavlov, N. P. Ivanova, E. V. Korneeva, N. A. Mikhailova, E. F. Panarin, *J. Carbohyd. Chem.*, **1996**, *15*, 419 - 433.
- [127] B.S. Hartley, V. Massey, *Biochim. Biophys. Acta*, **1956**, *21*, 58 - 70.
- [128] T. A. Larsen, A. J. Olson, D. S. Goodsell, *Structure*, **1998**, *6*, 421 - 427.
- [129] C. Schmuck, *Chem. Commun.*, **1999**, *35*, 843 - 844.
- [130] C. Schmuck, *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 2397 - 2403.
- [131] C. Schmuck, *Chem. Eur. J.*, **2000**, *6*, 709 - 718.
- [132] J. A. Zablocki, M. Miyano, R. B. Garland, D. Pireh, L. Schretzman, S. N. Rao, R. J. Lindmark, S. G. Panzer-Knodle, N. S. Nicholson, Nancy S., *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 1811 - 1819.
- [133] E. Hochuli; H. Dobeli, A. Schacher, *J. Chromatogr.*, **1987**, *411*, 177 - 184.

- [134] B. R. Hart, K. J. Shea, *Macromolecules*, **2002**, *35*, 6192 - 6201.
- [135] T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake, S. Shinkai, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, *35*, 1910 - 1922.
- [136] J. Adams, M. Behnke, S. Chen, A. A. Cruickshank, L. R. Dick, L. Grenier, J. M. Klunder, Y.-T. Ma, L. Plamondon, R. L. Stein, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 333 - 338.
- [137] R. C. Gardner, S. J. Assinder, G. Christie, G. G. F. Manson, R. Markwell, Harry Wadsworth, M. McLaughlin, R. King, M. C. Chabot-Fletscher, J. J. Brenton, D. Allsop, A. J. Rivett, *Biochem. J.*, **2000**, *346*, 447 - 454.
- [138] S. R. S. Ting, E. H. Min, P. B. Zetterlund, M. H. Stenzel, *Macromolecules*, **2010**, *43*, 5211 - 5221.
- [139] E. L. Doyle, C. A. Hunter, H. C. Phillips, S. J. Webb, N. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 4593 - 4599.
- [140] A. C. Biraboneye, S. Madonna, Y. Laras, S. Krantic, P. Maher, J.-L. Kraus, *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 4358 - 4369.
- [141] I. Stratmann, *Bachelorarbeit*, Universität Duisburg-Essen, **2013**.
- [142] S. Lata, A. Reichel, R. Brock, R. Tampe, J. Piehler, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 10205 - 10215.
- [143] V. Bickert, *Dissertation*, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, **2008**.
- [144] T. Schmuck, V. Bickert, M. Merschky, L. Geiger, D. Rupprecht, J. Dudaczek, P. Wich, T. Rehm, U. Machon, *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, 324 - 329.
- [145] M. Pecs, M. Eggert, K. Schügerl, *J Biotechnol*, **1991**, *21*, 137 - 142.
- [146] M. Mares-Guia, Elliott Shaw, *J. Biol. Chem.*, **1965**, *240*, 1579 - 1585.
- [147] J. Stürzebechera, P. Walsmanna, B. Voigt, G. Wagner, *Thromb res*, **1984**, *36*, 457 - 465.
- [148] R. A. Engh, H. Brandstetter, G. Sucher, A. Eichinger, U. Baumann, W. Bode, R. Huber, T. Poll, R. Rudolph, W. von der Saal, *Structure*, **1996**, *4*, 1353 - 1362.
- [149] C. Ruppert, C. Pucker, P. Markart, R. Schmidt, F. Grimminger, W. Seeger, J. Stürzebecher, A. Günther, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **2003**, *28*, 95 - 102.
- [150] M. Turlington, H. Mackay, C. Rutledge, Z. Taherbhai, B. Nguyen, D. Wilson, M. Lee, *Heterocycl. Comm.*, **2006**, *12*, 89 - 92.
- [151] K. Mizusawa, Y. Ishida, Y. Takaoka, M. Miyagawa, S. Tsukiji, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 7291 - 7293.
- [152] A. R. Brenner, *Dissertation*, Technische Universität München, **1996**.
- [153] C. Renner, *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, **2006**.
- [154] U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem.*, **2003**, *115*, 3458 - 3459.

- [155] F. Lottspeich, J. W. Engels, *Bioanalytik*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2006**.
- [156] M. Otto, *Analytische Chemie*, 3. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**.
- [157] W. Hoppe, W. Lohmann, H. Marko, H. Ziegler, *Biophysik*, 2. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg, **1982**.
- [158] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, *Prinzipien der Biochemie*, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1994**.
- [159] G. J. K. Praefcke, C. Herrmann, *Biospektrum*, **2005**, *11*, 44 - 47.
- [160] D. M. Shotton, B. S. Hartley, *Biochem. J.*, **1973**, *131*, 643 - 675.
- [161] C. Gardi, G. Giuseppe, *Analytical Biochemistry*, **1984**, *140*, 472 - 477.
- [162] P. D. Edwards, P. R. Bernstein, *Med res rev*, **1994**, *14*, 127 - 194.
- [163] H. L. James, A. B. Cohen, *J. Clin. Invest.*, **1978**, *62*, 1344 - 1353.
- [164] D. C. Whitcomb, M. E. Lowe, *Dig Dis Sci*, **2007**, *52*, 1 - 17.
- [165] J. Bieth, B. Spiess, C. G. Wermuth, *Biochem. Med.*, **1974**, *11*, 350 - 357.
- [166] T. Tamada, T. Kinoshita, K. Kurihara, M. Adachi, T. Ohhara, K. Imai, R. Kuroki, T. Tada, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 11033 - 11040.
- [167] J. Carre, C. Figarella, O. Guy, J.P. Thouvenot, *Biochim Biophys Acta*, **1986**, *883*, 46 - 53.
- [168] W. Ma, C. Tang, L. Lai, *Biophys J.*, **2005**, *89*, 1183 - 1193.
- [169] R. L. Stein, F. Melandri, L. Dick, *Biochemistry*, **1996**, *35*, 3899 - 3908.
- [170] A. Kashima, Y. Inoue, S. Sugio, I. Maeda, T. Nose, Y. Shimohigashi, *Eur. J. Biochem.*, **1998**, *255*, 12 - 23.
- [171] F. Tietze, *J. Biol. Chem.*, **1953**, *204*, 1 - 11.
- [172] E. Shaw, M. Mares-Guia, W. Cohen, *Biochemistry*, **1965**, *4*, 2219 - 2224.
- [173] K. A. Walsh, *Methods Enzymol.*, **1970**, *19*, 41 - 63.
- [174] S. Koutsopoulos, K. Patzsch, W. T. E. Bosker, W. Norde, *Langmuir*, **2007**, *23*, 2000 - 2006.
- [175] B. F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen, *Arch. Biochem. Biophys*, **1961**, *95*, 271 - 278.
- [176] D. Liebschner, M. Dauter, A. Brzuszkiewicz, Z. Dauter, *Acta Cryst.*, **2013**, *69*, 1447 - 1462.
- [177] M. Golicnik, J. Stojan, *BAMBED*, **2004**, *32*, 228 - 235.
- [178] J. Vendrell, A. Guasch, M. Coll, V. Villegas, M. Billeter, G. Wider, R. Huber, K. Wuthrich, F. X. Aviles, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **1992**, *373*, 387 - 392.

- [178] F.A. Quiocho, W.N. Lipscomb, *Carboxypeptidase A: A Protein and an Enzyme*, 25, Adv. Protein Chem, **1971**.
- [179] D. W. Christianson, W. N. Lipscomb, *Acc. Chem. Res.*, **1989**, 22, 62 - 69.
- [180] F. W. Putnam, H. Neurath, *J. Biol. Chem.*, **1946**, 166, 603 - 619.
- [181] R Breslow, D. E. McClure, R. S. Brown, and J. Eisenach, *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 194 - 195.
- [182] A. K. Barber, J. R. Fisher, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **1972**, 69, 2970 - 2974.
- [183] W. L. Mock, Y. Liu, D. J. Stanford, *Anal. Biochem.*, **1996**, 239, 218 - 222.
- [184] C. A. Ryan, G. M. Hass, R. W. Kuhn, H. Neurath, *J Biol Chem*, **1974**, 249, 5495 - 5499.
- [185] A. F. Jensen, J. T. Bukrinsky, M. J. Bjerrum, S. Larsen, *J Biol Inorg Chem*, **2002**, 7, 490 - 499.
- [186] G. Thews, E. Mutschler, P. Vaupel, *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschens*, 5. Auflage, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, **1999**.
- [187] A. M. Gressner, T. Aendt, *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, 1. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, **2007**.
- [188] C. A. Borgoño, I. P. Michael, E. P. Diamandis, *Mol Cancer Res*, **2004**, 2, 257 - 280.
- [189] E. Schremmer-Danninger, S. Naidoo, C. Neuhof, K. Valeske, C. Snyman, C. Sander, K. D. Bhoola, H. Neuhof, *Biol. Chem.*, **2004**, 385, 1069 - 1076.
- [190] M. E. Moreau, N. Garbacki, G. Molinaro, N. J. Brown, F. Marceau, A. Adam, *J Pharmacol Sci*, **2005**, 99, 6 - 38.
- [191] D. Doenecke, J. Koolman, G. Fuchs, W. Georg, *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*, 15. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2005**.
- [192] H. Waldner, B. Vollmar, P. Conzen, A. Giitz, P. Lehnert, E. Fink, W. Brendel, L. Schweiberer, *Langenbecks Arch Chir*, **1993**, 378, 154 - 159.
- [193] F. Fiedler, C. Hirschauer, E. Werle, *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, **1970**, 351, 225 - 238.
- [194] G. Raspi, *J. Chromatogr. B*, **1996**, 684, 265 - 287.
- [195] L. Svendsen, B. Blomback, M. Blombxck, P. I. Olsson, *Thromb res*, **1972**, 1, 267 - 278.
- [196] T. Kishi, S. M. Cloutier, C. Kündig, D. Deperthes, E. P. Diamandis, *Biol. Chem.*, **2006**, 387, 723 - 731.
- [197] G. Laxmikanthan, S. I. Blaber, M. J. Bennett, I. A. Scarisbrick, M. A. Juliano, M. Blaber, *Proteins*, **2005**, 58, 802 - 814.
- [198] L. Hedstrom, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 4501 - 4523.

- [199] S. Prasad, A. M. Cantwell, L. A. Bush, P. Shih, H. Xu, E. Di Cera, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 10103 - 10108.
- [200] I. S. R. Carter, A. L. V. Hoek, E. L. G. Prydzial, R. T. A. MacGillivray, *Thrombosis*, **2010**, 1 - 9.
- [201] P. G. Righetti, G. Tudor, *J. Chrom. A*, **1981**, 220, 115 - 194.
- [202] S. R. Stone, A. Betz, J. Hofsteenge, *Biochemistry*, **1991**, 30, 9841 - 9848.
- [203] A. Biela, M. Khayat, H. Tan, J. Kong, A. Heine, D. Hangauer, G. Klebe, *J. Mol. Biol.*, **2012**, 418, 350 - 366.
- [204] A. Vashishta, S. S. Ohri, J. Vetvickova, M. Fusek, J. Ulrichova, V. Vetvicka, *Eur J Cell Biol.*, **2007**, 86, 303 - 313.
- [205] V. Gieselmann, A. Hasilika, K. Figura, *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260, 3215 - 3220.
- [206] A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner, *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 3. Auflage, Elsevier Science Verlag, **2012**.
- [207] E. Liaudet-Coopman, M. Beaujouin, D. Derocq, M. Garcia, M. Glondu-Lassis, V. Laurent-Matha, C. Prebois, H. Rochefort, F. Vignon, *Cancer Lett.*, **2006**, 237, 167 - 179.
- [208] L. Urbanelli, C. Emiliani, C. Massini, E. Persichetti, A. Orlacchio, G. Pelicci, S. Sorbi, A. Hasilik, G. Bernardi, A. Orlacchio, *Neurobiol. Aging*, **2008**, 29, 12 - 22.
- [209] B. Veerapandian, J. B. Cooper, A. Sali, T. L. Blundell, R. L. Rosati, B. W. Dominy, D. B. Damon, D. J. Hoover, *Protein Sci.*, **1992**, 1, 322 - 328.
- [210] N. Marks, M. Benuck, G. Hashim, *J neurosci res*, **1980**, 5, 217 - 223.
- [211] D. C. Pimenta, A. Oliveira, M. A. Juliano, L. Juliano, *BBA*, **2001**, 1544, 113 - 122.
- [212] R. Smith, V. Turk, *Eur. J. Biochem.*, **1974**, 48, 245 - 254.
- [213] Y. Yasuda, T. Kageyama, A. Akamine, M. Shibata, E. Kominami, Y. Uchiyama, K. Yamamoto, *J. Biochem.*, **1999**, 125, 1137 - 1143.
- [214] E. T. Baldwin, T. N. Bhat, S. Gulnik, M. V. Hosur, R. C. Sowder II, R. E. Cachau, J. Collins, A. M. Silva, J. W. Erickson, *PNAS*, **1993**, 90, 6796 - 6800.
- [215] P. Latza, P. Gilles, T. Schaller, T. Schrader, Affinity Polymers Tailored for the Protein A Binding Site of IgGs, *Chem. Eur. J.*, **2014**, DOI: 10.1002/chem.201402399R1.
- [216] L. Gros, S. O. Lorente, C. J. Jimenez, V. Yardley, L. Rattray, H. Wharton, S. Little, S. L. Croft, L. M. Ruiz-Perez, D. Gonzalez-Pacanowska, I. H. Gilbert, *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 6094 - 6103.
- [217] S. Nam, D. M. Smith, Q. P. Dou, *Cancer epidemiol biomarkers prev*, **2001**, 10, 1083 - 1088.
- [218] P. Hauske, M. Meltzer, C. Ottmann, T. Krojer, T. Clausen, M. Ehrmann, M. Kaiser, *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 2920 - 2924.

# Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

