

**Entwicklung neuer hochbeladener Trägermaterialien für  
die organische Festphasensynthese auf der Basis von  
vernetztem Polyethylenimin (Ultraharze)**

**Anwendung im Bereich der Peptidsynthese, für  
Polymerreagenzien und zur Synthese von  
peptidfunktionalisierten dendritischen Polymeren**

**DISSERTATION**

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften**

**2004**

**vorgelegt von**

**Michael Barth**

Tag der mündlichen Prüfung:

01.09.04

Dekan:

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. G. Jung

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. J. Rademann

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von

**Herrn PROF. DR. JÖRG RADEMANN**

im Arbeitskreis von

**Herrn PROF. DR. GÜNTHER JUNG**

in der Zeit von Oktober 2000 bis Juni 2004 am Institut für Organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn PROF. DR. JÖRG RADEMANN danke ich sehr für die intensive Betreuung, für die interessante Aufgabenstellung und sein mir entgegengebrachtes Vertrauen.

Herrn PROF. DR. GÜNTHER JUNG danke ich sehr für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, für die Freiheit bei der Bearbeitung des Themas und sein mir entgegengebrachtes Vertrauen.



## **Mein Dank gilt...**

JÖRG BAUER, STEFFEN WEIK und DR. UDO MARQUARDT für das super Arbeitsklima im Labor 10 M 31 und für viele Hilfestellungen und Diskussionen innerhalb und außerhalb der Chemie.

RAINER FISCHER für die tolle Zusammenarbeit im Rahmen des Peptidpolymerprojekts.

PAUL SCHULER für die Durchführung von ESR-Messungen und seine große Hilfsbereitschaft bei allen Fragen rund um die ESR-Spektroskopie.

DR. HANS-JOACHIM EGELHAAF für Simulation und Auswertung von Reaktionskinetiken.

DR. VOLKER BRAIG (BASF AG, Ludwigshafen) für die Durchführung von Gelpermeationschromatographie-Messungen.

URSULA BECKER-SANZENBACHER für die vielen Hilfen bei allen organisatorischen Fragen und Problemen.

JÖRG BAUER und DR. GERHARD SORG für das Beheben aller Computerprobleme.

STEFFEN WEIK für die Aufnahme von LC/MS-Läufen.

MICHAELA REGINEK für die Zusammenarbeit im Rahmen eines Katalyse-Projekts.

NICOLE SESSLER für die Synthese von Peptiden.

BERTHOLD MAIER für die Aufnahme von Gelphasen-NMR-Spektren.

WOLFGANG BOCK für die Durchführung der vielen Elementaranalysen.

der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT für die Finanzierung eines Stipendiums im Rahmen des Graduiertenkollegs „Chemie in Interphasen“.

der Firma BÜCHI für die Bereitstellung des Syncore<sup>®</sup> Reaktors.

allen Kolleginnen und Kollegen, die nicht namentlich erwähnt worden sind, für das tolle Klima im Arbeitskreis Jung.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>_____</b>	<b>i</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>_____</b>	<b>vi</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Allgemeiner Teil</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Festphasensynthese</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>Polymerunterstützte Lösungssynthese (PASP-Synthese)</b>	<b>6</b>
2.2.1	Polymerunterstützte Scavenger	7
2.2.2	Polymerunterstützte Reagenzien	8
2.2.3	Polymerunterstützte Katalysatoren	8
2.2.4	„Catch-and release“	8
<b>2.3</b>	<b>Die Trägermaterialien</b>	<b>9</b>
2.3.1	Gelförmige Polymere	9
2.3.1.1	Polystyrol	10
2.3.1.2	Polyacrylamidharze	12
2.3.1.3	PEG-PS-Copolymere	13
2.3.1.4	Polyacrylamid-PEG Copolymere	14
2.3.1.5	Modifizierte Polystyrolharze	16
2.3.1.6	Hochbeladene Trägermaterialien	16
2.3.2	Makroporöse Polymere	18
2.3.2.1	Makroporöses Styrol-DVB-Copolymer	19
2.3.2.2	Silica (Kieselgel)	19
2.3.2.3	Verbundmaterialien aus makroporösen und gelförmigen Trägern	20
2.3.3	Lösliche Polymere	20
<b>2.4</b>	<b>Linker</b>	<b>22</b>
2.4.1	Elektrophil spaltbare (säurelabile) Linker	23
2.4.2	Nukleophil spaltbare Linker	24
2.4.3	Photochemisch spaltbare Linker	25
2.4.4	Metallinduzierte Abspaltungsmethoden	25
2.4.5	Abspaltungen unter reduktiven Bedingungen	26
2.4.6	Abspaltungen unter oxidativen Bedingungen	26

<b>2.5</b>	<b>Parameter in der Festphasensynthese</b>	<b>27</b>
2.5.1	Stabilität des Trägermaterials	27
2.5.2	Die Kapazität polymerer Träger	28
2.5.3	Das Quellverhalten	28
2.5.4	Verteilung funktioneller Gruppen	30
2.5.5	Beadgröße	31
2.5.6	Kinetische Betrachtungen	32
<b>2.6</b>	<b>Analytische Methoden in der Festphasenchemie</b>	<b>33</b>
2.6.1	Elementaranalyse	33
2.6.2	Farbreaktionen	34
2.6.3	Infrarotspektroskopie	34
2.6.4	NMR-Spektroskopie	35
2.6.5	Massenspektrometrie	35
2.6.6	ESR-Spektroskopie	36
2.6.7	UV/VIS- und Fluoreszenzspektroskopie	36
<b>2.7</b>	<b>Polyethylenimin</b>	<b>37</b>
2.7.1	Darstellung	37
2.7.2	Eigenschaften von verzweigtem PEI	39
2.7.3	Verwendung von PEI	40
<b>3</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Synthese von Ultraharzen</b>	<b>43</b>
4.1.1	Einleitung	43
4.1.2	Synthese von Ultraharzen	47
4.1.3	Charakterisierung der Ultraharze	50
4.1.4	Derivatisierung der Ultraharze	52
4.1.5	Chemische Stabilität der Ultraharze	61
4.1.6	Peptidsynthese an Ultraharzen	62
<b>4.2</b>	<b>Evaluierung von Ultraharzen</b>	<b>65</b>
4.2.1	Einleitung	65
4.2.2	Charakterisierung von PEI	65
4.2.3	Variation der Vernetzer	70
4.2.4	Synthese von Ultraharzen mit unterschiedlichen Mengen an Vernetzer	72
4.2.5	<sup>1</sup> H-Gelphasen MAS NMR-Untersuchungen	76
4.2.6	Kupplung von Linkermolekülen an Ultraharze	79



4.2.7	Untersuchung des Quellverhaltens _____	82
4.2.8	Mobilitätsmessungen mit Hilfe der ESR-Spektroskopie _____	85
4.2.9	Vergleich der Ultraharze durch Anwendung in der Peptidsynthese _____	88
<b>4.3</b>	<b>Polymeres Borhydrid auf der Basis von vernetztem PEI _____</b>	<b>91</b>
4.3.1	Einleitung _____	91
4.3.2	Synthese eines Ultraharzes mit hochmolekularem PEI _____	92
4.3.3	Synthese polykationischer Ultraharze _____	95
4.3.4	Beladung des polykationischen Ultraharzes mit Borhydrid durch Ionenaustausch _____	96
4.3.5	Bestimmung der effektiven Beladung _____	98
4.3.6	Einfluss von Lösungsmittel und Partikelgröße des Harzes auf die Reduktionskraft _____	100
4.3.7	Reduktion von Carbonylverbindungen und Nitroolefinen _____	101
4.3.8	Reduktive Aminierungen _____	105
4.3.9	Lager- und Recyclingfähigkeit des polymeren Borhydrids _____	107
<b>4.4</b>	<b>Reversibel vernetzte Polymere zur Synthese von multivalent funktionalisierten dendritischen Polymeren _____</b>	<b>110</b>
4.4.1	Einleitung _____	110
4.4.1.1	<b>Polymer Therapeutika _____</b>	<b>110</b>
4.4.1.2	<b>Dendrimere _____</b>	<b>111</b>
4.4.1.3	<b>Aufnahme von PEI/DNA-Komplexe in die Zelle _____</b>	<b>115</b>
4.4.1.4	<b>Multivalenzeffekte _____</b>	<b>116</b>
4.4.1.5	<b>Peptidfunktionalisierte Dendrimere _____</b>	<b>117</b>
4.4.2	Konzept zur Synthese von peptidfunktionalisierten dendritischen Polymerstrukturen _____	118
4.4.3	Synthese des reversiblen Vernetzers _____	119
4.4.4	Synthese des polymeren Trägers _____	123
4.4.5	Charakterisierung _____	124
4.4.6	Auflösung der Vernetzung des Polymers _____	127
4.4.7	Peptidsynthese an reversibel vernetzten Polymeren _____	128
4.4.8	Endocytose von peptidfunktionalisierten PEI-Polymeren in HeLa-Zellen	137
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung _____</b>	<b>141</b>
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil _____</b>	<b>145</b>
6.1	<b>Chemikalien und Lösungsmittel _____</b>	<b>145</b>
6.2	<b>Analytische Methoden und Geräte _____</b>	<b>145</b>

6.2.1	Kaiser-Test _____	145
6.2.2	Chloraniltest _____	146
6.2.3	UV-Spektroskopie _____	146
6.2.4	Bestimmung der Harzbeladung durch UV-spektrometrische Fmoc- Bestimmung _____	146
6.2.5	FT-ATR-IR-Spektroskopie _____	147
6.2.6	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie _____	148
6.2.7	HPLC/MS-Analytik _____	148
6.2.8	ES-Massenspektrometrie _____	149
6.2.9	NMR-Spektroskopie _____	149
6.2.10	ESR-Spektroskopie _____	149
6.2.11	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie _____	149
<b>6.3</b>	<b>Experimenteller Teil zu Kap. 4.1 und 4.2 _____</b>	<b>150</b>
6.3.1	Synthese der Ultraharze _____	150
6.3.2	Charakterisierung von PEI-1 und PEI-2 _____	152
6.3.3	Peracetylierung von PEI-1 und PEI-2 _____	152
6.3.4	NMR-Messungen der peracetylierten PEIs _____	153
6.3.5	Kupplung von Linkermolekülen an Ultraharze _____	153
6.3.5.1	<b>2-Hydroxyacetamidharze _____</b>	<b>153</b>
6.3.5.2	<b>4-(4-Hydroxymethyl-3-methoxy-phenoxy)-butanoylamidharze (HMPB-Harze) _ _____</b>	<b>154</b>
6.3.5.3	<b>4-Hydroxymethylbenzamidharze (HMBA-Harze) _____</b>	<b>154</b>
6.3.5.4	<b>Rinkamid Harze _____</b>	<b>154</b>
6.3.5.5	<b>Synthese von 4-(4-Acetoxymethyl-3-methoxyphenoxy)buttersäure _____</b>	<b>154</b>
6.3.5.6	<b>Synthese von 4-Acetoxymethylbenzoesäure _____</b>	<b>155</b>
6.3.6	Bestimmung der Quellfaktoren _____	155
6.3.7	Synthese von spin-gelabelten Harzen _____	155
6.3.8	Peptidsynthese an Ultraharzen _____	156
<b>6.4</b>	<b>Experimenteller Teil zu Kap. 4.3 _____</b>	<b>156</b>
6.4.1	Synthese eines Ultraharzes ausgehend von hochmolekularem PEI ____	156
6.4.2	Synthese polykationischer Ultraharze _____	157
6.4.3	Beladung des polykationischen Ultraharzes mit Borhydrid durch Ionenaustausch _____	157
6.4.4	Allgemeine Vorschrift für die Reduktion von Carbonylverbindungen und Nitroolefinen _____	157
6.4.5	Allgemeine Vorschrift zur reduktiven Aminierung _____	158

<b>6.5</b>	<b>Experimenteller Teil zu Kap. 4.4</b>	<b>158</b>
6.5.1	Synthese des Silyldiether-Vernetzers	158
<b>6.5.1.1</b>	<b>Synthese von 4-Hydroxymethylbenzaldehyd</b>	<b>158</b>
<b>6.5.1.2</b>	<b>Synthese von Diisopropyl-bis[(4-formylbenzyl)oxy]silan</b>	<b>158</b>
6.5.2	Synthese des polymeren Trägers	159
6.5.3	Synthese der funktionalisierten Trägermaterialien	159
<b>6.5.3.1</b>	<b>Synthese von RH 1</b>	<b>159</b>
<b>6.5.3.2</b>	<b>Synthese von RH 2</b>	<b>160</b>
<b>6.5.3.3</b>	<b>Synthese von RH 3</b>	<b>160</b>
6.5.4	Allgemeine Vorschrift zur Synthese peptidfunktionalisierter dendritischer Polymere	161
6.5.5	Synthese von Fluorescein-markierten Peptidpolymeren	161
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>163</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Für Aminosäuren wurde laut IUPAC-IUB-Kommission für biologische Nomenklatur [*Eur. J. Biochem.* **1984**, *138*, 9-37] der Ein- oder Dreibuchstaben-Code verwendet.

ACN	Acetonitril
AIBN	Azobisisobutyronitril
AS	Aminosäure
BF <sub>3</sub> ·Et <sub>2</sub> O	Bortrifluorid-Etherat
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
CPG	Controlled Pore Glass
DCM	Dichlormethan
Dde	1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyanobenzochinon
DIBAH	Diisobutylaluminiumhydrid
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DiPEA	<i>N</i> -Ethyl-diisopropylamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
DVB	Divinylbenzol
EA	Elementaranalyse
EDT	Ethandithiol

eq.	Äquivalente
ESR	Elektronenspinresonanz
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
exp.	experimentell
Gd	Gadolinium
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FT-ATR-IR	Fourier-Transform-Attenuated-Total-Reflection-IR
BF <sub>3</sub>	Tetrafluorborsäure
HF	Fluorwasserstoff
HMBA	Hydroxymethylbenzoesäure
HMPB	4-(4-Hydroxymethyl-3-methoxyphenoxy)buttersäure
HOAt	<i>N</i> -Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
KBr	Kaliumbromid
KCN	Kaliumcyanid
KHSO <sub>4</sub>	Kaliumhydrogensulfat
LD <sub>50</sub>	Letale Dosis 50 %
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation
MAS	Magic Angle Spinning
MeIm	<i>N</i> -Methylimidazol
MeOH	Methanol
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrie
MSNT	1-(Mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis

NaBH <sub>4</sub>	Natriumborhydrid
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Natriumsulfat
NaOMe	Natriummethanolat
NBS	<i>N</i> -Bromsuccinimid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PAMAM	Polyamidoamin
PASP	Polymer-Assisted Solution-Phase
Pbf	2,2,5,7,8-Pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	Palladium-tetrakis-(triphenylphosphin)
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
ppm	parts per million
PPI	Polypropylenimin
PS	Polystyrol
RT	Raumtemperatur
SiO <sub>2</sub>	Siliziumdioxid
SPOS	Solid-Phase-Organic Synthesis
SPPS	Solid-Phase-Peptide-Synthesis
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl
tert.-But.	tert. Butanol
TFA	Trifluoressigsäure

TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
theor.	theoretisch
THF	Tetrahydrofuran
TOF-SIMS	Time-of-flight-Sekundärionen-MS
TIS	Triisopropylsilan
TPA	Terephthalaldehyd
UV	Ultraviolett
v	Volumen





# 1 Einleitung

Die organische Chemie stellt heutzutage die zentrale Naturwissenschaft in Bereichen wie Pharmaforschung, Pflanzenschutz, Lebensmittelchemie und Umweltschutz dar. Ursprünglich auf reine Lösungssynthese beschränkt, ist seit Beginn der sechziger Jahre die festphasenunterstützte Synthese ein weit verbreiteter Begriff. Die Synthese des ersten Tetrapeptids an einer vernetzten Polystyrolmatrix von Merrifield<sup>[1]</sup> war die Geburtsstunde der organischen Festphasensynthese, welche bis heute in vielen Bereichen der Chemie Einzug erhalten hat. Dabei werden an einem polymeren Trägermaterial über ein spezielles Linkermolekül Verbindungen sukzessive aufgebaut und nach der Synthese das Zielmolekül vom Polymer abgespalten. Die Vorteile der Festphasenchemie gegenüber der konventionellen Synthese in Lösung sind vor allem die schnelle und einfache Aufarbeitung der Reaktion durch Abfiltrieren und Waschen des Polymers und die Möglichkeit des Einsatzes von hohen Reagenzienüberschüssen, um Reaktionen vollständig ablaufen zu lassen. Durch die neuen Entwicklungen in der Automatisierungstechnik können mit Hilfe des Prinzips der Kombinatorischen Chemie viele Verbindungen in kurzer Zeit festphasengebunden synthetisiert werden. Dies wird bei der Leitstruktursuche eines neuen Wirkstoffes in der Arzneimittelforschung intensiv genutzt. Konnten früher nur wenige Verbindungen pro Woche synthetisiert werden, so ist heute mit Hilfe der Kombinatorischen Chemie die Herstellung von tausenden Verbindungen in kurzer Zeit kein Problem mehr, welche anschließend im so genannten High-Throughput-Screening auf ihre biologische Wirkung getestet werden. Viele dieser Synthesen laufen festphasenunterstützt ab.

In den letzten Jahrzehnten wurden alle wichtigen Reaktionstypen der organischen Chemie an die feste Phase übertragen. Heterozyklensynthese, Naturstoffsynthesen, Oligonukleotidsynthesen, C-C-Knüpfungsreaktionen, wie auch die Immobilisierung von Katalysatoren wurden mit großem Erfolg entwickelt. Ein weiteres und in letzter Zeit viel beachtetes Konzept basierend auf der Festphasenchemie, ist die Verwendung von funktionalisierten Polymeren in der polymerunterstützten Lösungssynthese (Polymer-Assisted-Solution-Phase Synthesis, PASP-Synthese).<sup>[2]</sup> Hier können durch Kombination mit Automatisierungstechniken eine Vielzahl potentieller Wirkstoffmoleküle in Lösung hergestellt werden. Der größte Erfolg der festphasenunterstützten Chemie liegt aber in der Peptidsynthese. Hier hat die Festphasenchemie die Synthese in Lösung nahezu vollständig

verdrängt. Durch Einsatz von Syntheserobotern können mit Hilfe der Synthese an fester Phase Peptidsequenzen von bis zu 40 Aminosäuren schnell und effizient aufgebaut werden.

Die Entwicklung der Trägermaterialien für die organische Festphasensynthese war anfangs fokussiert auf die Verwendung von Polystyrol, welches auch heute noch der am meisten verwendete polymere Träger ist. Von Beginn der siebziger Jahre bis heute wurden eine Vielzahl neuer polymerer Träger entwickelt, die die Schwachstellen des Polystyrols, wie z. B. die Wasserinkompatibilität, deutlich verbesserten, so dass die Festphasenchemie auch Einzug in Gebiete der Biochemie und Biologie erhielt.

Jedoch blieb der Chemie an fester Phase der ganz große Durchbruch in der chemischen Industrie verwehrt. Fast alle Feinchemikalien werden heute in Lösung synthetisiert. Die Kosten für Herstellung und Funktionalisierung der polymeren Träger sind für Anwendungen in industriellen Prozessen zu hoch. Dies liegt u. a. an der geringen Atomökonomie der Trägermaterialien gegenüber der Synthese in Lösung.<sup>[3]</sup> Auch gibt es Schwierigkeiten mit dem Upscaling, dem Übertragen der einzelnen Reaktionsschritte vom Labormaßstab (mg bis g) in den kg-Maßstab. Die Anforderungen an einen polymeren Träger sind außerdem sehr hoch: Zum Einen muss eine chemische, thermische und mechanische Stabilität des Polymers während den einzelnen Reaktionsschritten gewährleistet sein, zum Anderen sollte der Träger eine breite Lösungsmitteltoleranz besitzen. Ein großer Nachteil ist die geringe Beladung der Polymere, welche durch die Wahl des Monomers und die Art der Funktionalisierung beschränkt ist. Die normal verwendeten Trägermaterialien weisen eine Beladung von 0.2 – 1.5 mmol/g auf. Durch Verwendung von niedermolekularen, funktionalisierten Monomeren für die Herstellung neuer polymerer Träger sollte es möglich sein, die angeführten Nachteile der kommerziell erhältlichen Harze zu vermeiden und Einsatzmöglichkeiten in chemischen und biologischen Prozessen aufzuzeigen.

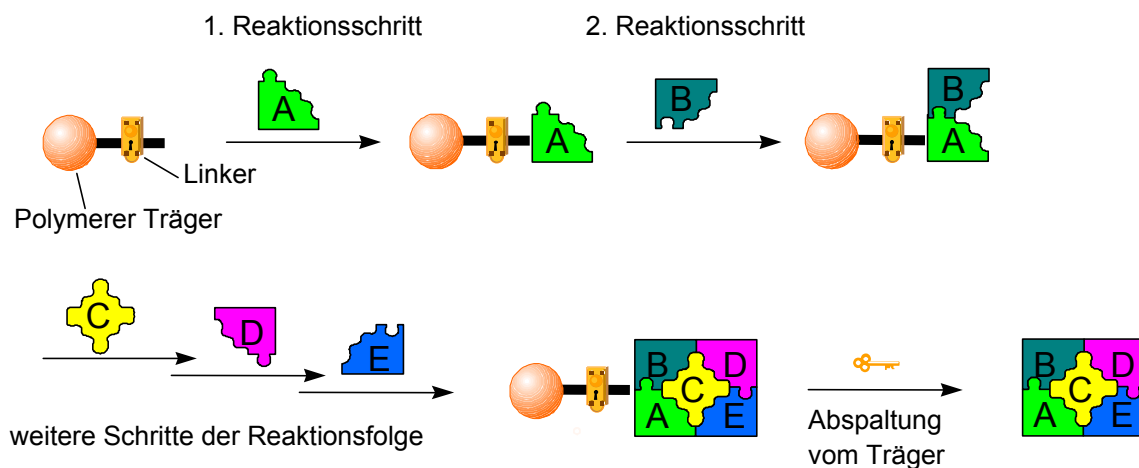
Die vorliegende Arbeit befasst sich zunächst mit der Synthese, Charakterisierung und Evaluierung eines neuen Trägermaterials auf der Basis von vernetztem Polyethylenimin (Ultraharz). Weitere Teile untersuchen den Einsatz der neuen hochbeladenen Polymere in der Peptidsynthese und als polymeres Reagenz. Im letzten Teil wird ein neues Konzept zur einfachen Synthese von peptidfunktionalisierten dendritischen Polymeren mit Hilfe von reversibel vernetzten Polyethyleniminen vorgestellt.

## 2 Allgemeiner Teil

### 2.1 Festphasensynthese

Das Prinzip der Festphasenchemie ist heute eine der wichtigsten Strategien zur Synthese kombinatorisch erzeugter Substanzbibliotheken.<sup>[4-7]</sup> Entwickelt zu Beginn der sechziger Jahre von Bruce Merrifield, wurde sie zunächst nur in der Peptidchemie (Solid-Phase-Peptide Synthesis; SPPS) und Oligonukleotidsynthese eingesetzt. Anfang der neunziger Jahre wurde das Konzept der festphasenunterstützten Chemie sehr stark für die Synthese von Heterozyklen und Pharmakophoren verwendet.

Die Festphasenchemie besticht durch ihre Einfachheit. Das Prinzip basiert auf der Verwendung eines unlöslichen, polymeren Trägers, an den über ein spezielles Linkermolekül ein Substrat kovalent angebunden wird. Die Bindungsstelle Linker-Substrat muss während dem Aufbau der Reaktionssequenz chemisch stabil sein, sollte aber unter genau definierten Bedingungen labil sein, um eine Abspaltung vom Polymer jederzeit zu ermöglichen. Umgekehrt muss die Bindung zwischen Linker und Polymer - sowohl während der Synthese als auch unter den Abspaltbedingungen - stabil bleiben. Die Reaktionen werden i. A. durch Schütteln des Polymers in einem Lösungsmittel mit den entsprechenden Reagenzien in einem Glas- oder Plastikreaktor durchgeführt, welcher mit einer Fritte ausgestattet ist. Bei Verwendung von Rührwerken besteht die Gefahr der Zerstörung der Polymerpartikel, was eine Verstopfung der Fritten zur Folge haben kann. Die Aufreinigung erfolgt durch einfaches Abfiltrieren und Waschen des Polymers mit einer speziellen Folge von verschiedenen Lösungsmitteln, welche abhängig von dem verwendeten Trägermaterial und den eingesetzten Reagenzien ist. Nach der Abspaltung vom Polymer wird das Filtrat eingeeengt und mit Hilfe von chromatographischen und spektroskopischen Methoden charakterisiert. Während der Synthese am Polymer kann der Reaktionsverlauf mit einer Reihe von verschiedenen analytischen Verfahren verfolgt werden (siehe Kap. 2.6).



**Abb. 2-1: Schematische Darstellung des Prinzips der Festphasensynthese.**

Die Vor- und Nachteile der Chemie an fester Phase sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

Die Aufarbeitung der einzelnen Reaktionsschritte durch Abfiltrieren und Waschen des Polymers gestaltet sich wesentlich einfacher als bei der Lösungssynthese, da zeitaufwendige Reinigungs- und Isolierungsschritte durch die kovalente Bindung von Produkt und Edukt am Träger entfallen.

Durch Verwendung hoher Überschüsse an Reagenzien können Reaktionsverläufe thermodynamisch und kinetisch beeinflusst werden. Dadurch können Reaktionen beschleunigt und vollständige Umsetzungen erzielt werden, was eine problemlose Automatisierung von Reaktionssequenzen ermöglicht. Allerdings ist dies auch sehr wichtig, da unvollständige Umsetzungen in einer mehrstufigen Reaktionsfolge die Ausbeute stark reduzieren (Tab. 2-1).<sup>[4]</sup> Auch müssen die Bedingungen so gewählt werden, dass keine unerwünschten Nebenreaktionen auftreten. Andere Möglichkeiten zur Vervollständigung einer Reaktion an fester Phase sind Temperatur- und Konzentrationserhöhung, sowie die mehrfache Wiederholung der Reaktion.

**Tab. 2-1: Ausbeute an Endprodukt als Funktion der Ausbeute pro Stufe und der Anzahl an Stufen.**

Ausbeute pro Stufe	Anzahl an Stufen								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>99 %</b>	98 %	97 %	96 %	95 %	94 %	93 %	92 %	91 %	90 %
<b>95 %</b>	90 %	86 %	82 %	77 %	74 %	70 %	66 %	63 %	60 %
<b>90 %</b>	81 %	73 %	66 %	59 %	53 %	48 %	43 %	39 %	35 %
<b>85 %</b>	72 %	61 %	52 %	44 %	38 %	32 %	27 %	23 %	20 %
<b>80 %</b>	64 %	51 %	41 %	33 %	26 %	21 %	17 %	13 %	11 %

Durch Wahl geeigneter Abspaltungsbedingungen und Linkergruppen kann der polymere Träger regeneriert und erneut in der Synthese eingesetzt werden. Dies könnte vor allem bei der industriellen Synthese kleiner Moleküle mit wenigen Reaktionsschritten eine Rolle spielen. Bei aufwendigen und mehrstufigen Synthesen sind die Kosten für die Harze eher unerheblich.

Die Nachteile der festphasenunterstützten Synthese liegen in der eingeschränkten Wahl der Reaktionsbedingungen, Reagenzien und Lösungsmitteln, welche durch die polymeren Träger und die Linkergruppierungen bedingt ist. Bei der Verwendung von Polystyrolharzen können z. B. keine Reaktionen in Wasser oder Methanol ausgeführt werden, da die Quelleigenschaften des Polystyrols in diesen Lösungsmitteln sehr schlecht sind. Weitere Beispiele für den limitierenden Einsatz von funktionalisierten Polystyrolträgern sind Friedel-Crafts-Reaktionen und Reaktionen bei Temperaturen über 120 °C über einen längeren Zeitraum.<sup>[8]</sup> Heterogen-Katalysierte Reaktionen können mit wenigen Ausnahmen nicht an polymeren Trägern durchgeführt werden. Ein weiteres Problem ist oft die Transferierung einer Reaktionssequenz in Lösung direkt an die feste Phase. Hier müssen zuerst zeitaufwendige Syntheseprotokolle erarbeitet werden. In den letzten Jahren sind jedoch für viele Probleme Standardlösungen entwickelt worden.<sup>[9-12]</sup> Die Möglichkeiten zur „on-bead“ - Verfolgung des Reaktionsfortschrittes sind immer noch begrenzt, da viele in der Lösungssynthese üblichen Routineverfahren wie Dünnschichtchromatographie und UV/VIS-Spektroskopie nicht eingesetzt werden können. Auch müssen generell mehr

Reaktionsschritte am Polymer durchgeführt werden, um das Produkt anzuknüpfen und wieder abzuspalten.

## 2.2 Polymerunterstützte Lösungssynthese (PASP-Synthese)

Um ein Teil der oben angeführten Nachteile für den Einsatz der Festphasenchemie in der kombinatorischen Synthese von Substanzbibliotheken zu umgehen, wurden funktionalisierte Polymere in der Lösungssynthese eingesetzt, um ein Substrat zu einem oder mehreren Produkten umzusetzen. Der Unterschied zur Festphasenchemie liegt darin, dass zu keiner Zeit eine kovalente Bindung zwischen Polymer und Substrat vorliegt. Dieses Prinzip der polymerunterstützten Lösungssynthese (Polymer-Assisted-Solution-Phase Synthesis; PASP-Synthese) findet auch Anwendung beim Abfangen von Nebenprodukten und Edukten,<sup>[13]</sup> als Träger in der heterogenen Katalyse<sup>[14]</sup> und zur Aufreinigung von Reaktionen nach dem „catch-and-release“-Prinzip.<sup>[15]</sup> Auch hier kann das polymere Reagenz im Überschuss eingesetzt werden, um Reaktionen schnell und vollständig ablaufen zu lassen. Toxische Substrate können durch Immobilisierung an die Polymermatrix in eine stabile und gut handhabbare Form gebracht werden. In Bezug auf Effizienz und Selektivität unterscheiden sich viele Reaktionen in Lösung interessanterweise kaum von der entsprechenden Festphasenvariante.<sup>[16]</sup> Die Aufarbeitung besteht aus einfachem Abfiltrieren und Einengen des Filtrats, was eine wichtige Voraussetzung zum Aufbau von kombinatorischen Bibliotheken ist. Die Produkte können zu jedem Zeitpunkt der Synthese mit konventionellen Methoden charakterisiert werden. Durch die Filtrationstechnik besteht die Möglichkeit, die verbrauchte polymergebundene Spezies wiederzugewinnen und zu reaktivieren. Bei der polymerunterstützten Synthese in Lösung kann auch mehr als ein Reagens simultan eingesetzt werden. Dabei können sogar Spezies, die in homogener Lösung inkompatibel sind, in der polymergebundenen Form miteinander kombiniert werden und in Eintopfreaktionen eingesetzt werden. Man kombiniert mit dem Konzept der polymerunterstützten Lösungssynthese die Vorteile der Festphasensynthese mit den Vorteilen der Synthese in Lösung.

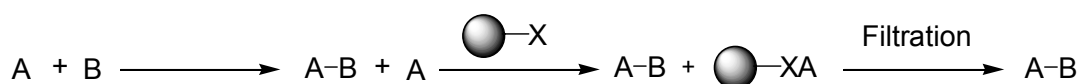
Die Entwicklung dieser polymeren Reagenzien und Scavenger-Harzen hat in den letzten zehn Jahren einen rasanten Aufschwung erfahren, was sich in einer großen Zahl an Publikationen auf diesem Gebiet niederschlägt. Die Bandbreite reicht dabei von einzelnen

Reaktionsschritten bis hin zu kompletten Reaktionssequenzen zur stereoselektiven Synthese von Naturstoffen, inklusive Produktisolierung und –aufreinigung.<sup>[2]</sup> Der Einsatz von Ionenaustauscherharzen in der Katalyse ist aber schon sehr lange bekannt, der erste Review erschien im Jahre 1957,<sup>[17]</sup> sechs Jahre vor Merrifield's Pionierartikel der Festphasenchemie.<sup>[1]</sup> Dennoch bleibt kritisch anzumerken, dass der breite Einsatz von polymeren Reagenzien in der Lösungssynthese oft wirtschaftlich fragwürdig ist, da sie bislang in der Regel zu teuer sind.

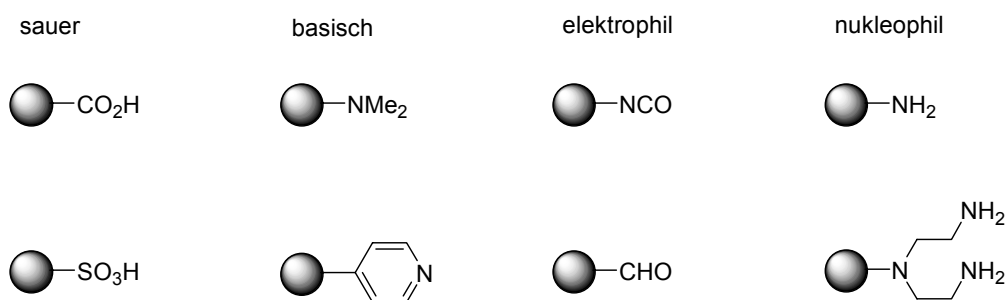
In den folgenden Abschnitten sollen die verschiedenen Konzepte der polymerunterstützten Synthese kurz erläutert werden.

### 2.2.1 Polymerunterstützte Scavenger

Polymerunterstützte Scavenger werden in der Lösungssynthese verwendet, um Reaktionen abubrechen oder Nebenprodukte und überschüssige Edukte abzufangen. Die Aufarbeitung erfolgt durch einfaches Abfiltrieren und Waschen des Polymers. Es gibt grundsätzlich nur zwei Klassen von Scavengerharzen: Die in ihrer Ursprungsform ionischen (saure und basische Reagenzien) und die kovalenten (elektrophile und nukleophile Reagenzien). Einen Überblick über den Einsatz von Scavengerharzen in der Lösungssynthese gibt ein Review von Eames.<sup>[13]</sup>



**Abb. 2-2: Schematische Darstellung einer Lösungssynthese unter Verwendung eines polymeren Scavengers.**



**Abb. 2-3: Repräsentative Beispiele für Scavengerharze.**

### 2.2.2 Polymerunterstützte Reagenzien

Hier wird eine polymergebundene aktive Spezies benutzt, um die Umsetzung eines oder mehrerer Substrate zu neuen Substraten zu erreichen. Verbrauchtes oder überschüssiges Polymer kann durch Filtrieren entfernt werden.

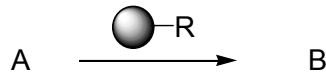


Abb. 2-4: Prinzip eines polymerunterstützten Reagenzes.

### 2.2.3 Polymerunterstützte Katalysatoren

Polymerunterstützte Katalysatoren sind aktive Verbindungen, die mit einem Polymer assoziiert sind und in substöchiometrischen Mengen eingesetzt werden, um Reaktionen auszulösen oder zu beschleunigen. Die Anbindung des eigentlichen Katalysators an das Polymer kann dabei auf verschiedene Arten vorliegen: Der Katalysator kann sukzessive am Polymer aufgebaut werden, der Katalysator wird in Lösung synthetisiert und in einem Schritt auf ein entsprechend funktionalisiertes Polymer gekuppelt, oder der Katalysator wird während des Polymerisationsprozesses durch einen entsprechend funktionalisierten Katalysatorbaustein in das Polymer eingebaut. Auch hier erfolgt die Aufarbeitung der Reaktion durch einfaches Abfiltrieren und Waschen, wobei der polymergebundene Katalysator in der Regel wiedergewonnen und -eingesetzt oder recycelt werden kann.

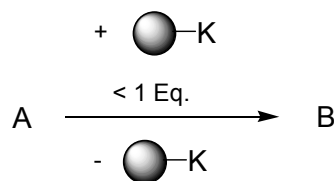


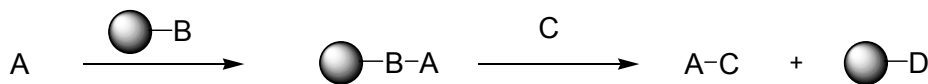
Abb. 2-5: Prinzip des polymergebundenen Katalysators.

### 2.2.4 „Catch-and release“

Bei dieser Hybrid-Technik wird das Konzept der Festphasenchemie mit der Idee der polymerunterstützten Scavengern verbunden. Die für diese Technik funktionalisierten Trägermaterialien fangen das gewünschte Produkt einer Flüssigphasenreaktion ein und



halten es als reaktives, polymergebundenes Intermediat fest. Edukte und Nebenprodukte können durch Abfiltrieren und Waschen entfernt werden. In einem zweiten Schritt erfolgt eine chemische Umsetzung an dem immobilisierten Substrat, was auch die Abspaltung des neuen Produktes vom Polymer zur Folge hat. Oft dient der zweite Schritt auch nur der chemischen Transformation, und das Produkt wird durch Zugabe eines weiteren Substrats in einem dritten Schritt vom Polymer „befreit“.



**Abb. 2-6: Prinzip der „catch-and release“ Methode.**

## 2.3 Die Trägermaterialien

Die zentrale Rolle in der Festphasenchemie spielen die Trägermaterialien. Seit Beginn der polymerunterstützten Synthese sind eine Vielzahl verschiedener Polymere mit völlig unterschiedlichen Eigenschaften entwickelt worden. Eine grobe Einteilung lässt sich in gelförmige, makroporöse und lösliche Polymere vornehmen, wobei die gelförmigen Träger heute die größte Bedeutung haben. Die folgenden Kapitel befassen sich mit den wichtigsten Vertretern dieser Klassen, weitere Informationen bieten zahlreiche Bücher und Reviews.<sup>[18][4, 19-24]</sup>

### 2.3.1 Gelförmige Polymere

Gelförmige Trägermaterialien sind unlösliche Polymere, die die Eigenschaft haben, Lösungsmittel aufzunehmen und somit ihr Volumen zu vergrößern. Dies erleichtert die Diffusion der Substrate in die Polymerpartikel. Das Quellverhalten eines Trägers in dem verwendeten Lösungsmittel ist eine zwingende Voraussetzung für eine effiziente Festphasensynthese. Gelförmige Polymere sind nur relativ schwach vernetzt. Der Anteil an Vernetzermolekülen hängt stark von der Natur der verwendeten Monomeren und Crosslinkern ab. Die am weitesten verbreitete Form der Polymere sind kugelförmige Partikel, sog. Beads, mit einem Durchmesser zwischen 0.04 und 0.15 mm.

### 2.3.1.1 Polystyrol

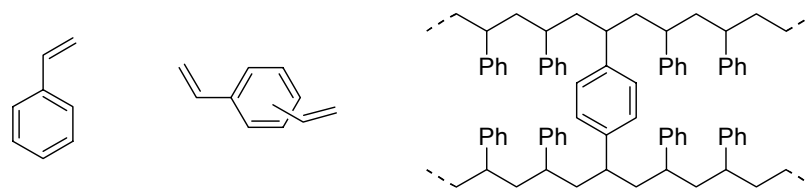
Wenn man zu den Anfängen der Festphasenchemie zu Beginn der sechziger Jahre des letzten Jahrhunderts zurückgeht, stößt man automatisch auf die Pionierarbeiten von Bruce Merrifield und Robert Letsinger. Beide arbeiteten unabhängig voneinander an der Verwendung von Polymeren für die organische Synthese. Der eigentliche Vater der Festphasenchemie ist Bruce Merrifield, der im Jahre 1963 die erste Synthese eines Tetrapeptids an einem polymeren Träger aus vernetztem Polystyrol veröffentlichte und der für seine herausragenden und richtungsweisenden Entwicklungen 1984 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde.

Die Idee, Polymere für die organische Synthese zu verwenden, kam Merrifield im Jahre 1959. War die Verwendung von Ionenaustauscherharzen schon seit Mitte der dreißiger Jahre bekannt, verfolgte er ein neues Konzept: Das Polymer sollte als Ankermaterial für Aminosäuren dienen, die in weiteren Reaktionsschritten zu einer Peptidsequenz am Polymer aufgebaut und anschließend wieder abgespalten werden sollte. Die ersten Experimente befassten sich mit der Verwendung von Cellulose als Träger zur Synthese eines Dipeptids, was ihm schließlich auch gelang, allerdings in schlechten Ausbeuten und nur unter drastischen Reaktionsbedingungen. Auch die Verwendung von Polyvinylalkohol brachte keine Verbesserung. Anfang 1960 benutzte er für seine Versuche einen käuflichen Ionenaustauscher, der zu 94 % aus Methylmethacrylat und zu 6 % aus Divinylbenzol (DVB) bestand. Hier machte er bereits die Entdeckung, dass nur wenige der funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der Harzbeads lokalisiert sind. Daraus folgerte er, dass nur die Trägermaterialien geeignet sein werden, die porös genug sind, um den Aminosäurederivaten Zugang zu den funktionellen Gruppen im Inneren der Polymerpartikel zu verschaffen. Mit Hilfe dieses Trägers auf Polyacrylamidbasis gelang ihm die erste erfolgreiche Synthese eines Dipeptids. Leider waren alle Anstrengungen, die Peptidkette an diesem Polymer zu verlängern, zum Scheitern verurteilt. Auf der Suche nach einem neuen geeigneten Träger, verwendete er käufliche, makroporöse Copolymere aus Styrol und DVB. Die Synthese eines Tripeptids gelang, nur waren die Ausbeuten inakzeptabel. Merrifield stellte fest, dass die Verwendung von hochgradig vernetzten Polymeren für seine Zwecke nicht zum Ziel führte. Der Durchbruch kam durch die Herstellung und Entwicklung von Chlormethylcopoly(styrol-DVB), anfangs noch mit 16 bzw. 4 % DVB-Anteil, später mit nur 2 % DVB als Crosslinkeranteil. Dieses chlormethylierte Harz ist heute noch unter dem Namen „Merrifieldresin“ bekannt. Die

Reduzierung des Crosslinkeranteils brachte eine Verbesserung der Quelleigenschaften und dadurch eine wesentliche Erhöhung der Ausbeuten. Gleichzeitig reichten 2 % DVB aus, um ein mechanisch stabiles Harz zu erhalten. Mit Hilfe dieses Polymers gelang die erste erfolgreiche Synthese des Tetrapeptids Leu-Ala-Gly-Val an fester Phase, die Geburtsstunde der Festphasenchemie.

Nahezu gleichzeitig arbeitete Robert Letsinger ebenfalls an der Entwicklung einer Peptidsynthese mit Hilfe von funktionalisierten Polymeren. Als Trägermaterial verwendete er ein carboxyliertes Popcornpolymer aus 99.5 % Styrol und 0.5 % DVB,<sup>[25]</sup> welches er mit verschiedenen funktionellen Gruppen derivatisierte. Das hydroxymethylierte Polymer wurde für die erfolgreiche Synthese des Dipeptides Leu-Gly verwendet, die Spaltung des Benzylesters erfolgte mit Bromwasserstoff. Diese Synthese wurde nur kurz nach Merrifields Pionierartikel publiziert.<sup>[26]</sup> Letsinger hatte den Wettlauf nur um wenige Monate verloren, er realisierte aber, dass Merrifield auf diesem neuen Gebiet zu dieser Zeit weiter war als er. Deshalb fokussierte er seine Anstrengungen auf die Entwicklung der festphasengebundenen Oligonucleotidsynthese, als dessen Vater er heute gilt.<sup>[27]</sup>

Heute ist das mit 1 % DVB vernetzte Polystyrolharz das Trägermaterial, welches am weitesten verbreitet ist und mit einer Vielzahl von verschiedenen funktionellen Gruppen und Linkern käuflich erhältlich ist. Es wird durch radikalische Suspensionspolymerisation von Styrol und DVB hergestellt. Durch geeignete Wahl der Polymerisationsbedingungen kann die Größe der Beads gesteuert werden.<sup>[28]</sup> Das Quellverhalten von Polystyrol ist in dipolar aprotischen Lösungsmitteln sehr gut, aber schlecht in Alkanen, acyclischen Ethern, protischen Lösungsmitteln und in Wasser. Mit zunehmendem Anteil an Crosslinker nimmt das Quellvermögen ab. Das Polystyrol zeigt gegenüber starken Basen und Säuren keine Veränderungen, aber starke Oxidationsmittel bei hohen Temperaturen und starke Lewissäuren greifen das Polystyrol an.<sup>[4, 29]</sup> Die Einführung funktioneller Gruppen kann entweder nach der Polymerisation erfolgen oder durch Verwendung geeigneter Monomerbaustein, wie z. B. 4-Chlormethylstyrol während der Polymerisation. Die Beladung der Trägermaterialien liegt zwischen 0.5 und 1.5 mmol/g, letzteres entspricht einer Derivatisierung von 20 % der vorhandenen Phenylringe. Höher beladene Polystyrole können zwar auch hergestellt werden, allerdings haben sie bisher keine breite Anwendung gefunden.



**Abb. 2-7: Ausschnitt aus mit DVB vernetztem Polystyrol.**

### 2.3.1.2 Polyacrylamidharze

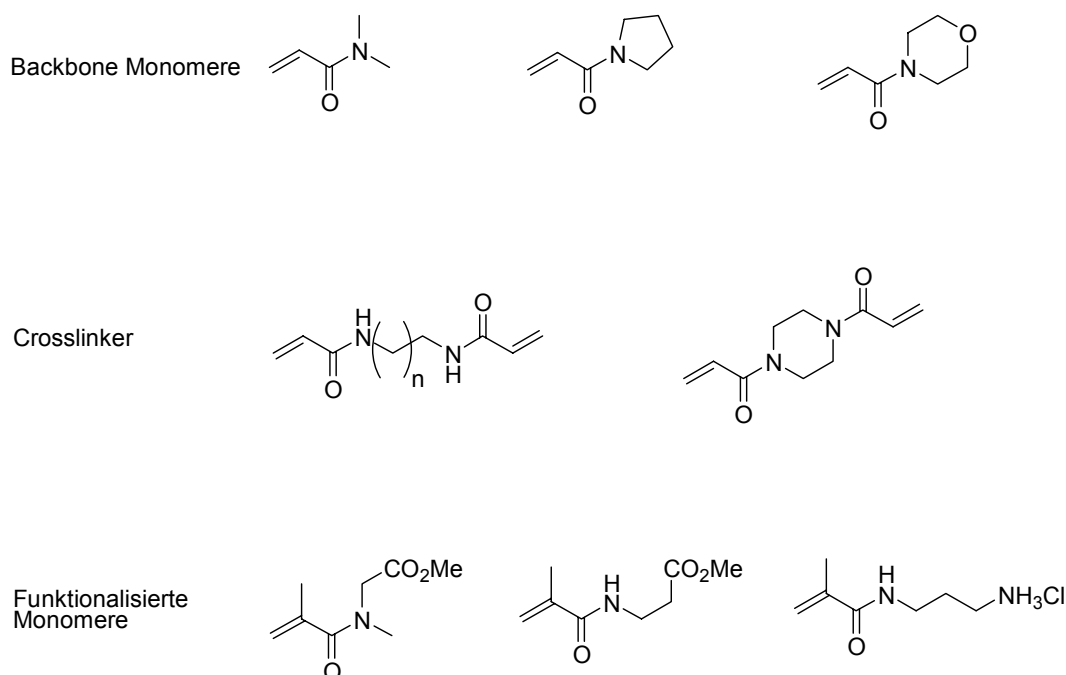
Anfang der siebziger Jahre befasste sich Bob Sheppard mit dem Problem, dass Polystyrol nur in apolaren Lösungsmitteln gut quillt, diese aber nicht immer für die Peptidsynthese geeignet sind. Inspiriert durch Dimethylformamid als das meist eingesetzte Lösungsmittel in der Peptidsynthese, verwendete er Polyacrylamid als Träger, ein Material, das aus der Molekularbiologie bekannt war. Die Weiterentwicklung, ein Copolymer aus Polydimethylacrylamid und Ethylenbisacrylamid wurde unter dem Namen „Pepsyn“ bekannt, welches ein sehr guter Träger für die Festphasenpeptidsynthese aufgrund seiner hervorragenden Quelleigenschaften in DMF ist.<sup>[30-32]</sup>

Jim Sparrow verbesserte 1991 die Polyacrylamidharze von Sheppard, indem er mit *N,N'*-bisacrylyl-1,3-diaminopropan einen flexibleren Crosslinker verwendete und den Emulsionspolymerisationsprozess verfeinerte.<sup>[33]</sup> Auch dieser Träger wurde erfolgreich in der Peptidsynthese eingesetzt und ist unter dem Namen SPAR 50 im Handel erhältlich.

Eine weitere Variante der Polyacrylamidharze sind die 1996 von George Barrany entwickelten CLEAR-Harze (Cross-Linked Ethoxylate Acrylate Resin; CLEAR), die durch radikalische Copolymerisation von diversen PEG-modifizierten Acrylbausteinen gewonnen werden.<sup>[34]</sup> Diese hochvernetzten polymeren Trägermaterialien haben gute Quelleigenschaften in einem breiten Spektrum an Lösungsmitteln und sind unter Standardbedingungen der Peptidsynthese stabil. Allerdings sind sie instabil gegenüber starken Basen.

Reza Arshady beschäftigte sich Anfang der achtziger Jahre mit der Copolymerisation von Styrol und Acrylamid, um ein amphiphiles Trägermaterial herzustellen. Durch Verwendung von aktivierten Acrylaten, Styrol und DVB gelang ihm die Herstellung von alternierenden Copolymeren welche durch anschließende Aminolyse in ein Trägermaterial überführt wurde. Dieses Polymer zeichnete sich durch seine generelle Lösungsmittel- und Substrattoleranz aus. Durch Verwendung flexiblerer Crosslinker als DVB, wie z. B.

*N,N'*-dimethyl-1,6-hexandiacylamid, und durch Variation der Menge an Crosslinker, schuf Arshady ein System, das es ihm erlaubte, amphiphile Polymere mit entweder gelförmiger oder poröser Morphologie zu erhalten.<sup>[35-37]</sup>



**Abb. 2-8: Typische Bausteine für den Aufbau von Polyacrylamidharzen.**

### 2.3.1.3 PEG-PS-Copolymere

Zu Beginn der achtziger Jahre arbeiteten Wolfgang Rapp und Ernst Bayer an der Modifizierung von vernetztem Polystyrol mit Polyethylenglycol (PEG). Durch die Einführung von PEG-Ketten auf die Polystyrolmatrix sollte die Toleranz bezüglich polarer Lösungsmittel wesentlich verbessert werden. Ende des Jahres 1981 wurde das erste Propfcopolymer aus Polystyrol und PEG erfolgreich hergestellt. Es bestand aus einer mit 1 % DVB vernetzten Polystyrolmatrix, auf die durch anionische Propfcopolymerisation mit Ethylenoxid PEG-Ketten über eine Benzyletherbindung angebracht waren. Das Harz zeigte gutes Quellverhalten in nahezu allen gängigen Lösungsmitteln, exzellente Reaktionskinetiken in der Peptidsynthese und eine hohe mechanische Stabilität. Ab 1989 wurde es unter dem Namen TentaGel vertrieben.<sup>[38]</sup> Allerdings war das Polymer aufgrund der Benzyl-Ether-Bindung instabil gegenüber stark sauren Bedingungen. Deshalb wurde 1992 ein neues TentaGel entwickelt, bei welchem die Säureanfälligkeit dadurch verbessert wurde, dass die PEG-Ketten über eine Ethylfunktion an die Matrix gebunden waren. TentaGele haben eine Beladung von 0.2 – 0.5 mmol/g und werden in nahezu allen

Bereichen der Festphasenchemie eingesetzt.<sup>[39]</sup> Auch können aufgrund der hohen Beweglichkeit innerhalb des Polymers lösungsähnliche NMR-Spektren von an TentaGelen immobilisierten Substraten erhalten werden.<sup>[40]</sup>

1996 wurde eine weitere Variante von PEG modifiziertem Polystyrol von Godding publiziert. Die Einführung einer Verzweigung durch ein 1,3-Diolfunktionalisiertes Polystyrol ermöglichte das Aufpolymerisieren von bifunktionellen PEG-Ketten mit Hilfe von Ethylenoxid, was nahezu eine Verdopplung der Beladung gegenüber dem TentaGel bedeutete. Gleichzeitig wurde die Stabilität gegenüber Säuren durch die Alkyletherbindung erhöht. Diese Harze sind heute unter dem Namen ArgoGel bekannt.<sup>[41]</sup>

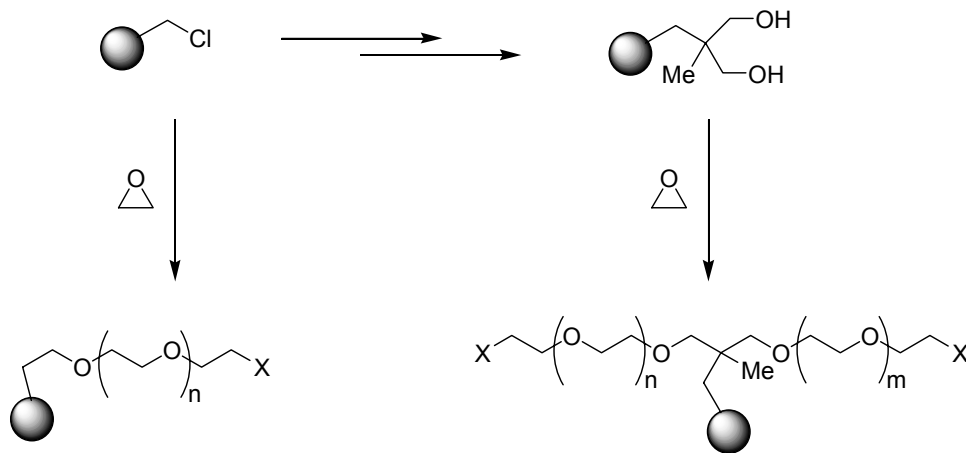


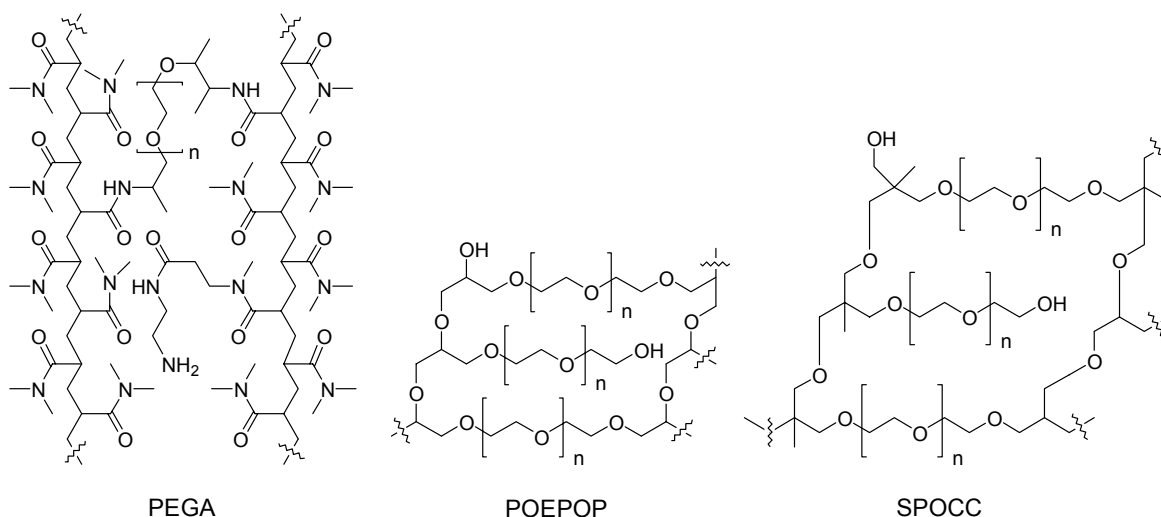
Abb. 2-9: Darstellung und Struktur von TentaGel (links) und ArgoGel (rechts).

#### 2.3.1.4 Polyacrylamid-PEG Copolymere

Morten Meldal befasste sich Anfang der neunziger Jahre ebenfalls mit der Verwendung von PEG zur Herstellung neuer Trägermaterialien. Er erkannte, dass das hohe Solvatationspotential von PEG in vielen Lösungsmitteln auf die amphiphile Natur der PEG-Ketten zurückzuführen ist. Die von ihm entwickelten polymeren Träger bestehen aus PEG, das mit modifizierten PEG-Ketten vernetzt ist, was auch eine Neuerung war, im Vergleich zu den bisher verwendeten kurzen Crosslinkern für Polystyrolharze. Durch Variation der Länge und Verteilung der PEG-Ketten und durch Zugabe von Copolymeren, die die Einführung funktioneller Gruppen während der Polymerisation erlaubten, konnten die Eigenschaften der Trägermaterialien reguliert werden. Dies wurde durch die Reaktion von linearem bis- und verzweigtem tris-2-aminopropyl-PEG mit Acryloylchlorid in einer von Arshady entwickelten radikalischen inversen Polymerisation erreicht. Die Harze, die

unter dem Namen PEGA bekannt wurden, waren mechanisch weniger stabil als PS und zeigten ausgezeichnete Quelleigenschaften in allen Lösungsmitteln. Sie wurden vor allem in der Peptidsynthese und für on-bead Reaktionen von Enzymen eingesetzt, was mit den bisherigen Trägermaterialien nicht möglich war.<sup>[42, 43]</sup> Für den Einsatz in der organischen Festphasensynthese waren die PEGA-Harze nur bedingt geeignet. Dies lag vor allem an der hohen Zahl sekundärer Amidbindungen im Polymerbackbone, die bei Reaktionen mit Carbeniumionen und starken Basen wechselwirken. Die chemische Stabilität wurde dadurch erhöht, dass nur noch Etherbindungen im Polymer vorhanden waren. Dieses Polymer, was als POEPOP auf den Markt kam, wurde durch anionische Polymerisation von PEG, welches teilweise mit Chlormethyloxiran derivatisiert war, erhalten und zeigte die gleichen guten Quell- und Reaktionseigenschaften wie das PEGA-Harz.<sup>[44, 45]</sup> Allerdings war die chemische Stabilität gegenüber stark sauren Bedingungen durch die Anwesenheit sekundärer Etherbindungen sehr schlecht.

Eine weitere Verbesserung brachte die Synthese des SPOCC-Harzes, welches dem POEPOP sehr ähnlich ist, aber keine sekundären Etherbindungen mehr enthält. Dies wurde durch die Polymerisation von PEG-Oxetan Makromonomeren mit  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  als Katalysator erreicht. Die Trägermaterialien zeigten sehr gute Quelleigenschaften und eine hohe mechanische und chemische Stabilität.<sup>[46, 47]</sup>



**Abb. 2-10: Struktur von PEGA-, POEOP- und SPOCC-Harzen.**

Eine spezielle Weiterentwicklung des SPOCC-Harzes für den Einsatz in enzymatischen Essays ist das EXPO<sub>3000</sub>.<sup>[48]</sup> Bei diesem Träger wird ein hochfunktionalisierter Silylcrosslinker bei der Polymerisation eingebaut, welcher durch Zugabe von Säure oder

Fluoridionen anschließend wieder entfernt werden kann. Dadurch verbessert sich das Quellverhalten des Harzes enorm und die Aufnahme von Proteasen wird ermöglicht.

### **2.3.1.5 Modifizierte Polystyrolharze**

Viele Arbeiten der letzten Jahre auf dem Gebiet der Entwicklung polymerer Trägermaterialien befassen sich mit der Verbesserung bereits bestehender Harze und deren Feinabstimmung auf bestimmte Syntheseansprüche. Oft geht es um die Erweiterung der Lösungsmitteltransparenz der polymeren Träger, um auch Reaktionen in polaren Lösungsmitteln wie Wasser und Alkohole besser durchführen zu können. Dabei werden Polystyrolharze modifiziert, indem flexiblere Crosslinker, meist auf PEG-Basis, für die Polymerisation mit Styrol verwendet werden.<sup>[49]</sup>

Kim Janda entwickelte 1999 das JandaJel, welches aus einem mit Polytetrahydrofuran vernetzten Polystyrol besteht.<sup>[50, 51]</sup> Diese Harze weisen einheitlichere und bessere Quelleigenschaften in polaren wie unpolaren Lösungsmitteln auf, verglichen mit normalen Polystyrolharzen und Tentagelen.

Weitere Beispiele für modifizierte Polystyrolharze sind die Poly(oxyethylen glykol) Polymere (POP) von Sutherland,<sup>[52]</sup> die Polystyrol-Methoxypoly(ethylen glykol) Polymere von Bradley,<sup>[53]</sup> sowie Arbeiten von Kumar, der zur Vernetzung von Styrol Tri(propylenglykol) glycerolat diacrylat verwendete. Bei diesem Harz werden die funktionellen Gruppen über die Hydroxygruppen des Crosslinkers eingeführt.<sup>[54]</sup>

### **2.3.1.6 Hochbeladene Trägermaterialien**

Ein weiterer Schwerpunkt bei der Synthese neuer Trägermaterialien in den letzten Jahren ist die Erhöhung der Beladung der Polymere. Herkömmliche Polystyrolharze haben Beladungen zwischen 0.5 – 1.5 mmol/g, die PEG-basierten Träger liegen sogar noch deutlich darunter (0.2 – 0.5 mmol/g). Dies schränkt den Einsatz polymerer Träger in vielen Bereichen der Chemie stark ein.

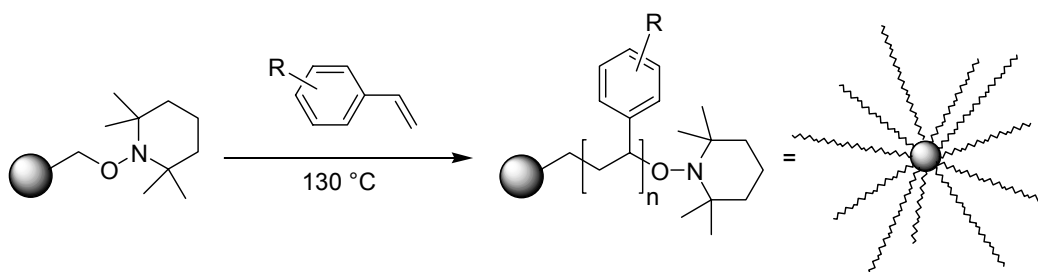
Roger Epton nutzte als erster bereits Mitte der achtziger Jahre sog. ultra-hochbeladene polymere Trägermaterialien in der Festphasenpeptidsynthese. Durch Verwendung von Poly[N[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]acrylamid] konnte quasi an jedem Monomerbaustein eine Peptidkette aufgebaut werden.<sup>[55]</sup> Die Ergebnisse waren sehr zufriedenstellend.



Allerdings geriet die Idee, hochbeladene Trägermaterialien in der Festphasenpeptidsynthese zu verwenden, wieder in Vergessenheit, da allgemein die Meinung vorherrschte, dass bei sehr hoch beladenen Harzen die Interaktion der einzelnen Peptidketten untereinander zu groß wird.

Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Beladung von Polystyrolharzen besteht in der Entwicklung von effizienteren Funktionalisierungsreaktionen. Durch Friedel-Crafts-Alkylierung von 1 % DVB-Polystyrol mit *N*-(Chlormethyl)phthalimid unter Verwendung von Eisen(III)chlorid als Katalysator und anschließender Hydrazinolyse konnte ein hochbeladenes Aminomethylpolystyrolharz erhalten werden (7.3 mmol/g), bei dem 96 % der zur Verfügung stehender Benzolringe funktionalisiert sind.<sup>[56]</sup> Allerdings besteht bei hochbeladenen Polystyrolträgern generell das Problem, dass die Quelleigenschaften mit zunehmender Beladung stark abnehmen, was die Zugänglichkeit zu den reaktiven Gruppen deutlich herabsetzt und somit Ausbeute und Effizienz der Festphasensynthese minimiert.

John Hodges schlug im Jahr 2000 einen neuen Weg vor, um höher beladene, gelförmige Polystyrole zu erhalten. Durch Reaktion von TEMPO-Polystyrolharz mit funktionalisierten Styrolderivaten wird bei 130 °C eine sog. „Living Free Radical Polymerization“ ausgelöst, bei der die Styrolderivate zwischen dem Polystyrol und dem TEMPO-Molekül in langen Ketten eingebaut werden.<sup>[57]</sup> Dadurch kommt es zu einem enormen Massenzuwachs (bis zum 6.7 fachen) und einer Vergrößerung des Durchmessers der einzelnen Beads (bis zum 2.8 fachen). Da jedes aufpolymerisierte Styrolmolekül eine funktionelle Gruppe enthält, nimmt die Beladung stark zu. Diese Harze werden aufgrund ihrer langen Ketten um den Polymerkern „Rastaresins“ genannt. Durch den Einsatz der mikrowellenunterstützten Synthese konnte die Herstellung der Rastaresins noch verbessert werden.<sup>[58]</sup> Sie weisen Beladungen von 4.0 bis 5.8 mmol/g auf und werden vor allem als Scavenger benutzt.



**Abb. 2-11: Synthese der „Rastaresins“.**

Eine weitere Möglichkeit, die Beladung von Harzen zu erhöhen, besteht im Aufbau von Dendrimerstrukturen an herkömmlichen Trägern. Bradley publizierte 1997 die Darstellung

von Polyamidoamin (PAMAM) Dendrimeren und deren Immobilisierung auf TentaGel.<sup>[59]</sup> Die vierte Generation dieser PAMAM-Harze hatte bereits eine Beladung von 2.8 mmol/g. Andere Beispiele unter der Verwendung von dreifach verzweigten Isocyanaten zum Aufbau von Dendrimeren sowohl an Polystyrol als auch an TentaGel folgten, wobei die dritte Generation dieser Dendrimerharze eine 10 fache Erhöhung der Beladung zeigte.<sup>[60, 61]</sup> Das Quellverhalten der Träger ist stark abhängig sowohl vom Ausgangspolymer als auch von der Generation der immobilisierten Dendrimere. Sie werden in Gebieten des Single Bead Screenings eingesetzt.

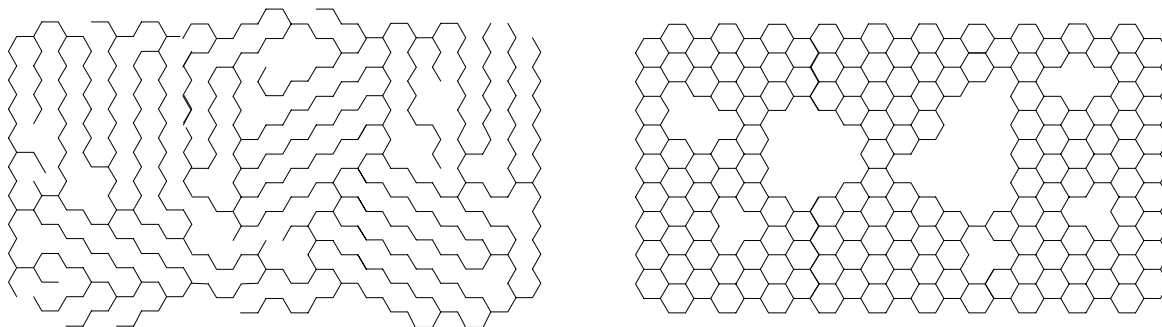
Durch Verwendung von niedermolekularen, funktionalisierten Monomeren können ebenfalls hochbeladene Harze erhalten werden. Auf diesen Sachverhalt wird an späterer Stelle noch ausführlich eingegangen. Beispiele aus der Literatur sind Materialien auf der Basis von 1,4-Butandiol vinyl ether (bis zu 8.5 mmol/g)<sup>[62]</sup> und Poly(methylenamin).<sup>[63]</sup>

Eine weitere Variante der Verwendung von niedermolekularen, funktionalisierten Monomeren bei der Herstellung polymerer Träger sind die sog. ROMPgels. Diese Polymere werden durch eine Ringöffnungs-Metathese Polymerisation (ring-opening metathesis polymerization; ROM polymerization) von substituierten Norbornenen unter Verwendung von Grubb's Rutheniumkatalysator erhalten. Hier wird die funktionelle Gruppe bereits vor der Polymerisation eingeführt. Da jedes Monomer eine funktionelle Gruppe trägt, sind die Beladungen der ROMPgels sehr hoch. Sie werden vor allem als Scavenger und polymere Reagenzien eingesetzt. Einen Überblick über Herstellung und Verwendung von ROMPgels bietet ein Review von Tony Barrett.<sup>[64]</sup>

### **2.3.2 Makroporöse Polymere**

Eine andere Klasse polymerer Träger besteht aus makroskopischen Poren, die in einer extrem starren Struktur eingebettet sind, welche keinerlei Quellen der Matrix zulässt. Die makroporösen Polymere haben eine extrem große innere Oberfläche, an der chemische Umsetzungen erfolgen können. Durch ihre große mechanische Stabilität werden sie vor allem bei Durchflussreaktionen, in der Chromatographie und als Ionenaustauscher eingesetzt. Da bei diesen Trägern der Einfluss des Lösungsmittels auf Quellverhalten und Diffusionsgeschwindigkeit irrelevant ist, sollte die Übertragung einer Reaktion in Lösung

an die feste Phase einfacher sein. Verunreinigungen und Nebenprodukte können leichter entfernt werden als bei gelförmigen Harzen.



**Abb. 2-12: Schematische Darstellung des Aufbaus gelförmiger (links) und makroporöser Polymere (rechts).**

### 2.3.2.1 Makroporöses Styrol-DVB-Copolymer

Durch Polymerisation einer Suspension von Styrol und DVB gewinnt man gelförmige Polystyrole. Im Unterschied dazu werden makroporöse Polystyrolpartikel mit einer hohen inneren Oberfläche erhalten, wenn man eine Lösung von Styrol und DVB unter Zugabe von Porenbildnern, sog. Porogene, polymerisiert. Als Lösungsmittel dient z. B. Toluol oder Xylol. Während der Polymerisation werden die Porenbildner, meist lineares Polystyrol oder höhere Alkohole, in das vernetzte Polymer eingebaut und erzeugen so große Poren. Die Porogens werden nach der Polymerisation durch Waschen oder Evaporieren wieder entfernt.<sup>[65]</sup> Makroporöses Polystyrol hat einen DVB-Anteil von mind. 10 %. Es wird vor allem als Ionenaustauscherharz nach Sulfonylierung oder Aminomethylierung oder in der Chromatographie verwendet. In letzter Zeit finden diese Polymere auch immer mehr Anwendung im Bereich der Festphasensynthese.<sup>[66]</sup> Aufgrund ihrer makroporösen Struktur gibt es keine Einschränkung bei der Wahl des Lösungsmittels. Die Kapazität dieser Träger liegt zwischen 0.8 und 1.0 mmol/g.

### 2.3.2.2 Silica (Kieselgel)

Verschiedene Formen von Siliziumdioxid wurden als Träger für Festphasensynthesen verwendet. Silica ist ein starres, unlösliches Material, das in organischen Lösungsmitteln nicht quellfähig ist. Kommerziell erhältliche Silicagele unterscheiden sich in Partikelgröße, Porengröße und innerer Oberfläche. Träger mit großen Porengrößen (25 – 300 nm) werden

als „Controlled Pore Glass“ (CPG) bezeichnet und finden vor allem in der Oligonukleotidsynthese Anwendung.<sup>[67]</sup> Sie haben gegenüber normalen Kieselgelen durch ihre regelmäßige Porengrößenverteilung und ihre höhere mechanische Stabilität Vorteile. Obwohl durch den Sol-Gel-Prozeß viele organisch modifizierte Silicagele hergestellt und auch teilweise in der Festphasensynthese eingesetzt wurden,<sup>[68]</sup> sind sie nie zu einem etablierten Trägermaterial geworden.

### **2.3.2.3 Verbundmaterialien aus makroporösen und gelförmigen Trägern**

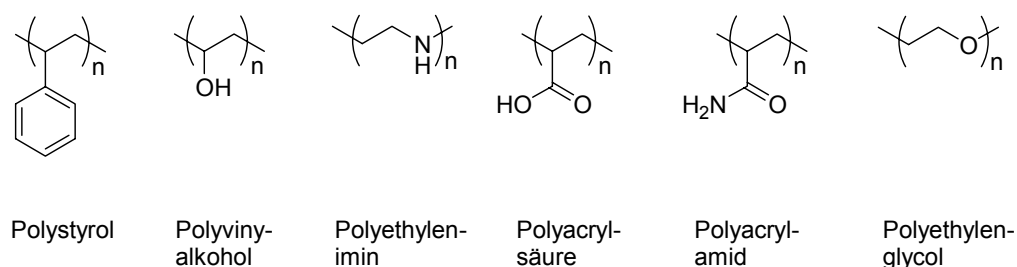
Hier werden die Vorteile der beiden Trägerklassen kombiniert. Die Verwendung einer makroporösen, starren Matrix als Grundgerüst liefert die mechanische Stabilität. Durch Einpolymerisieren eines gelförmigen Trägermaterials in die Porenstruktur des makroporösen Trägers wird ein Compositmaterial erhalten, was vor allem in Durchflusssynthesen eingesetzt wird. Das erste Polymere dieser Art ist das „PepsynK“ von Sheppard aus dem Jahr 1981.<sup>[69]</sup> Hier wird in die Poren von Kieselguhr ein Polyacrylamidharz einpolymerisiert. Die physikalische Stabilität des Polymers ist jedoch sehr unbeständig und die Beladungen mit funktionellen Gruppen niedrig (0.1 – 0.2 mmol/g).

Der Einsatz von makroporösem Polystyrol als Grundmatrix, in die ein auf Polyacrylamid basierender gelförmiger Träger eingebaut wird, liefert einen mechanisch stabileren Träger mit einer Beladung bis zu 1 mmol/g. Hier wird die Polyacrylamidphase mit dem makroporösen Polystyrol chemisch verbunden. Dieses Trägermaterial von Sherrington findet Verwendung in der Durchflussspeptidsynthese.<sup>[70]</sup>

### **2.3.3 Lösliche Polymere**

Die optimale Kombination aus der Flüssig- und Festphasenchemie sollte die Synthese an löslichen Polymeren darstellen. Für den Einsatz in der polymerunterstützten Synthese müssen sie eine geringe Polydispersität aufweisen, da die Eigenschaften von Polymeren mit stark unterschiedlichen Kettenlängen differieren. Das Molekulargewicht sollte nicht zu niedrig gewählt werden, so dass die Polymere bei Raumtemperatur fest oder kristallin sind, aber auch nicht zu hoch, damit die Löslichkeit in diversen Lösungsmitteln nicht darunter leidet. Prinzipiell sollten Reaktionen an löslichen Polymeren unter den gleichen oder sehr

ähnlichen kinetischen Bedingungen ablaufen, als die entsprechende Synthese in Lösung. Es besteht kein Diffusionsproblem mit der Zugänglichkeit zu den reaktiven Zentren und die Verwendung von hohen Überschüssen an Reagenzien ist ebenfalls möglich. Zur Analytik von löslichen Polymeren stehen alle gängigen Lösungsmethoden zur Verfügung. Die Reaktionsverfolgung mit Hilfe von NMR, UV und sogar Dünnschichtchromatographie ist durchaus möglich. Ein Nachteil von löslichen Polymeren ist, dass sie generell nur in Lösungsmitteln eingesetzt werden können, in denen sie gut löslich sind, da ansonsten alle Vorteile verloren gehen. Die Abtrennung des Polymers erfolgt meist über Fällung (klassisch) und Mikro- oder Ultrazentrifugationsmethoden, die relativ teuer sind und in Syntheselabors oft routinemäßig nicht eingesetzt werden können. Die Ausfällung mit einem das Polymer nicht lösenden Lösungsmittel kann problematisch sein, wenn es nach der Fällung als klebrige Masse anfällt, die nicht filtrierbar ist. Auch die Tatsache, dass Polymerknäuel in Lösung nur bei einer Konzentration unter 1 – 2 % isoliert voneinander zu betrachten sind, muss bedacht werden. Bei höherer Konzentration kann es zu Interaktionen der einzelnen Polymerketten untereinander kommen. Wenn die Konzentration auf mehr als 5 % ansteigt, liegen viele Polymerlösungen als viskose Flüssigkeit vor. Dennoch haben lösliche Polymere Anwendung in nahezu jedem Feld der klassischen Festphasenchemie gefunden. Sowohl in der Peptid- und Oligonukleotidsynthese, in der Oligosaccharidsynthese, in der kombinatorischen Synthese von Substanzbibliotheken kleiner organischer Moleküle als auch als hochbeladene polymere Reagenzien und als Katalysatoren gibt es Beispiele für den Einsatz löslicher Polymere. Eine Auswahl der verwendeten löslichen Polymere ist in Abb. 2-13 aufgeführt. Einen Übersichtsartikel über organische Synthese an löslichen polymeren Trägern hat Kim Janda geschrieben.<sup>[71]</sup>



**Abb. 2-13: Beispiele für lösliche Polymere.**

Als Zwischenstufe zwischen gelförmigen und löslichen Polymeren sind die „Microgele“ anzusehen.<sup>[72]</sup> Sie bestehen aus vernetzten Polystyrolen, die die Eigenschaft haben, sich in einem geeigneten Lösungsmittel komplett zu lösen. Erreicht wird dies durch die Verwendung niedriger Monomerkonzentrationen bei der Polymerisation und durch

geeignete Wahl der Polymerisationsdauer. Die Abtrennung des Polymers erfolgt durch Ausfällen mit Methanol. Microgels weisen Beladungen von 0.4 bis 1.2 mmol/g auf und können als polymere Reagenzien, Scavenger und zur Synthese von Substanzbibliotheken verwendet werden.<sup>[73]</sup>

## 2.4 Linker

Linkermoleküle stellen das Bindeglied zwischen Polymer und zu dem immobilisierenden Substrat dar. Sie sollten die Anbindung des ersten Substrats an das Polymer erleichtern, stabil gegenüber einer breiten Vielfalt an Reaktionsbedingungen sein und die selektive Abspaltung am Ende der Synthese ermöglichen, ohne dass das Produkt dabei Schaden nimmt. Viele Harze tragen zwischen Polymer und Linker noch ein Spacermolekül, das durch die daraus resultierende höhere Beweglichkeit der funktionellen Gruppen die Diffusion der Reaktanden erleichtern soll. Allerdings ist dieser Effekt bei der Darstellung kleiner Moleküle nur von untergeordneter Bedeutung. Er kann eine wichtige Rolle bei der Synthese von schwierigen Peptidsequenzen spielen und verbessert die Qualität der NMR-Spektren von polymergebundenen Substraten. Die Linkermoleküle müssen chemisch fest am Polymer verankert sein, damit sowohl während der Synthese als auch bei der Abspaltung keine Linkerspaltung auftritt. Viele Linker tragen aus diesem Grund eine Carboxylgruppe, über die sie meist unter Ausbildung einer Amidbindung an das Polymer gebunden sind. Es empfiehlt sich generell, die Harze vor dem Abspaltungsschritt gründlich zu waschen und zu trocknen, da einige Lösungsmittel und Reagenzien die Tendenz haben, am Polymer zu adsorbieren, was zu einer Verunreinigung der Produkte oder auch zur Verhinderung der Abspaltungsreaktion führen kann. Viele säurelabile Linker und Schutzgruppen, die in der Festphasensynthese eingesetzt werden, führen während der sauren Abspaltung zur Bildung von Carbokationen. Dadurch können elektronenreiche Substrate, wie z. B. Pyrrole, Indole, Thiole oder Phenole, irreversibel alkyliert werden, was in niedrigen Ausbeuten oder Mischungen von Produkten resultiert. Dies kann durch den Zusatz von Scavengern, wie z. B. EDT oder TIS vermieden werden. Eine besondere Abspaltungsmethode ist die Verwendung von „Safety-Catch-Linkern“. Diese Linker werden in einem separaten Schritt aktiviert und erlauben dann in einem weiteren Schritt die


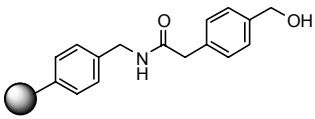
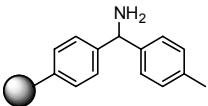
selektive Abspaltung des Produkts. Dadurch kann eine höhere Orthogonalität erreicht werden.

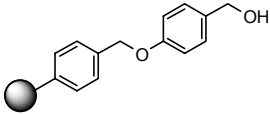
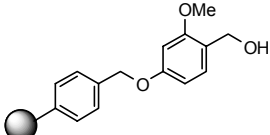
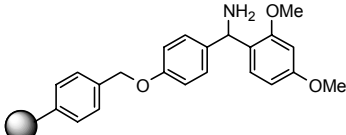
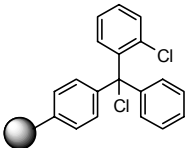
Die Linker lassen sich in verschiedene Klassen einteilen, je nach Art der Abspaltungsreaktion. Man unterscheidet zwischen elektrophiler Abspaltung, nukleophiler Abspaltung, photochemisch induzierter Abspaltung, metallinduzierter Abspaltung, Abspaltung unter reduktiven bzw. oxidativen Bedingungen und Abspaltungen, die auf Cycloadditionen bzw. -reversionen basieren. Allerdings gibt es innerhalb dieser Klassen oft Überschneidungen.<sup>[74]</sup>

### 2.4.1 Elektrophil spaltbare (säurelabile) Linker

Elektrophile Abspaltungen werden vor allem durch Protonen ausgelöst. Durch protoneninduzierte Abspaltung kann eine ganze Reihe von Substraten, wie Säuren, Alkohole, Amide, Thiole, Amine und Sulfonamide, erhalten werden. In Tab. 2-2 ist eine Auswahl an gängigen Linkern mit den entsprechenden Abspaltungsbedingungen aufgeführt.

Tab. 2-2: Elektrophil spaltbare Linker.

Linker	Eigenschaften
 Chlormethyl-Linker <sup>[75]</sup>	Immobilisierung von Carbonsäuren, Phenolen. Abspaltung mit HF, TFMSA, BF <sub>3</sub> ·Et <sub>2</sub> O.
 PAM (phenylacetamidomethyl)- Linker <sup>[76]</sup>	Immobilisierung von Carbonsäuren. Abspaltung mit 50 % TFA/DCM.
 MBHA (4-methylbenzhydrylamin)- Linker <sup>[77]</sup>	Immobilisierung von Carbonsäuren. Abspaltung mit TFMSA, HBF <sub>4</sub> /Thioanisol.

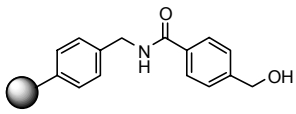
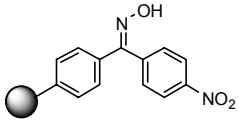
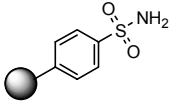
Linker	Eigenschaften
 <p data-bbox="331 427 539 465">Wang-Linker<sup>[78]</sup></p>	<p data-bbox="730 320 1337 349">Immobilisierung von Carbonsäuren, Phenolen.</p> <p data-bbox="820 389 1248 421">Abspaltung mit 20 % TFA/DCM</p>
 <p data-bbox="180 689 687 772">SASRIN-Linker (Super Acid Sensitive Resin)<sup>[79]</sup></p>	<p data-bbox="799 589 1267 618">Immobilisierung von Carbonsäuren.</p> <p data-bbox="866 658 1200 689">Abspaltung mit 1 % TFA.</p>
 <p data-bbox="304 992 564 1025">Rinkamid-Linker<sup>[80]</sup></p>	<p data-bbox="707 842 1359 871">Immobilisierung von Carbonsäuren, Sulfonsäuren.</p> <p data-bbox="756 911 1310 999">Abspaltung mit 20 – 95 % TFA/DCM zum entsprechenden Amid.</p>
 <p data-bbox="272 1256 596 1294">2-Chlor-Trityl-Linker<sup>[81]</sup></p>	<p data-bbox="740 1072 1327 1160">Immobilisierung von Carbonsäuren, Aminen, Alkoholen, Hydrazinen, Phenolen, Thiolen.</p> <p data-bbox="730 1200 1337 1285">Abspaltung mit 1 – 10 % TFA/DCM, Eisessig, Hexafluoroisopropanol.</p>

## 2.4.2 Nukleophil spaltbare Linker

Hier ist vor allem die Esterspaltung, die Aminolyse und der Gebrauch von Safety-Catch-Linkern zu nennen, welche nach Aktivierung sensitiv gegenüber Nukleophilen sind.



Tab. 2-3: Nukleophil spaltbare Linker.

Linker	Eigenschaften
 <p>HMBA (Hydroxymethylbenzoesäure)- Linker<sup>[82]</sup></p>	<p>Immobilisierung von Carbonsäuren.</p> <p>Abspaltung mit Aminen, Hydrazinen, Alkoholaten.</p>
 <p>Kaiser (Oxim)-Linker<sup>[83, 84]</sup></p>	<p>Immobilisierung von Carbonsäuren.</p> <p>Abspaltung mit Hydrazinen, Aminen, Aminosäureester.</p>
 <p>4-Sulfamylbenzoyl-Linker<sup>[85, 86]</sup></p>	<p>Immobilisierung von Carbonsäuren.</p> <p>Nach Aktivierung mit z. B. Diazomethan oder Iodacetonitril kann Abspaltung mit Aminen, Thiolen oder Hydroxiden erfolgen.</p>

### 2.4.3 Photochemisch spaltbare Linker

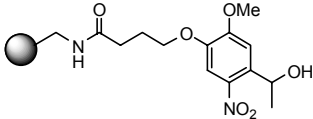
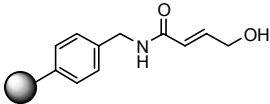
Die Photolyse bietet eine milde Abspaltungsmethode, die unter neutralen Bedingungen abläuft. Das Hauptproblem bei der Verwendung von Photolinkern ist das Erzielen hoher Ausbeuten bei der Abspaltung. Das verwendete Licht sollte außerdem nur von der Linkergruppe absorbiert werden, um eventuelle chemische Transformationen mit anderen funktionellen Gruppen im Produktmolekül zu vermeiden. Als Photolinker dienen vor allem o-Nitrobenzyllderivate (Tab. 2-4).

### 2.4.4 Metallinduzierte Abspaltungsmethoden

Zwei Reaktionstypen werden in dieser Sparte angewendet: Die Aktivierung von Olefinen durch Übergangsmetalle und die Aktivierung bzw. Polarisierung von Kohlenstoff-Heteroatomaren Bindungen durch Lewissäuren. Der große Nachteil dieser Abspaltungsmethoden ist eine resultierende Verunreinigung der Produkte mit der

eingesetzten Metallspezies, welche beim Screening von pharmazeutischen Substanzbibliotheken zu Problemen führen kann.

**Tab. 2-4: Beispiele für Photolinker und metallinduziert spaltbare Linker.**

Linker	Eigenschaften
 <p>Aminoethyl-Photolinker<sup>[87]</sup></p>	<p>Immobilisierung von Carbonsäuren.</p> <p>Abspaltung durch Bestrahlung mit UV-Licht (<math>\lambda = 365\text{nm}</math>) als Amid.</p>
 <p>HYCRAM (Hydroxycrotonylamido)-Linker<sup>[88]</sup></p>	<p>Immobilisierung von Carbonsäuren</p> <p>Abspaltung mit Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>.</p>

### 2.4.5 Abspaltungen unter reduktiven Bedingungen

Reduktionen präsentieren eine wichtige Klasse von Abspaltungsreaktionen, die zu vielen anderen Methoden orthogonal sind. Es gibt vier Typen der reduktiven Abspaltung, die an polymeren Trägern bekannt sind: Katalytische Hydrierung, die Reduktion von Disulfidbindungen (DTT,<sup>[89]</sup> TCEP<sup>[90]</sup>), die Reduktion von Sulfiden bzw. Seleniden (Tributylzinnhydrid, AIBN<sup>[91]</sup>) und der nukleophile Angriff von Hydriden (Lithiumborhydrid, DIBAH<sup>[92]</sup>).

### 2.4.6 Abspaltungen unter oxidativen Bedingungen

Die Oxidation stellt eine zu vielen existierenden Bedingungen orthogonale Strategie dar. Es werden vor allem zwei Ansätze verfolgt, die die Abspaltung vom polymeren Träger ermöglichen: Der Aufbau eines Linkermoleküls, welches oxidativ spaltbar ist (Ozonolyse von Alkenen, Oxidation von auf schwefel- und selenbasierender Linker), oder die Verwendung von besonderen Eigenschaften bereits existierender Linker. Beispiele hierfür sind die Oxidation von p-Alkoxybenzylgruppen mit DDQ,<sup>[93]</sup> die Abspaltung von

Glykosiden mit NBS,<sup>[94]</sup> oder die Herstellung von Peptidaldehyden durch Ozonolyse.<sup>[95]</sup> Oxidative Abspaltungen sind nicht kompatibel mit sensitiven Gruppen innerhalb des Zielmoleküls.

## **2.5 Parameter in der Festphasensynthese**

Die Chemie an fester Phase hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einer wichtigen Methode bei der Herstellung von Substanzbibliotheken entwickelt. Jedoch gibt es immer noch ein großes Defizit beim Verständnis der Mechanismen einer Festphasenreaktion, was oft zu unerwünschten Nebenreaktionen, einem größeren Zeitaufwand und erhöhten Kosten für Reagenzien, die in extremen Überschüssen eingesetzt werden, führen kann. Um zu verstehen, was in einem Polymer während einer Reaktion abläuft, müssen viele Parameter in Betracht gezogen werden. Die Natur des Polymers spielt dabei die entscheidende Rolle. Durch die Komplexität dieser heterogenen Reaktionen ist es schwierig, die kinetischen und mechanistischen Abläufe einer Reaktion generell vorherzusagen. Auch die Einschränkung in der Auswahl analytischer Methoden erschwert eine detaillierte Untersuchung häufig. In den folgenden Abschnitten werden die wichtigsten Parameter in SPOS vorgestellt.

### **2.5.1 Stabilität des Trägermaterials**

Um eine einwandfreie Filtrierbarkeit zu gewährleisten, muss das eingesetzte Polymer während der gesamten Synthese eine gewisse Feinkörnigkeit aufrechterhalten. Oft gibt es bei der Verwendung von Rührwerken Probleme mit der Zerschlagung von Polymerbeads, was zu ineffizienten Synthesen und schwierigen Aufarbeitungsschritten durch das Verstopfen der Fritten führen kann.

Das polymere Trägermaterial muss außerdem gegen alle in der Synthese eingesetzten Reagenzien chemisch inert sein, um keine Nebenprodukte bzw. Verunreinigungen zu erhalten. Die chemische Stabilität hängt auch stark vom verwendeten Linkersystem ab.

Die thermische Stabilität des Polymers sollte über einen relativ großen Temperaturbereich gegeben sein. Hier gibt es Einschränkungen gegenüber der Synthese in Lösung, da sich viele Träger bereits oberhalb von 120 °C teilweise zersetzen.<sup>[8]</sup> Durch den Einsatz der

mikrowellenunterstützten Synthese in SPOS-Reaktionen kann dieser Nachteil wieder ausgeglichen werden.<sup>[96]</sup> Die mikrowellenunterstützte Synthese bietet den Vorteil eines sehr effizienten und reproduzierbaren Heizens. Es besteht auch die Möglichkeit, Reaktionen unter erhöhtem Druck ablaufen zu lassen, wobei Temperaturen erreicht werden, die weit über dem Siedepunkt des Lösungsmittels liegen.

Für den Einsatz in Durchflussreaktoren muss das Harz einem höheren Druck stand halten können. Diese Eigenschaft besitzen vor allem makroporöse Trägermaterialien aufgrund ihrer starren Grundstruktur.

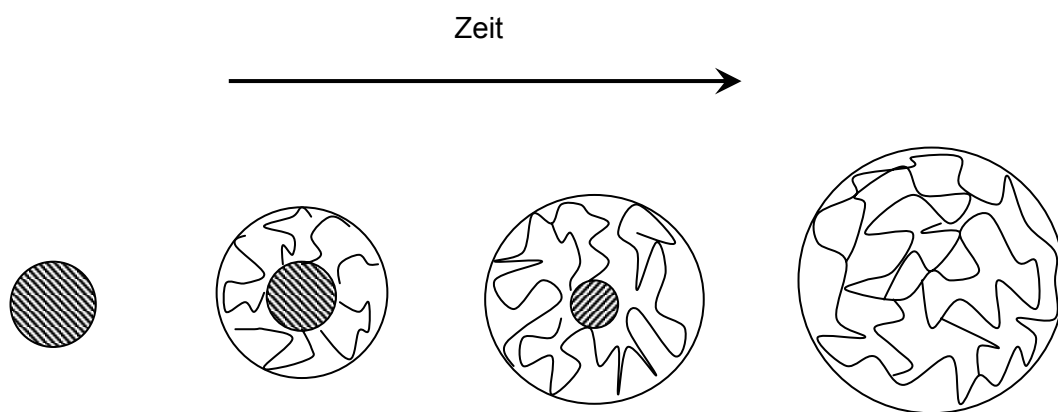
### **2.5.2 Die Kapazität polymerer Träger**

Die Kapazität oder Beladung von polymeren Trägern gibt die Stoffmenge an, die an eine bestimmte Menge Harz immobilisiert werden kann. Ihre Einheit ist i. A. mmol/g, bei Macrobeads kann auch die Beladung eines einzelnen Beads in nmol/Bead angegeben werden. Generell gilt, dass eine hohe Beladung die Ausbeute und die Wirtschaftlichkeit oder Effizienz einer Reaktion erhöht, während nieder beladene Träger den Einfluss von Nebenreaktionen und Wechselwirkungen von benachbarten Substraten am Polymer minimieren. Allerdings muss es bei der Verwendung von hochbeladenen Trägern nicht automatisch zu vermehrten Nebenreaktionen kommen.

### **2.5.3 Das Quellverhalten**

Die Fähigkeit, Lösungsmittel im Polymer aufzunehmen und dadurch das Volumen des Polymers zu vergrößern, ist die wichtigste Eigenschaft gelförmiger Trägermaterialien. Das Quellvermögen eines Polymers hängt von der Struktur und vom Vernetzungsgrad des Polymers, von der Art anwesender funktioneller Gruppen, von der Beladung und vom verwendeten Lösungsmittel ab. Das Quellen eines vernetzten, unlöslichen Polymers in einem Lösungsmittel ist vergleichbar mit dem Lösungsvorgang eines löslichen Polymers. Die treibende Kraft für das Quellen geht aus Beiträgen hervor, die aus Änderungen der Enthalpie und Entropie bestehen, welche mit der Mischung von Lösungsmittel und gelöstem Stoff assoziiert sind, zusammen mit Änderungen der Konfigurationsentropie, die auf die Lösung flexibler Ketten zurückzuführen sind.<sup>[97]</sup> Zur physikalischen Beschreibung

des Quellvorgangs dient die Flory-Rehner Theorie.<sup>[98]</sup> Der eigentliche Quellvorgang erfolgt von außen nach innen. Das bedeutet, dass zunächst die äußere Hülle des Beads aufquillt und im Inneren des Beads ein „glasartiger“ Kern zurückbleibt. Mit der Zeit nimmt die Dicke der Hülle zu, bis der innere Kern letztendlich verschwindet. Bei Verwendung eines „guten“ Lösungsmittels kann das polymere Netzwerk bis zu seinem elastischen Limit quellen, was durch die Vernetzung definiert ist. Durch Zugabe von „schlechten“ Lösungsmitteln wird der umgekehrte Vorgang zum Quellen ausgelöst, dem Kollabieren des polymeren Netzwerks. Auch hier verläuft der Vorgang des „Schrumpfens“ des Polymers von außen nach innen.<sup>[8]</sup>



**Abb. 2-14: Schematische Darstellung des Quellvorgangs eines Polymerbeads in einem „guten“ Lösungsmittel.**

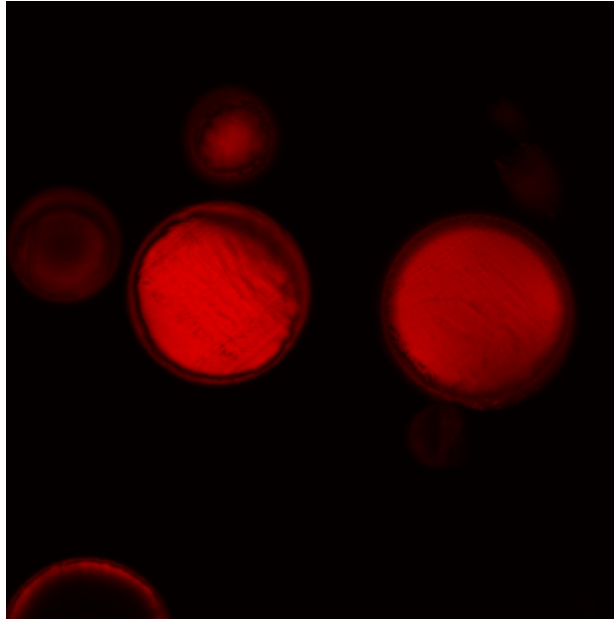
Polystyrol bildet ein dichtes Netzwerk von aromatischen Wechselwirkungen innerhalb seines kovalenten Netzwerks. Das Quellvermögen in einem Lösungsmittel ist durch die Fähigkeit des Lösungsmittels gegeben, diese intrapolymere aromatischen Wechselwirkungen zu unterbrechen. In Polyacrylamidharzen bilden die Amide untereinander Wasserstoffbrückenbindungen aus, was zur Folge hat, dass nur Lösungsmittel, die Wasserstoffbrückenbindungen durchbrechen können, diese Polymere durchdringen können. Bei der Verwendung von Copolymeren, wie z. B. TentaGel, wird durch die Anwesenheit einer hydrophoben Polystyrolmatrix und hydrophilen PEG-Ketten ein breites Spektrum an gut quellenden Lösungsmitteln erhalten. Tab. 2-5 zeigt die Quellfaktoren von Wang-Polystyrolharz und einem mit einem Rinklinker modifizierten TentaGel.<sup>[99]</sup>

**Tab. 2-5: Quellfaktoren von Polystyrol und TentaGel in verschiedenen Lösungsmitteln angegeben in ml/g Harz.**

Lösungsmittel	Wang-PS-Harz (2 % DVB)	Rinkamid-TentaGel
THF	6.0	4.0
DMF	5.2	4.4
DCM	5.4	5.6
Methanol	1.6	3.6
Wasser	1.6	3.6
Diethylether	2.8	2.0
Dioxan	5.6	4.2
Toluol	4.0	3.6
Chloroform	5.6	5.6

### 2.5.4 Verteilung funktioneller Gruppen

Wenn man sich mit kinetischen Abläufen an Polymeren befasst, ist die Frage nach der Verteilung der funktionellen Gruppen, die unmittelbar an der Reaktion teilnehmen, von großer Bedeutung. Frühe Untersuchungen haben eine homogene Verteilung postuliert.<sup>[100]</sup> Jedoch wurde dies in einer späteren Arbeit der Gruppe von Stuart Schreiber am Scripps-Institut, die zur Untersuchung der Verteilung der funktionellen Gruppen fluoreszenzmikroskopische Studien vornahm, angezweifelt. Es war eine deutlich höhere Fluoreszenz auf der Oberfläche des Beads zu sehen, verglichen mit der Fluoreszenz im Inneren. Daraus wurde auf eine inhomogene Verteilung der reaktiven Zentren geschlossen.<sup>[101]</sup> Eigene Arbeiten konnten dies wiederum widerlegen. Durch konfokale fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Mikrotomschnitten rhodamingelabelter Polystyrolbeads konnte gezeigt werden, dass eine homogene Verteilung der funktionellen Gruppen innerhalb eines Beads vorliegt (Abb. 2-15). Die fälschliche Annahme der inhomogenen Verteilung ist auf die starke Absorption des Fluoreszenzlichts durch die immobilisierten Rhodamingruppen zurückzuführen.<sup>[102]</sup>



**Abb. 2-15: Konfokale Fluoreszenzaufnahme von Mikrotomschnitten rhodamingelabelter Polystyrolbeads.**

Als wichtige Folge dieser Untersuchungen gilt die Tatsache, dass sich die Mehrheit der funktionellen Zentren im Inneren des Harzes befindet. Bei einer Oberflächentiefe von  $0.1\ \mu\text{m}$  sind 99 % der reaktiven Gruppen innerhalb eines Beads lokalisiert.<sup>[103]</sup> Aus diesem Grund sind die Zugänglichkeit zu diesen Gruppen und die Beweglichkeit innerhalb des Polymers für den Erfolg einer Reaktion von allergrößter Wichtigkeit.

### **2.5.5 Beadgröße**

Der Einfluss der Beadgröße auf die Geschwindigkeit einer Reaktion sollte laut klassischer Literatur in einem inversen Zusammenhang zwischen Kugelradius und der Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion bestehen.<sup>[104]</sup> Allerdings basiert diese Theorie auf Reaktionen, die diffusionskontrolliert ablaufen. Auch hier müssen wieder mehrere Parameter betrachtet werden: Zum Einen spielt das Quellverhalten eine wichtige Rolle, je besser das Harz quillt, desto weniger ist die Diffusion eingeschränkt. Zum Anderen muss man unterscheiden zwischen einer diffusionskontrollierten und einer geschwindigkeitskontrollierten Reaktion. Wenn die Diffusion viel schneller abläuft als die eigentliche Reaktion, so sollte nach relativ kurzer Zeit die Diffusion in das Kugelinnere abgeschlossen sein, bevor die eigentliche Reaktion stattfindet. Das bedeutet, dass es bei diffusionskontrollierten Reaktionen sehr wohl eine Abhängigkeit zwischen Beadradius und

Geschwindigkeit der Reaktion gibt.<sup>[105]</sup> Da die kommerziell erhältlichen Trägermaterialien immer aus einer relativ breiten Größenverteilung bestehen (z. B. 40 – 75  $\mu\text{m}$ , 75 – 150  $\mu\text{m}$ ), kann dies vor allem bei der Synthese von „one-bead-one-compound“-Bibliotheken einen großen Einfluss nehmen. Eine Alternative dazu ist die Verwendung von monodispersen Beads, welche jedoch sehr teuer sind.

### 2.5.6 Kinetische Betrachtungen

Die Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit einer Reaktion in Lösung und an fester Phase lassen sich nicht generell beschreiben. Auf Grund von Diffusion, geringer Beweglichkeit und Zugänglichkeit bei der polymerunterstützten Synthese, sollten Reaktionen an der festen Phase langsamer ablaufen als in Lösung. Bing Yan widmete sich ab Mitte der neunziger Jahre sehr ausführlich dem kinetischen Ablauf von Reaktionen an unterschiedlichen polymeren Trägern und verglich die Ergebnisse mit der Lösungssynthese. Dabei untersuchte er unterschiedliche Reaktionstypen auf verschiedenen polymeren Trägern, wie TentaGel und Polystyrol.<sup>[103, 106, 107]</sup> Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nicht alle Reaktionen an fester Phase langsamer ablaufen als in Lösung und dass man keine Vorhersage treffen kann, ob eine Reaktion an einem beweglicheren, polaren Träger wie TentaGel generell schneller abläuft, als an einem unbeweglicheren Polystyrolträger. Auch hier müssen wieder viele Parameter, wie Art der Reaktion, Quellverhalten des Trägers im verwendeten Lösungsmittel, die Beweglichkeit der reaktiven Zentren und der Einfluss der Struktur der eingesetzten Reagenzien auf die Polymermatrix, berücksichtigt werden.

Wechselwirkungen zwischen räumlich benachbarten funktionellen Gruppen müssen in der Festphasenchemie ebenfalls beachtet werden. In Lösung hängt das Auftreten von inter- und intramolekularen Reaktionen von der Zahl der Zusammenstöße zweier verschiedener Moleküle (intermolekular) und zweier funktioneller Gruppen im gleichen Molekül (intramolekular) ab. Die freie Beweglichkeit der Moleküle in Lösung beschränkt intermolekulare Reaktionen jedoch nicht von vornherein. Der Träger beschränkt diese Beweglichkeit jedes gebundenen Moleküls, was zu einer Begünstigung von inter- und intramolekularen Reaktionen führt. Allerdings führt die gute Solvataion der Beads zu einer lösungsähnlichen Umgebung, was wiederum eine Abnahme der Wechselwirkungen zur Folge hat. Generell ist die Konzentration funktioneller Gruppen in einem Polymerbead sehr



hoch. Bei einem mit 1 mmol/g beladenen Träger, der in einem Lösungsmittel um das dreifache seines Volumens quillt, beträgt die Konzentration der reaktiven Zentren 0.33 mmol/ml. Die Unzugänglichkeit der reaktiven Zentren tritt vor allem bei höher vernetzten Polymeren auf.<sup>[108]</sup>

## **2.6 Analytische Methoden in der Festphasenchemie**

Im Unterschied zur Lösungschemie, bei der jede Zwischenstufe isoliert und mit den gängigen Analysemethoden wie NMR-Spektroskopie, Massenspektrometrie oder chromatographische Verfahren charakterisiert werden kann, ist die Analytik bei polymergebundenen Substraten komplizierter und fordert die Entwicklung spezieller Verfahren. Eine Möglichkeit, den Fortschritt der Synthese am Polymer zu verfolgen, besteht in der Abspaltung einer kleinen Menge des jeweiligen Zwischenprodukts (off-bead-Analytik). Dies kann anschließend über HPLC, NMR und MS vollständig charakterisiert werden. Dieses Vorgehen ist jedoch sehr zeit- und eventuell kostenaufwendig, wenn nur wenig Harz für die eigentliche Synthese zur Verfügung steht. Auch kann es Schwierigkeiten mit unter den Abspaltbedingungen instabilen Zwischenstufen geben. Aus diesen Gründen ist es notwendig, eine Reihe von analytischen Verfahren zur Hand zu haben, die es erlauben, den Fortschritt einer Reaktion direkt am Polymer zu verfolgen (on-bead-Analytik).

Spezielle Methoden werden zur Charakterisierung der Polymere im Hinblick auf Beweglichkeit, Diffusionsverhalten und zur Bestimmung von Beladungen verwendet. Die folgenden Abschnitte geben einen Überblick über die in der Festphasenchemie eingesetzten analytischen Methoden.

### **2.6.1 Elementaranalyse**

Die Elementaranalyse dient zur Bestimmung von Halogen-, Schwefel- und Stickstoffgehalt eines Polymers und gibt somit Informationen über die Beladung des Trägers. Auch können mit Hilfe der Elementaranalyse durch das Verschwinden von Heteroatomen bei einer Synthese Aussagen über die Vollständigkeit der Reaktion gemacht werden.

## 2.6.2 Farbreaktionen

Farbreaktionen sind schnelle und einfache Methoden, um die Vollständigkeit einer Reaktion am Polymer zu überprüfen. Eventuell noch am Polymer vorhandene funktionelle Gruppen gehen mit den Färbereagenzien eine Reaktion ein. Der bekannteste Farbttest ist der sog. Kaiser-Test, eine Reaktion von Ninhydrin mit primären Aminen, die zu einem tiefblauen Farbstoff führt.<sup>[109]</sup> Weitere Tests sind der Chloraniltest auf sekundäre Amine<sup>[110]</sup> und diverse Tests auf Alkohole,<sup>[111]</sup> Aldehyde<sup>[112]</sup> und Carbonsäuren,<sup>[113]</sup> welche aber weniger Anwendung finden.

Bei der Immobilisierung von Indikatoren auf der Basis von Bromphenolblau am Harz kann die Vollständigkeit der Reaktion durch einen Farbwechsel des Harzes angezeigt werden. Diese „Self-Indicating Resins“ dienen zur in situ Verfolgung von Peptidsynthesen.<sup>[114]</sup>

## 2.6.3 Infrarotspektroskopie

Die IR-Spektroskopie ist die meist eingesetzte Methode in der Festphasenchemie. Das getrocknete Harz kann direkt zu Herstellung von KBr-Presslingen verwendet werden. Noch einfacher ist die Probenvorbereitung bei der FT-ATR-IR-Spektroskopie (abgeschwächte Totalreflexion; ATR), bei der das Harz direkt vermessen werden kann. Hier werden im Unterschied zu Aufnahmen in Transmission nicht ganze Kugeln durchstrahlt, sondern durch die geringe Eindringtiefe des IR-Strahls in die Probe werden nur oberflächennahe Bereiche detektiert. Die IR-Spektroskopie bietet die Möglichkeit, den Verlauf einer Synthese über die An- bzw. Abwesenheit charakteristischer Banden von funktionellen Gruppen zu verfolgen.<sup>[115, 116]</sup> Um die Absorptionen der Polymermatrix zu eliminieren, dient ein Differenzspektrum von belegtem und unbelegtem Harz.

Es existiert eine Vielzahl spezieller IR-Verfahren. Die FT-IR-Mikroskopie ermöglicht die Aufnahme qualitativ guter IR-Spektren von einzelnen Harzkugeln. Dabei werden die Beads in einen KBr-Pressling eingedrückt und in Transmission vermessen. Die IR-Mikroskopie dient zur Single Bead-Analytik von kombinatorischen Substanzbibliotheken<sup>[117]</sup> und zur Aufnahme von Reaktionskinetiken.<sup>[118, 119]</sup> Zur Quantifizierung von Reaktionen können IR-spektroskopische Verfahren in Verbindung mit der Chemometrie eingesetzt werden.<sup>[120]</sup> Auch Raman-Techniken sind mittlerweile in der Festphasenchemie verbreitet, welche z. B. zu Untersuchungen der Zugänglichkeit von Enzymen<sup>[121]</sup> und der Homogenität

funktioneller Gruppen im Polymer verwendet werden.<sup>[122]</sup> Weitere IR-Methoden wie DRIFT- und Photoakustikspektroskopie werden ebenfalls eingesetzt.<sup>[123]</sup>

#### **2.6.4 NMR-Spektroskopie**

Durch Quellen in deuterierten Lösungsmitteln können am Polymer verankerte Substrate wie in Lösung NMR-spektroskopisch untersucht werden. Allerdings liefern bei dieser Methode nur Kerne mit großer chemischer Verschiebung, wie  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{19}\text{F}$ , qualitativ gute Spektren. Die Aussagekraft von  $^1\text{H}$ -Spektren ist aufgrund der starken Linienverbreiterung nur mäßig. Eine große Verbesserung der Qualität von Gelphasen-NMR-Spektren bringt der Einsatz der MAS-NMR-Spektroskopie. Mit ihrer Hilfe können  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von gelförmigen Polymeren mit guter Auflösung erhalten werden.<sup>[124]</sup> Die MAS-NMR-Spektroskopie liefert auch die Möglichkeit, Reaktionen am Harz quantitativ zu verfolgen.<sup>[125]</sup> Sogar NMR-Spektren von einzelnen Macrobeads konnten mit Hilfe dieser Technik aufgenommen werden.<sup>[40]</sup> Messungen von Diffusionskoeffizienten in diversen Polystyrolharzen können durch Anwendung spezieller Pulsprogramme durchgeführt werden.<sup>[126]</sup> Der Einfluss der Polymermatrix kann durch geeignete Pulssequenzen (Spin-Echo-Experiment) minimiert werden.<sup>[127]</sup>

#### **2.6.5 Massenspektrometrie**

Die Verwendung von photosensitiven Linkern ermöglicht die direkte Analyse polymergebundener Zwischenstufen durch MALDI-TOF MS.<sup>[128, 129]</sup> Nicht photolabil angebundene Substrate können mittels TOF-SIMS direkt analysiert werden.<sup>[130]</sup> Um im MALDI MS detektiert werden zu können, müssen die Moleküle positiv geladen sein. Um die Detektion aller polymergebundener Komponenten zu ermöglichen, hat sich die Verwendung von speziellen Linkern als besonders nützlich erwiesen. Diese Linker tragen einen geladenen Spacer (z. B. ein quartäres Ammoniumsalz), der bei der Abspaltung freigesetzt wird.<sup>[129]</sup>

### 2.6.6 ESR-Spektroskopie

Die ESR-Spektroskopie wird zur Untersuchung der Beweglichkeit reaktiver Zentren eingesetzt. Durch Anbinden eines Spin-Labels an das Polymer können über die Linienbreite des erhaltenen Signals Aussagen über die Mobilität des Spin-Labels im Polymer gemacht werden.<sup>[131-134]</sup> Weitere Anwendungen der ESR-Spektroskopie sind die Optimierung von Peptidsynthesen<sup>[135]</sup> und eine Methode zur Beladungsbestimmung von Harzen.<sup>[136]</sup> Anders als bei der NMR-Spektroskopie, bei der die gesamte Polymermatrix mit erfasst wird, erhält man in der ESR-Spektroskopie nur Informationen über das Verhalten des Spin-Labels in seiner Umgebung. Dies macht die ESR-Spektroskopie zu einer sehr sensitiven Methode. Weitere Details zur Theorie folgen in Kapitel 4.2.8.

### 2.6.7 UV/VIS- und Fluoreszenzspektroskopie

Durch Kuppeln von Fmoc-geschützten Aminosäuren kann nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe die Beladung von polymeren Trägermaterialien über die UV-spektrometrische Quantifizierung des Dibenzofulvens bestimmt werden. Dieses Verfahren wird routinemäßig eingesetzt und ist eine sehr exakte Methode für Beladungsbestimmungen.

Die Fluoreszenzspektroskopie ermöglicht durch Anbringen eines Fluorophors an das Polymer Untersuchungen zu Beweglichkeiten und Quellverhalten.<sup>[137, 138]</sup> Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie erlaubt die Aufnahme einzelner Beads. Dabei wird die Polymerkugel optisch in Schichten zerlegt und von jeder Schicht die Fluoreszenzintensität gemessen. Beispiele hierfür sind Informationen zur Homogenität der funktionellen Gruppen und Aussagen über den Ablauf einer Reaktion innerhalb eines Beads.<sup>[102]</sup> Allerdings müssen Quenchingeffekte berücksichtigt werden, die die Interpretation der Ergebnisse oft erschweren.<sup>[139]</sup> Eine Verbesserung dazu bringt der Einsatz der Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopie.<sup>[140]</sup>

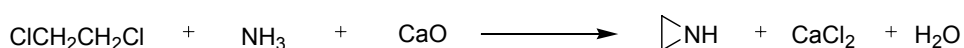
## 2.7 Polyethylenimin

Polyethylenimin (PEI) ist ein wasserlösliches Polymer, das aufgrund seiner hohen Reaktivität heute in vielen industriellen Prozessen eingesetzt wird. Es wird nur von zwei Firmen weltweit hergestellt, der Nippon Shokubai Company, Ltd. (Japan) unter dem Handelsnamen EPOMIN<sup>®</sup> und der BASF-AG Ludwigshafen (Deutschland) unter dem Handelsnamen Lupasol<sup>®</sup>. PEI besteht aus einer Mischung verzweigter Polymere mit unterschiedlichem Molekulargewicht. Auf dem Markt sind Polymere mit durchschnittlichen Molekulargewichten zwischen 300 und 2 000 000 erhältlich, sowohl in wasserfreier Form, als auch als wässrige Lösung. PEI und seine Derivate werden heute vor allem in der Papierindustrie eingesetzt.

### 2.7.1 Darstellung

PEI wird durch Ringöffnungspolymerisation des Aziridins (Ethylenimin) unter Säurekatalyse hergestellt. Bei dieser Art der Polymerisation kommt es während des Prozesses zu hoch verzweigten Polymeren, die primäre, sekundäre und tertiäre Amine in einem Verhältnis von ungefähr 1:2:1 besitzen.

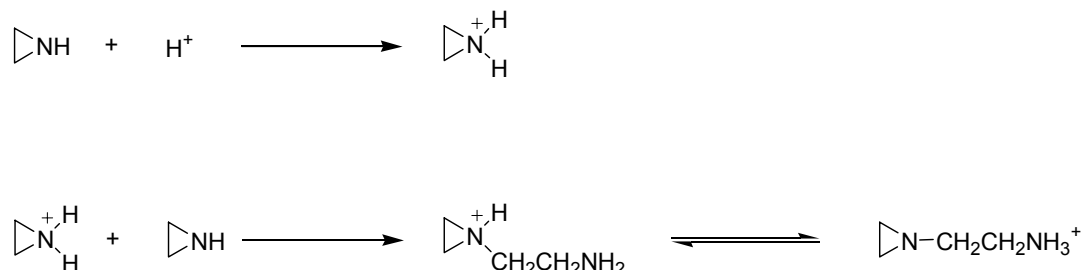
Das Aziridin ist eine farblose, entflammare, leicht flüchtige Flüssigkeit, die mit fast allen organischen Lösungsmitteln und Wasser in jedem Verhältnis mischbar ist, dagegen unlöslich in alkalischen Lösungen und in aliphatischen Kohlenwasserstoffen. Aziridin ist bei Inhalation und Berührung mit der Haut sehr toxisch und kann bei Kontakt mit Lewissäuren zu explosiven Polymerisationen führen. Es wird mit Hilfe des Dow Prozesses kommerziell hergestellt.<sup>[141]</sup> Dabei reagiert Ethylendichlorid mit Ammoniak zu 2-Chlorethylamin, was in Gegenwart von Calciumoxid zum Imin zyklisiert. Das wasserfreie Imin wird an der spontanen Polymerisation, die durch Verunreinigungen mit Säuren ausgelöst werden kann, durch Lagern über Natriumhydroxid gehindert.



**Abb. 2-16: Darstellung von Aziridin nach dem Dow Verfahren.**

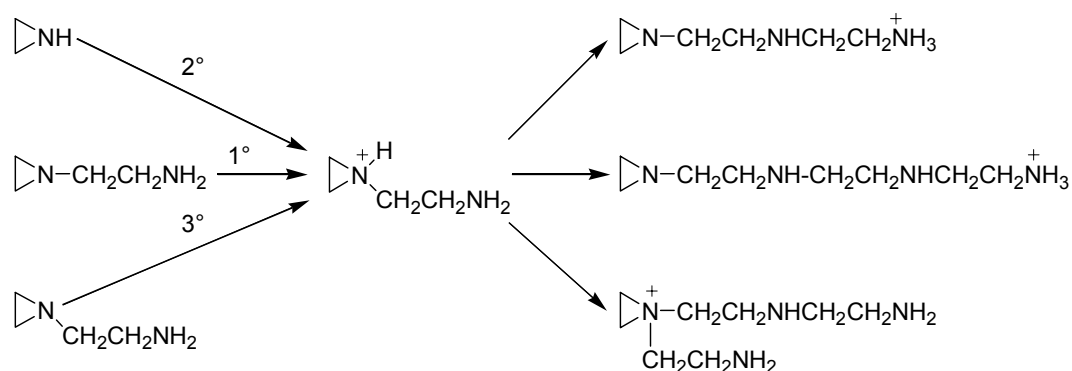
Die Polymerisation des Aziridins läuft durch einen Kettenwachstumsmechanismus ab.<sup>[142]</sup> Ausgelöst wird die Polymerisation durch kleine Mengen an kationischen Reagenzien, welche das Aziridin in ein elektronenarmes Alkylierungsmittel überführen. Diese

intermediäre Spezies kann nun sehr leicht eine Ringöffnung durch Nukleophile eingehen. Als kationische Reagenzien werden z. B. Säuren, Wasser, organische Halogenide und Phenole eingesetzt.



**Abb. 2-17: Initialisierung der Polymerisation durch Protonierung von Aziridin und Dimerbildung.**

Das Kettenwachstum kann durch Reaktion des protonierten Aziridins mit einem unprotonierten ausgelöst werden. Genauso erfolgt der Kettenaufbau durch Reaktion des protonierten Aziridins mit primären, sekundären und tertiären Aminen von bereits aufgebauten Polymerketten, was zu vielen Verzweigungen in der Polymerkette führt.



**Abb. 2-18: Kettenwachstumsreaktionen bei der Polymerisation von PEI.**

Der Kettenabbruch erfolgt durch intramolekulare makrozyklische Ringbildung, wobei die entstehenden Ringe größer als sechs Monomereinheiten sind.<sup>[143]</sup>

Um lineares PEI herzustellen, müssen entweder andere Monomerbausteine verwendet werden oder die Polymerisation mit Aziridin muss unter bestimmten Bedingungen durchgeführt werden. Die säurekatalysierte Polymerisation von 2-substituierten 2-Oxazolinen führt zu Poly(*N*-acylethylenimin), welche nach Hydrolyse lineares PEI ergibt.<sup>[144]</sup> Durch Verwendung von  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  als Initiator kann eine nahezu vollständige Hydrolyse von Poly(*N*-formalethylenimin) mit Natriumhydroxid erreicht werden.<sup>[145]</sup> Mit

dieser Art der Polymerisation können Polymere mit einem Molekulargewicht von bis zu 10 000 hergestellt werden.

Wenn die Polymerisation von Aziridin bei niedrigen Temperaturen (unter 40 °C) durchgeführt wird, erhält man ebenfalls lineares PEI.<sup>[146, 147]</sup> Hier wurden sogar Molekulargewichte von 25 000 erreicht. Im Gegensatz zu verzweigtem PEI, ist lineares PEI ein kristallines Polymer, das wasserunlöslich ist.

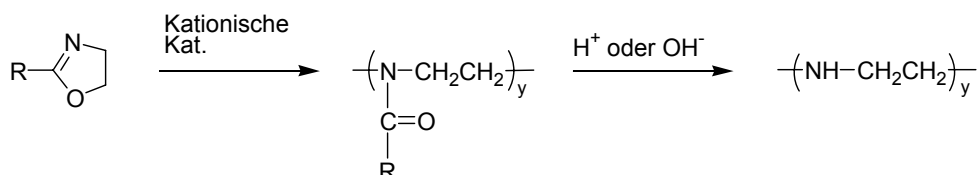


Abb. 2-19: Darstellung von linearem PEI.

## 2.7.2 Eigenschaften von verzweigtem PEI

Verzweigtes PEI ist eine klare, hochviskose Flüssigkeit, die je nach Molekulargewicht leicht gelblich bis farblos ist. Die Viskosität ist stark abhängig von Molekulargewicht, Konzentration und Temperatur. Der Festpunkt von PEI liegt bei Polymeren mit niedrigen und mittleren Molekulargewichten unter -20 °C und bei höhermolekularen Polymeren unter -5 °C. Die Zersetzungstemperatur liegt zwischen 240 °C und 310 °C. PEIs sind in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar und lösen sich sehr gut in niederen Alkoholen und Aceton, sowie in THF, Toluol oder Ethylacetat. Die Toxizität von PEI fällt mit einer LD<sub>50</sub> von 0.8-3.0 g/kg Körpergewicht bei oraler Applikation unter die Rubrik schwach toxisch bis nahezu nichttoxisch. Dennoch können durch die hohe Basizität des PEIs bei Kontakt mit Augen, Schleimhäuten und offenen Wunden Entzündungen hervorgerufen werden. Die Vernetzungspunkte innerhalb des PEIs befinden sich größtenteils 3 bis 3.5 Stickstoffatome voneinander entfernt.<sup>[143, 148]</sup> Durch diese Vernetzungsverteilung liegen wahrscheinlich spheroidal geformte Moleküle vor,<sup>[149]</sup> welche viele geladene Stickstoffatome beinhalten können. PEI kann als ein kationischer Polyelektrolyt fungieren und wird sehr stark von anionisch geladenen organischen und anorganischen Materialien, Kolloiden und Oberflächen angezogen. Durch die eingebauten Aminogruppen in den Polymerketten zeigt PEI eine hohe chemische Reaktivität.<sup>[150]</sup> Es kann Reaktionen eingehen mit Aldehyden, Ketonen und Halogeniden, welche bei Verwendung von difunktionalisierten Molekülen

eine dreidimensionale Vernetzung des PEIs bewirken. Isocyanate, Thioisocyanate, Acrylnitril, Guanidine, Harnstoffe und Carbonsäurederivate werden zur Derivatisierung von PEI ebenfalls eingesetzt und liefern für viele Sparten der Industrie technische Rohstoffe.

### **2.7.3 Verwendung von PEI**

PEI wird vor allem in der Papierindustrie eingesetzt. Hier findet es eine ganze Reihe von Anwendungen, wie zur Erhöhung der Papierfestigkeit, zur Verbesserung von Füll-, Pigment- und Farbstoffprozessen und zur Klärung von Abwässern, welche bei der Papierherstellung anfallen, um nur einige zu nennen. Viele Derivate des PEIs werden bei der Herstellung spezieller Papiersorten verwendet.

Viele andere industriellen Anwendungen des PEIs und dessen Derivate seien an dieser Stelle nur aufgelistet:<sup>[150]</sup>

als Klebstoffe

zur Verbesserung der Qualität von Druckerfarben

zur Verbesserung der Eigenschaften von Textilfasern

als Zusatz in Haarpflegemitteln und Seifen

als Flockungsmittel

als Rostschutzmittel

als Schmiermittel

als Dispergiermittel

als Schwermetallscavenger

als Ionenaustauscherharz

als Zusatzstoff bei der Galvanisierung

Auf die biologischen, medizinischen und enzymatischen Anwendungen des PEIs wird in Kap. 4.4 extra eingegangen.



### 3 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Dissertationsarbeit gliedert sich in vier Bereiche, die sich alle mit einem neuen Trägerkonzept auf der Basis von Polyethylenimin befassen. Dieses neue Konzept der Polykondensation von funktionalisierten Monomeren liefert einen einfachen Zugang zu hochbeladenen, aminfunktionalisierten Ultraharzen.

Im ersten Teil der Arbeit stand die Synthese von neuen hochbeladenen Trägermaterialien durch Vernetzung von niedermolekularem Polyethylenimin mit einem difunktionalisierten Crosslinkermolekül im Vordergrund. Durch Erarbeitung eines robusten Syntheseprotokolls für die Herstellung des Polymers sollte die Möglichkeit geliefert werden, diese neuen polymeren Trägermaterialien ohne Probleme auch in größerem Maßstab herzustellen. Nach ausführlicher Charakterisierung des Harzes, war die Untersuchung der chemischen und mechanischen Stabilität und das Erreichen hoher Beladungen durch verschiedene Funktionalisierungsreaktionen das Ziel.

Der zweite Teil befasst sich mit der Synthese und Evaluierung verschiedener Ultraharze. Ausgehend von einer genauen Charakterisierung diverser Polyethylenimine, sollte eine Reihe von Ultraharzen mit unterschiedlichen Anteilen an Crosslinker und unterschiedlichen PEIs hergestellt und charakterisiert werden. Die Harze sollten mit einer Reihe von gängigen Linkermolekülen derivatisiert werden, mit dem Ziel hohe Beladungen zu erreichen. Untersuchungen des Quellverhaltens und der Mobilität der einzelnen Polymere sowie ihre Verwendung als Trägermaterial in der Peptidsynthese sollten Aussagen zulassen, welches der hergestellten Harze sich am besten für den Einsatz in der festphasenunterstützten Synthese eignet.

Im dritten Teil sollte das Ultraharz-Konzept auf die Anwendung als polymeres Reagenz übertragen werden. Ziel war die Herstellung eines hochbeladenen polymeren Borhydridharzes. Die Idee war, durch Quarternisierung der Amine des Polymers ein polykationisches Harz herzustellen, welches durch einfachen Ionenaustausch zum polymeren Borhydrid umgesetzt wird. Das hochbeladene polymere Reagenz sollte in einer Reihe von in der Literatur beschriebenen Anwendungen als Reduktionsmittel getestet werden.

Der vierte Teil befasst sich mit der Synthese von peptidfunktionalisierten dendritischen Strukturen. Durch Vernetzung von PEI mit einem speziellen Crosslinker, sollte ein Trägermaterial hergestellt werden, das nach entsprechender Funktionalisierung wieder in seine löslichen Ausgangspolymere zerlegt werden kann. Die Aufgabe bestand in der Synthese eines reversiblen Vernetzers und in der Etablierung der Polymerisation mit PEI. Anschließend sollten an diesem reversibel vernetzten Träger Peptide in hohen Beladungen aufgebaut werden. Nach Auflösen der Vernetzung, sollten die erhaltenen peptidfunktionalisierten PEI-Polymere charakterisiert und auf ihre Zellverfügbarkeit und Cytotoxizität untersucht werden.

## 4 Ergebnisse

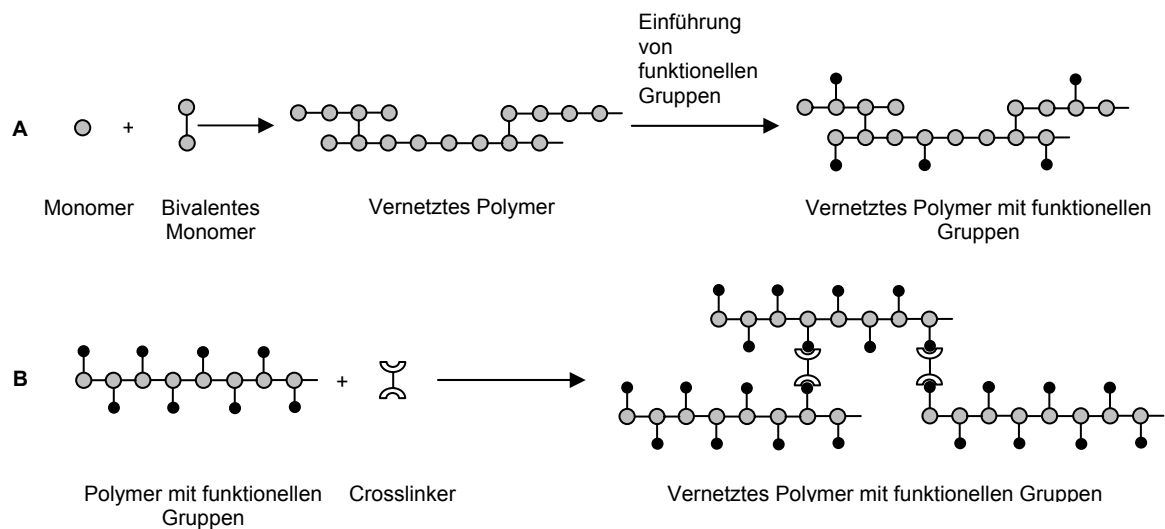
### 4.1 Synthese von Ultraharzen

#### 4.1.1 Einleitung

Polymere Trägermaterialien werden klassischerweise über die Copolymerisation von monovalenten Monomeren zusammen mit einem kleinen Anteil von bivalenten Monomeren, welche zur Vernetzung des Polymers führen, hergestellt. Funktionelle Gruppen werden entweder durch entsprechende Monomerbausteine während der Polymerisation eingeführt, oder aber die Funktionalisierung erfolgt nach der Polymerisation. Die Eigenschaften der Polymere können durch Variation von Länge und Menge des Crosslinkers beeinflusst werden (Abb. 4-1, A).

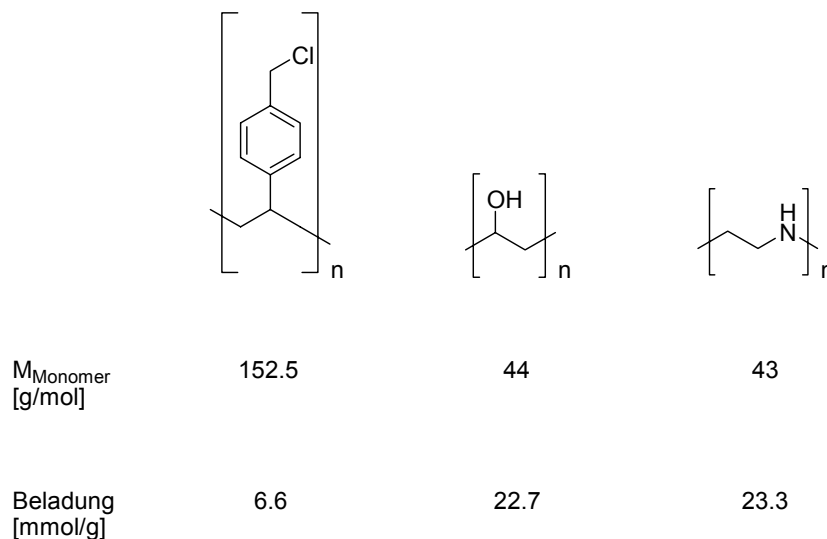
Generell leiden aktuelle polymerunterstützte Synthesemethoden an ihrer geringen Atomökonomie im Vergleich zur konkurrierenden Synthese in Lösung.<sup>[3]</sup> Dadurch wird die festphasenunterstützte Chemie an konventionellen Harzen von ressourcen- und kostenintensiven Anwendungen, wie Synthesen im größeren oder sogar technischen Maßstab ausgeschlossen. Durch Entwicklung neuer, effizient funktionalisierbarer Polymere sollte es möglich sein, die Trägerkapazität erheblich zu steigern und somit der Festphasenchemie Zugang zu neuen Feldern in der Chemie zu verschaffen.

Ein alternatives Konzept zu dem oben beschriebenen herkömmlichen Verfahren für die Herstellung von polymeren Trägern, ist die Vernetzung von löslichen Polymeren, die eine hohe Dichte von funktionellen Gruppen tragen, und die somit eine nachträgliche, weitere Funktionalisierung des polymeren Trägers erlauben (Abb. 4-1, B). Dieses Prinzip ermöglicht sehr einfach die Herstellung von hochbeladenen Trägermaterialien und wurde bereits bei Ionenaustauschern und für die Enzymimmobilisierung eingesetzt.



**Abb. 4-1: Alternative Konzepte für die Herstellung von vernetzten Polymeren.**

Entscheidend für die theoretische maximale Beladung des Polymers ist das Molekulargewicht des verwendeten Monomers: Je kleiner das Molekulargewicht, desto höher ist die Kapazität des daraus resultierenden Polymers.



**Abb. 4-2: Potenzielle Bausteine für die Synthese hochbeladener Polymere auf der Basis von Poly-4-chlormethylstyrol, Polyvinylalkohol (PVA) und Polyethylenimin (PEI).**

Die Vernetzung von PEI führt zu hochbeladenen Trägermaterialien, die über die große Zahl von Aminen im Polymerrückgrat sehr leicht und vielfältig funktionalisierbar sind. Viele Publikationen haben sich bereits mit der Herstellung von Polymeren aus vernetztem PEI befasst. Diese Polymere wurden vor allem als Ionenaustauscherharze und als Schwermetallscavenger für Uran, Kupfer und Kobalt eingesetzt.<sup>[151-155]</sup> Hier sind PEIs mit unterschiedlichen Molekulargewichten (von 600 bis 50 000) vor allem mit Dihalogenverbindungen und Epichlorhydrin vernetzt worden. Die Verwendung von

Dihalogenverbindungen als Crosslinker hat gegenüber Epichlorhydrin den Vorteil, dass bei Reaktion eines Alkyldibromids mit einem sekundären Amin das gebildete tertiäre Amin als Bromid vorliegt und deshalb nicht mit einem weiteren Alkylbromid zu einem stark basischen quartären Ammoniumion reagieren kann. Dies kann bei Verwendung von Epichlorhydrin nicht generell ausgeschlossen werden. Auf der anderen Seite garantiert die hohe Reaktivität des Epoxidrings eine vollständigere Reaktion. Hier verläuft die Vernetzung über nukleophile Addition (Ringöffnung), während sie bei Verwendung von Dihalogenverbindungen über eine nukleophile Substitution abläuft.

Frühe Arbeiten aus dem Jahre 1957 von Shepherd verwendeten als Crosslinker Ethylendibromid, welches mit zuvor aus Ethylenimin hergestelltem PEI in MeOH für 24 h bei 95 °C zu einem klaren Gel polymerisiert wurde.<sup>[156]</sup> Die erhaltenen Polymere wurden mit KOH in die freie Aminform überführt und in Hinblick auf ihre Affinität gegenüber Anionen und Kupfer getestet. Untersuchungen zum Vernetzungsgrad der Polymere zeigten, dass es ein Minimum an Crosslinker gibt, welches ein mechanisch stabiles Polymergel liefert. Auch die maximale Menge an Vernetzer wurde getestet und es zeigte sich, dass bei stöchiometrischen Mengen bzw. Überschüssen nur noch eine bestimmte Anzahl an Crosslinkermolekülen mit dem PEI reagiert. Allerdings zeigten diese Materialien nicht das Verhalten von hochvernetzten Polymeren, sondern es waren elastische, quellfähige Gele. Daraus folgerten die Autoren, dass nur ein kleiner Teil der Dihalogenverbindung wirkliche Vernetzungen zwischen den PEI-Ketten eingeht und der Großteil mit einzelnen Ketten zu kleinen, geschlossenen Ringen reagiert.

Nonogaki benutzte eine 20 % wässrige Lösung von PEI, die mit Ethylendichlorid und NaOH für 13 h bei 100 °C zu einem Polymer umgesetzt wurde. Die erhaltenen Harze wurden in die Chlorid- und in die Hydroxyform überführt, und Kupfer- und Kobaltkomplexe mit diesen Harzen auf ihre Anionenaustauschereigenschaften untersucht.<sup>[157]</sup>

Rivas befasste sich in den achtziger Jahren ausführlich mit der Herstellung von Polymeren auf der Basis von vernetztem PEI für den Einsatz als Schwermetallscavenger.<sup>[151-155, 158]</sup> Zur Herstellung wurde eine Reihe von Dihalogenverbindungen verwendet, die mit PEI in einer heterogenen Reaktion in Petrolether unter Zusatz eines Emulgators bei 95 °C für 8 h umgesetzt wurden. Die erhaltenen Polymere wurden mit 1 N NaOH gewaschen. Weitere Derivatisierungen der Harze, wie *N*-Methylierung mit Dimethylsulfat in Acetonitril,

*N*-Carboxymethylierung mit Monochloressigsäure unter basischen Bedingungen und *N*-Phosphonmethylierung mittels Formaldehyd und Phosphorsäure wurden durchgeführt.

Für die Immobilisierung von Enzymen wurde ebenfalls der Einsatz von vernetztem PEI untersucht. Dazu wurden Harze mit Isothiocyanatgruppen und mit Säureazidgruppen als reaktiven Gruppen hergestellt. Als Crosslinker fungierte 1,4-Phenylendiisothiocyanat. Durch Variation des Vernetzungsgrades und dem Gehalt an reaktiven Gruppen, wurde eine Reihe von Harzen hergestellt, die auf ihre Eignung für die Immobilisierung von Papain, Trypsin,  $\alpha$ -Chymotrypsin und Urease getestet wurden.<sup>[159]</sup> Eine andere Arbeit zur Enzymimmobilisierung benutzte für die Darstellung der Polymere eine 50 % wässrige Lösung von PEI (MG 45 000), die mit Epichlorhydrin bei 40 – 50 °C für 1 h vernetzt wurde.<sup>[160]</sup>

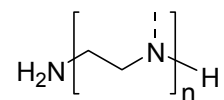
Klotz synthetisierte vernetzte PEIs durch Derivatisierung mit Thiobutylolacton und anschließender Vernetzung der Thiolgruppen zu Disulfidbrücken bei An- und Abwesenheit von Methylorange. Nach dem Entfernen des Methyloranges, wurden die beiden Polymere auf ihre Bindungsaffinität gegenüber Methylorange untersucht. Dabei zeigte sich eine höhere und stärkere Bindung bei dem Polymer, was in Anwesenheit von Methylorange polymerisiert wurde. Basierend auf diesen Resultaten wurde vorgeschlagen, dass die Konformation des Polymers durch die Anwesenheit von Substraten während der Polymerisation beeinflusst werden kann.<sup>[161]</sup>

Eine weitere Art der Vernetzung von PEI ist die Verwendung von Dialdehyden, welche in einer Polykondensationsreaktion zu einem Polymer reagieren. In einem zweiten Schritt werden die entstandenen Imine reduziert.<sup>[162]</sup>

Generell lassen sich PEIs mit einer Vielzahl von bifunktionellen Molekülen vernetzen. Die Eigenschaften der Polymere hängen von der Größe und dem Vernetzungsgrad der eingesetzten PEIs ab. Natürlich spielt auch die Natur des Crosslinkers eine wichtige Rolle, sowie die Art der Vernetzungsreaktion.

### 4.1.2 Synthese von Ultraharzen

Für die Synthese der Ultraharze auf der Basis von vernetztem PEI wurde ein PEI mit einem niedrigen Molekulargewicht verwendet. Zur Berechnung des Polymerisationsgrades  $n$  wurde das Verhältnis von Stickstoff zu Kohlenstoff im PEI aus den Daten der Elementaranalyse mit der allgemeinen Summenformel für PEI gleichgesetzt:



$$C = 2 \cdot n \cdot 12$$

$$N = 14 \cdot n + 14$$

$$M_n = 43.07 \cdot n + 17.03$$

$$\frac{N}{C} = \frac{14n}{24n} + \frac{14}{24n}$$

$$n = \frac{14}{24} \left( \frac{N}{C} - \frac{14}{24} \right)$$

aus Elementaranalyse: C: 53.1 % H: 11.9 % N: 34.5 %

⇒  $n = 8.74$   $M_n = 393.5 \text{ g/mol}$  (Angabe des Herstellers 420 g/mol)

Die Verwendung eines PEIs mit relativ kurzer Kettenlänge und daraus resultierendem niedrigen Verzweigungsgrad sollte bei der Polymerisation ein regelmäßig aufgebautes Polymer liefern, welches bessere Eigenschaften wie Zugänglichkeit, Beladbarkeit und Quellverhalten hat, als ein Polymer, das aus einem höhermolekularen, stark verzweigten PEI aufgebaut ist. Auch sollte der Polymerisationsprozess dadurch besser gesteuert werden können.

Als Vernetzermolekül wurde der Terephthalaldehyd ausgewählt. Dieser bifunktionelle Aldehyd reagiert in einer thermodynamisch kontrollierten Gleichgewichtsreaktion mit den Aminen des PEIs zum entsprechenden Imin, und zwar bevorzugt mit den primären Aminen, was wiederum zu einem Polymer mit einer geordneten Struktur führt. Diese Reaktion dient zur Verlängerung der Ketten. Erst wenn alle primären Amine abreagiert haben, erfolgt die eigentliche Vernetzung durch Reaktion von noch vorhandenem Terephthalaldehyd mit sekundären Aminen des PEIs. Natürlich besteht bereits durch die verzweigte Struktur des PEIs eine vernetzte Raumstruktur. Durch die Kenntnis des mittleren Molekulargewichts des PEIs kann der Vernetzungsgrad genau kontrolliert werden. Die entstandenen Imine wurden in einem zweiten Schritt zu den entsprechenden

Aminen reduziert. Durch dieses Verfahren konnten aus kostengünstigen Ausgangsstoffen sehr einfach die Ultraharze auch in größeren Maßstäben hergestellt werden.

Die Polykondensation wurde in THF bei Raumtemperatur durchgeführt. Dabei wurden PEI und Terephthalaldehyd separat in soviel THF gelöst, damit beide Stoffe gerade noch gut dissoziiert vorliegen. Die beiden Lösungen wurden unter Rühren schnell vereint, und es erfolgte eine spontane Erwärmung des Reaktionsgefäßes auf 42 °C. Die Viskosität der Lösung nahm innerhalb weniger Minuten zu, und nach 10 min begann die anfangs gelbe Lösung zu einem klaren gelben Gel fest zu werden. Nach weiteren 10 min erfolgte eine Eintrübung des Polymers vom Rand des Glaskolbens. Das weißlich-gelbe Polykondensationsprodukt war nach 1 h vollständig eingetrübt und hatte eine gummiartige Konsistenz.

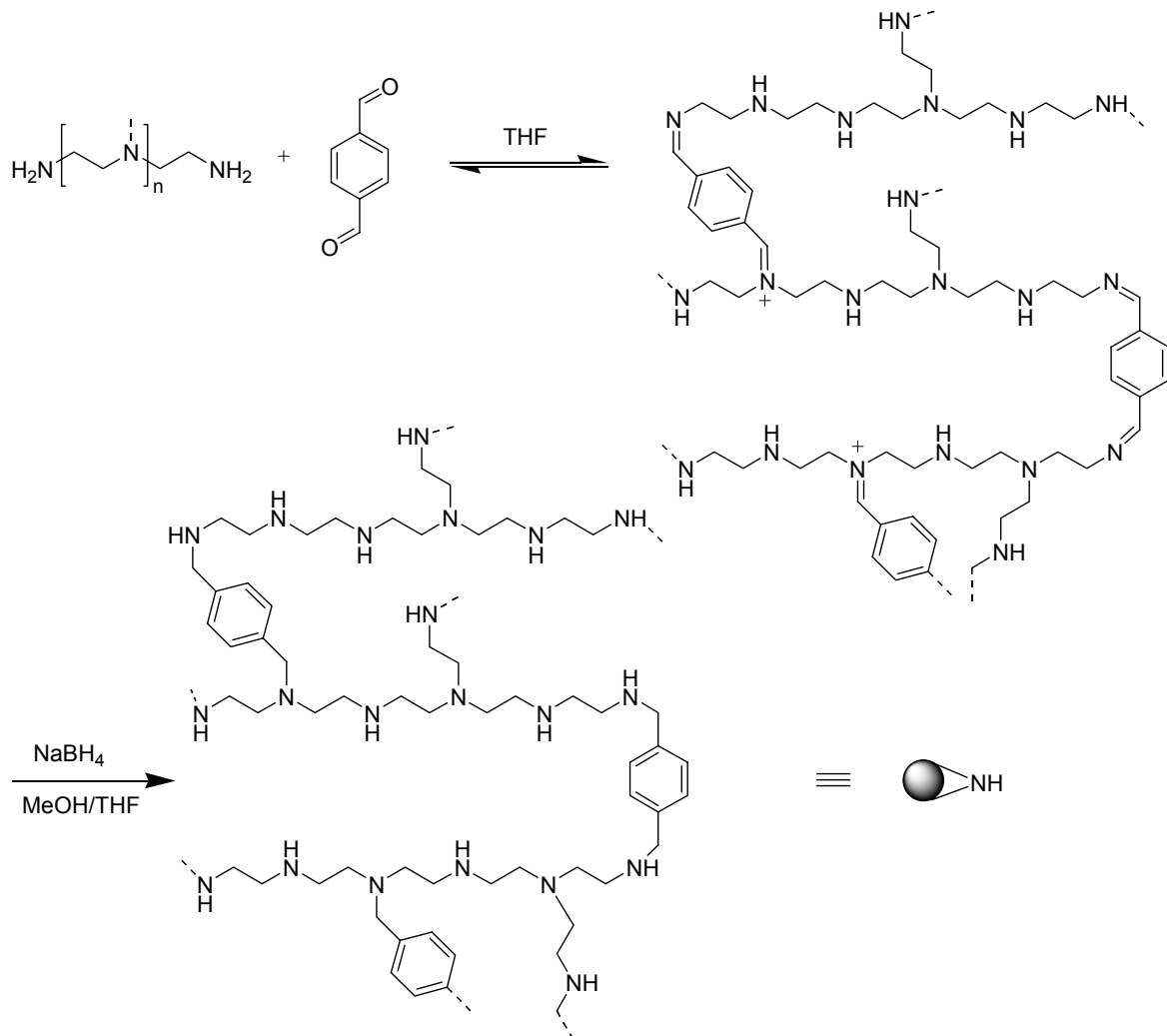


Abb. 4-3: Synthese der Ultraharze.



Nach insgesamt 4 h wurde das Polymer zerkleinert und die Imine mit 3 eq. Natriumborhydrid bezogen auf die Menge an Vernetzer in THF/MeOH 2:1 für 16 h bei RT reduziert.

Um überschüssiges Natriumborhydrid zu eliminieren, wurde das Harz durch Behandlung mit 1 N HCl in die Hydrochloridform überführt. Dabei nahm das Quellvolumen des Polymers sehr stark zu (bis zu 180 ml/g). Die Überführung in die freie Aminform durch Behandlung mit 2 N NaOH und anschließendem Waschen mit Wasser erfolgte quantitativ, was durch eine negative Elementaranalyse auf Chlor und FT-ATR-IR-Spektroskopie gezeigt werden konnte.

Die weitere Aufarbeitung des Harzes beinhaltete gründliches Waschen mit Wasser und THF, um eventuell nicht umgesetzte Edukte zu entfernen. Anschließend wurde das Aminharz in MeOH gequollen und durch ein Metallsieb gedrückt, um Partikel mit einer einheitlichen Größenverteilung zu erlangen. Nach weiterem Waschen mit THF und DCM wurde das Harz im Vakuum getrocknet. Die erhaltenen weiß-grauen Polymere zeigten starke Adsorption untereinander, und waren bei Zugabe von Lösungsmittel sehr gut quellfähig. Das Hydrochloridharz wurde als weiß-graues, feinkörniges Polymer erhalten.<sup>[163]</sup>

Für den Erfolg der Polymerisation ist die Konzentration der Ausgangsstoffe in THF von entscheidender Bedeutung. Bei zu niedriger Konzentration tritt keine Polymerisation auf Grund der kleineren Wahrscheinlichkeit der Zusammenstöße zwischen PEI und Crosslinker ein, bzw. es resultiert ein Polymer, welches mechanisch nicht genügend stabil ist. Bei zu hoher Konzentration ist die Löslichkeit des PEIs und vor allem des Terephthalaldehyds in THF zu gering, so dass hier eine unvollständige Reaktion zwischen PEI und Dialdehyd stattfindet. Wenn die Polymerisation in anderen Lösungsmitteln, wie z. B. DCM durchgeführt wird, resultiert ein Polymer mit wesentlich schlechteren Quelleigenschaften. Auf die Verwendung von unterschiedlichen Varianten und Mengen an Vernetzer wird in Kap 4.2 ausführlich eingegangen.

Für die Reduktion der Imine im polymeren Netzwerk wurde eine Reihe von Parametern variiert. Die Verwendung von Natriumborhydrid in reinem MeOH resultierte oft in der Auflösung des Iminnetzwerkes. Auch die Anwesenheit von Wasser sowohl durch die Polykondensation als auch im verwendeten MeOH kann zur Hydrolyse der Imine führen. Bei Durchführung der Reduktion in reinem THF dauerte die Reduktion sehr lange und war

meist nicht vollständig, was sich in einer teilweisen Auflösung des Polymers bei Zugabe von 1 N HCl und daraus folgend in niedrigen Ausbeuten zeigte. Dies kann mit der schlechten Löslichkeit des Natriumborhydrids in THF erklärt werden. Das in der Lösungssynthese am meisten verbreitete Reduktionsmittel für reduktive Aminierungen, Natriumcyanoborhydrid, war zu schwach, um die polymeren Imine zu reduzieren. Die Zugabe von wasserentziehenden Mitteln, wie Tetramethylorthoameisensäureester, brachte keine Verbesserung. Die Kombination von THF und MeOH lieferte die besten und verlässlichsten Resultate. Hier werden einmal die polymeren Imine durch das THF stabilisiert und das Natriumborhydrid durch das MeOH genügend solvatisiert, um die Reduktion quantitativ ablaufen zu lassen. Der Versuch, Polykondensation und Reduktion in einer Ein-Topf-Reaktion durchzuführen, resultierte in einem mechanisch instabilen Harz, was nur in niedrigen Ausbeuten erhalten wurde.

#### 4.1.3 Charakterisierung der Ultraharze

Die Charakterisierung der hergestellten Ultraharze erfolgte mit Hilfe der Elementaranalyse, der FT-ATR-IR-Spektroskopie und der <sup>1</sup>H-MAS-NMR-Spektroskopie.

Die Elementaranalyse lieferte durch den Stickstoffgehalt eine Beladung von 14.6 mmol/g an Aminen der Harze. Die Zahl der für weitere chemische Derivatisierung zur Verfügung stehenden Amine ist jedoch kleiner, da die im Polymer vorhandenen tertiären Amine nicht weiter funktionalisiert werden können. Auf die Berechnung der Anzahl tertiärer Amine im Polymer wird in Kap. 4.2.4 eingegangen.

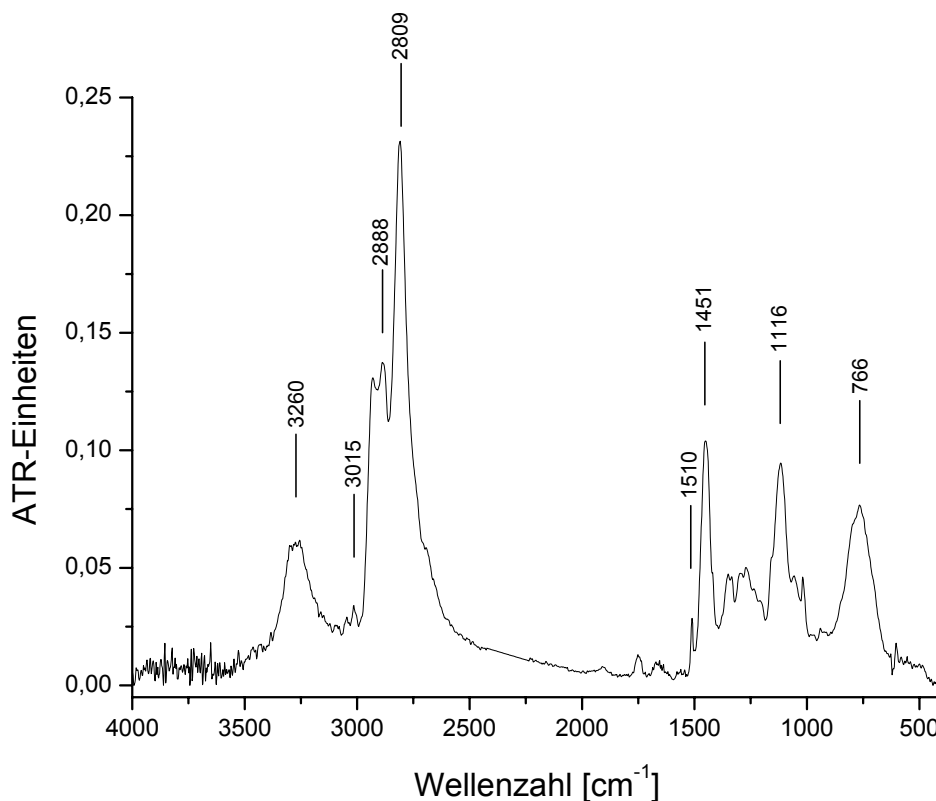
**Tab. 4-1: Ergebnisse der Elementaranalyse der Ultraharze in der Hydrochloridform und in der freien Aminform.**

Ultraharz	C [%]	H [%]	N [%]	Cl [%]
Hydrochloridform	42.2	7.4	12.2	26.2
Aminform	64.2	10.6	20.4	0

Das Hydrochlorid-Harz zeigte ein Chlorgehalt von 26.2 %, was einer Beladung von 7.4 mmol/g entspricht. Die vollständige Konvertierung des Hydrochloridharzes in das freie

Aminharz mit NaOH konnte durch Bestimmung des Chlorgehaltes im Aminharzes bewiesen werden. Hier wurde kein Chlor mehr gefunden.

Mit Hilfe der FT-ATR-IR-Spektroskopie konnte die komplette Umsetzung des Terephthalaldehyds mit dem PEI gezeigt werden. Im IR-Spektrum des freien Aminharzes wurden keine Carbonylbanden des Aldehyds bei  $1698\text{ cm}^{-1}$  sowie auch keine Hydroxybanden des entsprechend reduzierten Alkohols gefunden. Auch die Vollständigkeit der Reduktion konnte durch Abwesenheit einer Iminbande bei  $1640\text{ cm}^{-1}$  demonstriert werden. Die These, dass Terephthalaldehyd zunächst mit den primären Aminen des PEIs reagiert und erst anschließend mit den sekundären die Vernetzung des Polymers eingeht, konnte durch das Fehlen der für PEI charakteristischen N-H-Deformationsschwingung für primäre Amine bei  $1605\text{ cm}^{-1}$  untermauert werden.<sup>[142]</sup>



**Abb. 4-4:** FT-ATR-IR-Spektrum des Ultraharzes in der freien Aminform.

Die charakteristischen Banden des Ultraharzes in der freien Aminform sind die N-H-Valenzschwingung für sekundäre Amine bei  $3260\text{ cm}^{-1}$ , aromatische C-H-Valenzschwingungen des Crosslinkers bei  $3015\text{ cm}^{-1}$ , aliphatische

C-H -Valenzschwingungen bei 2888 und 2809  $\text{cm}^{-1}$ , N-H-Deformationsschwingungen der sekundären Amine bei 1510  $\text{cm}^{-1}$  und C-H-Deformationsschwingungen des PEIs bei 1451  $\text{cm}^{-1}$ . Das IR-Spektrum der Hydrochloridform der Ultraharze zeigte aufgrund der protonierten Amine eine breite Bande zwischen 2780 und 2200  $\text{cm}^{-1}$ .

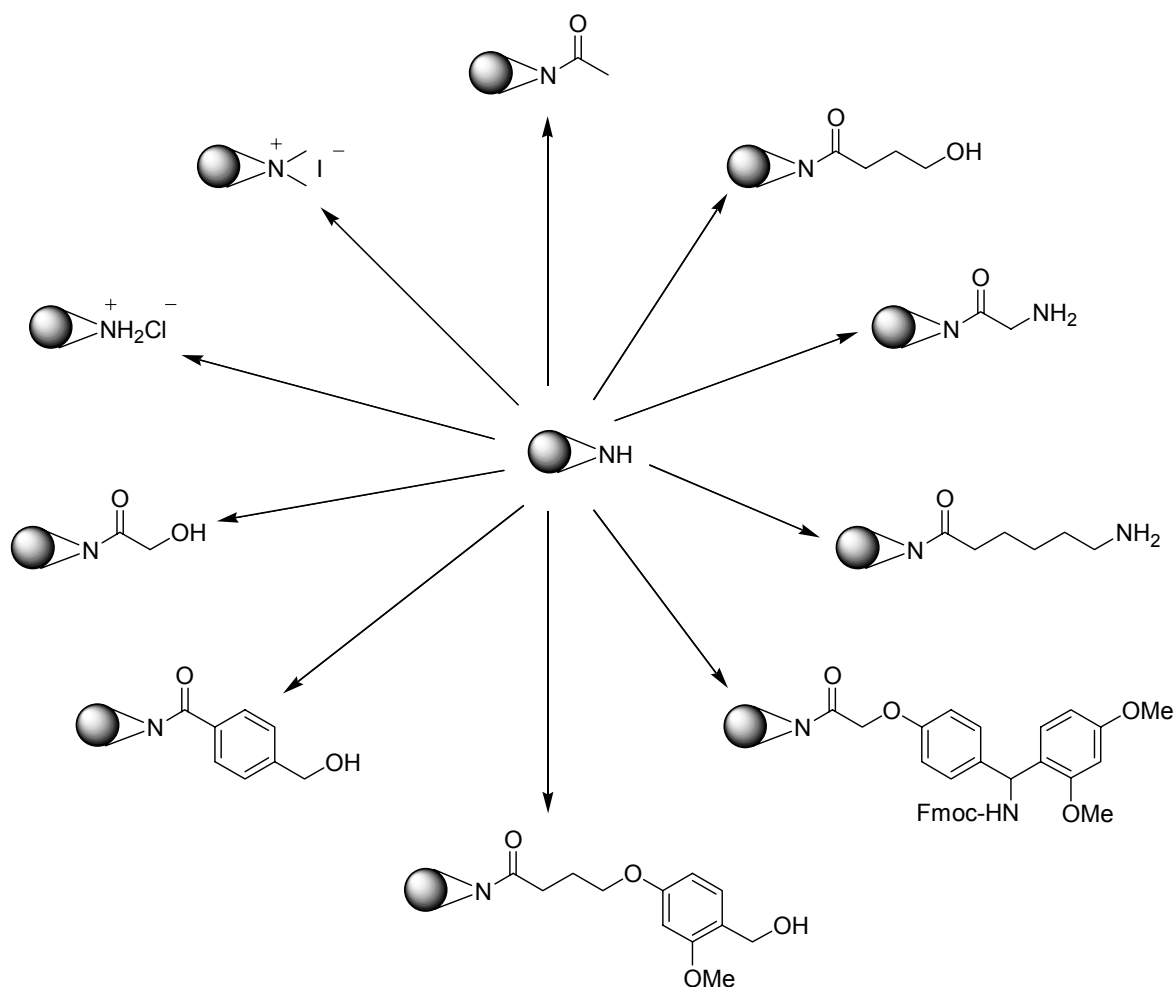
Die  $^1\text{H}$ -MAS-NMR-Spektroskopie konnte für die experimentelle Bestimmung des Verhältnisses zwischen Vernetzer und PEI in den Ultraharzen verwendet werden. Das theoretische Verhältnis berechnet sich aus der Menge an Terephthalaldehyd und der Menge an PEI, welche durch das mittlere Molekulargewicht gegeben ist. Für das hier hergestellte Ultraharz ergab sich ein theoretisches Verhältnis von Crosslinker zu PEI von 1.67. Die Integration der  $\text{CH}_2$ -Protonen des PEIs im Polymer zwischen 2.3 und 3.1 ppm und der benzyliischen Protonen des Crosslinkers zwischen 3.5 und 4.0 ppm lieferte nach Berechnung der Anzahl der CH-Protonen im PEI über den Polymerisationsgrad  $n$  das experimentelle Verhältnis zwischen Terephthalaldehyd und PEI, was hier bei 1.55 lag und somit in guter Übereinstimmung mit der Theorie steht. Ausführliche Untersuchungen und Berechnungen von Vernetzungsgraden aus den  $^1\text{H}$ -MAS-NMR-Spektren folgen in Kap. 4.2.5.

Die Hydrochloridform der Ultraharze zeigt ein enormes Quellvolumen in Wasser (180 ml/g), jedoch nur mäßiges Quellen in organischen Lösungsmitteln. Dies kann durch die polykationische Natur der Harze erklärt werden. Die freie Aminform der Ultraharze hat ein sehr gutes Quellverhalten in allen gängigen organischen Lösungsmitteln. Besonders zu erwähnen sind die ausgezeichneten Quelleigenschaften des polymeren Trägers in Wasser (62 ml/g) und in MeOH (44 ml/g), was diese Harze auch für biologische Anwendungen interessant macht. Weitere Quellfaktoren werden in Kap 4.2.7 aufgeführt.

#### **4.1.4 Derivatisierung der Ultraharze**

Die große Zahl an Aminen im Polymerbackbone lässt eine Vielzahl von Funktionalisierungsreaktionen, wie Acylierungen und nukleophile Substitutionen, zu. Um Linkermoleküle in hoher Beladung am Polymer zu verankern, muss zunächst die Zugänglichkeit zu den reaktiven Zentren, den Aminen, gewährleistet sein. Außerdem muss sichergestellt werden, dass nach dem Anbringen eines Linkers die verbleibenden Amine des Harzes auf einfache Weise chemisch so modifiziert werden können, dass sie in der

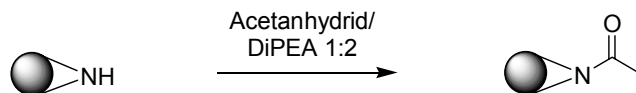
weiteren Synthese keine Nebenreaktionen mit Reagenzien eingehen können. Dies würde eine Verringerung der Ausbeute und Reinheit der Produkte bedeuten. Die Ultraharze wurden als polymere Reagenzien sowie mit einer Vielzahl an Linkern derivatisiert. Dabei stand das Erreichen von hohen Beladungen bei der Optimierung der Synthesen im Vordergrund. Abb. 4-5 gibt einen Überblick über die hergestellten funktionalisierten Ultraharze. Die Aufarbeitung der Harze erfolgte durch Waschen mit einer Lösungsmittelreihe von polar zu unpolar und anschließendem Trocknen der Harze im Vakuum, analog der Aufarbeitung von Polystyrolharzen.



**Abb. 4-5: Derivatisierungsmöglichkeiten von Ultraharzen.**

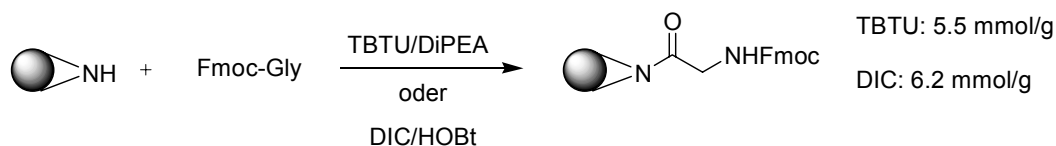
Um die gute Zugänglichkeit zu den Aminen im Ultraharz zu demonstrieren, wurde die freie Aminform des Ultraharzes mit Acetanhydrid und DiPEA (1:2, v:v) komplett acetyliert. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde durch negativen Kaiser- und Chloraniltest sowie durch die Abwesenheit der N-H-Valenzschwingung bei  $3260\text{ cm}^{-1}$  im IR-Spektrum bewiesen. Die gebildeten Amide zeigten eine starke Bande bei  $1635\text{ cm}^{-1}$ , die der Carbonylschwingung der Amidbindung zuzuordnen ist. Mit Hilfe dieser einfachen Reaktion war es generell

möglich, die gesamten Amine des Harzes zu „cappen“ und somit nach Funktionalisierung mit einem Linker vom weiteren Syntheseverlauf auszuschließen. Aufgrund der hohen Stabilität der Amidbindung, gab es bei den weiteren chemischen Transformationen keinerlei Nebenreaktionen.



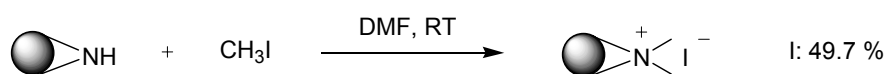
**Abb. 4-6: Acetylierung von Ultraharz.**

Ein weiterer Test für die Zugänglichkeit der Amine im Hinblick auf den Einsatz der Harze in der Peptidsynthese war die Immobilisierung von Fmoc-Glycin direkt an die Ultraharze. Dabei wurden unterschiedliche Kupplungsreagenzien unter gleichen Bedingungen getestet. Die Verwendung von TBTU mit DiPEA als Base resultierte nach zweimaliger Kupplung für jeweils 3 h mit 2 eq. bezogen auf 15 mmol/g in einer Beladung von 5.5 mmol/g, welche nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit 20 % Piperidin/DMF-Lösung und photospektrometrischer Quantifizierung bestimmt wurde. Durch Einsatz von DIC/HOBt als Kupplungsreagenz wurde eine Beladung von 6.2 mmol/g erreicht, was einer Umsetzung von über 80 % der für die Funktionalisierung zugänglichen Amine entspricht. Die Polymere zeigten ausgezeichnete Quelleigenschaften in organischen Lösungsmitteln. Die Masse der Harze vergrößerte sich während der Synthese auf das 7.5 fache.



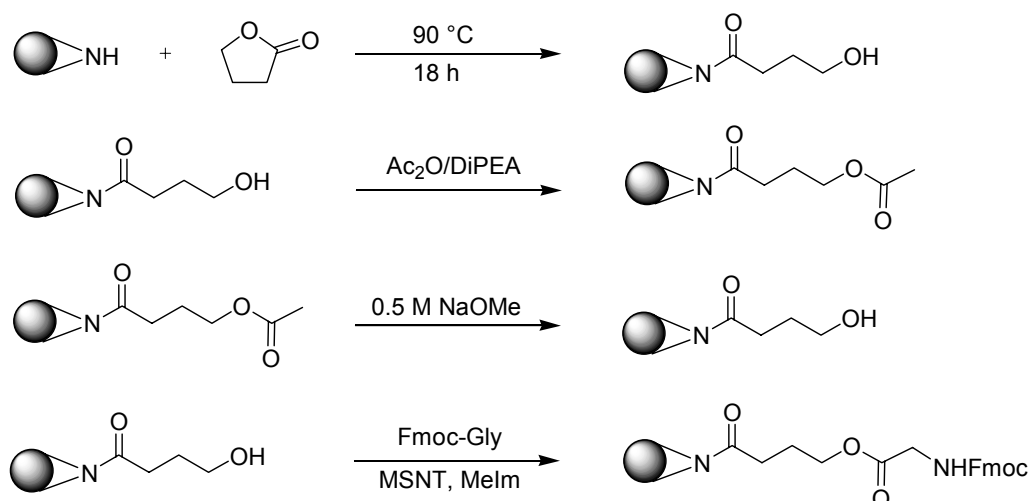
**Abb. 4-7: Kupplung von Fmoc-Glycin unter verschiedenen Bedingungen an Ultraharz.**

Die Alkylierung der sekundären und tertiären Amine des Ultraharzes mit Methyljodid in DMF bei RT lieferte das quarternisierte, polykationische Harz. Durch Elementaranalyse wurde ein Iodgehalt von 49.7 % ermittelt, was einer Umsetzung von ca. 88 % entspricht. Dieses Polymer zeigte aufgrund seiner ionischen Struktur ein sehr hohes Quellvolumen in polaren Lösungsmitteln, wie MeOH und Wasser. Dabei wurde das Harz zu einem farblosen, gelartigen Polymer.



**Abb. 4-8: Alkylierung von Ultraharz mit Methyljodid.**

Die Einführung eines Linkermoleküls an die Ultraharze erfordert die Verwendung eines bifunktionellen Substrates. Dabei muss eine funktionelle Gruppe mit den Aminen des Polymers eine stabile Bindung eingehen, während die andere funktionelle Gruppe geschützt vorliegen muss, was weitere Reaktionsschritte, wie Einführung einer Schutzgruppe auf das Linkersubstrat und Abspaltung der Schutzgruppe nach Immobilisierung an das Polymer zur Folge hat. Die Reaktion von Lactonen mit Aminen führt durch nukleophile Ringöffnung des Lactons in einem Schritt zur Bildung von Hydroxyamiden. In der Literatur ist diese Reaktion auf stark nukleophile Amine und sehr reaktive Lactone unter drastischen Reaktionsbedingungen, wie hoher Druck und hohe Temperatur, beschrieben.<sup>[164]</sup> Durch Reaktion von 4-Butyrolacton mit Ultraharz bei 90 °C für 18 h wurden die entsprechenden Hydroxyamide erhalten. Schon nach kurzer Reaktionszeit wurde der Fortschritt durch die starke Volumenvergrößerung des Harzes deutlich. Durch den großen Überschuss an Lacton kam es durch Reaktion der freien Hydroxygruppe mit 4-Butyrolacton zur Bildung der entsprechenden Ester. Diese konnten nach Capping der restlichen Amine des Harzes mit Acetanhydrid/DiPEA durch Hydrolyse mit Natriummethanolat wieder gespalten werden. Um die Beladung der Ultraharze mit Hydroxygruppen zu bestimmen, wurde Fmoc-Glycin mit Hilfe von MSNT als Kupplungsreagenz und 1-Methylimidazol als Base in DCM auf die Hydroxygruppen gekuppelt.<sup>[165]</sup> Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe wurde eine Beladung von 3.5 mmol/g erhalten. Allerdings ist trotz Doppelkupplung und großen Überschüssen von Fmoc-Glycin (5 eq. bezogen auf 5 mmol/g) nicht sichergestellt, dass alle OH-Gruppen acyliert wurden. Alle Harze zeigten gutes Quellverhalten in DCM und DMF. Die gesamte Reaktionsfolge wurde mit Hilfe der IR-Spektroskopie verfolgt. Die Hydroxyamide zeigten eine starke Amidbande bei 1623 cm<sup>-1</sup>, eine Esterbande bei 1730 cm<sup>-1</sup> und eine breite OH-Bande bei 3350 cm<sup>-1</sup>. Nach dem Cappingschritt waren eine Verschiebung der Amidbande zu 1637 cm<sup>-1</sup> und eine starke Zunahme der Esterbande bei 1730 cm<sup>-1</sup> sichtbar. Die vollständige Verseifung der Estergruppen wurde durch das Verschwinden der Esterbande und durch eine breite Hydroxybande bei 3370 cm<sup>-1</sup> bewiesen. Der immobilisierte Fmoc-Glycin-Ester zeigte eine Esterbande bei 1720, die Carbamatschwingung bei 1750 und die für das Fluorengerüst charakteristische Deformationsschwingung bei 760 und 740 cm<sup>-1</sup>.



**Abb. 4-9: Reaktionsfolge der Immobilisierung von 4-Butyrolacton an Ultraharz mit anschließendem Cappen, Entschützung und Beladungsbestimmung durch Kuppeln von Fmoc-Glycin.**

Die Funktionalisierung der Ultraharze mit einer Hydroxyfunktion wurde auch durch Reaktion mit Acetoxyessigsäurechlorid erreicht. Dieses hochreaktive Säurechlorid gestattete die Einführung eines Linkers in sehr hohen Beladungen, da durch das kleine Molekulargewicht des Substrates die Ausgangsbeladung des Harzes nach der Reaktion wesentlich weniger stark abnimmt, als bei Verwendung größerer Linkermoleküle. Diese Reaktion diente als Test, bis zu welchen Beladungen die Ultraharze derivatisiert werden können und in wie weit sich durch die hohen Beladungen die Zugänglichkeit zu den reaktiven Zentren und die Quelleigenschaften des Harzes ändern. Dazu wurde das Ultraharz in DCM gequollen und bei  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit 2 eq. Acetoxyessigsäurechlorid (bezogen auf  $15\text{ mmol/g}$ ) mit katalytischen Mengen an DMAP und 5 eq. Pyridin versetzt. Die Geschwindigkeit der Reaktion zeigte sich durch die schnelle Massenzunahme des Harzes. Die Vollständigkeit der Acylierung wurde durch einen negativen Chloraniltest bewiesen. Nach Abspaltung der Acetylschutzgruppe mit  $0.5\text{ M}$  Natriummethanolatlösung wurden verschiedene Methoden für die Kupplung von Fmoc-Glycin zur Beladungsbestimmung getestet. Die Ergebnisse sind in Tab. 4-2 aufgeführt.



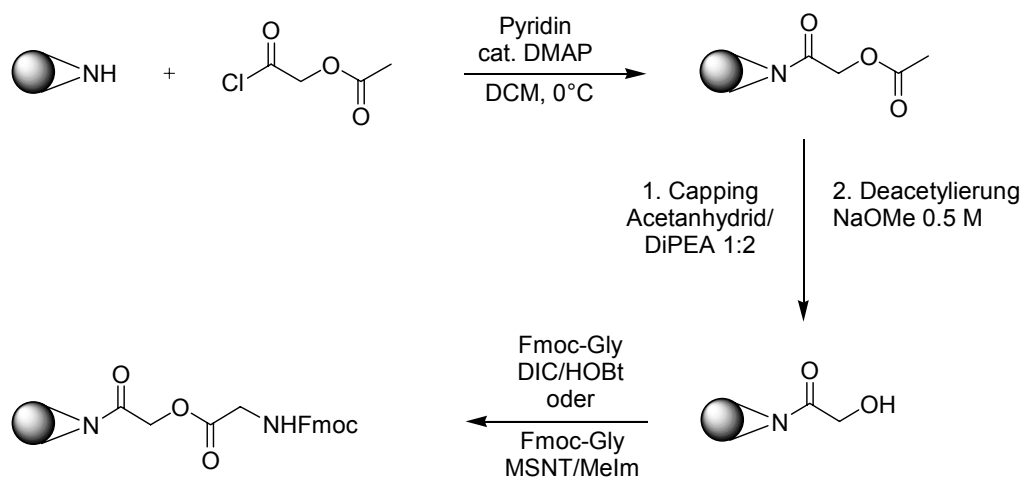


Abb. 4-10: Reaktionsschema zur Darstellung von 2-Hydroxyacetamidharzen und deren Fmoc-Glycin-Ester.

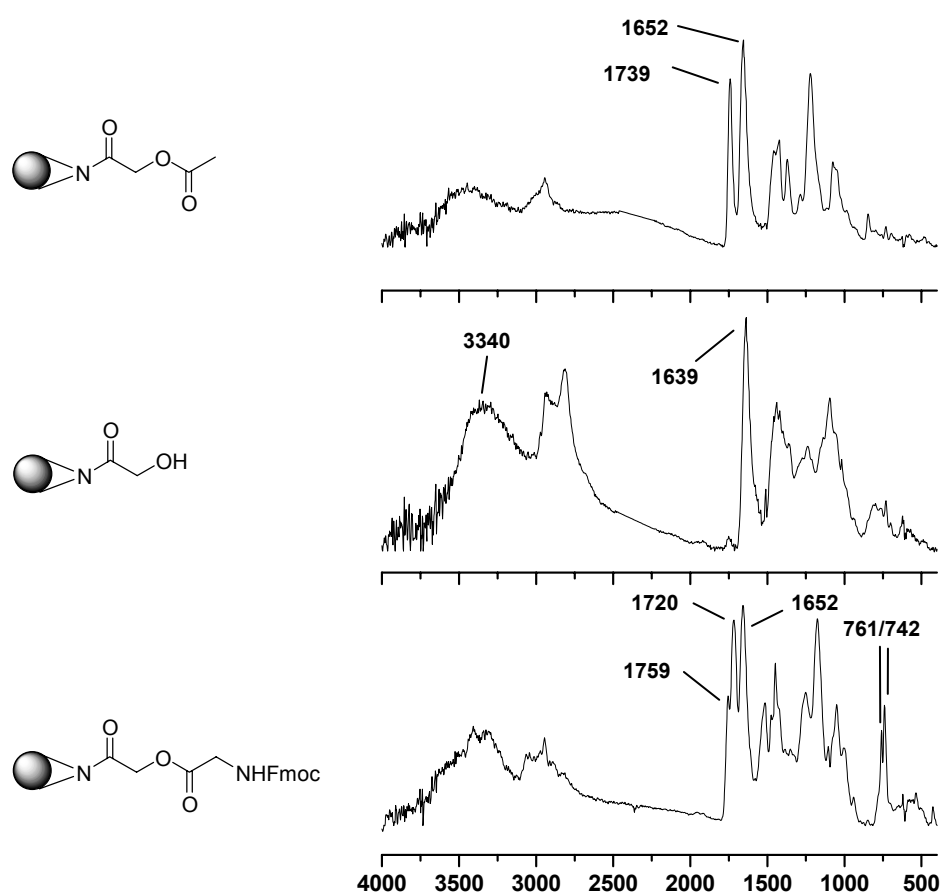
Tab. 4-2: Ergebnisse für die Evaluierung der Kupplungsbedingungen von Fmoc-Glycin auf 2-Hydroxyacetamidharze.

Reagenz	Eq. (auf 5 mmol/g)	Anzahl der Kupplungen	Reaktionszeit [h]	Beladung [mmol/g]
MSNT, MeIm, DCM	5	2	1 × 1h, 1 × 16 h	1.7
DIC, HOBt, DMF	5	1	16 h	5.0
DIC, HOBt, DMF	5	2	2 × 16 h	7.6

Mit einer Beladung von 7.6 mmol/g waren nahezu alle Amine acyliert und die gesamten Hydroxygruppen mit Fmoc-Glycin verestert. Dies zeigte die sehr gute Zugänglichkeit der funktionellen Gruppen auch nach Einführung von Linkergruppierungen in sehr hohen Beladungen. Die Quelleigenschaften der Harze änderten sich mit der Natur der funktionellen Gruppe. Die Hydroxyacetamidharze zeigten nur noch mäßiges Quellen in DCM, was auch als Grund für die schlechten Kupplungsausbeuten des Fmoc-Glycins bei der Verwendung von MSNT in DCM angeführt werden kann. In DMF quollen sowohl die Hydroxyacetamidharze als auch die mit Fmoc-Glycin modifizierten Harze sehr gut (9 ml/g), was einen Einsatz in der Peptidsynthese möglich machte.

Die IR-Spektren der einzelnen Harze sind in Abb. 4-11 aufgeführt. Nach Kupplung des Acetoxyessigsäurechlorids treten als charakteristische Schwingungen die Amidbande bei  $1652\text{ cm}^{-1}$  und die Esterbande der Acetylschutzgruppe bei  $1739\text{ cm}^{-1}$  auf. Die

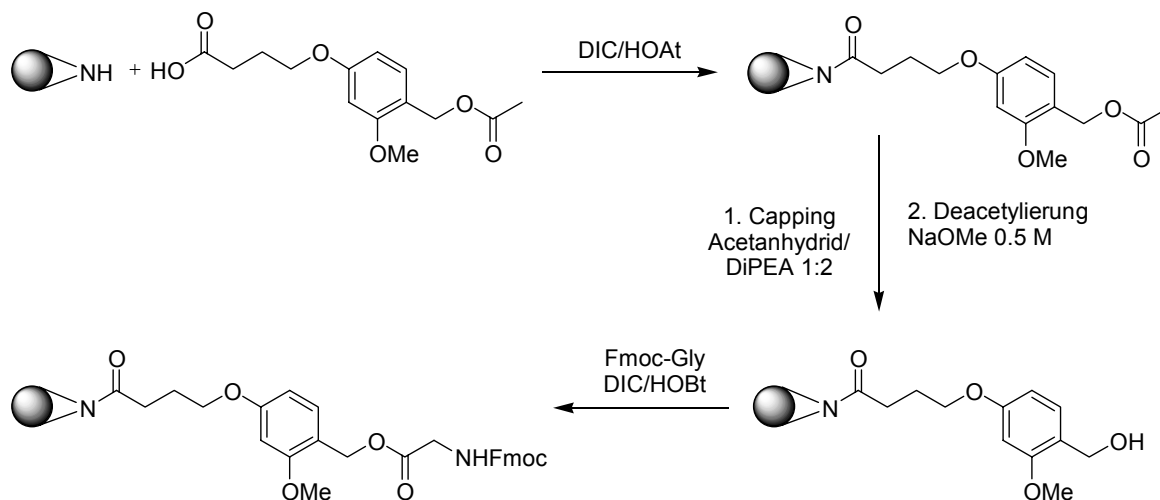
Vollständigkeit der Abspaltung der Acetylschutzgruppe wird durch das Fehlen der Esterbande und durch die Anwesenheit einer breiten OH-Bande bei  $3340\text{ cm}^{-1}$  gezeigt. Die Veresterung der Hydroxygruppe mit Fmoc-Glycin kann durch die Anwesenheit einer neuen Esterbande bei  $1720\text{ cm}^{-1}$ , der Carbamatschwingung der Fmoc-Schutzgruppe bei  $1759\text{ cm}^{-1}$  und der für das Fluorengerüst typischen Deformationsschwingung bei  $761$  und  $742\text{ cm}^{-1}$  charakterisiert werden.



**Abb. 4-11: IR-Spektren der Hydroxyacetamidharze.**

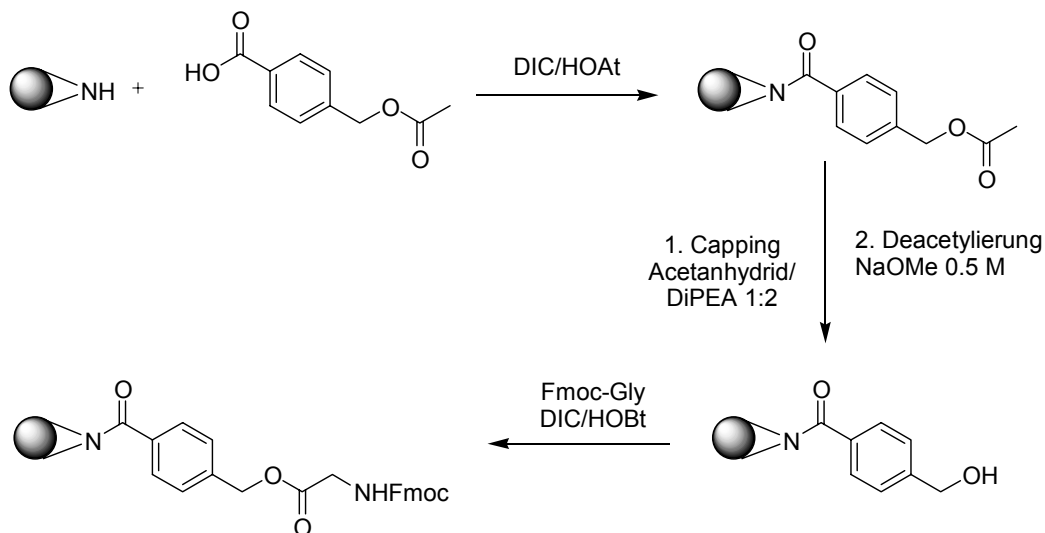
Für den Einsatz in der Peptidsynthese wurden die Ultraharze mit einer Reihe von in der Festphasensynthese üblichen Linkern modifiziert. Der sauer spaltbare Hydroxylinker, 4-(4-Hydroxymethyl-3-methoxyphenoxy)buttersäure (HMPB), ein wangähnlicher Linker, wurde nach Acetylierung der Hydroxygruppe unter Aktivierung mit DIC und HOAt mit 1 eq. bezogen auf  $15\text{ mmol/g}$  Ausgangsbeladung mit Ultraharz für  $16\text{ h}$  bei RT gekuppelt.<sup>[166]</sup> Nach Cappen der restlichen Amine und Deacetylierung mit

Natriummethanolat, wurden durch zweimaliges Kuppeln von Fmoc-Glycin mit DIC/HOBt als Kupplungsreagenz Beladungen von 2.8 mmol/g erzielt.



**Abb. 4-12: Kupplung des acetylgeschützten HMPB-Linkers an Ultraharz.**

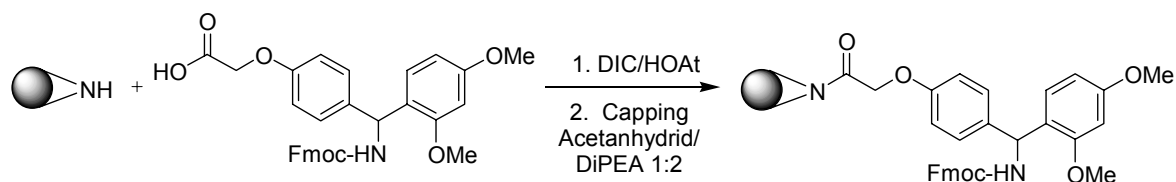
Der basenlabile Hydroxymethylbenzoesäure-(HMBA)-Linker wurde ebenfalls acetylgeschützt, und unter den gleichen Bedingungen gekuppelt. Hier resultierte nach Cappen, Entschützung und Derivatisierung mit Fmoc-Glycin eine Beladung von 3.3 mmol/g.



**Abb. 4-13: Kupplung des acetylgeschützten HMBA-Linkers an Ultraharz.**

Als weiterer säurelabiler und sterisch sehr anspruchsvoller Linker wurde Fmoc-geschütztes Rinkamid an Ultraharz immobilisiert. Auch hier wurde nur 1 eq. des p-[ $\alpha$ -[9H-Fluoren-9-yl)-methoxyformamido]-2,4-dimethoxybenzyl]-phenoxyessigsäure mit DIC/HOAt für 16 h bei RT gekuppelt. Die Bestimmung der Beladung des Trägermaterials konnte nach dem

Cappingschritt direkt durch Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgen und ergab eine Beladung von 2.7 mmol/g, was aufgrund des hohen Molekulargewichts des Rinklinkers eine nahezu quantitative Umsetzung bedeutet.



**Abb. 4-14: Kupplung des Fmoc-geschützten Rink-Linkers an Ultraharz.**

Generell konnte gezeigt werden, dass die Amine der Ultraharze sehr einfach und mit niedriger Äquivalentzahl effizient funktionalisiert werden können. Der Einfluss des Kupplungsreagenz bei der Immobilisierung der Linkersubstrate spielte eher eine untergeordnete Rolle. Dennoch lässt die Aktivierung mit DIC/HOAt den Einsatz von equimolaren Reagenzien zu, was vor allem bei teuren Linkermolekülen von Bedeutung ist. Die Kupplung des Fmoc-geschützten Rinklinkers demonstriert nachhaltig die ausgezeichnete Zugänglichkeit der Substrate zu den reaktiven Zentren des Polymers auch für größere Moleküle. Die nach der Funktionalisierung noch vorhandenen Amine konnten durch Cappen mit Acetanhydrid/DiPEA jeweils vollständig blockiert werden. Bei der Bestimmung der Beladung von hydroxyfunktionalisierten Harzen wurde die Kupplung von Fmoc-Glycin durch Aktivierung mit DIC/HOBt der Verwendung von MSNT als spezielles Kupplungsreagenz für Hydroxygruppen vorgezogen. Durch die Doppelkupplung konnte sichergestellt werden, dass alle für die weitere Synthese zugänglichen Hydroxygruppen verestert wurden.

Weiter wurde untersucht, ob die Basizität der sekundären Amine des Polymerbackbones ausreicht, um die Fmoc-Schutzgruppe eines Fmoc-geschützten Substrates während des Kupplungsschrittes abzuspalten. Dies wurde nur bei Verwendung von substöchiometrischen Mengen an Reagenz und gleichzeitig langen Reaktionszeiten sowie bei einer Erhöhung der Reaktionstemperatur beobachtet.

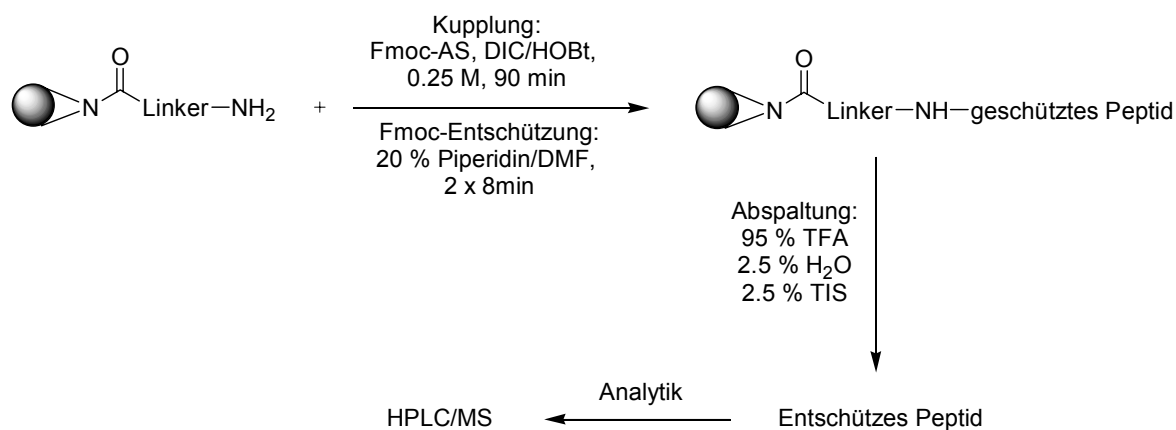
#### 4.1.5 Chemische Stabilität der Ultraharze

Die chemische Stabilität der Ultraharze wurde unter verschiedenen Reaktionsbedingungen getestet. Die freie Aminform wurde mit Butyllithium (2.6 M in Heptan) und Kalium-tert.-butanolat (3 M) für jeweils 16 h bei RT behandelt. Nach ausgiebigem Waschen und Trocknen der Harze wurde keine Veränderung in Bezug auf Masse, Quellverhalten und IR-Spektren der Polymere festgestellt. Durch Reaktion mit Methyljodid/Triethylamin entstand das quarternisierte Harz. Das stark quellende, polymere Gel hatte ein Iodgehalt von 49 %. Die Behandlung mit 3 M Salzsäure bei 70 °C für 16 h überführte das Ultraharz in die protonierte Form, welche extremes Quellvermögen in polaren Lösungsmitteln zeigte. Die Rücküberführung in die freie Aminform konnte durch Behandlung mit Natriumhydroxid sehr leicht und quantitativ erfolgen. Lewis-Säuren führten ebenfalls nicht zu einer Zerstörung des Harzes. Nach Behandlung mit purem Thionylchlorid für 16 h bei RT zeigte das Harz unverändertes Quellverhalten, das IR zeigte die protonierte Spezies und die Masse des Harzes vergrößerte sich auf das 1.7fache. Die Reaktion von Ultraharz mit Trifluormethansulfonsäure-trimethylsilylester/Acetanhydrid (1:2, v:v) für 16 h bei RT führte zu einer vollständigen Acylierung der Amine, was durch IR-Spektroskopie und einen starken Massenzuwachs um das dreifache bewiesen wurde. Auch dieses Harz zeigte sehr gute Quelleigenschaften in organischen Lösungsmitteln.

Um auch die Stabilität der funktionalisierten Ultraharze zu untersuchen, wurde das HMPB-Harz unter den gleichen Reaktionsbedingungen getestet. Nach Behandlung mit starken Basen (2.6 M Butyllithium in Heptan, 3 M Kaliumhydroxid in H<sub>2</sub>O für jeweils 16 h bei RT) und mit Methyljodid/Triethylamin für 16 h bei RT wurden keinerlei Veränderungen bezüglich Quellverhalten, Masse des Harzes und IR-Spektren festgestellt. Durch Behandlung mit starken Säuren (3 M Salzsäure bei 70 °C für 16 h) und Lewis-Säuren (pures Thionylchlorid, Trifluormethansulfonsäure-trimethylsilylester/Acetanhydrid 1:2, v:v für 16 h bei RT) verfärbte sich das Harz rot, vermutlich aufgrund der Bildung des Dialkoxy-substituierten Benzylradikals. Das Quellvermögen war reduziert, wobei die Masse der Harze unverändert blieb.

#### 4.1.6 Peptidsynthese an Ultraharzen

Ultraharze mit verschiedenen Linkersystemen wurden als Trägermaterial in der Peptidsynthese getestet. Dabei sollte untersucht werden, ob die hohen Beladungen genutzt werden können, oder ob es bei der Synthese von langen Peptidsequenzen aufgrund der hohen Dichte von immobilisierten Peptiden am Harz vermehrt zur Bildung von Fehlsequenzen oder zu Aggregation der einzelnen Peptidketten untereinander kommt. Generell wird der Einsatz von hochbeladenen Trägermaterialien in der Peptidsynthese eher abgelehnt aufgrund der oben angeführten Gründe. Allerdings haben schon frühe Arbeiten von Epton gezeigt, dass es durchaus möglich ist, mit hochbeladenen Harzen, Peptide in hohen Reinheiten zu synthetisieren.<sup>[55]</sup>



**Abb. 4-15: Schema für die Synthese von Peptiden an Ultraharzen.**

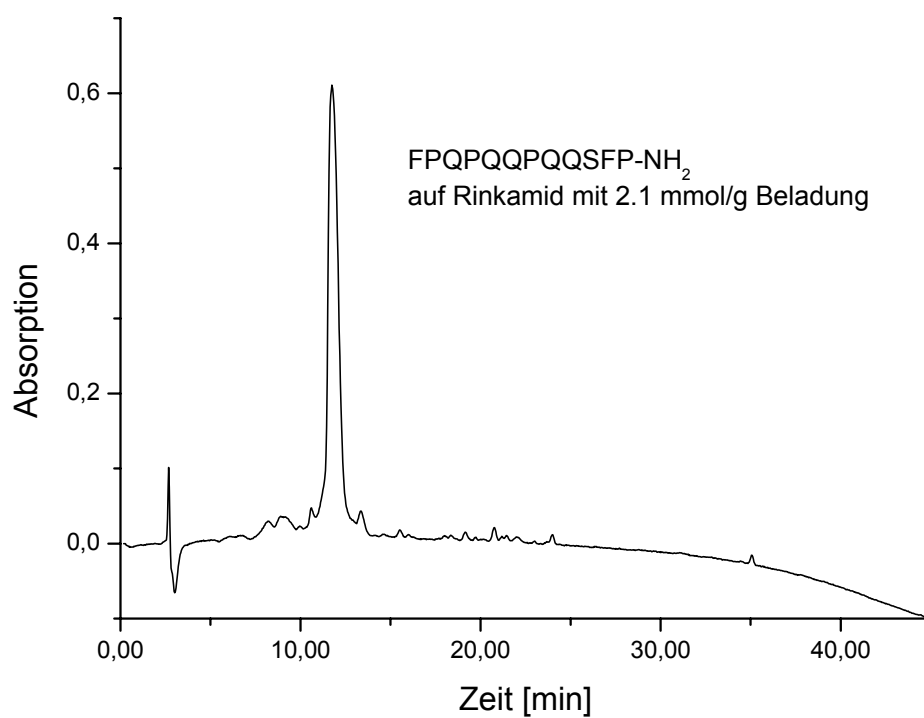
Für die Peptidsynthese wurde ein Rinkamid-Ultraharz mit einer Beladung von 2.1 mmol/g, ein HMPB-funktionalisiertes Ultraharz mit 2.9 mmol/g und ein 4-Hydroxyacetamid-Ultraharz mit 2.5 mmol/g Beladung verwendet. Die hydroxyfunktionalisierten Harze wurden zunächst mit Fmoc-Glycin durch Doppelkupplung mit DIC/HOBt als Kupplungsreagenz vorbelegt und die Beladung photospektrometrisch bestimmt. Zum Vergleich wurden die gleichen Sequenzen an Rink- bzw. Wangfunktionalisiertem Polystyrolharz synthetisiert. Der Aufbau der Peptide wurde mit Hilfe eines Syntheseroboters nach der Fmoc-Strategie unter DIC/HOBt-Aktivierung (0.25 M) durchgeführt. Die Kupplungszeiten der Fmoc-Aminosäuren betragen jeweils 90 min, die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit 20 % Piperidin/DMF-Lösung wurde zweimal für 8 min durchgeführt. Nach der Synthese wurden die Peptide mit 95 % TFA, 2.5 % TIS, 2.5 % Wasser bzw. für Peptide mit Cystein und Methionin mit 95 % TFA, 1 % TIS, 2.5 % Wasser, 2.5 % EDT für 3 h abgespalten. Nach Fällung mit kaltem Diethylether wurden die

Peptide aus *tert.*-But./Wasser lyophilisiert und mittels HPLC/MS charakterisiert. Die Peptide, die an dem 4-Hydroxyacetamidlinker aufgebaut wurden, wurden mit 0.25 M Natriummethanolat-Lösung für 2 h abgespalten. Die Abspalllösung wurde mit einem Ionenaustauscherharz zur Entfernung des überschüssigen Natriummethanols für 1 h geschüttelt. In Tab. 4-3 sind einige ausgewählte Beispiele für die Peptidsynthese an Ultraharzen aufgeführt.

**Tab. 4-3: Ergebnisse der Peptidsynthese an verschiedenen funktionalisierten Ultraharzen. \*(HPLC 214 nm)**

Sequenz	Linker	Beladung [mmol/g]	Masse	Reinheit* [%]
MICHA	Rink	2.1	572	98
C-Aca-PKKKRKV	Rink	2.1	1099.8	98
FPQPQQPQQSFP	Rink	2.1	1426.9	92.9
RQIKIWFQNRRMKWKK	Rink	2.1	2245.3	92.4
AAFAFG	4-Hydroxyacetamid	2.5	583	74.4
LKVSQAGKTLG	HMPB	2.9	1100.4	83.5
FDVFKAISFKRG	HMPB	2.9	1413.7	84.2

Die Peptide wurden in guten bis ausgezeichneten Reinheiten erhalten. Dabei konnten die hohen Beladungen der Harze voll genutzt werden. Der Vergleich mit den Peptiden, die an Polystyrolharzen synthetisiert wurden, ergab für Peptide mit bis zu 15 Aminosäuren keine Unterschiede bezüglich Reinheiten und Ausbeuten. Auch bei der Synthese von schwierigen Sequenzen, wie Peptide mit hohem Anteil an Prolin, wurden sehr gute Reinheiten erzielt (Abb. 4-16). Die sehr guten Ergebnisse der Peptidsynthese an Ultraharzen können mit dem Quellverhalten der Träger erklärt werden. Durch die Immobilisierung der einzelnen Aminosäuren nimmt das Quellvermögen der Harze sehr stark zu, so dass die Konzentration der Peptide am Harz nahezu konstant bleibt und aus diesem Grund auch bei diesen hochbeladenen Harzen genügend „Platz“ für den Aufbau der Peptide ist. Fehlsequenzen wurden vor allem beim späten Einbau von Lysin und Arginin bei der Synthese von längeren Peptidsequenzen beobachtet.



**Abb. 4-16: HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts von FPQPQQPQQSFP (MG 1426.9 als Amid) auf Rinkamid-Ultraharz.**



## 4.2 Evaluierung von Ultraharzen

### 4.2.1 Einleitung

Nach der Einführung des Ultraharzkonzepts und der Demonstration verschiedener Synthesebeispiele an den neuen Trägermaterialien, sollte nun im zweiten Teil eine detaillierte Untersuchung verschiedener Ultraharze vorgenommen werden. Ziel war es, ein optimiertes Harz herzustellen, welches Eigenschaften wie Quellverhalten, Mobilität, Zugänglichkeit zu den reaktiven Zentren und den Einsatz in der Peptidsynthese am besten vereint. Dazu wurde zunächst die für die Herstellung der Harze verwendeten PEIs genau charakterisiert. Die Verwendung anderer Crosslinkermoleküle für die Synthese wurde untersucht und nach dem Screening eine Reihe von unterschiedlich stark vernetzten Polymeren hergestellt. Durch  $^1\text{H}$ -MAS-NMR-Spektroskopie konnte das Vernetzungsverhältnis in den einzelnen Harzen bestimmt und mit den theoretischen Verhältnissen verglichen werden. Das Quellverhalten von freien Aminharzen sowie von funktionalisierten Harzen wurde in einer Reihe von gängigen organischen Lösungsmitteln untersucht und in Relation zu Vernetzungsgrad und Art der Funktionalität gebracht. Die Beweglichkeit der reaktiven Zentren wurde mit Hilfe der ESR- und der Fluoreszenzmikroskopie untersucht und mit herkömmlichen Trägermaterialien verglichen. Nach Funktionalisierung mit diversen Linkersystemen in hohen Beladungen wurde ein Peptid aus 11 Aminosäuren an den verschiedenen Ultraharzen aufgebaut und die Ergebnisse in Hinblick auf Ausbeute und Reinheit miteinander verglichen.<sup>[167]</sup>

### 4.2.2 Charakterisierung von PEI

Die ausführliche Charakterisierung der Ausgangspolymere war entscheidend für die reproduzierbare Synthese von Ultraharzen. PEI entsteht durch Polymerisation von Aziridin. Man erhält PEI als Mischung von Polymeren, die anhand der Verteilung des Polymerisationsgrades und dem Verzweigungsgrad charakterisiert sind.

Die physikalischen Eigenschaften eines vernetzten Polymers werden durch den Vernetzungsgrad der Ausgangspolymere stark beeinflusst. Aber auch die chemischen

Parameter werden durch die Verteilung von primären, sekundären und tertiären Aminen im Polymer bestimmt.

Der eigentliche Verzweigungsgrad in einem PEI kann mit dem speziellen Fall der statistischen Verzweigung verglichen werden. Im Falle einer statistischen Verteilung der Verzweigung reagieren die Aziridinmonomere mit primären und sekundären Aminen mit gleicher Geschwindigkeit. Diese Kinetik wurde im Rahmen einer Kooperation von H.-J. Egelhaaf numerisch simuliert. Dabei wurde die Polymerisation von Aziridin durch folgende zwei Reaktionen beschrieben: Primäre Amine reagieren mit Aziridin unter Bildung eines primären und eines sekundären Amins. Sekundäre Amine reagieren mit Aziridin unter Bildung eines sekundären und eines tertiären Amins. Die Simulation dieses Reaktionssystems ausgehend von primären Aminen am Anfang wurde unter der Annahme durchgeführt, dass Aziridin immer in hohen Überschüssen vorhanden ist und dass die Geschwindigkeit der beiden Reaktionen gleich ist ( $k_1 = k_2 = 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ). Nach anhaltender Reaktionszeit wurde eine Verteilung von primären zu sekundären zu tertiären Aminen wie 1.61 : 1 : 1.61 gefunden. Dies entspricht 38 % primäre, 24 % sekundäre und 38 % tertiäre Amine. Die Ergebnisse stimmten mit experimentellen Daten für große, verzweigte PEI-Moleküle überein.<sup>[168]</sup> Als Konsequenz dieser Simulation ergab sich, dass bei niedermolekularen Polymeren ein hoher Grad an hochreaktiven primären und sekundären Aminen erwartet werden kann.

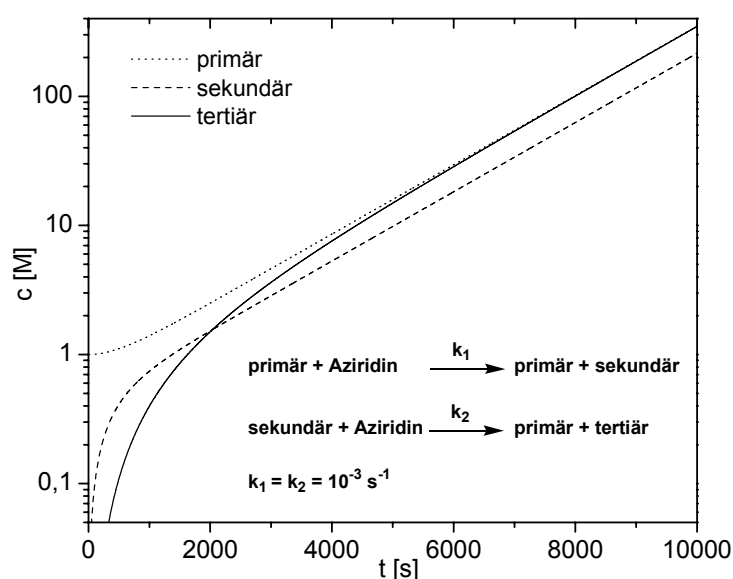


Abb. 4-17: Simulation der Kinetik der Polymerisation von Aziridin.

Für die maximale Beladung eines vernetzten Polymers mit reaktiven Gruppen und für eine große Variationsbreite beim Vernetzungsgrad sollten die Ausgangs-PEIs mit einem kleinen Verzweigungsgrad gewählt werden. Ideal wären lineare PEIs, diese sind jedoch synthetisch schwer herzustellen, und deshalb für eine ökonomische Harzsynthese nicht einsetzbar. Außerdem zeigen sie andere physikalische Eigenschaften. Aus diesem Grund wurden niedermolekulare PEIs mit niedrigem Verzweigungsgrad bei niedrigen Anschaffungskosten ausgesucht.

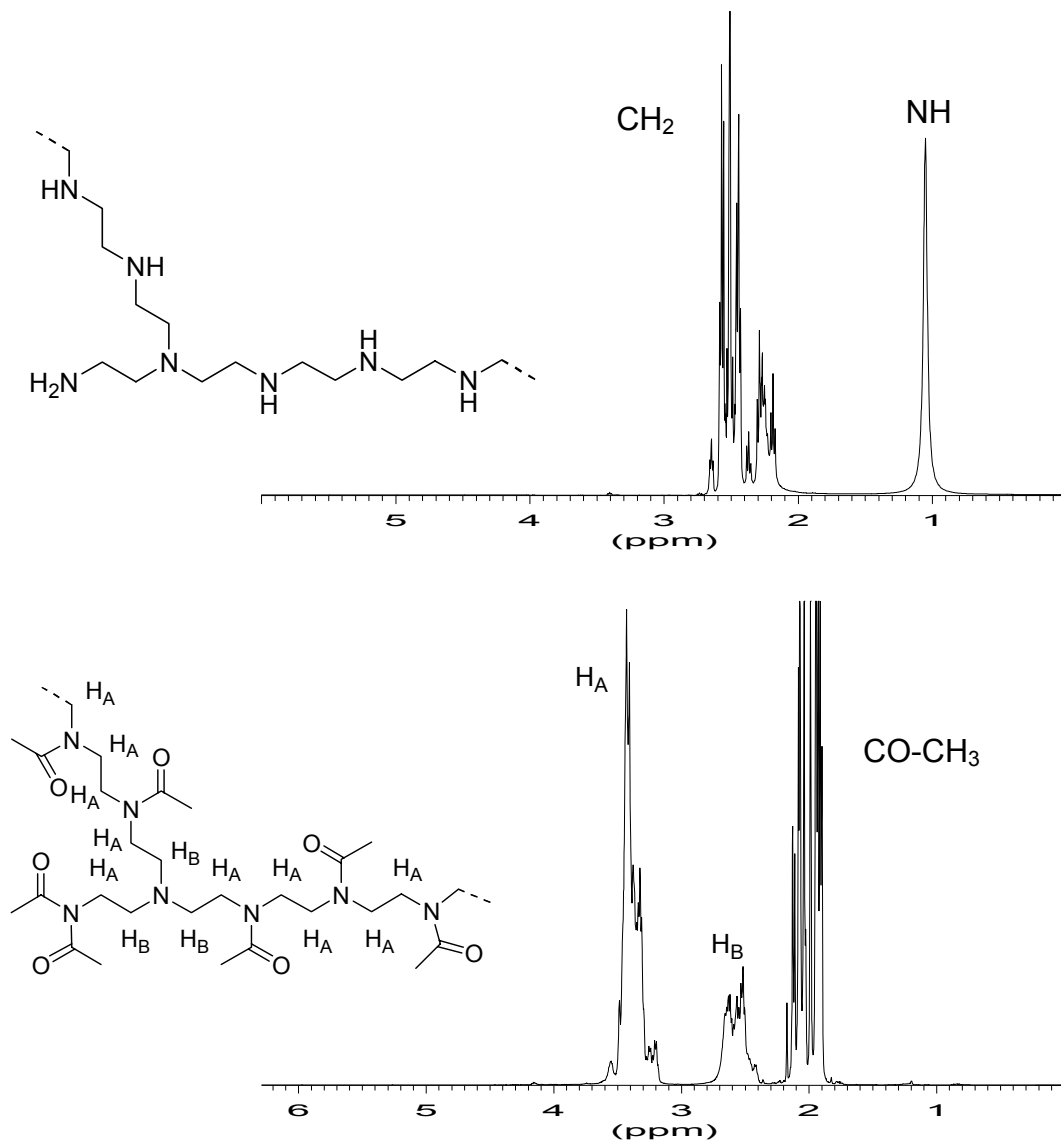
Die Größe von PEI wird konventionell über Viskositätsmessungen, Lichtbrechungsexperimente und Gelpermeationschromatographie bestimmt. Eine andere Methode bedient sich der Daten der Elementaranalyse und berechnet aus der allgemeinen Summenformel das durchschnittliche Molekulargewicht. Die Berechnung wurde bereits in Kap. 4.1.2 aufgeführt. Die Gültigkeit dieser Formel ist durch Variation der Verzweigung nicht beeinträchtigt.

Die Bestimmung des Verzweigungsgrades wurde für große PEIs mit Hilfe der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie bestimmt.<sup>[168]</sup> Für die hier verwendeten kleinen PEIs wurde eine neue Methode entwickelt, die auf der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie basiert und welche präzisere Ergebnisse auf einem einfachen Weg liefert. Dazu wurden die zu untersuchenden PEIs mit Acetanhydrid/Pyridin peracetyliert. Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren zeigen für die Protonen der PEI- $\text{CH}_2$ -Gruppen, welche einem acetylierten Stickstoff benachbart sind, eine Tieffeldverschiebung im Vergleich zu denjenigen PEI- $\text{CH}_2$ -Protonen, die direkt neben einem tertiären Amin liegen. Durch Bildung des Verhältnisses zwischen diesen beiden Integralen, kann die Anzahl an tertiären Aminen und daraus auch die Anzahl an primären und sekundären Aminen berechnet werden.

Es wurden zwei niedermolekulare PEIs verwendet. Aus der Elementaranalyse folgt nach Berechnung des N/C-Verhältnisses für den Polymerisationsgrad  $n$  und für das Molekulargewicht:

$$\text{PEI-1:} \quad n = 5.27 \quad \Rightarrow \quad M_n = 243.65 \text{ g/mol}$$

$$\text{PEI-2:} \quad n = 8.132 \quad \Rightarrow \quad M_n = 366.70 \text{ g/mol}$$



**Abb. 4-18:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von PEI-1 (oben) und peracetyliertem PEI-1 (unten) (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

Die Berechnung der Anzahl an tertiären Aminen pro PEI-Molekül soll anhand des PEI-1 erklärt werden. Aus dem NMR-Spektrum des peracetylierten PEIs ergibt sich nach Integration ein Verhältnis von (primär + sekundär): tertiär = 1 : 0.36 (Abb. 4-18).

A: Gesamtzahl der Amine pro g für M<sub>n</sub> 243.65 g/mol in mmol N/g

x: tertiäre Amine pro g

$$A = \frac{5.27 + 1}{M_n} = 25.73 \text{ mmol N/g}$$

$$\text{Primär} : x + \frac{2 \cdot 1000}{M_n} = x + 8.208$$

$$\text{Sekundär} : A - \text{primär} - \text{tertiär} = 25.73 - 2x - 8.208$$

$$\text{aus NMR} : \frac{\text{tertiär}}{\text{sekundär} + \text{primär}} = \frac{6 \cdot x}{[4 \cdot (25.73 - 2 \cdot x - 8.208) + 2 \cdot (x + 8.208)]} = 0.36$$

$$\Rightarrow x = 3.816 \text{ mmol N / g tertiäre Amine} \Rightarrow \text{pro PEI - 1 Monomer } 0,93 \text{ tertiäre Amine}$$

Bei der Quotientenbildung tertiär / (sekundär + primär) gehen die Anzahl der benachbarten CH<sub>2</sub>-Protonen der jeweiligen Amine mit in die Berechnung ein.

Die Ergebnisse der Bestimmung für die Anzahl primärer, sekundärer und tertiärer Amine in den verwendeten PEIs sind in Tab. 4-4 zusammengefasst. Für eine statistische Polymerisation von Aziridin hätte man 38 % tertiäre Amine erwartet, was 2.4 und 3.5 tertiäre Amine pro Monomer für die verwendeten PEIs entsprechen würde. Diese niedermolekularen Polymere zeigen eine signifikante Reduzierung des Verzweigungsgrades, welche vorteilhaft für die nachfolgende Funktionalisierung und den Gebrauch als hochbeladenes Polymer in der polymerunterstützten Lösungssynthese ist.

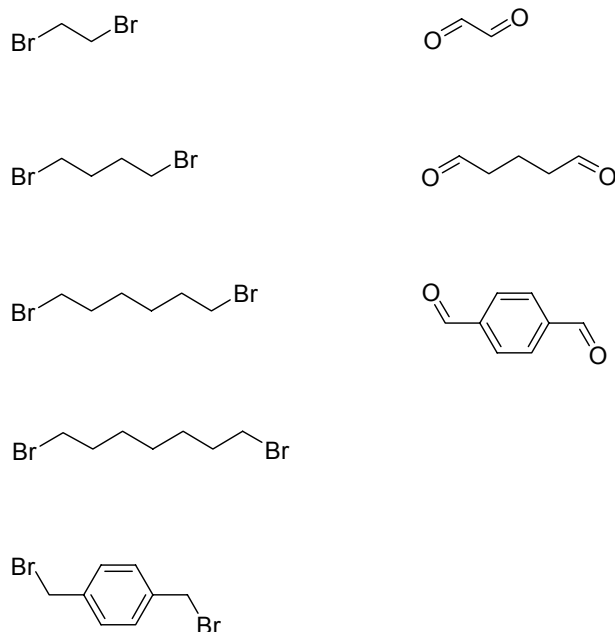
**Tab. 4-4: Ergebnisse der Charakterisierung von PEI-1 und PEI-2.**

	PEI-1	PEI-2
Polymerisationsgrad n	5.27	8.132
M <sub>n</sub> [g/mol]	243.65	366.7
A [mmol N / g]	25.73	24.90
Primäre Amine pro Monomer	2.93 (46.71 %)	3.52 (37.81 %)
Sekundäre Amine pro Monomer	2.41 (38.42 %)	4.09 (44.78 %)
Tertiäre Amine pro Monomer	0.93 (14.81 %)	1.52 (16.65 %)

### 4.2.3 Variation der Vernetzer

Für die Optimierung der Ultraharze wurden zunächst verschiedene Crosslinker getestet. Generell wäre es ökonomischer, wenn die Herstellung der Harze in einem Reaktionsschritt gelingen würde. Dazu eignen sich Dihalogenverbindungen, die mit den Aminen in einer nukleophilen Substitution eine Vernetzung des PEIs eingehen. Viele Beispiele für den Einsatz von Dibromalkanen sind in der Literatur bekannt, jedoch werden hier meist höhermolekulare Polymere verwendet. Es muss weiter bedacht werden, in wie weit die Natur des Crosslinkers und der Mechanismus der Vernetzungsreaktion die physikalischen Eigenschaften der Polymere bestimmen.

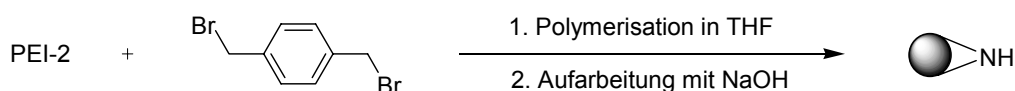
Der zweite Parameter, der variiert wurde, ist die Menge an Crosslinker. Allgemein nimmt die mechanische Stabilität mit zunehmendem Anteil an Vernetzer zu, während gleichzeitig die Quelleigenschaften der Polymere schlechter werden. Für die Vernetzung von PEI gibt es sowohl eine minimale Menge an Crosslinker, der verwendet werden muss, um ein mechanisch noch stabiles Polymer zu bekommen. Genauso gibt es eine Obergrenze, über der keine vollständige Reaktion des Crosslinkers mit dem PEI mehr stattfindet. Beide Grenzen hängen stark von der Größe des PEIs und von der Natur des Crosslinkers ab.



**Abb. 4-19: Dibromverbindungen und Dialdehyde als potentielle Crosslinker.**

Für die Polymerisation von PEI-1 bzw. PEI-2 mit den in Abb. 4-19 aufgeführten Dibromalkanen wurden verschiedene Vorschriften getestet. Bei Verwendung der kurzkettigen Vernetzer 1,2-Dibromethan bzw. 1,4-Dibrombutan mit Natriumhydroxid als

Base und einer wässrigen Lösung von PEI bei 100 °C,<sup>[157]</sup> wurde nur ein sehr fein verteiltes Polymer in niedrigen Ausbeuten erhalten, welches sehr schlechte Quelleigenschaften in organischen Lösungsmitteln zeigte. Auch bei der Polymerisation in THF wurde keine Verbesserung erzielt. In einer anderen Variante zur Herstellung von vernetztem PEI, wurde die Polymerisation in heterogener Phase durchgeführt.<sup>[151]</sup> Dazu wurde 1,4-Dibrombutan in Petrolether gelöst und mit einer wässrigen Lösung des PEIs unter Verwendung eines Emulgators bei 100 °C erhitzt. Hier bildete sich auch nach längerer Reaktionszeit kein Polymer. Die Polymerisation mit 1,6-Dibromhexan bzw. 1,7-Dibromheptan in THF bei 50 °C lieferte mechanisch instabile Polymere. Lediglich bei der Verwendung von Dibrom-p-Xylol (1,4-Bis(brommethyl)benzol) für die Polymerisation mit PEI-2 wurde ein mechanisch stabiles Polymer erhalten. Beide Komponenten wurden in THF gelöst, die Menge an Crosslinker entsprach der Menge an Terephthalaldehyd, der zur Synthese des Ultraharzes in Kap. 4.1.2 verwendet wurde. Dabei bildete sich spontan ein Polymer, was nach Waschen mit NaOH und Trocknen im Vakuum ähnliche Quelleigenschaften zeigte, als das dazu analog mit Terephthalaldehyd vernetzte Ultraharz, jedoch bei der Funktionalisierung wesentlich niedrigere Beladungen lieferte.



**Abb. 4-20: Synthese von Ultraharz mit Dibrom-p-Xylol als Crosslinker.**

Abschließend lässt sich feststellen, dass die Vernetzung von niedermolekularem PEI mit Dibromalkanen meist zu mechanisch instabilen Polymeren in niederen Ausbeuten führt. Die Verwendung von Dibrom-p-Xylol lieferte zwar ein mechanisch stabiles Harz, jedoch zeigte es wahrscheinlich auf Grund einer unregelmäßigen und auf primäre Amine unselektive Vernetzungsreaktion schlechtere Zugänglichkeiten. Auch die höheren Kosten für das Dibrom-p-Xylol im Vergleich zum entsprechenden Terephthalaldehyd müssen für eine kostengünstige Synthese der Harze berücksichtigt werden.

Da Dialdehyde bevorzugt mit primären Aminen in Anwesenheit von sekundären und tertiären Aminen reagieren, liefern sie nach reduktiver Aminierung Polymere, mit der höchstmöglichen Zahl an chemisch funktionalisierbaren sekundären Aminen. Bei der Verwendung von Glyoxalaldehyd als Vernetzer für die verwendeten niedermolekularen PEIs wurde auch nach Variation des Crosslinkeranteils kein Polymer erhalten. Vermutlich laufen hier bevorzugt intramolekulare Reaktion ab. Die Polymerisation von PEI-1 mit Glutaraldehyd wurde in wässriger Lösung bei RT durchgeführt. Dabei bildete sich spontan

ein gelb-weißes Polymer, was nach Reduktion und Aufarbeitung ein gelförmiges, mechanisch labiles Harz lieferte, welches für den Einsatz in der Festphasenchemie nicht geeignet war. Die Verwendung des starrereren Terephthalaldehyds als Crosslinker ergab in einer thermodynamischen Gleichgewichtsreaktion mechanisch stabile Harze mit sehr guten Quelleigenschaften, so dass dieser für die weitere Optimierung der Ultraharze verwendet wurde.

#### **4.2.4 Synthese von Ultraharzen mit unterschiedlichen Mengen an Vernetzer**

Durch die Synthese von unterschiedlich stark vernetzten Ultraharzen und durch den Gebrauch von Ausgangspolymeren mit unterschiedlichen Molekulargewichten, sollte eine Reihe von Harzen hergestellt werden, die nach Charakterisierung und Funktionalisierung eine Aussage zulassen, welches Harz für den Einsatz in der Festphasensynthese am besten geeignet ist.

Die Synthese von Ultraharzen mit unterschiedlichen PEIs und unterschiedlichen Mengen an Terephthalaldehyd als Crosslinker wurde analog zur bereits in Kap. 4.1.2 beschriebenen Darstellung durchgeführt. Um die Reproduzierbarkeit der Synthesevorschrift zu gewährleisten, wurde die Konzentration des PEIs und des Crosslinkers in THF konstant gehalten. Über die Kenntnis der Verteilung von primären, sekundären und tertiären Aminen in PEI-1 bzw. PEI-2, konnte das theoretische Verhältnis zwischen Crosslinker und PEI genau berechnet werden. Unter der Annahme, dass die primären Amine bevorzugt mit Terephthalaldehyd reagieren, konnte auch die theoretische Anzahl an sekundären und tertiären Aminen in den einzelnen Ultraharzen ermittelt werden.

Es wurden Ultraharze mit verschiedenen Anteilen an Crosslinkern hergestellt. Dabei lagen die Verhältnisse von Crosslinker und PEI zwischen 1.2 und 2.8 Molekülen pro PEI-Kette. Die Polymerisation wurde in THF durchgeführt, die Konzentration des PEI-1 betrug 1.72 mmol/ml und die des PEI-2 1.15 mmol/ml. Die Konzentration des Vernetzers variierte zwischen 0.7 und 0.94 mmol/ml. Hier konnte die Konzentration aufgrund der Löslichkeit des Terephthalaldehyds in THF nicht beliebig erhöht werden. Das Minimum an Terephthalaldehyd bei der Reaktion mit PEI-1 und PEI-2 lag bei einem Crosslinkeranteil von 1.5 Molekülen pro PEI-Kette. Bei Verringerung dieses Verhältnisses wurde unter den



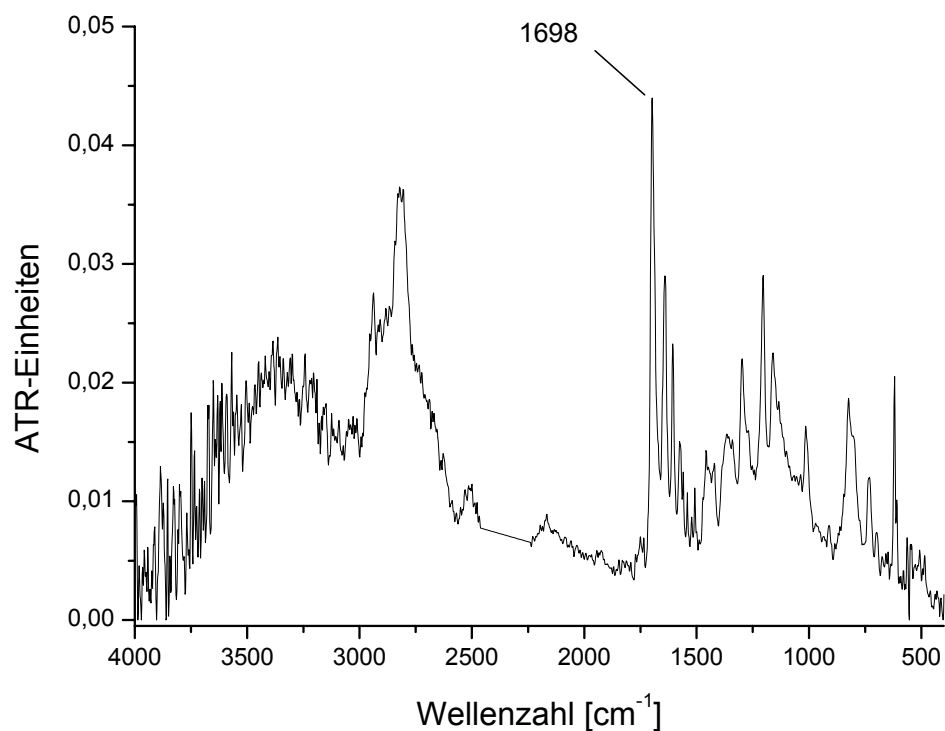
vorgegebenen Polymerisationsbedingungen kein Polymer mehr erhalten. Auch durch Verkleinerung der Konzentration von PEI und Crosslinker bildete sich kein festes Polymer, welches für den Einsatz in der Festphasenchemie geeignet wäre. Die maximale Menge an Terephthalaldehyd, die noch mit dem PEI vollständig abreagierte, lag bei einem Verhältnis von 2.1 für PEI-1 und 2.8 für PEI-2. Bei Vergrößerung des Vernetzeranteils wurde ein sehr hartes, transparent bleibendes Polymer erhalten, welches sich nur unvollständig reduzieren und sehr schwer aufarbeiten ließ. Die Unvollständigkeit der Vernetzung wurde durch FT-ATR-IR-Spektroskopie aufgeklärt. Die Anwesenheit einer Carbonylschwingung bei  $1698\text{ cm}^{-1}$  war charakteristisch für den eingesetzten Terephthalaldehyd (Abb. 4-21). Bei vernetzten PEIs, die einen sehr hohen Crosslinkeranteil haben, kann es aufgrund der hohen Konzentration an Vernetzermolekülen zur Bildung von intramolekularen Brücken kommen. Dabei werden innerhalb einer PEI-Kette Ringe gebildet. Diese Crosslinkermoleküle tragen nicht zur eigentlichen Vernetzung zwischen den einzelnen PEI-Ketten bei, so dass hier eventuell auch eine schwächere Vernetzung vorliegen kann, als bei einem Polymer mit niederem Crosslinker/PEI-Verhältnis.

**Tab. 4-5: Synthese von Ultraharzen (UH) durch Vernetzung von PEI-1 und PEI-2 mit unterschiedlichen Mengen an Terephthalaldehyd (TPA) als Crosslinker.**

Harz	PEI	n(PEI) [mmol]	n(TPA) [mmol]	Crosslinker/PEI Verhältnis	Reaktionszeit [min]
UH 1	PEI-1	17.2	25.6	1.5	13
UH 2	PEI-1	17.2	29.1	1.7	10
UH 3	PEI-1	17.2	36.2	2.1	15
	PEI-1	17.2	43.2	2.5	-
	PEI-2	11.5	14.1	1.2	-
UH 4	PEI-2	11.5	17.6	1.5	10
UH 5	PEI-2	11.5	24.8	2.2	10
UH6	PEI-2	11.5	32.0	2.8	60

Tab. 4-5 gibt die theoretischen Crosslinker/PEI-Verhältnisse sowie die eingesetzten Mengen an. Die Reaktionszeit bezieht sich auf die Zeit, wie lange der Rührfisch noch in der

Lage ist, sich frei zu bewegen, bevor die Ausbildung des polymeren Netzwerkes die Viskosität der Lösung so stark erhöht hat, dass ein freies Rotieren nicht mehr möglich ist. Dabei erwärmten sich die Lösungen unmittelbar nach Beginn der Reaktion auf 38 – 45 °C. Die Reaktionszeiten lagen zwischen 10 und 15 min mit Ausnahme von UH 6, bei dem sich erst nach 60 min ein festes Polymer bildete. Hier kann es aufgrund des hohen Anteils an Vernetzer zu den oben beschriebenen intramolekularen Ringbildungen kommen, und es erfolgt erst später eine intermolekulare Vernetzung der Polymerketten.



**Abb. 4-21: FT-ATR-IR-Spektrum von unvollständig vernetztem PEI nach Polymerisation.**

Die Reduktion und Aufarbeitung der Harze erfolgte nach der in Kap. 4.1.2 beschriebenen Vorgehensweise. Alle Harze wurden in die freie Aminform überführt. Die Charakterisierung mittels Elementaranalyse zeigte anhand von negativen Analysen auf Chlor die vollständige Umsetzung in die Aminform. Die Beladung der einzelnen Polymere mit Stickstoff ist in Tab. 4-6 aufgeführt. Alle FT-ATR-IR-Spektren der einzelnen Harze bewiesen die vollständige Polymerisation durch Abwesenheit von charakteristischen Banden des Terephthalaldehyds sowie die komplette Reduktion der Iminform der Polymere.

Für die Berechnung der sekundären und tertiären Amine in den Polymeren wurden die Ergebnisse der Charakterisierung der verwendeten PEIs als Grundlage genommen. Es wurde davon ausgegangen, dass die primären Amine der PEIs vollständig mit den Crosslinkermolekülen unter der Bildung von sekundären Aminen abreagieren und der restliche Anteil an Vernetzer mit vorhandenen sekundären Aminen unter der Bildung von tertiären Aminen reagiert. Durch die eingesetzte Menge an PEI und Terephthalaldehyd kann die Menge an primärer, sekundärer und tertiärer Amine berechnet werden. Teilen durch die Masse des entstehenden Polymers ergibt die Beladung mit sekundären und tertiären Aminen bei 100 % Umsatz. Die Vorgehensweise wird anhand des Harzes UH 2 erläutert.

UH 2 TPA: 29.1 mmol  $\equiv$  3.9 g

PEI-1: 17.2 mmol  $\equiv$  4.2 g

mit  $n = 5.27 \Rightarrow 108.1$  mmol Amine

davon 50.5 mmol primär, 41.8 mmol sekundär, 16.1 mmol tertiär

Gesamtmasse des Harzes bei 100 % Umsatz: 7.17 g

58.2 mmol Amine sind nach Polymerisation vernetzt

Zahl der sekundären Amine:  $41.8 \text{ mmol} + 101 \text{ mmol} - 58.2 \text{ mmol} = 84.6 \text{ mmol}$

Zahl der tertiären Amine: aus PEI: 16.1 mmol

aus Vernetzung:  $58.2 \text{ mmol} - 50.5 \text{ mmol} = 7.7 \text{ mmol}$

$\Rightarrow$  Beladung des Harzes UH 2 an sekundären Aminen: 11.8 mmol/g

$\Rightarrow$  Beladung des Harzes UH 2 an tertiären Aminen: 3.3 mmol/g

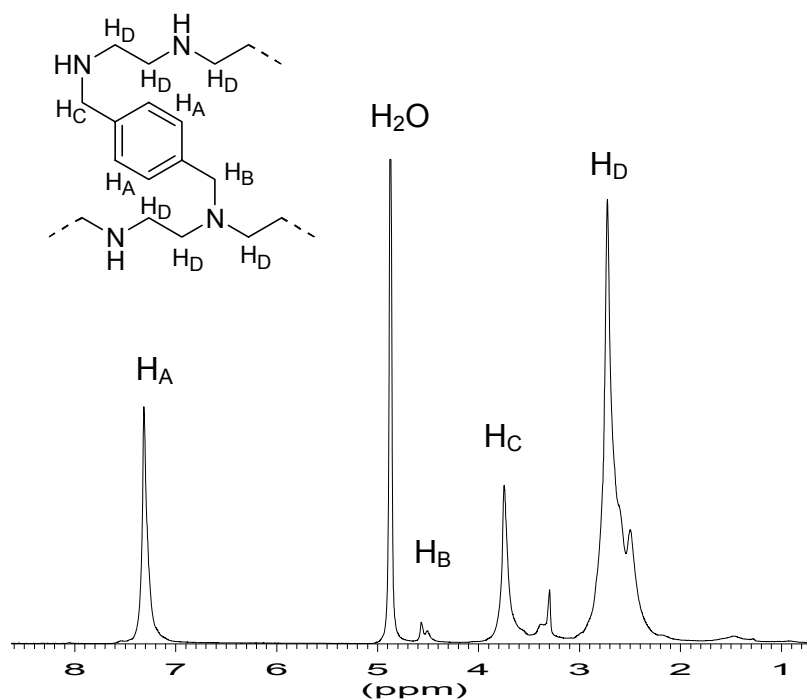
Tab. 4-6 gibt die berechneten Beladungen an sekundären und tertiären Aminen an. Ein Vergleich mit der Gesamtzahl an Aminen aus der Elementaranalyse zeigt gute Übereinstimmungen mit den berechneten Werten.

**Tab. 4-6: Ergebnisse der Beladungsberechnungen von sekundären und tertiären Aminen in den Ultraharzen UH 1 bis UH 6 und Vergleich mit Daten aus der Elementaranalyse.**

<b>Harz</b>	<b>Beladung an N aus EA [mmol/g]</b>	<b>Sekundäre Amine (theor.) [mmol/g]</b>	<b>Tertiäre Amine (theor.) [mmol/g]</b>	<b>Verhältnis EA/theor.</b>
UH 1	14.3	13.4	2.4	0.91
UH 2	13.7	11.8	3.3	0.91
UH 3	13.3	8.9	4.8	0.97
UH 4	14.8	15.1	2.9	0.83
UH 5	14.6	11.3	4.0	0.96
UH 6	13.8	8.3	5.5	1.00

#### 4.2.5 <sup>1</sup>H-Gelphasen MAS NMR-Untersuchungen

Eine ausführliche Charakterisierung der Ultraharze in der freien Aminform erfolgte mit Hilfe der hochauflösenden <sup>1</sup>H-Gelphasen MAS NMR-Spektroskopie. Dazu wurden die Polymere in deuteriertem Methanol gequollen und mit einer Rotationsfrequenz von 4500 Hz unter MAS-Bedingungen vermessen. Die Spektren zeigten gut aufgelöste Signale der PEI-CH<sub>2</sub>-Protonen (H<sub>D</sub>), sowie die benzylichen CH<sub>2</sub>-Protonen und die aromatischen Protonen des Terephthalaldehyds (H<sub>A</sub>). Die benzylichen Methylenprotonen spalteten in zwei Signale auf, einmal in die Protonen, die einem sekundären Amin benachbart sind (H<sub>C</sub>) und einmal in die Protonen, die einem tertiären Amin benachbart sind (H<sub>B</sub>).



**Abb. 4-22:**  $^1\text{H}$  MAS NMR-Spektrum von UH 4 (400 MHz, MeOD, MAS 4500 Hz).

Durch Integration der Methylenprotonen des PEIs und des aromatischen Signals konnte das Verhältnis von Crosslinker und PEI im Harz experimentell überprüft werden. Die Aufspaltung der benzylicischen  $\text{CH}_2$ -Protonen gestattete die Ermittlung an tertiären Aminen, die durch die Vernetzung entstanden sind.

Für die Berechnung des experimentellen Verhältnisses zwischen Crosslinker und PEI müssen die Integrale aus den NMR-Spektren für die aromatischen Protonen des Vernetzers und für die Methylenprotonen des PEIs entsprechend ihrer Anzahl pro Molekül gewichtet werden. Jedes Terephthalaldehydmolekül hat vier aromatische Protonen, so dass der Integralwert durch vier geteilt werden muss. Für die Berechnung der durchschnittlichen Anzahl an Methylenprotonen des PEIs wird der Polymerisationsgrad  $n$  verwendet. Jede Ethylenimineinheit hat wiederum vier Methylenprotonen, so dass sich die Gesamtzahl der Protonen pro PEI-Molekül zu 21.08 für PEI-1 ( $n = 5.27$ ) bzw. 32.53 für PEI-2 ( $n = 8.132$ ) ergibt. Auch hier muss der Wert des Integrals durch die entsprechende Anzahl der Protonen geteilt werden. Das Integral für die PEI- $\text{CH}_2$ -Protonen wird bei allen Spektren auf den Wert 100 gesetzt, die anderen Integrale ergeben sich relativ dazu. Das Verhältnis zwischen Vernetzer und PEI folgt durch Quotientenbildung der beiden ermittelten Werte nach Berücksichtigung der Anzahl der jeweiligen Protonen. Die Ergebnisse sowie ein Vergleich mit den theoretischen Verhältnissen sind in Tab. 4-7 aufgeführt.

**Tab. 4-7: Ergebnisse der NMR-Untersuchungen zur Bestimmung der Crosslinkeranteile und der Anzahl an tertiären Aminen in Ultraharzen.**

Harz	Korrigierte Integrationswerte		Crosslinker pro PEI			Tertiäre Amine [mmol/g]	
	Arom. H	PEI-CH <sub>2</sub>	Exp.	Theor.	Exp./theor	Exp.	Theor.
UH 1	7.075	4.74	1.49	1.5	0.99	2.8	2.4
UH 2	7.825	4.74	1.65	1.7	0.97	3.2	3.3
UH 3	9.05	4.74	1.91	2.1	0.91	4.5	4.8
UH 4	4.925	3.07	1.60	1.5	1.06	3.5	2.9
UH 5	6.325	3.07	2.06	2.2	0.94	3.7	4.0
UH 6	8.05	3.07	2.62	2.8	0.94	5.7	5.5

Die sehr guten Übereinstimmungen der aus der NMR-Spektroskopie erhaltenen Werte mit den theoretischen zeigen, dass für alle hergestellten Ultraharze eine vollständige Umsetzung der Vernetzermoleküle mit den eingesetzten PEIs stattgefunden hat.

Für die Bestimmung der tertiären Amine der Ultraharze, welche durch die Vernetzung entstehen, können die beiden Signale der benzylicischen Methylenprotonen herangezogen werden. Durch Integration der Signale von H<sub>B</sub> und H<sub>C</sub> und durch Quotientenbildung kann die Prozentzahl an tertiären Aminen ermittelt werden, die nur durch die Vernetzung entsteht. Dabei muss beachtet werden, dass pro Crosslinkermolekül zwei Amine vernetzt werden, und deshalb der erhaltene Prozentwert für die Umrechnung auf die Anzahl von tertiären Aminen mit zwei multipliziert werden muss. Die exakte Berechnung wird anhand der Ergebnisse für Ultraharz UH 2 erläutert.

UH 2:            aus NMR:    Integral für H<sub>B</sub>            1.87    Integral für H<sub>C</sub>            28.23

$$\Rightarrow \text{Prozentwert tertiäre Amine, die durch Vernetzung entstehen: } 2 \cdot \frac{H_B}{H_B + H_C} = 12.425 \%$$

In Ultraharz UH 2 sind theoretisch insgesamt 58.14 mmol Amine vernetzt, davon tertiäre Amine:            58.14 mmol · 0.12425 = 7.224 mmol.

Die Anzahl an tertiären Aminen aus dem PEI-1 beträgt 16.01 mmol.

Die Gesamtmasse des Polymers bei einem Umsatz von 100 % beträgt 7.17 g.

⇒ Beladung an tertiären Aminen von UH 2 anhand von NMR-Daten: 3.2 mmol/g.

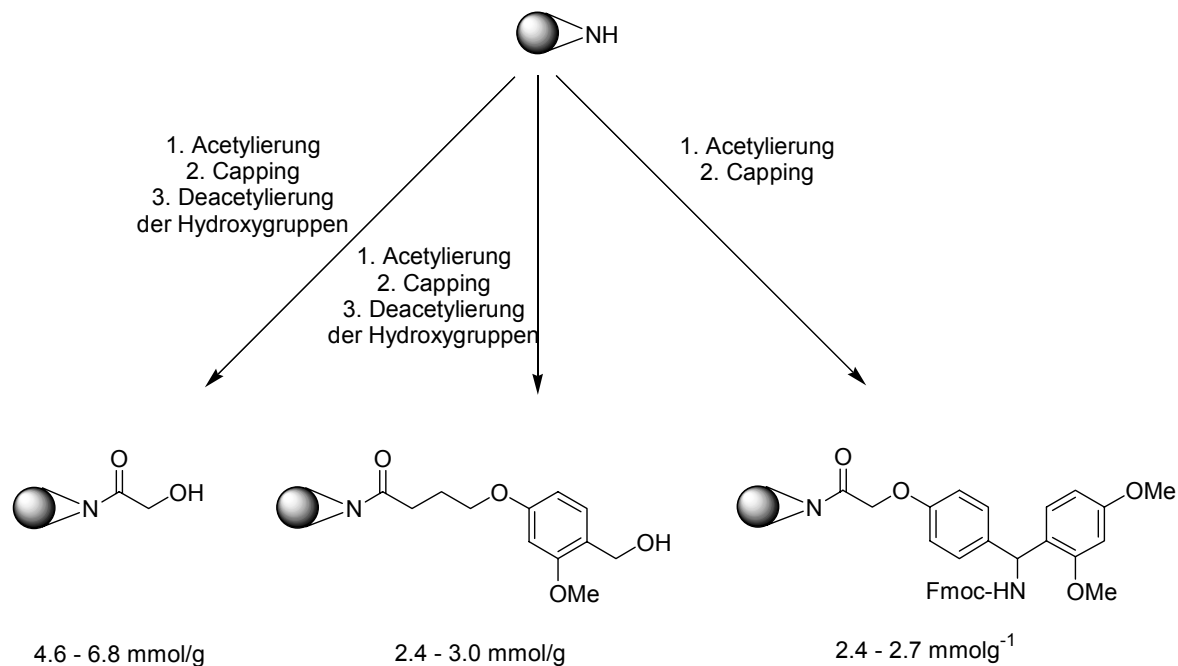
Die Ergebnisse der experimentellen Bestimmung der Gesamtzahl an tertiären Aminen der Ultraharze sind in Tab. 4-7 aufgeführt. Auch hier zeigt sich wieder eine gute Übereinstimmung mit den in Kap. 4.2.4 errechneten Werten.

Die Bestimmung des Verhältnisses von Crosslinker und PEI und die Bestimmung der Beladung an tertiären Aminen unterliegen verschiedenen Fehlerquellen. Alle Berechnungen basieren auf der Bestimmung des mittleren Molekulargewichtes der PEIs aus dem N/C-Verhältnis der Elementaranalyse. Hier können schon kleine Abweichungen relativ große Änderungen bewirken. Die guten Übereinstimmungen der experimentellen mit den theoretischen Werten zeigen, dass die Reaktionen vollständig verlaufen sind und dass die Eigenschaften der Ausgangspolymere korrekt ermittelt wurden.

#### 4.2.6 Kupplung von Linkermolekülen an Ultraharze

Für den Einsatz in der Festphasensynthese mussten die Ultraharze mit geeigneten Linkermolekülen funktionalisiert werden. Darüber hinaus offenbarte die Kupplung von verschiedenen Linkern wichtige Informationen über die synthetische Zugänglichkeit der hochbeladenen Ultraharze. Dafür wurden drei Linker eingesetzt, die sich in ihrem Molekulargewicht, ihrer sterischen Anforderung und in ihren funktionellen Gruppen für die weitere Festphasensynthese unterscheiden. Alle sechs hergestellten Ultraharze UH 1 bis UH 6 wurden mit 2-Acetoxyessigsäurechlorid, acetylgeschütztem HMPB-Linker und Fmoc-geschütztem Rinkamid-Linker gekuppelt. Die Bedingungen für die Synthesen sind analog zu den in Kap. 4.1.4 beschriebenen Vorschriften. Nach Immobilisierung der geschützten Linker folgte für alle Harze ein Cappingschritt mit Acetanhydrid/DiPEA, um noch vorhandene Amine des Polymerbackbones zu acetylieren. Die Vollständigkeit der Reaktionen wurde durch negativen Chloraniltest festgestellt. Nach Deacetylierung der 2-Acetoxyacetamidharze und der acetylgeschützten HMPB-Harze mit 0.5 M Natriummethanolat-Lösung, erfolgte die Bestimmung der Beladung der Harze durch Kupplung von Fmoc-Glycin unter Aktivierung mit DIC/HOBt. Nach zweimaliger Kupplung wurden die Beladungen nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe durch photospektrometrische Quantifizierung des Dibenzofulvens bestimmt. Der

Reaktionsfortschritt der einzelnen Synthesen wurde anhand der FT-ATR-IR-Spektroskopie dokumentiert.



**Abb. 4-23: Schema für die Synthese linkermodifizierter Ultraharze.**

Die Beladung der Harze wurde auf die jeweilige funktionelle Gruppe der Linker bezogen. Die Berechnung der prozentualen Ausbeute erfolgte unter Berücksichtigung des Massenzuwachses durch Anbringen der Linker. Als effektive Ausgangsbeladung der unfunktionalisierten Harze UH 1 bis UH 6 wurden die in Kap. 4.2.4 berechneten theoretischen Beladungen an sekundären Aminen zu Grunde gelegt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4-8 zusammengefasst.

**Tab. 4-8: Ergebnisse der Linkerkupplungen an Ultraharze UH 1 bis UH 6.**

Harz	2-Hydroxy- acetamid Harze [mmol/g]	HMPB Harze [mmol/g]	Rinkamid Harze [mmol/g]
UH 1	5.5 (74 %)	2.8 (86 %)	2.4 (91 %)
UH 2	5.8 (86 %)	2.6 (81 %)	2.3 (90 %)
UH 3	4.9 (87 %)	2.9 (quant.)	2.4 (quant.)
UH 4	4.6 (58 %)	2.4 (71 %)	2.7 (quant.)



UH 5	6.8 (quant.)	3.0 (94 %)	2.6 (quant.)
UH 6	5.6 (quant.)	2.9 (quant.)	2.4 (quant.)

Die Ergebnisse der Beladungsbestimmungen zeigen, dass die Kupplung von Linkern an allen Ultraharzen sehr effizient und in hohen Ausbeuten durchgeführt werden kann. Die Aktivierung mit DIC/HOAt ermöglicht bei manchen Harzen bei nur geringem Überschuss an Reagenz eine quantitative Kupplung.

Alle Rinkamidharze zeigen sehr hohe Kupplungsausbeuten (zwischen 91 % und quantitativ), was wiederum die ausgezeichnete Zugänglichkeit zu den Aminen der Ultraharze demonstriert. Selbst die Größe des Linkermoleküls und die sterische Hinderung durch die Fmoc-Schutzgruppe gestatten die Acylierung aller Amine bei nahezu allen Harzen. Die Quelleigenschaften der Rinkamidharze sind in organischen Lösungsmitteln sehr gut. Ein Einfluss des Vernetzungsgrades der Harze auf die Kupplungsausbeuten ist nicht zu beobachten.

Die HMPB-Harze weisen Beladungen zwischen 2.4 und 2.9 mmol/g auf, was Ausbeuten zwischen 71 % und quantitativem Umsatz entspricht. Auch hier zeigt sich die ausgezeichnete Zugänglichkeit der Substrate zu den reaktiven Zentren der Harze. Generell sollten die Beladungen mit zunehmendem Vernetzungsgrad aufgrund der kleineren Zahl an acylierbaren Aminen abnehmen. Dieser Trend ist bei den HMPB-funktionalisierten Harzen nicht eindeutig erkennbar. Da hier für die Beladungsbestimmung ein extra Syntheseschritt nötig ist, kann dies mit unvollständigen Veresterungen der Hydroxyfunktionen der HMPB-Harze mit Fmoc-Glycin erklärt werden.

Die höchsten Beladungen zeigen aufgrund des kleinen Molekulargewichtes des Linkers die 2-Hydroxyacetamidharze. Hier wurden nach Kupplung von Fmoc-Glycin Beladungen von 4.6 bis zu 6.8 mmol/g erhalten. Auch hier lässt sich wie bei den HMPB-Harzen kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Vernetzungsgrad und Beladung feststellen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die unvollständige Veresterungen der Hydroxyfunktionen sein.

Die ausgezeichnete Zugänglichkeit der Amine der Ultraharze konnte an Hand von Kupplungen verschiedener Linker eindrucksvoll demonstriert werden. Alle Harze wurden schnell und mit geringen Überschüssen an Reagenzien effektiv funktionalisiert. Der

Reaktionsfortschritt konnte ebenfalls durch einen großen Massenzuwachs der Harze gezeigt werden. Die Berechnung der theoretischen Beladungen für die linkermodifizierte Harze beinhaltet nicht den Massenzuwachs, der durch den Cappingschritt hinzukommt. Das hat zur Folge, dass die prozentualen Ausbeuten der Kupplungen in praxi etwas höher liegen, als hier angegeben. Der Einfluss des Vernetzungsgrades der einzelnen Harze auf die Zugänglichkeit von Substraten ist nur sehr gering.

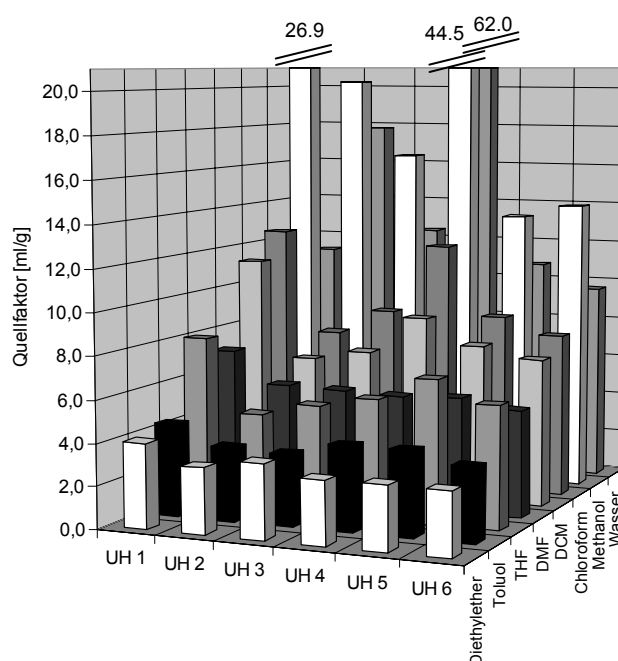
#### **4.2.7 Untersuchung des Quellverhaltens**

Das Quellen eines gelartigen Polymers in einem Lösungsmittel ist eine hinreichende Bedingung für eine erfolgreiche chemische Transformation. Quellfaktoren geben das Gesamtvolumen aus Harz und aufgenommenem Lösungsmittel an, bezogen auf die Masse des Harzes. Es gibt allgemein zwei verschiedene Möglichkeiten zur Bestimmung der Quellfaktoren. Durch Messen des Durchmessers eines einzelnen Beads im trockenen und im gequollenen Zustand unter dem Mikroskop kann nach Bestimmung der Dichte des Harzes der Quellfaktor berechnet werden.<sup>[169]</sup> Bei einer eher makroskopischen Bestimmung des Quellfaktors wird eine bestimmte Menge an trockenem Harz eingewogen, Lösungsmittel zugegeben und für eine gewisse Zeit geschüttelt. Nach einer Equilibrierungszeit von einer Stunde in Ruhe, wird das überschüssige Lösungsmittel abgesaugt, und das Volumen des gequollenen Harzes gemessen. Durch Quotientenbildung aus gemessenem Volumen und eingewogener Menge an trockenem Harz, kann der Quellfaktor berechnet werden.<sup>[99]</sup>

Da die hergestellten Ultraharze keine Beadstruktur besitzen, wurde zur Bestimmung der Quellfaktoren die zweite Variante angewendet. Alle sechs Ultraharze wurden in der freien Aminform, als 2-Hydroxyacetamidharze und als Fmoc-geschützte Rinkamidharze auf ihre Quellfähigkeiten in einer Reihe von Lösungsmitteln untersucht. Jede Bestimmung wurde dreimal wiederholt, um einen verlässlichen Durchschnittswert zu erhalten.

Trotz ihrer hohen Polarität zeigten alle Ultraharze in der freien Aminform in unpolaren Lösungsmitteln sehr gute Quelleigenschaften. Das Quellen in polaren Lösungsmitteln ist bei allen Harzen sehr hoch. Herausragend sind die Faktoren für Methanol und vor allem für Wasser, wobei hier durch Absenken des pH-Wertes der Effekt durch Protonierung der Harze noch wesentlich verstärkt werden kann (bis zu 180 ml/g bei pH 0).

Die beiden Ultraharze mit den kleinsten Mengen an Vernetzer, UH 1 und UH 4, zeigen wie erwartet die höchsten Quellfaktoren. Ansonsten nehmen die Quellfaktoren mit zunehmendem Anteil an Crosslinker ab. Abweichungen in dieser Reihe innerhalb eines Lösungsmittels können durch intramolekulare Ringbildungen des PEIs bei der Polymerisation der hochvernetzten Harze erklärt werden. Diese intramolekularen Ringe tragen nichts zur eigentlichen Vernetzung bei, so dass bei diesen Harzen zwar eine vollständige Umsetzung des PEIs mit dem Crosslinker erfolgte, die wirkliche Vernetzung aber geringer ist, als bei Harzen mit weniger Vernetzeranteil. Dies kann auch durch die <sup>1</sup>H-MAS NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Harze nicht erfasst werden. Der Einfluss der Kettenlänge des Ausgang-PEIs ist nur von untergeordneter Bedeutung.



**Abb. 4-24: Quellfaktoren der Ultraharze UH 1 bis UH 6 in der freien Aminform.**

Durch Anbringen von Linkermolekülen in hohen Beladungen wurden die Quelleigenschaften der Ultraharze stark beeinflusst. Die 2-Hydroxyacetamidharze (HAA-UH 1 bis HAA-UH 6) zeigten eingeschränktes Quellvermögen in unpolaren wie in polaren Lösungsmitteln mit Ausnahme von DMF. Die Fmoc-geschützten Rinkamidharze (Rink-UH 1 bis Rink UH 6) wiesen dagegen ausgezeichnete und gegenüber der freien Aminharze bessere Quellfaktoren in unpolaren Lösungsmitteln auf. Hier konnte auch sehr gut der Einfluss des Vernetzeranteils auf die Quellbarkeit nachgewiesen werden. Auch hier haben die leicht vernetzten Harze UH 1 und UH 4 die höchsten Werte. In sehr polaren Lösungsmitteln nimmt die Quellfähigkeit der Fmoc-geschützten Rinkamidharze ab.

**Tab. 4-9: Quellfaktoren der freien Aminharze (UH), der 2-Hydroxyacetamidharze (HAA-UH) und der Fmoc-geschützten Rinkamidharze (Rink-UH) in verschiedenen Lösungsmitteln.**

Harz	Et <sub>2</sub> O	Toluol	THF	DMF	DCM	CHCl <sub>3</sub>	MeOH	Water
UH 1	4.0	4.4	8.1	7.1	11.3	12.6	26.9	11.2
UH 2	3.1	3.5	4.6	5.6	6.5	7.5	20.3	17.8
UH 3	3.5	3.4	5.2	5.5	7.0	8.7	16.5	12.4
UH 4	3.0	4.0	5.7	5.4	8.8	12.1	44.5	62.0
UH 5	3.0	4.0	6.8	5.5	7.6	8.7	13.5	10.8
UH 6	3.0	3.5	5.8	5.1	7.1	7.9	14.1	9.6
HAA-UH 1	2.0	-	2.7	3.4	3.0	-	3.4	4.0
HAA-UH 2	3.0	-	3.9	5.9	4.4	-	4.9	4.9
HAA-UH 3	2.1	-	3.3	6.4	4.2	-	4.6	3.3
HAA-UH 4	2.8	-	3.8	9.2	4.8	-	4.8	5.6
HAA-UH 5	2.8	-	3.3	5.6	5.6	-	4.5	4.5
HAA-UH 6	3.1	-	3.7	7.0	4.4	-	4.4	4.2
Rink-UH 1	3.8	-	6.6	10.3	8.0	-	5.6	5.6
Rink-UH 2	4.1	-	4.6	6.9	6.4	-	4.1	3.7
Rink-UH 3	3.4	-	4.9	5.9	5.9	-	3.4	2.9
Rink-UH 4	2.9	-	6.9	11.5	10.0	-	4.6	3.4
Rink-UH 5	4.4	-	6.6	9.3	7.1	-	4.4	4.9
Rink-UH 6	3.9	-	6.8	8.2	7.3	-	3.9	3.4

Generell lässt sich feststellen, dass die Natur des Linkermoleküls einen starken Einfluss auf die Quelleigenschaften der Harze ausübt. Durch die sehr hohen Beladungen rückt der Einfluss des Polymers in den Hintergrund und die Quellfähigkeit der linkermodifizierten Harze wird nahezu ausschließlich durch die Art des Linkers bestimmt.

#### 4.2.8 Mobilitätsmessungen mit Hilfe der ESR-Spektroskopie

Die Beweglichkeit der reaktiven Zentren ist ein wichtiger Parameter zur Bestimmung der Reaktivität von Polymeren. Die Elektronenspinresonanz ist eine exzellente Methode, um Beweglichkeiten innerhalb von gequollenen und nicht gequollenen vernetzten Polymeren zu messen. Das Verhalten von paramagnetischen Substraten, die am Polymer immobilisiert sind, kann mit hoher Empfindlichkeit beobachtet werden, da das nicht paramagnetische polymere Rückgrat keinen Beitrag zum ESR-Signal liefert. Aus diesem Grund bedarf es im Gegensatz zur NMR-Spektroskopie keiner weiteren speziellen Technik für die Aufnahme von ESR-Spektren polymergebundener Spin-Labels. Viele Beispiele aus der Literatur sind bekannt, die sich dieser Methode bedienen, um Mobilitäten innerhalb von Polymeren zu untersuchen. <sup>[131, 132, 134, 135]</sup>

Ziel bei Mobilitätsuntersuchungen ist die Berechnung der Rotationskorrelationszeit  $\tau_R$ . Sie gibt die Zeit an, bei der ein augenblicklicher Bewegungszustand des Spin-Labels noch mit dem des vor  $\tau_R$  Sekunden vorhandenen korreliert ist. Anders ausgedrückt ist der momentane Bewegungszustand für eine Zeit  $t > \tau_R$  unabhängig vom Zustand des Teilchens vor  $t$  Sekunden. In dieser Zeitspanne  $t$  wirken auf das Molekül so viele Kräfte ein, dass keine Beziehungen zwischen dem Anfangs- und Endzustand mehr vorliegen. Der Zusammenhang der Rotationskorrelationszeit mit der Beweglichkeit von Spin-Labels in einem polymeren Träger lautet: Je beweglicher der Spin-Label, desto kleiner ist die Rotationskorrelationszeit  $\tau_R$ . Die Beweglichkeit hängt vom Quellverhalten und dem Vernetzungsgrad des Polymers sowie von der Löslichkeit des Spin-Labels im verwendeten Lösungsmittel ab.

Eine Theorie zur Berechnung der Rotationskorrelationszeit aus den gemessenen ESR-Spektren stammt von Waggoner.<sup>[170]</sup> Hier wird die Linienbreite des ESR-Signals zur Berechnung herangezogen.<sup>[171]</sup>

Unter der Linienbreite wird die Gesamtbreite der Absorption beim halben Wert des Linienmaximums verstanden. Die Linienbreite einer einzelnen ESR-Komponente ist Ausdruck einer Energieunschärfe der Hyperfeinstruktur-niveaus des Radikals, und/oder einer experimentell bedingten Messungenauigkeit.

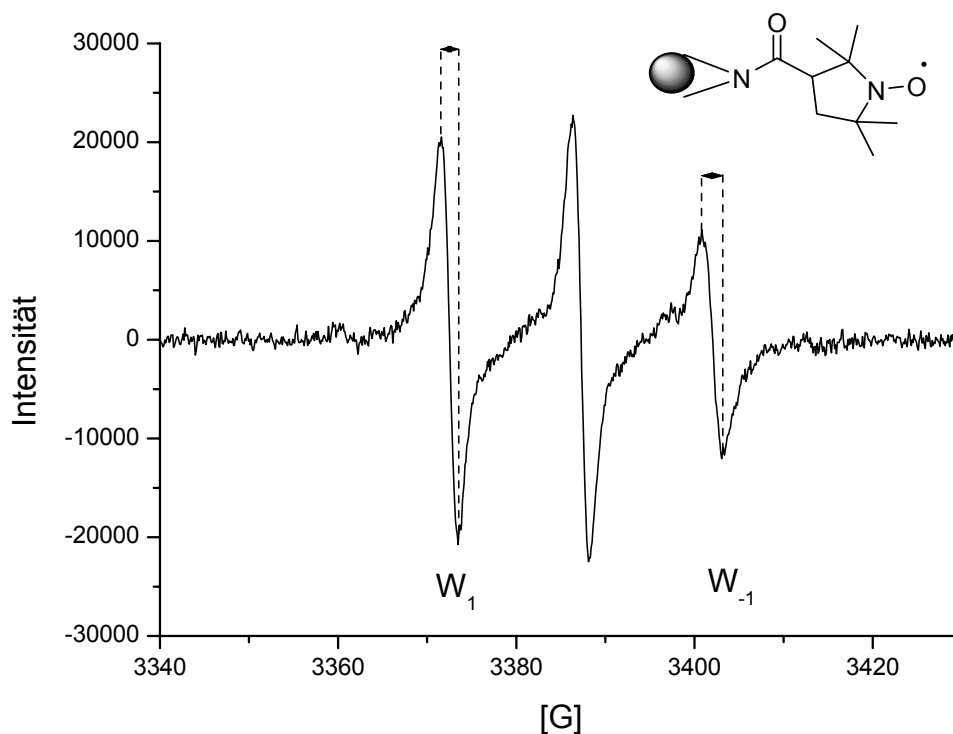
Die Korrelationszeiten werden aus Unterschieden in der Linienbreite des ESR-Signals berechnet. Diese Unterschiede kommen dadurch zustande, dass das freie Elektron eines Radikalmoleküls während seiner Brownschen Molekularbewegung zeitlich veränderlichen

magnetischen Feldern ausgesetzt ist, wenn die moleküleigenen magnetischen Kerne eine anisotrope Hyperfeinstruktur zeigen oder das Radikal einen anisotropen g-Faktor besitzt. Beide Effekte mitteln sich bezüglich der Lage der Hyperfeinstruktur-Komponenten heraus. Diese zeitabhängige Störung verursacht jedoch eine zusätzliche Relaxation des Elektronenspins, die von den fluktuierenden magnetischen Kernfeldern und damit von der Kernquantenzahl abhängt.

Die Formel, die für die Berechnung der Korrelationszeit aus den Differenzen der Linienbreiten verwendet wurde, lautet

$$\tau_R = (W_1 - W_{-1}) \left( \frac{-15\pi\sqrt{3}}{8b\Delta b\Delta} \right)$$

wobei  $W_1$  und  $W_{-1}$  der Peakabstand der Tief- bzw. Hochfeldlinie,  $b = 3,06 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ ,  $\Delta\gamma = 4,22 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \text{ G}^{-1}$  und  $H$  die Magnetfeldstärke beim Zentrum des ESR-Signals ist.<sup>[170, 172]</sup>

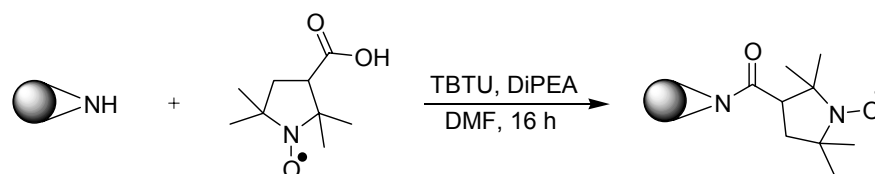


**Abb. 4-25:** ESR-Spektrum von spingelabeltem Ultraharz. Eingezeichnet sind die zu bestimmenden Linienbreiten  $W_1$  und  $W_{-1}$  der beiden Extrema der Hyperfeinstruktur.

Bei dieser Art der Auswertung werden die anisotropen Kopplungen, die sich generell auf die Linienbreite niederschlagen, durch Differenzbildung herausgemittelt und somit nur die isotropen Kopplungen, welche die Beweglichkeit charakterisieren, berücksichtigt.

Eine Einschränkung erfährt die Theorie dadurch, dass sie nur für gut definierte Spektren gilt. Bei starker Verbreiterung und Deformierung der Hyperfeinstruktur, z. B. durch Temperaturerniedrigung oder durch Messen im festen Zustand, müssen für die Auswertung andere Theorien angewendet werden.<sup>[173]</sup>

Zur Bestimmung der Mobilität wurde die freien Aminform der Ultraharze mit 3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-yloxy (3-Carboxy-PROXYL) in sehr niedriger Beladung ( $10^{-3}$  mmol/g) mit TBTU als Kupplungsreagenz gekuppelt. Die extrem niedrige Beladung ist Voraussetzung dafür, dass es nicht bei zu hoher Konzentration der Spin-Label auf dem Polymer zur Linienverbreiterung durch Spin-Spin-Wechselwirkungen kommt. Um die Beweglichkeiten der Ultraharze mit herkömmlichen Trägermaterialien vergleichen zu können, wurde mit 1 % DVB vernetztes Aminomethylpolystyrolharz und Amino-Tentagel unter identischen Bedingungen mit dem Spin-Label umgesetzt. Weiter wurde auch ein Vergleich zwischen Spin-Label am Polymer und Spin-Label in Lösung durchgeführt. Dabei wurde die entsprechende Konzentration des 3-Carboxy-PROXYL in Chloroform vermessen.



**Abb. 4-26: Synthese des mit 3-Carboxy-PROXYL gelabeltem Ultraharz.**

Die Harzproben wurden in Chloroform gemessen und die Linienbreiten und die Integrale der resultierenden ESR-Signale bestimmt. Die Vollständigkeit der Acylierungen und somit die einheitliche Beladung der hergestellten Harze mit dem Nitroxid, wurden durch ESR-Messungen der Reaktionslösungen nach der Kupplung festgestellt. Nach Integration der Signale konnten in keiner Lösung mehr als 3 % des eingesetzten Spin-Labels gefunden werden.

**Tab. 4-10: Rotationskorrelationszeiten der spin-gelabelten Ultraharze UH 1 bis UH 6 verglichen mit Polystyrol, Tentagel und des Spin-Labels in Lösung.**

Ausgangsharz	Rotationskorrelationszeit $\tau_R$ [ $\times 10^{-10}$ s]
UH 1	14.4
UH 2	14.0
UH 3	14.4
UH 4	7.4
UH 5	14.0
UH 6	14.4
Aminomethyl-Polystyrol	13.2
Amino-Tentagel	5.76
3-Carboxy-PROXYL in Lösung	2.0

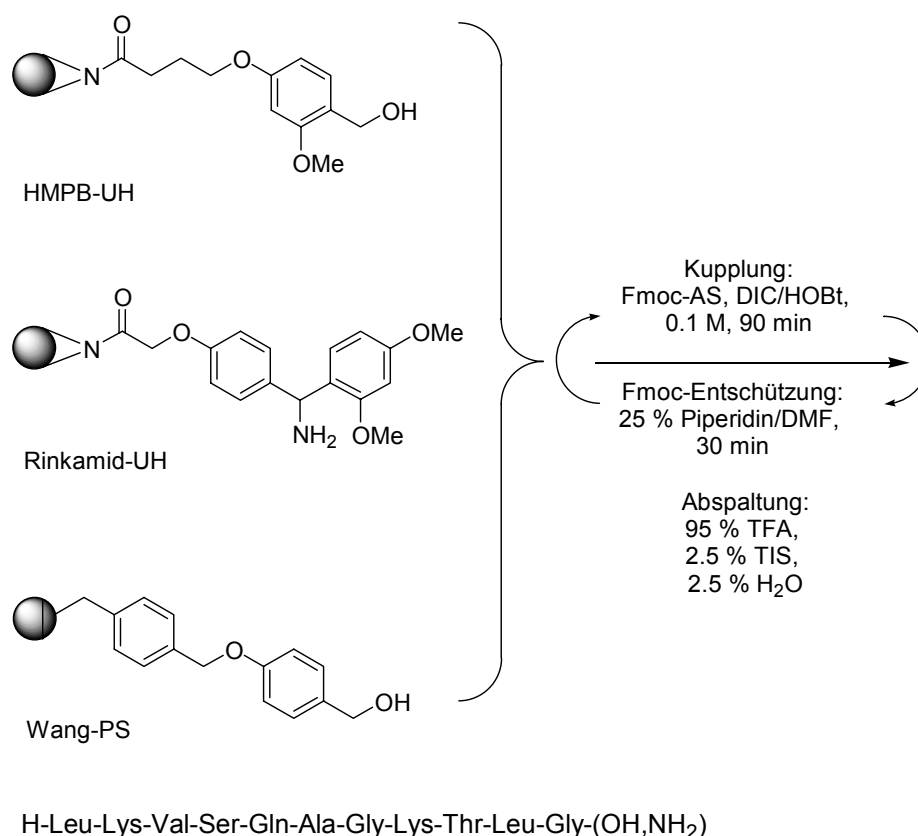
Die Ergebnisse zeigen, dass die Beweglichkeit des Spin-Labels der Ultraharze im Bereich der Mobilität des Polystyrols liegt oder sogar noch besser. Für UH 4 wurde eine Rotationskorrelationszeit von  $7.4 \times 10^{-10}$  s bestimmt, was dem Wert für das flexible Tentagel von  $5.78 \times 10^{-10}$  s sehr nahe kommt. Zum Vergleich beträgt der Wert für den Spin-Label in Lösung  $2.0 \times 10^{-10}$  s. Der Einfluss des Crosslinkeranteils auf die Beweglichkeit konnte nur bedingt festgestellt werden. Während die Mobilität der mit PEI-2 vernetzten Harze (UH 4 bis UH 6) mit zunehmendem Vernetzeranteil wie erwartet abnimmt, kann diese Tendenz bei den mit PEI-1 hergestellten Harze nicht festgestellt werden. Hier findet man nahezu identische Werte für die Rotationskorrelationszeiten.

#### **4.2.9 Vergleich der Ultraharze durch Anwendung in der Peptidsynthese**

Die Zugänglichkeit der mit verschiedenen Linkermolekülen hochbeladenen Ultraharze wurde beim Einsatz in der Festphasenpeptidsynthese untersucht. Dazu wurden alle sechs HMPB- und alle sechs Rinkamid-Ultraharze getestet. An allen zwölf Harzen wurde das



Peptid mit der Sequenz LKVSQAGKTLG nach der Fmoc-Strategie aufgebaut. Um die erhaltenen Peptide in Bezug auf Reinheit und Ausbeute mit einem auf Standard-Polystyrolharz synthetisierten Peptid zu vergleichen, wurde die Sequenz zusätzlich auf Wang-Polystyrolharz synthetisiert. Jeweils 10  $\mu\text{mol}$  Harz wurden eingewogen. Die Aktivierung der Kupplung erfolgte mit DIC/HOBt in DMF ( $c = 0.1 \text{ M}$ ), die Kupplungszeit betrug jeweils 90 min. Die Abspaltung der Harze erfolgte mit 95 % TFA, 2.5 % TIS und 2.5 % Wasser. Nach Lyophilisieren wurden die Peptide mit HPLC und MS charakterisiert.



**Abb. 4-27: Syntheschema für die Peptidsynthese an verschiedenen Ultraharzen und an Wang-Polystyrol.**

Die Ergebnisse der Peptidsynthese zeigen, dass der Vernetzungsgrad und die Wahl des Linkers entscheidend für den Erfolg der Synthese sind. Als Nebenprodukt wurde vor allem das 10- und 9-Peptid gefunden, die aus Fehlkupplungen auf Valin in Position 8 resultieren. Der sterisch sehr anspruchsvolle Rinkamid-Linker lieferte deutlich mehr Nebenprodukte als der flexiblere HMPB-Linker. Die höchsten Reinheiten der Peptide ohne Nebenprodukte lieferten die HMPB-Harze mit dem kleinsten Crosslinkeranteil (HMPB-UH 1 und HMPB-UH 4). Die Ausbeuten an Rohprodukt waren mit dem auf Wang-Polystyrol synthetisierten Peptid vergleichbar.

Tab. 4-11: Ergebnisse der Peptidsynthese an diversen Ultraharzen. \*HPLC 214 nm.

Harz	Beladung [mmol/g]	Masse Harz [mg]	$\mu\text{mol}$	Rohprodukt [mg]	Reinheit* [%]
HMPB-UH 1	2.8	3.6	10.1	11.3	100
HMPB-UH 2	2.6	3.9	10.1	11.9	98.4
HMPB-UH 3	2.9	3.4	9.9	9.9	97.1
HMPB-UH 4	2.4	4.2	10.1	13.4	100
HMPB-UH 5	3.0	3.7	11.1	11.3	92.2
HMPB-UH 6	2.9	3.5	10.2	11.0	85.1
Rinkamid-UH 1	2.4	4.2	10.1	9.2	92.7
Rinkamid-UH 2	2.3	4.3	9.9	9.4	90.7
Rinkamid-UH 3	2.4	4.3	10.3	12.2	90.8
Rinkamid-UH 4	2.7	3.9	10.5	14.5	88.3
Rinkamid-UH 5	2.6	3.8	9.9	11.1	85.3
Rinkamid-UH 6	2.4	4.3	10.3	12.5	82.1
Wang-PS	0.5	22.8	11.4	15.0	100

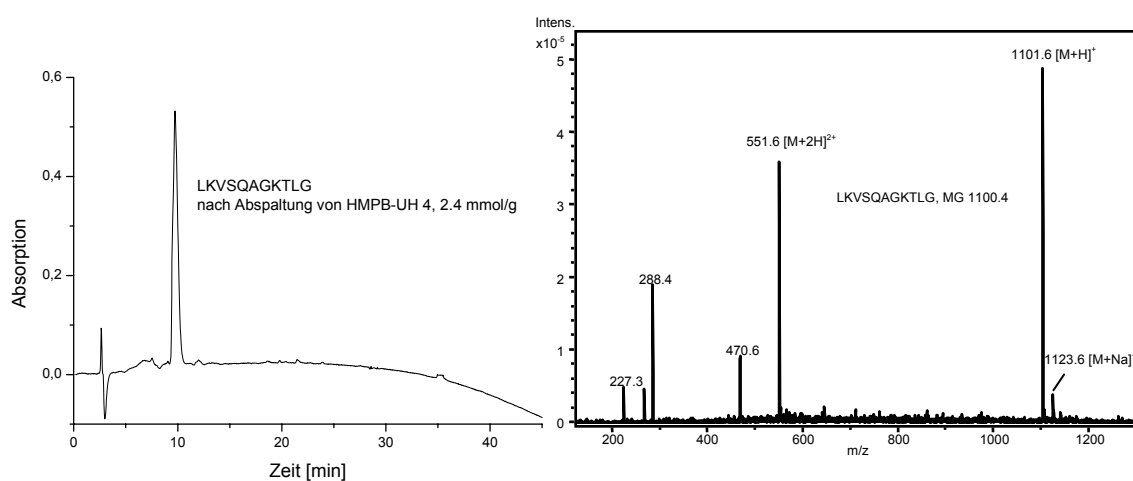


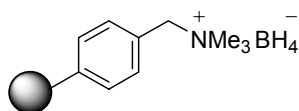
Abb. 4-28: HPLC-Chromatogramm und MS-Spektrum von LKVSQAGKTLG (MG 1100.4) nach Abspaltung von HMPB-UH 4 mit 2.4 mmol/g Beladung.

## 4.3 Polymeres Borhydrid auf der Basis von vernetztem PEI

### 4.3.1 Einleitung

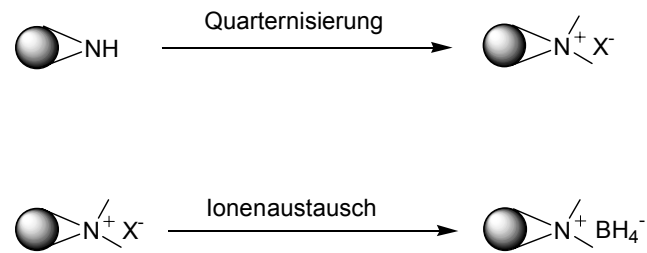
Die Entwicklung polymerer Reagenzien ist in den letzten Jahren stark fortgeschritten. Eine signifikante Einschränkung der derzeitigen Reagenzien ist ihre relativ niedrige Beladung (0.5 – 3 mmol/g für die meisten kommerziell erhältlichen polymeren Reagenzien). Aufgrund ihrer hohen Herstellungskosten sind polymere Reagenzien nicht sehr wirtschaftlich, ihr Einsatz ist auf Reaktionen im kleinen Maßstab beschränkt. Durch hochbeladene und preiswert hergestellte Reagenzien, könnte die Effizienz und die Atomökonomie von polymerunterstützter Methoden stark gesteigert werden.

Das Ultraharz-Konzept erlaubt die Herstellung kostengünstiger, hochbeladener Trägermaterialien. Es sollte nun auf die Herstellung eines hochbeladenen polymeren Borhydrids angewendet werden. Polymeres Borhydrid gehört zu den ältesten polymeren Reagenzien<sup>[174]</sup> und findet eine breite Anwendung in allen Bereichen der organischen Synthesechemie. Die herkömmlichen polymeren Borhydrid-Reagenzien basieren auf einem makroporösem Polystyrol-Ionenaustauscherharz, welches mit Natriumborhydridlösung behandelt wird.<sup>[175]</sup> Durch Einsatz von makroporösen Trägermaterialien kann die Toleranz gegenüber polaren Lösungsmitteln erhöht werden. Die Beladungen werden meist durch Bor-Elementaranalyse von den Herstellern angegeben, was allerdings aufgrund der Bildung von Borcarbid sehr fehlerbehaftet ist. Sie liegen laut Hersteller im Bereich zwischen 2.0 und 3.0 mmol/g. Polymeres Borhydrid wird vor allem zur Reduktion von Carbonylverbindungen und zur reduktiven Aminierung eingesetzt.<sup>[176-178]</sup>



**Abb. 4-29: Struktur von makroporösem Borhydrid-Polystyrolharz.**

Die Vorgehensweise bei der Synthese des polymeren Borhydrids auf der Basis der Ultraharze ist gleich wie bei der Herstellung auf Polystyrol. Zuerst werden die sekundären und tertiären Amine des Ultraharzes alkyliert und somit ein polykationisches Harz erzeugt. Anschließend erfolgt der Ionenaustausch mit einer Natriumborhydrid-Lösung.



**Abb. 4-30: Syntheschema für die Herstellung von polymeren Borhydrid auf Ultraharzbasis.**

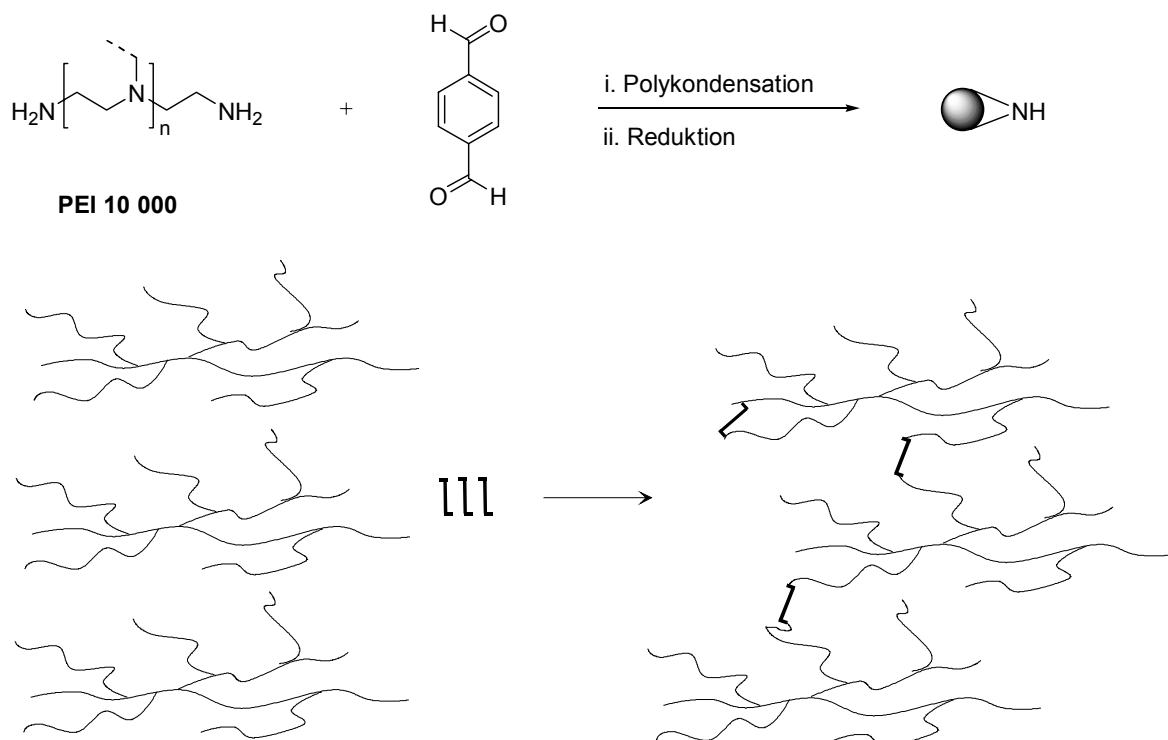
### 4.3.2 Synthese eines Ultraharzes mit hochmolekularem PEI

Die Verwendung von Ultraharzen mit kurzkettigen PEIs, wie in Kap. 4.1 und 4.2 beschrieben, führte nach der Quarternisierung der Amine und Ionenaustausch zu einem in polaren Lösungsmitteln wie Wasser und Methanol sehr stark quellenden Gel. Dadurch musste bei den anschließenden Reduktionen wesentlich mehr Lösungsmittel verwendet werden, was die Konzentration der zu reduzierenden Komponente stark verringerte und somit die Effizienz der Reaktion wesentlich herabsetzte. Auch die Abtrennung des Polymers vom Substrat durch Filtration gestaltete sich durch den gelartigen Charakter des Polymers als sehr schwierig. Durch Verstopfung der Fritten und durch Wechseln zu unpolaren Lösungsmitteln beim Waschvorgang, musste die Aufarbeitungsprozedur wesentlich verlängert werden, was sich auch in niederen Ausbeuten bemerkbar machte.

Um die Problematik der stark quellenden Gele zu umgehen, waren zwei Möglichkeiten vorhanden. Zum einen konnte ein Ultraharz als Ausgangspolymer verwendet werden, was einen hohen Crosslinkeranteil hat. Dadurch sollte das Quellvolumen in polaren Lösungsmitteln abnehmen. Wie in Kap 4.2.4 bereits erläutert, gibt es allerdings hier eine Obergrenze für den Vernetzeranteil. Als weiteren Nachteil sinkt dadurch auch die theoretische Beladung der Harze. Durch Alkylierung von UH 6 und anschließendem Ionenaustausch wurde ein polymeres Borhydridharz erhalten, was allerdings immer noch starke Quelleigenschaften in Methanol zeigte. Auch war die effektive Beladung bei Testreduktionen von Benzaldehyden nicht zufrieden stellend.

Die zweite Möglichkeit bestand darin, ein hochmolekulares PEI für die Herstellung des Ausgangsharzes zu verwenden. Durch das hohe Molekulargewicht und die damit resultierende stärkere Verzweigung der Polymere, sollte nach Vernetzung ein Polymer

erhalten werden, was deutlich weniger stark quillt, aber immer noch hohe Beladungen an Amin liefert. PEI mit einem Molekulargewicht von 10 000 g/mol wurde mit Terephthalaldehyd in THF zum Polyimin kondensiert. Das Verhältnis von Crosslinker und PEI war dabei 42 : 1. Dabei lief die Polymerisation im Gegensatz zu der Verwendung der kurzkettigen PEIs spontan ab. Nach Reduktion mit 2 eq. Natriumborhydrid in THF/MeOH 2:1 für 2 h wurde das Harz mit 1 N Salzsäure in die Hydrochloridform transformiert, um überschüssiges Natriumborhydrid zu eliminieren. Das Harz wurde anschließend mit Wasser gewaschen und wieder mit 2 N NaOH in die freie Aminform überführt. Die darauf folgende Waschprozedur war analog zu der in Kap. 4.1.2 beschriebenen. Das weiß-graue Polymer lag als fein verteilte, körnige Substanz vor und konnte durch Sieben in Partikel von 80-170  $\mu\text{m}$  Durchmesser aufgetrennt werden.



**Abb. 4-31: Herstellung von Ultraharz aus hochmolekularem PEI. Darunter schematisch die Struktur der verzweigten Polymere.**

Die Elementaranalyse zeigte eine Beladung von 15 mmol/g Aminen. Das Quellverhalten des Harzes war von polaren zu unpolaren Lösungsmitteln sehr einheitlich, die Quellfaktoren waren aber niedriger als bei den mit kurzkettigen PEIs hergestellten Ultraharzen (Tab. 4-12).

Tab. 4-12: Quellfaktoren des Ultraharzes aus hochmolekularem PEI.

Lösungsmittel	Quellfaktor [ml/g Harz]
Methanol	7.8
DMF	5.3
DCM	5.3

Das FT-ATR-IR-Spektrum beinhaltet die gleichen charakteristischen Banden wie die Ultraharze UH 1 bis UH 6. Im  $^1\text{H}$ -MAS-NMR-Spektrum waren die einzelnen Signale nicht ausreichend genug aufgelöst, um eine Integration der PEI- $\text{CH}_2$ -Protonen und damit eine Quantifizierung des Crosslinkeranteils durchzuführen. Die Verbreiterung der Peaks kann mit den schlechteren Quelleigenschaften des Harzes in Methanol erklärt werden.

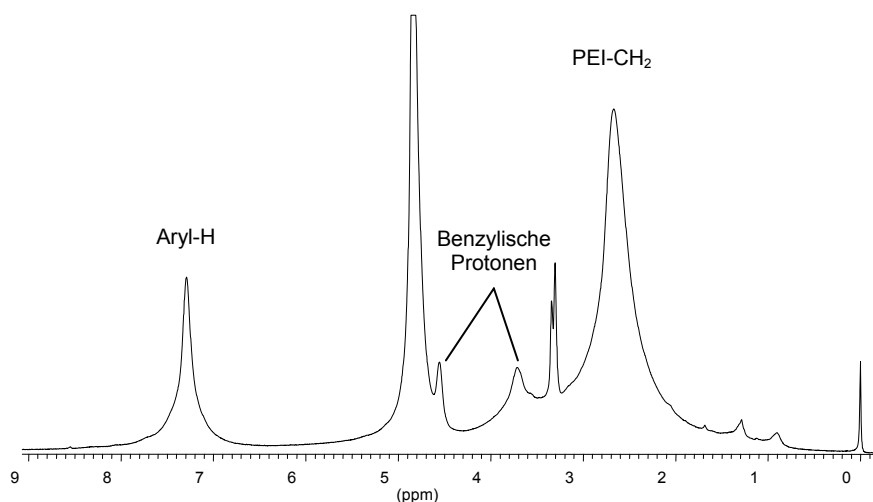


Abb. 4-32:  $^1\text{H}$ -MAS-NMR-Spektrum von hochverzweigtem Ultraharz (400 MHz, MeOD, MAS 4500 Hz).

Alle Signale konnten eindeutig zugeordnet werden. Neben dem Signal für die aromatischen Protonen bei 7.2 ppm, konnten auch hier die beiden unterschiedlichen Signale der benzylichen Protonen bei 4.5 ppm und 3.7 ppm gefunden werden. Die PEI- $\text{CH}_2$ -Protonen lagen bei 2.6 ppm. Die beiden scharf aufgelösten Peaks bei 3.3 und 3.34 ppm sind dem Lösungsmittel, deuteriertem Methanol, zuzuordnen. Hier kann es allgemein zu einer Aufspaltung des Signals kommen, da sich das Lösungsmittel einmal im Polymer und

einmal außerhalb des Polymers befindet. Durch die unterschiedliche chemische Umgebung werden zwei Signale für das Lösungsmittel beobachtet.

### 4.3.3 Synthese polykationischer Ultraharze

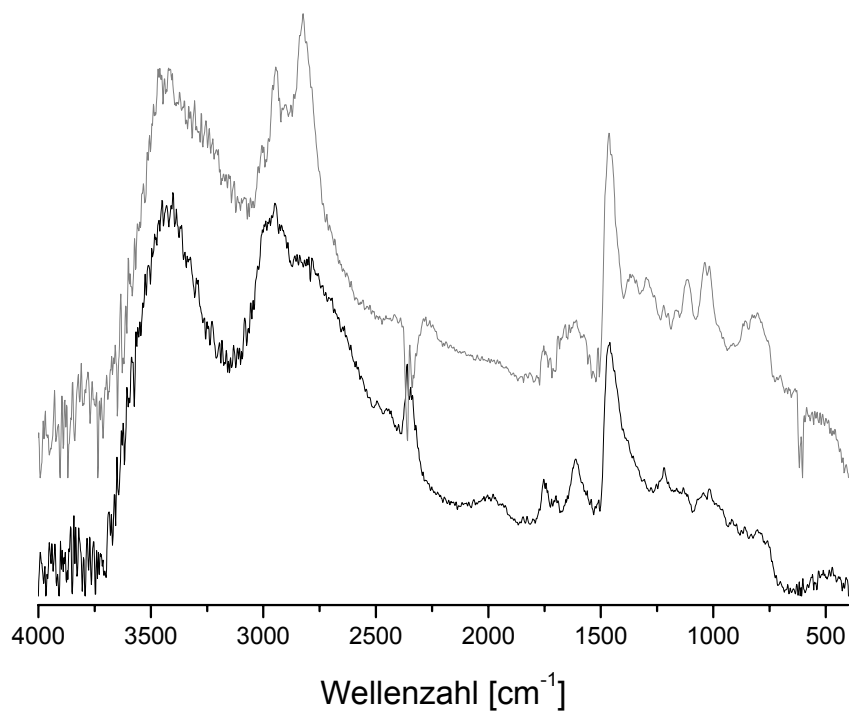
Für die Alkylierung der Amine der Ultraharze wurden verschiedene Methylierungsreaktionen getestet. Die Quarternisierung von vernetztem PEI wurde bereits mittels Dimethylsulfat in Acetonitril bei 50 °C durchgeführt.<sup>[158]</sup> Andere Vorschriften verwenden Methyljodid in DMF unter Zusatz von NaOH als Base<sup>[179]</sup>. Alle diese Varianten wurden getestet, die Bestimmung der Beladung erfolgte mit Hilfe der Elementaranalyse und über den Massenzuwachs des Harzes. Die besten Ergebnisse lieferte die Verwendung von Methyljodid in 10fachem Überschuss bei RT für 24 h. Als Lösungsmittel wurde DMF verwendet. Nach Reaktionsende wurde das leicht gelbliche Harz gründlich mit DMF und DCM gewaschen, bis eine Lösung von Silbernitrat aus dem Waschwasser kein Silberjodid mehr ausfällt. Nach Trocknen im Vakuum wurde ein Iodgehalt von 47.5 % bestimmt, was einer Umsetzung von ca. 83 % entspricht.



**Abb. 4-33: Synthese des polykationischen Ultraharzes.**

Der Zusatz von NaOH brachte keine Verbesserung. Die Verwendung von Dimethylsulfat lieferte laut Elementaranalyse analoge Ausbeuten, aufgrund seiner stark toxischen Eigenschaften wurde jedoch für die Synthese der polykationischen Harze darauf verzichtet.

Grundsätzlich können quartäre Amine unter basischen Bedingungen und hohen Temperaturen eine Hofmann-Eliminierung zu den entsprechenden Olefinen eingehen. Um die chemische Stabilität des Harzes gegenüber basischen Bedingungen zu testen, wurde das polykationische Polymer mit 2 N NaOH bei 50 °C für 5 h behandelt. Nach Waschen und Trocknen konnte keine Veränderung bezüglich Quellverhalten und Form des Harzes festgestellt werden. Die Masse des Harzes blieb konstant und im FT-ATR-IR-Spektrum zeigten sich keine Unterschiede zum Ausgangsspektrum.

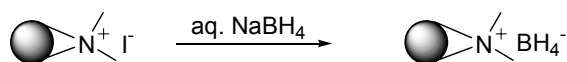


**Abb. 4-34:** FT-ATR-IR-Spektren des polykationischen Ultraharzes vor NaOH-Behandlung (unten) und danach (oben).

#### **4.3.4 Beladung des polykationischen Ultraharzes mit Borhydrid durch Ionenaustausch**

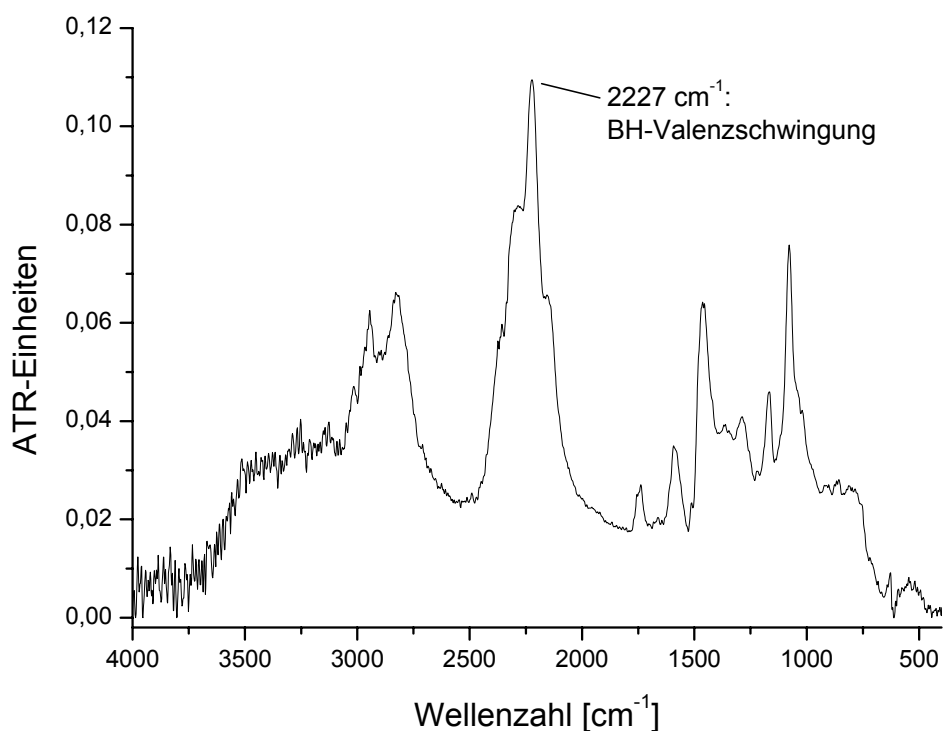
Der letzte Schritt bei der Herstellung des polymeren Borhydrids auf Ultraharzbasis bestand im Austausch der Iodid-Ionen gegen Borhydrid-Anionen. Dazu wurde das quarternisierte Iodidharz in Wasser gequollen und mit einer 1 M wässrigen Natriumborhydridlösung für 15 min behandelt. Nach Abfiltrieren und Waschen mit Wasser wurde diese Prozedur noch zweimal wiederholt. Anschließend erfolgte ein gründlicher Waschschrift mit Wasser, um alles überschüssige Natriumborhydrid zu eliminieren, und zwar so lange, bis im Waschwasser nach Zugabe von HCl keine Gasentwicklung mehr sichtbar war. Anschließend wurde das jetzt farblose Polymer mit THF und DCM gewaschen und im Vakuum bei 80 °C für 5 h getrocknet.





**Abb. 4-35: Austausch der Iodidanionen gegen Borhydrid-Anionen.**

Die Charakterisierung des polymeren Borhydrids erfolgte mit Hilfe der FT-ATR-IR-Spektroskopie. Dabei kann die Absorptionsbande bei  $2227 \text{ cm}^{-1}$ , die charakteristisch für B-H-Valenzschwingungen ist, halbquantitativ für die Bestimmung der Beladung mit Borhydrid benutzt werden.



**Abb. 4-36: FT-ATR-IR-Spektrum des Borhydridharzes.**

Um den Ionenaustausch mit Wasser zu umgehen und eine leichtere Trocknung des Harzes zu erreichen, wurden auch andere Lösungsmittel wie Methanol, Ethanol oder THF für den Austausch getestet. Sie führten alle zu wesentlich niederen Beladungen der Harze mit Borhydrid, was mit IR-Spektroskopie überprüft wurde.

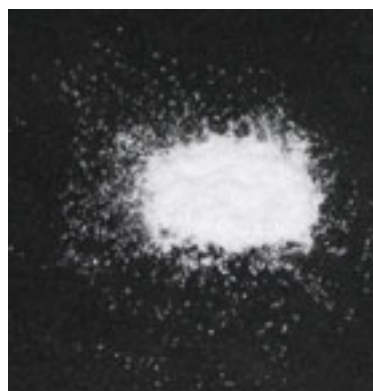
Das Quellverhalten des Harzes war gegenüber den Borhydridharzen, welche mit kurzkettigen PEIs synthetisiert wurden, stark reduziert. Das höchste Quellvolumen wurde in MeOH mit 10.7 ml/g Harz gemessen, die Quellvolumina des Borhydridharzes in polaren wie unpolaren Lösungsmitteln zeigten sehr einheitliche Werte. Als anschaulicheren Parameter für die Quelleigenschaften wurde der Quellquotient eingeführt, der als Quotient

aus dem Volumen des gequollenen Harzes geteilt durch das Volumen des Harzes im trockenen Zustand definiert ist. Hier lagen die meisten Werte unter 2 (Tab. 4-13).

**Tab. 4-13: Quelleigenschaften des Borhydridharzes.**

Lösungsmittel	Quellfaktor [ml/g]	Quellquotient
Trocken	5	1
Methanol	10.7	2.14
DCM	8.2	1.64
Wasser	8.8	1.76
THF	6.0	1.2
DMF	7.5	1.5
Toluol	7.0	1.4

Das farblose Polymer zeigte eine feinkörnige Struktur, keinerlei Adsorption untereinander und konnte leicht durch Sieben in verschiedene Partikelgrößen unterteilt werden.

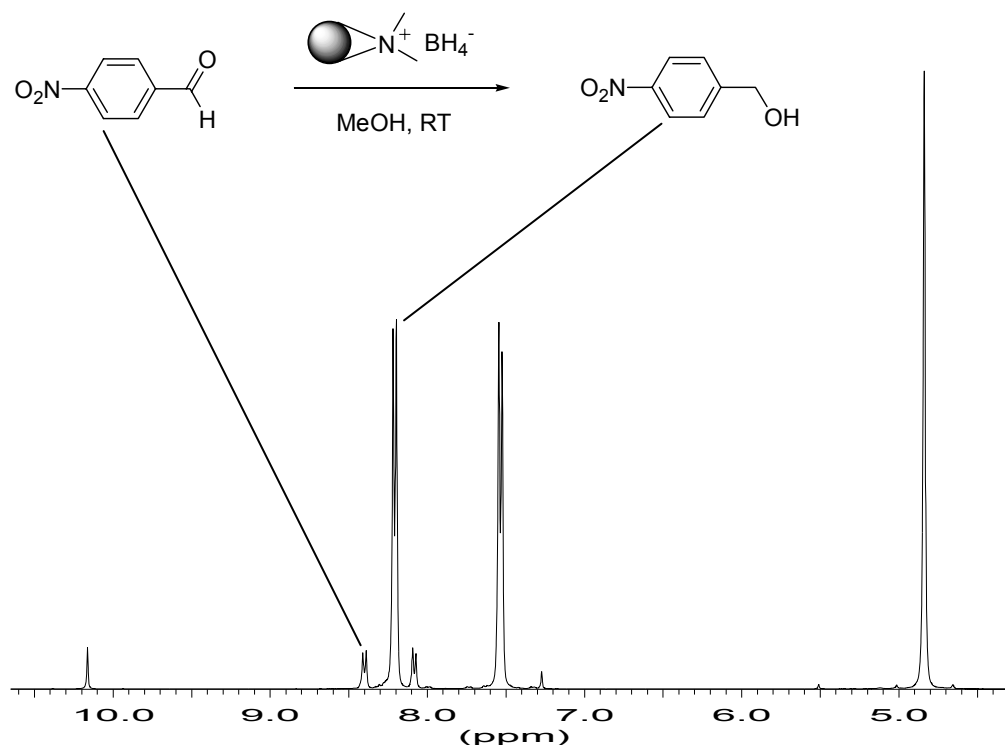


**Abb. 4-37: Polymeres Borhydrid auf Ultraharzbasis.**

#### 4.3.5 Bestimmung der effektiven Beladung

Um die effektive Beladung des Borhydridharzes für den Einsatz als reduzierendes polymeres Reagenz zu bestimmen, wurde 4-Nitrobenzaldehyd in MeOH zum entsprechenden Alkohol reduziert. Dabei wurde ein Überschuss des Aldehyds eingesetzt

und die Umsetzungsrate mit Hilfe der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie quantifiziert. Für die Auswertung wurden die aromatischen Dubletts von Produkt und Edukt verwendet. Nach Integration ergab sich für die Testreduktion eine effektive Beladung des Harzes von 8 mmol/g bei einer Reaktionszeit von 30 min. Die Aktivität des Harzes konnte durch Verlängerung der Reaktionszeit auf 16 h sogar auf 12 mmol/g gesteigert werden (Abb. 4-38). Damit konnte auch die ausgezeichnete Zugänglichkeit des Substrates zu den reaktiven Zentren des Harzes demonstriert werden.



**Abb. 4-38: Bestimmung der effektiven Beladung des Borhydridharzes durch  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).**

Zum Vergleich wurde die gleiche Reaktion mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen polymeren Borhydridharzes auf Basis von makroporösem Polystyrol durchgeführt. Die Beladung betrug laut Hersteller 3.4 mmol/g. Die Integration lieferte allerdings auch nach 16 h Reaktionszeit nur eine effektive Beladung von 2 mmol/g für das Polystyrolharz.

### 4.3.6 Einfluss von Lösungsmittel und Partikelgröße des Harzes auf die Reduktionskraft

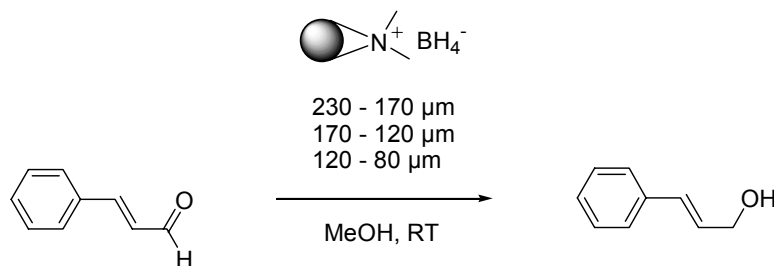
Um den Einfluss des Lösungsmittels bei der Reduktion von Carbonylverbindungen mit Hilfe des polymeren Borhydridharzes zu untersuchen, wurde die oben beschriebene Reduktion von 4-Nitrobenzaldehyd in verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt. Die Bestimmung der effektiven Beladung erfolgte wieder mit Hilfe der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie.

**Tab. 4-14: Effektive Beladungen für die Reduktion von 4-Nitrobenzaldehyd für 16 h bei RT in verschiedenen Lösungsmitteln.**

Lösungsmittel	Effektive Beladung [mmol/g]
MeOH	12
DCM	10
THF	0.6

MeOH liefert wie erwartet die höchste effektive Beladung. Reduktionen in DCM laufen ebenfalls mit hoher Aktivität ab. Bei Verwendung von THF als Lösungsmittel findet man nur geringe Umsetzungen.

Der Einfluss der Teilchengröße auf die Geschwindigkeit bei einer diffusionskontrollierten Reaktion besteht in einem inversen Zusammenhang zwischen Geschwindigkeitskonstante und Teilchenradius. Polymers Borhydrid wurde nach Sieben in drei Partikelverteilungen (230 – 170  $\mu\text{m}$ , 170 – 120  $\mu\text{m}$ , 120 – 80  $\mu\text{m}$ ) zur Reduktion von Zimtaldehyd eingesetzt. Dabei wurden 2 eq. Harz bezogen auf 8 mmol/g effektive Beladung verwendet.

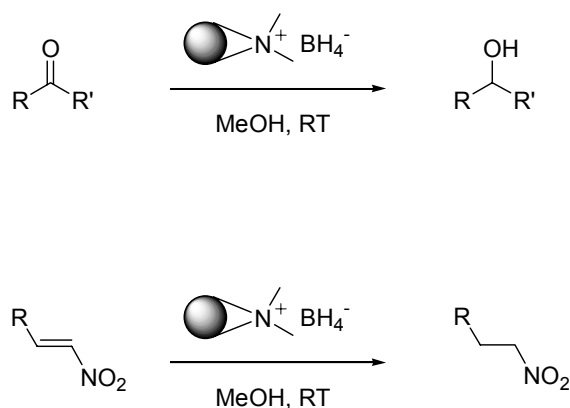


**Abb. 4-39: Einfluss der Teilchengröße auf die Reaktionsgeschwindigkeit.**

Nach Aufarbeitung wurde in allen drei Proben eine vollständige Umsetzung zum entsprechenden Zimtalkohol gefunden, was mit Hilfe von NMR- und HPLC-Analytik quantifiziert wurde. Somit konnte für diesen Fall keine Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Partikelgröße ermittelt werden.

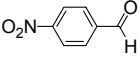
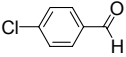
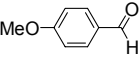
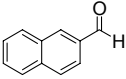
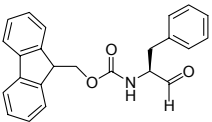
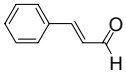
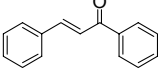
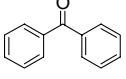
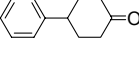
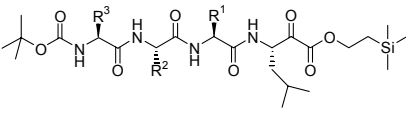
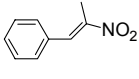
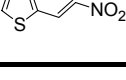
#### 4.3.7 Reduktion von Carbonylverbindungen und Nitroolefinen

Die Aktivität des Borhydridharzes wurde an verschiedenen gesättigten und ungesättigten Aldehyden und Ketonen und an Nitroolefinen getestet. Da die Reaktionsgeschwindigkeit der Reduktionen sehr stark vom jeweiligen Substrat abhängt, wurden die Reaktionszeit und die Equivalentzahl an Borhydridharz für die einzelnen Reaktionen angepasst, um vollständige Umsetzungen zu erreichen. Die effektive Beladung von 8 mmol/g des Borhydridharzes wurde als 1 Equivalent definiert. Die Produkte wurden mit Hilfe der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie und der HPLC auf ihre Reinheit untersucht.



**Abb. 4-40:** Einsatz des Borhydridharzes für die Reduktion von Carbonylverbindungen und Nitroolefinen.

**Tab. 4-15: Ergebnisse der Reduktionen mit polymeren Borhydrid. Die Zahl der Äquivalente ist auf eine effektive Beladung von 8 mmol/g angegeben. \*HPLC 214 nm.**

Ausgangsverbindung	Zahl an Äquivalenten	Zeit [h]	Ausbeute [%]	Reinheit* [%]
	1	0.5	98	100
	1.3	1	98	100
	2	4	100	99
	1	2	100	99
	2	3	95	90
	1.6	4	100	99
	4	16	100	81
	4	16	98	100
	4	16	100	100
	8	16	65	90
	2	2	77	100
	2	2	52	93

Aldehyde reagierten wesentlich schneller als Ketone und wurden selektiv in Gegenwart einer Doppelbindung zum entsprechenden Alkohol reduziert (Abb. 4-41). 4-Phenylcyclohexanon wurde nach Reduktion als Mischung der cis- und trans-

Diastereomeren erhalten (Abb. 4-42). Bei der Reduktion von Benzalacetophenon wurde neben dem ungesättigten Alkohol auch 19 % des entsprechenden gesättigten Alkohols gefunden, der mit Hilfe der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie quantifiziert wurde (Abb. 4-43). Des Weiteren wurde ein  $\alpha$ -Ketoamid innerhalb eines vollgeschütztes Tetrapeptids zum entsprechenden Norstatinprodukt mit vier aliphatischen Seitenketten reduziert, welches als Diastereomerenpaar erhalten wurde. Die Nitroolefine wurden zu den entsprechenden Nitroalkanen ohne Reduktion der Nitrogruppe reduziert.

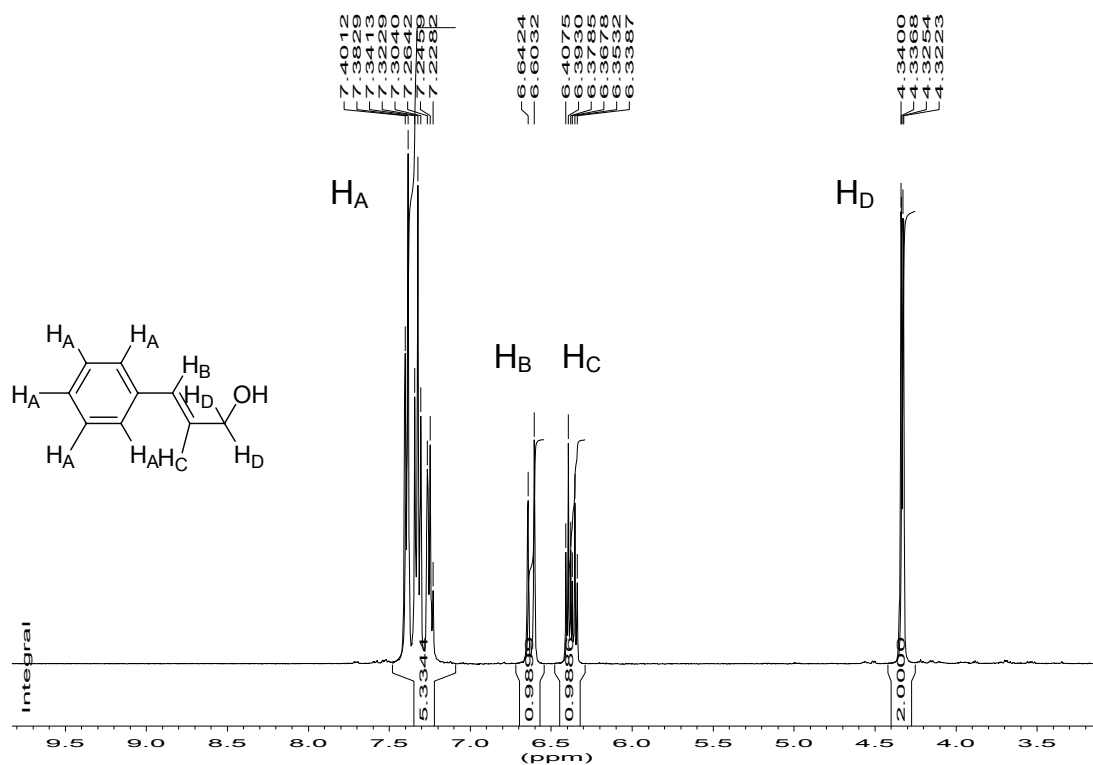


Abb. 4-41:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des reduzierten Zimtaldehyds (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

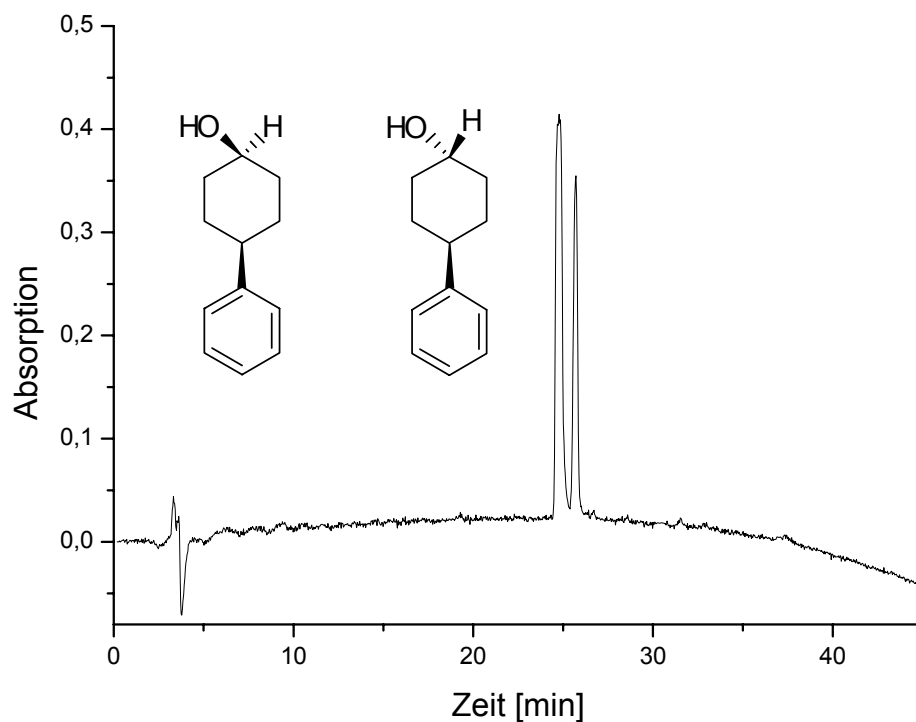


Abb. 4-42: Chromatogramm von cis- und trans-1-Phenyl-cyclohexanol-4.

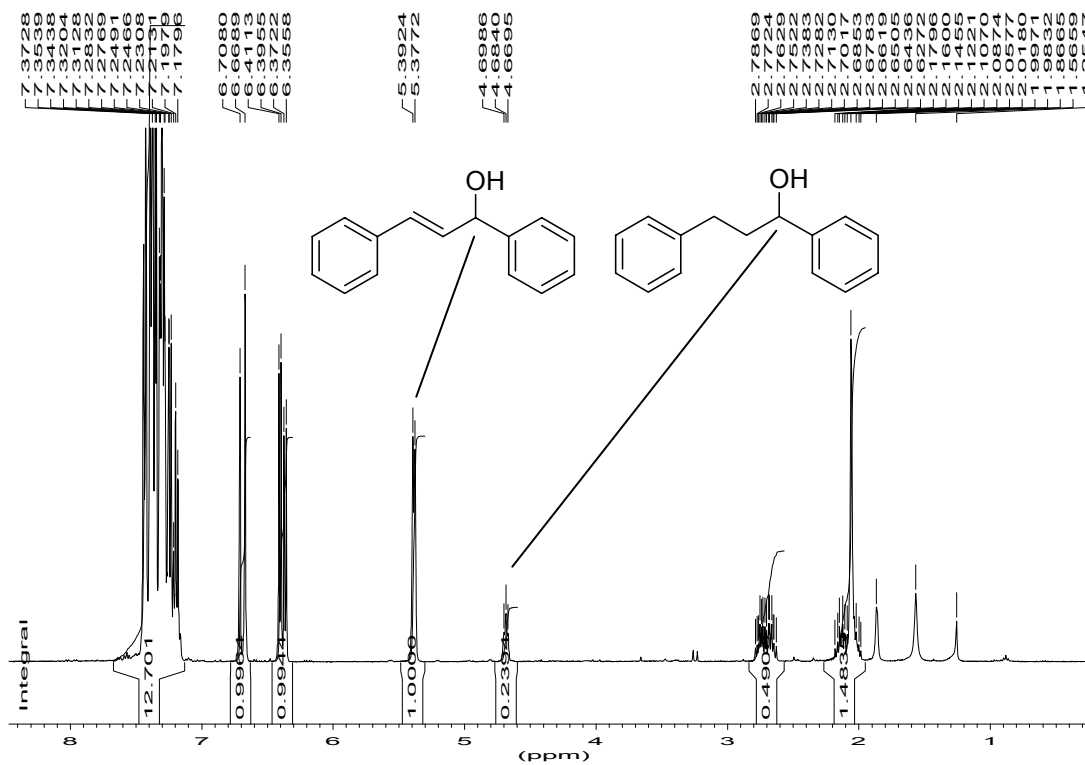


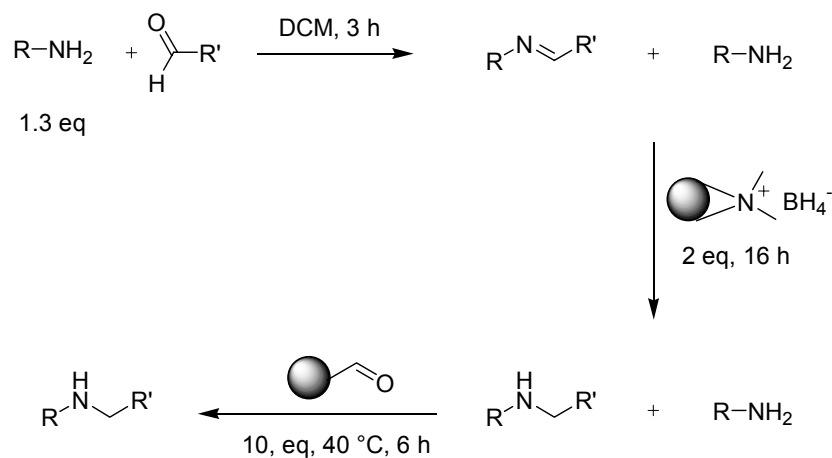
Abb. 4-43: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des reduzierten Benzalacetophenons (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



Die Produkte wurden in guten bis ausgezeichneten Ausbeuten erhalten, wobei nur ein geringer Überschuss an Borhydridharz eingesetzt werden musste. Die Ergebnisse zeigten, dass die hohe Beladung des polymeren Borhydrids auf Ultraharzbasis in der polymerunterstützten Lösungssynthese voll genutzt werden konnten.

### 4.3.8 Reduktive Aminierungen

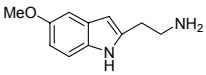

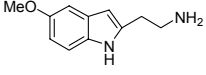

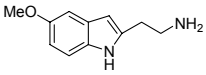
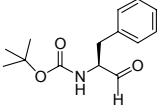
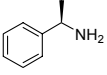

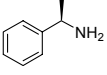

Als weitere Anwendung wurde das Borhydridharz bei reduktiven Aminierungen eingesetzt. Dazu reagierte ein Aldehyd mit einem kleinen Überschuss an primärem Amin (1.3 eq.), um eine vollständige Iminbildung zu erreichen. Nach Zugabe von 2 eq. polymerem Borhydrid, wurde das reduzierte Amin neben dem noch vorhandenen überschüssigen primären Amin erhalten. Um dies selektiv zu entfernen, wurde ein Scavengingprozess mit Formylpolystyrolharz (10 eq.), welches selektiv primäre Amine binden kann, durchgeführt. Die Produkte aus den einzelnen reduktiven Aminierung wurden mittels HPLC und NMR-Spektroskopie charakterisiert.



**Abb. 4-44: Reduktive Aminierung mit Hilfe des Borhydridharzes.**

Ein geringer Überschuss an Borhydridharz (2 eq.) reichte aus, um die durch die Kondensation entstandenen Imine zu den entsprechenden Aminen in guten Ausbeuten und Reinheiten zu reduzieren.

Tab. 4-16: Ergebnisse der reduktiven Aminierungen. \*HPLC 214 nm

Amin	Aldehyd	Ausbeute [%]	Reinheit* [%]
		85	99
		83	91
		94	94
		92	90
		72	85

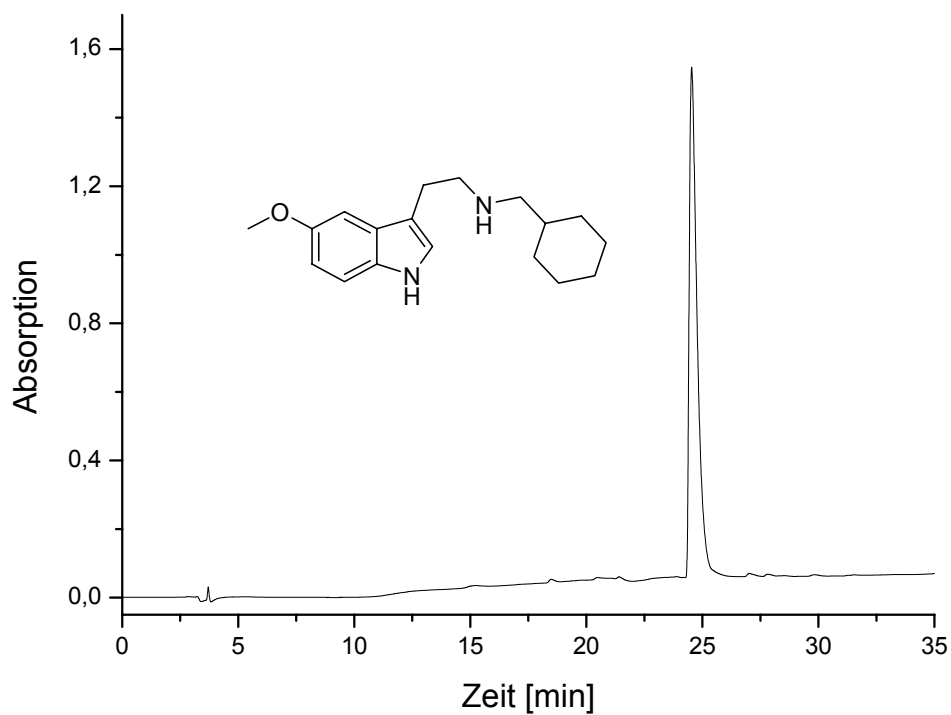


Abb. 4-45: HPLC-Chromatogramm des Produktes der reduktiven Aminierung von Cyclohexylcarbaldehyd mit 5-Methoxytryptamin.

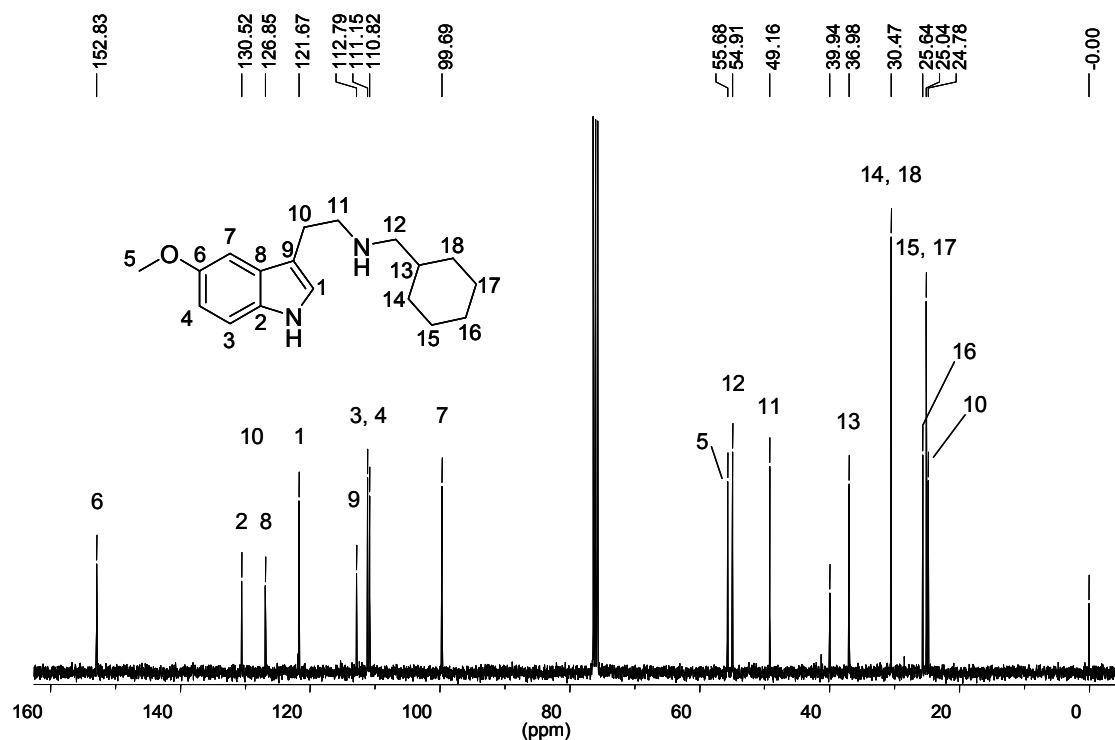


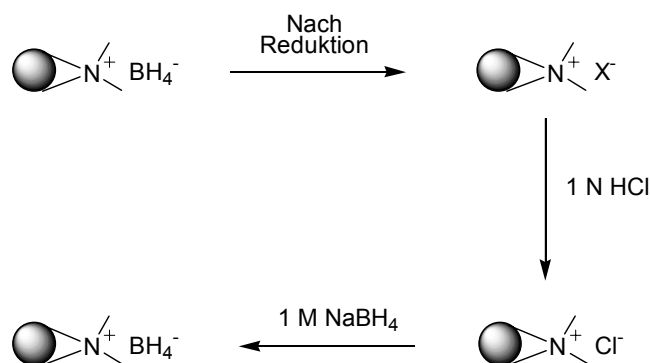
Abb. 4-46:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des Produktes der reduktiven Aminierung von Cyclohexylcarbaldehyd mit 5-Methoxytryptamin (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4.3.9 Lager- und Recyclingfähigkeit des polymeren Borhydrids

Die Beladung von kommerziell erhältlichem Borhydridharz nimmt bei längerer Lagerung ab. Dies lässt sich mit der chemischen Labilität der quarternären Ammoniumsalze gegenüber Hofmann-Eliminierungen erklären. Ionenaustauscherharze zeigen den typischen Fischgeruch von freigesetztem Trimethylamin.

Das polykationische Borhydridharz hingegen hatte auch nach einem Jahr Lagerung bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  die nahezu identische effektive Beladung. Dazu wurde die Testreduktion des 4-Nitrobenzaldehyds in MeOH für 16 h bei RT durchgeführt. Nach Quantifizierung mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie ergab sich eine effektive Beladung von 11.6 mmol/g, was eine Abnahme von nur 3.3 % bedeutet, die im Rahmen der Messgenauigkeit liegen dürfte. Das polymere Borhydridharz auf PEI-Basis ist somit wesentlich stabiler als herkömmliche Borhydrid-Trägermaterialien.

Für die Untersuchung der Recyclingfähigkeit des Harzes wurde nach einer Reduktion das Harz mit DCM und MeOH gewaschen und anschließend mit 1 N HCl mehrmals versetzt. Nach Waschen mit Wasser erfolgte wieder der Ionenaustausch mit einer 1 M Natriumborhydrid- Lösung. Das farblose Polymer wurde entsprechend aufgearbeitet und getrocknet.

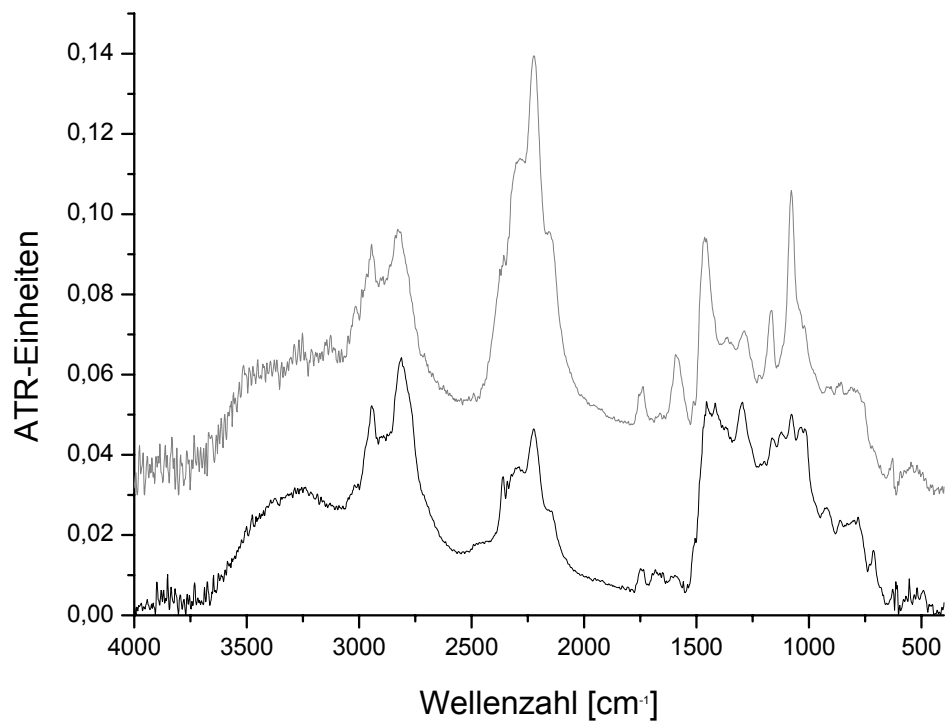


**Abb. 4-47: Recycling des Borhydridharzes.**

Das FT-ATR-IR-Spektrum zeigte eine wesentlich weniger intensive B-H-Bande als im Ausgangsharz. Nach Durchführung der Testreduktion mit 4-Nitrobenzaldehyd ergab sich nur noch eine effektive Beladung von 6.1 mmol/g. Die Reinheit des Substrates war ebenfalls reduziert, so dass davon ausgegangen werden muss, dass während der Recyclingschritte nicht alle Verunreinigungen vom Harz gewaschen werden konnten und somit das Recyceln des Harzes leider nicht wirtschaftlich genug durchgeführt werden kann.

**Tab. 4-17: Lager- und Recyclingfähigkeit des polymeren Borhydrids.**

Borhydridharz	Effektive Beladung [mmol/g]
Ausgangsharz	12
Nach einem Jahr	11.6
Nach Recycling	6.1



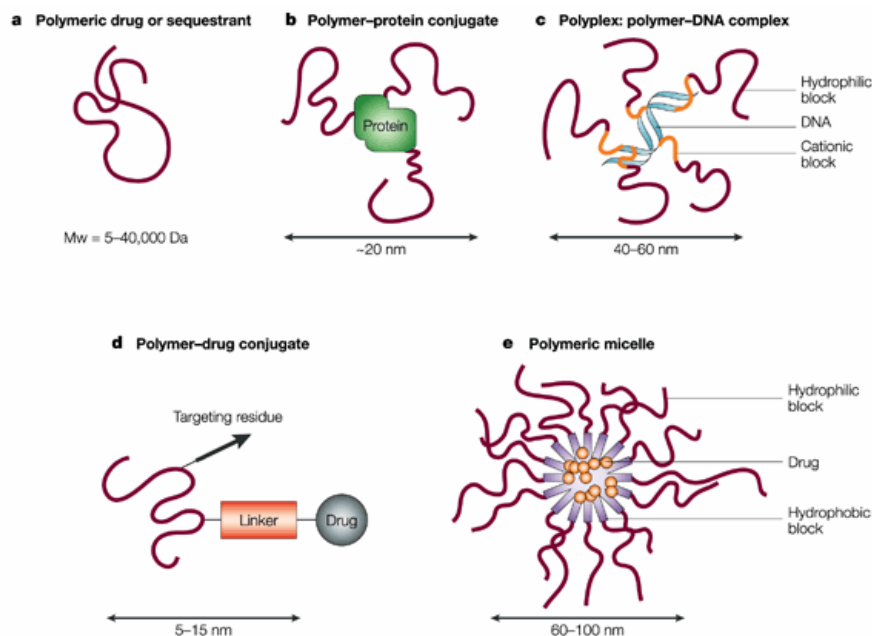
**Abb. 4-48: FT-ATR-IR-Spektren des Borhydridharzes nach einmaligem Recycling (unten). Darüber das Spektrum des Ausgangsharzes.**

## 4.4 Reversibel vernetzte Polymere zur Synthese von multivalent funktionalisierten dendritischen Polymeren

### 4.4.1 Einleitung

#### 4.4.1.1 Polymere Therapeutika

In den letzten 15 Jahren haben so genannte polymere Therapeutika eine immer größere Bedeutung erlangt. Der Begriff umfasst makromolekulare Wirkstoffe, Polymer-Wirkstoff- und Polymer-Protein-Konjugate, polymeren Micellen, die kovalent gebundene Wirkstoffe tragen und polyelektrolytische Komplexe für den DNA-Transport.



**Abb. 4-49: Polymere Therapeutika (aus [180]).**

Dabei spielt die Wahl des Polymers die entscheidende Rolle. Lineare oder verzweigte Polymere können einmal selbst als bioaktive Spezies fungieren oder, was häufiger der Fall ist, als inerte Strukturkomponente eines Konjugates, einer polymeren Micelle oder eines nichtviralen Vektors dienen. Der allgemeine Aufbau eines Polymer-Wirkstoff- oder Polymer-Protein-Konjugates umfasst eine dreigeteilte Struktur: Das Polymer, ein Linker und die bioaktive Spezies. Als Polymere werden die synthetischen Polymere PEG, *N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid (HPMA), Polyvinylpyrrolidon (PVP), PEI, lineare Polyamidoamine und Divinylethermaleinsäureanhydrid (DIVEMA) verwendet. Weiter

werden natürliche Polymere eingesetzt, wie Dextran, Dextrin und Hyaluronsäure und so genannte „Pseudosynthetische Polymere“ wie die Polyamino­säuren Poly(L-Lysin), Poly(L-Glutaminsäure) und Poly(L-asparagin). Die Natur der Polymere stellt eine spezielle Herausforderung für die pharmazeutische Entwicklung dar. Im Gegensatz zu einem herkömmlichen Wirkstoff, der aus einer einzigen, definierten Verbindung besteht, sind Polymere grundsätzlich heterogene Komponenten, die teilweise auch höhere Anforderungen an deren Charakterisierung stellen. Ein wichtiger Punkt, der die biologische Aktivität beeinträchtigen kann, ist die Tatsache, dass Polymere aus individuellen Molekülen mit verschiedenen Kettenlängen bestehen können. Das durchschnittliche Molekulargewicht ist durch die Begriffe Massenmittelwert  $M_w$  und Zahlenmittelwert  $M_n$  beschrieben, der Quotient  $M_w/M_n$  wird als Polydispersität bezeichnet. Der Zahlenmittelwert berücksichtigt die Anzahl der Moleküle mit gleichem Polymerisationsgrad, während der Massenmittelwert deren Anteil an der Gesamtmasse angibt.

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}$$

Wichtige Beispiel für Polymere in medizinischen Anwendungen sind mit PEG konjugierte Proteine. Die PEG-Ketten erhöhen dabei die Stabilität und die Löslichkeit der Proteine und reduzieren ihre Immunogenität. Es sind bereits einige Medikamente, die durch „PEGylierung“ erhalten werden, auf dem Markt mit Anwendungen im Bereich der Multiplen Sklerose (PEG-INTRON), Hepatitis C (PEGASYS) oder Leukämie (Oncaspar). Für die Protein-Wirkstoff-Konjugate werden vor allem HPMA-Copolymere verwendet, an die Antitumorwirkstoffe angebracht werden. Einige davon befinden sich bereits in der klinischen Entwicklung als Antikrebsmittel.<sup>[180]</sup>

#### 4.4.1.2 Dendrimere

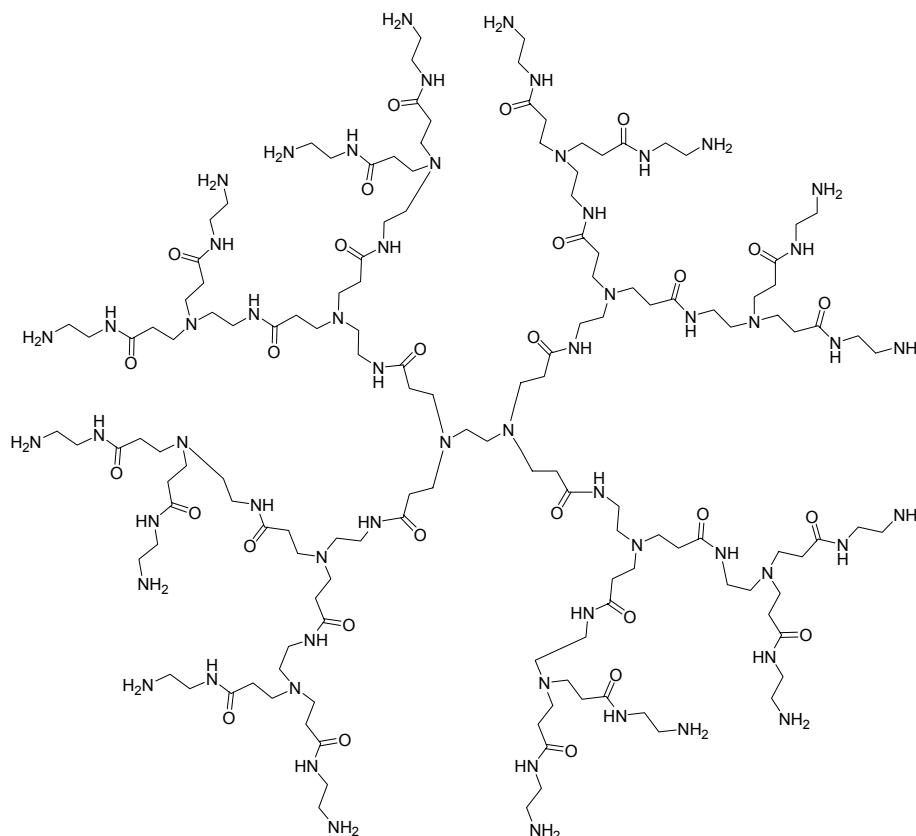
Eine große Bedeutung bei der Synthese von Polymeren für medizinische Anwendungen haben Dendrimere und dendritische Moleküle. Dendrimere sind in der Natur weit verbreitet, der Name stammt von den griechischen Wörtern „Dendron“ (Baum) und „Meros“ (Teil) ab. Dendrimere sind trotz ihres hohen Molekulargewichtes definierte Strukturen, die eine im Vergleich mit traditionellen Polymeren niedrige Polydispersität

haben. Sie bestehen aus einer regelmäßigen, stark verzweigten, globularähnlichen Struktur, die meist eine hohe Dichte an Funktionalitäten an deren Oberfläche besitzt und gleichzeitig ein kleines molekulares „Volumen“ hat.<sup>[181]</sup>

Die dendrimere Struktur ist durch Schichten zwischen den einzelnen Verknüpfungspunkten definiert, die man Generationen nennt. Allgemein wird die Anzahl an Generationen als Zahl von Verknüpfungspunkten vom Kern bis zur Oberfläche bezeichnet.

Es gibt zwei unterschiedliche Verfahren zur Synthese von Dendrimeren. Beim divergenten Ansatz werden die Dendrimere vom Kern ausgehend Generation für Generation aufgebaut. Dies erfordert jedoch durch die Anwesenheit vieler reaktiver Zentren an einem einzelnen Molekül sehr effektive chemische Transformationen, um Defekte auszuschließen. Sogar bei sehr effizienten Umsetzungen ist bei einem G 5–PPI-Dendrimer die Ausbeute an perfektem Dendrimer nur ca. 25 %. Der alternative konvergente Ansatz startet an der Oberfläche und endet am Kern, wo die Dendrimerbausteine zusammengesetzt werden. Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass pro Syntheseschritt nur eine kleine Zahl an reaktiven Zentren vorhanden ist, die auch nur eine kleine Zahl an Nebenreaktionen zulassen und dass jede synthetisierte Generation separat aufgereinigt werden kann. Allerdings ist die Aufreinigung von Dendrimerbausteinen höherer Generation aufgrund ihrer Ähnlichkeit zwischen den Reaktanden und den Produkten oft sehr schwierig.





**Abb. 4-50: Struktur der PAMAM-Dendrimere.**

Die Struktur der Dendrimere lässt sich in drei Kompartimente einteilen: Die multivalente Oberfläche mit einer großen Anzahl an potentiellen reaktiven Stellen, die „äußere Schale“ direkt unter der Oberfläche, die eine definierte Umgebung hat, welche von außen durch die Dendrimeroberfläche geschützt ist und den Kern, der bei Dendrimeren höherer Generation durch die dendritischen Zweige vom äußerem Umfeld geschützt ist. Das Innere eines Dendrimers ist sehr gut für den Einbau von Gastmolekülen geeignet. Diese drei Teile eines Dendrimers können spezifisch auf einzelne Anwendungen zugeschnitten werden, wie als dendritischer Sensor, Wirkstofftransporter oder als Wirkstoff an sich.

Damit Dendrimere als Werkzeuge für die Wirkstoffsynthese oder den Wirkstofftransport *in vivo* eingesetzt werden können, müssen sie einige wichtige biologische Anforderungen erfüllen. Sie dürfen weder toxisch, noch immunogen sein, sie müssen in der Lage sein, biologische Barrieren, wie z. B. Zellmembranen oder Blut-Gewebe-Schranken, zu passieren, sie sollten für eine bestimmte Zeit, die benötigt wird, um einen klinischen Effekt zu erzielen, im Kreislauf erhalten bleiben und sie sollten spezifische Strukturen erkennen, oder als solche erkannt werden.

Dendrimere werden bereits in vielen Bereichen der Medizin eingesetzt.<sup>[182]</sup> In der medizinischen Diagnostik werden für das Magnetresonanz-Imaging(MRI)-Verfahren Gd-Komplexe als Kontrastmittel zur Beeinflussung der Relaxationszeiten eingesetzt. Durch Verwendung von Dendrimerstrukturen als Chelatbildner für Gd<sup>III</sup>-Komplexe können die Verweilzeiten im Blutkreislauf wesentlich erhöht werden, was eine Verbesserung der MRI-Darstellungen von Blutgefäßen und Organen bewirkt. Hier werden vor allem sog. Polyamidoamin(PAMAM)-Dendrimere verwendet (Abb. 4-50).

Ein weiteres Gebiet, auf dem momentan intensiv geforscht wird, sind DNA-Dendrimere. Sie werden durch aufeinander folgende Hybridisierungen partiell zueinander komplementärer Hetero-Duplexe („DNA-Monomere“) erhalten. Nach jedem Hybridisierungsschritt wird die Struktur durch eine Art „Quervernetzung“ fixiert. Somit können DNA-Dendrimere mit bis zu zwei Millionen Oligonucleotid-Endgruppensträngen erhalten werden, die vielfältige Möglichkeiten für die Erkennung von Oligonukleotiden bieten. Als therapeutische Anwendung auf Dendrimerbasis ist die Gentransfektion durch Dendrimere als nichtvirale Vektoren am meisten untersucht. Unter physiologischen Bedingungen (pH 7.4) liegen die Dendrimere (PAMAM, PPI) als Polykationen vor und können so mit den negativ geladenen Phosphateinheiten der Nukleinsäuren wechselwirken. Die Dendrimere zwingen die DNA in eine kompakte Form und erleichtern somit den Eintritt der DNA in die Zelle. Interessant ist, dass die perfekte Dendrimerstruktur mit einem Verzweigungsgrad von 100 % weniger effizient für die Transfektion ist, als z. B. kommerziell erhältliches PEI, welches eine hyperverzweigte Struktur besitzt (Verzweigungsgrad von 65 %) und ausgezeichnete Transfektionseigenschaften aufweist.

Der Einsatz von Dendrimeren für die kontrollierte Wirkstofffreisetzung ist ebenfalls ein intensiv bearbeitetes Gebiet. Dabei werden Wirkstoffe in dendritische Kern-Schale-Komplexe eingebaut und können so an ihren Wirkort transportiert werden. Die eingeschlossenen Gastmoleküle lassen sich dabei selektiv wieder freisetzen. Antitumoraktive Cytostatika wie Adriamycin und Methotrexat wurden bereits in wasserlösliche Dendrimer-systeme eingekapselt.

Ein weiterer Aspekt der medizinischen Anwendung der Dendrimerchemie bilden Dendrimere mit bakteriziden Eigenschaften. Die wegen der hohen Funktionalität verstärkte Wechselwirkung der dendritischen Polykationen mit Zellwänden lässt sich nutzen, um eine antibakterielle Wirkung zu erzielen. Beispiele hierfür sind quarternisierte

Polyamindendrimere, aber auch Dendrimer-Silber-Komplexe, die eine höhere in-vitro-Aktivität gegenüber einigen Bakterien zeigen, als gelöstes Silbernitrat.

#### 4.4.1.3 Aufnahme von PEI/DNA-Komplexe in die Zelle

Die Aufnahme von PEI/DNA-Komplexe in die Zelle ist ausführlich untersucht worden.<sup>[183, 184]</sup> Allgemein wird davon ausgegangen, dass diese Komplexe über Endocytose in die Zelle aufgenommen werden. Dabei werden blasenförmige Vesikel von der Zellmembran nach innen abgeschnürt, wobei die so gebildeten Endosomen membrannahes Material einschließen. Die Endosomen fusionieren anschließend mit den Lysosomen, in denen der pH-Wert niedriger ist (pH 4-5), als unter normalen physiologischen Bedingungen (pH 7.4). Durch diese pH-Wert-Verschiebung kommt es zum vermehrten Eintritt von Protonen, Chloridionen und Wasser, was letztendlich zum Platzen der Vesikel aufgrund der Erhöhung des osmotischen Drucks führt. Durch Verwendung von Bafilomycin A1, ein selektiver Inhibitor, der die Ansäuerung der Endosomen bzw. Lysosomen unterdrückt, wird kein Austreten der PEI/DNA-Komplexe beobachtet.<sup>[185]</sup>

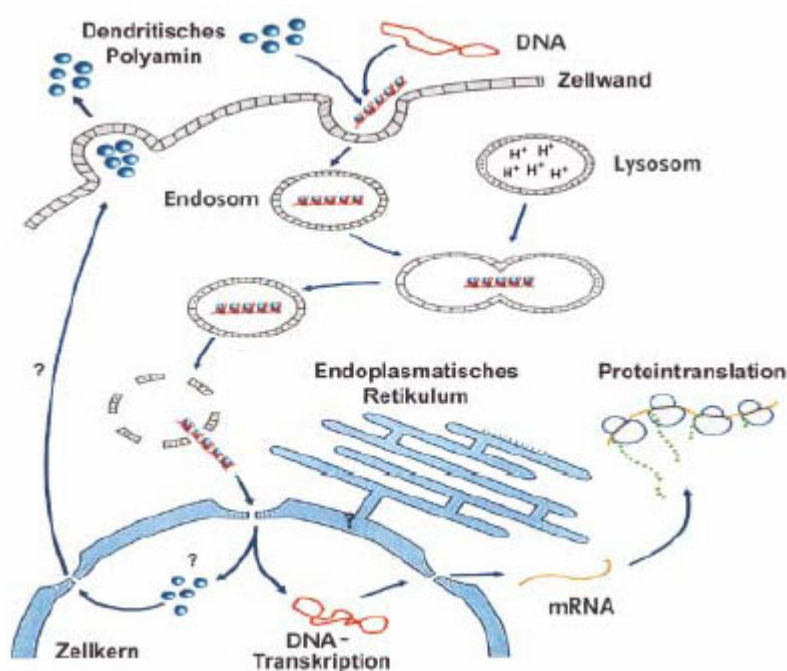


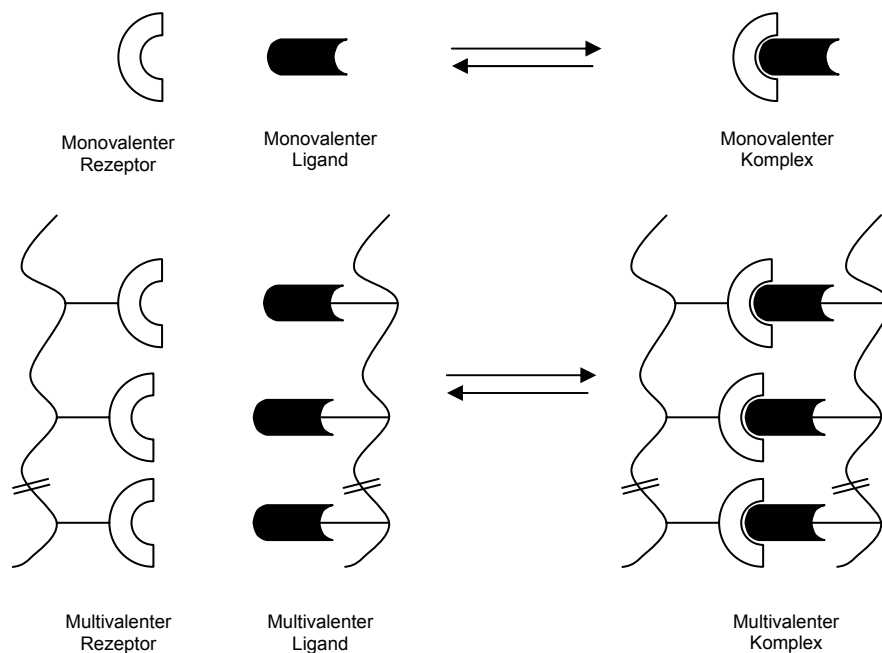
Abb. 4-51: Vorgeschlagener Mechanismus der DNA-Transfektion mit kationischen Dendrimeren (aus <sup>[182]</sup>).

Die Cytotoxizität von PEI ist stark abhängig von Molekulargewicht und Vernetzungsgrad des Polymers. PEI mit 800 kD verklebt zu großen Clustern (2-6 µm), die an der

Zelloberfläche haften. Bei PEI mit 25 KD wurden nur kleine Aggregate mit 10-50 nm gefunden. Die Biokompatibilität des PEIs wird durch die hohe Dichte an kationischen Ladungen, durch eine kompakte und hochverzweigte Struktur sowie durch ein hohes Molekulargewicht negativ beeinflusst. Auch die Effizienz der Transfektion von DNA war bei PEI mit niedrigerem Molekulargewicht wesentlich höher als bei hochmolekularem PEI.<sup>[183]</sup>

#### 4.4.1.4 Multivalenzeffekte

Multivalente Wechselwirkungen können in der ganzen Natur beobachtet werden.<sup>[186]</sup> Die Multivalenz kann zu einer stark erhöhten Aktivität führen, verglichen mit der monomeren Wechselwirkung. Diese synergistische Steigerung einer bestimmten Aktivität bezeichnet man als „Cluster“- oder „dendritischen“ Effekt. Der dendritische Effekt ist zurückzuführen auf einen kooperativen Effekt in einem multivalenten System, der zu einer stärkeren Erhöhung der Aktivität führt, als dies durch die Valenz des Systems erwartet werden würde.



**Abb. 4-52: Multivalenzeffekt.**

Multivalenz kann auch die Spezifität einer bestimmten Wechselwirkung erhöhen, vor allem durch die geometrische Erhöhung der (hohen) Affinität eines spezifischen Liganden und die Erhöhung der (niederen) Affinität eines unspezifischen Liganden, was zu einem

wesentlich höheren Verhältnis zwischen spezifischer und unspezifischer Affinität führt. Multivalente Wechselwirkungen bieten:

Eine feste Bindung von eher schwach bindenden monomeren Liganden.

Die Möglichkeit, Liganden mit niedriger Affinität in neuen Anordnungen mit einem neuen Bindungspartner zu verknüpfen.

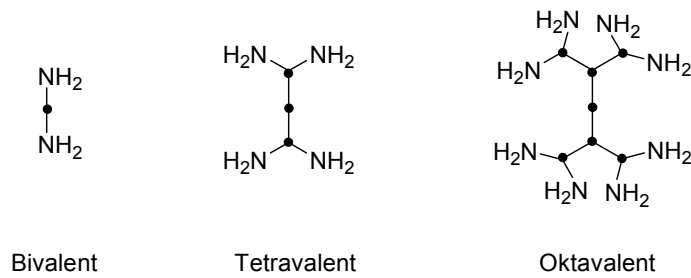
Effizientere Zell-Zell-Wechselwirkungen, die durch multiple Wechselwirkungen vermittelt werden.

Dendrimere sind ausgezeichnet für die multivalente Präsentation von synthetischen, biologisch interessanten Strukturelementen geeignet.

#### **4.4.1.5 Peptidfunktionalisierte Dendrimere**

Viele Peptidstrukturen mit potentieller therapeutischer Aktivität sind bereits identifiziert worden. Jedoch ist aufgrund der kurzen Halbwertszeit der Peptide in vivo ihr Einsatz als Wirkstoffe stark limitiert. Peptide werden in den allermeisten Fällen von Peptidasen und Proteasen abgebaut, so dass der Transport der Peptide zum Wirkort der eigentliche Engpass bei der Entwicklung von peptidischen Therapeutika ist. Um dies zu umgehen, wurden verschiedene Strategien angewendet. Zum einen wurde durch Verwendung von D- oder Pseudo-Aminosäuren die Stabilität der Peptide erhöht. Allerdings wird durch die Modifikationen die Aktivität des Peptids beeinflusst. Weitere Verfahren sind die Synthese von Peptidomimetika, meist nichtpeptidische Strukturen, die aber die aktive Konformation des Peptides widerspiegeln. Sie zeigen eine verstärkte Resistenz gegenüber abbauenden Enzymen.

Ein anderer Ansatz bedient sich peptidfunktionalisierten Dendrimerverstrukturen. Durch die dendritische Form wird die Stabilität gegenüber Proteasen und Peptidasen erhöht, was sich in einer längeren Halbwertszeit der Peptiddendrimere zeigt.<sup>[187]</sup> Pionierarbeiten auf diesem Gebiet stammen von James Tam, der so genannte „Multiple Antigen Peptide (MAP)“-Dendrimere Ende der achtziger Jahre herstellte.<sup>[188, 189]</sup> Der Kern besteht aus einer bestimmten Anzahl von Lysinen, die die verzweigte Struktur über die beiden Aminogruppen des Lysins generieren (Abb. 4-53). Der Aufbau der Kernstruktur und der daran immobilisierten Peptide erfolgte an einem polymeren Träger mit gängigen Methoden der Festphasensynthese.



**Abb. 4-53: Struktur der Kernmatrix der MAP-Dendrimere.**

Nach Abspaltung und Aufreinigung wurden die peptidfunktionalisierten Dendrimere mit einem Molekulargewicht von ca. 10 000 zur Erkennung und Bildung von Antikörpern in Mäusen und Kaninchen eingesetzt. Die Seren zeigten deutlich höhere Antikörpertiter als die entsprechenden Peptide, die an einen herkömmlichen Transporter kovalent gebunden waren.

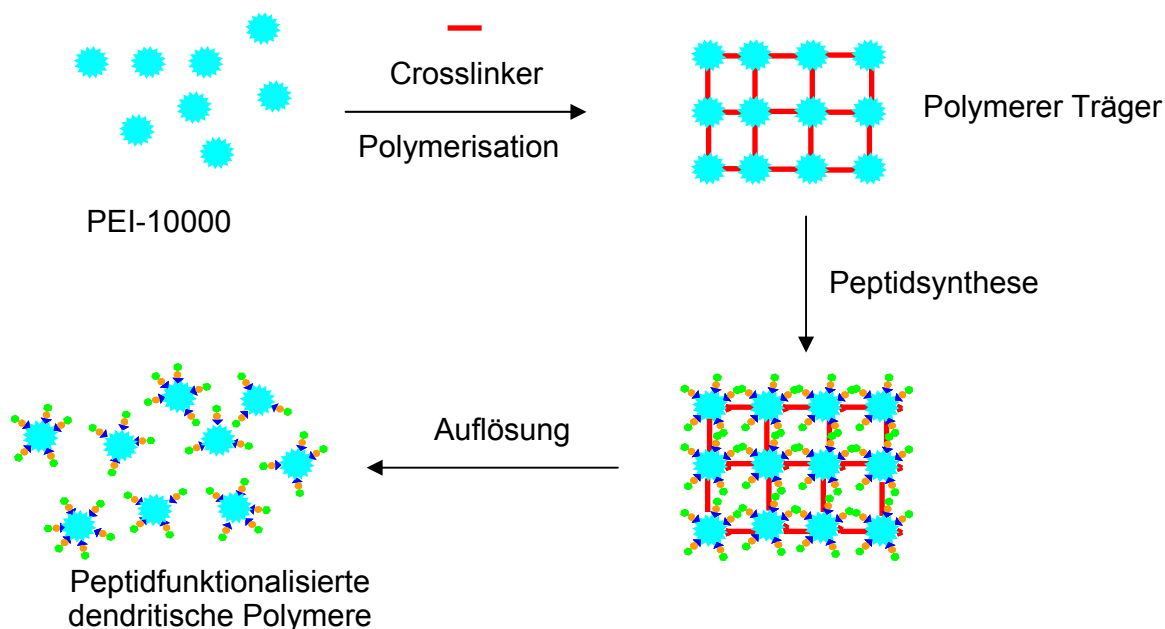
Darauf folgende Arbeiten nutzten und verbesserten dieses Konzept für die Synthese verschiedener Peptidstrukturen auf unterschiedlich großen dendritischen Kernstrukturen und untersuchten deren Wirkung in den verschiedensten medizinischen Bereichen.<sup>[181, 187, 190-192]</sup> Andere Publikationen befassen sich mit Peptiddendrimeren, die über Proline und 4-Aminoproline an fester Phase aufgebaut werden,<sup>[193]</sup> oder über mehrstufige Synthesen von Aminosäure-Monomerbausteine synthetisiert werden.<sup>[194, 195]</sup>

Generell haben peptidfunktionalisierte Dendrimere aufgrund ihrer makromolekularen Struktur und Größe, ihrer Resistenz gegenüber Proteasen und Peptidasen und ihrer hohen Dichte von funktionellen Peptideinheiten ein großes Potential bei der Suche nach neuen Wirkstoffen und Antigenen. Der Nachteil liegt in der aufwendigen Synthese und Aufreinigung der Dendrimere, die in der Regel über Ultrazentrifugation oder Dialysenmethoden ablaufen.

#### **4.4.2 Konzept zur Synthese von peptidfunktionalisierten dendritischen Polymerstrukturen**

Um einen einfachen Zugang zu peptidfunktionalisierten dendritischen Polymeren zu bekommen, sollen die Vorteile der Festphasenpeptidsynthese genutzt werden. Durch Herstellung eines Trägermaterials aus Polyethylenimin, das mit einem speziellen Crosslinker vernetzt wird, und Peptidsynthese an diesem nichtlöslichen, quellbaren

Polymer, können Peptide in hohen Beladungen aufgebaut werden. Nach der Peptidsynthese werden die Vernetzungspunkte des Harzes wieder aufgelöst und man erhält somit lösliche PEI-Polymere, die mit der entsprechenden Sequenz mehrfach funktionalisiert sind. Auf diese Weise können sehr einfach makromolekulare, multiple Peptidsysteme hergestellt werden.



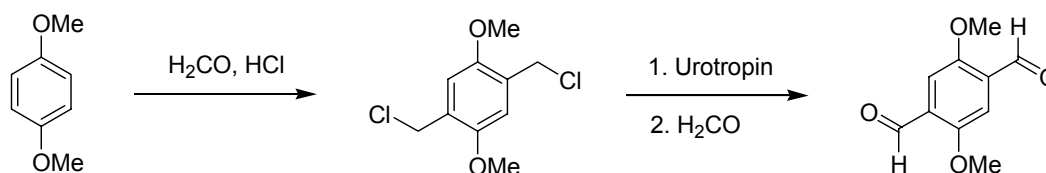
**Abb. 4-54: Schematische Darstellung des Konzepts zur Synthese von reversibel vernetzten Polymeren für die Herstellung von peptidfunktionalisierten dendritischen Polymerstrukturen.**

#### 4.4.3 Synthese des reversiblen Vernetzers

Die Reversibilität der Vernetzung garantiert der spezielle Crosslinker, der bestimmte Anforderungen erfüllen muss. Zum Einen muss er chemisch stabil gegenüber den Bedingungen der Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-Strategie sein, zum Anderen muss er die Auflösung der Vernetzungspunkte des Polymers nach erfolgter Peptidsynthese in einem zusätzlichen Reaktionsschritt ermöglichen. Außerdem muss er entsprechende funktionelle Gruppen tragen, die mit dem PEI eine stabile Vernetzung eingehen. Es muss also ein bifunktionelles Substrat synthetisiert werden, das zusätzlich innerhalb des Moleküls eine weitere orthogonale Schutzgruppe hat.

Basierend auf den Erfahrungen der Synthese der Ultraharze, wurde als funktionelle Gruppe für die Vernetzung des PEIs die Aldehydfunktion ausgewählt, welche mit den Aminen des PEIs in einer Polykondensationsreaktion zu den entsprechenden Iminen reagiert. Die Reduktion zu den Aminen liefert eine stabile Verbindung zwischen Vernetzer und PEI. Für die Gewährleistung der mechanischen Stabilität des Trägermaterials wurde wiederum ein aromatischer Aldehydbaustein verwendet.

Die Reversibilität der Vernetzung sollte zunächst durch einen Knorr- bzw. Rinklinker-analogen Crosslinker hergestellt werden. Durch Einführung von elektronenschiebenden Methoxygruppen in ortho-Stellung zu den beiden jeweiligen Aldehydfunktionen sollten die nach reduktiver Aminierung mit dem PEI hergestellten Amine durch Behandlung mit Säure<sup>[196]</sup> oder durch Chlorameisensäure-1-chlorethylester<sup>[197]</sup> wieder gespalten werden können. 2,5-Dimethoxyterephthalaldehyd wurde durch Chlormethylierung des 1,4-Dimethoxybenzols<sup>[198]</sup> und anschließender Sommelet-Reaktion erhalten.<sup>[199]</sup>

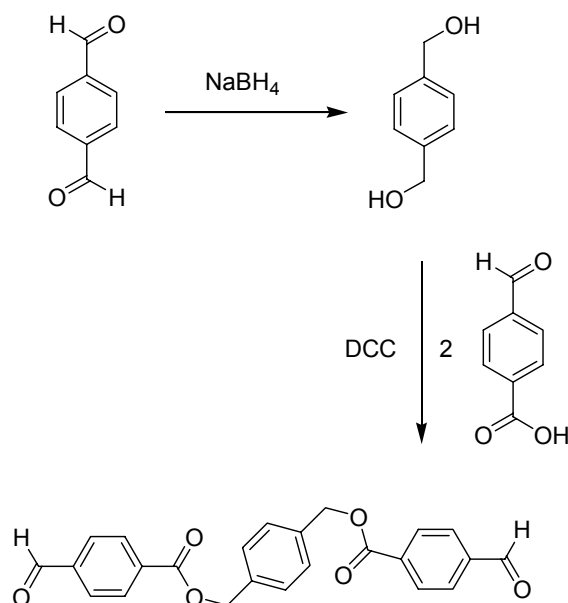


**Abb. 4-55: Synthese des 2,5-Dimethoxyterephthalaldehyds.**

Das nach Polymerisation hergestellte Trägermaterial konnte jedoch weder durch TFA-Behandlung noch durch Verwendung von Chlorameisensäure-1-chlorethylester wieder aufgelöst werden. Als Grund hierfür kann die meta-Stellung jeweils einer Methoxygruppe zum entsprechenden Amin und daraus resultierend eine verminderte Reaktivität angeführt werden.

Im zweiten Anlauf wurde versucht, die Reversibilität der Vernetzung über eine Estergruppierung einzuführen. Dazu wurde 1,4-Dihydroxymethylbenzol, was durch Reduktion von Terephthalaldehyd mit  $\text{NaBH}_4$  erhalten wird, mit 2 eq. 4-Formylbenzoesäure unter Verwendung von DCC als Kupplungsreagenz zum entsprechenden Diester umgesetzt.





**Abb. 4-56: Synthese des 4-Formylbenzoesäure-diphenylmethylesters.**

Nach Polymerisation mit PEI wurde ein quellbares Harz erhalten. Die Auflösung der Vernetzung des Polymers unter basischen Bedingungen (0.5 M NaOMe) gelang allerdings nicht. Wahrscheinlich erfolgte nach Hydrolyse der Esterbindung eine Reaktion der freien Carboxygruppe mit vorhandenen Aminen des PEIs zu Amiden, was eine entsprechende Bande im FT-ATR-IR-Spektrum anzeigte.

Den Durchbruch verschaffte die Verwendung eines Silyldiethers als orthogonale Schutzgruppe. Silylether sind durch Säure spaltbar, was der hier angestrebten Verwendung als reversibler Crosslinker für die Herstellung von peptidfunktionalisierten Dendrimerstrukturen mit Hilfe der Festphasenpeptidsynthese sehr entgegen kommt. Da die Peptide nach der Fmoc-Strategie am Träger immobilisiert werden sollen und Schutzgruppen vonseitenkettengeschützten Aminosäuren mit Hilfe von TFA entfernt werden, kann bei Verwendung eines Silyldiethers die Abspaltung der Schutzgruppen und die Auflösung der Vernetzung des Polymers in einem Schritt erfolgen. Die Stabilität von Silylethern gegenüber Säuren nimmt mit zunehmender Größe der Substituenten zu.<sup>[200]</sup> Einerseits darf die Bindung nicht zu labil sein, um ein chemisch stabiles Trägermaterial während des gesamten Syntheseablaufs zu haben, andererseits sollte sie nicht zu stark sein, damit eine Auflösung der Vernetzung unter TFA-Behandlung garantiert ist. Aus diesen Gründen wurde als Silylbaustein ein mit zwei Isopropylgruppen funktionalisiertes Dichlorsilan verwendet. Als Aldehydbaustein, der die Vernetzung mit dem PEI eingeht, wurde 4-Hydroxymethylbenzaldehyd verwendet. Dieser konnte sehr einfach durch

Reduktion von Terephthalaldehyd mit  $\text{NaBH}_4$  in THF und anschließender säulenchromatographischer Abtrennung von Edukt und Diol erhalten werden.<sup>[201]</sup> Die Umsetzung von 4-Hydroxymethylbenzaldehyd mit Diisopropyldichlorsilan erfolgte in Pyridin bei 60 °C für eine Stunde.

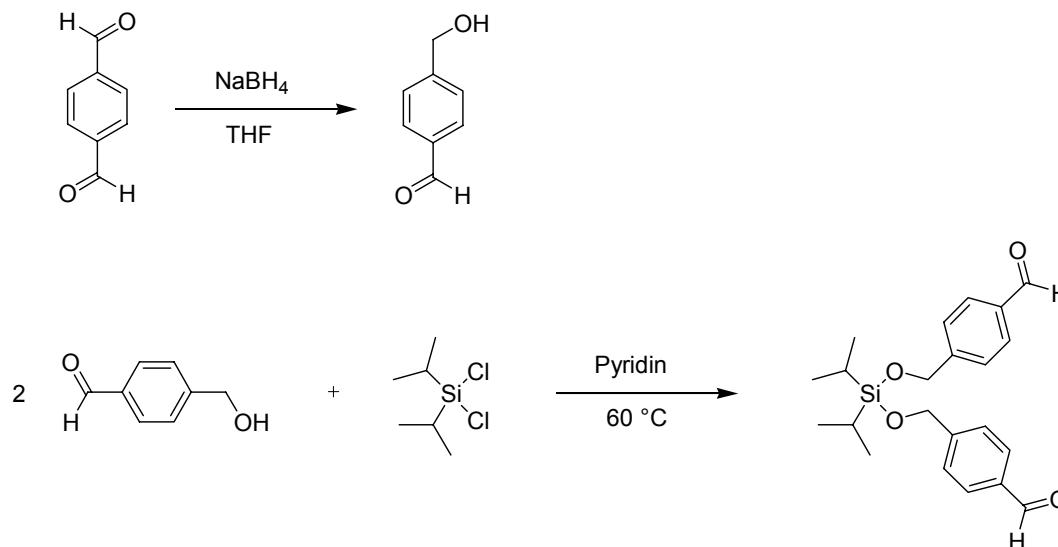


Abb. 4-57: Synthese von Diisopropyl-bis[(4-formylbenzyl)oxy]silan.

Die Charakterisierung erfolgte mit Hilfe von  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie. Abb. 4-58 zeigt das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Crosslinkers.

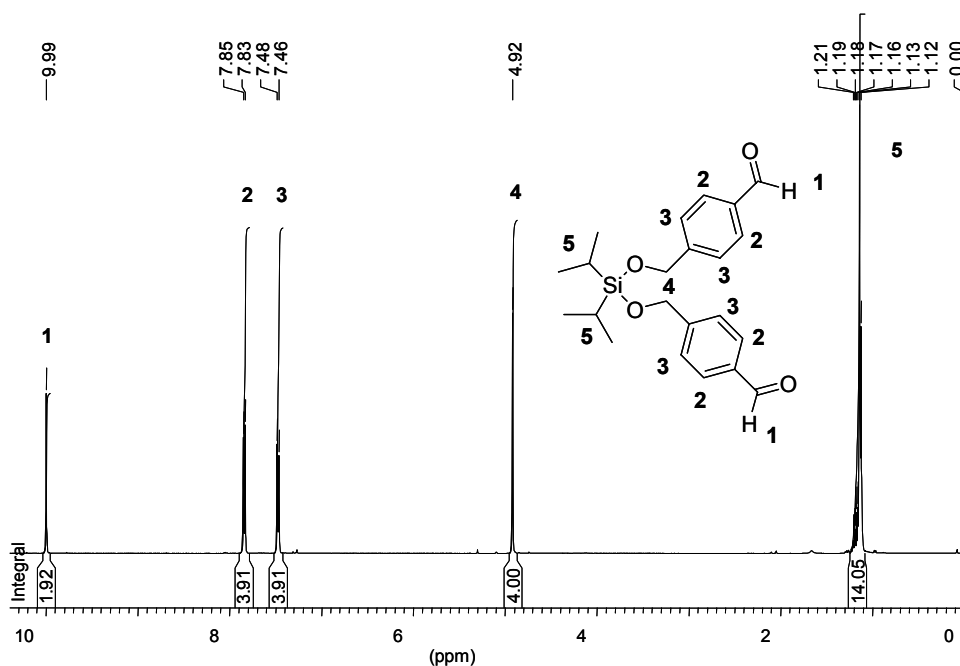


Abb. 4-58:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von Diisopropyl-bis[(4-formylbenzyl)oxy]silan (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4.4.4 Synthese des polymeren Trägers

Für die Synthese des reversibel vernetzten polymeren Trägermaterials wurde hochmolekulares PEI ( $M_n$  10 000,  $M_w$  25 000) verwendet. Dadurch können makromolekulare Substrate mit vielen Peptiden pro einzelnes PEI-Molekül erhalten werden.

Die Herstellung erfolgte analog zu den anderen Ultraharzen durch Lösen von PEI und Vernetzermolekül in THF. Um eine homogene Polymerisation zu erzielen, spielt die Konzentration von Crosslinker und THF eine wichtige Rolle. Bei Verwendung des höhermolekularen PEIs besteht generell die Gefahr, dass eine spontane Polymerisation nach Zufügen des Crosslinkers eintritt und somit die Reaktion häufig unvollständig und unregelmäßig abläuft. Entscheidend für die Quellbarkeit des Harzes und damit für die Zugänglichkeit zu den reaktiven Zentren ist das Verhältnis von Crosslinker und PEI. Auch hier muss das optimale Verhältnis vorab bestimmt werden, damit einerseits eine gute Quellbarkeit vorhanden ist, auf der anderen Seite das Harz mechanisch stabil ist.

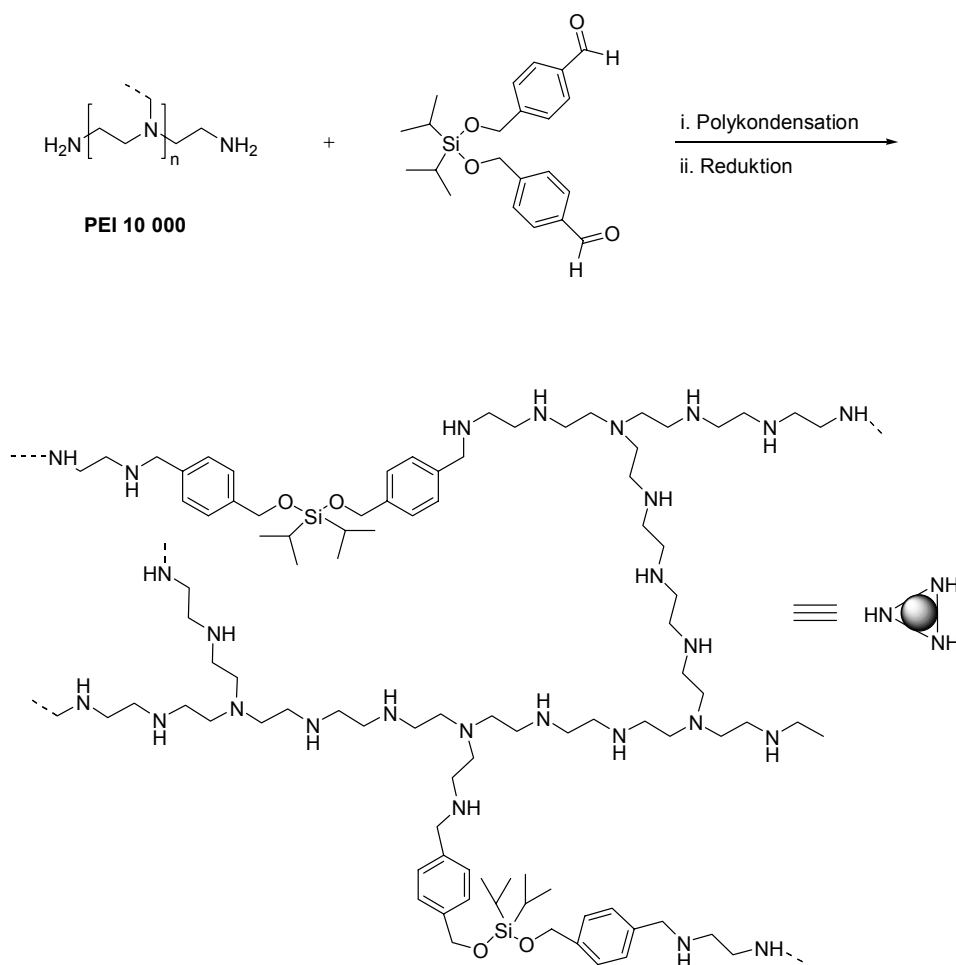


Abb. 4-59: Syntheschema für die Herstellung von reversibel vernetzten Trägermaterialien.

Die optimierten Synthesebedingungen sind in Tab. 4-18 zusammengefasst. Dabei bildete sich nach Zusammenfügen der beiden Komponenten eine homogene Lösung, die nach bereits 1 min fest wurde. Nach der Polykondensation erfolgte die Reduktion mit 2 eq. NaBH<sub>4</sub> in THF/MeOH für 16 h. Überschüssiges NaBH<sub>4</sub> wurde durch gründliches Waschen mit MeOH entfernt, da hier aufgrund der Säurelabilität des Crosslinkers auf das Quenchen mit 1 N Salzsäure verzichtet werden muss. Das Polymer wurde in Partikel mit einer durchschnittlichen Größe von 400 µm zerkleinert.

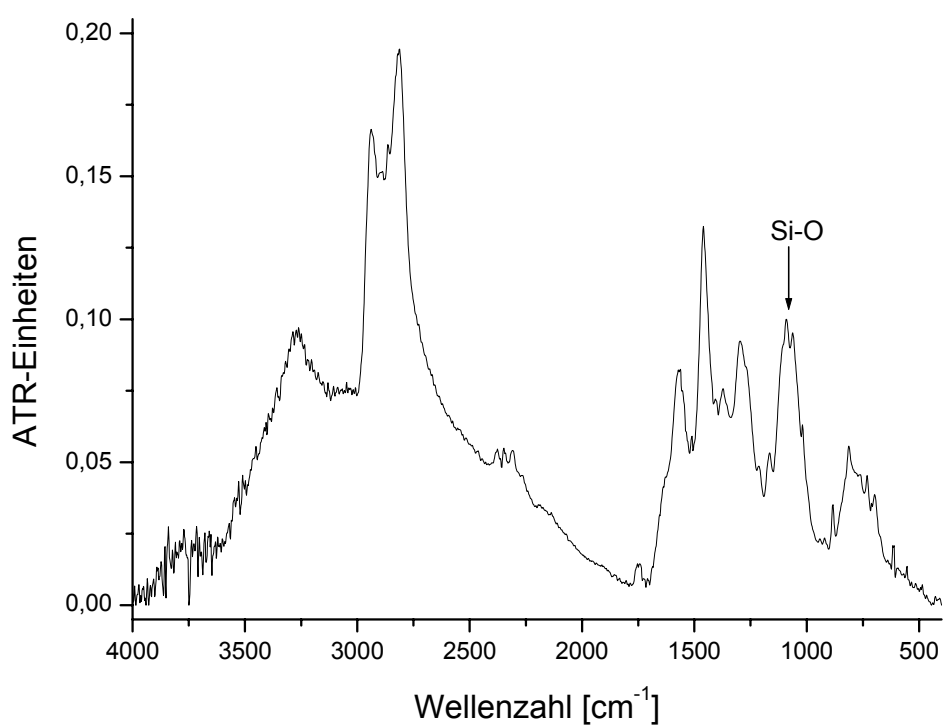
**Tab. 4-18: Bedingungen für die Synthese des polymeren Trägers.**

<b>Bedingung</b>	<b>Wert</b>
Konzentration Crosslinker in THF	0.28 mmol/ml
Konzentration PEI in THF	0.25 g/ml
Verhältnis CL/ PEI	1.03 mmol CL/g PEI 10 000
Reaktionszeit für Polykondensation	4 h

#### 4.4.5 Charakterisierung

Das bläulich-weiße Polymer wurde mit Hilfe von FT-ATR-IR-Spektroskopie, <sup>1</sup>H-MAS-NMR-Spektroskopie und Elementaranalyse charakterisiert.

Im IR-Spektrum konnten die komplette Umsetzung des Crosslinkers mit dem PEI und die vollständige Reduktion durch Abwesenheit der entsprechenden Aldehyd- bzw. Hydroxybande und Iminbanden gezeigt werden. Auch das Entfernen des überschüssigen NaBH<sub>4</sub> durch Waschen mit MeOH verlief nahezu quantitativ, was durch das Fehlen der B-H-Valenzschwingung bei 2230 cm<sup>-1</sup> deutlich wird. Als charakteristische Bande des Silylcrosslinkers dient die Si-O-Schwingung bei 1090 cm<sup>-1</sup> (Abb. 4-60).



**Abb. 4-60: FT-ATR-IR-Spektrum des unsubstituierten Harzes.**

Das  $^1\text{H}$ -MAS-NMR-Spektrum zeigt gut aufgelöste Signale für die Isopropylgruppe und die aromatischen Protonen des Crosslinkers sowie Signale diverser benzylicher Protonen, die von unterschiedlichen Substitutionsmustern des Crosslinkers innerhalb des Polymers stammen. Als breite Bande sind die  $\text{CH}_2$ -Protonen des PEIs zu sehen.

**Tab. 4-19: NMR-Daten des unsubstituierten Harzes.**

Signal-Nr.	ppm	Zuordnung	Rel. Integral
1	0.8-1.3	m, Si-isopropyl	17.3
2	2.0-3.1	m, PEI- $\text{CH}_2$	100
3	3.6-3.9	bs, sek-N- $\text{CH}_2$ -aryl	2.64
4	4.5-4.7	bs, tert-N- $\text{CH}_2$ -aryl	0.89
5	4.90	s, Si-O- $\text{CH}_2$ -aryl	-
6	7.0-7.6	bs, Aryl-H	7.09

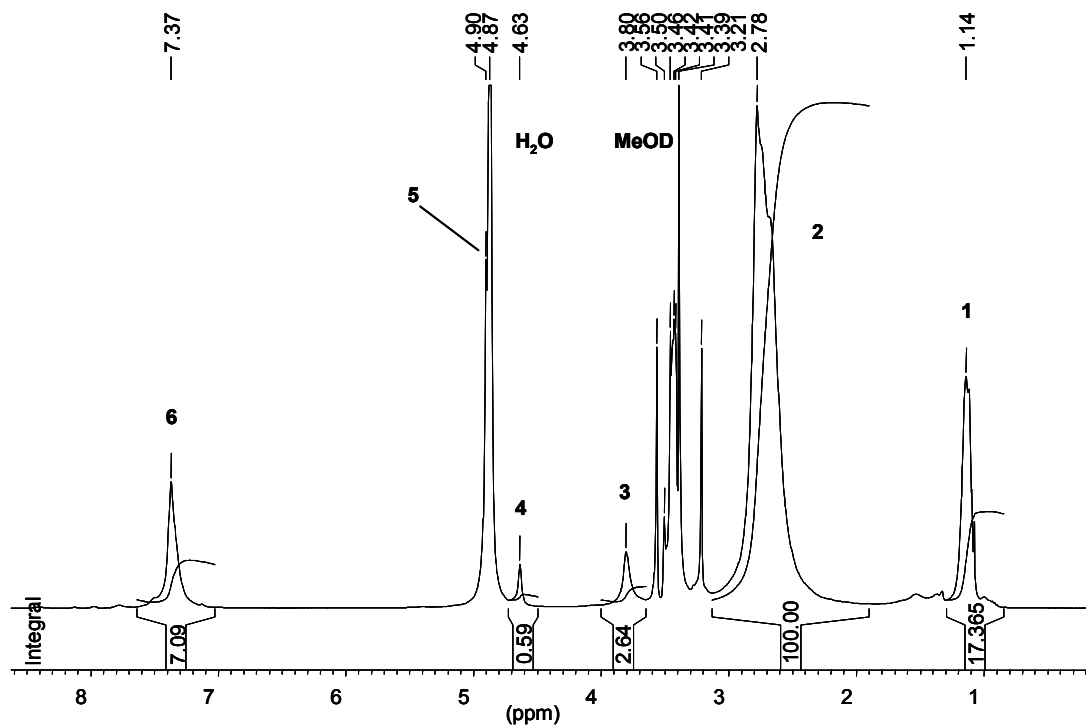


Abb. 4-61:  $^1\text{H}$ -MAS-NMR-Spektrum des unsubstituierten Harzes (400 MHz, MeOD, MAS 4500 Hz).

Die Elementaranalyse lieferte eine Stickstoffbeladung des Harzes von 15 mmol/g. Die Quellfähigkeit des Polymers war über ein breites Polaritätsspektrum der Lösungsmittel sehr gut (Tab. 4-20).

Tab. 4-20: Quellfaktoren des unsubstituierten Harzes.

Lösungsmittel	Quellfaktor [ml/g Harz]
Wasser	7.7
Methanol	8.3
DMF	4.6
THF	4.9
DCM	6.7

#### 4.4.6 Auflösung der Vernetzung des Polymers

Um die Reversibilität der Vernetzung des Harzes zu demonstrieren, wurde das Polymer einmal mit Säure (50 % TFA in DCM) und einmal mit Fluorid (1 M Tetrabutylammoniumfluorid in THF) behandelt. Schon nach 30 min war in beiden Fällen das Polymer aufgelöst. Die Auflösung der Vernetzung mit TFA hat gegenüber der Verwendung von TBAF gewisse Vorteile. Sie kann durch Evaporieren bzw. Lyophilisieren sehr leicht entfernt werden und sie spaltet gleichzeitig die Schutzgruppen der funktionellen Seitenketten der Aminosäuren ab. Somit können die Schutzgruppenabspaltung und die Auflösung der Vernetzung in einem Schritt erfolgen.

Die Vollständigkeit der Auflösung des unfunktionalisierten Polymers wurde mittels Gelpermeationschromatographie und  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bewiesen. Die Gelpermeationschromatographie ist in der Lage, makromolekulare Substrate nach ihrem Molekulargewicht zu trennen. Dabei eluieren große Moleküle zuerst. Abb. 4-62 zeigt das Chromatogramm des Ausgangs-PEIs und des Polymers, welches nach Vernetzung und anschließender Auflösung erhalten wurde.

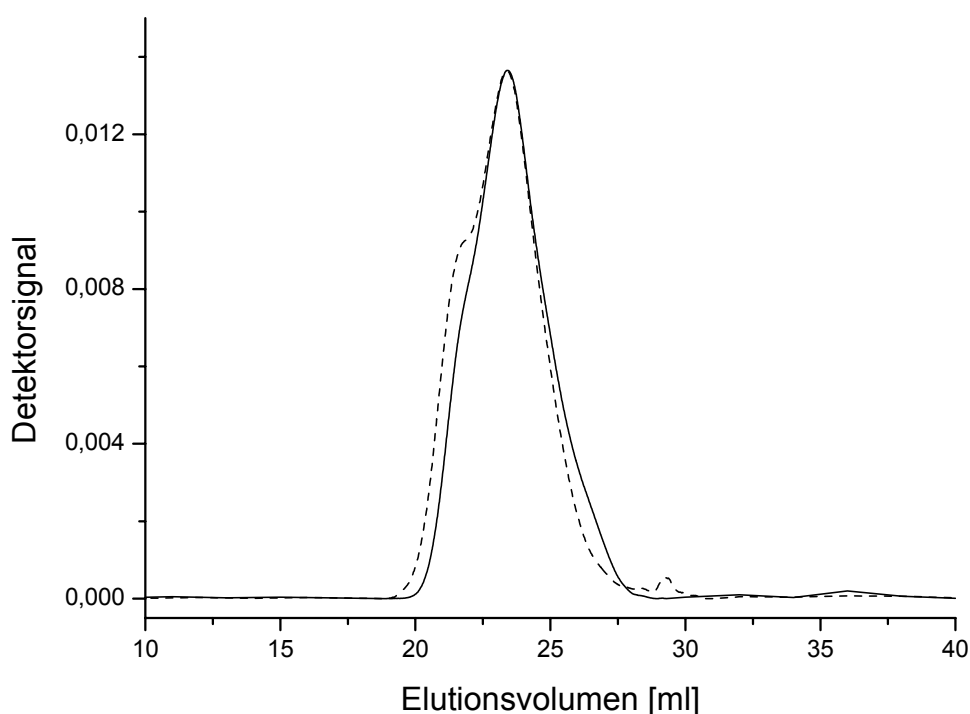


Abb. 4-62: Gelpermeationschromatogramm von reinem PEI (durchgehend) und nach Vernetzung wieder aufgelöstem Polymer (gestrichelt).

Beide Proben zeigen das gleiche Elutionsvolumen und das gleiche Signalprofil, was die identische Größenverteilung der beiden Polymere zeigt. Weiter wird aufgrund der Breite der Signale deutlich, dass das Ausgangs-PEI eine sehr breite Massenverteilung besitzt.

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des aufgelösten Polymers sind die Isopropylgruppen des Crosslinkers als scharfes, gut aufgelöstes Signal zu sehen, im Gegensatz zu den breiten Signalen, welche vom löslichen Polymer kommen. Dies kann als Indiz für die vollständige Auflösung der Si-O-Bindungen des Crosslinkers angesehen werden. Weiter sind die  $\text{CH}_2$ -Protonen des nach der Auflösung resultierenden Benzylalkohols bei 4.5 ppm sichtbar. Die Integration der Signale der Bausteine des Crosslinkers spiegelt das exakte Verhältnis der Protonen wieder. Die Signale für die  $\text{CH}_2$ -Protonen des PEIs sind aufgrund der Protonierung der benachbarten Amine durch die TFA-Behandlung tieffeldverschoben.

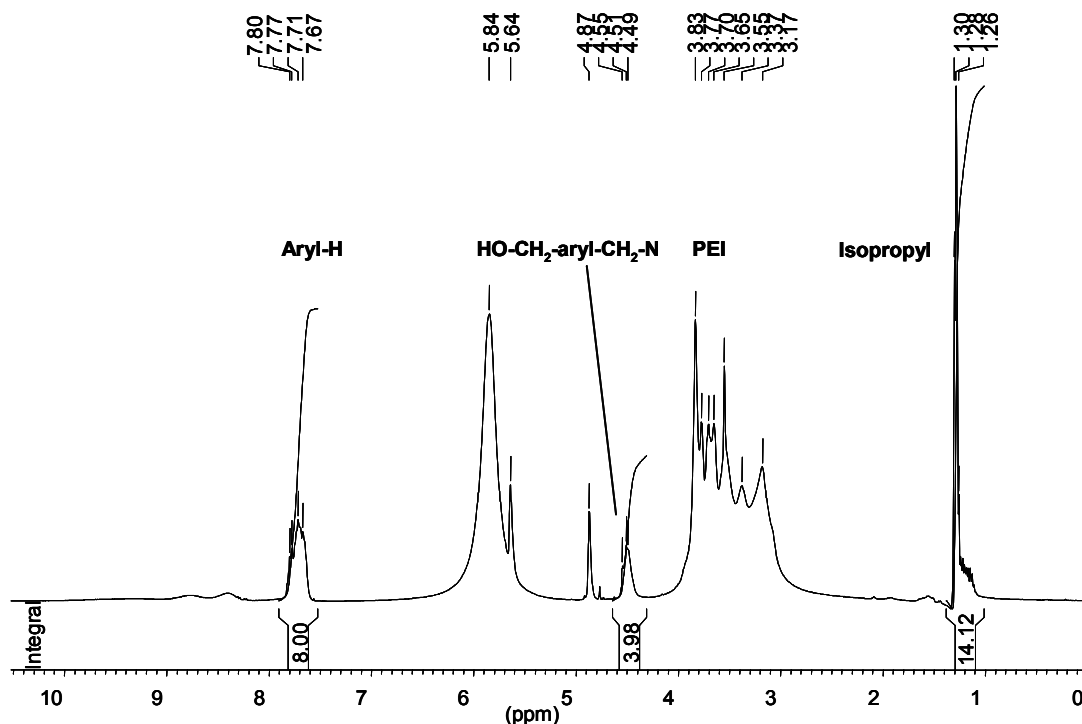


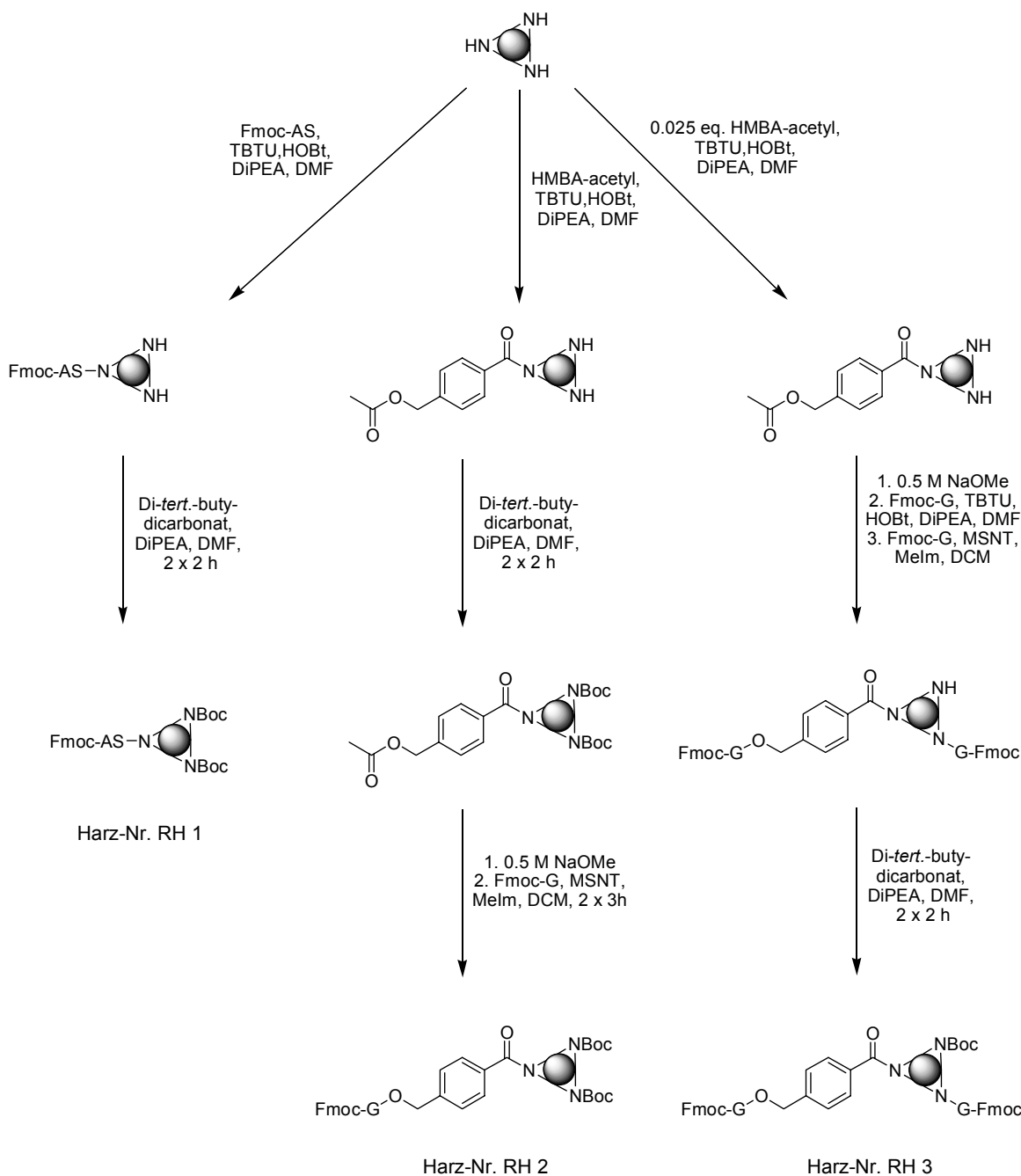
Abb. 4-63:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des aufgelösten Polymers, gemessen (400 MHz, MeOD).

#### 4.4.7 Peptidsynthese an reversibel vernetzten Polymeren

Der Aufbau von Peptiden an den reversibel vernetzten Polymeren wurde an drei unterschiedlich funktionalisierten Harzen durchgeführt. Einmal wurden die Peptide durch



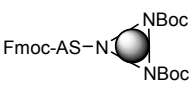
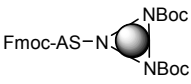
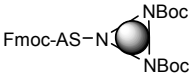
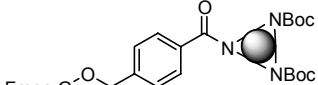
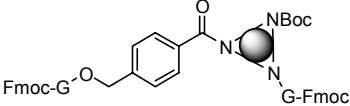
direkte Kupplung an die primären und sekundären Amine des Harzbackbones aufgebaut (RH 1, Abb. 4-64). Ein zweites Harz war zur Charakterisierung der immobilisierten Peptide mittels HPLC/MS mit einem basenlabilen HMBA-Linker funktionalisiert, an dem die Peptide direkt aufgebaut wurden (RH 2, Abb. 4-64). Als dritte Alternative wurde eine kleine Menge an HMBA-Linker an das unfunktionalisierte Harz gekuppelt, die die analytische Verfolgung der Peptidsynthese durch partielle Abspaltung ermöglichte. Der Großteil der Peptide wurde hier direkt am Polymerbackbone verankert (RH 3, Abb. 4-64).



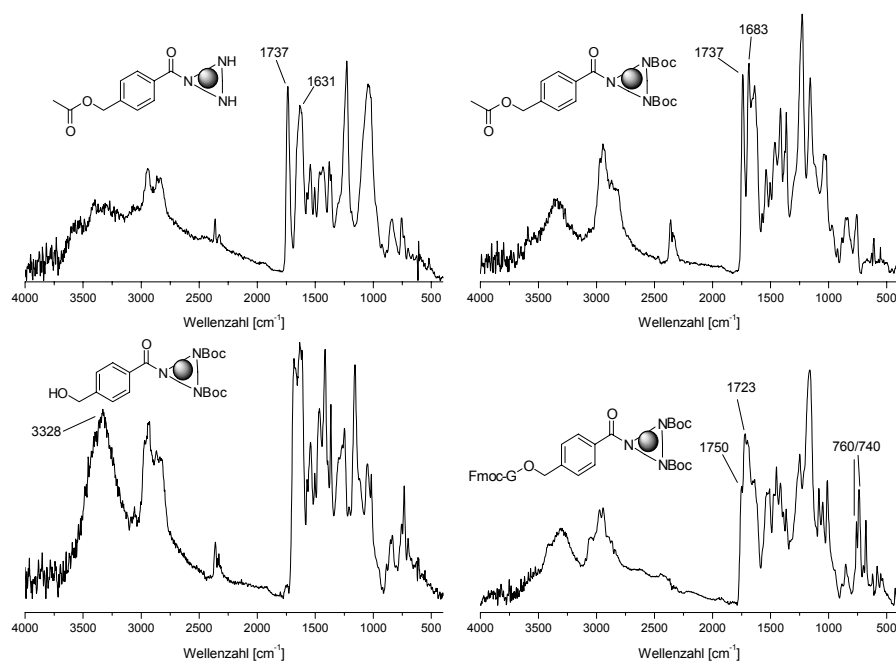
**Abb. 4-64: Syntheschema für die Herstellung verschieden funktionalisierter Ausgangsharze.**

Für die Beladung der Harze mit der ersten Aminosäure bzw. mit dem acetylgeschützten HMBA-Linker wurde jeweils 1 eq bezogen auf die Ausgangsbeladung mit Stickstoff von 15 mmol/g verwendet. Als Kupplungsreagenz diente TBTU. Die restlichen Amine des Harzes wurden mit Di-*tert.*-butyl-dicarbonat gecappt. Die Vollständigkeit des Cappingschritts wurde mit Hilfe von Kaiser- und Chloraniltest überprüft. Bei unvollständiger Reaktion wurde das Cappen wiederholt. Andere Methoden zur Einführung der Boc-Schutzgruppen auf die Amine des Polymers, wie die Verwendung des Boc-hydroxysuccinimidesters, waren in ihrer Effizienz wesentlich schlechter. Der Vorteil dieser Cappingmethode ist auch hier die Reversibilität. Nach erfolgter Peptidsynthese können die Boc-Schutzgruppen im Auflösungsschritt mit TFA abgespalten werden und man erhält die freien Amine wieder zurück. Die Beladungen der Harze mit der ersten Aminosäure wurden durch Fmoc-Quantifizierung bestimmt. Die Beladungen der HMBA-funktionalisierten Harze wurden nach zweimaliger Kupplung von Fmoc-Glycin mit MSNT und Methylimidazol als Base in DCM quantifiziert. Die hohen Ausgangsbeladungen der Harze zeigen die gute Zugänglichkeit der reaktiven Zentren der Harze. Das Quellverhalten in DMF war nach Funktionalisierung stark verbessert, was eine wichtige Voraussetzung für den Erfolg der Peptidsynthese darstellt.

**Tab. 4-21: Beladungen der reversibel vernetzten Polymere mit verschiedenen Aminosäuren bzw. mit HMBA-Linker.**

Harz	Fmoc-AS bzw. HMBA	Beladung [mmol/g]
	Glycin	3.0
	Alanin	2.7
	Valin	1.6
	HMBA-G	1.8
	HMBA-G	2.2

Die einzelnen Syntheseschritte wurden mit Hilfe der FT-ATR-IR-Spektroskopie verfolgt. Nach Immobilisierung des acetylgeschützten HMBA-Linkers an die Amine des Polymeren, zeigt das IR-Spektrum die Esterbande der Acetylgruppe bei  $1737\text{ cm}^{-1}$  und die Amidbande bei  $1631\text{ cm}^{-1}$ . Durch das Cappen mit Di-tert.-butyl-dicarbonat kommt eine weitere Amidbande bei  $1683\text{ cm}^{-1}$  dazu. Die Abspaltung der Acetylgruppe wird durch das Verschwinden der Esterbande bei  $1737$  und durch die Anwesenheit der OH-Valenzschwingung bei  $3328\text{ cm}^{-1}$  angezeigt. Nach Kupplung von Fmoc-Glycin an die freie Hydroxygruppe des HMBA-Linkers sind eine neue Esterbande bei  $1723$  und die Carbamatschwingung der Fmoc-Gruppe bei  $1750\text{ cm}^{-1}$  sichtbar. Außerdem findet man den für die Fmoc-Gruppe charakteristischen Doppelpack bei  $760$  und  $740\text{ cm}^{-1}$ , was einer Deformationsschwingung des Fluorengerüsts entspricht.

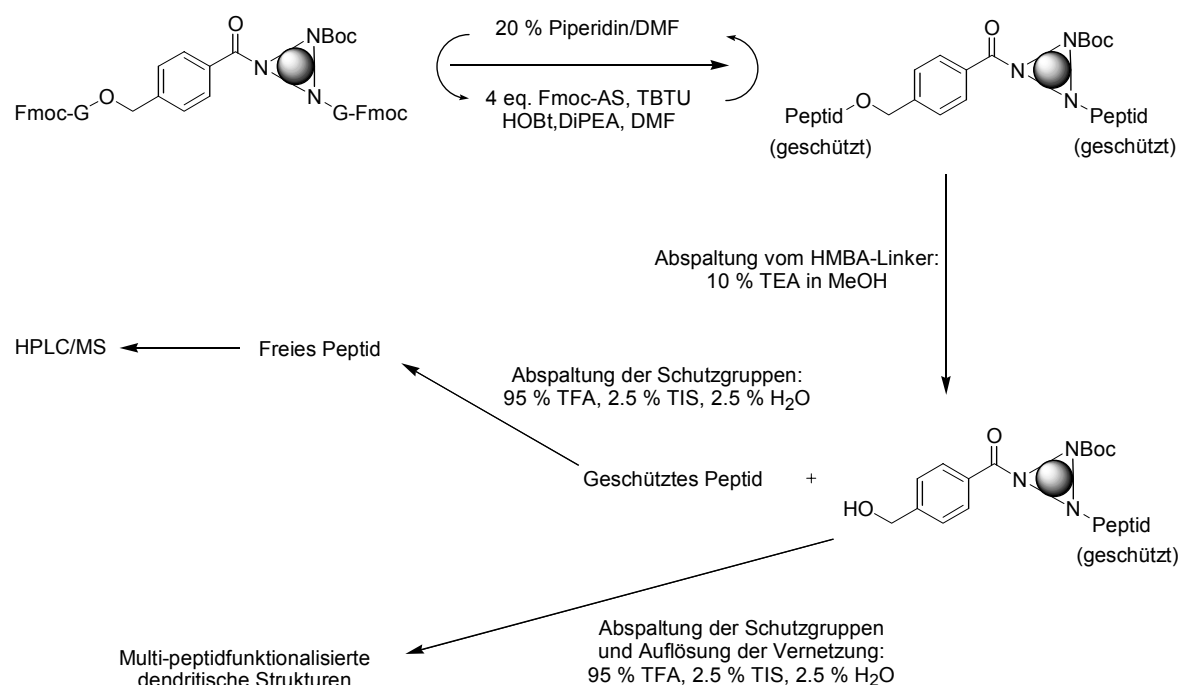


**Abb. 4-65: FT-ATR-IR-Spektren der einzelnen Zwischenstufen bei der Synthese der funktionalisierten, reversibel vernetzten Polymeren.**

Der Aufbau der Peptide an den funktionalisierten Harzen wurde durch Verwendung von 4 eq. Fmoc-geschützter Aminosäure durchgeführt. Als Kupplungsreagenz hatte sich TBTU/HOBt als wirkungsvoller gegenüber der Aktivierung mit DIC/HOBt erwiesen. Die normale Kupplungszeit betrug 90 min, beim Aufbau längerer Sequenzen mussten teilweise Doppelkupplungen durchgeführt werden, um eine vollständige Umsetzung zu erzielen. Die

Vollständigkeit der einzelnen Kupplungsschritte wurde mit Hilfe des Kaisertests überwacht.

Für die Abspaltung der vollgeschützten Peptide vom HMBA-Linker wurden diverse Methoden getestet. Die mildeste Variante stellte die Verwendung von 10 % Triethylamin in MeOH dar, welche die entsprechenden vollgeschützten Methylester der Peptide liefert. Sie zeigte gegenüber anderen Reagenzien, wie Natriummethanolat, Natriumhydroxid oder Hydrazinhydrat, wesentlich bessere Ergebnisse in Bezug auf Reinheiten der entsprechenden Peptidderivate. Nach Abspaltung der vollgeschützten Peptide vom HMBA-Linker wurden die Schutzgruppen mit Hilfe von 95 % TFA und jeweils 2.5 % Wasser und TIS als Scavenger entfernt.

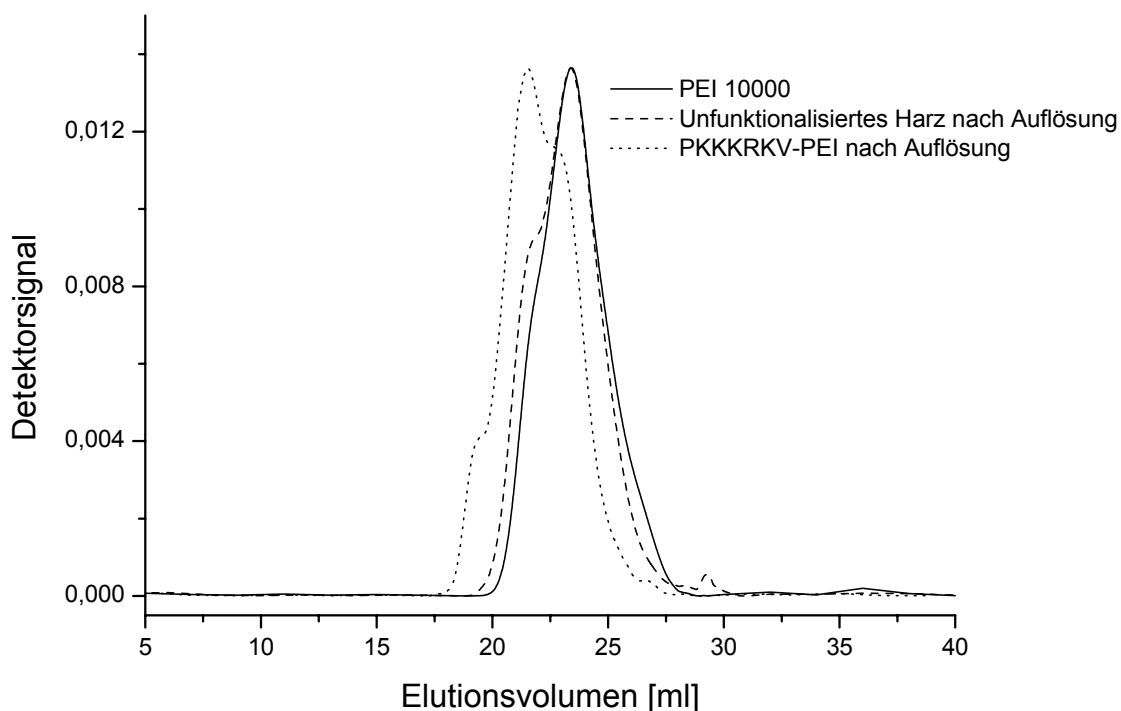


**Abb. 4-66: Allgemeines Schema für die Synthese von peptidfunktionalisierten dendritischen Strukturen an reversibel vernetzten Polymeren und für die Analytik der synthetisierten Peptide.**

Die Auflösung der peptidfunktionalisierten Harze und die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen der Aminosäuren wurde in einem Schritt mit 95 % TFA, 2.5 % Wasser und 2.5 % TIS für 4 h durchgeführt. Nach Etherfällung und Lyophilisieren aus *tert.*-But./Wasser wurden die peptidfunktionalisierten PEI-Polymere erhalten.

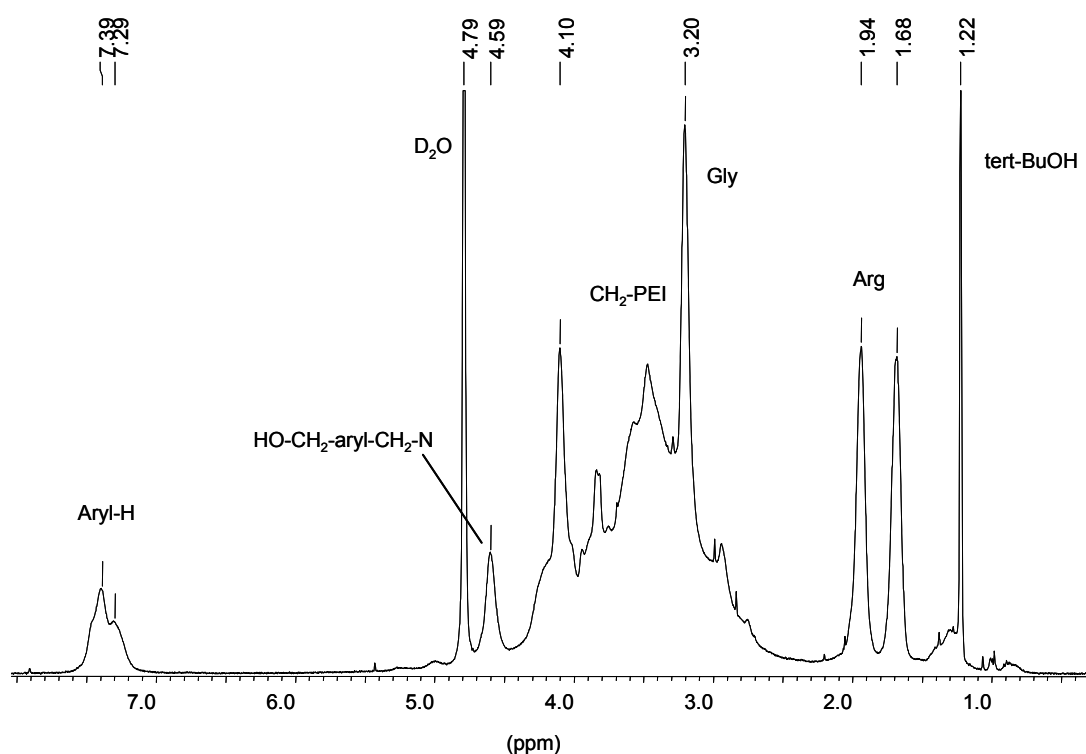
Die Vollständigkeit der Auflösung wurde wieder mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie untersucht. Durch das Beladen des Polymeren mit Peptiden nimmt das Molekulargewicht der Polymere zu. Aus diesem Grund eluieren die

peptidfunktionalisierten Polymere früher als das Ausgangsmaterial. Abb. 4-67 zeigt das Chromatogramm von mit der Sequenz PKKKRKV-beladenen PEIs nach Auflösung im Vergleich mit unfunktionalisiertem Harz nach Auflösung und Ausgangs-PEI. Dabei wurde ein identisches Peakprofil bei kleinerem Elutionsvolumen erhalten, was den Größenzuwachs der Polymere verdeutlicht.



**Abb. 4-67: Gelpermeationschromatogramm von peptidfunktionalisierten PEIs (Sequenz PKKKRKV, gepunktet) im Vergleich zum unfunktionalisierten Harz nach Auflösung (gestrichelt) und zum Ausgangspolymer (durchgehend).**

Das komplette Entfernen der Schutzgruppen durch Fällung der Peptidpolymere aus kaltem Diethylether wurde mittels  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie untersucht. Dazu wurde unfunktionalisiertes Harz mit Fmoc-Glycin umgesetzt und anschließend mit Di-tert.-butyl-dicarbonat gecappt. Nach Fmoc-Abspaltung erfolgte die Kupplung von Fmoc-Arginin, welches als Schutzgruppe der Guanidineinheit die Pbf-Schutzgruppe enthält. Nach Auflösen des Harzes mit TFA, viermaliger Etherfällung und Gefriertrocknung aus *tert.*-But./Wasser wurde das lösliche Polymer in deuteriertem Wasser vermessen.



**Abb. 4-68:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des aufgelösten Polymers mit der Sequenz Arg-Gly (400 MHz, D<sub>2</sub>O).

Das Spektrum zeigt keinerlei Signale, die der Pbf- bzw. Boc-Schutzgruppen zuzuweisen sind. Diese sollten, da sie sich in Lösung befinden würden und nicht mehr am Polymer verankert sind, scharfe Peaks liefern. Neben den NMR-Signalen des Polymers bei 7.4, 4.6 und zwischen 2.5 und 4.4 ppm, sind breite, unaufgelöste Signale für die CH<sub>2</sub>-Protonen des Arginins bei 1.68 und 1.94 ppm und ein Singulett bei 3.2 ppm zu sehen, welches zu der CH<sub>2</sub>-Gruppe des Glycins gehört.

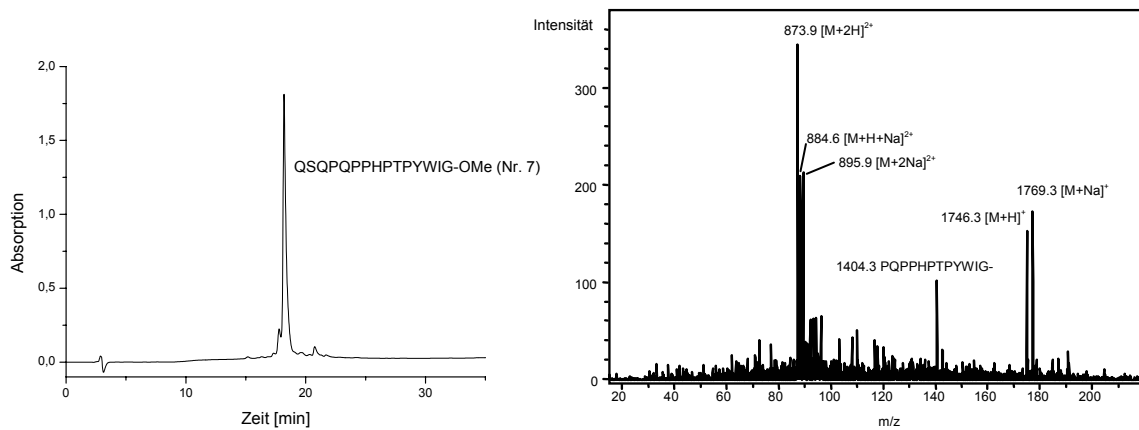
Um die Anwendbarkeit des Konzepts zu demonstrieren, wurde eine Auswahl an potentiellen bioaktiven peptidfunktionalisierten dendritischen Polymeren hergestellt (Tab. 4-22). Die ausgewählten Peptide beinhalten Sequenzen für intrazelluläres Targeting (Nr. 1 und 2), B- und T-Zell-Epitope für Impfung (4-7) und ein Peptid, das molekulare Interaktionen unterbricht, die bei der Regulierung der Apoptose innerhalb des Cytoplasmas involviert sind (Nr. 8 und 9). Alle Peptiddendrimere wurden nach dem oben angegebenen Schema synthetisiert. Die Fluorescein-gelabelten Polymere Nr. 1, 8 und 9 wurden nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe (Nr. 1) bzw. der Dde-Schutzgruppe (Nr. 8 und 9) durch Kupplung von 5(6)-Carboxyfluorescein mit DIC/HOBt unter Lichtausschluss

hergestellt. Die Harze wurden nach der Kupplung mehrere Male mit 20 % Piperidin/DMF-Lösung behandelt, um Estergebundenes Carboxyfluorescein zu entfernen.<sup>[202]</sup>

**Tab. 4-22: Übersicht über Sequenzen, Reinheiten und Größe der hergestellten Peptidpolymere. \*Massen und Reinheiten von AVPIAQKK(Dde)G bzw. KQAIPVAK(Dde)G. \*\*HPLC 214 nm.**

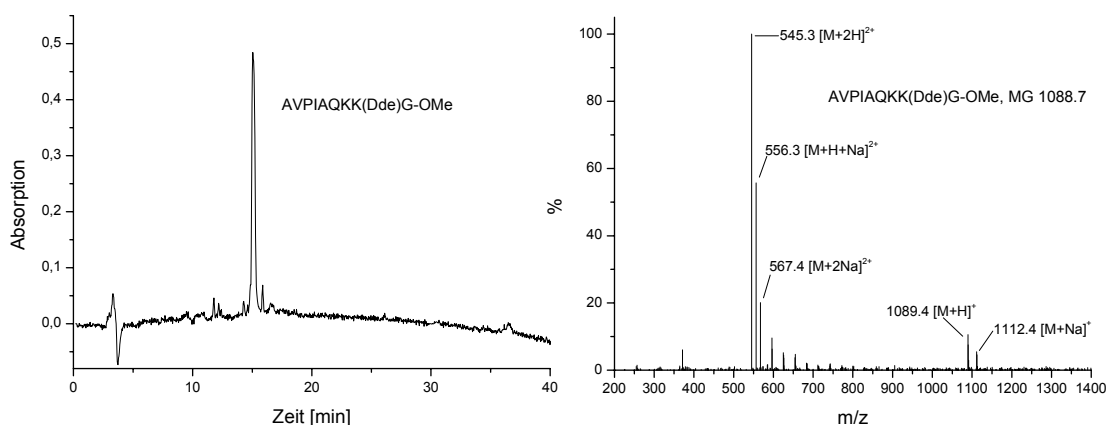
Nr.	Sequenz	Harz	Be- ladung [mmol/ g]	M Peptid- OMe [g/mol]	Rein- heit** [%]	M Peptid- polymer [g/mol]	Kopien pro PEI- Molekül
1	Fluo-PKKKRKV	RH 1	1.6	-	-	30 000	16
2	ANWTGPKKKR KV	RH 1	1.6	-	-	32 000	16
3	EQPRKFG	RH 1	3.0	-	-	35 000	40
4	MAYPRISVNNG	RH 2	1.8	1234.6	82.5	32 000	18
5	QSQPQPPHPTP YWIG	RH 2	1.8	1745.8	84.3	41 000	18
6	KVSTLPAILK LGGKG	RH 2	1.8	1595.9	82.5	38 500	18
7	QSQPQPPHPTP YWIG	RH 3	2.2	1745.8	88.3	48 000	22
8	AVPIAQKK(Flu o)G	RH 3	2.2	1088.7*	88.3*	38 000	22
9	KQAIPVAK(Flu o)G	RH 3	2.2	1088.7*	86.6*	38 000	22

Die vom HMBA-Linker der Polymere abgespalteten Peptidmethylester zeigten sehr gute Reinheiten (über 82 %). Auch bei der Synthese von längeren Peptiden oder Sequenzen mit vielen Prolinen (Nr. 7) wurden exzellente Reinheiten erhalten. Fehlsequenzen traten meist nur am Ende der Sequenzen bei Kupplung auf Prolin oder Lysin auf.



**Abb. 4-69: HPLC-Chromatogramm und MS-Spektrum von QSQPQPPHPTPYWIG-OMe (MG 1745.8).**

Für die Herstellung der fluoresceingelabelten peptidfunktionalisierten PEI-Polymere Nr. 8 und 9 (Tab. 4-22) wurde als zweite Aminosäure Fmoc-Lysin mit einer Dde-Schutzgruppe der Seitenkette verwendet. Als letzte Aminosäuren wurden jeweils die Boc-geschützten Derivate verwendet, um die Acylierung des Aminoterminus mit 5(6)-Carboxyfluorescein zu vermeiden. Nach Aufbau der Peptidsequenz wurden für die Synthesekontrolle die am HMBA-Linker immobilisierten geschützten Peptide abgespalten und analysiert. Anschließend wurde das Polymer mit 2 % Hydrazinhydrat/DMF-Lösung behandelt, um die Dde-Schutzgruppe abzuspalten. Da der HMBA-Linker gegenüber Hydrazinhydrat labil ist, musste die Analytik auf der vorigen Stufe durchgeführt werden. Die Vollständigkeit der Kupplung des Fluorophors wurde mit Hilfe des Kaiser-Tests überprüft.



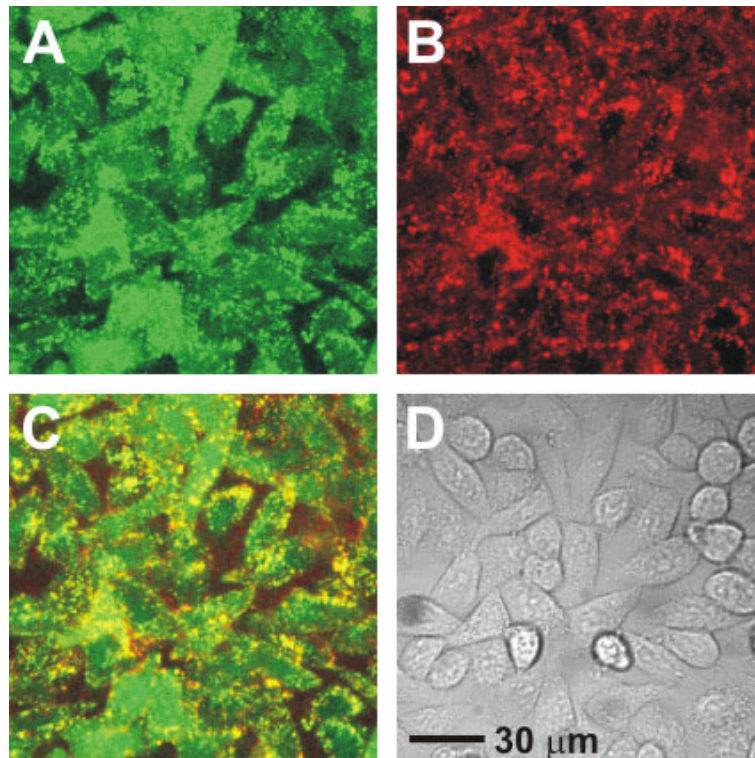
**Abb. 4-70: HPLC-Chromatogramm und MS-Spektrum von AVPIAQKK(Dde)G-OMe (MG 1088.7).**



Das durchschnittliche Molekulargewicht der peptidfunktionalisierten PEI-Polymere richtet sich nach Höhe der Beladung und Masse des immobilisierten Peptids. Für die Berechnung wurde für das PEI ein mittleres Molekulargewicht von 10 000 angenommen. Durch die hohen Beladungen der Polymere mit Peptiden können mit Hilfe dieses Konzepts sehr schnell und einfach makromolekulare Substrate hergestellt werden, welche bis zu 40 Kopien der jeweiligen Peptidsequenz auf einem PEI-Molekül tragen. Eine weitere Erhöhung der Multivalenz kann durch die Verwendung von verzweigten Polymeren mit höherem Molekulargewicht erreicht werden (Tab. 4-22).

#### **4.4.8 Endocytose von peptidfunktionalisierten PEI-Polymeren in HeLa-Zellen**

Um die biologische Anwendbarkeit der hergestellten Peptidpolymere zu testen, wurde die zelluläre Aufnahme durch konfokale Mikroskopie an lebenden Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen für 2 h mit dem mit der Fluorescein-markierten Kernlokalisationssequenz Fluo-PKKKRKV<sup>[203]</sup> funktionalisierten PEI-Polymer (Nr. 1, Tab. 4-22) inkubiert. HeLa-Zellen sind humane epitheliale Krebszellen und stellen eine weit verbreitete und häufig eingesetzte Zelllinie dar, die sehr häufig zur Untersuchung der Endocytose in Säugetierzellen verwendet wird. Sie gehören zu den adhärenen Zellen und wachsen in Monolayern. Für die Untersuchung des Aufnahmeweges der Peptidpolymere wurden HeLa-Zellen mit hochmolekularem fluoreszenzmarkiertem Dextran und dem Peptidpolymer Nr.1 ko-inkubiert. Von Dextranen ist allgemein bekannt, dass sie über Endocytose in Säugetierzellen aufgenommen werden.<sup>[204]</sup> Durch Vergleich der Fluoreszenzverteilung von Dextran und Peptidpolymer in den Zellen können somit Rückschlüsse über die Art der Aufnahme gezogen werden.



**Abb. 4-71: Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von HeLa-Zellen inkubiert mit Fluorescein-gelabeltem Peptidpolymer Nr.1 (400 nM) und AlexaFluor 647-Dextran (10 µM). Bild A zeigt die Fluorescein-Fluoreszenz, Bild B die AlexaFluor 647-Dextran-Fluoreszenz, Bild C die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle und Bild D zeigt die Transmissionsaufnahme.**

In Abb. 4-71 ist gut zu erkennen, dass HeLa-Zellen das Peptidpolymer effizient internalisieren. Zu erkennen ist sowohl eine vesikuläre Fluoreszenz, aber auch eine homogene Lokalisation der Fluoreszenz im Cytoplasma und im Zellkern. Ein Vergleich mit der Fluoreszenzverteilung der endocytierten Dextranmoleküle, die mit einem zweiten, unterschiedlichen Fluorophor markiert sind, zeigt eine deutliche Kolo-kalisation in den vesikulären Strukturen. Diese beobachtete Verteilung lässt auf einen Aufnahmeweg über Endocytose und anschließendem Austreten der peptidfunktionalisierten PEI-Polymere aus den endocytotischen Kompartimenten schließen.

Die Ergebnisse aus den ersten Untersuchungen zur Aufnahme der peptidfunktionalisierten PEI-Polymere über Endocytose wurden durch ein weiteres Experiment untermauert. Durch Zugabe von Bafilomycin A1 (Abb. 4-72), was ein selektiver Inhibitor der  $H^+$ -ATPase ist, wird die Absenkung des pH-Werts in den Endosomen verhindert, so dass es nicht zum Austritt der aufgenommenen Substrate in das Cytosol bzw. in den Zellkern kommt.<sup>[185]</sup> Bafilomycin A1 wurde 15 min vor Zugabe der Peptidpolymere und des Dextrans mit dem Zellmedium inkubiert.

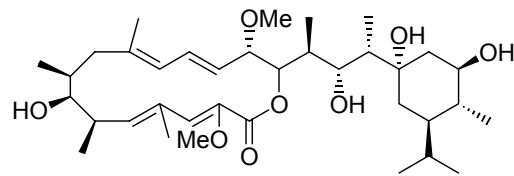


Abb. 4-72: Struktur des Bafilomycin A1.

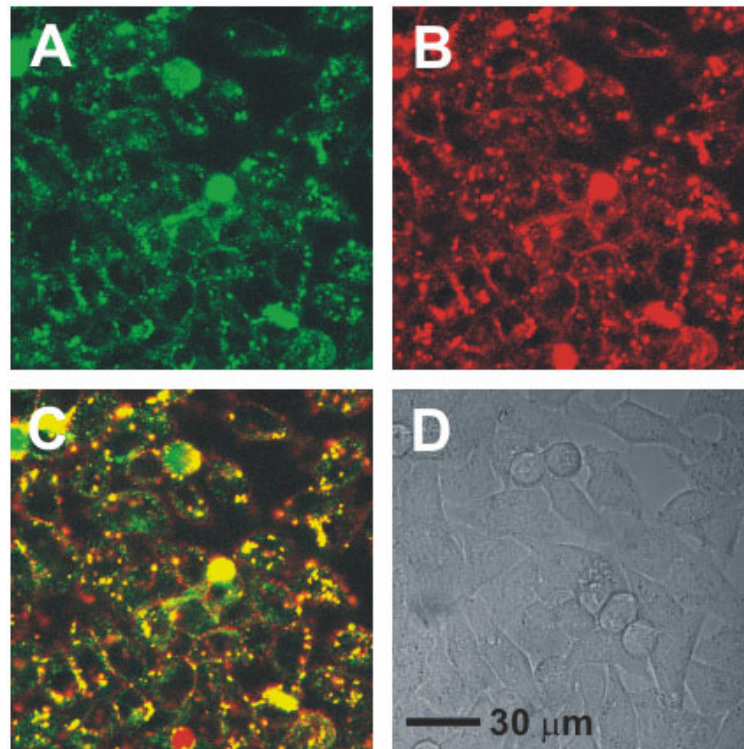
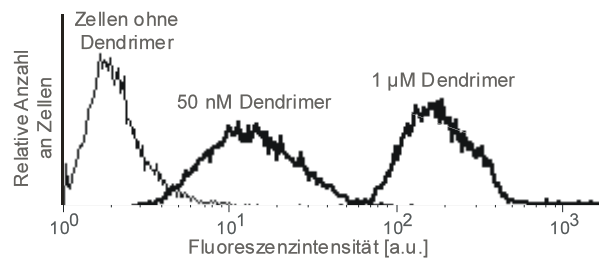


Abb. 4-73: Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von HeLa-Zellen inkubiert mit Bafilomycin A1 (300 nM), Fluorescein-gelabeltem Peptidpolymer Nr.1 (400 nM) und AlexaFluor 647-Dextran (10  $\mu$ M). Bild A zeigt die Fluorescein-Fluoreszenz, Bild B die AlexaFluor 647-Dextran-Fluoreszenz, Bild C die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle und Bild D zeigt die Transmissionsaufnahme.

Nach 2 h Inkubationszeit wurden die Zellen wiederum mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Fluoreszenz sowohl für die Peptidpolymere wie auch für das Dextran wurde nur in vesikulären Strukturen und nicht im Cytoplasma bzw. Zellkern detektiert (Abb. 4-73). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die hergestellten peptidfunktionalisierten PEI-Polymere über einen endocytotischen Weg in die Zellen aufgenommen werden und anschließend ansäuerungsabhängig in das Cytoplasma gelangen. Auf Grund der Mikroskopiedaten kann man davon ausgehen, dass durch den Übertritt des PEI ins Cytoplasma die Integrität der Endosomen beeinflusst wird und somit

auch das Dextran in das Cytoplasma gelangen kann. Die Anwesenheit der Peptidpolymere erhöht die Aufnahme des anionischen Dextrans erheblich.

Die Homogenität der Aufnahme der Peptidpolymere in die Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Dazu wurde die Aufnahme verschiedener Konzentrationen des Peptidpolymers in HeLa-Zellen bestimmt.



**Abb. 4-74: Zelluläre Aufnahme der fluoresceingelabelten Peptidpolymere.**

Alle Zellen der HeLa-Zellpopulationen internalisierten das Fluorescein-markierte Peptidpolymer. Sogar bei sehr niedrigen Konzentrationen von 50 nM weisen alle Zellen Fluoreszenzfärbung auf, was auf eine sehr effizient Aufnahme hinweist (Abb. 4-74).

Die zelluläre Toxizität der Peptidpolymere wurde anhand von zellmorphologischen Parametern wie Granularität und Zellgröße im Durchflusszytometrieexperiment bestimmt. Dabei wurde keine ersichtliche Toxizität der Peptidpolymere bei Konzentrationen unter 1  $\mu$ M beobachtet.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Synthese, Charakterisierung, Evaluierung und Anwendungskonzepten von neuen hochbeladenen Trägermaterialien auf der Basis von vernetztem Polyethylenimin (Ultraharze).

Im ersten Teil ging es um die Erarbeitung eines robusten Syntheseprotokolls für die Herstellung der Ultraharze. Durch Vernetzung von niedermolekularem PEI mit Terephthalaldehyd und anschließender Reduktion wurde ein hoch quellfähiges Trägermaterial erhalten, was eine Beladung von 15 mmol/g an Aminen aufweist. Die Charakterisierung mit  $^1\text{H}$ -MAS-NMR-Spektroskopie und FT-ATR-IR-Spektroskopie konnte die vollständige Umsetzung und Reduktion des Polyiminnetzwerkes beweisen. Durch verschiedene Derivatisierungsreaktionen, wie Acetylierung, Quarternisierung der Amine und Immobilisierung von Aminosäuren und Linkermolekülen konnte die ausgezeichnete Zugänglichkeit zu den Aminen des Polymers demonstriert werden. Es wurden Beladungen von bis zu 7.6 mmol/g erhalten, was einem Vielfachen von herkömmlichen Trägermaterialien entspricht. Das Quellverhalten der Harze wurde durch den hohen Grad der Funktionalisierung stark beeinflusst. Die chemische Stabilität von Ultraharz in der freien Aminform und von HMPB-funktionalisiertem Ultraharz wurde gegenüber stark sauren und stark basischen Bedingungen getestet. Es zeigten sich keinerlei Beeinträchtigungen des Quellverhaltens, der Masse und der Morphologie der Harze. Der Einsatz einer Reihe verschieden funktionalisierter Harze in der Peptidsynthese demonstrierte das Potential dieser hochbeladenen Ultraharze. Peptide in guten bis sehr guten Reinheiten und Ausbeuten wurden mit Hilfe eines Syntheseroboters unter Standardbedingungen synthetisiert.

Der zweite Teil befasst sich mit der Evaluierung von Ultraharzen. Basierend auf einer genauen Charakterisierung der verwendeten PEIs in Hinblick auf Molekulargewicht, Vernetzungsgrad und Verteilung von primären, sekundären und tertiären Aminen mit Hilfe der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie, wurden verschiedene Ultraharze hergestellt, mit dem Ziel, ein optimiertes Harz bezüglich Quellverhalten, mechanischer und chemischer Stabilität, Zugänglichkeit zu den reaktiven Zentren, Beladbarkeit und dem Einsatz als Trägermaterial in der Peptidsynthese zu finden. Diverse Vernetzer, wie Dibromverbindungen und Dialdehyde, wurden getestet. Dabei lieferten die mit Terephthalaldehyd vernetzten

Polymere die besten Ergebnisse, was die mechanische Stabilität und die Kontrolle des Polymerisationsprozesses betrifft. Sechs Ultraharze mit unterschiedlichen Crosslinkeranteilen und zwei verschiedenen PEI-Ausgangspolymeren wurden hergestellt, und mit FT-ATR-IR-Spektroskopie, Elementaranalyse und  $^1\text{H}$ -MAS-NMR-Spektroskopie charakterisiert. Durch Integration der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden die Verhältnisse von Vernetzer und PEI bestimmt. Dabei konnten sehr gute Übereinstimmungen mit den theoretischen Werten gefunden werden. Das Immobilisieren von drei verschiedenen Linkermolekülen lieferte in allen Fällen hochbeladene Trägermaterialien mit Umsetzungsraten zwischen 58 und 100 %. Alle Ultraharze zeigten sehr gute Zugänglichkeiten, so dass der Einfluss des Crosslinkeranteils nur gering war. Das Quellverhalten von unfunktionalisierten und funktionalisierten Ultraharzen wurde in einer Reihe von Lösungsmitteln mit breitem Polaritätsspektrum untersucht. Die freien Aminharze zeigten sowohl in polaren als auch in unpolaren Lösungsmitteln sehr gute Quelleigenschaften. Mit zunehmendem Crosslinkeranteil nahmen die Quellfaktoren ab. Die hochbeladenen, funktionalisierten Ultraharze wiesen abhängig von der Natur und Polarität des Linkermoleküls stark unterschiedliche Quelleigenschaften auf. Durch Anbringen eines Spin-Labels an die Ultraharze und Vermessung der Harze mit ESR-Spektroskopie, konnten die Rotationskorrelationszeiten der Label bestimmt und so Aussagen über die Mobilität der reaktiven Zentren im Polymer gemacht werden. Dabei zeigte sich durch einen Vergleich mit Polystyrol und TentaGel, dass das niedervernetzte Ultraharz UH 4 eine für polymere Träger sehr hohe Beweglichkeit hat, die im Bereich des flexiblen TentaGels liegt. Um den Einsatz in der Peptidsynthese zu untersuchen, wurden an Rink- und HMPB-funktionalisierten Ultraharzen ein aus 11 Aminosäuren bestehendes Peptid aufgebaut und die Ergebnisse bezüglich Reinheiten und Ausbeuten mit dem an Wang-PS synthetisiertem Peptid verglichen. Die besten Ergebnisse lieferten die niedervernetzten, mit HMPB-Linker funktionalisierten Ultraharze, welche mit dem an Wang-PS synthetisierten Peptid vergleichbar waren. Als Resultat der gesamten Evaluierung der Ultraharze kann abschließend festgestellt werden, dass das niedervernetzte, mit PEI-2 polymerisierte Ultraharz UH 4 die besten Eigenschaften in punkto Quellbarkeit, Zugänglichkeit, Mobilität und Einsatz in der Peptidsynthese aufweist.

Im dritten Teil wurde das Ultraharzkonzept auf die Herstellung von polymeren Reagenzien erweitert. Durch Vernetzung von hochmolekularem PEI mit Terephthalaldehyd wurde ein mechanisch stabiles und gering quellendes Polymer erhalten. Nach Quarternisierung der

sekundären und tertiären Amine mit Methyljodid und anschließendem Ionenaustausch mit wässriger Natriumborhydridlösung, wurde ein hochbeladenes polymeres Borhydridreagenz erhalten. Die Charakterisierung erfolgte mit FT-ATR-IR-Spektroskopie, das Harz zeigte einheitliche Quellfaktoren in polaren wie in unpolaren Lösungsmitteln. Nach Bestimmung der effektiven Beladung anhand einer Testreaktion mit Hilfe der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie, ergab sich eine effektive Beladung von bis zu 12 mmol/g. Das polymere Borhydrid auf PEI-Basis wurde für die Reduktion einer Reihe von Carbonylverbindungen und Nitroolefinen eingesetzt. Dabei wurden bei Verwendung von geringen Überschüssen an Borhydridharz ausgezeichnete Reinheiten und Ausbeuten der Substrate erhalten, welche mit NMR-Spektroskopie und HPLC charakterisiert wurden. Als weitere Anwendung wurde das polymere Borhydrid bei der reduktiven Aminierung von Aldehyden mit primären Aminen eingesetzt. Nach Iminbildung reichten 2 eq. Harz aus, um eine vollständige Reduktion zu erzielen. Die Lager- und Recyclingfähigkeit des Harzes wurde ebenfalls untersucht. Das Borhydridharz zeigte auch nach einer Lagerung von einem Jahr die nahezu identische effektive Beladung, wobei der Versuch des Recyclens des Polymers zu einer niederen Beladung führte.

Der vierte Teil befasst sich mit der Synthese von reversibel vernetzten Polymeren zur Synthese von peptidfunktionalisierten dendritischen Strukturen. Das Konzept basiert auf der Vernetzung von hochmolekularem PEI mit einem speziellen Crosslinkermolekül auf Silyletherbasis. An diesem quellbaren, gut funktionalisierbaren Polymer wurden Peptide in hohen Beladungen aufgebaut. Nach erfolgter Peptidsynthese wurde die Vernetzung des Harzes durch saure Hydrolyse der Si-O-Bindungen des Crosslinkers wieder aufgelöst. Gleichzeitig konnte die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen der Aminosäuren durchgeführt werden. Das Polymer wurde mit FT-ATR-IR-Spektroskopie und  $^1\text{H}$ -MAS-NMR-Spektroskopie charakterisiert. Nach Kupplung der ersten Aminosäure wurden die restlichen Amine des Harzes mit Di-*tert.*-butyl-dicarbonat gecappt. Um die am PEI-Polymer immobilisierten Peptide zu charakterisieren, wurde ein Linkerkonzept auf Basis des basenlabilen HMBA-Linkers entwickelt. Dieses gestattete die Abspaltung der vollgeschützten Peptide, welche anschließend mit HPLC/MS charakterisiert wurden. Die Reversibilität der Vernetzung wurde mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie und der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie untersucht. Die Synthese von einer Auswahl an potentiellen bioaktiven peptidfunktionalisierten Polymeren, lieferte dendritische Strukturen mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 30 000 bis 58 000 g/mol und mit 16 bis

40 Peptiden pro PEI-Polymer. Die biologische Anwendbarkeit der hergestellten Peptidpolymere wurde durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie an lebenden Zellen untersucht. Durch Internalisierung eines mit einer Kernlokalisationssequenz immobilisierten fluoreszenzmarkierten Peptidpolymers in HeLa-Zellen, konnte der Aufnahmeweg des Polymers über Endocytose bestimmt werden. Die Homogenität der zellulären Aufnahme wurde mit Hilfe der Durchflusscytometrie untersucht. Die peptidfunktionalisierten PEI-Polymere zeigten nur eine sehr geringe zelluläre Toxizität. Mit Hilfe dieses Konzepts der reversibel vernetzten Polymeren können multivalente, makromolekulare Peptidstrukturen schnell und einfach aufgebaut werden.



## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze) in p.a. Qualität bezogen. Die wasserfreien Lösungsmittel ACN, DCM, Dioxan, DMF, THF, Toluol wurden von Fluka (Neu-Ulm) bezogen. Für die HPLC wurden Acetonitril und Methanol der Reinheit LiChrosolv Gradient Grade der Firma Merck (Darmstadt) und Acetonitril der Reinheit HPLC Far UV Gradient Grade der Firma J. T. Baker (Deventer, Holland) eingesetzt. Trifluoressigsäure der Reinheit Uvasol stammte ebenfalls von der Firma Merck (Darmstadt). Entionisiertes Wasser wurde über eine Filtrationsanlage von Millipore (Eschborn) aufgereinigt.

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden von Aldrich (Steinheim), Fluka (Neu-Ulm), Lancaster (Mühlheim am Main) und Merck (Darmstadt) bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt. Polystyrolharze wurden von der Firma Nova-Biochem (Läufelfingen, Schweiz) und TentaGelharze von der Firma Rapp Polymere (Tübingen) bezogen.

### 6.2 Analytische Methoden und Geräte

#### 6.2.1 Kaiser-Test

Zur Kontrolle der Kupplungseffizienz auf primäre Amine wurde die Farbreaktion mit Ninhydrin an fester Phase nach Kaiser durchgeführt. Folgende Reagenzlösungen wurden dazu verwendet:

- Kaiser I: 50 µl einer 0,01 M wässrigen KCN-Lösung werden mit Pyridin auf 25 ml aufgefüllt.
- Kaiser II: 5 g Ninhydrin werden in 100 ml n-Butylalkohol gelöst.
- Kaiser III: 80 g Phenol werden in 20 ml n-Butylalkohol gelöst.

Zur Durchführung werden wenige Harzkugeln in einem Eppendorf-Cup mit je einem Tropfen der drei Reagenzlösungen versetzt und die Suspension 5 min bei 110 °C erhitzt. Tritt dabei keine intensive Blaufärbung des Harzes oder der Lösung auf, so liegen keine freien Aminogruppen vor.

### **6.2.2 Chloraniltest**

Zur Kontrolle der vollständigen Acylierung auf sekundäre Amine der Ultraharze, wurde der Chloraniltest verwendet. Dazu werden wenige Harzkörner in einem Eppendorf-Cup mit je einem Tropfen einer Lösung von Acetaldehyd in DMF (2 % (v/v)) und Chloranil in DMF (2 % (w/v)) versetzt. Bei Anwesenheit von sekundären Aminen färbt sich das Harz nach 2 – 10 min blau.

### **6.2.3 UV-Spektroskopie**

Für die quantitative Fmoc-Beladungsbestimmung der Ultraharze wurden UV-Spektren an einem Lambda 5 UV/VIS-Spektrometer (Perkin-Elmer, Überlingen) aufgenommen.

### **6.2.4 Bestimmung der Harzbeladung durch UV-spektrometrische Fmoc-Bestimmung**

Für die Fmoc-Bestimmung wird gewaschenes und getrocknetes Harz (3 – 7 mg) in einen 10 ml Maßkolben genau eingewogen. Anschließend wird der Maßkolben mit 20 % Piperidin/DMF-Lösung aufgefüllt und für 2 h geschüttelt. Als Referenzlösung dient die Piperidin-Lösung (20 % in DMF). Es wird zunächst am UV-Spektrometer mit der Referenzlösung eine Hintergrundkorrektur im Wellenlängenbereich zwischen 250 und 320 nm aufgenommen und anschließend die Abspaltlösung gegen die Referenz vermessen. Zur Ermittlung der Beladung dient als Grundlage das Lambert-Beersche Gesetz. Es werden die Extinktionswerte bei  $\lambda_1 = 267$  nm,  $\lambda_2 = 289$  nm und  $\lambda_3 = 301$  nm mit folgender Gleichung ausgewertet:

$$x \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] = \frac{10000 \cdot E_{\lambda}}{\varepsilon_{\lambda} \cdot (\text{Einwaage})}$$

$x$  = Harzbeladung

$E_{\lambda}$  = Extinktion

$\varepsilon_{\lambda}$  = Extinktionskoeffizient

(Einwaage) = Harzmenge [mg]

Die Werte für die Extinktionskoeffizienten der drei Maxima betragen:

$$\varepsilon_{\lambda 1} = 17500 \text{ cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{\lambda 2} = 5800 \text{ cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{\lambda 3} = 7800 \text{ cm}^{-1}$$

Die Harzbeladung ergibt sich durch Mittelwertbildung über die drei bei den unterschiedlichen Wellenlängen berechneten Werte.

Um den Massenzuwachs bei der Beladungsbestimmung durch das Kuppeln von Fmoc-geschützten Aminosäuren zu berücksichtigen, wird folgende Korrektur verwendet:

$$x_{\text{korr}} \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] = \frac{x}{1 - x \frac{\Delta M}{1000}}$$

mit  $\Delta M = 222.3 \text{ g/mol}$  für Fmoc.

### 6.2.5 FT-ATR-IR-Spektroskopie

Alle IR-Spektren von Harzen bzw. polymergebundenen Verbindungen wurden an einem Bruker Vector 22 aufgenommen, welches mit einer SplitPea<sup>®</sup> ATR-Einheit der Firma Harrick ausgerüstet ist. Die Polymere wurden durch direktes Aufpressen auf einen Si-Kristall vermessen. Die Scanzahl betrug 16 und es wurde jeweils eine automatische ATR-Korrektur durchgeführt.

### 6.2.6 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Für analytische HPLC-Trennungen wurden zwei verschiedene Anlagen verwendet. Es wurde eine Anlage der Firma Waters (Eschborn), bestehend aus einer Steuerungseinheit 600 S, Pumpeneinheit 626, UV-Detektor 486 sowie einem 712 WISP Autosampler, eingesetzt. Die Anlage ist mit einer analytischen Trennsäule Nucleosil C18 (5  $\mu\text{m}$  Korngröße, 250 x 2 mm, Grom, Herrenberg) ausgestattet.

Weitere analytische HPLC-Trennungen wurden an einer Beckman Gold-Anlage, bestehend aus einer Steuereinheit 406, Pumpeneinheit 126, Autosampler 507 und Diodenarray-Detektor 168, durchgeführt. Als Trennsäule wurde eine Nucleosil 100 C-18, (5  $\mu\text{m}$ , 2x250 mm, Fa. Grom, Herrenberg) verwendet.

Für die Trennungen mit beiden Anlagen wurde ein Gradient von Wasser / 0,1 % TFA (v/v) (Laufmittel A) und Acetonitril / 0,1 % TFA (v/v) (Laufmittel B) bei einer Flussrate von 0,3 ml/min gefahren. Es wurden, je nach Trennproblem, folgende Gradienten eingesetzt:

- 0 % B auf 100 % B innerhalb 30 min, 100 % B für 5 min
- 10 % B auf 100 % B innerhalb 30 min, 100 % B für 5 min.

Die UV-Detektion erfolgte bei  $\lambda = 214 \text{ nm}$  und die Reinheit der Produkte wurde anhand der Peakflächen errechnet. Eine absolute Gehaltsangabe ist jedoch aufgrund der unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten der Verbindungen nicht möglich.

### 6.2.7 HPLC/MS-Analytik

Für die Aufnahmen von Massenspektren wurde das HPLC/MS-Gerät LC/MSD VL der 1100 Serie der Firma AGILENT, Waldbronn mit Elektrospray-Ionisierung (ESI) und einer Fragmentor-Spannung von 50 eV aufgenommen. Die Intensitäten sind in (%) relativ zum Basispeak (100 %) angegeben. Die Anlage ist mit einer analytischen Trennsäule Nucleosil 110-5 C<sub>18</sub> HD (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{Å}$ , 3 x 70 mm) ausgestattet. Als Laufmittel diente Reinstwasser mit 5 mmol/l NaCl und Acetonitril der Firma J. T. Baker. Bei Flussraten von 0.5 ml/min wurde der Eluentenstrom aus einer in Reihe geschalteten UV-Zelle (Detektionswellenlänge 214, 254 und 280 nm) direkt an das ES-Interface gekuppelt.

### 6.2.8 ES-Massenspektrometrie

Alle ES-MS-Messungen wurden mit einem Bruker Esquire 3000plus LC-ES-MS<sup>n</sup>-System (Bruker Daltonics, Bremen) durchgeführt. Das Massenspektrometer wurde mit der EsquireControl-Software (Bruker Daltonics Esquire NT 4.0) gesteuert. Die Proben wurden in ACN/H<sub>2</sub>O (1:1; 0,1 % Ameisensäure) gelöst und die Spektren im Positivionenmodus aufgenommen. Die Probenzuführung erfolgte über eine Spritzenpumpe (Syringe Infusion Pump 22, Harvard Apparatus, South Natick, Massachusetts, USA) mit einer Flussrate von 240 µl/h.

### 6.2.9 NMR-Spektroskopie

Alle <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren wurden an einem Bruker Avance 400 MHz Spektrometer aufgenommen.

Die hochauflösenden <sup>1</sup>H-MAS-Gelphasen-NMR-Spektren der Polymere wurden mit Hilfe eines Bruker ARX 400 MHz mit einer Rotationsfrequenz von 4500 Hz durchgeführt. Als Lösungsmittel diente MeOD oder D<sub>2</sub>O.

### 6.2.10 ESR-Spektroskopie

Die ESR-Spektren wurden auf einem Bruker ESP 300 E mit einem X-Band von 9,8 GHz aufgenommen. Die Harzproben (je 30 mg) wurden in ein Glasröhrchen eingewogen und in Chloroform gequollen. Direkt vor der Messung wurde die Probe mit Stickstoff gespült. Für die Messungen der Reaktionslösungen in DMF wurden Glasröhrchen mit einem sehr dünnen Querschnitt verwendet.

### 6.2.11 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Konfokale Fluoreszenzaufnahmen wurden an einem LSM 510 Laser Scanning Microscope (Carl Zeiss, Göttingen) aufgenommen, welches mit einem Plan-Apochromat 63 × 1.4 A Objektiv ausgerüstet ist. Für die zweifache Detektion des Fluorescein-gelabelten Dendrimers und des AlexaFluor 647 Dextrans wurde die 488 nm-Linie eines Argon-Ionen-

Lasers und das Licht eines 633 nm Helium/Neon-Lasers auf einen HFT UV 488/633 Strahlenteiler gerichtet. Fluoreszenz wurde durch Verwendung eines NFT 545 Strahlenteilers detektiert, in Kombination mit einem 505-530 Breitbandfilter für die Detektion des Fluorescein und einen LP 650 Filter für die AlexaFluor 647-Detektion.

## 6.3 Experimenteller Teil zu Kap. 4.1 und 4.2

### 6.3.1 Synthese der Ultraharze

In ein 50 ml-Rundkolben mit Magnetprüher wurde PEI-1 (M 243.65 g/mol, 4.2 g, 17.24 mmol) oder PEI-2 (M 366.7 g/mol, 4.2 g, 11.45 mmol) in trockenem THF gelöst. Die entsprechende Menge an Terephthalaldehyd wurde in THF mit einer Konzentration zwischen 0.7 und 0.94 mmol/ml gelöst und schnell zu der PEI-Lösung gegeben. Die entstehende Mischung erwärmte sich spontan auf 42 °C. Nach einer bestimmten Zeit (10 min bis zu 1 h) wurde das Polymer fest. Nach insgesamt 4 h wurde das Polymer in kleine Teile zerstoßen und mit NaBH<sub>4</sub> (3 eq. bezogen auf die Menge an eingesetztem Terephthalaldehyd) in THF/MeOH (100 ml, 2:1 (v:v)) für 16 h reduziert. Um überschüssiges NaBH<sub>4</sub> zu entfernen, wurde das Polymer in die Hydrochloridform durch Behandlung mit Salzsäure (1 N, 1 h) gebracht. Das stark gequollene Polymer wurde über eine Glasfritte filtriert, mit Wasser gewaschen und mit NaOH (2N) für 15 min gerührt, um das Polymer wieder in die freie Aminform zu transformieren. Nach Waschen mit Wasser, THF und MeOH, wurde das gequollene Polymer durch ein Metallsieb (Porengröße 400 µm) gepresst. Nach Filtrieren und Waschen mit THF und DCM, wurde das Ultraharz im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet.

FT-ATR-IR-Daten: 1116, 1451, 1510, 2812, 2890, 3300 cm<sup>-1</sup>.

**UH 1:** TPA (3.43 g, 25.57 mmol) wurde in THF (30 mL) gelöst und zu einer Lösung von PEI-1 (4.2 g, 17.24 mmol) in THF (10 mL) gegeben. Nach 13 min Stillstand des Magnetprühers. Elementaranalyse: C 66.19, H 9.14, N 20.01, Cl 0.07 %. Ausbeute 4.3 g (59.9 %). <sup>1</sup>H-MAS-NMR (400 MHz, MAS mit 4500 Hz, MeOD): δ = 2.2-3.0 (m, PEI-CH<sub>2</sub>, rel. Integral 100), 3.72 (bs, sek.-N-CH<sub>2</sub>-aryl, 25.9), 4.56 (bs, tert.-N-CH<sub>2</sub>-aryl, 0.94), 7.35 ppm (bs, aryl-H, 28.4).

**UH 2:** TPA (3.9 g, 29.07 mmol) wurde in THF (35 mL) gelöst und zu einer Lösung von PEI-1 (4.2 g, 17.24 mmol) in THF (10 mL) gegeben. Nach 10 min Stillstand des Magnetührers. Elementaranalyse: C 64.44, H 12.3, N 19.09, Cl 0 %. Ausbeute 4.97 g (65.6 %). <sup>1</sup>H-MAS-NMR (400 MHz, MAS mit 4500 Hz, MeOD):  $\delta = 2.1-3.1$  (m, PEI-CH<sub>2</sub>, rel. Integral 100), 3.72 (bs, sek.-N-CH<sub>2</sub>-aryl, 28.3), 4.52 (bs, tert.-N-CH<sub>2</sub>-aryl, 1.9), 7.0-7.5 ppm (bs, aryl-H, 31.3).

**UH 3:** TPA (4.85 g, 36.16 mmol) wurde in THF (45 mL) gelöst und zu einer Lösung von PEI-2 (4.2 g, 17.24 mmol) in THF (10 mL) gegeben. Nach 15 min Stillstand des Magnetührers. Elementaranalyse: C 67.59, H 11.8, N 18.53, Cl 0 %. Ausbeute 4.51 g (53.7 %). <sup>1</sup>H-MAS-suspension NMR (400 MHz, MAS mit 4500 Hz, MeOD):  $\delta = 2.0-3.0$  (m, PEI-CH<sub>2</sub>, rel. Integration 100), 3.72 (bs, sek.-N-CH<sub>2</sub>-aryl, 30.1), 4.54 (bs, tert.-N-CH<sub>2</sub>-aryl, 4.7), 6.9-7.4 ppm (bs, aryl-H, 36.2).

**UH 4:** TPA (2.36 g, 17.59 mmol) wurde in THF (25 mL) gelöst und zu einer Lösung von PEI-2 (4.2 g, 11.48 mmol) in THF (10 mL) gegeben. Nach 10 min Stillstand des Magnetührers. Elementaranalyse: C 61.55, H 9.03, N 20.73, Cl 0 %. Ausbeute 4.72 g (75.6 %). <sup>1</sup>H-MAS-NMR (400 MHz, MAS mit 4500 Hz, MeOD):  $\delta = 2.0-3.0$  (m, PEI-CH<sub>2</sub>, rel. Integral 100), 3.72 (bs, sek.-N-CH<sub>2</sub>-aryl, 18.7), 4.54 (bs, tert.-N-CH<sub>2</sub>-aryl, 1.0), 7.0-7.5 ppm (bs, aryl-H, 20.3).

**UH 5:** TPA (3.33 g, 24.82 mmol) wurde in THF (30 mL) gelöst und zu einer Lösung von PEI-2 (4.2 g, 11.48 mmol) in THF (10 mL) gegeben. Nach 10 min Stillstand des Magnetührers. Elementaranalyse: C 64.87, H 10.63, N 20.35, Cl 0.1 %. Ausbeute 4.25 g (60.0 %). <sup>1</sup>H-MAS-NMR (400 MHz, MAS mit 4500 Hz, MeOD):  $\delta = 2.0-3.1$  (m, PEI-CH<sub>2</sub>, rel. Integral 100), 3.72 (bs, sek.-N-CH<sub>2</sub>-aryl, 22.7), 4.53 (bs, tert.-N-CH<sub>2</sub>-aryl, 1.9), 7.0-7.4 ppm (bs, aryl-H, 25.3).

**UH 6:** TPA (4.29 g, 31.98 mmol) wurde in THF (40 mL) gelöst und zu einer Lösung von PEI-2 (4.2 g, 11.48 mmol) in THF (10 mL) gegeben. Nach 60 min Stillstand des Magnetührers. Elementaranalyse: C 66.4, H 10.51, N 19.21, Cl 0 %. Ausbeute 3.8 g (48.1 %). <sup>1</sup>H-MAS-NMR (400 MHz, MAS mit 4500 Hz, MeOD):  $\delta = 2.0-3.0$  (m, PEI-CH<sub>2</sub>, rel. Integral 100), 3.72 (bs, sek.-N-CH<sub>2</sub>-aryl, 24.0), 4.52 (bs, N-CH<sub>2</sub>-aryl, 6.2), 6.9-7.4 ppm (bs, aryl-H, 32.2).

### 6.3.2 Charakterisierung von PEI-1 und PEI-2

Der Polymerisationsgrad  $n$  wurde aus dem N/C-Verhältnis aus Daten der Elementaranalyse errechnet [ $n = 0.583/(N/C - 0.583)$ ].

PEI-1: C 51.60, H 11.72, N 35.82 %, N/C = 0.694,  $n = 5.27$ , durchschnittliches Molekulargewicht 243.65 g/mol.

PEI-2: C 52.56, H 12.16, N 34.43 %, N/C = 0.655,  $n = 8.132$ , durchschnittliches Molekulargewicht 366.7 g/mol.

Die Anzahl der Protonen von PEI-1 und PEI-2 wurden anhand des Polymerisationsgrades  $n$  und der allgemeinen Formel für PEI berechnet, und mit den Ergebnissen der Integration der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren verglichen.

PEI-1: Theorie für  $n = 5.27$ : CH 21.08, NH 8.27. Ergebnisse aus den  $^1\text{H-NMR}$  Messungen (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): CH Protonen (m, 2.53 - 2.14) 21.08, NH Protonen (s, 1.02 ppm) 7.45.

PEI-2: Theorie für  $n = 8.132$ : CH 32,528, NH 11.132. Ergebnisse aus den  $^1\text{H-NMR}$  Messungen (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): CH Protonen (m, 2.72 - 2.22) 32.528, NH Protonen (s, 1.16 ppm) 10.51.

### 6.3.3 Peracetylierung von PEI-1 und PEI-2

PEI-1 (224 mg, 5.74 mmol) wurde in DCM (5 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von Acetanhydrid (662  $\mu\text{l}$ , 7 mmol) und Pyridin (563  $\mu\text{l}$ , 7 mmol), wurde die Lösung für 5 h bei RT gerührt. Nach Verdampfen im Vakuum wurde ein gelb-braunes Öl erhalten.

PEI-2 (138 mg, 3.44 mmol) wurde in DCM (3 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von Acetanhydrid (425  $\mu\text{l}$ , 4.5 mmol) und Pyridin (362  $\mu\text{l}$ , 4.5 mmol), wurde die Lösung für 5 h bei RT gerührt. Nach Verdampfen im Vakuum wurde ein gelb-braunes Öl erhalten.



### 6.3.4 NMR-Messungen der peracetylierten PEIs

Peracetyliertes PEI-1 und PEI-2 (50 mg) wurde in  $\text{CDCl}_3$  (0.7 ml) gelöst. Der Integrationsbereich der primären und sekundären Amine lag zwischen 3.52 und 3.12 ppm für PEI-1 und zwischen 3.55 und 3.2 ppm für PEI-2. Für die Bestimmung der Menge an tertiären Aminen wurden die Multipletts zwischen 2.62 und 2.46 für PEI-1 und zwischen 2.95 und 2.56 ppm für PEI-2 integriert. Das Verhältnis zwischen tertiären und primären und sekundären Aminen war für PEI-1 0.36 und für PEI-2 0.39.

### 6.3.5 Kupplung von Linkermolekülen an Ultraharze

#### 6.3.5.1 2-Hydroxyacetamidharze

Ultraharze UH 1 bis UH 6 (je 100 mg) wurden in DCM gequollen und auf 0 °C abgekühlt. 2-Acetoxy-acetylchlorid (484  $\mu\text{l}$ , 4.5 mmol) und eine katalytische Menge an DMAP wurden hinzugefügt. Nach 2 min erfolgte langsam die Zugabe von Pyridin (483  $\mu\text{l}$ , 6 mmol). Die Reaktion wurde für 30 min bei 0 °C fortgeführt und anschließend auf RT erwärmt. Nach 3 h wurden die Harze mit DCM, DMF, DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Capping erfolgte mit einer Mischung von Acetanhydrid/DiPEA 1:2 (v:v) für 16 h. Nach wiederholtem Waschen und Trocknen der Harze, konnten keine primären und sekundären Amine durch Kaiser-Test bzw. Chloraniltest detektiert werden. Um die Acetylschutzgruppe abzuspalten, wurden die Harze mit NaOMe (0.5 M) in THF/MeOH für 2 h behandelt und anschließend mit MeOH, DCM gewaschen und getrocknet. Um die Beladung zu bestimmen, wurden die 2-Hydroxyacetamidharze (50 mg) mit Fmoc-Glycin (297,3 mg, 1 mmol), DIC (155  $\mu\text{l}$ , 1 mmol) und HOBT (153 mg, 1 mmol) in DMF gekuppelt. Nach 2 h wurden die Harze mit DMF gewaschen und mit der gleichen Menge an Reagenzien noch mal für 16 h umgesetzt. Nach Waschen mit DMF und DCM wurden die Harze im Vakuum getrocknet. Die Beladung wurde durch Abspaltung der Fmoc-Gruppe mit 25 % Piperidin/DMF-Lösung für 2 h und anschließender UV-Messung der Abspalllösung bestimmt.

### **6.3.5.2 4-(4-Hydroxymethyl-3-methoxy-phenoxy)-butanoylamidharze (HMPB-Harze)**

Ultraharze UH 1 bis UH 6 (je 100 mg) wurden mit 4-(4-Acetoxyethyl-3-methoxyphenoxy)buttersäure (424 mg, 1.5 mmol), DIC (232  $\mu$ l, 1.5 mmol) und HOAt (0.5 mmol/mL in DMF, 3 mL, 1.5 mmol) in DMF für 16 h gekuppelt. Nach Waschen mit DMF und DCM, wurden die Harze im Vakuum getrocknet. Das Cappen der verbleibenden Amine, die Abspaltung der Acetylschutzgruppe und die Beladungsbestimmung mit Fmoc-Glycin wurde wie in 6.3.5.1 durchgeführt.

### **6.3.5.3 4-Hydroxymethylbenzamidharze (HMBA-Harze)**

Die Vorgehensweise für die Kupplung von 4-Acetoxyethylbenzoesäure an Ultraharz entspricht exakt der Synthese der HMPB-Harze aus 6.3.5.2. Ebenfalls analog verlaufen der Cappingschritt, die Abspaltung der Acetylschutzgruppe und die Beladungsbestimmung durch Kupplung von Fmoc-Glycin.

### **6.3.5.4 Rinkamid Harze**

Für die Kupplung von p-[ $\alpha$ -[9H-Fluoren-9-yl)-methoxyformamido]-2,4-dimethoxybenzyl]-phenoxyessigsäure an die Ultraharze UH 1 bis UH 6, wurden die gleichen Kupplungsreagenzien und Reaktionsbedingungen wie in 6.3.5.2 verwendet. Die verbleibenden Amine wurden ebenfalls mit Acetanhydrid gecappt. Die Bestimmung der Beladungen konnte direkt durch Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe durchgeführt werden.

### **6.3.5.5 Synthese von 4-(4-Acetoxyethyl-3-methoxyphenoxy)buttersäure**

4-(4-Hydroxymethyl-3-methoxyphenoxy)buttersäure (2.5 g, 10 mmol) wurden mit Pyridin (6.7 ml, 80 mmol) und Acetanhydrid (3.8 ml, 40 mmol) für 4 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Ethylacetat (70 ml) wurde die Lösung zweimal mit  $\text{KHSO}_4$ -Lösung und mit Wasser (je 35 ml) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Ausbeute 1.7 g (61 %).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 2.00 (s, 3H), 2.05 (m, 2H), 2.50 (t, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.95 (t, 2H), 5.02 (s, 2H), 6.37 (m, 2H), 7.14 (d, 2H).

$^{13}\text{C}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 21.8, 24.5, 30.4, 55.6, 61.8, 66.8, 99.1, 104.9, 117.1, 129.1, 159.1, 160.6, 171.4, 177.9$ .

#### 6.3.5.6 Synthese von 4-Acetoxymethylbenzoesäure

4-Hydroxymethylbenzoesäure (700 mg, 4.6 mmol) wurden mit Pyridin (3 ml, 36.8 mmol) und Acetanhydrid (1.74 ml, 18.4 mmol) für 4 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Ethylacetat (20 ml) wurde die Lösung zweimal mit  $\text{KHSO}_4$ -Lösung und mit Wasser (je 10 ml) ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Ausbeute 840 mg (94 %).

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2.15$  (s, 3H), 5.19 (s, 2H), 7.45 (d, 2H), 8.11 (d, 2H).

$^{13}\text{C}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 21.1, 65.6, 127.9, 129.2, 130.6, 131.0, 142.1, 170.9, 171.8$ .

#### 6.3.6 Bestimmung der Quellfaktoren

Eine exakt eingewogene Menge an getrocknetem Harz wurde mit dem entsprechenden Lösungsmittel in einer 2-ml Spritze für 1 h geschüttelt. Anschließend wurde das überstehende Lösungsmittel entfernt, und das Volumen des gequollenen Harzes durch Messen der Höhe berechnet. Nach jeder Bestimmung wurde das Harz getrocknet. Um einen verlässlichen Mittelwert für die Bestimmung des Quellfaktors zu erzielen, wurden jeweils drei Messungen pro Harz und Lösungsmittel wiederholt.

#### 6.3.7 Synthese von spin-gelabelten Harzen

3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-yloxy (Carboxy-PROXYL) (0.018 mg, 0.0001 mmol) wurde mit TBTU (0.032 mg, 0.0001 mmol) und DiPEA (0.017  $\mu\text{l}$ , 0.0001 mmol) in DMF (2 mL) an die freie Aminform der Ultraharze (100 mg), an Aminomethyl-(1 % divinylbenzol-polystyrol) und an Amino-TentaGel gekuppelt. Nach 16 h wurden die Harze mit DMF und DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet.

### 6.3.8 Peptidsynthese an Ultraharzen

Für die Synthese des Peptids mit der Sequenz LKVSQAGKTLG ( $M=1100.4$  g/mol als Säure,  $M=1099.4$  g/mol als Amid) wurden HMPB- und Rinkamid funktionalisierte Ultraharze (10  $\mu\text{mol}$ ) verwendet. Jede Aminosäure (0.1 mmol) wurde mit DIC (15.5  $\mu\text{l}$ , 0.1 mmol) und HOBt (15.3 mg, 0.1 mmol) in DMF (1 mL,  $c=0.1$  mmol/mL) für 1.5 h gekuppelt. Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgte mit Hilfe von 25 % Piperidin/DMF-Lösung für 30 min. Die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde mit 95 % TFA, 2.5 % TIS und 2.5 % Wasser für 3h durchgeführt. Nach Ausfällen mit kaltem Diethylether wurden die Peptide aus *tert.*-But./Wasser (4:1 (v:v)) lyophilisiert.

## 6.4 Experimenteller Teil zu Kap. 4.3

### 6.4.1 Synthese eines Ultraharzes ausgehend von hochmolekularem PEI

In einem 500-ml Kolben wurde PEI (21 g,  $M_n$  10 000 g/mol,  $M_w$  25 000 g/mol) in THF (150 ml) gelöst. Terephthalaldehyd (11.9 g, 0.088 mol, gelöst in 125 ml THF) wurde schnell zu der Lösung unter starkem Rühren zugegeben. Die Reaktionsmischung verfestigte sich spontan, und wurde für 1 h geschüttelt. Das vernetzte Polymer wurde mit THF gewaschen, zerkleinert und in THF/MeOH (2:1 (v:v), 450 ml) suspendiert. Nach Zugabe von  $\text{NaBH}_4$  (6.7 g, 0.17 mol), wurde die Mischung für 2 h gerührt. Zur Entfernung des überschüssigen  $\text{NaBH}_4$  wurde das Polymer für 1 h mit 1 N Salzsäure behandelt. Nach Abfiltrieren und Waschen mit Wasser erfolgte die Transformierung in die freie Aminform durch Rühren in NaOH (2 N, 15 min). Das Polymer wurde mit Wasser, THF und DCM gewaschen und für 5 h bei 60 °C am Vakuum getrocknet. Das Polymer wurde durch Sieben in zwei Partikelgrößen getrennt (80-170  $\mu\text{m}$  und > 170  $\mu\text{m}$ ). Ausbeute 28 g (90 %). Elementaranalyse: C 53.1 %, H 9.9 %, N 21.1 %, Cl 0.1 %. Beladung an Aminen: 15 mmol/g. FT-ATR-IR: 798, 1114, 1460, 1508, 2817, 2937, 3220.

### 6.4.2 Synthese polykationischer Ultraharze

Das mit hochmolekularem PEI hergestellte Ultraharz (20 g) wurde in DMF (500 ml) gequollen und mit Methyljodid (426 g, 3 mol) versetzt. Nach 24 h Schütteln bei RT wurde das quarternisierte Polymer über eine Glasfritte abfiltriert, mit DMF und DCM gewaschen und bei 60 °C im Vakuum für 5 h getrocknet. Ausbeute 42.7 g eines leicht gelblichen Polymers. Elementaranalyse: C 31.3 %, H 5.8 %, N 9.2 %, I 47.5 %. FT-ATR-IR: 1460, 1612, 2784, 2949, 3402.

### 6.4.3 Beladung des polykationischen Ultraharzes mit Borhydrid durch Ionenaustausch

Das polykationische Ultraharz (32 g) wurde in Wasser gequollen und mit einer 1 M wässrigen  $\text{NaBH}_4$ -Lösung für 15 min versetzt. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Verfahrens, wurde das Harz mit destilliertem Wasser gewaschen, bis alles überschüssige  $\text{NaBH}_4$  entfernt war. Das Harz wurde im Vakuum bei 80 °C für 5 h getrocknet. Ausbeute 16 g eines farblosen Polymers. FT-ATR-IR: 1070, 1456, 1578, 2223, 2814, 2939.

### 6.4.4 Allgemeine Vorschrift für die Reduktion von Carbonylverbindungen und Nitroolefinen

4-Chlorbenzaldehyd (23.6 mg, 0.168 mmol) wurde in MeOH (2 ml) gelöst. Nach Zugabe von Borhydridharz (28 mg, 0.22 mmol, mit einer effektiven Beladung von 8 mmol/g), wurde die Reaktionsmischung für 1 h bei RT geschüttelt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde durch Dünnschichtchromatographie überprüft. Nach Zugabe von DCM (4 ml), wurde das Harz abfiltriert und dreimal mit DCM (2 ml) gewaschen. Nach Evaporieren des Lösungsmittels, wurde der 4-Chlorbenzylalkohol in reiner Form erhalten. Die Reinheit wurde mit Hilfe der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie und durch HPLC-Analyse bestimmt.

### 6.4.5 Allgemeine Vorschrift zur reduktiven Aminierung

5-Methoxytryptamin (25.2 mg, 0.133 mmol) und Cyclohexylcarbaldehyd (11.4 mg, 0.102 mmol) wurden in DCM (2 ml) gelöst. Die Lösung wurde für 3 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von Borhydridharz (51 mg, 2 eq.), wurde die Reaktionsmischung für 16 h bei RT geschüttelt. Das Harz wurde durch Filtration entfernt und dreimal mit DCM (2 ml) gewaschen. Um überschüssiges primäres Amin zu entfernen, wurde die Reaktionslösung mit Formylpolystyrolharz (0.57 mmol/g, 10 eq.) für 6 h bei 40 °C behandelt. Nach Filtration des Harzes und Waschen mit DCM (15 ml), wurde das Lösungsmittel evaporiert. Die Reinheit der sekundären Amine wurde mit Hilfe der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie und durch HPLC-Analyse bestimmt.

## 6.5 Experimenteller Teil zu Kap. 4.4

### 6.5.1 Synthese des Silyldiether-Vernetzers

#### 6.5.1.1 Synthese von 4-Hydroxymethylbenzaldehyd

Terephthalaldehyd (10.0 g, 0.075 mol) wurde in trockenem THF (66 ml) gelöst. Nach Zugabe von  $\text{NaBH}_4$  (0.8 g, 0.021 mol), wurde die Suspension für 1 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde durch Evaporieren entfernt, und der Rückstand in Ethylacetat (130 ml) aufgenommen. Die Lösung wurde mit Wasser ( $2 \times 65$  ml) und gesättigter  $\text{NaCl}$ -Lösung (65 ml) gewaschen, und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Vakuum, wurde das Rohprodukt durch Flash-Säulenchromatographie aufgereinigt ( $\text{SiO}_2$ , n-Hexan/Ethylacetat 2:1). Ausbeute 1.9 g (19 %).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 4.79$  (s, 2 H), 7.53 (d,  $^2J = 7.9$  Hz, 2 H), 7.87 (d,  $^2J = 8.1$  Hz, 2 H), 9.98 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 64.6, 127.0, 130.0, 135.7, 148.0, 192.2$ .

#### 6.5.1.2 Synthese von Diisopropyl-bis[(4-formylbenzyl)oxy]silan

Zu einer Lösung von 4-Hydroxymethylbenzaldehyd (1.124 g, 8.26 mmol) in Pyridin (11 ml) wurde Diisopropyldichlorsilan (0.746 ml, 4.13 mmol) zugegeben und für 1 h bei 60 °C erhitzt. Die Lösung wurde mit wässriger  $\text{KHSO}_4$ -Lösung (22 ml, pH 3) und DCM

(44 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde mit Wasser ( $2 \times 22$  ml) gewaschen, und über  $\text{NaSO}_4$  getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum, wurde der Rückstand durch Flash-Säulenchromatographie aufgereinigt ( $\text{SiO}_2$ , n-Hexan/EtOAc 4.25:1) Ausbeute 1.03 g (65 %).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 1.14$  (m, 14 H), 4.92 (s, 4 H), 7.48 (d,  $^2J(\text{H,H}) = 8.1$  Hz, 4 H), 7.85 (d,  $^2J(\text{H,H}) = 8.3$  Hz, 4 H), 9.99 (s, 2 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 12.3, 17.5, 64.3, 126.3, 130.0, 135.6, 148.0, 192.1$ .

## 6.5.2 Synthese des polymeren Trägers

Zu einer Lösung von PEI ( $M_n$  10.000,  $M_w$  25.000, 1.25 g) in THF (6.1 ml), wurde eine Lösung von Diisopropyl-bis[(4-formylbenzyl)oxy]silan (0.495 g, 1.29 mmol) in THF (4.6 ml) schnell zugegeben. Das Polymer bildete sich innerhalb von 1 min. Nach 4 h wurde das Polymer zerkleinert, mit THF gewaschen und in THF/MeOH (2:1 (v:v), 24 ml) suspendiert. Nach Zugabe von  $\text{NaBH}_4$  (0.097 g, 2.56 mmol) wurde die Suspension für 16 h bei RT geschüttelt. Das Polymer wurde mit THF und MeOH gewaschen, durch ein Metallsieb gepresst (Porengröße 400  $\mu\text{m}$ ), wieder mit MeOH und DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Ausbeute 1.5 g (89 %). Elementaranalyse: C 55.6, H 9.7, N 21.0.  $^1\text{H}$ -MAS-NMR (400 MHz, MeOD, MAS mit 4500 Hz):  $\delta = 0.9$ -1.2 (m, isopropyl, rel. Integral 16.7), 2.2-3.0 (m, PEI- $\text{CH}_2$ , 100), 3.72 (bs, sek-N- $\text{CH}_2$ -aryl, 2.52), 4.56 (bs, tert.-N- $\text{CH}_2$ -aryl, 0.53) 7.2-7.5 (bs, aryl-H, 6.51). FT-ATR-IR: 815, 1063, 1090, 1461, 1572, 2815, 2932, 3277  $\text{cm}^{-1}$ .

## 6.5.3 Synthese der funktionalisierten Trägermaterialien

### 6.5.3.1 Synthese von RH 1

Fmoc-Glycin (446 mg, 1.5 mmol) wurde mit TBTU (482 mg, 1.5 mmol), HOBt (230 mg, 1.5 mmol) und DIPEA (257  $\mu\text{l}$ , 1.5 mmol) in DMF (6 ml) an das unfunktionalisierte Harz (100 mg) gekuppelt. Nach 4 h wurde das Polymer mit DMF und DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die restlichen Amine des Harzbackbones wurden mit Di-*tert.*-butyl-dicarbonat (1.1 g, 5 mmol) und DIPEA (1.7 ml, 10 mmol) in DMF (5 ml) für  $2 \times 2$  h bei RT gecappt. Die Vollständigkeit der Acylierung wurde durch negativen Kaiser-Test und

Chloraniltest bewiesen. Die Beladung der Harze wurde mit UV-Spektroskopie durch Abspaltung der Fmoc-Gruppe vom Harz bestimmt.

### 6.5.3.2 Synthese von RH 2

4-[(Acetyloxy)methyl]benzoesäure (291 mg, 1.5 mmol) wurde mit TBTU (482 mg, 1.5 mmol), HOBt (230 mg, 1.5 mmol) und DIPEA (257  $\mu$ l, 1.5 mmol) in DMF (6 ml) an das unfunktionalisierte Harz (100 mg) gekuppelt. Nach 4 h wurde das Polymer mit DMF und DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die restlichen Amine des Harzbackbones wurden mit Di-*tert.*-butyl-dicarbonat (1.1 g, 5 mmol) und DIPEA (1.7 ml, 10 mmol) in DMF (5 ml) für 2  $\times$  2 h bei RT gecappt. Die Vollständigkeit der Acylierung wurde durch negativen Kaiser-Test und Chloraniltest bewiesen. Nach Abspaltung der Acetylschutzgruppe mit NaOMe (0.5 M in MeOH) für 30 min, wurde Fmoc-Glycin (446 mg, 1.5 mmol) an die freie Hydroxyfunktion des HMBA-Linkers mit MSNT (444 mg, 1.5 mmol) und MeIm (119  $\mu$ l, 1.5 mmol) in DCM (6 ml) zweimal für 3 h gekuppelt. Das Harz wurde mit DCM, DMF und DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Beladung wurde analog zu RH 1 bestimmt.

### 6.5.3.3 Synthese von RH 3

4-[(Acetyloxy)methyl]benzoesäure (16 mg, 0.08 mmol), TBTU (26 mg, 0.08 mmol), HOBt (12 mg, 0.08 mmol) und DiPEA (14  $\mu$ l, 0.08 mmol) in DMF (4 ml) wurden mit dem unfunktionalisierten Harz (200 mg) umgesetzt. Nach 4 h wurde das Polymer mit DMF und DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Nach Abspaltung der Acetylschutzgruppe mit NaOMe (0.5 M, in MeOH) für 30 min, wurde Fmoc-Glycin (238 mg, 0.8 mmol) zunächst mit MSNT (237 mg, 0.8 mmol) und MeIm (63.5  $\mu$ l, 0.8 mmol) in DCM (4 ml) für 3 h gekuppelt und anschließend mit TBTU (257 mg, 0.8 mmol), HOBt (123 mg, 0.08 mmol) und DiPEA (137  $\mu$ l, 0.8 mmol) in DMF (4 ml) für weitere 3 h gekuppelt. Das Harz wurde mit DMF und DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die restlichen freien Amine wurden mit Di-*tert.*-butyl-dicarbonat (1310 mg, 6 mmol) und DiPEA (2.06 ml, 12 mmol) in DMF (5 ml) 2  $\times$  für 2 h gecappt. Die Beladung wurde analog zu RH 1 bestimmt.



#### 6.5.4 Allgemeine Vorschrift zur Synthese peptidfunktionalisierter dendritischer Polymere

Peptide wurden nach der Fmoc-Strategie synthetisiert. Jeweils 4 eq. Aminosäure (basierend auf der Beladung des Harzes mit der ersten Aminosäure), TBTU, HOBt und DiPEA in DMF wurden für 90 min mit dem entsprechend funktionalisierten Harz gekuppelt. Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe wurde mittels 20 % Piperidin in DMF (2 × 8 min) durchgeführt. Die Vollständigkeit der Acylierung wurde durch Kaiser-Test überprüft.

Die Auflösung der peptidfunktionalisierten Harze wurde mit 95 % TFA, 2.5 % Wasser und 2.5 % TIS für 4 h bei RT durchgeführt. Nach Abfiltrieren der Lösung und Waschen mit TFA, wurden die löslichen Peptidpolymere aus kaltem Diethylether gefällt (4 ×) und lyophilisiert (*tert.*-But. : Wasser 4:1).

Die Abspaltung der geschützten Peptide vom HMBA-Linker der Harze RH 2 und RH 3 erfolgte mit TEA (10 % in MeOH) für 16 h bei RT. Nach Abfiltrieren wurde das Harz mit DMF (1 ml) gewaschen. Das Filtrat wurde evaporiert und die Schutzgruppen durch Behandlung mit 95 % TFA, 2.5 % Wasser und 2.5 % TIS für 3h bei RT entfernt. Nach Ausfällen aus kaltem Diethylether (4 x), wurden die Peptide lyophilisiert (*tert.*-But. : Wasser 4:1).

#### 6.5.5 Synthese von Fluorescein-markierten Peptidpolymeren

Die Peptide wurden wie in 6.5.4 beschrieben aufgebaut. Nach Abspaltung der letzten Fmoc-Gruppe wurde 5(6)-Carboxyfluorescein (75 mg, 0.2 mmol) an das peptidfunktionalisierte Harz (20 mg) unter Verwendung von DIC (31 µl, 0.2 mmol) und HOBt (31 mg, 0.2 mmol) in DMF (1 ml) für 16 h bei RT unter Lichtausschluss gekuppelt. Das Harz wurde mit 20 % Piperidin/DMF-Lösung gewaschen, bis die Lösung farblos war, um eventuell über Ester angebundenes Fluorescein zu entfernen. Nach Waschen mit DMF und DCM wurde das Harz im Vakuum getrocknet.

Für die Darstellung der Seitenketten Fluorescein-markierten Peptidpolymere Nr. 8 (AVPIAQKKG) und 9 (KQAI PVAKG) wurde Fmoc-Lys(Dde)-OH an Position 2 verwendet. Die letzte aminoterminal Aminosäure wurde als Boc-geschütztes Derivat eingesetzt, um die Acylierung des Aminoterminus mit Carboxyfluorescein zu vermeiden.

Die Dde-Schutzgruppe wurde mit Hydrazinhydrat (2 % in DMF) für  $2 \times 3$  min abgespalten. Die Kupplung von 5(6)-Carboxyfluorescein an die freie Aminogruppe in der Seitenkette des Lysins in Position 2 erfolgte wie oben beschrieben.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2160.
- [2] S. V. Ley, I. R. Baxendale, R. N. Bream, P. S. Jackson, A. G. Leach, D. A. Longbottom, M. Nesi, J. S. Scott, R. I. Storer, S. J. Taylor, *Perkin 1* **2000**, 3815-4195.
- [3] B. M. Trost, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 285-307.
- [4] F. Zaragoza Dörwald, „Organic Synthesis on Solid Phase“, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [5] J. S. Früchtel, G. Jung, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 19-46.
- [6] L. A. Thompson, J. A. Ellman, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 555-600.
- [7] F. Balkenhohl, C. Bussche-Hühnefeld, A. Lansky, C. Zechel, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2436-2488.
- [8] D. C. Sherrington, *Chem. Commun.* **1998**, 2275-2286.
- [9] K. C. Nicolaou, R. Hanks, W. Hartwig, „Handbook of Combinatorial Chemistry - Drugs, Catalysts, Materials“, Wiley-VCH, Weinheim **2002**.
- [10] P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. Rees, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 5643-5678.
- [11] R. E. Dolle, *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 1-41.
- [12] R. E. Dolle, *J. Comb. Chem.* **2002**, *4*, 369-418.
- [13] J. Eames, M. Watkinson, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1213-1224.
- [14] C. A. McNamara, M. J. Dixon, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3275-3299.
- [15] A. Kirschning, H. Monenschein, R. Wittenberg, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 4445-4450.

- [16] A. Kirschning, H. Monenschein, R. Wittenberg, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 650-679.
- [17] M. J. Astle in C. Calman, T. R. E. Kressman (Eds.), „Ion Exchanger in Organic and Biochemistry”, Interscience; New York, **1957**, 658.
- [18] P. Seneci, „Solid Phase Synthesis and Combinatorial Technologies” Wiley-VCH, Weinheim **2000**.
- [19] P. Hodge, „Polymer-supported Reactions in Organic Synthesis”, John Wiley & Sons Ltd., **1980**.
- [20] G. Jung, „Combinatorial Chemistry”, Wiley-VCH-Verlag, Weinheim **1999**.
- [21] D. Hudson, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 334-360.
- [22] D. Hudson, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 403-457.
- [23] R. Arshady, *J. Chromatogr.* **1991**, *586*, 181-187.
- [24] D. C. Sherrington, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2001**, *39*, 2364-2377.
- [25] R. L. Letsinger, S. B. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 3009-3012.
- [26] R. L. Letsinger, M. J. Kornet, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 5163-5165.
- [27] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3526-3527.
- [28] T. Balakrishnan, W. T. Ford, *J. Appl. Polym. Sci.* **1982**, *27*, 133-138.
- [29] V. Karmore, G. Madras, *Industr. & Engin. Chem. Res.* **2002**, *41*, 657-660.
- [30] E. Atherton, D. L. J. Clive, R. C. Sheppard, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 6584-6585.
- [31] R. Arshady, E. Atherton, M. J. Gait, K. Lee, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, *9*, 423-425.
- [32] R. Arshady, E. Atherton, D. L. J. Clive, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Perkin 1* **1981**, *2*, 529-537.

- [33] P. Kanda, R. Kennedy, J. T. Sparrow, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *38*, 385-391.
- [34] M. Kempe, G. Barany, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7083-7093.
- [35] R. Arshady, *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **1981**, *2*, 573-575.
- [36] R. Arshady, *Makromol. Chem.* **1984**, *185*, 1383-1393.
- [37] R. Arshady, F. Fallah, *J. Pol. Sci.* **1992**, *A-30*, 1705-1716.
- [38] W. Rapp, E. Bayer, „Immobilized PEG chains: Dynamics and application in peptide synthesis, immunology and chromatography” in M. J. Harris (Ed.), „Poly(ethylene glycol) chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications”, Plenum Press, New York, **1992**, 325-345.
- [39] W. Rapp in G. Jung (Ed.), „Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries“ Wiley-VCH, Weinheim **1996**, 425-464.
- [40] M. Pursch, G. Schlotterbeck, L. H. Tseng, K. Albert, W. Rapp, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2867-2869.
- [41] O. W. Gooding, S. Baudart, T. L. Deegan, K. Heisler, J. Labadie, W. S. Newcomb, J. A. Porco, P. van Eikeren, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 113-122.
- [42] M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3077-3080.
- [43] M. Renil, M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4647-4650.
- [44] M. Renil, M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6185-6188.
- [45] J. Rademann, M. Meldal, K. Bock, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1218-1225.
- [46] J. Rademann, M. Grotli, M. Meldal, K. Bock, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5459-5466.
- [47] M. Grotli, C. H. Gotfredsen, J. Rademann, J. Buchardt, A. J. Clark, J. Duus, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 108-119.
- [48] C. W. Tornøe, M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6409-6411.
- [49] P. H. Toy, T. S. Regeer, K. D. Janda, *Aldri. Act.* **2000**, *33*, 87-93.

- [50] P. H. Toy, K. D. Janda, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6329-6332.
- [51] P. H. Toy, T. S. Reger, P. Garibay, J. C. Garno, J. A. Malikayil, G. Liu, K. D. Janda, *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 117-124.
- [52] M. C. McCairn, S. T. Tonge, A. J. Sutherland, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4847-4855.
- [53] S. M. Alesso, Z. Yu, D. Pears, P. A. Worthington, R. W. A. Luke, M. Bradley, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 7163-7169.
- [54] P. G. Sasikumar, K. S. Kumar, C. Arunan, V. Pillai, *J. Chem. Soc., Perkin I* **2002**, 2886-2895.
- [55] R. Epton, D. A. Wellings, A. Williams, *React. Pol.* **1987**, *6*, 143-157.
- [56] C. Zikos, N. G. Ferderigos, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3741-3744.
- [57] Hodges J.C., L. S. Harikrishnan, S. Ault-Justus, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 80-88.
- [58] D. D. Wisnoski, W. H. Leister, K. A. Struss, Z. Zhao, C. W. Lindsley, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4321-4325.
- [59] V. Swali, N. J. Wells, G. J. Langley, M. Bradley, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4902-4903.
- [60] S. Lebreton, M. Newcomb, M. Bradley, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2475-2478.
- [61] S. Lebreton, M. Newcomb, M. Bradley, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2479-2482.
- [62] G. Cavalli, A. G. Shooter, D. Pears, J. H. G. Steinke, *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 637-644.
- [63] M. Klapper, C. Hamciuc, R. Dyllick-Brenzinger, K. Müllen, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4835-4838.
- [64] A. G. M. Barrett, B. T. Hopkins, J. Koebberling, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3301-3323.
- [65] Y. Liang, F. Svec, J. M. J. Frechet, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1997**, *35*, 2631-2643.

- [66] J. A. Porco, T. L. Deegan, W. Devonport, O. W. Gooding, K. Heisler, J. Labadie, M. Newcomb, C. Nguyen, P. van Eikeren, J. Wong, P. Wright, *Mol. Divers.* **1997**, *2*, 197-206.
- [67] H. Köster, *Tetrahedron Lett.* **1972**, 1527-1530.
- [68] A. Basso, L. De Martin, C. Ebert, P. Linda, L. Gardossi, R. V. Ulijn, S. L. Flitsch, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6083-6085.
- [69] E. Atherton, E. Brown, R. C. Sheppard, A. Rosevear, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1981**, *21*, 1151-1152.
- [70] Ph. W. Small, D. C. Sherrington, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, *21*, 1589-1591.
- [71] D. J. Gravert, K. D. Janda, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 489-509.
- [72] C. Spanka, B. Clapham, K. D. Janda, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3045-3050.
- [73] O. Shimomura, B. Clapham, C. Spanka, S. Mahajan, K. D. Janda, *J. Comb. Chem.* **2002**, *4*, 436-441.
- [74] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2091-2157.
- [75] R. S. Feinberg, R. B. Merrifield, *Tetrahedron* **1974**, *30*, 3209-3212.
- [76] A. R. Mitchell, B. W. Erickson, M. N. Ryabtsev, R. S. Hodges, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 7357-7362.
- [77] G. R. Matsueda, J. M. Stewart, *Peptides* **1981**, *2*, 45-50.
- [78] S. S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328-1333.
- [79] R. C. Sheppard, B. J. Williams, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1982**, *20*, 451-454.
- [80] H. Rink, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3787-3790.
- [81] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiou, P. Sotiriu, Y. Wenquing, W. Schäfer, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3943-3946.

- [82] E. Atherton, E. Brown, R. C. Sheppard, A. Rosevear, *J. Chem. Soc., Perkin I* **1981**, 538-546.
- [83] W. F. DeGrado, E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 1295-1300.
- [84] W. F. DeGrado, E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 3258-3261.
- [85] G. W. Kenner, J. R. McDermott, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1971**, 636-637.
- [86] B. J. Backes, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11171-11172.
- [87] C. P. Holmes, D. G. Jones, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2318-2319.
- [88] H. Kunz, B. Dombo, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 711-713.
- [89] J. Méry, C. Granier, M. Juin, J. Brugidou, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1993**, *42*, 44-52.
- [90] J.-M. Campagne, J. Coste, P. Jouin, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2079-2082.
- [91] T. Ruhland, K. Andersen, H. Pedersen, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9204-9211.
- [92] S. Kobayashi, I. Hachiya, M. Yasuda, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5569-5572.
- [93] T. L. Deegan, O. W. Gooding, S. Baudart, J. A. Porco, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4973-4976.
- [94] J. Rademann, R. R. Schmidt, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3650-3653.
- [95] C. Sylvain, A. Wagner, C. Mioskowski, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1043-1044.
- [96] H. M. Kingston, S. J. Haswell, „Microwave-enhanced Chemistry“, American Chemical Society, Washington, **1997**.
- [97] P. J. Flory, *Macromolecules* **1979**, *12*, 119-122.
- [98] P. J. Flory, J. Rehner, *J. Chem. Phys.* **1943**, *11*, 521-526.
- [99] R. Santini, M. C. Griffith, M. Qi, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8951-8954.



- [100] R. B. Merrifield, *Br. Polymer Journal* **1984**, *16*, 173.
- [101] S. R. McAlpine, S. L. Schreiber, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 3528-3532.
- [102] J. Rademann, M. Barth, R. Brock, H.-J. Egelhaaf, G. Jung, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3884-3889.
- [103] W. Li, B. Yan, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4092-4097.
- [104] D. C. Sherrington, in P. Hodge (Ed.) „Polymer-supported Reactions in Organic Synthesis”, John Wiley & Sons Ltd., **1980**,. 59-82.
- [105] T. Groth, M. Grotli, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 461-468.
- [106] B. Yan, Q. Sun, J. R. Wareing, Ch. F. Jewell, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8765-8770.
- [107] B. Yan, J. B. Fell, G. Kumaravel, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7467-7472.
- [108] P. Hodge, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 417-424.
- [109] E. T. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.
- [110] T. Vojtkovsky, *Peptide Research* **1995**, *8*, 236-237.
- [111] M. E. Attardi, M. Taddei, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2927-2927.
- [112] J. Vázquez, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6691-6693.
- [113] M. E. Attardi, G. Porcu, M. Taddei, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7391-7394.
- [114] J. K. Cho, P. D. White, W. Klute, T. W. Dean, M. Bradley, *J. Comb Chem.* **2003**, *5*, 632-636.
- [115] W. Haap, T. Redemann, J. S. Früchtel, G. Jung, *GIT Spezial Prof. Bayer* **1997**, 94-97.
- [116] W. Huber, A. Bubendorf, A. Grieder, D. Obrecht, *Anal. Chim. Acta* **1999**, *393*, 213-221.
- [117] W. Haap, T. Walk, G. Jung, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3506-3509.

- [118] B. Yan, G. Kumaravel, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *52*, 843-848.
- [119] B. Yan, G. Kumaravel, H. Anjaria, A. Wu, R. C. Petter, Ch. F. Jewell, J. R. Wareing, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5736-5738.
- [120] B. Yan, S. Yoo, *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 78-84.
- [121] J. Kress, R. Zanaletti, A. Amour, M. Ladlow, J. G. Frey, M. Bradley, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 3769-3772.
- [122] J. Kress, A. Rose, J. G. Frey, W. S. Brocklesby, M. Ladlow, M. Bradley, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3880-3883.
- [123] T. Y. Chan, R. Chen, M. J. Sofia, B. C. Smith, D. Glennon, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2821-2826.
- [124] P. A. Keifer, L. Baltusis, D. M. Rice, A. A. Tymiak, J. N. Shoolery, *J. Magn. Reson.* **1996**, *119*, 65-75.
- [125] R. Warrass, G. M. Lippens, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2946-2950.
- [126] C. Gambs, T. J. Dickerson, S. Mahajan, L. B. Pasternack, K. D. Janda, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3673-3678.
- [127] R. S. Garigipati, B. Adams, J. L. Adams, S. K. Sarkar, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2911-2914.
- [128] K. M. Halkes, C. H. Gotfredsen, M. Grotli, L. P. Miranda, J. Duus, M. Meldal, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3584-3591.
- [129] M. R. Carrasco, M. C. Fitzgerald, Y. Oda, S. B. H. Kent, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6331-6334.
- [130] K. C. Nicolaou, J. Pastor, S. Barluenga, N. Winssinger, *Chem. Commun.* **1998**, *63*, 1947-1948.
- [131] S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 5275-5276.
- [132] S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3108-3112.

- [133] C. Lagercrantz, M. Setaka, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 5652-5655.
- [134] A. R. Vaino, D. B. Goodin, K. D. Janda, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 330-336.
- [135] E. M. Cilli, R. Marchetto, S. Schreier, C. R. Nakaie, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9118-9123.
- [136] A. R. Katritzky, S. A. Belyakov, S. Strah, B. Cage, N. S. Dalal, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 407-410.
- [137] H.-J. Egelhaaf, B. Lehr, M. Hof, A. Häfner, H. Fritz, F. W. Schneider, E. Bayer, D. Oelkrug, *J. Fluoresc.* **2000**, *10*, 383-392.
- [138] E. Kumacheva, Y. Rharbi, M. A. Winnek, L. Guo, K. C. Tam, R. D. Jenkins, *Langmuir* **1997**, *13*, 182-186.
- [139] B. Yan, P. C. Martin, J. Lee, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 78-81.
- [140] R. A. Farrer, G. T. Copeland, M. J. R. Previte, M. M. Okamoto, S. J. Miller, J. T. Fourkas, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1994-2003.
- [141] J. F. Cobb, U.S. Pat. 3,336,294, **1967**.
- [142] H. F. Mark, N. M. Bikales, C. G. Overberger, G. Menges, „Encyclopedia of Polymer Science and Engineering”, John Wiley & Sons, New York, **1985**.
- [143] C. R. Dick, G. E. Ham, *J. Macromol. Sci., Chem.* **1970**, *4*, 1301-1314.
- [144] D. A. Tomalia, D. P. Sheetz, *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.* **1966**, *4*, 2253-2265.
- [145] T. Saegusa, H. Ikeda, H. Fujii, *Macromolecules* **1972**, *5*, 108-108.
- [146] P. A. Gembitskii, A. I. Chmarin, D. S. Zhuk, *Izv. Akad. Nauk Gruz. SSR, Ser. Khim.* **1972**, *8*, 1898-1898.
- [147] D. S. Zhuk, P. A. Gembitskii, A. I. Chmarin, U.S. Pat. 4,032,480, **1967**.
- [148] G. M. Lukovkin, V. S. Pshezhetsky, G. A. Murtazaeva, *Eur. Polym. J.* **1973**, *9*, 559-565.

- [149] R. E. Hosteller, J. W. Swanson, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1974**, *12*, 29-43.
- [150] I. Akasaki, in J. C. Salamone (Ed.), „Polymeric Materials Encyclopedia“, CRC Press, New York, **1996**, 6124-6132.
- [151] B. L. Rivas, H. A. Maturana, I. M. Perich, U. Angne, *Polym. Bull.* **1985**, *14*, 239-245.
- [152] B. L. Rivas, H. A. Maturana, I. M. Perich, *Polym. Bull.* **1992**, *28*, 601-606.
- [153] B. L. Rivas, H. A. Maturana, I. M. Perich, *Angew. Makromol. Chem.* **1993**, *211*, 103-112.
- [154] J. Bartulin, B. L. Rivas, M. L. Ramos, *Polym. Bull.* **1984**, *12*, 393-397.
- [155] B. L. Rivas, H. A. Maturana, J. Bartulin, R. E. Catalan, I. M. Perich, *Polym. Bull.* **1986**, *16*, 299-303.
- [156] E. J. Shepherd, J. A. Kitchener, *J. Chem. Soc.* **1957**, 86-92.
- [157] S. Nonogaki, S. Makishima, Y. Yoneda, *J. Phys. Chem.* **1958**, *62*, 601-603.
- [158] J. Bartulin, H. A. Maturana, B. L. Rivas, I. M. Perich, *Polym. Bull.* **1984**, *12*, 189-193.
- [159] G. Manecke, S. Heydolph, *Makromol. Chem.* **1981**, *182*, 2641-2657.
- [160] J. Zemek, L. Kuniak, P. Gemeiner, J. Zamocký, S. Kucár, *Enzyme Microb. Technol.* **1982**, *4*, 233-238.
- [161] T. Takagishi, I. M. Klotz, *Biopolymers* **1972**, *11*, 483-491.
- [162] T. Takagishi, T. Sugimoto, A. Hayashi, N. Kuroki, *J. Polym. Sci.* **1983**, *21*, 2311-2322.
- [163] J. Rademann, M. Barth, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3087-3090. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2975-2978.

- [164] K. Matsumoto, S. Hashimoto, T. Okamoto, S. Otani, J. Hayami, *Chem. Lett.* **1987**, 803-804.
- [165] B. Blankemeyer-Menge, M. Nimtz, R. Frank, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1701-1704.
- [166] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- [167] M. Barth, J. Rademann, *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 340-349.
- [168] T. Pierre, M. Geckle, *J. Macromol. Sci., Chem.* **1985**, *22*, 877-887.
- [169] V. K. Sarin, S. B. H. Kent, R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5463-5470.
- [170] S. A. Waggoner, O. H. Griffith, C. R. Christensen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1967**, *57*, 1198-1205.
- [171] J. H. Freed, G. K. Fraenkel, *J. Chem. Phys.* **1963**, *39*, 326-348.
- [172] O. H. Griffith, D. W. Cornell, H. M. McConnell, *J. Chem. Phys.* **1965**, 2909-2910.
- [173] S. A. Goldman, G. V. Bruno, J. H. Freed, *J. Phys. Chem.* **1972**, *76*, 1858-1860.
- [174] B. Sansoni, O. Sigmund, *Naturwissenschaften* **1961**, *48*, 598-599.
- [175] H. W. Gibson, F. C. Bailey, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, *22*, 815-815.
- [176] A. R. Sande, M. H. Jagadale, R. B. Mane, M. M. Salunkhe, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 3501-3504.
- [177] N. M. Yoon, E. G. Kim, H. S. Son, J. Choi, *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 1595-1599.
- [178] N. M. Yoon, B. P. Kyoung, S. G. Young, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *24*, 5367-5370.
- [179] B. Tamami, H. Mahdavi, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 821-826.
- [180] R. Duncan, *Nature* **2003**, *2*, 347-360.
- [181] U. Boas, P. M. H. Heegaard, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 43-63.

- [182] S.-E. Stiriba, H. Frey, R. Haag, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1385-1390.
- [183] D. Fischer, Th. Bieber, Y. Li, H.-P. Elsässer, Th. Kissel, *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1273-1279.
- [184] W. T. Godbey, K. K. Wu, A. G. Mikos, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 5177-5181.
- [185] T. Merdan, K. Kunath, D. Fischer, J. Kopecek, T. Kissel, *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 140-146.
- [186] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 2755-2794.
- [187] L. Bracci, C. Falciani, B. Lelli, L. Lozzi, Y. Runci, A. Pini, M. Graziella de Montis, A. Tagliamonte, P. Neri, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46590-46595.
- [188] J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 5409-5413.
- [189] D. N. Posnett, H. McGrath, J. P. Tam, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 1719-1725.
- [190] C. Rao, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6975-6976.
- [191] J. Shao, J. P. Tam, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3893-3899.
- [192] J. P. Tam, Y.-A. Lu, J.-L. Yang, *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 923-932.
- [193] L. Crespo, G. Sanclimens, B. Montaner, R. Perez-Tomas, M. Royo, M. Pons, F. Albericio, E. Giralt, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8876-8883.
- [194] Y. Kim, F. Zeng, S. C. Zimmerman, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2133-2138.
- [195] A. Herrmann, G. Mihov, G. W. M. Vandermeulen, H. A. Klok, K. Müllen, *Tetrahedron* **2003**, 3925-3935.
- [196] A. V. Purandare, M. Poss, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *39*, 935-938.
- [197] P. Conti, D. Demont, J. Cals, H. C. J. Ottenheijm, D. Leysen, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2915-2918.

- [198] J. H. Wood, R. E. Gibson, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 393-395.
- [199] J. H. Wood, C. C. Tung, M. A. Perry, R. E. Gibson, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 2992-2993.
- [200] T. D. Nelson, R. D. Crouch, *Synthesis* **1996**, *9*, 1031-1069.
- [201] C. Mak, N. Bampos, S. Darling, M. Montalti, L. Prodi, J. K. M. Sanders, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4476-4486.
- [202] R. Fischer, O. Mader, G. Jung, R. Brock, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 653-660.
- [203] R. Cartier, R. Reszka, *Gene Therapy* **2002**, *9*, 157-167.
- [204] C. Plank, B. Oberhauser, K. Mechtler, C. Koch, E. Wagner, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 12918-12924.

## Eigene Publikationen

M. Barth, R. Fischer, R. Brock, J. Rademann, Reversible cross-linking of hyperbranched polymers: A strategy for the combinatorial decoration of multivalent scaffolds, *Angew. Chem.* **2004**, accepted.

M. Barth, S. T. A. Shah, J. Rademann, High loading polymer reagents based on polycationic ultragels. Polymer-supported reductions and oxidations with increased efficiency, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 8703-8709.

M. Barth, J. Rademann, Tailoring Ultraresins based on the cross-linking of polyethylene imines. Comparative investigation of the chemical composition, the swelling, the mobility, the chemical accessibility, and the performance in Solid-Phase Synthesis of very high loaded resins, *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 340-349.

J. Rademann, M. Barth, ULTRA loaded resins based on the cross-linking of linear poly(ethylene imine). Improving the atom economy of Polymer-supported chemistry, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3087-3090; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2975-2978.

J. Rademann, M. Barth, R. Brock, H.-J. Egelhaaf, G. Jung, Spatially resolved single bead analysis: Homogeneity, diffusion, and adsorption in cross-linked polystyrene, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3884-3889.



Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, K. W. Bock, H. Brendle, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, W. Göpel†, G. Häfelinger, H.-P. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, W. Jäger, J. Jauch, G. Jung, S. Kemmler-Sack†, B. Koppenhöfer, D. Krug, N. Kuhn, E. Lindner, M. E. Maier, H. A. Mayer, H.-J. Meyer, U. Nagel, W. Nakel, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, H. Pommer, G. Reinhardt, V. Schurig, M. Schwarz, E. Schweda, F. F. Seelig, B. Speiser, H. Stegmann, J. Strähle, W. Voelter, U. Weimar, K.-P. Zeller, C. Ziegler

## Lebenslauf

## Michael Barth

03. November 1973	geboren in Freudenstadt
Familienstand	ledig
1980 - 1984	Hartranft-Grundschule Freudenstadt
1984 - 1993	Kepler-Gymnasium Freudenstadt
Mai 1993	Abitur
Juli 1993 - September 1994	Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz, Kreisverband Freudenstadt
Oktober 1994 - September 2000	Chemiestudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
September 1996	Vordiplom
Januar 2000	mündliche Diplomprüfungen
März 2000 – September 2000	Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel „Charakterisierung von polymeren Trägermaterialien“ am Institut für Organische Chemie unter der Anleitung von Prof. Dr. J. Rademann und Prof. Dr. G. Jung
Oktober 2000 – Juli 2004	Anfertigung der Doktorarbeit mit dem Titel „Entwicklung neuer hochbeladener Trägermaterialien für die organische Festphasensynthese auf der Basis von vernetztem Polyethylenimin (Ultraharze) - Anwendung im Bereich der Peptidsynthese, für Polymerreagenzien und zur Synthese von peptidfunktionalisierten dendritischen Polymeren“ am Institut für Organische Chemie unter der Anleitung von Prof. Dr. J. Rademann und Prof. Dr. G. Jung
Oktober 2000 – September 2003	Promotionsstipendiat im DFG-Graduiertenkolleg „Chemie in Interphasen“

